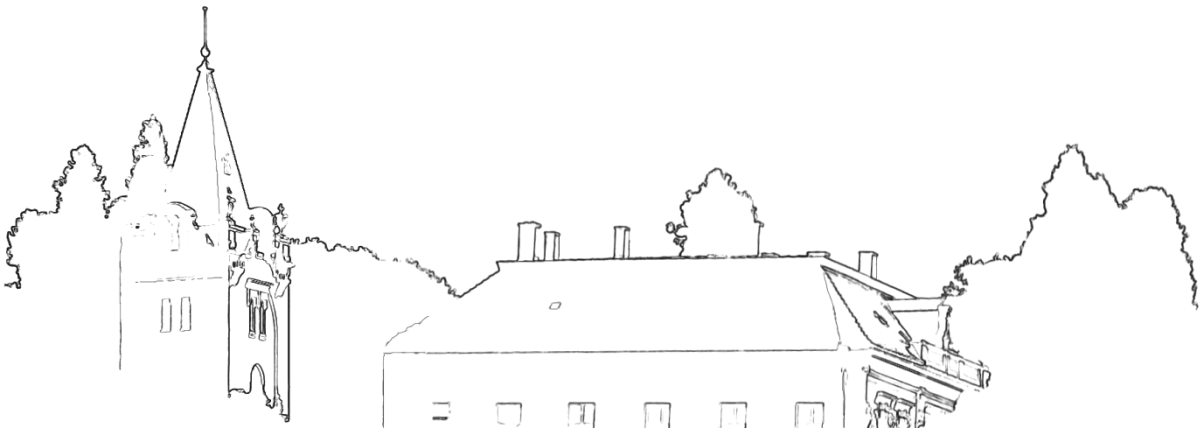
Recenzovaný zborník príspevkov z vedeckej konferencie

DENDROLOGICKÉ DNI
V ARBORÉTE MLYŇANY SAV 2016

"*Dreviny v meniacom sa prostredí*"

Arborétum Mlyňany SAV,
detašované pracovisko
Ústavu ekológie lesa SAV

Vo Vieske nad Žitavou,
5. októbra 2016



Arborétum Mlyňany SAV

Ústav ekológie lesa SAV

Slovenská spoločnosť pre
poľnohospodárske, lesnícke
a veterinárne vedy pri SAV

Vedecký výbor konferencie:

prof. RNDr. Elena Masarovičová, DrSc., Univerzita Komenského, Bratislava
doc. Dr. Ing. Alena Salašová, Mendlova univerzita, Brno, Česká republika
Dr. Ines Grigorescu, Geografický ústav RA, Bukurešť, Rumunsko
Ing. Lenka Langhansová, PhD., Ústav experimentálnej botaniky AV ČR, Praha, Česká republika
prof. Ing. Ján Supuka, DrSc., Slovenská poľnohospodárka univerzita, Nitra
doc. Ing. Ivan Lukáčik, CSc., Arborétum Borová hora, Technická univerzita, Zvolen
Ing. Jana Konôpková, PhD., Arborétum Mlyňany, Ústav ekológie lesa SAV, Vieska nad Žitavou

Recenzenti príspevkov:

prof. Ing. Pavel Hrubík, DrSc., Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Dr. Ing. Peter Kelbel, Botanická záhrada Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Ing. Martin Suvák, PhD., Botanická záhrada Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Organizačný výbor konferencie:

Ing. Peter Ferus, PhD.
Ing. Marek Barta, PhD.
RNDr. Dominika Bošiaková
Ing. Zuzana Švecová

Zborník zostavili:

Ing. Marek Barta, PhD.
Ing. Peter Ferus, PhD.

ISBN 978-80-89408-26-9

OBSAH

BARANEC, T. – IKRÉNYI, I. – GALUŠČÁKOVÁ, Ľ. Biokoridory a inváznе druhy drevín	**5**
BARTA, M. Entomopatogénne huby ako endofyty asimilačných pletív drevín v Arboréte Mlyňany SAV	**14**
BARTA, M. – MEDO, J. – ZACH, P. Entomopatogénne huby (Ascomycota, Hypocreales) parazitujúce na imágach inváznej lienky *Harmonia axyridis* v Arboréte Mlyňany SAV	**25**
BOŠEĽOVÁ, D. – ŽIAROVSKÁ, J. Genomická variabilita včlenení retrotranspozónov druhu *Hedera helix* L.	**35**
ĎURAČKA, M. – MICHALKO, J. – MATUŠÍKOVÁ, I. – TVRDÁ, E. Antioxidant effects of *schizandra* and bilberry extracts on male gametes	**41**
ĎURIŠOVÁ, Ľ. – ŽABKA, M. – BARANEC, T. Vitalita peľu hybridných taxónov rodu *Prunus* L.	**47**
ELIÁŠ, P. Morfologická plasticita drevín – ako definovať jedinca?	**54**
ELIÁŠ, P. Premenlivosť listových znakov stromov v (lesnom) spoločenstve	**59**
ELIÁŠ, P. jun. – ĎURIŠOVÁ, Ľ. – BARANEC, T. Cenologické nároky skalníka matranského (*Cotoneater matrensis*) v npr Zoborská lesostep (pohorie Tríbeč)	**65**
FERIANCOVÁ, Ľ – KUCZMAN, G. Potenciál nových mediterránnych druhov drevín pre záhradnú a krajinársku tvorbu slovenských miest	**71**
FERUS, P. – HOŤKA, P. – KONÔPKOVÁ, J. – PASTIRČÁK, M. – MAJESKÁ, M. – GUBIŠ, J. Zdravotný stav zbierky rododendronov v Arboréte Mlyňany ÚEL SAV: súčasnosť a vyhliadky do budúcnosti	**76**
FILOVÁ, A. Effect of the culture medium and biotic stimulation on taxane production in *Taxus baccata* L. *in vitro* cultures	**82**
GAJDOŠOVÁ, A. – HUNKOVÁ, J. – LIBIAKOVÁ, G. Mikropropagácia introdukovaných druhov drobného ovocia: *Amelanchier alnifolia*	**90**
GALGÓCI, M. – KORMUŤÁK, A. – SÚKENÍKOVÁ, D. – TOKOŠOVÁ, E. – GÖMÖRY, D. Kríženeľnosť druhov *Pinus sylvestris* L., *Pinus mugo* Turra a ich predpokladaných hybridných rojov	**94**
GÁPER, J. – NÁPLAVOVÁ, K. Characterization and host range of the wood-decaying polypore *Fomes fasciatus*	**100**
GÁPEROVÁ, S. – KRUŽLÍKOVÁ, M. – GÁPER, J. – GAŠPARCOVÁ, T. Atakcia drevín drevorozkladajúcimi trúdnikmi v sídlach Tekova	**106**
GRIGORESCU, I. – KUCSICSA, G. – DUMITRAŞCU, M. – DOROFTEI, M. Assessing invasive terrestrial plant species in selected protected areas in Romania	**113**
HRICÁKOVÁ, N. – MEDO, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – FERUS, P. – BARTA, M. Mikrobiálne osídlenie koreňov a listov drevín s dôrazom na *Gleditsia triacanthos*	**121**
HRUBÍK, P. – HOLEČKOVÁ, D. Analýza základných klimatickýh faktorov v Arboréte Mlyňany SAV vo Vieske nad Žitavou za obdobie rokov 2001–2015	**129**
IVANOVÁ, H. Výskyt a charakteristika húb *Pestalotiopsis funerea* a *Truncatella hartigii* na vybraných druhoch borovíc v Arboréte Mlyňany	**137**
KONÔPKOVÁ, J. – BOŠIAKOVÁ, D. – HOŤKA, P. – FERUS, P. Mikropropagácia rododendronov	**141**
LANGHANSOVÁ, L. – MARŠÍK, P. Anticancer and anti-inflammatory activity of *Myrica rubra* leaves	**146**

LUKÁČIK, I. – SARVAŠOVÁ, I. – JANKOVSKÁ, P.
Hodnotenie rastových charakteristík pôvodov brezy svalcovitej (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merkl.) z Nízkych Beskýd vysadených v Arboréte Borová hora **155**

MAKOVÁ, J. – POLLÁKOVÁ, N. – JAVOREKOVÁ, S. – MEDO, J. – KOVÁCSOVÁ, S. – CHAROUSOVÁ, I. – HALENÁROVÁ, E.
Vplyv zalesňovania vinohradu na vybrané chemické a biologické vlastnosti pôdy v Arboréte Mlyňany **161**

MASAROVIČOVÁ, E. – MÁJEKOVÁ, M. – VYKOUKOVÁ, I.
Plasticita rastlín – základ biodiverzity a stability ekosystémov **167**

MICHALKO, J. – MEDO, J. – BARTA, M. – BIBEŇ, T.
Microbial communities in leaves of evergreen woody plants growing in Mlyňany Arboretum **174**

MŇAHONČÁKOVÁ, E. – HRUBÍK, P.
Významnejšie stromy ginka dvojlaločného (*Ginkgo biloba* L.) v Nitrianskom samosprávnom kraji ako zdroj fytogenofondu pre jeho pestovanie na Slovensku **178**

NÁPLAVOVÁ, K. – GÁPER, J.
Fomes fomentarius on woody plants in Norway **182**

OSTROVSKÝ, R. – KOBZA, M.
Vplyv jednosmerného elektrického prúdu na rast hypovirulentnej formy huby *Cryphonectria parasitica* **188**

PAGANOVÁ, V. – JUREKOVÁ, Z. – LICHTNEROVÁ, H. – ČERNÁ, J.
Medzidruhové rozdiely v raste koreňov drevín v podmienkach sucha **194**

PASTIRČÁK, M. – MAJESKÁ, M. – FERUS, P. – GUBIŠ, J.
Diverzita mikroskopických húb na konároch rododendronov v Arboréte Mlyňany **201**

PASTIRČÁKOVÁ, K. – ADAMČÍKOVÁ, K.
Druhová diverzita patogénnych húb na gaštane jedlom v rôznych typoch porastov **205**

POLLÁKOVÁ, N. – ŠIMANSKÝ, V. – KONÔPKOVÁ, J.
Pôdne subtypy v Arboréte Mlyňany **208**

PŠIDOVÁ, E. – MAJEROVÁ, J. – JEŽÍK, M. – SLUGEŇOVÁ, K. – DITMAROVÁ, Ľ.
Vybrané populácie jedle a ich odozva na aktuálne podmienky prostredia počas vrcholu vegetačnej sezóny 2015 **209**

ROVNÁ, K. – BAKAY, L.
Ekologické požiadavky druhov *Rosa* L. a zhodnotenie ich výskytu v juhovýchodnej časti Krupinskej planiny **216**

SALAJ, T. – HAZUBSKA-PRZYBYL, T. – MATÚŠOVÁ, R. – KLUBICOVÁ, K. – SALAJ, J.
Biological characterisation of *Pinus nigra* Arn. embryogenic tissues *in liquid* culture system **220**

TÓTH, A.
Druhová diverzita drevín vo vidieckej krajine **224**

TVRDÁ, E. – MICHALKO, J. – MATUŠÍKOVÁ, I. – LUKÁČ, N.
Plant extracts: alternative *in vitro* supplements to preserve male fertility **229**

UHRIN, P. – SUPUKA, J.
Hodnotenie miery poškodenia tisu obyčajného (*Taxus baccata* L.) v mestskom prostredí **239**

VESELÝ, O. – MARŠÍK, P. – LANGHANSOVÁ, L. – MOŤKOVÁ, K. – BOŽIK, M. – VANĚK, T.
Minoritní evropské lesní dřeviny jako potenciální zdroj biologicky aktivních látek **247**

SZLOVÁKOVÁ, T. – POLLÁKOVÁ, N.
Zmena obsahu labilných foriem uhlíka v pôde so zmeneným využívaním **253**

Zoznam autorov **257**

BIOKORIDORY A INVÁZNE DRUHY DREVÍN

BIOCORRIDORS AND INVASIVE WOODY PLANTS

TIBOR BARANEC – IVAN IKRÉNYI – ĽUDMILA GALUŠČÁKOVÁ

BARANEC, T. – IKRÉNYI, I. – GALUŠČÁKOVÁ, Ľ. 2016. Biokoridory a inváze druhy drevín. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 5-13. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Agricultural activities are the main reasons for landscape fragmentation. Bio-corridors are effective conservation tools that provide linkage between fragmented habitats and biocenters. Phytosociological methods based on Zurich-Montpellier school were applied to determine and evaluate phytocoenoses of ecological corridors in marginal zones of the agricultural landscape at three localities (Veľké Úľany, Chynoriansky luh, Čechynce and Horný Ohaj) located in the Western and Southern regions of Slovakia. Based on the results of our assessment, vegetation at Chynoriansky luh locality is classified as *Ulmeto - Fraxinetum carpineum* forest type and *Saliceto – Populetum* forest type at localities Čechynce, Veľké Úľany and Horný Ohaj. Skeleton of the ecological corridors comprises tree species. The shrub undergrowth is represented considerably and comprises particularly *Prunetalia spinosae* shrub populations with dominance of sloe hybrids (*Prunus × fruticans*). Autochthonous sloe species (*Prunus spinosa*) is gradually replaced with its hybrids. Phytocoenoses of ecological corridors comprise also species that penetrate from adjacent agrobiocoenoses and setlments and does a potential danger of autochthonous populations of dominant species.

Key words: bio-corridor, allien woody plants, phytocoenology, agricultural landscape, Slovakia

ÚVOD

Dlhodobým vplyvom činnosti človeka na prírodné biotopy sa finalizovalo prostredie do podoby sekundárnych biocenóz pozostávajúcich z menších a väčších fragmentov prirodzených stanovíšť (BARANEC et al. 2009). Najčastejšími dôvodmi fragmentácie krajiny sú intenzívna poľnohospodárska činnosť a urbanizácia (REHÁČKOVÁ et al. 2007). Fragmentácia biotopov je dynamický proces, ktorého výsledkom sú výrazné zmeny v krajinnej štruktúre (BENNETT 2003), redukcia diverzity (ŠARAPATKA, NIGGLI 2008) a úbytok druhov v našich podmienkach (RUŽIČKOVÁ, ŠÍBL et al. 2000). Vo vysoko fragmentovanej krajine vzrastá význam prepojenia stanovištných biotopov a zlepšenia ich kvality (BARANEC et. al. 2010). Biokoridory, ako líniové prvky nelesnej drevinovej vegetácie (NDV) v poľnohospodárskej krajine, sú dôležitým nástrojom ochrany životného prostredia. Napomáhajú zachovať biodiverzitu a prepojenosť krajiny (BEIER, NOSS, 1998). Zastúpenie prvkov NDV v poľnohospodárskej krajine nížinnej oblasti južného Slovenska je 2-3%. Z funkčného hľadiska by bolo vhodné zvýšiť ich zastúpenie minimálne na 3-5% (SUPUKA 2005).

Funkčnosť biokoridoru je podmienená jeho priestorovými parametrami (dĺžka a šírka), štruktúrou a druhovým zložením biocenóz, stavom trvalých ekologických podmienok (MÍCHAL 1994), typom vegetácie tvoriacej biokoridor, typom priľahlej vegetácie a spôsobom využívania okolitého územia.

Vegetačná štruktúra biokoridorov, ktoré sa vyvinuli na neobrábaných plochách poľnohospodárskej pôdy oblasti juhozápadného Slovenska je tvorená prevažne populáciami radu *Prunetalia spinosae*, ktorých dominantné druhy patria do rodov *Prunus, Crataegus a Rosa* (BARANEC et al. 2009). V práci sa zaoberáme floristickou analýzou, ako aj zložením vegetácie biokoridorov v oblasti južného a západného Slovenska.

MATERIÁL A METÓDY

Charakteristika záujmového územia

Floristickú štruktúru biokoridorov sme hodnotili na lokalitách: Veľké Úľany, Chynoriansky luh, Čechynce a Horný Ohaj (Tabuľka 1).

Tab. 1 Základná charakteristika skúmaných lokalít.

Lokalita			
	Veľké Úľany	**Čechynce**	**Chynorianský luh**
Lokalizácia	Trnavský kraj, okres Galanta zemep. šírka 48° 11' 28.84'' S, zemep. dĺžka 17° 35' 10.01'' V	Nitriansky kraj, okres Nitra zemep. šírka 48° 15' 23''S zemep. dĺžka 18° 09' 37''S	Trenčiansky kraj, okres Partizánske zemep. šírka 48° 36' 35''S, zemepis. dĺžka 18° 16' 28'' V
Nadmorská výška	118 m n. m.	133 m n. m.	178 m n. m
Pôdne pomery	Fluvizem, stredne ťažká, karbonátová pôda	Černozem nivná	Fluvizem glejová, karbonátová, vysoké zastúpenie ílovej frakcie
Klimatické pomery	Veľmi teplá a suchá klimatická oblasť s ročným úhrnom zrážok 550 - 580 mm	Teplá klimatická oblasť, suchý klimatický okrsok s miernou zimou	Teplá klimatická oblasť
Veľkosť koridoru	Dĺžka 144 m, Šírka 20 m	Dĺžka 587 m, Šírka 15 m	Dĺžka 303 m, Šírka 10 m
Expozícia úseku koridoru	Orientácia biokoridoru severojužná, hodnotený úsek zo západnej strany	Orientácia biokoridoru východozápadná, hodnotený úsek zo severovýchodnej strany	Orientácia biokoridoru severojužná, hodnotený úsek zo západnej strany
Syntaxonomická štruktúra	*Saliceto – Populetum, Ulmeto - Fraxinetum*	*Saliceto - Populetum*	*Querco-roboris Fraxinetea Ulmeto-Fraxinetum carpineum*

Analýza floristického zloženia biokoridorov

Lokálne krovinaté fytocenózy s dominantným zastúpením druhu *Prunus spinosa s.l.*, ktoré sa vyskytujú predovšetkým v podobe neudržiavaných subspontánnych krovinných pásov (biokoridorov) na okrajoch poľnohospodársky využívaných pôd boli skúmané na vybraných lokalitách.

Analýza floristickej skladby a priestorovej štruktúry rastlinných spoločenstiev zvolených úsekov biokoridorov na vybraných lokalitách sa realizovala pomocou metód fytocenológie podľa metodiky autorov MORAVEC et al. (1994) a KRIŽOVÁ (1995). Pri výbere výskumných plôch sme postupovali subjektívnym výberom, ktorý pozostáva z týchto krokov:

1. Predbežné rozlíšenie a vymedzenie jednotlivých typov rastlinných spoločenstiev na vybraných lokalitách.
2. Rozmiestnenie výskumných plôch.
3. Overenie minimálnej veľkosti výskumných plôch a homogenity porastu.
4. Vlastná analýza a vyhotovenie fytocenologických zápisov.

Fytocenologické zápisy sú uvádzané latinskými názvami a zapísané podľa zastúpenia v jednotlivých etážach. Pre označenie jednotlivých etáží skúmaných fytocenóz bola použitá stupnica podľa metodiky Zűrišsko-Montpellierskej školy (MORAVEC et al., 1994). Pre každú etáž sa uviedla celková pokryvnosť a aj počet druhov. Nomenklatúra je uvádzaná podľa MARHOLDA a HINDÁKA (1998). Pokryvnosť populácií bola stanovená odhadom podľa MORAVCA et al. (1994) a vyjadrená pomocou

stupníc pokryvnosti. Pre odhad pokryvnosti jednotlivých druhov na skúmaných lokalitách bola použitá Braun – Blanquetova kombinovaná stupnica abundancie a dominancie.

Schematické znázornenie horizontálnej stavby fytocenóz na presne vytýčených plochách skúmaných lokalít bolo realizované graficky vo vhodnej mierke s použitím programov AutoCAD 2010 a CorelDraw X3. Pre grafické znázornenie boli zisťované nasledovné charakteristiky: **1.** Priemer koruny jedincov na vybranom úseku, **2.** Vzájomná vzdialenosť jedincov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Lokalita Chynoriansky luh

Tento biokoridor sa vyznačuje charakteristickou líniovou priestorovou štruktúrou. Porasty sú zapojené a viacvrstvové s veľmi výrazným zastúpením krovinatého podrastu. Stromová etáž je tvorená druhmi, ktoré predstavujú pozostatky lužného lesa (*Fraxinus angustifolia* subsp. *danubialis, Fraxinus excelsior, Quercus robur, Quercus petraea, Acer tataricum*), v menšom zastúpení *Ulmus minor, Carpinus betulus, Acer campestre* a druhmi, ktoré boli zámerne vysádzané za účelom ochrany agrocenóz (vetrolamy) – *Populus × canadensis* (Tab. 2).

Stromovú kostru hodnoteného úseku biokoridoru tvoria jedince *Populus × canadensis*, ktoré sú prestarnuté a na mnohých miestach postupne vypadávajú, čím je ohrozená súvislá zapojenosť biokoridoru. Na voľné miesta prenikajú taxóny z nižších etáží a rozširujú sa semenáčiky expanzívnych druhov. Hodnotením ekologických a rastových charakteristík *Quercus robur* a *P. spinosa* sa zaoberal BAKKER et al. (2004). Uvádza, že semenáčiky duba letného sa priestorovo viažu na krovinaté porasty *P. spinosa*, čo sme taktiež zaznamenali na skúmanom úseku biokoridoru. Autor zdôvodňuje tento jav tým, že mladé jedince *Quercus robur* majú vyššiu úspešnosť prežitia v súvislých porastoch slivky trnkovej (*P. spinosa*), ktorá im zabezpečuje ochranu pred herbivormi a poskytuje vhodné svetelné podmienky. S tým súhlasia aj pozorovania KÜPPERSA (1985), ktorý potvrdil, že pionierske druhy (*Rubus, Prunus, Rosa*) vytvárajú vhodné podmienky pre uchytenie sukcesných druhov.

Z hľadiska vegetačnej skladby sú v etáži krov zastúpené druhy radu *Prunetalia spinosae*, zväzu *Pruno spinosae-Crataegetum monogynae* Soó. Dominujú populácie druhu *Prunus spinosa* a jeho krížencov: *Prunus × fruticans*, *P. × fetchneri,* pričom pôvodný druh *Prunus spinosa* je týmito spontánnymi krížencami postupne vytláčaný. Možnou príčinou je značná miera introgresie (*P. insititia* a *P. domestica* sa spätne krížia s *P. spinosa*), ku ktorej v týchto populáciách dochádza a taktiež negatívny vplyv antropogénnej činnosti. Najexpanzívnejší je kríženec *P. × fruticans*, ktorý sa hojne šíri na antropicky podmienené biotopy (okraje ciest, polné medze, úhory). Podobný jav popisuje LEPŠÍ et al. (2011) pri populáciách *Prunus fruticosa* v oblasti Českého Krumlova. V krovinnej etáži hodnoteného biokoridoru sú ďalej zastúpené *Prunus cerasifera, Prunus avium, Rosa canina, Crataegus monogyna,* na okrajoch dalšie druhy prevažne svetlomilných krov *Rhamnus cathartica, Euonymus europaeus, Ligustrum vulgare, Swida sanguinea* (Tab. 2). Populácie krov v podobnom zastúpení tvoria aj výrazný okrajový plášť samotného biocentra, na ktoré sa biokoridor napája. V bylinnej etáži sme zistili výskyt druhov, ktoré pochádzajú z agrocenóz (*Urtica dioica, Arrhenatherum elatius, Poa pratensis, Lolium perene, Agropyron repens*).

Pôvodné fytocenózy analyzovaného biokoridoru sú negatívne ovplyvnené a potenciálne ohrozené antropogénnou činnosťou v súvislosti s obrábaním pôd a pestovateľskými postupmi realizovanými na priľahlých agrocenózach. V dôsledku poľnohospodárskej činnosti človeka dochádza k prieniku nepôvodných taxónov do populácií a k vytláčaniu autochtónnych druhov.

Lokalita Veľké Úľany

Tento biokoridor na lokalite Veľké Úľany sa taktiež vyznačuje líniovou priestorovou štruktúrou, avšak menej pravidelnou v porovnaní s biokoridorom na lokalite Chynoriansky luh. Porast je viacvrstvový s dominantným zastúpením druhov, ktoré predstavujú zvyšky pobrežnej vegetácie lužného lesa (*Saliceto – Populetum*) pozdĺž mŕtveho ramena Čiernej vody. V stromovej etáži sú

zastúpené druhy *Salix fragilis, Populus alba, Populus tremula, Fraxinus excelsior, Fraxinus angustifolia, Ulmus carpinifolia, Ulmus minor* (Tab. 3). Stromovú kostru tvoria nepôvodné jedince *Robinia pseudoacacia*.

Krovinná etáž je tvorená prevažne krížencami druhu *Prunus spinosa* a zastúpením ďalších druhov radu *Prunetalia spinosae* (*Rosa canina, Crataegus monogyna, Swida sanguinea, Sambucus nigra, Euonymus europaeus*) a iných (*Frangula alnus*). Bylinná etáž pozostáva z druhov, ktoré prenikajú z priľahlých agrocenóz a z burinných druhov, ktoré sú typické pre fytocenózy biokoridorov a úhory (*Urtica dioica, Ballota nigra, Cirsium arvense, Conium maculatum*, *Cardaria draba, Tripleurospermum inodorum, Bromus sterilis*). Ako uvádza KÜPPERS (1985), invázie z priľahlých úhorov prenikajú do biokoridorov rýchlo (v priebehu jedného alebo pár rokov v závislosti od vzdialenosti) prostredníctvom vegetatívnej migrácie pionierskych druhov.

Lokalita Čechynce

Vegetácia biokoridoru na lokalite Čechynce sa zaraďuje medzi spoločenstvá lužného lesa asociácie *Saliceto – Populetum*. Vyznačuje sa dominantným zastúpením drevín mäkkého luhu: topoľa kanadského (*Populus* × *canadensis*) v stromovej etáži (E_3) a v menšom výskyte *Populus deltoides*, *Salix fragilis*. Tieto jedince tvoria líniovú priestorovú štruktúru biokoridoru, ktorá však nie je súvislá. Na voľné miesta prenikajú pionierske taxóny z etáže E_2 a náletové druhy (*Acer campestre,* vo výraznom zastúpení *Negundo aceroides* a uľahčujú rast semenáčikom ďalších drevín (*Quercus cerris, Q. robur, Fraxinus excelsior*).

Krovinná etáž je mohutná a podobne, ako na ostatných skúmaných lokalitách, tvorená prevažne krížencami slivky trnkovej (*Prunus spinosa*) s dominantným zastúpením *Prunus* × *fruticans*. V menšom zastúpení sa vyskytuje hybrid *P*. × *dominii*, ktorý preniká najmä na svetlejšie úseky biokoridoru bez výskytu kostrových drevín etáže E_3. Krovinný porast dotvárajú ďalšie druhy radu *Prunetalia spinosae* (*Swida sanguinea, Rosa canina, Sambucus nigra, Crataegus monogyna, Cerasus avium ´Julianae´, Rhamnus cathartica*) (Tab. 4).

Husté kriačiny sú veľmi zatienené, takže podrast je slabo vyvinutý. V sýnuzii bylín sa uplatňujú druhy svetlo nenáročné, ale vyžadujúce dostatok živín (najmä dusíka) ako *Urtica dioica, Rubus caesius, Artemisia vulgaris, Amaranthus retroflexus, Sonchus oleraceus, Silene latifola*, ktoré tvoria prevažne vonkajší lem. Dominantný výskyt nitrofilných druhov indikuje stanovište s pôdou bohatou na dusík, čo je dôsledok poľnohopodárskych aktivít realizovaných na priľahlých agrocenózach. Preto sa v bylinnej etáži uplatňujú aj ďalšie druhy lemových ruderálnych spoločenstiev a synantropných stanovíšť (*Ballota nigra, Stachys arvensis, Stellaria media, Agropyron repens, Sinapis arvensis, Tanacetum vulgare, Arrhenatherum elatius, Atriplex patula, Aristolochia clematitis, Lamium purpureum, Galium album, Thlaspi arvense*).

Lokalita Horný Ohaj

Tento biokoridor na lokalite Horný Ohaj sa zaraďuje medzi spoločenstvá brehových porastov lužného lesa asociácie *Saliceto – Populetum*. Vyznačuje sa dominantným zastúpením drevín mäkkého luhu: topoľa čierneho (*Populus nigra*) v stromovej etáži (E_3) a v menšom výskyte, *Salix alba, Fraxinus angustifolia*. Tieto jedince tvoria líniovú priestorovú štruktúru biokoridoru, ktorá však nie je súvislá. Na voľné miesta prenikajú pionierske taxóny z etáže E_2 a náletové druhy (*Acer campestre, Juglans regia* a *Cerasus avium ´Julianae´,* vo výraznom zastúpení *Negundo aceroides*) ako aj (*Fraxinus excelsior*).

Krovinná etáž je miestami rozsiahla a podobne, ako na ostatných skúmaných lokalitách, tvorená prevažne krížencami slivky trnkovej (*Prunus spinosa*) s dominantným zastúpením *Prunus* × *fruticans*. V menšom zastúpení sa vyskytuje hybrid *P*. × *dominii*, ktorý preniká najmä na svetlejšie úseky biokoridoru bez výskytu kostrových drevín etáže E_3. Krovinný porast dotvárajú ďalšie druhy radu *Prunetalia spinosae* (*Swida sanguinea, Rosa canina, Crataegus monogyna, Rhamnus cathartica*) (Tab. 5).

Bylinný podrast je slabo vyvinutý z dôvodu tienenia spomínaných krovín. Nachádzajú sa tu tieto druhy *Urtica dioica, Rubus caesius,R. fruticosus, Artemisia vulgaris, Amaranthus retroflexus, Sonchus oleraceus,* ktoré tvoria vonkajší lem. Výskyt nitrofilných druhov indikuje stanovište s pôdou bohatou na dusičnany, čo je dôsledok hnojenia na priľahlých agrocenózach. V bylinnej etáži sú zastúpené aj ďalšie druhy lemových ruderálnych spoločenstiev a synantropných stanovíšť (*Ballota nigra, Stachys arvensis, Stellaria media, Agropyron repens, Sinapis arvensis, Tanacetum vulgare, Atriplex patula, Aristolochia clematitis, Lamium purpureum, Galium album, Thlaspi arvense, Cirsium arvense*).

Tab. 2 Fytocenologický zápis na lokalite Chynoriansky luh.

CHL1 rozloha 10x30 m

etáž	druh	pokryv - nosť
E3	*Populus x canadensis*	r
	Fraxinus excelsior	1
E2	*Prunus spinosa*	+
	Prunus cerasifera	+
	Cerasus avium	r
	Populus x canadensis	r
	Ligustrum vulgare	+
	Prunus x fruticans	r
	Malus domestica	r
E1	*Urtica dioica*	3
	Arrhenatherum elatius	2
	Poa pratensis	2
	Agropyron repens	2
	Lolium perenne	+
	Alopecurus pratensis	+
	Calystegia sepium	1
	Galium schultesii	1
	Potentilla reptans	1
	Vicia sp.	r
	Chaerophyllum sp.	r (+)
	Lathyrus tuberosus	+
	Arctium tomentosum	r
	Convolvulus arvensis	+
	Lactuca serriola	+
	Cirsium arvense	+
	Galium aparine	+
	Humulus lupulus	r
	Dipsacus laciniatus	+
	Carex pilosa	2
	Galium molugo	+
	Vicia cracca	+
	Agrimonia eupatoria	+
	Lathyrus palustris	+
	Symphytum officinale	r
	Typha latifolia	+
	Phalaris arundinacea	1
	Euonymus europaeus	r

CHL2 rozloha 10x30 m

etáž	druh	pokryv - nosť
E3	*Populus x canadensis*	2
	Acer campestre	+
E2	*Prunus x fruticans*	3
	Prunus x fetchnerii	+
	Rubus corylifolius-agregát	r
	Rosa canina	r
	Crataegus monogyna	+
	Acer campestre	+
E1	*Arrhenatherum elatius*	r
	Poa pratensis	1
	Agropyron repens	1
	Cirsium arvense	+
	Convolvulus arvensis	+
	Anthriscus sylvestris	r
	Daucaceae	+
	Urtica dioica	1
	Cichorium?	+
	Chaerophyllum sp.	1
	Galium schultesii	1
	Melandrium album	r
	Rumex alpinus	r
	Dipsacus laciniatus	r
	Tanacetum vulgare	r
	Adonis aestivalis	r
	Artemisia vulgaris	r
	Tripleumospermum inodorum	r
	Anagallis arvensis	r
	Consolida regalis	r
	Cruciata laevipes	r

CHL3 rozloha 25x35 m

etáž	druh	pokryv - nosť
E3	*Fraxinus angustifolia*	4
	Acer campestre	2
	Carpinus betulus	2
E2	*Fraxinus angustifolia*	1
	Acer campestre	+
	Padus racemosa	+
	Euonymus europaeus	1
	Crataegus laevigata	1
	Sambucus nigra	1
	Swida sanguinea	r
	Rubus caesius	r
	Crataegus monogyna	r
E1	*Allium ursinum*	4
	Glechoma hederacea	2
	Quercus robur - semenáčik	r
	Hedera helix	2
	Alliaria officinalis	r
	Rubus corylifolius	r
	Galium aparine	1
	Ranunculus lanuginosus	r
	Mercurialis vaxii	1
	Euonymus europaeus - semenáčik	r
	Fraxinus angustifolia - semenáčik	r
	Rubus caesius	r

Tab. 3 Fytocenologický zápis na lokalite Veľké Úľany.

VU1 rozloha 144 x 20 m

Etáž	Druh	Pokryv.
E3	*Robinia pseudoacacia*	2
	Fraxinus excelsior	+
	Ulmus carpinifolia	1
	Ulmus minor	+
	Populus tremula	+
	Salix fragilis	1
	Fraxinus angustifolia	1
	Populus alba	+
E2	*Rubus caesius*	1
	Rubus corylifolius	1
	Prunus x fruticans	2
	Prunus x fetchnerii	r
	Prunus padus	+
	Sambucus nigra	1
	Rosa cannina	+
	Rosa dumalis	r
	Crataegus monogyna	+
	Swida sanguinea	+
	Frangula alnus	r
	Rhamnus cathartica	r
	Euonymus europaeus	r

Etáž	Druh	Pokryv.
E1	*Urtica dioica*	+
	Ballota nigra	1
	Arctium lappa	+
	Daucus carota	r
	Cardaria draba	r
	Aristolochia clematis	r
	Plantago media	1
	Plantago lanceolata	+
	Solanum dulcamara	+
	Tanacetum vulgare	1
	Achilea millefolium	1
	Conium maculatum	1
	Cirsium arvense	1
	Bromus sterilis	1
	Melandrium album	+
	Galium aparinum	+
	Tripleurospermum inodorum	+
	Artemisia vulgaris	1
	Atriplex nitens	+
	Cucubalus baccifer	+
	Anthriscus sylvestris	+
	Centaurea acosta	+
	Aegopodium podagraria	+
	Hypericum maculatum	r
	Cirsium vulgare	+
	Symphytum sp.	+
	Lythrum salicaria	+
	Senecio umbrosa	+
	Solidago canadensis	+
	Valeriana officinalis	+
	Altea officinalis	+
	Epilobium hirsutum	r

Tab. 4 Fytocenologický zápis na lokalite Čechynce.

Čech **rozloha 587 x 15 m**

Etáž	Druh	Pokryv.
E3	*Populus × canadensis*	4
	Populus deltoides	r
	Fraxinus excelsior	r
	Salix fragilis	1
	Quercus robur	+
	Quercus cerris	1
E2	*Acer campestre*	1
	Acer negundo	3
	Rhamnus cathartica	r
	Crataegus monogyna	1
	Prunus × fruticans	5
	Prunus × fetchnerii	r
	Prunus cerasus ´Juliana´	r
	Prunus × dominii	1
	Rosa canina	1
	Rubus caesius	+
	Sambucus racemosa	1
	Swida sanguinea	2

Etáž	Druh	Pokryv.
E1	*Achillea milefolium*	2
	Equisetum arvense	1
	Sinapis arvensis	1
	Artemisia vulgaris	2
	Euphorbia esula	+
	Chenopodium polyspermum	3
	Amaranthus retroflexus	2
	Amaranthus albus	2
	Inula britannica	2
	Sonchus oleraceus	2
	Atriplex patula	2
	Thlaspi arvense	2
	Aristolochia clematitis	3
	Lamium purpureum	2
	Galium verum	3
	Galium album	3
	Stellaria media	3
	Xanthium strumarium	2
	Geranium pyrenaicum	2
	Silene latifolia	2
	Symphytum officinale	2
	Arrhenatherum elatius	1
	Stachys arvensis	1
	Agropyron repens	2
	Urtica dioica	2
	Taraxacum officinale	1
	Humuls lupulus	2
	Convolvulus arvensis	r
	Centaurea sp.	r
	Tanacetum vulgare	r
	Ballota nigra	1
	Avena fatua	r

Tab. 5 Fytocenologický zápis na lokalite Horný Ohaj.

Vymedzená plocha			
Biokoridor Horný Ohaj			
Nadmorská výška m n.m.		**150**	
Plocha zápisu (m^2)		20x20 m=**400**	
GPS lokalizácia: N G		**48°27´07,2“** **0,18°31´11“**	
Dĺžka/šírka/výška biokoridoru (m)		**3070/20/18**	
Etáž	**Druh**	**Pokryvnosť**	**Poznámka**
E3 Stromová	***Celková pokryvnosť***	**E3, E2, E1=100%**	
	Negundo aceroides Moench.	3	alochtónny druh
	Robinia pseudoacacia L.	1	
	Salix alba L.	1	
	Prunus cerasifera Ehrh.	+	alochtónny druh
	Celková pokryvnosť E3	**70%**	
E2 Krovitá	*Clematis vitalba* L.	2	
	Negundo aceroides Moench.	r	alochtónny druh
	Sambucus nigra L.	r	
	Celková pokryvnosť E2	**10%**	
E1 Bylinná	*Humulus lupulus* L.	2	
	Rubus caesius L.	2	
	Agropyron repens (L.)R. Bauv.	1	
	Lamimum maculatum L.	+	
	Sambucus ebulus L.	+	
	Althaea officinalis L.	r	
	Carduus acanthoide.L.	r	
	Lysimachia vulgaris L.	r	
	Galium aparine L.	r	
	Calystegia sepium (L.) R. Br.	r	
	Arctium lappa L.	r	
	Conium maculatum L.	r	
	Equisetum arvense L.	r	
	Dactylis glomerata L.	r	
	Bryonia alba L.	r	
	Tanacetum vulgare L.	r	
	Cirsium arvense (L.) Scop.	r	
	Negundo aceroides Moench	r	semenáč
	Celková pokryvnosť E1	**20%**	

ZÁVER

Výsledky analýzy floristického zloženia a priestorovej štruktúry fytocenóz biokoridorov vyvinutých na neobrábaných plochách poľnohospodárskej pôdy v oblasti južného a západného Slovenska potvrdzujú, že vegetačná štruktúra biokoridorov závisí v prevažnej miere od typu pôvodnej vegetácie a spôsobu využívania okolitého územia. Porovnaním fytocenóz biokoridorov na skúmaných lokalitách JZ Slovenska (Veľké Úľany, Čechynce, Chynoriansky luh, Horný Ohaj) neboli zistené výrazné rozdiely vo vegetačnej skladbe. Na lokalite Veľké Úľany a lokalite Čechynce sme zaznamenali výskyt druhov indikujúci spoločenstvá lužného lesa asociácie *Saliceto – Populetum* (dominantné zastúpenie

drevín mäkkého luhu – *Populus alba, P. tremula, Salix fragilis*) a na lokalite Chynoriansky luh druhy asociácie *Ulmeto-Fraxinetum carpinetum*. Stromová kostra biokoridorov je tvorená jedincami *Populus × canadensis, Robinia pseudoacacia Negundo aceroides,k*toré boli zámerne vysádzané ako vetrolamy. Často sa vyskytuje *Prunus cerasifera, Cerasus avium*. Krovinná etáž je tvorená druhmi radu *Prunetalia spinosae*, zväzu *Pruno spinosae-Crataegetum monogynae*. Dominujú populácie druhu *Prunus spinosa* a jeho krížencov: *Prunus × fruticans*, *Prunus × dominii,* pričom pôvodný druh *Prunus spinosa* je týmito spontánnymi krížencami postupne vytláčaný, čo je dôsledkom značnej miery introgresie. V bylinnej etáži sme zistili výrazné zastúpenie nitrofytov a neofytov, ktoré tu prenikajú do populácií z priľahlých agrocenóz. Potenciálne ohrozenie funkčnosti biokoridorov predstavujú dva invázne druhy *Negundo aceroides* a *Robinia pseudoacacia*.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s podporou grantovej agentúry MŠ SR VEGA projektu č. 1/0731/14.

LITERATÚRA

BAKKER, E.S. - OLFF, H. - VANDENBERGHE, C. - DE MAEYER, K. - SMIT, R. - GLEICHMAN, J.M. - VERA, F.W.M. 2004. Ecological anachronisms in the recruitment of temperate light-demanding tree species in wooded pastures. In: Journal of Applied Ecology, roč. 41, 2004, č. 3, s. 571-582. ISSN 0021-8901

BARANEC, T. - IKRÉNYI, I. - DEBNÁRIKOVÁ, P. - RYBNIKÁROVÁ, J. 2009. Analysis of vegetation structure of biocorridors on the territory of agricultural landscape in SW Slovakia. In: Landscape – theory and practice. Abstracts of the 15th International symposium on Problems of Landscape ecological research. Bratislava, 2009. s.128.

BARANEC, T. - MURÁŇOVÁ, K. - ŽGANČÍKOVÁ, I. - IKRÉNYI, I. 2010. Hodnotenie vegetačnej štruktúry vybraných biokoridorov typických pre poľnohospodársku krajinu JZ Slovenska. In: Ochrana a využívanie prírody a krajiny. Bratislava: Univerzita Komenského, 2010. ISBN 978-80-223-2943-9.

BEIER, P. - NOSS, R. F. 1998. Do habitat corridors provide connectivity? In: Conservation Biology, roč. 12, 1998, č. 6, s 1241-1252, ISSN 0888-8892

BENNETT, A. F. 2003. *Linkages in the landscape: the role of corridors and connectivity in wildlife conservation.* 2. vyd. Cambridge, Gland, Switzerland: IUCN, 2003. 254 s. ISBN 2-8317-0744-7

KRIŽOVÁ, E. 1995. *Fytocenológia a lesnícka typológia*. Zvolen: Vydavateľstvo TU vo Zvolene, 1995 (2001). 203 s. ISBN 80-228-1026-6

KŰPPERS, M. 1985. Carbon relations and competition between woody species in a Central European hedgerow.IV. Growth form and partitioning. In: Oecologia, roč. 66, 1985, č. 3, s. 343-352, ISSN 0029-8549

LEPŠÍ, P. - LEPŠÍ, M. - BOUBLÍK, K. - KOLÁŘ, F. 2011. Reliktní a izolovaný výskyt *Prunus fruticosa* u Českého Krumlova. In: Zprávy Česk. Bot. Společ, roč. 46, 2011, s. 231 – 250.

MARHOLD, K. - HINDÁK, L. 1998. *Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska.* Bratislava: Veda, 1998, 687 s. ISBN 80-224-05-26-4

MÍCHAL, I. 1994. *Ekologická stabilita*. Brno, Veronica, 2 rozš. vyd., 276 s. ISBN 80-85368-22-6

MORAVEC, J. a kol. 1994. *Fytocenologie (Nauka o vegetaci)*. Praha: Academia, 1994. 403 s. ISBN 80-200-0128-X, ISBN 80-200-0457-2

REHÁČKOVÁ, T. - LEHOTSKÁ, B. - NEVŘELOVÁ, M. - PAUDITŠOVÁ, E. - RUŽIČKOVÁ, J. 2007. *Fragmenty lesov v zastavanom území Bratislavy.* Bratislava: Cicero s. r. o, 2007. 173 s. ISBN 978-80-969678-3-4

RUŽIČKOVÁ, J. – ŠÍBL, J. a kol. 2000. Ekologické siete v krajine. Nitra-Bratislava: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 181 s., ISBN 80-7137-761-9

SUPUKA, J. 2005. Application of woody plants in agricultural landscape design. In: Autochthonous dendroflora and its application in landscape. Zvolen: Technická univerzita vo Zvolene, 2005, s.50-60. ISBN 80-228-1481-4

ŠARAPATKA, B. – NIGGLI, U. a kol. 2008. Zemědělství a krajina: Cesty k vzájomnému souladu. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2008. 272 s. ISBN 978-80-244-1885-8

Adresa autorov

prof. RNDr. Tibor Baranec, PhD., E-mail: tibor.baranec@uniag.sk

RNDr. Ivan Ikrényi, PhD., E-mail: ivan.ikrenyi@uniag.sk

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Katedra botaniky, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika, tel. 037/641 4450

Ing. Ľudmila Galuščáková, PhD., E-mail: lgaluscakova@ukf.sk

Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Katedra botaniky a genetiky, Trieda A. Hlinku 1, 949 76 Nitra, Slovenská republika

ENTOMOPATOGÉNNE HUBY AKO ENDOFYTY ASIMILAČNÝCH PLETÍV DREVÍN V ARBORÉTE MLYŇANY SAV

ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AS ENDOPHYTES IN ASSIMILATORY TISSUES OF WOODY PLANT SPECIES IN MLYŇANY ARBORETUM SAS

MAREK BARTA

BARTA, M. 2016. Entomopatogénne huby ako endofyty asimilačných pletív drevín v Arboréte Mlyňany SAV. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 14-24. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
In this paper we present preliminary results of ongoing research on endophytic fungi in woody plant species. During 2014-2015, occurrence of endophytic insect pathogenic fungi (Ascomycota, Hypocreales) were studied in assimilatory tissue of woody plant species with a special focus on sempervirent taxa growing in Mlyňany Arboretum SAS. The survey revealed a presence of these fungi in both deciduous and sempervirent species. As many as 30 *in vitro* isolates of the endophytic fungi were obtained from analysed leaves/needles. Four fungal species, *Beauveria bassiana*, *B. pseudobassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*, were identified but *I. fumosorosea* was the most prevalent one. Majority of fungus-positive samples were detected during July and August. One isolate of *M. anisopliae* was isolated from *Ilex aquifolium* leaf collected during winter (in February) indicating the capability of these fungi to overwinter in microhabitats of plant tissue. All fungal isolates were pathogenic to larvae of *Galleria mellonella*, however their virulence was lower than that of the reference isolate from commercial mycoinsecticide Boverol®.

Key words: endophytes, entomopathogenic fungi, sempervirent species, virulence

ÚVOD

V súčasnosti je všeobecne akceptovaný fakt, že rastliny koexistujú v prirodzenej asociácii s rôznymi mikroorganizmami (baktériami a mikroskopickými hubami) – endofytmi. Termín „endofyt“ zaviedol de Bary (DE BARY 1884), ktorý tak definoval mikroskopické huby alebo baktérie vyskytujúce sa asymptomaticky v rastlinných pletivách. Podstata tejto definície sa dodnes nezmenila a jej univerzálna formulácia hovorí, že endofyty sú mikroorganizmy, ktoré inter- a/alebo intracelulárne kolonizujú a asymptomaticky infikujú rastlinné pletivá, zároveň medzi mikroorganizmami a hostiteľom existujú interakcie na biochemickej a genetickej úrovni (WILSON 1995). Endofytické mikroorganizmy (EMO) boli detegované vo všetkých rastlinách, v ktorých sa doteraz ich prítomnosť cielene skúmala a zároveň sú považované za jednu z najrozmanitejších skupín mikroorganizmov (ARNOLD, LUTZONI 2007). Mnoho štúdií sa v minulosti zameralo na hľadanie negatívnych účinkov EMO na svojich hostiteľov. No štúdie potvrdili skôr ich priaznivé účinky na rast a vývoj hostiteľských rastlín (AZEVEDO 2000). EMO vykazujú celý rad vlastností, ktoré plnia doposiaľ neobjasnené, ale zjavne dôležité, úlohy vo fyziológii rastlín. Zohrávajú významnú úlohu v adaptácii rastlín na rôzne environmentálne javy. Môžu pôsobiť ako stimulátory rastu rastlín syntézou fytohormónov, biosurfaktantov, alebo enzýmov, zlepšením tolerancie voči stresu, zlepšením príjmu živín, viazaním atmosférického dusíku, alebo reguláciou škodcov a patogénov hostiteľských rastlín (REDMAN et al. 2002; ARNOLD et al. 2003; RODRIGUEZ et al. 2004).

Patológovia hmyzu tradične vnímajú entomopatogénne huby iba v jedinej rovine – ako parazitov hmyzích hostiteľov. Dnes je však známe, že tieto mikroskopické huby môžu plniť aj celkom odlišné úlohy v trofických vzťahoch huba – hmyz – rastlina. Nedávne štúdie preukázali schopnosť viacerých zástupcov entomopatogénnych húb z radu Hypocreales kolonizovať pletivá rastlín a

pretrvať v nich ako prirodzené endofyty. Entomopatogénne druhy z rodov *Beauveria, Isaria* a *Metarhizium* sú bežne rozšírené mikromycéty infikujúce rôzne skupiny článkonožcov. Môžu sa rýchlo šíriť medzi populáciami hostiteľov pomocou konídií a infikovať hostiteľa cez kutikulu (HAJEK, ST. LEGER 1994; VALERO-JIMÉNEZ et al. 2016). Entomopatogénne vlastnosti týchto húb sú dobre známe a často sa využívajú v rámci systému biologických metód regulácie škodcov kultúrnych rastlín (SUJEETHA, SAHAYARAJ 2014). Avšak, ich nedávno spozorovaná endofytická asociácia s rastlinami rýchlo podnietila ďalších výskum v tejto oblasti. Entomopatogénna huba *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. bola študovaná ako endofyt po cielenej inokulácii vo viacerých plodinách: kukurici, zemiakoch, rajčiaku, kakaovníku, maku, bavlníku, pšenici, či banánovníku (BING, LEWIS 1991 1992; JONES 1994; CHERRY et al. 1999a, 1999b; LECKIE 2002; ARNOLD, LEWIS 2005; POSADA, VEGA 2005; QUESADA-MORAGA et al. 2006; AKELLO et al. 2007; POWELL et al. 2007; PAMPAPATHY et al. 2010; GREENFIELD et al. 2016). Nedávne fylogenetické štúdie naznačujú, že entomopatogénne huby z rodov *Beauveria* a *Metarhizium* majú bližšie k fytopatogénnym hubám a rastlinným endofytom, než hubám parazitujúcich na živočíšnych hostiteľoch (GAO et al. 2011). *B. bassiana* ako endofyt preukázala antagonistickú aktivitu voči fytopatogénnym mikromycétam (OWNLEY et al. 2004, 2008) alebo fylofágnym škodcom (AKELLO et al. 2008). Preukázaný bol tiež vzťah medzi ďalšou entomopatogénnou hubou, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, a rizosférou rastlín (BRUCK 2005; ST. LEGER 2008; GREENFIELD et al. 2016). Na základe štúdií, v ktorých sa skúmal vplyv herbivorného hmyzu na rastliny endofyticky kolonizované entomopatogénnymi hubami, možno predpokladať, že entomopatogény prítomné v rastlinách negatívne ovplyvňujú vývoj a aktivitu tohto hmyzu, pravdepodobne v dôsledku produkcie špecifických metabolitov (VEGA 2008). Existuje hypotéza, že rastliny poskytujú entomopatogénom vhodné útočisko, a tým si rastliny zabezpečujú dodatočnú (kryptickú) ochranu pred herbivorným hmyzom prípadne inými pôvodcami rastlinných ochorení.

Použitiu tejto skupiny EMO na cielenú reguláciu rastlinných patogénov (baktérií a plesní) a škodcov sa venuje stále väčšia pozornosť ako trvalo udržateľná alternatíva k syntetickým pesticídom. Avšak úloha endofytov v rastlinných organizmoch nie je zatiaľ celkom preskúmaná a v súčasnosti sa intenzívne študuje. Štúdium entomopatogénnych húb z radu Hypocreales ako endofytov sa sústreďuje najmä na poľnohospodársky významné plodiny, ale menej na dreviny. Hoci ich výskyt v rôznych orgánoch hospodársky zaujímaných drevín bol detegovaný (GANLEY, NEWCOMBE 2005; POSADA, VEGA 2005; VEGA 2008; RONDOT, REINEKE 2013). V našej práci sme sa sústredili na výskyt týchto húb v okrasných drevinách s dôrazom na vždyzelené dreviny, v ktorých výskyt entomopatogénnych húb zatiaľ nebol publikovaný.

Cieľom práce bolo (1) vyhodnotiť prevalenciu endofytického štádia entomopatogénnych húb z radu Hypocreales v asimilačných pletivách drevín rastúcich v modelovom území Arboréta Mlyňany SAV klasickými kultivačnými metódami, (2) získať izoláty entomopatogénnych húb a (3) overiť ich virulenciu voči modelovému hmyzu v laboratórnych podmienkach.

MATERIÁL A METÓDY

V Arboréte Mlyňany SAV sme v rokoch 2014–2015 v mesačných intervaloch odoberali vzorky asimilačných orgánov vybraných taxónov drevín (Tabuľka 1), z ktorých sme tradičnými kultivačnými metódami izolovali endofytické druhy entomopatogénnych húb. Z vybraných drevín sme odoberali po 10 listov resp. 50 ihlíc, ktoré sme povrchovo sterilizovali (v nasledovnej sérii: 1 min. v 70% etanole, 5 min. v 2,5% NaOCl) a 2× opláchli v sterilizovanej destilovanej vode. V listových čepeliach sme korkovrtom č. 5 vyrezali po 5–10 výsekov, ktoré sme umiestnili na povrch agarového kultivačného média v Petriho miskách. Ihlice ihličnatých drevín sme nasekali skalpelom na úseky dlhé cca. 5 mm. Na izoláciu entomopatogénnych húb sme použili selekčné agarové médium, ktorého základ tvoril Sabouraudov dextrózový agar (SDA) doplnený o antibiotiká (0,6g/l streptomycín sulfát, 0,05g/l tetracyklín hydrochlorid) a špecifické fungicídy (0,25g/l cyclohexamide a 0,5g/l dodine) (STRASSER et al. 1996). Výseky v miskách sme inkubovali 14 dní pri 25±2°C. Kolónie, ktoré vyrástli z okrajov výrezov

sme preočkovali na štandardný SDA bez antibiotík a fungicídov a kultivovali 10 dní pri 25±2°C. Získané izoláty sme uskladnili v skúmavkách na rovnakom kultivačnom agare v chladničke pri 5°C.

Tab. 1 Zoznam taxónov drevín v Arboréte Mlyňany SAV zaradených do prieskumu výskytu endofytických húb v pletivách asimilačných orgánov v rokoch 2014–2015.

Názov taxónu	**Čeľaď**	**Rok testovania**
Acer saccharinum L.	*Sapindaceae*	2014
Alnus glutinosa (L.) Gaertn.	*Betulaceae*	2014
Amorpha fruticosa L.	*Fabaceae*	2014
Aucuba japonica Thunb.	*Garryaceae*	2014, 2015
Berberis julianae Schneid.	*Berberidaceae*	2014, 2015
Berberis vulgaris L.	*Berberidaceae*	2014
Buxus sempervirens L.	*Buxaceae*	2014, 2015
Corylus avellana L.	*Corylaceae*	2014
Cotoneaster salicifolius Franch.	*Rosaceae*	2014, 2015
Euonymus hamiltonianus Wall.	*Celastraceae*	2014
Hamamelis virginiana L.	*Hamamelidaceae*	2014
Hedera helix L.	*Araliaceae*	2014, 2015
Chimonanthus praecox (L.) Link	*Calycanthaceae*	2014
Ilex aquifolium L.	*Aquifoliaceae*	2014, 2015
Lonicera nitida Wilson	*Caprifoliaceae*	2014, 2015
Lonicera × purpusii Rehd.	*Caprifoliaceae*	2014, 2015
Liriodendron tulipifera L.	*Magnoliaceae*	2014
Mahonia aquifolium (Pursh) Nutt.	*Berberidaceae*	2014, 2015
Osmanthus heterophyllus (G.Don) P.S.Green	*Oleaceae*	2014
Parthenocissus quinquefolia (L.) Planch.	*Vitaceae*	2015
Pieris japonica (Thunb.) D. Don ex G. Don	*Ericaceae*	2014
Prunus laurocerasus L.	*Rosaceae*	2014, 2015
Prunus padus L.	*Rosaceae*	2014
Pyracantha coccinea M.Roem.	*Rosaceae*	2014
Quercus cerris L.	*Fagaceae*	2014
Quercus coccinea Muenchh.	*Fagaceae*	2015
Quercus rubra L.	*Fagaceae*	2014
Rhododendron catawbiense Michx.	*Ericaceae*	2015
Rhododendron decorum Franch.	*Ericaceae*	2015
Rhododendron fortunei Lindl.	*Ericaceae*	2014, 2015
Robinia pseudoacacia L.	*Fabaceae*	2014
Sambucus nigra L.	*Adoxaceae*	2014
Skimmia japonica Thunb.	*Rutaceae*	2014, 2015
Symphoricarpos albus (L.) S.F.Blake	*Caprifoliaceae*	2014
Syringa vulgaris L.	*Oleaceae*	2014
Tilia platyphyllos Scop.	*Tiliaceae*	2014
Cephalotaxus harringtonia (Forbes) K. Koch	*Cephalotaxaceae*	2014, 2015
Ginkgo biloba L.	*Ginkgoaceae*	2014
Picea abies (L.) H.Karst.	*Pinaceae*	2014, 2015
Picea pungens Engelm.	*Pinaceae*	2014, 2015
Pinus mugo Turra	*Pinaceae*	2015
Pinus nigra Arnold	*Pinaceae*	2015
Taxus baccata L.	*Taxaceae*	2014, 2015
Thuja plicata Donn ex D.Don	*Cupressaceae*	2014, 2015

Entomopatogénne huby sme identifikovali podľa špecifických makro- a mikroskopických znakov (HUMBER 2012, MAHARACHCHIKUMBURA et al. 2016).

Získané izoláty entomopatogénnych húb sme použili na testovanie ich virulencie voči hmyzu. Ako testovaný hmyz sme použili larvy 4.–5. instaru vijačky voštinovej (*Galleria mellonella* (Linnaeus 1758)) získané z laboratórneho chovu Arboréta Mlyňany SAV. Na testovanie virulencie izolátov sme

použili 4 rôzne koncentrácie spór v suspenzii s 0.01% (w/v) vodným roztokom zmáčadla (Tween 80), konkrétne 10^4, 10^5, 10^6 a 10^7 spór v 1 ml. Jednotlivé suspenzie spór sme použili na inokuláciu 20 lariev vijačky, ktorú sme vykonali priamo ponorením celej skupiny lariev na 5s do pripravených suspenzií. Ošetrené larvy sme umiestnili do transparentných plastových krabičiek vystlaných navlhčeným filtračným papierom a inkubovali sme ich 10 dní pri 25±2°C. Denne sme sledovali ich mortalitu a vyhodnocovali výskyt symptómov mykózy na mŕtvych jedincoch pre potvrdenie infekcie. V kontrolnom variante sme 20 lariev ošetrili v 0.01% vodnom roztoku Tweenu 80 bez spór. Pri všetkých izolátoch sme test virulencie vykonali v troch nezávislých opakovaniach v časovom odstupe asi 1 mesiac.

Okrem izolátov entomopatogénnych húb získaných z listov drevín sme do testovania zaradili ako referenčný kmeň huby *B. bassiana* získaný z komerčného biopreparátu BOVEROL® (Fytovita s.r.o., Ostrožská Lhota, Česká republika).

Virulenciu testovaných izolátov sme vyhodnotili mierou letálnej koncentrácie LC50, ktorú sme stanovili probitovou analýzou z údajov mortality lariev pre jednotlivé koncentrácie spór. Priemerné hodnoty mortality lariev ošetrených testovanými suspenziami a hodnoty LC50 jednotlivých izolátov sme porovnali analýzou rozptylu a Tukeyovým HSD testom. Dáta pre mortalitu lariev (m) boli pred použitím v analýze rozptylu podrobené arc-sínusovej transformácii ($m' = \arcsin\sqrt{m}$) pre dosiahnutie podmienky normality. Na štatistické vyhodnotenie sme použili štatistický program Minitab 17®.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V práci prezentujeme priebežné výsledky z prieskumu výskytu endofytickej fázy entomopatogénnych húb z radu Hypocreales v asimilačných orgánoch drevín rastúcich v Arboréte Mlyňany SAV realizovaného počas dvoch rokov. V roku 2014 sme uskutočnili odber vzoriek v 11 termínoch v letnom období od 16.7. do 8.8., kedy sme odobrali vzorky z 38 taxónov drevín, spolu zo 65 rastlín. V nasledujúcom roku 2015 sme s odberom vzoriek začali už 27.2. a pokračovali až do 3.12., kedy sme v 15 termínoch odobrali vzorky asimilačných orgánov z 23 taxónov, celkovo z 88 rastlín. Spolu sme analyzovali 570 listov a 400 ihlíc v roku 2014 a 840 listov a 400 ihlíc v roku 2015. Do prieskumu bolo spolu zaradených 44 taxónov drevín (Tabuľka 1), z toho bolo 36 zástupcov krytosemenných rastlín (Angiospermae) a 8 zástupcov nahosemenných rastlín (Gymnospermae – Pinophyta, Ginkgophyta). V prvom roku prieskumu bol výber taxónov do analýzy náhodný s cieľom pokryť vo zvolenom časovom období čo najširšie druhové spektrum drevín, ako potenciálnych hostiteľov endofytických húb. V roku 2015 sme sa prioritne zamerali na vždyzelené dreviny (širokolisté a ihličnaté) a prieskum sme časovo rozvrhli takmer počas celého kalendárneho roku, t.j. vrátane odberov mimo vegetačného obdobia. Pri odbere vzoriek asimilačných orgánov sme vždy vyberali iba zdravé nepoškodené listy/ihlice zo stromov/krov, dbali sme o to, aby vybrané vzorky nevykazovali žiadne mechanické poškodenie ani viditeľné symptómy ochorenia (škvrny, deformácie, farebné zmeny, nekrózy a pod.). Celkovo sme počas sledovaného obdobia získali 30 izolátov entomopatogénnych húb z 13 taxónov drevín (3 opadavé, 8 vždyzelených a 2 ihličnaté dreviny) (Tabuľka 2). Kým v roku 2014 sme detegovali pomocou kultivácie na selekčnom médiu iba jednu pozitívnu vzorku a získali sme iba jeden izolát, konkrétne druh *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner et R.A. Humber z listu *Tilia platyphyllos* Scop., v nasledujúcom roku sme získali izoláty štyroch druhov entomopatogénnych húb: *B. bassiana* (8 izolátov z 5 druhov drevín), *B. pseudobassiana* (2 izoláty z 2 druhov drevín), *M. anisopliae* (2 izoláty z 2 druhov drevín) a *Isaria fumosorosea* Wize (18 izolátov z 9 druhov drevín). Z pohľadu sezónneho výskytu boli takmer všetky pozitívne vzorky detegované počas mesiacov júl a august, dva izoláty sme získali zo vzoriek odobratých v júni a jeden izolát sme získali vo februári z listu vždyzelenej cezmíny *Ilex aquifolium* L.

Výsledky prieskumu endofytov potvrdili vhodnosť použitého selekčného média na izoláciu a detekciu týchto húb v pletivách rastlín. Pôvodne bolo toto médium navrhnuté na izoláciu

entomopatogénnych húb (*Beauveria* sp.) z pôdnych vzoriek (STRASSER et al. 1996). Kultivačné médium s podobným zastúpením antibiotík a fungicídov bolo úspešne použité pri izolácii endofytov (*Metarhizium* a *Beauveria*) z rastlinných pletív aj v iných štúdiách (napr. BEHIE et al. 2015). Prieskum v Arboréte Mlyňany SAV poukázal na schopnosť entomopatogénnych húb prirodzene kolonizovať asimilačné pletivá okrasných drevín vrátane vždyzelených taxónov. Prevalencia týchto húb v analyzovaných vzorkách však bola nízka. V roku 2015, kedy sme prieskum uskutočnili v priebehu celého roka, bolo pozitívnych iba 2,34% zo všetkých analyzovaných vzoriek počas roka. V mesiacoch júl a august bola prevalencia vyššia a dosiahla 8,84%. Pri prieskume výskytu entomopatogénnych húb v koreňoch, stonkách a listoch viacerých druhov divo rastúcich tráv a bylín v Kanade boli druhy z rodu *Metarhizium* izolované predovšetkým z koreňov, kým výskyt *B. bassiana* bol zaznamenaný vo všetkých hodnotených rastlinných orgánoch. Z rodu *Metarhizium* dominoval druh *M. robertsii* a menej boli zastúpené druhy *M. brunneum* a *M. guizhouense*. V listoch hodnotených rastlín nebolo *Metarhizium* detegované (BEHIE et al. 2015). Autori spomínanej štúdie dávajú do súvisu preferenciu húb z rodu *Metarhizium* ku koreňom rastlín so skutočnosťou, že tieto huby primárne infikujú hmyz osídľujúci pôdne prostredie (MEYLING et al. 2011). Podobne aj v iných prácach je zdôraznená väzba *M. anisopliae* na rizosféru rastlín (HU, ST. LEGER 2002). Počas nášho prieskumu endofytov sme v listoch detegovali iba jeden druh tohto rodu, *M. anisopliae*, ktorý bol izolovaný v dvoch vzorkách listov vždyzelených drevín, *R. decorum* a *I. aquifolium*. V ďalšej fáze prieskumu sa plánujeme zamerať na prevalenciu endofytov v podzemných orgánoch a drevnatých častiach rastlín zaradených do analýzy. Získané výsledky nám tak umožnia vytvoriť si komplexný obraz o výskyte týchto endofytických húb v drevinách. Zaujímavým nálezom v našom prieskume je detekcia *M. anisopliae* v listoch *I. aquifolium* mimo vegetačného obdobia, vo februári. Uvedený nález môže naznačovať, že listy vždyzelených rastlín by mohli slúžiť ako rezervoár entomopatogénnych húb v prostredí počas mimovegetačného obdobia. Podobný nález zatiaľ v literatúre nebol publikovaný. Prirodzeným a hlavným rezervoárom týchto húb v prostredí je pôda, kde entomopatogénne huby pretrvávajú v štádiu spór alebo mycélia (HAJEK, ST. LEGER 1994). Vyvstáva tiež otázka, či entomopatogénne huby dokážu pretrvať zimné obdobie v asimilačných pletivách sempervirentných rastlín, ktoré by tak mohli poskytovať vhodný mikrohabitat – útočisko pre tieto huby v čase nepriaznivých klimatických podmienok. Experimentálne takýto jav zatiaľ nebol zdokumentovaný.

V ďalšej časti práce sme sa zamerali na overenie entomopatogénnych schopností získaných *in vitro* izolátov endofytov voči hmyzu. Patogenitu, t.j. virulenciu entomopatogénnych húb ovplyvňuje viacero faktorov (MOONJELY et al. 2016) vrátane hostiteľského organizmu resp. živného substrátu. Všetky izoláty entomopatogénnych druhov húb získané počas prieskumu v arboréte sme namnožili na kultivačnom médiu a otestovali sme ich patogenitu proti larvám vijačky voštinovej. Patogenitu endofytických kmeňov sme porovnali s patogenitou kmeňa *B. bassiana* izolovaného z komerčného biopreparátu BOVEROL® určeného na použitie proti škodlivému hmyzu v poľnohospodárstve a lesníctve. Mortalita lariev vijačky v závislosti od koncentrácie spór izolátov húb použitých pri testovaní je uvedená v tabuľke 3. Mortalita lariev po aplikácii spór testovaných izolátov významne ($P<0,05$) varírovala medzi izolátmi pri porovnávaní rovnakých koncentrácií spór v experimente. Pri najnižšej koncentrácii spór v suspenzii (10^4 spór/ml) sa priemerná mortalita lariev pohybovala v rozsahu od 3,33 do 23,33%. Najvyššia mortalita bola zaznamenaná pri izoláte *B. bassiana* z biopreparátu BOVEROL®. Podobne aj pri ďalších troch použitých koncentráciách bol izolát z biopreparátu najúčinnejší (55% mortalita pri 10^5, 83,33% mortalita pri 10^6 a 96,67% mortalita pri koncentrácii 10^7 spór v 1 ml suspenzie). Z pohľadu vzájomnej porovnateľnosti patogenity testovaných izolátov poskytla koncentrácia 10^6 spór/ml najhodnotnejšiu informáciu o variabilite v mortalite ošetrených lariev, čo potvrdila ANOVA a post-hoc Tukeyov HSD test ($P<0,05$) s identifikáciou 8 homogénnych skupín. Opačným prípadom bola najvyššia koncentrácia spór v experimente (10^7 spór/ml), kedy HSD test identifikoval iba tri homogénne skupiny izolátov ($P<0,05$). Pri koncentrácii spór 10^6 mortalita lariev varírovala v rozpätí 33,33–83,33% vrátane izolátu z biopreparátu, resp. 33,33–70,00%, ak uvažujeme iba o endofytických izolátoch. Na základe hodnotenia priemernej mortality lariev vijačky po ošetrení suspenziou spór s koncentráciou 10^6 spór/ml môžeme patogenitu

endofytov definovať ako nízku (<40%), strednú (40–60%) a vysokú (>60). Štyri izoláty môžeme podľa tejto kategorizácie považovať za nízko patogénne, 17 izolátov so strednou patogenitou a 9 izolátov za vysoko patogénne. Z deviatich vysoko patogénnych izolátov sedem vyvolalo mortalitu lariev štatisticky porovnateľnú (P>0,05) s referenčným kmeňom z biopreparátu. Porovnávanie patogenity endofytických izolátov s kmeňom z biopreparátu však treba hodnotiť opatrne, keďže viac ako polovica endofytických izolátov bolo identifikovaných ako *I. fumosorosea*, a teda sme navzájom porovnávali aj odlišné druhy entomopatogénnych húb. V kontrolnej skupine lariev sa mortalita v dôsledku entomopatogénnych húb nevyskytla.

Pri všetkých testovaných izolátoch mortalita populácie testovaných lariev stúpala s rastúcou koncentráciou spór, čo nám umožnilo použiť probitovú analýzu pre determináciu virulencie izolátov pomocou hodnoty tzv. strednej letálnej koncentrácie (LC50). LC50 vyjadruje štatistický odhad takej koncentrácie spór v suspenzii, ktorá po aplikácii vyvolá mortalitu presne polovice populácie testovaných lariev vijačky. V tabuľke 4 uvádzame parametre probitovej analýzy z testovania virulencie izolátov endofytov proti larvám vijačky voštinovej. Hodnota priemernej LC50 sa v závislosti od izolátu pohybovala v rozsahu 3,65–23,90 × 10^5 spór/ml, čo poukazuje na značnú variabilitu medzi izolátmi a zároveň korešponduje s hodnotami mortality lariev uvedených v tabuľke 3. Variabilita medzi izolátmi je graficky znázornená na obrázku 1 a závislosť mortality od koncentrácie spór v suspenzii najúčinnejších izolátov je prezentovaná na obrázku 2. Analýza rozptylu poukázala na štatisticky významné rozdiely v hodnotách LC50 pre testované izoláty ($F_{1,64}$=4,26; P<0,05). Najvirulentnejším izolátom bol BOVEROL® (LC50 = 0,87 × 10^5 spór/ml), hoci z pohľadu štatistickej významnosti bol signifikantne (P<0,05) účinnejší len v porovnaní s piatimi endofytickými izolátmi (obrázok 1): AM_ef_78, AM_ef_79, AM_ef_85, AM_ef_87 a AM_ef_7c. Výsledky laboratórnych experimentov teda potvrdili účinnosť endofytických entomopatogénnych húb voči hmyzu. Využitie entomopatogénnych húb ako endofytov v ochrane rastlín proti vybraným hmyzím škodcom je v súčasnosti aktuálnou otázkou viacerých štúdií (MOONJELY et al. 2016).

V práci sme vyhodnotili priebežné výsledky výskytu entomopatogénnych húb v asimilačných pletivách drevín, ich druhové spektrum a patogenitu voči hmyzu v laboratórnych testoch. V ďalšom kroku výskumu sa plánujeme sústrediť na analýzu koreňov a drevnatých nadzemných častí rastlín. V závere výskumu sa zameriame na molekulárnu diagnostiku získaných izolátov pre potvrdenie ich druhovej identity.

ZÁVERY

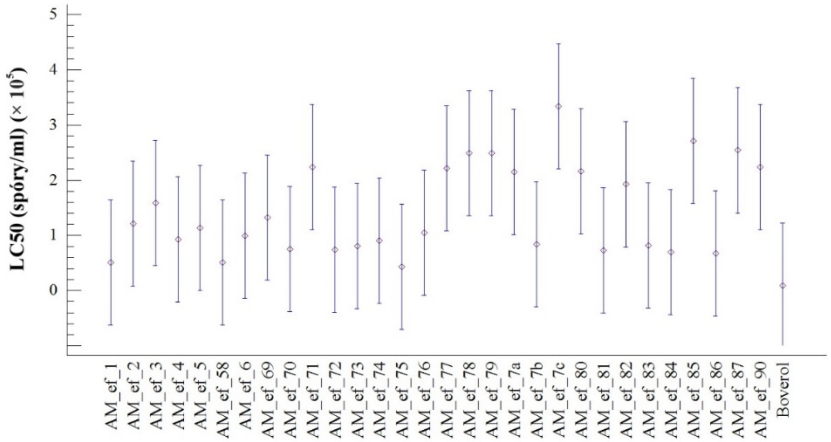
Analýza asimilačných pletív drevín rastúcich v Arboréte Mlyňany SAV potvrdila prítomnosť entomopatogénnych húb (Ascomycota, Hypocreales) v opadavých, ihličnatých aj vždyzelených taxónoch.

Spolu sme detegovali štyri druhy entomopatogénnych húb a izolovali sme 30 *in vitro* izolátov čistých kultúr.

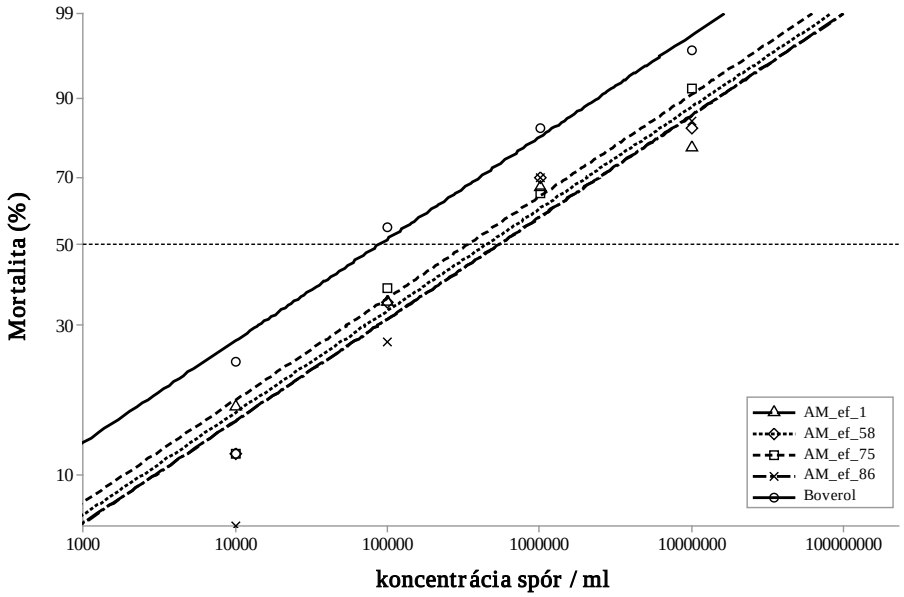
Prevalencia týchto húb v analyzovaných vzorkách nebola vysoká, pozitívnych bolo 2,34% analyzovaných vzoriek.

Väčšina pozitívnych vzoriek bola detegovaná v letných mesiacoch, no jeden izolát sme získali zo vzoriek odobratých vo februári.

Všetky endofytické izoláty preukázali patogénne schopnosti voči modelovému hmyzu v laboratórnych experimentoch.



Obr. 1 Graf priemerných hodnôt letálnej koncentrácie LC50 testovaných izolátov entomopatogénnych húb s vyznačením intervalov spoľahlivosti (95%) Tukeyovho HSD testu.



Obr. 2 Grafické znázornenie závislosti koncentrácie spór 4 najvirulentnejších izolátov entomopatogénnych húb získaných z pletív drevín v Arboréte Mlyňany SAV a mortality lariev *G. mellonella*. Pre porovnanie je v grafe zobrazený aj referenčný izolát BOVEROL®.

Tab. 2 Zoznam izolátov entomopatogénnych húb získaných z pletív drevín v Arboréte Mlyňany SAV v rokoch 2014–2015.

Názov izolátu	Dátum izolácie	Hostiteľská rastlina	Endofytická huba izolovaná z listov resp. ihlíc drevín
AM_ef_1	15/06/2014	*Tilia platyphyllos* Scop.	*Beauveria pseudobassiana*
AM_ef_2	28/07/2015	*Prunus laurocerasus* L.	*Beauveria bassiana*
AM_ef_3	16/07/2015	*Cephalotaxus harringtonia* (Forbes) K. Koch	*Beauveria pseudobassiana*
AM_ef_4	28/07/2015	*Hedera helix* L.	*Beauveria bassiana*
AM_ef_5	16/07/2015	*Hedera helix* L.	*Beauveria bassiana*
AM_ef_6	16/07/2015	*Prunus laurocerasus* L.	*Beauveria bassiana*
AM_ef_7c	28/07/2015	*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.	*Beauveria bassiana*
AM_ef_7b	28/07/2015	*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.	*Beauveria bassiana*
AM_ef_7a	28/07/2015	*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.	*Beauveria bassiana*
AM_ef_58	10/06/2015	*Rhododendron decorum* Franch.	*Metarhizium anisopliae*
AM_ef_69	23/07/2015	*Cephalotaxus harringtonia* (Forbes) K. Koch	*Isaria fumosorosea*

AM_ef_70	24/07/2015	*Berberis julianae* Schneid.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_71	23/07/2015	*Taxus baccata* L.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_72	24/07/2015	*Lonicera* × *purpusii* Rehd.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_73	25/07/2015	*Lonicera* × *purpusii* Rehd.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_74	25/07/2015	*Lonicera* × *purpusii* Rehd.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_75	23/07/2015	*Skimmia japonica* Thunb.	*Beauveria bassiana*
AM_ef_76	04/08/2015	*Hedera helix* L.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_77	04/08/2015	*Hedera helix* L.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_78	12/08/2015	*Hedera helix* L.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_79	23/07/2015	*Ilex aquifolium* L.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_80	24/07/2015	*Ilex aquifolium* L.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_81	24/07/2015	*Ilex aquifolium* L.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_82	21/07/2015	*Rhododendron decorum* Franch.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_83	11/08/2015	*Rhododendron decorum* Franch.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_84	21/07/2015	*Rhododendron fortunei* Lindl.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_85	11/08/2015	*Rhododendron fortunei* Lindl.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_86	11/08/2015	*Rhododendron fortunei* Lindl.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_87	22/08/2015	*Rhododendron catawbiense* Michx.	*Isaria fumosorosea*
AM_ef_90	25/02/2015	*Ilex aquifolium* L.	*Metarhizium anisopliae*

Tab. 3 Priemerná mortalita lariev *G. mellonella* (± SE) po ošetrení suspenziami spór izolátov endofytov v 4 rôznych koncentráciách.

Izolát	Mortalita lariev 10^4 sp./ml (%)	Mortalita lariev 10^5 sp./ml (%)	Mortalita lariev 10^6 sp./ml (%)	Mortalita lariev 10^7 sp./ml (%)
AM_ef_1	16,67 ± 4,41 cd*	35,00 ± 2,89 cd	66,67 ± 4,41 fgh	78,33 ± 4,41 ab
AM_ef_2	8,33 ± 1,67 abcd	25,00 ± 2,89 abcd	61,67 ± 7,26 cdefg	73,33 ± 6,01 ab
AM_ef_3	8,33 ± 1,67 abcd	23,33 ± 1,67 abcd	51,67 ± 6,01 abcdefg	70,00 ± 2,89 a
AM_ef_4	13,33 ± 1,67 bcd	26,67 ± 1,67 abcd	60,00 ± 7,64 bcdefg	76,67 ± 4,41 ab
AM_ef_5	6,67 ± 1,67 abcd	21,67 ± 1,67 abcd	55,00 ± 2,89 abcdefg	80,00 ± 2,89 ab
AM_ef_6	5,00 ± 2,89 abc	30,00 ± 2,89 bcd	55,00 ± 2,89 abcdefg	80,00 ± 2,89 ab
AM_ef_7c	3,33 ± 1,67 abc	20,00 ± 2,89 abc	36,67 ± 1,67 ab	65,00 ± 2,89 a
AM_ef_7b	11,67 ± 1,67 abcd	26,67 ± 4,41 abcd	55,00 ± 2,89 abcdefg	81,67 ± 1,67 ab
AM_ef_7a	8,33 ± 1,67 abcd	23,33 ± 1,67 abcd	40,00 ± 2,89 abcd	70,00 ± 2,89 a
AM_ef_58	11,67 ± 1,67 abcd	35,00 ± 2,89 cd	70,00 ± 5,77 gh	83,33 ± 7,26 abc
AM_ef_69	6,67 ± 1,67 abcd	20,00 ± 2,89 abc	45,00 ± 5,77 abcdef	85,00 ± 2,89 abc
AM_ef_70	3,33 ± 0,33 ab	28,33 ± 3,33 abcd	66,67 ± 4,41 fgh	85,00 ± 2,89 abc
AM_ef_71	6,67 ± 1,67 abcd	18,33 ± 3,33 ab	40,00 ± 2,89 abcd	75,00 ± 5,77 ab
AM_ef_72	11,67 ± 1,67 abcd	25,00 ± 2,89 abcd	60,00 ± 2,89 bcdefg	85,00 ± 2,89 abc
AM_ef_73	10,00 ± 2,89 abcd	30,00 ± 2,89 bcd	53,33 ± 3,33 abcdefg	85,00 ± 2,89 abc
AM_ef_74	10,00 ± 0,00 abcd	20,00 ± 2,89 abc	58,33 ± 4,41 bcdefg	83,33 ± 1,67 abc
AM_ef_75	11,67 ± 4,41 abcd	38,33 ± 3,33 de	65,00 ± 5,77 efgh	91,67 ± 3,33 bc
AM_ef_76	6,67 ± 1,67 abcd	25,00 ± 2,89 abcd	55,00 ± 2,89 abcdefg	81,67 ± 4,41 abc
AM_ef_77	11,67 ± 1,67 abcd	21,67 ± 1,67 abcd	40,00 ± 2,89 abcd	70,00 ± 2,89 a
AM_ef_78	3,33 ± 1,67 abc	13,33 ± 1,67 a	33,33 ± 4,41 a	78,33 ± 4,41 ab
AM_ef_79	6,67 ± 1,67 abcd	23,33 ± 3,33 abcd	38,33 ± 3,33 abc	71,67 ± 6,67 ab
AM_ef_80	3,33 ± 1,67 abc	15,00 ± 2,89 ab	40,00 ± 2,89 abcd	76,67 ± 1,67 ab
AM_ef_81	11,67 ± 1,67 abcd	26,67 ± 4,41 abcd	65,00 ± 2,89 efgh	80,00 ± 2,89 ab
AM_ef_82	6,67 ± 1,67 abcd	25,00 ± 2,89 abcd	43,33 ± 1,67 abcdef	71,67 ± 3,33 ab
AM_ef_83	8,33 ± 1,67 abcd	25,00 ± 2,89 abcd	61,67 ± 1,67 cdefg	81,67 ± 1,67 ab
AM_ef_84	10,00 ± 2,89 abcd	23,33 ± 1,67 abcd	63,33 ± 1,67 defgh	85,00 ± 2,89 abc
AM_ef_85	1,67 ± 1,67 a	16,67 ± 4,41 ab	41,67 ± 3,33 abcde	71,67 ± 6,01 ab
AM_ef_86	6,67 ± 1,67 abcd	26,67 ± 1,67 abcd	70,00 ± 5,77 gh	85,00 ± 5,00 abc
AM_ef_87	8,33 ± 1,67 abcd	26,67 ± 3,33 abcd	40,00 ± 2,89 abcd	66,67 ± 4,41 a
AM_ef_90	3,33 ± 3,33 ab	21,67 ± 1,67 abcd	33,33 ± 3,33 a	78,33 ± 6,01 ab
Boverol®	23,33 ± 1,67 d	55,00 ± 2,89 e	83,33 ± 4,41 h	96,67 ± 1,67 c

* priemerné hodnoty mortality označené rovnakým písmenom v stĺpci nie sú signifikantne rozdielne (P>0,05).

Tab. 4 Parametre probitovej analýzy z testovania virulencie izolátov endofytov proti larvám *G. mellonella*.

Izolát	LC50 (spóry/ml)	± SE	95% interval spoľahlivosti	Regresná priamka
AM_ef_1	4,60 × 10^5	1,58 × 10^5	2,16 – 8,77 × 10^5	y = -4,23 + 0,30x
AM_ef_2	10,29 × 10^5	3,06 × 10^5	5,52 – 18,48 × 10^5	y = -5,26 + 0,35x
AM_ef_3	15,63 × 10^5	4,86 × 10^5	8,38 – 29,72 × 10^5	y = -5,34 + 0,35x
AM_ef_4	8,14 × 10^5	2,53 × 10^5	4,22 – 14,92 × 10^5	y = -4,89 + 0,33x
AM_ef_5	11,07 × 10^5	2,86 × 10^5	6,44 – 18,30 × 10^5	y = -6,24 + 0,42x
AM_ef_6	9,52 × 10^5	2,57 × 10^5	5,38 – 16,04 × 10^5	y = -5,89 + 0,40x
AM_ef_7c	31,84 × 10^5	9,77 × 10^5	17,79 – 62,46 × 10^5	y = -6,35 + 0,40x
AM_ef_7b	8,27 × 10^5	2,34 × 10^5	4,54 – 14,30 × 10^5	y = -5,45 + 0,37x
AM_ef_7a	21,28 × 10^5	6,77 × 10^5	11,46 – 42,16 × 10^5	y = -5,57 + 0,36x
AM_ef_58	4,33 × 10^5	1,30 × 10^5	2,23 – 7,56 × 10^5	y = -4,92 + 0,35x
AM_ef_69	12,40 × 10^5	2,94 × 10^5	7,55 – 19,66 × 10^5	y = -7,03 + 0,47x
AM_ef_70	6,84 × 10^5	1,72 × 10^5	3,98 – 10,95 × 10^5	y = -6,08 + 0,44x
AM_ef_71	19,79 × 10^5	5,29 × 10^5	11,59 – 34,27 × 10^5	y = -6,55 + 0,43x
AM_ef_72	6,91 × 10^5	1,86 × 10^5	3,88 – 11,52 × 10^5	y = -5,72 + 0,40x
AM_ef_73	7,51 × 10^5	2,04 × 10^5	4,21 – 12,64 × 10^5	y = -5,68 + 0,39x
AM_ef_74	8,88 × 10^5	2,29 × 10^5	5,14 – 14,56 × 10^5	y = -6,14 + 0,42x
AM_ef_75	3,65 × 10^5	1,00 × 10^5	2,00 – 6,05 × 10^5	y = -5,47 + 0,40x
AM_ef_76	9,76 × 10^5	2,54 × 10^5	5,64 – 16,13 × 10^5	y = -6,11 + 0,42x
AM_ef_77	21,02 × 10^5	7,06 × 10^5	10,99 – 43,67 × 10^5	y = -5,28 + 0,34x
AM_ef_78	23,72 × 10^5	5,32 × 10^5	15,05 – 37,20 × 10^5	y = -8,27 + 0,54x
AM_ef_79	21,25 × 10^5	6,34 × 10^5	11,83 – 39,98 × 10^5	y = -5,93 + 0,38x
AM_ef_80	21,12 × 10^5	4,99 × 10^5	13,06 – 33,91 × 10^5	y = -7,60 + 0,50x
AM_ef_81	6,75 × 10^5	1,97 × 10^5	3,61 – 11,75 × 10^5	y = -5,20 + 0,40x
AM_ef_82	18,14 × 10^5	5,46 × 10^5	9,97 – 33,99 × 10^5	y = -5,69 + 0,37x
AM_ef_83	7,98 × 10^5	2,14 × 10^5	4,50 – 13,32 × 10^5	y = -5,80 + 0,40x
AM_ef_84	6,95 × 10^5	1,82 × 10^5	3,97 – 11,39 × 10^5	y = -5,95 + 0,42x
AM_ef_85	23,90 × 10^5	5,98 × 10^5	14,48 – 39,87 × 10^5	y = -7,27 + 0,47x
AM_ef_86	6,00 × 10^5	1,56 × 10^5	3,42 – 9,75 × 10^5	y = -5,98 + 0,42x
AM_ef_87	23,17 × 10^5	8,20 × 10^5	11,81 – 50,77 × 10^5	y = -5,12 + 0,32x
AM_ef_90	20,39 × 10^5	5,02 × 10^5	12,42 – 33,57 × 10^5	y = -7,24 + 0,47x
Boverol®	0,87 × 10^5	0,29 × 10^5	0,41 – 1,55 × 10^5	y = -4,46 + 0,36x

POĎAKOVANIE

Práca vznikla vďaka finančnej podpore agentúry VEGA, projekt č. 2/0025/15 „Endofytické mikroorganizmy a ich potenciálna úloha pri zvyšovaní tolerancie drevín voči stresu“.

LITERATÚRA

AKELLO, J. et al. 2007. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). Journal of Invertebrate Pathology 96: 34–42.

AKELLO, J. et al. 2008. Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus,* and their damage in tissue-cultured banana plants. Entomologia Experimentalis et Applicata 129, 157–165.

ARNOLD, A. E., LEWIS, L. C. 2005. Ecology and evolution of fungal endophytes, and their roles against insects. In: VEGA F.E., BLACKWELL M., eds. Insect–fungal associations: ecology and evolution. New York: Oxford University Press. p. 74–96.

ARNOLD, A. E., LUTZONI, F., 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology 88, 541–549.

ARNOLD, A.E. et al. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100: 15649–15654.

AZEVEDO, J. L. et al. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology 3 (1): 40–65.

CHERRY, A. J. et al. 1999a. Pathogen incidence and their potential as microbial control agents in IPM of maize stem borers in West Africa. BioControl 44, 301–327.

CHERRY, A. J. et al. 1999b. Suppression of the stem borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera: *Noctuidae*) in maize following seed dressing, topical application and stem injection with African strains of *Beauveria bassiana*. Agric. Entomol. 7: 171–181.

DE BARY, H. A., 1884. Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze Mycetozoen und Bacterien. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, Berlin.

BING, L. A., LEWIS, L. C. 1991. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: *Pyralidae*) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Environ. Entomol. 20: 1207–1211.

BING, L. A., LEWIS, L. C. 1992. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in rhizome: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Biocontrol Sci. Technol. 2: 39–47.

BRUCK, D. J. 2005. Ecology of Metarhizium anisopliae in soilless potting media and the rhizosphere: Implications for pest management. Biol. Control 32, 155–163.

GANLEY, R. J., NEWCOMBE, G., 2005. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. Mycol. Res. 110, 318–327.

GAO, Q., JIN, K., YING, S. H., et al. 2011. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model insect pathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. PLoS Genetics, 7 (1): e1001264. http://dx.doi.org/10.1371/journal. pgen.1001264.

GREENFIELD, M. et al. 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. Biol. Control, 95: 40–48.

HAJEK, A. E., ST LEGER, R. J. 1994: Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu. Rev. Entomol. 39: 293–322.

HU, G., ST. LEGER, R. J. 2002. Field studies using recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Applied and Environmental Microbiology, 68, 6383–6387.

HUMBER R. A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. In: Lacey L.A. (Ed.) Manual of techniques in invertebrate pathology, 2nd Ed., Academic Press, Amsterdam: 151–187.

JONES, K. D. 1994. Aspects of the biology and biological control of the European corn borer in North Carolina, Ph.D. Dissertation, North Carolina State University, Raleigh.

LECKIE, B. M. 2002. Effects of *Beauveria bassiana* mycelia and metabolites incorporated into synthetic diet and fed to larval *Helicoverpa zea*; and detection of endophytic *Beauveria bassiana* in tomato plants using PCR and ITS primers. M.S. Thesis, The University of Tennessee, Knoxville, TN.

LEWIS, L. C., BING, L.A. 1991. *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for European corn borer control: Program for immediate and season long suppression. Can. Entomol. 123, 387–393.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. 2016. Families of Sordariomycetes. Fungal Diversity, 79:1–317.

MEYLING, N.V., THORUP-KRISTENSEN, K., EILENBERG, J. 2011. Below and above ground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. Biological Control 59, 180–186.

MOONJELY, S, BARELLI, L., BIDOCHKA, M.J. 2016. Insect Pathogenic Fungi as Endophytes. Advances in Genetics, 94, 107–135.

OWNLEY, B. H. et al. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. In: LARTEY, R.T., CESAR, A.J. (Eds.), Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost, India, pp. 255–269.

OWNLEY, B. H. et al. 2008. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. J. Invertebr. Pathol. 98, 267–270.

PAMPAPATHY, G. et al. 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. Biol. Control 55: 34–41.

POSADA, F., VEGA, F. E. 2005. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). Mycologia 97: 1195–1200.

POWELL, W. A. et al. 2007. Endophytic *Beauveria bassiana* in tomatoes yields mycosis in tomato fruitworm larvae. HortScience 42, 933.

QUESADA-MORAGA, E. et al. 2006. Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. Mycopathologia 161: 323–329.

REDMAN, R. S. et al. 2002. Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. Science 298: 1581.

RODRIGUEZ, R. J. et al. 2004. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 9: 261–272.

RONDOT Y., REINEKE A. 2013. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as an endophyte in grapevine *Vitis vinifera* (L.) plants. In: SCHNEIDER C., LEIFERT C., FELDMANN F. (Eds), Endophytes for plant protection: the

state of the art. Proceedings of the 5th International Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, p. 158.

ST. LEGER, R. 2008. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. J. Invertebr. Pathol. 98, 271–276.

STRASSER et al. 1996. Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. In: JACKSON, T.A., GLARE, T.R. (Eds.), Microbial Control of Soil Dwelling Pests. AgResearch, Lincoln, New Zealand, pp. 125–130.

SUJEETHA, J., SAHAYARAJ, K., 2014. Role of Entomopathogenic Fungus in Pest Management. K. SAHAYARAJ (Ed.): Basic and Applied Aspects of Biopesticides, Springer New Delhi, India, pp 31–46.

VALERO-JIMÉNEZ C. A., WIEGERS H., ZWAAN B. J., KOENRAADT C. J. M., VAN KAN J. A. L. 2016. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology, 133: 41–49.

VEGA, F. E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. J. Invertebr. Pathol. 98: 277–279.

WILSON, D. 1995. Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos 73, 274–276.

Adresa autora

Ing. Marek Barta, PhD. Arborétum Mlyňany, Ústav ekológie lesa SAV, Vieska nad Žitavou 178, 951 52 Slepčany, Tel: +421-37-633-4211, E-mail: marek.barta@savba.sk

ENTOMOPATOGÉNNE HUBY (ASCOMYCOTA, HYPOCREALES) PARAZITUJÚCE NA IMÁGACH INVÁZNEJ LIENKY *HARMONIA AXYRIDIS* V ARBORÉTE MLYŇANY SAV

ENTOMOPATHOGENIC FUNGI (ASCOMYCOTA, HYPOCREALES) PARASITING TO ADULTS OF INVASIVE HARLEQUIN LADYBIRD, *HARMONIA AXYRIDIS*, IN MLYŇANY ARBORETUM SAS

MAREK BARTA – JURAJ MEDO – PETER ZACH

BARTA, M. – MEDO, J. – ZACH, P. 2016. Entomopatogénne huby (Ascomycota, Hypocreales) parazitujúce na imágach inváznej lienky *Harmonia axyridis* v Arboréte Mlyňany SAV. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 25-34. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Entomopathogenic fungi were recorded from diapausing samples of the Asian ladybird, *Harmonia axyridis*, the invasive coccinellid originating in Asia. The samples collected in Mlyňany Arboretum SAS (in southwestern Slovakia) were found to be infected by fungi of four genera: *Purpureocillium, Aspergillus, Beauveria* and *Isaria*. Altogether, 12 *in vitro* cultures were obtained from the infected cadavers. Natural mortality due to fungal infection was low (< 1%) in the diapausing population. In laboratory bioassays, the ladybird adults were susceptible to only species of genera *Beauveria* and *Isaria*. Strains of *B. bassiana* from commercial mycoinsecticides were less virulent to ladybird adults than native strains from naturally infected samples. However, in general, virulence of all strains tested to *H. axyridis* was low (10-22% mortality), but was high enough (LC50 = 0.76–67.74×10^5 spores/ml) when tested against a laboratory strain of *Galleria mellonella* larvae.

Key words: entomopathogenic fungi, invasive species, mycoinsecticides, pathogenicity, virulence.

ÚVOD

Introdukcia nových druhov do ekosystému môže vyvolať vážne zmeny v jeho autoregulačnej schopnosti. Introdukovaný veľmi kompetitívny druh môže potlačiť prirodzené druhy postavené na rovnakom stupni potravového reťazca a následne ovplyvniť aj ostatné stupne. Keďže v ekosystéme zvyčajne chýbajú predátori, paraziti alebo patogény schopné regulovať introdukovaný druh, dá sa pozorovať jeho masívne rozmnoženie. *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: *Coccinellidae*) je druh lienky pôvodom z Ázie, ktorý je v Európe a Severnej Amerike považovaný za inváznu druh. Pôvodne sem bol zámerne introdukovaný človekom za účelom biologickej ochrany rastlín proti voškám. V Severnej Amerike sa však lienka začala nekontrolovane šíriť v osemdesiatych rokoch 20. storočia a momentálne predstavuje najčastejší druh lienky takmer na celom území Spojených štátov a Kanady (KOCH 2003). V Európe bola lienka *H. axyridis* komerčne dodávaná niekoľkými firmami ako účinné bioagens v biologickej ochrane. Od roku 1995 bola predávaná za týmto účelom vo Francúzku, Belgicku a Holandsku. Postupne bola zámerne vypúšťaná aj do ďalších 9 európskych krajín. V ekosystéme si tento druh našiel miesto a začal sa veľmi rýchlo šíriť po Európe, hlavne od roku 2002 (PANIGAJ et al. 2014). Na Slovensku bol prvý výskyt lienky zaznamenaný v roku 2006 (MAIZLAN et al. 2008; PANIGAJ et al. 2014). V roku 2008 už bolo možné lienku bežne nájsť v 13 krajinách Európy (BROWN et al. 2008).

H. axyridis sa zvyčajne živí voškami, ale konzumuje aj vajíčka a larvy iných druhov hmyzu, medzi ktoré patria aj autochtónne druhy lienok ako napríklad *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763) v Južnej Amerike (MICHAUD 2002), *Adalia decempunctata* (Linnaeus, 1758) a *A. bipunctata* (Linnaeus, 1758) v Európe (BROWN et al. 2015). Známe je tiež kanibalistické správanie lienky *H. axyridis*. Doterajšie výskumy potvrdili, že *H. axyridis* je výrazný kompetitívny predátor v rámci koexistujúcich

hmyzích spoločenstiev vyznačujúci sa agresivitou a dobrým obranným systémom proti ostatným druhom (RAAK-VAN DEN BERG et al. 2012). Táto vysoká kompetitívna schopnosť vyústila do znižovania hustoty populácií prirodzených druhov lienok. Zvyšovanie početností jedného druhu na úkor ostatných vedie k poklesu diverzity a k strate stability ekosystému, preto invázia *H. axyridis* predstavuje významný ekologický problém (BROWN et al. 2008).

Medzi prirodzených regulátorov *H. axyridis* patria predátory, napr. vtáky, proti ktorým však lienka využíva obranný systém založený na reflexívnom vypúšťaní sekrétu s obsahom alkaloidov (ALAM et al. 2002). Napriek tomu, niekoľko druhov vtákov túto lienku konzumuje (NECHAYEV, KUZNETSOV 1973). Ďalším známym predátorom je bzdocha *Podisus maculiventris* (Say, 1832), ktorá je schopná požierať *H. axyridis*, prirodzene ju však nevyhľadáva (DECLERCQ et al. 2003). Parazitoidy, ktoré využívajú *H. axyridis* ako hostiteľa (*Phalacrotophora philaxyridis* Disney, 1997, *Medina luctuosa* (Meigen, 1824), *Strongygaster triangulifera* (Loew, 1863) nie sú prirodzene rozšírené v Európe (KOCH 2003). V Dánsku však bola pozorovaná parazitácia *H. axyridis* parazitickou osičkou *Dinocampus coccinellae* (Schrank, 1802) (STEENBERG, HARDING 2009).

Entomopatogénne huby sú schopné napádať takmer všetky druhy hmyzu, ale ich výskyt je variabilný podľa jednotlivých druhov hmyzu a je silne závislý od konkrétneho kmeňa huby. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce entomopatogénne huby v populáciách hmyzu patria druhy z radu Hypocreales (Ascomycota). Sú to mitoticky sa rozmnožujúce askomycéty predovšetkým z rodov *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* a *Lecanicillium*. Nálezy mŕtvych jedincov *H. axyridis* napadnutých hubou *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. popísal napríklad KUZNETSOV (1997). STEENBERG a HARDING (2009) získali izoláty niekoľkých druhov entomopatogénnych húb infikujúcich *H. axyridis* v Dánsku. Konkrétne *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr., *B. bassiana* a *Lecanicillium* sp. Niektoré jedince boli infikované aj viac ako jedným druhom huby. Najčastejším patogénom bol druh *I. farinosa*. Pri testovaní tejto huby sa zistila 100% úmrtnosť lariev, ale len 5% úmrtnosť dospelých jedincov. Vyššie spomínané druhy entomopatogénnych húb sú pomerne časté a vyskytujú sa v rôznych prostrediach (pôda, fylosféra, rastliny), v lesných aj poľnohospodárskych ekosystémoch (TKACZUK et al. 2014; MEDO, CAGÁŇ 2011).

V laboratórnych experimentoch sa ukázalo, že *H. axyridis* je výrazne menej náchylná na infekciu entomopatogénnymi hubami ako natívne lienky (CONTREL, SAPIRO-ILAN 2003; ROY et al. 2008). Zistilo sa tiež, že je tolerantná proti komerčne používaným kmeňom entomopatogénnej huby *B. bassiana*.

Cieľom práce bolo (1) vyhodnotiť prevalenciu a druhové spektrum entomopatogénnych húb z prirodzene uhynutých dospelých diapauzujúcich jedincov *H. axyridis* odchytených v Arboréte Mlyňany SAV, (2) získať *in vitro* izoláty týchto húb a v laboratórnych podmienkach (3) otestovať ich patogenitu voči imágam inváznej lienky.

MATERIÁL A METÓDY

V Arboréte Mlyňany SAV sme v mesiaci január v roku 2015 zberali vzorky imág inváznej lienky *H. axyridis* hromadne sa sťahujúce do interiéru budov arboréta. Zber vzoriek sme uskutočnili v týždenných intervaloch od 9. do 30. januára. Z nazberaných lienok sme vyselektovali mŕtve jedince, ktoré sme ihneď uložili po 5 ks do plastových Petriho misiek (90 × 16 mm) vystlaných navlhčeným filtračným papierom. Misky s mŕtvymi lienkami sme vložili do inkubátora pri 25±1°C na 10 dní. Po 10 dňoch sme vyhodnotili počet lienok so symptómami typickými pre infekciu entomopatogénnymi hubami. Tieto jedince sme použili na získanie *in vitro* izolátov entomopatogénnych húb. Nazbierané živé lienky sme 15 dní inkubovali pri 24±2°C a 80% relatívnej vlhkosti vzduchu. Po 15 dňoch sme vyselektovali mŕtve jedince a tie sme inkubovali ďalších 10 dní v Petriho miskách ako je uvedené vyššie. Z nich sme vybrali jedince, na ktorých sa objavili symptómy mykotického ochorenia a opäť sme ich použili na izoláciu čistých kultúr entomopatogénnych húb.

Na izoláciu entomopatogénnych húb sme použili selekčné agarové médium, ktorého základ tvoril Sabouraudov dextrózový agar (SDA) doplnený o antibiotiká (0,6g/l streptomycín sulfát, 0,05g/l tetracyklín hydrochlorid) a špecifické fungicídy (0,25g/l cyclohexamide a 0,5g/l dodine) (STRASSER et al. 1996). Mŕtve jedince sme inkubovali 15 dní pri 25±2°C na agarovej platni. Kolónie húb, ktoré vyrástli z mŕtvych lienok sme preočkovali na štandardný SDA bez antibiotík a fungicídov a kultivovali 10 dní pri 25±2°C. Získané čisté izoláty sme uskladnili v skúmavkách, kam boli preočkované na rovnaké kultivačné médium. Uskladnené boli v chladničke pri 5°C.

Entomopatogénne huby sme identifikovali podľa špecifických makro- a mikroskopických znakov (HUMBER 2012, MAHARACHCHIKUMBURA et al. 2016). Pre potvrdenie druhovej identity patogénov sme tiež analyzovali ITS región rDNA všetkých získaných izolátov (MEDO 2009; SCHEMMER et al. 2016). Amplifikované ITS sekvencie sme porovnali so sekvenciami v nukleotidovej databázy GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) použitím algoritmu BLAST N (ALTSCHUL et al. 1997).

Pre potvrdenie entomopatogénnych vlastností získaných izolátov voči lienke *H. axyridis* sme uskutočnili jednoduchý skríningový test. Skupiny 50 ks imág lienok sme ošetrili spórami získaných izolátov tak, že sme lienky nasypali priamo do sporulujúcej *in vitro* kultúry v Petriho miske. Takto ošetrené lienky sme následne premiestnili do transparentných plastových krabičiek vystlaných navlhčeným filtračným papierom a inkubovali sme ich 15 dní pri 25±1°C. Denne sme sledovali ich mortalitu a vyhodnocovali výskyt symptómov mykózy na mŕtvych jedincoch pre potvrdenie infekcie. V kontrolnej skupine sme lienky (50 ks) neošetrili spórami, ale inkubovali sme ich rovnako ako ošetrené jedince. Izoláty húb, pri ktorých sme týmto testom potvrdili entomopatogénne vlastnosti, sme v druhej fáze experimentu použili na vyhodnotenie ich virulencie. Lienky pre test patogenity boli zberané v Arboréte Mlyňany SAV z populácie hibernujúcich jedincov a počas inkubácie sme im okrem vody neposkytli zdroj potravy.

Testovanie virulencie izolátov sme hodnotili voči imágam *H. axyridis* a ďalšiemu modelovému hmyzu. Ako modelový hmyz sme použili larvy 4.–5. vývojového štádia vijačky voštinovej (*Galleria mellonella* (Linnaeus 1758)) získané z laboratórneho chovu Arboréta Mlyňany SAV. Lienky na test virulencie boli odchytené v mesiaci august v lokalite Zvolen a Levice. Na testovanie virulencie izolátov sme pripravili 4 rôzne koncentrácie spór v suspenzii s 0.01% vodným roztokom zmáčadla (Tween 80), konkrétne 10^5, 10^6, 10^7 a 10^8 spór v 1 ml. Jednotlivé suspenzie spór sme použili na inokuláciu 15 imág lienok a 20 lariev vijačky, ktorú sme vykonali priamo ponorením celej testovanej skupiny hmyzu na 5s do pripravených suspenzií. Ošetrené jedince sme inkubovali v plastových krabičkách 15 dní pri 25±2°C tak ako je uvedené vyššie. Denne sme sledovali ich mortalitu a vyhodnocovali výskyt symptómov mykózy na mŕtvych jedincoch pre potvrdenie infekcie. V kontrolnom variante sme rovnaký počet jedincov ošetrili v 0.01% vodnom roztoku Tweenu 80 bez spór. Ako potravu pre lienky počas inkubácie sme denne dodávali *ad libidum* vošku slivkovú (*Hyalopterus pruni* (Geoffroy 1762)). Pri všetkých izolátoch sme test virulencie vykonali v troch nezávislých opakovaniach.

Okrem izolátov entomopatogénnych húb získaných z prirodzene infikovaných lienok *H. axyridis* sme do testovania zaradili ako referenčné kmene huby *B. bassiana* získané z komerčných biopreparátov BOVEROL® (Fytovita s.r.o., Ostrožská Lhota, Česká republika), BOTANIGARD® ES (BioWorks Inc., Victor, NY, USA) a NATURALIS-L® (Fargro Ltd, West Sussex, Veľká Británia).

Virulenciu testovaných izolátov sme vyhodnotili mierou letálnej koncentrácie LC50, ktorú sme stanovili probitovou analýzou z údajov mortality lariev pre jednotlivé koncentrácie spór. Priemerné hodnoty mortality lariev ošetrených testovanými suspenziami a hodnoty LC50 jednotlivých izolátov sme porovnali analýzou rozptylu a Tukeyovým HSD testom. Dáta pre mortalitu lariev (m) boli pred použitím v analýze rozptylu podrobené arc-sínusovej transformácii ($m' = \arcsin\sqrt{m}$) pre dosiahnutie podmienky normality. Na štatistické vyhodnotenie sme použili štatistický program Minitab 17®.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V práci sme sledovali prirodzený výskyt infekcie entomopatogénnymi hubami v populácii imág inváznej lienky *H. axyridis* v Arboréte Mlyňany SAV. Počas prieskumu sme celkovo nazberali a vyhodnotili 2371 jedincov. Z nich 27,72% zahynulo počas inkubácie v laboratóriu a 22 lienok (0,93%) vykazovalo symptómy typické pre infekciu entomopatogénnymi hubami (Tabuľka 1). Použitím selekčného živného média sme z týchto jedincov získali 12 čistých kultúr mikroskopických húb (Tabuľka 2), ktoré boli identifikované ako *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones et Samson (1 izolát), *Aspergillus sclerotiorum* G.A. Huber (1 izolát), *Aspergillus flavus* Link (2 izoláty), *Aspergillus* sp. (3 izoláty), *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner et R.A. Humber (1 izolát), *Isaria fumosorosea* Wize (1 izolát) a *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (2 izoláty). Pri prieskume entomopatogénnych húb v populácii prezimujúcich imág *H. axyridis* v Dánsku boli determinované 4 druhy húb *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr., *B. bassiana*, *Lecanicillium muscarium* R. Zare et W. Gams a *L. lecanii* R. Zare et W. Gams (STEENBERG, HARDING 2009). Priemerná mortalita sa pohybovala okolo 4,5%, čo je násobne vyššia hodnota než sme zaznamenali v našom prieskume. Menej než 1% diapauzujúcich lienok (22 jedincov) prejavovalo charakteristické symptómy mykózy v arboréte, no z nich sme potvrdili infekciu entomopatogénmi iba v 12 prípadoch, čím sa podiel infikovaných jedincov v populácii ešte znížil. Rozdiely pozorujeme aj v druhovom spektre entomopatogénov. Kým v Dánsku v populácii lienky prevládala huba *I. farinosa*, tak v našich vzorkách sme tento druh nedetegovali. *B. bassiana* je považovaná za významného pôvodcu mortality aj domácej lienky *Coccinella septempunctata* Linnaeus 1758 najmä v zimných mesiacoch počas diapauzy (ORMOND et al. 2006). Vo všeobecnosti sa považuje *H. axyridis* za vysoko rezistentnú voči entomopatogénnym háďatkám alebo hubám, ktoré však vyvolávajú mortalitu domácich druhov lienok (SHAPIRO-ILAN, COTTRELL 2005, ROY, COTTRELL 2008; ROY et al. 2008). Napríklad SHAPIRO-ILAN a COTTRELL (2005) pozorovali v rovnakom období (september – október) 33–81% mortalitu autochtónnej lienky *Olla v-nigrum* (Mulsant, 1866), ale žiadnu mortalitu v sympatricky sa vyskytujúcej populácii *H. axyridis*. Na druhej strane aj domáci druh lienky *C. septempunctata* má v prirodzenom prostredí vyvinutý behaviorálny obranný systém, keďže zdravé lienky dokážu detegovať a následne sa vyhnúť kontaktu s jedincami infikovanými hubou *B. bassiana*, alebo kontaktu so spórami tejto huby (ORMOND et al. 2011).

Tab. 1 Zber imág lienky *H. axyridis* v Arboréte Mlyňany SAV a výskyt jedincov so symptómami infekcie entomopatogénnymi hubami.

Dátum zberu lienok	**Počet nazberaných lienok (n_0)**	**Mŕtve lienky počas inkubácie**		**Mŕtve lienky so symptómami mykózy**	
		n_1	% z n_0	n_2	% z n_0
09/01/2015	532	145	27,25	5	0,94
16/01/2015	613	212	34,58	7	1,15
23/01/2015	551	113	20,51	4	0,73
30/01/2015	675	188	27,85	6	0,89
Σ	**2371**	**658**	**27,75**	**22**	**0,93**

Test patogenity našich izolátov potvrdil entomopatogénne vlastnosti iba u druhov z rodu *Beauveria* a *Isaria*, hoci mortalita testovanej populácie lienok vyvolaná týmito hubami bola nízka, 10–22% (Tabuľka 3). Z druhov húb identifikovaných v našom prieskume iba druhy z rodov *Beauveria* a *Isaria* patria k typickým parazitom hmyzu. Huby z rodu *Aspergillus* (Ascomycota: Eurotiales) a druh *P. lilacinum* sú bežnými pôdnymi saprofytmi (BENNETT 2010). Huba *P. lilacinum* parazituje aj na pôdnych háďatkách a bola tiež testovaná ako potenciálny bioagens proti významným fytopatogénnym háďatkám (JATALA et al. 1979), roztočcom (MUŞTU et al. 2016) a listožravým mravcom (GOFFRÉ, FOLGARAIT 2015). Rod *Aspergillus* býva častým kontaminantom *in vitro* kultúr mikroskopických húb (LACEY 2012), ale niektoré druhy sú považované za príležitostných patogénov hmyzu (MORAES et al. 2001). Napríklad *A. flavus* and *Aspergillus clavatus* Desmazieres vykazovali

rovnakú virulenciu proti komárom (BAWIN et al. 2016), alebo vyššiu proti voškám (SEYE et al. 2014), ako bežný entomopatogénny druh *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin.

Tab. 2 Zoznam *in vitro* izolátov mikroskopických húb získaných z mŕtvych jedincov *H. axyridis* zberaných v Arboréte Mlyňany SAV a ich identifikácia.

Názov izolátu	**Dátum izolácie**	**Identifikácia huby z izolátu**	**Zhoda so sekvenciou v databáze GenBank**
AM_ep_11	15/02/2015	*Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones et Samson	KC157713.1 (100%)
AM_ep_12	15/02/2015	*Aspergillus sclerotiorum* G.A. Huber	FR733827.1 (100%)
AM_ep_13	15/02/2015	*Aspergillus* sp.	GQ169486.1 (100%)
AM_ep_14	19/02/2015	*Aspergillus* sp.	GQ169486.1 (100%)
AM_ep_15	26/02/2015	*Aspergillus flavus* Link	JQ316528.1 (100%)
AM_ep_16	26/02/2015	*Aspergillus flavus* Link	HQ340106.1 (100%)
AM_ep_17	26/02/2015	*Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.	KC753392.1 (100%)
AM_ep_18	26/02/2015	*Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner et R.A. Humber	KC355187.1 (100%)
AM_ep_19	26/02/2015	*Aspergillus* sp.	FR733828.1 (100%)
AM_ep_26	03/03/2015	*Isaria fumosorosea* Wize	GU354345.1 (100%)
AM_ep_29	12/03/2015	*Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.	HQ880760.1 (100%)
AM_ep_30	12/03/2015	*Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.	HQ880760.1 (100%)

Tab. 3 Mortalita imág lienky *H. axyridis* po ošetrení suchými spórami z *in vitro* kultúr húb získaných z mŕtvych jedincov tejto lienky.

Názov izolátu	**Mortalita lienok po ošetrení spórami izolátov (*n* = 50)**					
	5. deň		**10. deň**		**15. deň**	
	celková	**mykóza**	**celková**	**mykóza**	**celková**	**mykóza**
AM_ep_11	0%	0%	4%	0%	26%	0%
AM_ep_12	0%	0%	10%	0%	32%	0%
AM_ep_13	2%	0%	12%	0%	30%	0%
AM_ep_14	4%	0%	4%	0%	16%	0%
AM_ep_15	0%	0%	22%	0%	42%	0%
AM_ep_16	2%	0%	8%	0%	22%	0%
AM_ep_17	4%	0%	12%	2%	26%	8%
AM_ep_18	2%	0%	14%	2%	38%	10%
AM_ep_19	6%	0%	12%	0%	28%	0%
AM_ep_26	6%	0%	16%	4%	42%	12%
AM_ep_29	4%	0%	14%	6%	58%	22%
AM_ep_30	2%	0%	18%	4%	46%	18%
Kontrola	4%	0%	6%	0%	22%	0%

Pre posúdenie virulencie izolátov húb z rodov *Beauveria* a *Isaria* voči lienkam sme použili štandardizovaný metodický postup s aplikáciou 4 rôznych koncentrácií spór na testovanú skupinu lienok, tak aby sme dokázali zo získaných dát odhadnúť závislosť mortality a koncentrácie spór a pomocou probitovej analýzy stanoviť tzv. strednú letálnu koncentráciu LC50. Bohužiaľ imága lienok ošetrené koncentráciami 10^5–10^7 spór/ml nevykazovali žiadnu mortalitu po 15 dňoch od inokulácie suspenziami ani po dodatočných piatich dňoch monitorovania. Vývoj mykózy na ošetrených jedincoch sme dosiahli iba pri najvyššej použitej koncentrácii spór (10^8 spór/ml). Mortalita lienok na plánovanom konci experimentu (15. deň od inokulácie) bola nízka, v rozpätí 4,48–11,11% v závislosti

od izolátu (Graf 1). Ani po predĺžení pozorovania mortality na 20 dní sa však mortalita v testovanej populácii už nezvýšila. Najvyššiu mortalitu (11,11%) sme zaznamenali pre izolát AM_ep_29 (*B. bassiana*) a najnižšiu mortalitu (4,48%) sme získali po aplikácii izolátov AM_ep_17 (*B. bassiana*) a AM_ep_18 (*B. pseudobassiana*). Mortalita lienok po aplikácii izolátov z komerčných preparátov bola tiež nízka pri rovnakej koncentrácii spór a 2 izoláty (BOTANIGARD® ES NATURALIS-L®) vykazovali dokonca nižšiu patogenitu (mortalita 2,29%) ako natívne izoláty z lienok. Aj napriek rozdielom v mortalite lienok medzi izolátmi pri koncentrácii 10^8 spór/ml analýza rozptylu štatisticky preukazný rozdiel medzi izolátmi nepreukázala ($F_{2,66}$ = 1,02; P>0,05), čo súviselo s vyššou variabilitou medzi opakovaniami, resp. nízkym počtom opakovaní. Keďže sme pri aplikácii nižších koncentrácií spór nezaznamenali žiadnu mortalitu lienok, tak sme nemohli aplikovať probitovú analýzu pre odhad strednej letálnej koncentrácie LC50. Vzhľadom na nízku účinnosť testovaných izolátov voči imágam lienky sme preto zopakovali rovnaký experiment s larvami vijačky voštinovej, ktoré sa vyznačujú vysokou vnímavosťou voči infekcii entomopatogénnymi hubami. Tento test potvrdil patogenitu všetkých testovaných izolátov a mortalita lariev vijačky stúpala s rastúcou koncentráciou spór v testoch (Tabuľka 4), čo nám umožnilo odhadnúť závislosť medzi mortalitou a koncentráciou (Graf 2) a stanoviť letálnu koncentráciu LC50. Pri suspenziách s koncentráciou 10^6 a 10^7 spór/ml sme identifikovali signifikantné rozdiely (P<0,05) v mortalite lariev, pričom najvyššiu mortalitu sme dosiahli pri ošetrení spórami izolátu BOVEROL®. Najvyššiu virulenciu (LC50) voči larvám vijačky sme zistili pri izolátoch huby *B. bassiana*, BOVEROL® a AM_ep_29.

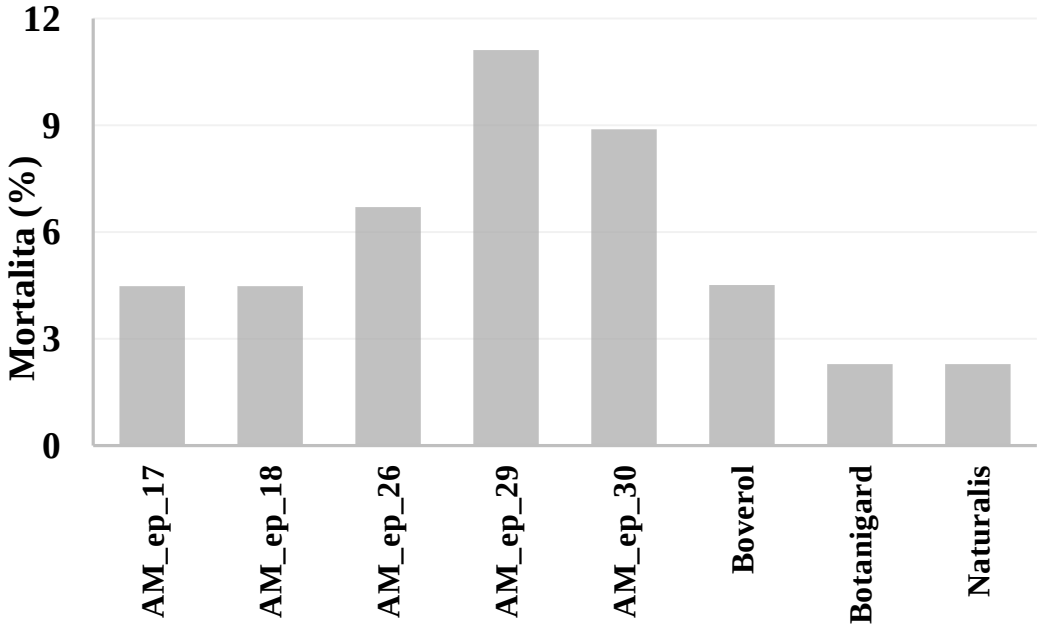
Tab. 4 Priemerná mortalita lariev vijačky voštinovej *G. melonella* po ošetrení vodnými suspenziami spór izolátov húb získaných z mŕtvych jedincov lienky *H. axyridis* na 15. deň po inokulácii a virulencia izolátov vyjadrená hodnotou letálnej koncentrácie LC50.

Názov izolátu	**Mortalita lariev po ošetrení spórami izolátov (*n* = 20)**				
	Koncentrácia spór v 1 ml suspenzie				**LC50 ±SE**
	10^5	**10^6**	**10^7**	**10^8**	**(×10^5) spór/ml**
AM_ep_17	21,67% a	33,33% ab	66,67% b	86,67% a	33,83 ± 9,98 b
AM_ep_18	23,33% a	38,33% ab	65,00% b	90,00% a	26,78 ± 7,86 b
AM_ep_26	18,33% a	30,00% a	70,00% ab	91,67% a	28,57 ± 8,51 b
AM_ep_29	23,33% a	40,00% ab	71,67% ab	91,67% a	2,71 ± 0,86 a
AM_ep_30	23,33% a	45,00% b	66,67% b	88,33% a	23,88 ± 6,95 ab
Boverol®	55,00% a	83,33% c	96,67% a	98,33% a	0,76 ± 0,26 a
Botanigard® ES	20,00% a	38,33% ab	65,00% b	85,00% a	35,16 ± 10,34 b
Naturalis-L®	13,33% a	28,33% a	58,33% c	81,67% a	67,74 ± 20,71 c
Kontrola	0%	0%	0%	0%	–
Parametre analýzy rozptylu	*F* = 2,54 *d.f.* = 7 *P* = 0,06	*F* = 8,35 *d.f.* = 7 *P* = 0,00	*F* = 2,96 *d.f.* = 7 *P* = 0,03	*F* = 2,36 *d.f.* = 7 *P* = 0,07	*F* = 5,54 *d.f.* = 7 *P* = 0,01

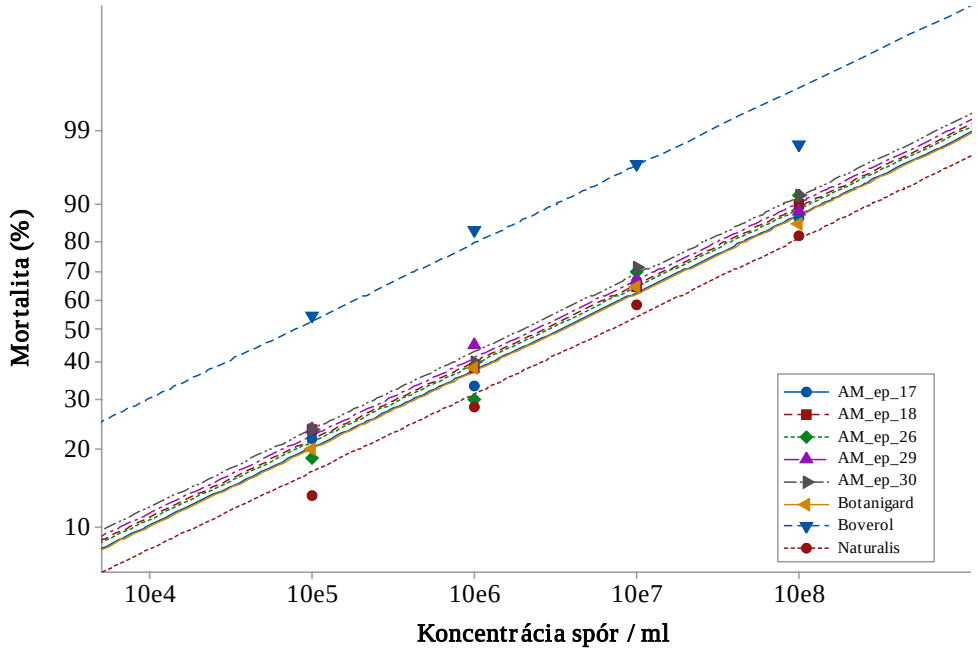
Hodnoty priemernej mortality v rámci rovnakej koncentrácie a hodnoty letálnej koncentrácie LC50 označené rozdielnym písmenom sú signifikantne rozdielne pre α = 0,05 (Tukeyov HSD test).

Je známe, že *H. axyridis* sa vyznačuje silnou rezistenciou voči širokému spektru patogénov, čo jej uľahčuje inváznе šírenie. Lienka sa bráni pred predátormi chemicky, alkaloidom Harmonín ((17R, 9Z)-1,17-diaminooctadec-9-en) a páchnucou látkou metoxypyrazín, ktoré sú obsiahnuté v hemolymfe lienky. V ohrození lienka vylučuje hemolymfu v podobe kvapiek z kolenných kĺbov (imága) a intersegmentálnych otvorov v zadnej časti tela lariev. Harmonín má výrazné antimikrobiálne účinky (NEDVĚD 2014). Okrem harmonínu je obrana lienky indukovaná aj produkciou antimikrobiálnych peptidov. Lienka po infekcii rôznymi mikroorganizmami (huby, baktérie) znižuje produkciu harmonínu a zvyšuje tvorbu širokej skupiny antimikrobiálnych peptidov (RÖHRICH et al. 2012; VILCINSKAS et al. 2013). V laboratórnych testoch domáce druhy lienok, *Adalia bipunctata* (Linnaeus 1758) a *C. septempunctata*, usmrcujú už stredné dávky spór huby *B. bassiana*, no pre usmrtenie *H. axyridis* sú potrebné násobne vyššie koncentrácie (ROY et al. 2008). Jedna z mála prác, kde sa testovala virulencia

huby *B. bassiana* (konkrétne kmeň GHA, ktorý je súčasťou biopreparátu BOTANIGARD® ES) proti imágam *H. axyridis*, uvádza strednú letálnu koncentráciu spór LC50 (t.j. mortalitu 50% testovanej populácie) v rozsahu $10^{8,3}$ až $10^{9,6}$ spór/ml (ROY et al. 2008). Na druhej strane autori v tej istej práci tiež píšu, že iba dávky na 10^9 spór/ml dokázali vyvolať infekciu imág *H. axyridis*. Hoci sme takú vysokú dávku v našich testoch nepoužili, naše výsledky viac-menej korešpondujú s touto prácou, keďže pri koncentrácii 10^8 spór/ml zahynulo v závislosti od izolátu iba 2–11% jedincov testovanej populácie. V našom testovaní dokonca izolát z preparátu BOTANIGARD® ES, ktorý bol použitý v citovanej práci, usmrtil pri koncentrácii 10^8 spór/ml iba 2,29% testovanej populácie a podstatne účinnejšie boli natívne izoláty izolované z prirodzene infikovaných lienok.



Graf 1. Priemerná mortalita imág lienok *H. axyridis* po ošetrení vodnou suspenziou spór izolátov entomopatogénnych húb s koncentráciou 1×10^8 spór/ml.



Graf 2. Grafické znázornenie závislosti koncentrácie spór testovaných izolátov entomopatogénnych húb a mortality lariev *G. mellonella*.

ZÁVERY

Sledovali sme prirodzený výskyt entomopatogénnych húb v populácii imág inváznej lienky *H. axyridis* v Arboréte Mlyňany SAV. Prevalencia lienok s príznakmi mykózy bola nízka, dosiahla iba 0,93%.
Použitím selekčného živného média sme získali 12 čistých kultúr mikroskopických húb, ale iba štyri z nich preukázali entomopatogénne vlastnosti. Mortalita lienok po ošetrení týmito štyrmi izolátmi bola nízka a pohybovala sa od 4 do 11%.
Mortalita lienok po aplikácii izolátov z komerčných preparátov bola tiež nízka, varírovala v rozpätí 2,29–4,51%.
Izoláty entomopatogénnych húb z lienok na druhej strane preukázali vysokú virulenciu voči ďalšiemu modelovému hmyzu zaradeného do experimentov, larvám vijačky voštinovej.
Výsledky práce potvrdzujú výraznú rezistenciu imág *H. axyridis* voči testovaným druhom entomopatogénnych húb.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla vďaka finančnej podpore agentúry VEGA, projekt č. 2/0052/15 „Funkčne významné živočíchy v dynamike lesných ekosystémov v nových environmentálnych podmienkach“ a agentúre APVV, projekt č. APVV-15-0348 „Nové metódy v integrovanej ochrane lesa zahŕňajúce využitie entomopatogénnych húb“.

LITERATÚRA

ALAM N, CHOI I.S., SONG K.S. et al., 2002. A new alkaloid from two coccinellid beetles Harmonia axyridis and Aiolocaria haexaspilota. Bulletin of the Korean Chemical Society 23: 497–499.

ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHÄFFER A.A., et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25: 3389–3402.

BAWIN, T., SEYE, F., BOUKRAA, S., et al., 2016. Production of two entomopathogenic *Aspergillus* species and insecticidal activity against the mosquito *Culex quinquefasciatus* compared to *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology, 26 (5), 617–629.

BENNETT J. W., 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. In MACHIDA, M. a GOMI, K. (eds.) *Aspergillus*: Molecular Biology and Genomics. Caister Academic Press, 1–18.

BROWN, P. M. J., ADRIAENS, T., BATHON, H., et al., 2008. Harmoniaaxyridis in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. BioControl, 53(1), 5–21.

BROWN, P. M. J., INGELS, B., WHEATLEY, A. et al., 2015. Intraguild predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: *Coccinellidae*) on native insects in Europe: molecular detection from field samples. Entomological Science, 18(1), 130–133.

COTTRELL, T.E., SHAPIRO-ILAN, D.I., 2003. Susceptibility of a native and an exotic lady beetle (Coleoptera: *Coccinellidae*) to *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 84,137–144.

DECLERCQ P., PEETERS I., VERGAUWE G., THAS O., 2003. Interactions between *Podisus maculiventris* and *Harmonia axyridis*, two predators used in augmentative biological control in greenhouse crops. BioControl 48: 39–55.

GOFFRÉ, D., FOLGARAIT, P. J., 2015. *Purpureocillium lilacinum*, potential agent for biological control of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii.* Journal of invertebrate pathology, 130, 107–115.

HUMBER R. A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. In: Lacey L.A. (Ed.) Manual of techniques in invertebrate pathology, 2nd Ed., Academic Press, Amsterdam: 151–187.

JATALA P., KALTENBACH R., BOCANGEL M., 1979. Biological control of *Meloidogyne incognita acrita* and *Globodera pallida* on potatoes. Journal of Nematology, 11: 303.

KOCH, R. L. (2003). The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-targetimpacts. Journal of insect Science, *3*(1), 32.

KUZNETSOV, V.N., 1997. Lady Beetles of the Russian Far East. Memoir no. 1, Center for Systematic Entomology. TheSandhillCrane Press, Gainesville. pp. 248.

LACEY, L. A., 2012. Manual of Techniques in Insect Pathology. 2nd ed., Academic Press, London, 484 p.

MAJZLAN, O., 2008. Faunistical contributions from Slovakia, Coleoptera, 4. Naturae Tutela 12: 207–210.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. 2016. Families of Sordariomycetes. Fungal Diversity, 79:1–317.

MEDO J., 2009. Druhové spektrum entomopatogénnych húb z radu Hypocreales izolovaných z pôdnych vzoriek pochádzajúcich z rôznych lokalít Slovenska a genetická štruktúra populácií *Beauveria bassiana* [DPh Dissertation]. Slovak University of Agriculture in Nitra, 148 pp.

MEDO, J., CAGÁŇ, Ľ., 2011 Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. Biological Control, 59(2), 200–208.

MICHAUD, J. P., 2002. Invasion of the Florida citrus ecosystem by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: *Coccinellidae*) and asymmetric competition with a native species, *Cycloneda sanguinea*. Environmental Entomology, 31(5), 827–835.

MORAES, A. M. L., COSTA, G. L. D., BARCELLOS, M. Z. C., OLIVEIRA, R. L., OLIVEIRA, P. C., 2001. The entomopathogenic potential of *Aspergillus* spp. in mosquitoes vectors of tropical diseases. Journal of Basic Microbiology, 41(1), 45–49.

MUŞTU, M., DEMIRCI, F., KÖKSAL, M., et al., 2016. Mortality effects of *Isaria farinosa* and *Purpureocillium lilacinum* (Sordariomycetes: Hypocreales) on the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: *Tetranychidae*) and its predator *Neoseiulus californicus* (Acari: *Phytoseiidae*) under controlled conditions. Entomologia Generalis, 243–252.

NECHAYEV V.A., KUZNETSOV V. N., 1973. Avian predation on coccinellids in Primorie Region. Entomofauna Sovetskogo Dalnego Vostoka. Vladivostok: Tr. Biol.-pochv. Inst. 97–99.

NEDVĚD, O., 2014. Slunéčko východní (*Harmonia axyridis*) – pomocník v biologickém boji nebo ohrožení biodiverzity? Certifikovaná metodika pro praxi, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 55 p.

ORMOND E.L., THOMAS A.P.M., PELL J.K., ROY H.E., 2006. Overwintering ecology of *Coccinella septempunctata*, *Beauveria bassiana* and *Dinocampus coccinellae*. In: Walter A.H., Rossing W.A.H., Eggenschwiler L., Poehling H.M. (eds) Working Group ''Landscape management for functional biodiversity'' at Zurich-Reckenholz (Switzerland), 16–19 May 2006 IOBC/wprs Bulletin 29(6), 85–88.

ORMOND, E. L., THOMAS, A. P. M., PELL, J. K. et al., 2011. Avoidance of a generalist entomopathogenic fungus by the ladybird, *Coccinella septempunctata*. FEMS Microbiol. Ecol. 77, 229–237.

PANIGAJ, Ľ., ZACH, P., HONĚK, A. et al., 2014. The invasion history, distribution and colour pattern forms of the harlequin ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Pall.) (Coleoptera, *Coccinellidae*) in Slovakia, Central Europe. ZooKeys, (412), 89–102.

RAAK-VAN DEN BERG, C. L., DELANGE, H. J.,VAN LENTEREN, J. C., 2012. Intraguild predation behaviour of ladybirds in semi-field experiments explains invasion success of *Harmonia axyridis*. PloSone, 7(7), e40681.

ROY H.E., BROWN P.M.J, ROTHERY P., WARE R.L., MAJERUS M.E.N., 2008. Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three species of coccinellid*: Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*. BioControl 53: 265–276.

ROY, H. E, COTTRELL, T. E. 2008. Forgotten natural enemies: Interactions between coccinellids and insect-parasitic fungi. Eur. J. Entomol. 105: 391–398.

RÖHRICH C.R., NGWA C.J., WIESNER J. et al., 2012. Harmonine, a defence compound from the harlequin ladybird, inhibits mycobacterial growth and demonstrates multi-stage antimalarial activity. Biol. Lett. 8, 308–311.

SHAPIRO-ILAN D.I., COTTRELL T.E., 2005. Susceptibility of lady beetles (Coleoptera: *Coccinellidae*) to entomopathogenic nematodes. J. Invertebr. Pathol. 89, 150–156.

SCHEMMER, R., CHLÁDEKOVÁ, P., MEDO, J., BARTA, M., 2016. Natural prevalence of entomopathogenic fungi in hibernating pupae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: *Gracillariidae*) and virulence of selected isolates. Plant Protect. Sci., 52 (3): 199–208.

SEYE, F., BAWIN, T., BOUKRAA, S., et al., 2014. Effect of entomopathogenic *Aspergillus* strains against the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). Applied entomology and zoology, 49(3), 453–458.

STEENBERG, T., HARDING, S., 2009. Entomopathogenic fungi recorded from the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*. Journal of invertebrate pathology, 102(1), 88–89.

STRASSER et al. 1996. Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. In: JACKSON, T.A., GLARE, T.R. (Eds.), Microbial Control of Soil Dwelling Pests. AgResearch, Lincoln, New Zealand, pp. 125–130.

TKACZUK, C., KRÓL, A., MAJCHROWSKA-SAFARYAN, A., NICEWICZ, Ł., 2014. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. Journal of Ecological Engineering, 15(4): 137–144.

VILCINSKAS, A., MUKHERJEE, K., VOGEL, H., 2013. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences, 280: 20122113.

Adresa autorov

Ing. Marek Barta, PhD. Arborétum Mlyňany, Ústav ekológie lesa SAV, Vieska nad Žitavou 178, 951 52 Slepčany, Tel: +421-37-633-4211, E-mail: marek.barta@savba.sk;
Ing. Juraj Medo, PhD. Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: juraj.medo@uniag.sk;
Ing. Peter Zach, PhD. Ústav ekológie lesa SAV, Štúrova 2, 960 53 Zvolen, E-mail: zach@savzv.sk.

GENOMICKÁ VARIABILITA VČLENENÍ RETROTRANSPOZÓNOV DRUHU *HEDERA HELIX* L.

GENOMIC VARIABILITY OF RETROTRANSPOSON INSERTIONS IN *HEDERA HELIX* L.

DANKA BOŠEĽOVÁ – JANA ŽIAROVSKÁ

BOŠEĽOVÁ, D. – ŽIAROVSKÁ, J. 2016. Genomická variabilita včlenení retrotranspozónov druhu *Hedera helix* L. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 35-40. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Hedera helix, L. is a plant that is widely used for pharmaceutical and ornamental purposes. However, it is only a little characterized at the genomic level and studies of its DMA markers based variability are also limited. In this study, five natural populations of *Hedera helix* L. from Slovakia are characterized. A total of 38 different iPBS markers were used. The markers 1838, 2274 and 2270 were used for the mapping analysis of genomic variability of retrotransposons insertions in selected populations of ivy from Slovakia. A total of 220 fragment were amplified and a 100% polymorphism was obtained. Unique fragments of retrotransposon insertions were identified in the ivy population from the locality of Nová Baňa. This population was evaluated as the least similar to others used in the study. The analyzed populations were highly similar at the level of 0.6735, as based of the average genetic distance by Jaccard index.

Key words: iPBS, *Hedera helix*, L., populations, Slovakia, genetic distance

ÚVOD

Hedera helix L. je polyploidný lianovitý ker so vždyzelenými listami a s výrazne odlišnými rannými a dospelými vývojovými štádiami (METCALFE 2005, GREEN et al. 2011). Brečtan je neznášanlivý voči chladu (priemerná teplota v zimných mesiacoch ≤-2°C) a predpokladá sa, že tento faktor je limitujúcim pri určení hraníc jeho rozšírenia v Severnej a vo Východnej Európe. Je fanerofytom rozšíreným v meridionálnotemperátnej až oceánickej oblasti Európy. Rastie v listnatých lesoch, húštinách, na skalách a múroch a všeobecne na stanovištiach s vysokým obsahom minerálnych látok. (METCALFE 2005).

Brečtan je najčastejšie využívaný ako dekoratívna rastlina a v súčasnosti zahŕňa množstvo kultivarov vrátane neťahavých druhov. Kvôli stálozelenosti a preferencii tienistých stanovíšť sa brečtan stal ideálnym pre zimné záhrady a záhradný dizajn. Okrem využitia ako okrasnej rastliny, významné sú aj jeho liečivé vlastnosti. Brečtan obsahuje saponíny, ktoré sú sekundárnymi metabolitmi známymi početnými farmakologickými účinkami - znižuje cholesterol, majú antibakteriálny, antifungicídny a antivírusový vplyv (BEDIR et al. 2000, MEDEIROS et al. 2002). Vo farmácii má brečtan široké využitie aj pre jeho ďalšie vlastnosti - expektoračný a antitusický účinok.

Hedera helix L. je príkladom genómovej plasticity, ktorá sa vyskytuje v priebehu typických vývojových zmien od juvenilnej až po dospelú fázu (OBERMAYER 2000). *Hedera helix* ssp. *helix* obsahuje 2n=48 chromozómov a ssp. *hibernica* 2n=96 chromozómov (VARGAS et al. 1999). Obsah diploidnej DNA bunky u mladých listov je 3,6 pg a vo fáze dospelých listov je 6,2 pg (SCHÄFFNER, Nagl 1979). Z genomického hľadiska sú však v súčasnosti napriek širokému využitiu tohto druhu k dispozícii len limitované informácie ako o markéroch vhodných na účely jeho genotypovania a populačných charakteristík. Cieľom tejto štúdie bolo overiť použiteľnosť univerzálnych iPBS markérov pre analýzy dĺžkového polymorfizmu a určenia celogenomickej variability populácií brečtanu.

MATERIÁL A METÓDY

Na účely pilotných analýz bola extrahovaná DNA z poolu10 mladých zdravých listov brečtanu, ktoré boli zozbieraných v *in situ* podmienkach počas leta 2015 v rôznych oblastiach Slovenska (Tab. 1). Ihneď po odobraní bol biologický materiál ošetrený etanolom za účelom povrchovej dezinfekcie. Vzorky boli udržiavané v chlade a ihneď transportované do laboratória, kde boli uskladnené pri teplote -20°C až do ďalšieho spracovania. Na extrakciu genomickej DNA bola použitá súprava GeneJET Plant Genomic DNA kit (ThermoScientific) a izolácia bola uskutočnená podľa pokynov výrobcu. Kvantita a kvalita extrahovanej DNA bola stanovená prístrojom NanoPhotometrom P-Class (Implen). Celkovo bolo testovaných 38 rôznych iPBS markérov a následne boli vybrané z nich použité na analýzu genomickej variability včlenení retrotranspozónov.

Tab. 1 Charakteristika biologického materiálu.

lokalizácia odberu	zemepisná šírka	zemepisná dĺžka	nadmorská výška
Poprad	49° 3 ´ 18´´	20° 18´ 5´´	647 m
Tatranská Polianka	49° 7´ 25´´	20° 11´11´´	995 m
Nová Baňa	48° 25´ 34´´	18° 38´ 11´´	248 m
Smolenice	48° 30´ 13´´	17° 25´ 35´´	296 m
Bojnice	48° 46´ 21´´	18° 34´ 22´´	301 m

iPBS analýzy prebiehali v nasledovnom časovom a teplotnom režime: 95°C - 3 min; 35 cyklov v zložení 95°C 30 s; 55°C 40 s; 72°C 120 s; záverečných 72°C 5 min a hodnotené boli v 4% PAGE. Vyhodnotenie dát prebehlo na základe prítomnosti alebo neprítomnosti amplifikačných produktov analýzou čierno – bielych výstupov analytickým softwérom. Na základe získaných fragmentov DNA sme vypočítali indexy podobnosti podľa Jaccarda. Vetvové členenia vzájomných závislostí boli zostrojené hierarchickou zhlukovou analýzou metódou UPGMA zoskupením zhlukov na základe priemerov euklidovskej vzdialenosti pre skutočnú pozíciu profilov iPBS fragmentov v štatistickom programe SYNTAX.

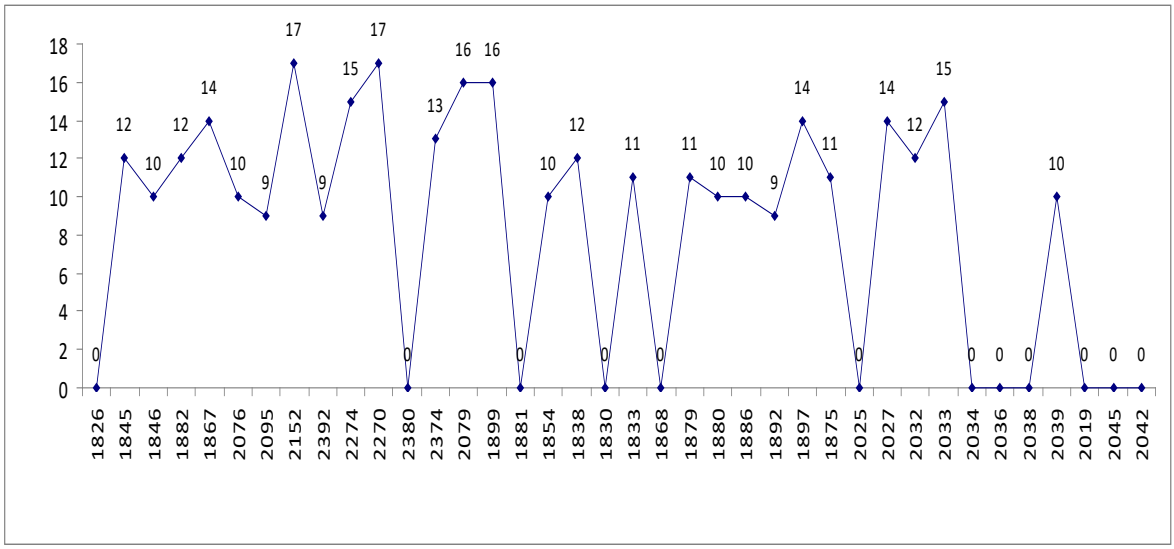
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z hľadiska analýz molekulárnymi markérmi, *Hedera,* spp. je jedným z druhov, kde v súčasnosti existuje len malé množstvo informácii. MIDORI et al. (2006) analyzovali druhy a kultivary brečtanu zodpovedné za inváziu do lesov severozápadného pacifiku. Použili RAPD markéry ako univerzálny markérovací systém a celkovo porovnali 58 vybratých populácii v Britskej Kolumbii, Oregone a vo Washingtone. Priradenie k deviatim taxónom brečtanu sa odrazilo pri genetickej a morfologickej identifikácii, kde 85 % prírastkov bolo priradených k *Hedera hibernica* a 15% k *Hedera helix* L.

Technika iPBS markéruje sekvencie pre naviazanie prajmerov (PBS) sú prítomné vo všetkých LTR retrotranspozónoch. Bola popísaná ako univerzálne použiteľná metóda, ktorá pracuje s konzervatívnymi časťami PBS. Prajmery pre iPBS analýzy sú navrhované tak, aby spájali konzervatívne oblasti sekvencií pre naviazanie prajmerov v LTR oblastiach retrotranspozónov (KALENDAR et al., 2010). Jednoduché iPBS prajmery zabezpečujú amplifikáciu jednotlivých fragmentov vizualizácie dĺžkového polymorfizmu medzi do seba včlenenými, opačne orientovanými retrotranspozómni nachádzajúcimi sa kdekoľvek v analyzovanom genóme. PCR amplikón tak obsahuje sekvencie dvoch včlenených PBS a dvoch LTR oblastí (BEŽO et al. 2015).

Ak sa raz z univerzálnej sady vyberú pre konkrétny organizmus špecifické iPBS prajmery, stane sa táto metóda efektívna a reprodukovateľná. Toto je jej výhoda v porovnaní s nešpecifickými technikami dĺžkového polymorfizmu tak ako RAPD alebo ISSR. V tejto štúdii bolo celkovo pri *Hedera*

helix L. testovaných 38 rozličných iPBS prajmerov. 12 z nich nepreukázalo žiadne amplifikačné vzory v genóme brečtanu (obr. 1).



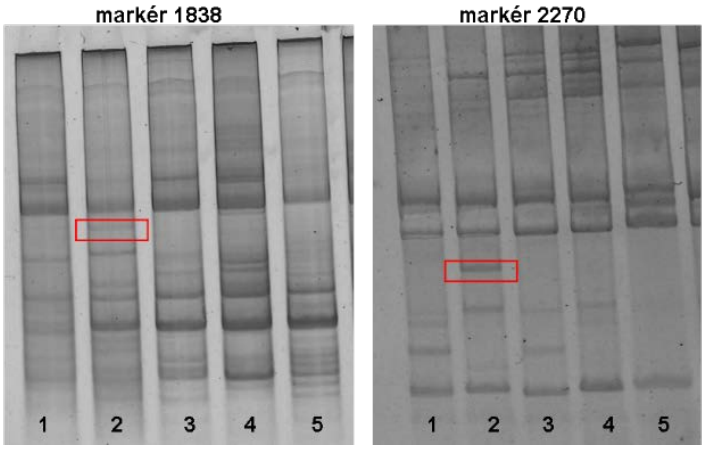
Obr. 1 Variabilita v počte iPBS loci amplifikácie použitím prajmerov pre analytické prírastky brečtanu *Hedera helix* L. Názvy (čísla kódov) iPBS prajmerov sú rovnaké ako uviedol KALENDAR et al. (2010).

Metóda iPBS bola úspešne použitá v analýzach viacerých druhov rastlín, napríklad *Linum ussitatisumum* (SMÝKAL et al. 2011), *Sausseurea esthonninca* (GAILĪTE et al., 2011), *Liparis loeselii* (BELOGRUDOVA et al. 2012) alebo *Prunus armeniaca* (BARÁNEK et al. 2012), pričom bola bola overená ako spoľahlivý DNA markérovací systém. Spolu s iPBS, aj iné DNA markéry založené na retrotranspozónoch ako IRAP, REMAP, RBIP alebo SSAP sú stále široko používané pre účely analýz genetických vzťahov (TREBICHALSKÝ et al. 2013, BALÁŽOVÁ et al. 2014, GUO et al. 2014). V analýzach mapujúcich genomickú variabilitu včlenení retrotranspozónov vo vybraných populáciách brečtanu v rámci Slovenska boli použité markéry 1838, 2274 a 2270. Týmito markérmi bolo zmnožených celkovo 220 fragmentov v rozložení, ktoré popisuje tabuľka 2.

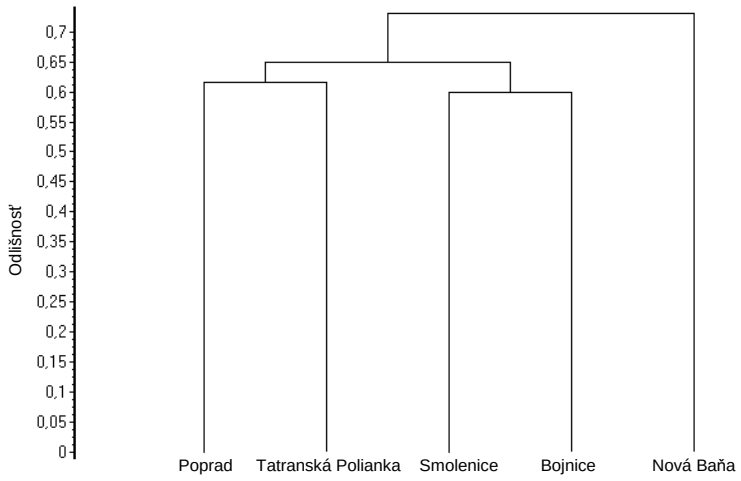
Tab. 2 Počty amplifikovaných fragmentov podľa jednotlivých použitých markérov.

genotyp/počet fragmentov	Poprad	Tatranská Polianka	Nová Baňa	Smolenice	Bojnice
markér 1838	10	11	15	18	14
markér 2274	14	16	21	22	19
markér 2270	13	12	13	19	9

V prípade populácie brečtanu z lokality Nová Baňa boli markérom 1838 a markérom 2270 identifikované jedinečné včlenenia sekvencií príslušných retrotranspozónov (obrázok 2), ktoré k konečnom dôsledku viedli k odčleneniu tejto populácie v zostrojenom dendrograme (obrázok 3). Všetky analyzované populácie však vykazovali vysokú príbuznosť v sledovanom type polymorfizmu s priemerným Jaccardovým indexom genetickej vzdialenosti na úrovni 0,6735. najnižšia dosiahnutá hodnota v analyzovanom súbore bola 0,6 a najvyššia 0,773. Kofenetický koeficient pre zostrojený dendrogram vykazoval hodnotu 0,93.



Obr. **2** Jedinečné fragmenty získané iPBS analýzou pre markéry 1838 a 2270. Kódy populácií: 1 – Smolenice; 2 – Nová Baňa; 3 – Bojnice; 4 – Poprad; 5 – Tatranská Polianka.



Obr. 3 Vetvové členenie odlišností vybraných populácií brečtanu na Slovensku hodnotených dĺžkovým polymorfizmom včlenení retrotranspozónov.

Jednoduché iPBS prajmery zabezpečujú amplifikáciu jednotlivých fragmentov vizualizácie dĺžkového polymorfizmu medzi do seba včlenenými opačne orientovanými retrotranspozónmi nachádzajúcimi sa kdekoľvek v analyzovanom genóme. PCR amplikon tak obsahuje sekvencie dvoch včlenených PBS a dvoch LTR oblastí. iPBS markéry vykazujú v porovnaní s IRAP a REMAP približne rovnakú úroveň polymorfizmu, pričom na rozdiel od vyššie spomenutých techník sú aplikovateľné aj pri analýzach polymorfizmu cDNA a rozdielov vzniknutých v dôsledku aktivity retrotranspozónov alebo rekombinácií retrotranspozónov po crossing-overi (KALENDAR et al., 2010). Z tohto hľadiska sú výborne uplatniteľnými markérmi práve na účely populačných a fylogenetických analýz. Toto potvrdzuje aj práca autorov PAUX et al. (2010), ktorý analyzovali polymorfizmus hexaploidnej pšenice a konštatujú, že iPBS markéry spĺňajú podmienky flexibilnosti, informatívnosti, nárokov na kvantitu a kvalitu DNA a ekonomických nákladov na analýzy. Konštatujú, že vysoký stupeň polymorfizmu iPBS prajmerov je predurčený na účely mapovania s využiteľnosťou aj v šľachtiteľskom procese (PAUX et al., 2010). BALOCH et al. (2015) použitím desiatich iPBS prajmerov v analýzach genómu šošovice amplifikovali 151 fragmentov DNA, z toho 150 polymorfných. Analýzy zaoberajúce sa rozdielmi medzi kultúrnymi a voľne rastúcimi odrodami viniča poukázali na to, že pri porovnaní iPBS primerov a iných techník bola iPBS porovnateľná až lepšia. Analyzovaných bolo celkovo 35 odrôd viniča, použitých 15 iPBS primerov, a amplifikovaných 99 polymorfných fragmentov DNA, čo bolo 86,3 % zo všetkých

použitých primerov (GUO et al., 2014). ANDEDEN et al. 2012 analyzoval genetickú diverzitu voľne rastúcich druhov cícera použitím iPBS a ISSR markérov. Pri ISSR bolo celkovo amplifikovaných 136 fragmentov použitím 10 odlišných prajmerov, pričom bolo hodnotených 71 vzoriek. Dosiahnutý bol 99,3%-ný polymorfizmus. V iPBS bolo amplifikovaných 130 fragmentov a dosiahnutý bol 100%-ný polymorfizmus. Priemerná hodnota obsahu polymorfnej informácie bola 0,91 pre oba markérovacie systémy. BARÁNEK et al.(2012) použili iPBS markéry na analýzy genetických odlišností odrôd marhúľ. Výsledky, ktoré získali, boli porovnateľné s konvenčnou metódou AFLP primerov.

ZÁVER

V štúdii boli na účely analýzy populačných odlišností druhu *Hedera helix* L. z rôznych lokalít Slovenska uplatnené iPBS markéry. Tieto vykazujú vysoký stupeň polymorfizmu a sú vhodnými markérmi práve pri fylogenetických a populačných analýzach. Z 38 testovaných iPBS markérov boli vybrané tri, použitím ktorých bola uskutočnená analýza. Každý z použitých markérov bol schopný odlíšiť všetky analyzované populácie od ostatných, čo potvrdzuje univerzálnosť a vysokú špecifickosť iPBS markérov.

POĎAKOVANIE

Vedecká publikácia vznikla s podporou Výskumného centra AgroBioTech vybudovaného v rámci projektu Vybudovanie výskumného centra ,,AgrobioTech" ITMS 26220220180.

LITERATÚRA

ANDEDEN, E.E., BALOCH, F.S., DERYA, M., KILIAN, B., ÖZKAN, H. 2012. iPBS retrotransposons based genetic diversity and realationships among wild annual Cicer species. In: Journal Of Plant Biochemistry And Biotechnology. Roč. 22, 2012, s. 453-466.

BALÁŽOVÁ, Ž., TREBICHALSKÝ, A., GÁLOVÁ, Z., KALENDAR, R., SCHULMAN, A., STRATULA, O., CHŇAPEK, M. 2014. Genetic diversity of triticale cultivars based on microsatellite and retrotransposon-based markers. In: Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. Roč. 3, 2014, s. 58-60.

BALOCH, F.S., DERYA, M., ANDEDEN, E.E., COMERTPAY, G., KILIAN, B., OZKAN, H. 2015. Inter-primer binding site retrotransposon and inter-simple sequence repeat diversity among wild Lens species. In: Biochemical Systematics and Ecology. Roč. 58, 2015, s.162-168.

BARÁNEK, M., MESZÁROS, M., SOCHOROVÁ, J., ČECHOVÁ, J., RADDOVÁ, J. 2012. Utility of retrotransposon-derived marker systems for differentiation of presumed clones of the apricot cultivar Velkopavlovická. In: Scientia Horticulturae. Roč. 143, 2012, s. 1-6, doi:10.1016/j.scienta.2012.05.022

BEDIR, E., KIRMIZIPEKMEZ, H., STICHER, O., ÇALIŞ, I. 2000. Triterpene Saponins from the Fruits of *Hedera helix*. In: Phytochemistry. Roč. 53, 2000, s. 905-909.

BELGORUDOVA, I., GRAUDA, D., JAKOBSONE, G., RASHAL, I. 2012. Usability of retrotransposone-based molecular marker system to assess genetic diversity of *Liparis loeselii*. In: Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis. Roč. 12, 2012, s. 40-43.

BEŽO, M., ŽIAROVSKÁ, J., RAŽNÁ, K., ŠTEFÚNOVÁ, V. Metódy genetických technológií – praktikum. Nitra: SPU, 111 s. ISBN 978-80-552-1293-7

GAILĪTE, A., IEVINSH, G., RUNĢIS, D. 2011. Genetic diversity analysis of Latvian and Estonian *Saussurea esthonica* populations. In: Environmental and Experimental Biology. Roč. 9, 2011, s. 115–119.

GREEN, A. F., RAMSEY, T.S., RAMSEY, J. 2011. Phylogeny and Biogeography of Ivies (*Hedera* spp., *Araliaceae*), a Polyploid Complex of Woody Vines. In: Systematic Botany. Roč. 36, 2011, s. 1114-1127.

GUO, D.L., GUO, M.X., HOU, X.G., ZHANG, G.H. 2014. Molecular diversity analysis of grape varieties based on iPBS markers. In: Biochemical Systematics And Ecology. Roč. 52, 2012, s. 27-32

KALENDAR, R., ANTONIUS, K., SMÝKAL, P., SCHULMAN, A. H. 2010. IPBS: a universal method for DNA Wngerprinting and retrotransposon isolation. In: Theoretical and Applied Genetics. Roč. 121, 2010, s. 1419-1430

MEDEIROS, J.R., MEDEIROS, H., MASCARENHAS, C. DAVIN, L.B., LEWIS, N.G. 2002. Bioactive components of *Hedera helix*. In: Arquipélago: Life and Marine Sciences. Roč. 19A, 2002, s. 27-32.

METCALFE, D.J. 2005: *Hedera helix*. In: Journal of Ecology: Biological flora of the British isles. Roč. 93, 2005, s. 632–648.

MIDORI, M., CLARKE, S., REICHARD, H., HAMILTON, C.W. 2006. Prevalence of different horticultural taxa of ivy (*Hedera* spp., *Araliaceae*) in invading populations. In: Biological Invasions. Roč. 8, 2006, s. 149–157. Dostupné z: http://dx.doi.org/10.1007/s10530-004-2424-6

OBERMAYER, R., GREILHUBER, J. 2000. Genome size in *Hedera helix* L.- a clarification. In: Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics. Roč. 53, 2000, doi: 10.1080/00087114.2000.10589175

PAUX, E., FAURE, S., CHOULET, F., ROGER, D., GAUTHIER, V. MARTINANT, J.P., SOURDILLE, P., BALFOURIER, F., PASLIER, M.C., CHAUVEAU, A., CAKIR., M., GANDON, B., FEUILLET, C. 2010. Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection. In: Wheat. Plant Biotechnology Journal. Roč. 8, 2010, s. 196 – 210.

SCHÄFFNER, K. H., NAGL, W. 1979. Differential DNA replication involved in transition from juvenile to adult phase in *Hedera helix* (*Araliaceae*). In: Plant Systematics and Evolution. Roč. 2, 1979, s. 105–110.

SMÝKAL, P., BAČOVÁ-KERTÉSZOVÁ, N., KALENDAR, R., CORANDER, J., SCHULMAN, A.H., PAVELEK, M. 2011. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum*, L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. In: Theoretical and Applied Genetics. Roč. 122, 2011, s. 1385-1397.

TREBICHALSKÝ, A., KALENDAR, R., SCHULMAN, A., STRATULA, O., GÁLOVÁ, Z., BALÁŽOVÁ, Ž., CHŇAPEK, M. 2013. Detection of genetic relationships among spring and winter triticale (× *Triticosecale* witt.) and rye cultivars (*Secale cereale* L.) by using retrotransposon-based markers. In: Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. Roč. 49, 2013, s. 171-174.

VARGAS, P., MCALLISTER, H.A., MORTON, C., JURY, S.L., WILKINSON, M.J. 1999. Polyploid speciation in Hedera (*Araliaceae*): phylogenetic and biogeographic insights based on chromosome counts and ITS sequences. In: Plant Systematics and Evolution. Roč. 219, 1999, s. 165-179.

Adresa autorov

Ing. Danka Bošeľová; doc. Ing. PaedDr. Jana Žiarovská, PhD.; Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, SPU v Nitre; Tr. A. Hlinku 2; 94976, Nitra; kontakt: jana.ziarovska@uniag.sk

ANTIOXIDANT EFFECTS OF *SCHIZANDRA* AND BILBERRY EXTRACTS ON MALE GAMETES

ANTIOXIDAČNÉ ÚČINKY EXTRAKTOV SCHIZANDRY A ČUČORIEDKY NA SAMČIE GAMÉTY

MICHAL ĎURAČKA – JAROSLAV MICHALKO – ILDIKÓ MATUŠÍKOVÁ – EVA TVRDÁ

ĎURAČKA, M. – MICHALKO, J. – MATUŠÍKOVÁ, I. – TVRDÁ, E. 2016. Antioxidant effects of *schizandra* and bilberry extracts on male gametes. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 41-46. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
It is well-known that *in vitro* manipulation with stored semen comes along with factors, which can potentially endanger male fertility. To prevent from reduced fertility potential it is necessary to protect the sample against oxidative stress. Therefore, supplements from various plant extracts with antioxidant properties are developed. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and *Schizandra chinensis* provide anthocyanins, polyphenols, flavonoids which abound not only antioxidant, but also antibacterial and anti-inflammatory properties. This study examins the effect of various concentrations of fruit extracts (100, 50, 10, 1 mg/mL) on bovine spermatozoa motility and oxidative balance during 0, 2 and 24 hours. Sperm motility was analyzed using the SpermVision^{TM} CASA (Computer aided sperm analysis) system. ROS production and total antioxidant capacity were assessed by the chemiluminescence assay using Glomax Multi^{+}. Our results indicate significantly positive effects of both extracts on the vitality of bovine gametes. The study reveals that 100 mg/mL had a negative impact on the bovine spermatozoa motility and antioxidant properties ($P<0.05$; $P<0.01$), while 10 mg/mL of both extracts exhibited significant motility-promoting and antioxidant properties when compared to the control, particularly at a later stage of the experiments (24h; $P<0.001$). Our data suggest future exploitation of plant extracts in the improvement and management of male infertility.

Key words: oxidative stress, *Vaccinium myrtillus*, bovine spermatozoa, *Schizandra chinensis*, antioxidants

INTRODUCTION

The imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses may result to structural damages, functional alterations and cell death (THANNICKAL and FANBURG 2000), which has been repeatedly associated with cancer initiation and inflammatory diseases (NISHIKAWA et al. 2008). Nowadays, oxidative stress (OS) research is closely related with significant aberrations in spermatozoa, including lipid peroxidation (LPO), DNA fragmentation and enzymatic inactivation (AITKEN et al. 2010; AITKEN and DE IULIIS 2010). OS is regarded as one of the fundamental mechanisms of idiopathic male infertility, being caused by two interlinked pathways. Firstly, the destructive effects of ROS on the sperm membranes lead to a decreased motility index and are followed by the second mechanism – a direct oxidative damage to the DNA molecule (IRVINE et al. 2000; TREMELLEN 2008). Antioxidants are currently used to supply protection against oxidative degradation of biomolecules (GÜLÇIN et al. 2005). The total antioxidant defence consists of enzymatic or non-enzymatic molecules, which are produced by numerous biological pathways in the organism. However, most antioxidants must be recieved as an additive (BABICH et al. 2011). In recent years, there has been a serious scientific interest in plant extracts as a natural and rich source of oxidation-preventive or protective compounds (ZHU et al. 1999; KIM et al. 2006).

Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) from the *Ericaceae* family, is well-known since the Middle Ages for its medicinal properties (MORAZZONI and BOMBARDELLI 1996). The bushes grow up to 50 cm, have elliptical leaves and single flowers on short stems. Globular fruits are dark purple-coloured with a gray film on the surface (KOVAČEVIĆ 2002). It has been reported that the high content of anthocyanins is responsible for the coloration of bilberries (HEARST et al. 2010). The chromatographic analysis has shown that the prevalent compound in bilberries is cyanidin (0.053 mg/mL). Delphinidin

and petunidin have been detected in quantities 2.5 fold lower than cyanidin, while other compounds such as peonidin and malvidin were found in insignificant concentration (BURDULIS et al. 2007).

Schizandra chinensis, known in China as Wuweizi, is a traditional Chinese medicinal plant. The origin of its name comes from the fact that *Schizandra* berries possess all five elementary flavors: sweet, salty, sour, bitter and astringent (WANG et al. 2008). In the Chinese Pharmacopoeia, *Schizandra* is officially listed as a tonic and a sedative. Recently, in plant has emerged in the western-based medicine for its antihepatotoxic effect (PHARMACOPOEIA COMMISION 2011). Numerous biological activities have been associated with *Schizandra chinensis* including antibacterial, antitoxic, antiallergenic, liver-protective, antidepressant, glycogenetic and last, but not least, antioxidant effects (ALOK et al. 2014). Antioxidant effects of nine dibenzo cyclooctene lignans isolated from *Schizandra* have been already demonstrated. Seven of nine demonstrated a potential than vitamin E, which is considered to be a highly-active antioxidant. Schisanhenol was determined to be the most active lignan of the plant (LU and LIU 1992).

As such, the aim of this study was to investigate the potential *in vitro* antioxidant effects of bilberry and Schizandra fruit extracts on bovine spermatozoa.

MATERIAL AND METHODS

Bilberries and *Schizandra* fruits were obtained from the Botanical garden at the Slovak University of Agriculture in Nitra. After drying, the material was crushed, weighed and soaked in ethanol p.a. (96 %, Centralchem, Bratislava, Slovak Republic) during two weeks at room temperature in the dark. Exposure to sunlight was avoided to prevent the degradation of active components. The ethanolic plant extracts were subjected to evaporation under reduced pressure at 40 °C in order to remove any residual ethanol (Stuart RE300DB rotary evaporator, Bibby Scientific Limited, UK, and vacuum pump KNF N838.1.2KT.45.18, KNF, Germany). Crude plant extracts were dissolved in DMSO (Dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to equal 1000 mg/mL as a stock solution.

Ejaculates (n = 10) were obtained from five adult Holstein Friesian breeding bulls (Slovak Biological Services, Nitra, Slovak Republic) that were on a regular collection schedule using an artificial vagina. Each sample had to meet the quality criteria given for the corresponding breed. Institutional and national guidelines for the care and use of animals were followed, and all experimental procedures were approved by the State Veterinary and Food Institute of Slovak Republic (no. 3398/11-221/3) and Ethics Committee.

Each sample was diluted in physiological saline solution (PS; sodium chloride 0.9 % w/v; Bieffe Medital, Italia) containing various concentrations of the extact (100, 50, 10 and 5 mg/mL) using a dilution ratio of 1:40. The samples were cultured at room temperature (22-25°C). After culture periods of 0, 2 and 12 h, spermatozoa motility and ROS generation were assessed for each group. Moreover an aliquot of each group was centrifuged at 800g at 25 ◦C for 10 min, the media were removed and the resulting pellet was sonicated at 28 kHz for 30 s on ice using RIPA buffer (Sigma-Aldrich) with protease inhibitor cocktail suitable for mammalian cell and tissue extracts (Sigma-Aldrich). Subsequently the samples were centrifuged at 11,828g at 4 ◦C for 15 min to purify the lysates from the residual cell debris. The resulting supernatants comprising the intracellular contents were stored at −20 ◦C for the TAC assessment.

Spermatozoa motility analysis Spermatozoa motion variables were assessed using the Computer-aided spermatozoa analysis (CASA) system comprising the SpermVision program (Minitube, Tiefenbach, Germany) and Olympus BX 51 phase contrast microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Each sample was placed into the Makler Counting Chamber (depth 10 mm, 37 ◦C; Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) and at least 1000 cells were evaluated for motility (MOT; percentage of motile spermatozoa; motility >5 m/s; %).

ROS production in each group was assessed by the chemiluminescence assay using luminol (5-amino-2, 3- dihydro-1, 4-phthalazinedione; Sigma-Aldrich) as the probe. The test samples consisted of luminol (10 µL, 5 mM) and 400 µL of control or experimental sample. Negative controls were prepared by replacing the spermatozoa suspension with 400 µL of PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline without calcium chloride and magnesium chloride; Sigma-Aldrich). Positive controls included 400 µL of PBS, 10 µL luminol and 50 µL hydrogen peroxide (30%; 8.8 M; Sigma-Aldrich). Chemiluminescence was measured on 48-well plates in 15 cycles of 1 min using the Glomax Multi$^+$ Combined Spectro-Fluoro Luminometer (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The results are expressed as relative light units (RLU)/s/10^6 spermatozoa.

An improved enhanced chemiluminescence antioxidant assay using horseradish peroxidase conjugate and luminol was used to study the total antioxidant capacity of the sample. 5-100 µmol/L Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; Sigma-Aldrich) was used as the standard, while a signal reagent consisting of 0.1 mol/L Tris-HCl (Sigma-Aldrich), 12 mol/L H_2O_2 (Sigma-Aldrich), 41.8 mmol/L 4-iodophenol (Sigma-Aldrich) and 282.2 mmol/L luminol (Sigma-Aldrich) was used to induce the chemiluminiscent reaction. Chemiluminescence was measured on 96-well plates in 10 cycles of 1 min using the Glomax Multi$^+$ Combined Spectro-Fluoro Luminometer (Promega Corporation). The results are expressed as µmol Trolox Eq./mg protein.

Protein concentration was quantified using the DiaSys Total Protein (DiaSys, Holzheim, Germany) commercial kit and the semi-automated clinical chemistry photometric analyzer Microlab 300 (Merck, Darmstadt, Germany). The measurement is based on the Biuret method, according to which copper sulfate reacts with proteins to form a violet blue color complex in alkaline solution, and the intensity of the color is directly proportional to the protein concentration when measured at 540 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Recent decades come hand in hand with a phenomenal growth in the area of male infertility in relation to ROS overproduction and subsequently OS developent. Seminal OS occurs when ROS prevail the semen's natural antioxidant protection and leads to the degradation of biomolecules essential for a proper sperm behavior. The aim of this study was to determine the optimal concentration of bilberry and *Schizandra* extracts in order to reach the slowest decrease of the sperm motility, and thus to prolong the structural as well as the functional viability of bovine spermatozoa.

In both cases of the sperm co-cultivation with bilberry and *Schizandra* fruit extracts, the CASA assessment showed a continuous decrease of spermatozoa motility during 24h of *in vitro* culture (Table 1). Initially (Time 0h) the MOT was higher in the experimental groups C-E (10 mg/mL) compared to the control groups (A; 0 mg/mL), while the most optimal concentration of both extracts were observed in the D groups (10 mg/ml). After 2 hours of co-incubation with plant extracts the MOT in D and E groups were almost the same when was compared with 0h. In the groups administered with the highest concetration of extracts (100 mg/ml) the MOT trend was decreasing in comparison with the control groups (Table 1). The last measure (MOT 24h) confirmed that the concentration of extracts in the group B (100 mg/mL) had a negative effect on the MOT of bovine spermatozoa, approximately half as much as in the group A (control; $P<0.05$) of bilberry extract, with a difference above 40% compared with D group ($P<0.001$), which confirmed its position as a leader among the others. Schizandra extract worked similarly after 24 hours: MOT of B group was lower than MOT of A group. The slowest decrease of MOT was observed at 10 mg/mL Schizandra extract, when compared to the control group the difference was nearly 40% ($P<0.001$).

Current evidence emphasizing on the antibacterial, antioxidant (VUČIĆ et al. 2013), antidiabetic (GÜDER et al. 2015), tumor-suppressive (HARA 2014) and numerous other profitable effects. MATSUNGA et al. (2009) discussed about the potential inhibitory effect of *Vaccinium myrtillus*

anthocyanidins (cyanidin, delphinidin and malvidin) on angiogenesis, presumably affected through its radical-scavenging properties. In addition, MATSUNAGA et al. (2008) report a decreasing gradient of LPO damage and also neuroprotective ability to the retinal ganglion cells *in vitro* and *in vivo*.

Reportedly, a polysaccharide isolated from *Schizandra chinensis* was enhancing the vitality of total superoxide dismutase of mouse spermatozoa *in vitro*. The quantity of malondialdehyde (MDA) was decreased in different levels with every concentration of *Schizandra chinensis* polysaccharide (SCP). These exploration indicate SCP could be conducive for the treatment of OS damage in spermatozoa (ZHAO et al. 2014). IP et al. (1996) demonstrated on rats lignan-enriched extract of *Schizandra chinensis* afford much more antioxidant activity than α-tocopherol acetate (vitamin E). In addtion, it has been strongly associated with antihepatotoxic and liver-protective effect. Schisanhenol have been proven to protect peroxidative damage of aging. GUO et al. (2008) presented in vitro study that showed anti-inflammatory properties of schisandrin isolated from *Schizandra chinensis*. Therefore, we have decided to focus on the possible beneficial in vitro antioxidant effects in relation to bovine spermatozoa.

Tab. 1 Spermatozoa motility (%) in the absence (A) or presence (B-E) of bilberry or *Schizandra* extract during different time periods (Mean ± SEM; n=10) ***(P<0.001); **(P<0.01); *(P<0.05). A– 0; B – 100; C – 50; D – 10; D – 5; E – 1 mg/mL bilberry or *Schizandra* extract.

bilberry	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
MOT 0h [%]	80.64±3.55	72.87±3.71	85.88±3.10	87.04±2.56	82.77±4.44
MOT 2h [%]	73.34±1.74	54.37±4.25	78.94±1.97	85.41±1.81	81.30±2.65
MOT 24h [%]	30.33±2.62	15.22±2.41*	55.53±3.56***	57.50±2.09***	55.58±1.32***
Schizandra	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
MOT 0h [%]	83.98±3.37	80.66±1.97	87.09±2.89	88.15±1.69	85.00±3.45
MOT 2h [%]	76.02±3.58	70.86±3.18	82.23±1.22	85.84±1.81	77.42±2.17
MOT 24h [%]	28.00±2.59	21.81±2.10	52.05±3.06***	55.39±1.52***	45.65±3.55***

Tab. 2 Reactive oxygen species (ROS) production in the absence (A) or presence (B-E) of bilberry or *Schizandra* extract during different time periods (Mean±SEM; n=10) ***(P<0.001); **(P<0.01); *(P<0.05). A– 0; B – 100; C – 50; D – 10; D – 5; E – 1 mg/mL bilberry (blue) or Schizandra (red) extract.

ROS / bilberry	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0h [RLU/sec/10^6 sperm]	7.229±0.85	7.49±1.02	5.67±0.87*	5.67±0.87*	5.72±0.84
2h [RLU/sec/10^6 sperm]	9.304±0.68	10.32±0.87	7.70±0.99*	7.59±1.03*	8.21±1.03
24h [RLU/sec/10^6 sperm]	25.86±1.62	32.10±1.25	17.81±1.02*	18.01±1.33*	21.44±1.41
ROS / *Schizandra*	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0h [RLU/sec/10^6 sperm]	4.05±1.19	4.35±1.02	3.02±0.89*	2.09±1.02**	3.19±0.79*
2h [RLU/sec/10^6 sperm]	6.56±1.40	6.37±1.25	4.06±0.80**	3.21±1.09***	4.09±1.15**
24h [RLU/sec/10^6 sperm]	17.74±1.45	18.17±1.98	13.60±1.57**	13.37±1.30***	14.16±1.34**

As stated in Table 3, concentration of 100 mg/mL (group B) crossed the border of optimal doses and worked as pro-oxidant, because the production of ROS was higher than control group at 0, 2 and 24 hours. This statement is equally applicable for both plant extracts, thus we limited the optimal concentration on the groups C-E depending on ROS production. Significant differences compared with control group are shown after 2 hours of co-cultivation (P<0.05).

The lowest ROS production was observed in the D group (10 mg/mL), where after 2 hours cultivation with Schizandra extract the ROS production was almost half of the control group (P<0.01). After 24 hours we could definitely confirm a significant positive antioxidant effect in the C-E groups (50-5 mg/mL). The ROS production as well as the CASA assessment proved that the optimal concentration of both extracts was 10 mg/ml in every time with statistically significant results (Table 2).

The results of the total antioxidant capacity showed that bilberry and also *Schizandra* supplements with concentration 100 mg/mL (B group) caused lower TAC values in comparison with the control group, thus worked opposite than was desired outcome. In the other groups (C-E; 50-5 mg/mL) we can state that effect of both extracts was already significant at initial time (0h) compared to the A group. With increasing elapsed time the contrast of the decreased value of TAC was more considerable. Both plants worked not only as strong antioxidants, but after 24 hours TAC of *Schizandra* supplement (50 mg/mL; D group) greatly exceeded double of TAC compared to the control group (Table 3).

Tab. 3 Total antioxidant capacity of bovine spermatozoa in the absence (A) or presence (B-E) of bilberry or *Schizandra* extract during different time periods (Mean±SEM; n=10) ***(P<0.001); **(P<0.01); *(P<0.05). A– 0; B – 100; C – 50; D – 10; D – 5; E – 1 mg/mL bilberry or Schizandra extract.

TAC / bilberry	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0h [µmol Trolox eq./g prot]	422.2±3.34	390.3±4.02**	500.8±4.03**	508.9±4.94**	420.1±3.67
2h [µmol Trolox eq./g prot]	401.9±3.25	353.6±3.02**	508.5±3.54**	519.8±4.52***	407.7±3.65
24h [µmol Trolox eq./g prot]	210.8±3.03	173.0±1.99***	359.2±3.03**	371.8±2.99***	231.6±5.01
TAC / *Schizandra*	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
0h [µmol Trolox eq./g prot]	439.6±6.45	422.7±5.22	520.0±5.89**	530.6±8.36***	461.9±5.62
2h [µmol Trolox eq./g prot]	420.1±4.83	391.7±4.98***	617.4±9.25**	618.7±5.86***	456.6±4.25**
24h [µmol Trolox eq./g prot]	201.1±4.89	163.3±5.21***	389.5±6.03**	442.1±4.02***	351.9±3.99**

CONCLUSIONS

Our results clearly reveal a dose-dependent in vitro biological activity and radical-scavenging potential of bilberry and Schizandra in bovine spermatozoa. It is absolutely necessary to develope new in vitro supplements to protect biological material, especially spermatozoa against oxidative stress to preserve possibly the best motion-promoting properties of sperm for in vitro fertilization, artificial insemination and cryopreservation. Of course, we cannot confirm positive in vivo effect on male subfertility, however our data may offer new ideas to future explorations to improve and/or manage male infertility in animals and humans.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Research Center AgroBioTech built in accordance with the project Building Research Centre "AgroBioTech" ITMS 26220220180 and by the the Slovak Research and Development Agency Grant no. APVV-15-0544.

REFERENCES

AITKEN, R. J. et al. 2010. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. In: *Human Reproduction*, 2010, roč. 25: s. 2415-2426.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. 2010. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. In: *Molecular human reproduction*, 2010, roč. 16,: s. 3-13.

ALOK, S. et al. 2014. Herbal antioxidant in clinical practice. In: *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2014, roč. 4, s. 78-84.

BABICH, H. et al. 2011.Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. In: *Journal of toxicology*, 2011, roč. 2011. s. 1-12.

BURDULIS, D. et al. 2007. Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. In: *Medicina (Kaunas)*, 2007, roč. 43, s. 971-977.

GÜDER, A., GÜR, M., ENGIN, M. S. 2015. Antidiabetic and Antioxidant Properties of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* Linn.) Fruit and Their Chemical Composition. In: *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, roč.17, s. 387-400.

GÜLÇIN, İ, ALICI, H., CESUR, M. 2005. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. In: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, roč. 53, s. 281-285.

GUO, L. Y. et al. 2008. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. In: *European journal of pharmacology*, 2008, roč. 591, s. 293-299.

HARA, S. et al. 2014. Tumor suppression effects of bilberry extracts and enzymatically modified isoquercitrin in early preneoplastic liver cell lesions induced by piperonyl butoxide promotion in a two-stage rat hepatocarcinogenesis model. In: *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2014, roč. 66, s. 225-234.

HEARST, C. et al. 2010. Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. In: *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, roč. 4, s. 1805-1809.

IP, S. P. et al. 1996. Effect of a Lignan-Enriched Extract of *Schisandra Chinensis* on Aflatoxin B_1 and Cadmium Chloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. In: *Pharmacology & toxicology*, 1996, roč. 78, s. 413-416.

IRVINE, D. S. et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. In: *Journal of andrology*, 2000, roč. 21, s. 33-44.

KIM, K. et al. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. In: *Food Chemistry*, 2006, roč. 95, s. 466-473.

LU, H., LIU, G. 1992. Anti-oxidant activity of dibenzocyclooctene lignans isolated from Schisandraceae. In: *Planta medica*, 1992, roč. 58, s. 311-313.

MATSUNAGA, N. et al. 2009. Bilberry and its main constituents have neuroprotective effects against retinal neuronal damage *in vitro* and *in vivo*. In: *Molecular nutrition & food research*, 2009, roč. 53, s. 869-877.

MORAZZONI, P., BOMBARDELLI, E. 1996. Vaccinium myrtillus L. In: *Fitoterapia*, 1996, roč. 67, s. 3-29.

NISHIKAWA, S., GOLDSTEIN, R. A., NIERRAS, C. R. 2008. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, roč. 9, s. 725-729.

PHARMACOPOEIA COMMISION. 2011. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: Chemical Industry Press, 791 s. ISBN 978-0-11920-779-8

THANNICKAL, V. J., FANBURG, B L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. In: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, roč. 279, 2000, s. 1005-1028.

TREMELLEN, K. 2008. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. In: *Human reproduction update*, 2008, roč. 14, s. 243-258.

VUČIĆ, D. M. et al. 2013. Antibacterial and antioxidant activities of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) *in vitro*. In: *African Journal of Microbiology Research*, 2013, roč. 7, s. 5130-5136.

WANG, B. et al. 2008. Simultaneous quantification of four active schisandra lignans from a traditional Chinese medicine *Schisandra chinensis* (Wuweizi) in rat plasma using liquid chromatography/mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography B*, 2008, roč. 865, s. 114-120.

ZHAO, D. H. et al. 2014. Study of the Protective Effect of *Schizandra chinensis* Polysaccharide on Oxidative Damage of Mouse Spermatozoa *In Vitro*. In: *Advanced Materials Research*, 2014, s. 1973-1977.

ZHU, Q. Y. et al. 1999. Regeneration of α-tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechin. In: *Journal of agricultural and food chemistry*, 1999, roč. 47, s. 2020-2025.

Authors' Address

Bc. Michal Ďuračka, Ing. Eva Tvrdá, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. Tel: +421-37-641-4918. Email: michaelduracka@gmail.com; evina.tvrda@gmail.com

Ing. Jaroslav Michalko, PhD., Slovak Academy of Sciences, Detached Branch of the Institute of Forest Ecology - Arborétum Mlyňany, Vieska nad Žitavou 178, 951 52 Slepčany, Slovakia. Tel: +421-37-633-4571. Email: jaroslav.michalko@gmail.com

Ing. Ildikó Matušíková, PhD., Slovak Academy of Sciences, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Akademická 2, 950 07 Nitra, Slovakia. Tel: +421-37-694-3110. Email: ildiko.matusikova@savba.sk

VITALITA PEĽU HYBRIDNÝCH TAXÓNOV RODU *PRUNUS* L.

POLLEN VIABILITY OF HYBRIDOGENOUS TAXA IN GENUS *PRUNUS* L.

ĽUBA ĎURIŠOVÁ – MICHAL ŽABKA – TIBOR BARANEC

ĎURIŠOVÁ, Ľ. – ŽABKA, M. – BARANEC, T. 2016. Vitalita peľu hybridných taxónov rodu *Prunus* L. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 47-53. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
The pollen viability of hybridogenous taxa in the genus *Prunus* was tested. Staining method was used to detect aborted and non-aborted pollen grains. Pollen germination was carried out using *in vitro* germination method. Assessment was fresh and stored pollen. The percentage of non-aborted pollen grains reached 88,7% in average. The average of pollen germination under *in vitro* conditions was 24.45% and 48.67% in the 2015 - 2016 years, respectively. The pollen germination on agar with the addition of boric acid averaged 65.67%. It was recorded statistically highly significant difference between 2015 - 2016 years. Stored pollen kept the same germination as fresh. The germination stored pollen reached in the range from 3,8 to 29,16%.

Key words: *Prunus*, hybridogenous taxa, pollen viability

ÚVOD

Na Slovensku sú autochtónni predstavitelia rodu *Prunus* zastúpení predovšetkým druhom *Prunus spinosa* L. a jeho špecifickými krížencami *Prunus* × *fruticans* (Weihe) Ascherson et Graebner, *Prunus* × *fechtneri* (Domin) Baranec, *Prunus* × *dominii* Baranec a *Prunus* × *schurii* Baranec. Tento doteraz široko chápaný komplex *Prunus spinosa* agg. je súčasťou mezofytných a xerofytných krovín zväzu *Berberidion vulgaris* Br.-Bl. 1950 a triedy *Rhamno –Prunetea* Rivas Goday et Borja carbonell ex Tüxen 1962 (JAROLÍMEK et al. 2008). Krovinná etáž s významným zastúpením predstaviteľov rodu *Prunus* tvorí dôležitú zložku biokoridorov poľnohospodárskej krajiny na Slovensku (BARANEC 1990). Dominantné postavenie autochtónneho druhu *P. spinosa* sa v posledných rokoch mení, nahrádzajú ho hybridy, predovšetkým *P.* × *fruticans* a *P.* × *dominii* (MURÁŇOVÁ et al. 2013). Väčšina zástupcov rodu *Prunus* disponuje veľmi dobrou schopnosťou vegetatívnej reprodukcie, vďaka ktorej sa taxóny úspešne udržujú a šíria v prírodných populáciách. Generatívna reprodukcia taxónov, hlavne hybridného pôvodu je limitovaná nestabilnosťou hybridného genómu, ktorá sa prejavuje poruchami tvorby gamét a generatívnych diaspór. Dôležitým faktorom, ktorý rozhoduje o úspešnosti oplodnenia pri spontánnom a kontrolovanom krížení rastlinných druhov a zabezpečení produkcie hybridného potomstva, ako aj o celkovej generatívnej reprodukcii rastlín je životaschopnosť peľu (OSTROLUCKÁ et al. 2011). Na zistenie životaschopnosti peľu existujú viaceré presné aj menej presné metódy. Výber vhodnej metódy v značnej miere závisí od skúmaného druhu (HANNA, TOWILL 1995). Nepriamou a skôr orientačnou metódou, ktorá vypovedá o zastúpení vitálnych a sterilných, resp. abortovaných a neabortovaných peľových zŕn je metóda farbenia peľu acetokarmínom, jódom, tetrazóliovými soľami (TTC-test) (PARFITT, GANESHAN 1989) alebo kombináciou farbív (PETERSON et al. 2010). Priamou metódou zisťovania vitality peľu je kultivácia peľových zŕn na umelých médiách, ktorá vypovedá o klíčení aj dynamike klíčenia peľu (LUX et al 1998).

Cieľom práce bolo otestovať a vybrať najvhodnejšie metódy na zisťovanie vitality peľu ako aj posúdiť schopnosť zachovania si vitality peľu po uskladnení.

MATERIÁL A METÓDY

Na hodnotenie vitality peľu bol použitý peľ získaný z jedincov nasledovných taxónov:
Prunus × *fruticans* (Weihe) Ascherson et Graebner
Prunus × *fechtneri* (Domin) Baranec
Prunus × *schurii* Baranec
Prunus × *dominii* Baranec
Prunus spinosa agg.

Materiál bol odoberaný v rokoch 2015 a 2016 z troch lokalít situovaných v blízkosti mesta Nitry: Janíkovce, Jelenec a Nitrianske Hrnčiarovce. Peľ bol zozbieraný celkovo z 26 jedincov skúmaných taxónov. Jedince na uvedených lokalitách sú súčasťou súvislých alebo fragmentovaných biokoridorov, v ktorých tvoria dominantnú zložku.

Peľ skúmaných taxónov bol odoberaný z vybraných jedincov vo fáze bielych púčikov krátko pred otvorením kvetu (baloon stage). Po prenesení do laboratórnych podmienok bol peľ presušený pri izbovej teplote 24 – 25°C po dobu 24 – 48 hodín. Časť presušeného peľu bola priamo použitá na nakličovanie na kultivačnom médiu a časť bola uskladnená v mrazničke pri -20°C a vlhkosti 60 – 65 °C po dobu 12 mesiacov.

Okrem odobratia peľu na kultiváciu *in vitro* boli priamo z čerstvých púčikov v rovnakom štádiu extirpované peľnice, ktoré boli prenesené do fixačného roztoku Carnoy zloženého z etanolu, chloroformu a ľadovej kyseliny octovej v pomere 6:3:1. Takto odobratý a fixovaný materiál bol skladovaný po dobu niekoľkých týždňov v chladnej miestnosti.

Na zistenie vitality peľu boli použité nasledovné metódy:

1.Metóda stanovenia vitality peľu na základe podielu abortovaných a neabortovaných peľových zŕn podľa PETERSON et al. (2010). Fixované peľnice boli prenesené na mikroskopické sklíčko, vysušené a zafarbené zmesou Malachitová zelená, Fuchsín kyslý a Oranž G. Peľové zrná, ktorých protoplazma sa zafarbila na červeno (magenta-red) boli považované za neabortované a peľové zrná zafarbené na modro – zeleno za abortované. Bolo hodnotených 500 – 1000 peľových zŕn z každej vzorky. Analyzovaných bolo 26 jedincov v roku 2015.

2.Metóda stanovenia vitality peľu nakličovaním na kultivačnom médiu podľa PARFITT, GANESHAN (1989). Základné kultivačné médium obsahovalo 1% agar a 15% koncentráciu sacharózy. Pokus prebiehal v dvoch variantoch: bez pridania kyseliny boritej (H_2BO_3) a s pridaním 100 ppm H_2BO_3 (BREWBAKER, KWACK 1963). Prvý variant sa realizoval v oboch rokoch, druhý v roku 2016 zo súboru 10 vybraných jedincov, zahŕňajúcich všetky hybridné taxóny.

Peľ sme pri obidvoch variantoch kultivovali v Petriho miskách za tmy pri teplote 25 °C. Percento klíčivosti sme stanovili po 24 hodinách vyhodnotením 100 peľových zŕn z troch zorných polí mikroskopu v troch opakovaniach.

3.Stanovenie klíčivosti uskladneného peľu sa realizovalo nakličovaním peľu na agare s pridaním 15% sacharózy. Na testovanie zachovania si vitality peľu bol vybraný súbor 5 jedincov reprezentujúcich všetky hybridné taxóny.

Na vyhodnotenie dosiahnutých výsledkov boli použité metódy popisnej štatistiky ako aj jednofaktorová analýzu rozptylu (ANOVA) a následné testovanie pomocou Tukeyovho HSD testu. Štatistické analýzy boli realizované pomocou softvéru STATISTICA 7.1.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Produkcia a vývin peľu hybridných taxónov rodu *Prunus* bol po cytologickej stránke hodnotený v predchádzajúcich štúdiách. Bolo dokázané, že tetraploidné hybridné taxóny *P.* × *fruticans* a *P*. × *dominii* vytvárajú dostatočné množstvo morfologicky normálne vyvinutého peľu,

ktorý je výsledkom mikrosporogenézy a mikrogametogenézy bez vážnejších porúch (KIŠACOVÁ et al. 2012a; RYBNIKÁROVÁ et al. 2010). Výrazná morfologická variabilita peľových zŕn bola zaznamenaná pri pentaploidnom taxóne *P.* × *fechtnerii*, u .ktorého predbežné embryologické analýzy poukazujú na poruchy gametogenézy (KIŠACOVÁ et al. 2012b).

Dosiahnuté hodnoty ukazovateľov vitality peľu získané metódou farbenia peľových zŕn ukázali, že stredná hodnota vitality peľu bola na úrovni 88,7% a výrazne nevarírovala medzi jedincami (72,7 – 96,7%) ani medzi lokalitami, čo dokazuje aj celkový koeficient variancie 7,28%. (tab. 1, 2). Porovnávaním metodík farbenia peľu a klíčivosti peľu na živných médiách prišli PARFITT, GANESHAN (1989) k záveru, že nepriame farbiace metódy pomocou acetokarmínu, TTC, Alexander´s test sa ukázali pri zástupcoch rodu *Prunus* ako nespoľahlivé, farbili aj neživotaschopný peľ a neboli v pozitívnej korelácii s *in vitro* testami. Ako najvhodnejšie metódy uvádzajú metódu visiacej kvapky a klíčenie peľu na agarovom médiu. K podobným záverom s technikou farbenia peľu podľa PETERSON et al. (1990) sme dospeli aj my na základe našich pozorovaní, keďže údaje získané farbením vykazovali veľmi vysoké hodnoty, ktoré neboli v korelácii s výsledkami dosiahnutými na agarovom médiu a predovšetkým pri taxóne *P.* × *fechtnerii* s nevyrovnaným peľom boli farbené aj nevyvinuté peľové zrná

Tab. 1 Hodnoty popisnej štatistiky pre vitalitu peľu farbením a klíčenie peľu na agare, r. 2015.

Použitá metóda	Počet	Priemer	Min	Max	Stredná chyba priemeru	Smerodajná odchýlka	Variačný koeficient
Farbiteľnosť (%)	26	88,71	72,71	96,94	1,26	6,46	7,28
Klíčivosť na agare (%)	26	18,80	2,27	42,47	2,38	12,16	64,70

Tab. 2 Popisná štatistika farbiteľnosti a klíčivosti peľových zŕn *Prunus spinosa* agg. podľa lokalít, r. 2015.

	Nitrianske Hrnčiarovce		Jelenec		Janíkovce		Celkom	
	F [%]	K [%]	F [%]	K [%]	F [%]	K [%]	F [%]	K [%]
Priemer	86,2	25,2	88,9	20,1	90,0	13,7	88,7	18,8
Min	78,1	13,3	81,8	4,2	72,7	2,3	72,7	2,3
Max	94,5	41,5	96,9	42,5	96,4	29,5	96,9	42,5
Počet [jedinec]	6,0	6,0	10,0	10,0	10,0	10,0	26,0	26,0
$\mathrm{SE}_{\bar{x}}$	2,5	5,4	1,4	4,3	2,7	2,7	1,3	2,4
s^2	6,0	13,2	4,4	13,5	8,4	8,6	6,5	12,2
C_v	7,0	52,6	4,9	67,1	9,4	62,7	7,3	64,7

F – farbiteľnosť peľových zŕn **K** – klíčivosť peľových zŕn na agare **Min** – minimum **Max** – maximum $\mathbf{SE}_{\bar{x}}$ – (standard error of mean) stredná chyba priemeru $\boldsymbol{s^2}$ – smerodajná odchýlka $\boldsymbol{C_v}$ – variačný koeficient

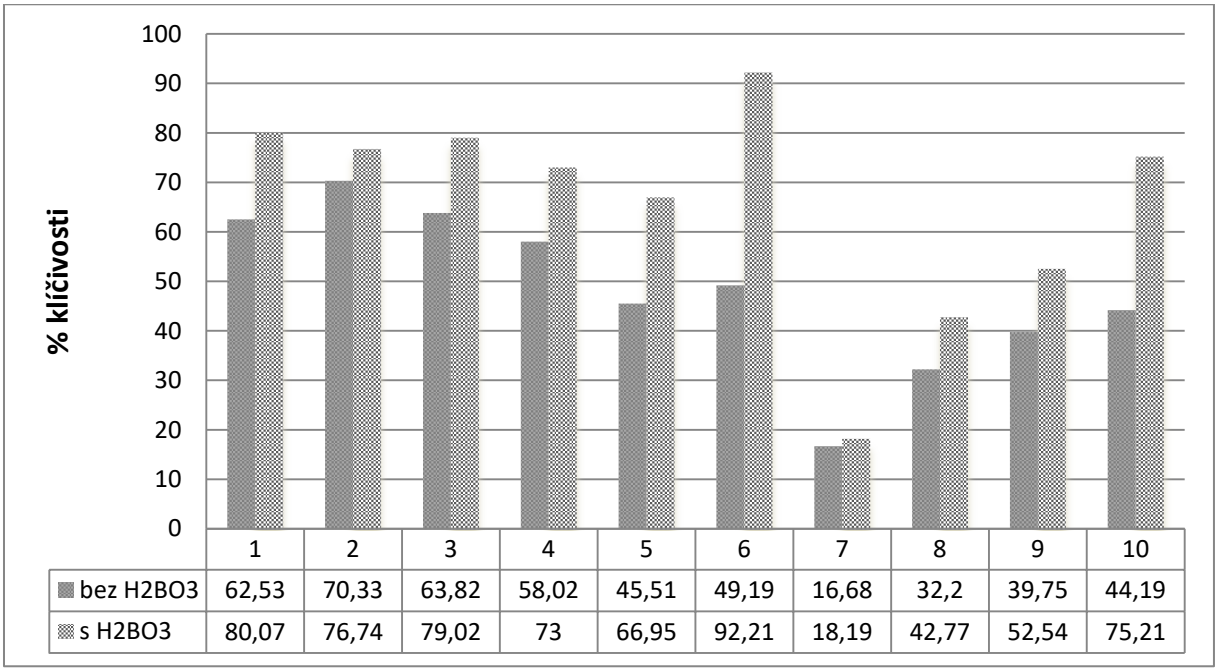
Pri hodnotení vitality peľu na agarovom médiu stredná hodnota klíčivosti peľu *in vitro* dosiahla celkovo 18,8% a boli zaznamenané významné rozdiely medzi jedincami (2,27 – 42,47%), keďže celkový koeficient variancie bol na úrovni 64,7% (tab. 1). Významné boli aj rozdiely medzi priemernými hodnotami klíčivosti peľu na lokalitách (tab.2). Avšak jednofaktorová analýza variancie nezistila preukazný rozdiel medzi lokalitami. Vyššie hodnoty klíčivosti peľu pri taxóne *P.* × *fruticans* ako bolo dosiahnuté v našej štúdii zaznamenala RYBNIKÁROVÁ (2010), ktorá pre daný taxón uvádza klíčivosť v intervale od 29,00% po 58,33% s hodnotami variačného koeficientu od 1,19 po 22,61%. Vyššiu klíčivosť zistila aj pre druh *P. spinosa* – 61,33%.

Klíčivosť peľu býva pozitívne ovplyvnená pridaním rastových látok alebo mikroelementov do živného média. Preukázateľne pozitívny vplyv na klíčenie peľu má bór. Kyselina boritá zohráva dôležitú úlohu v procese klíčenia peľu a prerastania peľových vrecúšok. Nedostatok bóru vedie k akumulácii kalózy v apikálnej časti peľových vrecúšok a vyvoláva zmeny v koncentrácii a distribúcii

kyslých pektínov, fenolických látok a nasýtených esterov (QINLI et al. 2003). Pri testovaní vplyvu bóru na klíčivosť peľu sme zistili, že pridaním kyseliny boritej do kultivačného média dosiahla priemerná klíčivosť peľu 65,67% (v intervale 18,19 – 92,21%), zatiaľ čo priemerná klíčivosť peľu na agare bez pridania kyseliny boritej bola 48,22% (v intervale od 16,68 – 70,33%) (tab. 3). Pridanie kyseliny boritej do média predstavovalo nárast klíčivosti v priemere o 17,45% (v intervale od 1,51 – 43,02%), hoci na základe analýzy variancie nebol potvrdený štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi (graf 1). Pozitívny vplyv kyseliny boritej a ďalších mikroelementov na klíčenie peľu zástupcov rodu *Prunus* uvádza PEREZ, MOORE (1985). Vysokú klíčivosť dosiahli pri *P. spinosa* (82%) ako aj pri *P. cerasifera* (91%), zatiaľ čo hybridné taxóny dosiahli klíčivosť v intervale od 1 – 40%.

Tab. 3 Hodnoty popisnej štatistiky pre klíčenie peľu na agare bez pridania a s pridaním kyseliny boritej (H_2BO_3), r. 2016.

Použitá metóda	Počet	Priemer	Min	Max	Stredná chyba priemeru	Smerodajná odchýlka	Variačný koeficient
Bez H_2BO_3	10	48,22	16,68	70,33	5,14	16,26	33,72
S H_2BO_3	10	65,67	18,19	92,21	6,92	21,88	33,32



Graf 1. Porovnanie klíčivosti peľu na agare bez pridania a s pridaním kyseliny boritej (H_2BO_3). 1 – 10 vybraní jedinci (1 – 3 *P.* × *dominii*, 4 – 6 *P.* × *fruticans*, 7 – *P.* × *fechtnerii*, 8 – *P.* × *schurii*, 9 – 10 *P. spinosa*) r. 2016

Na základe výsledkov analýz klíčivosti peľu môžeme potvrdiť predošlé údaje o kvantite a predpokladanej kvalite peľu skúmaných hybridných taxónov rodu *Prunus* získané cytoembryologickými metódami. Hybridné taxóny tetraploidnej úrovne dosiahli pri optimalizácii kultivačných podmienok približne rovnaké a dostatočné vysoké hodnoty klíčivosti peľu, zatiaľ čo pentaploidný taxón *P.* × *fechtnerii* dosiahol maximálnu hodnotu klíčivosti peľu 18,19%, čo je považované za nízku klíčivosť spôsobenú pravdepodobne poruchami gametogenézy, ktoré sa vyskytujú pri hybridoch s nepárnou úrovňou ploidie známou ako triploid block (MARKS 1966; CHUDÍKOVÁ et al. 2012).

Porovnaním klíčivosti peľu medzi jednotlivými rokmi bol zistený štatisticky vysoko preukazný rozdiel medzi dosiahnutými údajmi (tab.4,5). Zatiaľ čo priemerná hodnota klíčivosti v roku 2015 dosiahla iba 21,45%, čo je považované za nízku klíčivosť (WETHEIM (1996), v roku 2016 bola táto

hodnota 48,67%. Predpokladáme, že rozdiely medzi rokmi môžu byť spôsobené vplyvom rôznych klimatických podmienok v období formovania peľu a kvitnutia. Najviac je životaschopnosť peľu ovplyvnená teplotným stresom (THINGREINGAM, MITRA 2014). V posledných rokoch bolo u nás zaznamenané práve v období kvitnutia zástupcov rodu *Prunus* výrazné kolísanie medzi dennými a nočnými teplotami, čo môže mať negatívny dopad na úspešnosť opelenia a násadu plodov. Viacerí autori (CEROVIC, RUZIC 1992; SHARAFI 2011) uvádzajú, že optimálna teplota pre klíčenie peľu väčšiny zástupcov rodu *Prunus* je okolo 20°C, avšak EGEA et al. (1992) zaznamenali rast peľových vrecúšok niektorých kultivarov *P.armeniaca* aj pri 5°C, čo naznačuje možnú adaptáciu na nižšie teploty.

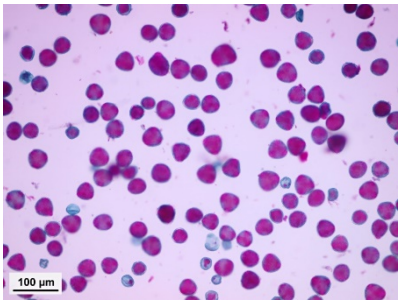
Tab. 4 Porovnanie klíčivosti peľu na agare bez H_2BO_3 medzi rokmi 2015 a 2016.

Rok	Počet	Priemer	Min	Max	Stredná chyba priemeru	Smerodajná odchýlka	Variačný koeficient
2015	9	21,45	4,18	41,47	4,012	12,03	56,10
2016	9	48,67	16,68	70,33	5,72	17,18	35,30

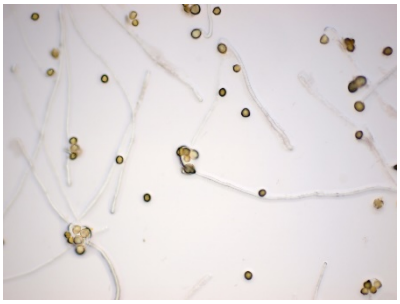
Tab. 5 Klíčivosť peľu na agare bez H_2BO_3, **Tukeyov HSD test** na hladine významnosti alfa = 0,01.

Rok	Klíčivosť peľu na agare bez H_2BO_3 (%)	a	b
2015	21,45	****	
2016	48,67		****

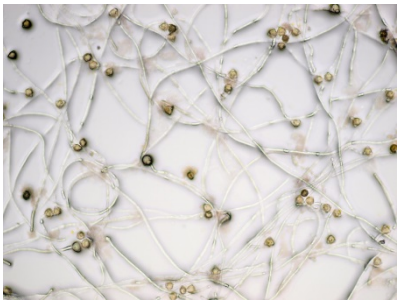
Získané hodnoty klíčivosti peľu 12 mesiacov po uskladnení ukázali, že väčšina testovaných taxónov si zachovala približne rovnakú, dokonca v dvoch prípadoch lepšiu klíčivosť peľu, a to v prípade, *P.*×*dominii,* ktorý po uskladnení dosiahol priemerne 15,16% klíčivosť v porovnaní s čerstvým peľom, ktorý mal 6,97% a *P.* × *schurii* s hodnotou 29,4% pre skladovaný peľ v porovnaní 14,75% pre čerstvý peľ. Pri *P.* × *fruticans* mal skladovaný peľ 26,41% klíčivosť a čerstvý 29,64%, pri *P. spinosa* 29,16% skladovaný a 33,33% čerstvý peľ. Výrazný pokles klíčivosti sme zaznamenali iba pri taxóne *P.* × *fechtnerii*, ktorého klíčivosť po uskladnení bola iba 3,8%, v porovnaní s 9,96% pred uskladnením. Zmenu v klíčivosti peľu po ročnom uskladnení pri -20°C pri kultivaroch *P. avium* nezaznamenali ALBURQUERQUE et al. (2007). Uvádzajú však, že peľ stráca životaschopnosť po 60-tich dňoch skladovania pri teplote 4°C. Schopnosť peľu zachovať si životaschopnosť aj po 1 – 1,5 ročnom uskladnení pri -20°C potvrdili u jedincov z hybridných rojov *Pinus mugo* a *P. sylvestris* OSTROLÚCKA et al. (2011). Zistili, že peľ uskladnený za vhodných podmienok je schopný zachovať si životaschopnosť na úrovni čerstvého peľu, dokonca s tendenciou mierneho vzostupu klíčivosti.



Obr. 1 Zafarbená vzorka peľu *P.* × *fruticans*.



Obr. 2 Klíčenie peľu *P.* × *dominii* na agare bez H_2BO_3.



Obr. 3 Klíčenie peľu *P.* × *dominii* na agare s H_2BO_3.

ZÁVER

Testovaním životaschopnosti peľu hybridných taxónov rodu *Prunus* priamymi a nepriamymi metódami sme zistili, že najvhodnejšou metódou stanovenia vitality peľu je metóda klíčenia peľu *in*

vitro použitím agarového média s prídavkom kyseliny boritej, zatiaľ čo metóda farbenia peľu je nepresná a môže poskytnúť iba orientačné údaje o podiele abortovaných a neabortovaných peľových zŕn. Skladovaním peľu pri mínusových teplotách sme zistili, že peľ si aj po niekoľkomesačnom uskladnení zachováva približne rovnakú klíčivosť ako peľ čerstvý. Porovnaním dvoch ročníkov sme zaznamenali štatisticky vysoko preukazný rozdiel v klíčivosti peľu skúmaných taxónov, ktorý pripisujeme predovšetkým vplyvu kolísania denných a nočných teplôt počas formovania a klíčenia peľu.

POĎAKOVANIE

Príspevok vznikol s podporou projektov VEGA 1/0731/14 a VEGA 1/0083/16 a projektu č. 26220220180 „AgroBioTech“..

LITERATÚRA

ALBURQUERQUE, N., MONTIEL, F.G., BURGOS, L. 2007. Influence of storage temperature on viability of sweet cherry pollen. In. Spanish Journal of Agricultural Research, 2007, Vol. 5, No. 1, p. 86 – 90.

BARANEC, T. 1990. Nové spontánne kríženec rodu *Prunus* L. pre Česko-slovensko. In Dendrologická sdělení, 1990, roč. 34, s. 38 – 40.

CEROVIC, R., RUZIC, D. 1992. Pollen-tube growth in sour cherry (Prunus cerasus L.) at the different temperatures. In Journal of Hortic. Science at Biotechnology, 1992, Vol. 67, No. 3, p. 333 – 340.

BREWBAKER, L., KWACK, B.H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. In Am.J.Bot., 1963, Vol. 50, No. 9, p. 859 – 865.

EGEA, J., BURGOS, L., ZOROA, N., EGEA, L. 1992. Influence of temperature on the in vitro germination of pollen of apricot (*Prunus armeniaca* L.). In *J Hort Sci.* 1992, vol. 67, pp. 247 – 250.

HANNA, W. W. TOWILL, L. E. 1995. Long-term pollen storage. In *Plant Breed. Rev.*, 1995, vol. 13, pp. 179-207.

CHUDÍKOVÁ, R., ĎURIŠOVÁ, Ľ., BARANEC, T., ELIÁŠ, P. 2012. The reproductive biology of selected taxa of the genus *Cerasus* duham. In Acta biologica cracoviensia series botanica. ISSN 0001-5296, 2012, vol. 54, no. 2, s. 1-10.

JAROLÍMEK I., ŠIBÍK J., TICHÝ L., KLIMENT J. 2008. Diagnostic, constant and dominant species of the higher vegetation units of Slovakia. – In: Jarolímek, I., Šibík, J. (eds). Diagnostic, constant and dominant species of the higher vegetation units of Slovakia. – Veda, Bratislava, p. 9–294. (ISBN 978–80–224–1024–3)

KIŠACOVÁ, A., ĎURIŠOVÁ, Ľ., GALUŠČÁKOVÁ, Ľ., BARANEC, T. 2012a. Reprodukčná biológia hybridného taxónu *Prunus* × *dominii*. In: VII.Vedecká konferencia doktorandov (ed. Ľ.Vozár), 2012, SPU Nitra, s. 24 – 28.

KIŠACOVÁ, A., ĎURIŠOVÁ, Ľ., GALUŠČÁKOVÁ, Ľ. 2012b Cytoembryological, cytometric and morhpometric analysis of *Prunus* x *fetchneri*. In Horticulture Nitra 2012. 1 vyd. 260 s. ISBN 978-80-552-0868-8. Záhradnícka medzinárodná vedecká konferencia. Nitra : Slovak university of agriculture in Nitra, 2012, s. 158-164

LUX, A. ERDELSKÁ, O. JÁSIK, J. KRIŽO, M. LUXOVÁ, M. OSTROLUCKÁ, G. PREŤOVÁ, A. SLADKÝ, Z. ZLINSKÁ, J. 1998. Praktikum z anatómie a embryológie rastlín. Univerzita Komenského Bratislava, 135 p.

MARKS, G. E. 1966. The origin and significance of intraspecific polyploidy: experimental evidence from Solanum chacoense. In Evolution 20: 552 – 557.

MURÁŇOVÁ, K., BARANEC, T., GALUŠČÁKOVÁ, Ľ., IKRÉNYI, I. 2013. Analýza veľkosti, hustoty a priestorovej štruktúry populácii *Prunus* × *fruticans* na juhozápadnom Slovensku. In Acta Pruhoniciana 103: 91 – 96.

OSTROLUCKÁ, M. G., KORMUŤÁK, A., BOLVANSKÝ, M. 2011. Vplyv uskladnenia na životaschopnosť peľu *Pinus* spp. In Acta Pruhoniciana, 99: 113 – 119.

PARFITT, D. E., GANESHAN, S. 1989. Comparison of Procedures for Estimating Viability of *Prunus* Pollen. In Hort. Science, Vol. 24, no. 2, p. 354-356.

PEREZ, S., MOORE, J. N. 1985. Prezygotic endogenous barriers to interspecific hybridization in *Prunus*. In Journal of Ame.Soc. for Hortic.Science. 1985, Vol. 24, No. 2, p. 354 – 356.

PETERSON, R., SLOVIN, J. P., CHEN, CH. 2010. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. In International Journal of Plant Biology, 2010, Vol 1, No 2, p. 66-69.

SHARAFI, Y. 2011. In vitro pollen germination in stone fruit tree of *Rosaceae* family. In African Joutnal of Agricultural Research. 2011, Vol. 6 (28), pp. 6021 – 6026.

QUINLI, W., LONGDOU, L., ZIAOQIN, W., YIQIN, L., JINXING, L. 2003. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. In Tree Physiology, 23: 345 – 351.

RYBNIKÁROVÁ, J. 2010. Reprodukčná biológia vybraných autochtónnych druhov rodu *Prunus* L. Dizertačná práca, SPU Nitra, 104 s.

RYBNIKÁROVÁ, J., BARANEC, T., ĎURIŠOVÁ, Ľ. 2010. Predbežné výsledky embryologického štúdia vybraných zástupcov rodu *Prunus* L. In Bull.Slov Bot.Spoločn., roč. 32, supl. 2, s. 247 – 251.

THINGREINGAM I., MITRA, S. K. 2014. Understanding the pollen and ovule characters and fruit set of fruit crop in relation to temeperature and genotype. In Journal of Applied Botany. 2014, vol. 87, pp. 157 – 167.

WERTHEIM, S. J. 1996. Methods for cross pollination and flowering assesment and their interpretation. In Acta Horticulturae 423: 237 – 241.

Adresa autorov

Ing. Ľuba Ďurišová, PhD., Ing. Michal Žabka, PhD., prof. RNDr. Tibor Baranec, CSc. – Katedra botaniky, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: luba.durisova@uniag.sk, michalzabka89@gmail.com, tibor.baranec@uniag.sk

MORFOLOGICKÁ PLASTICITA DREVÍN – AKO DEFINOVAŤ JEDINCA?

MORPHOLOGICAL PLASTICITY OF WOODY PLANTS – HOW TO DEFINE AN INDIVIDUAL?

PAVOL ELIÁŠ

ELIÁŠ, P. 2016. Morfologická plasticita drevín – ako definovať jedinca? In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 54-58. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Large morphological plasticity of woody plants is demonstrated not only in life forms usually distinguished as trees, shrubs, small shrubs and lianas. But also in differences in ontogeny and large diversity of life forms of trees and shrubs reflecting environmental conditions (non-stress and stress). In trees, individual trees with one stem (= trunk) are common, but trees with few and many stems are observed too. In shrubs, many stems growing up from soil surface are frequent, but other forms are also observed. In woody plants, individuals originated from seeds (genets) and ramets of vegetative origine can be used for population studies. Analysis and description of the individual units is important before the starting of the studies.

Key words: woody plants, trees, shrubs, life forms diversity, population studies, individual plants

ÚVOD

Dreviny (drevnaté rastliny, angl. *woody plants*) sú rastliny so zdrevnatenými stonkami (výhonkami) a koreňmi, ktorými prečkajú nepriaznivé obdobie (prezimujú) (cf. DOSTÁL 1958, 1966, ČERVENKA 1968, ČERNOHORSKÝ 1964). KOLEKTÍV (1959) zdôraňujú dĺžku života: *„drevina rastie dlhú dobu (až mnoho rokov)“*. Sú to dlhožijúce rastliny. Z fyziologického hľadiska sa zdôrazňujú (v porovnaní s bylinami) veľké rozmery, pomalý rast a dlhý životný cyklus drevín (KRAMER & KOZLOWSKI 1979, ELIÁŠ 1997). Medzi dreviny patria **stromy, kry, kríčky a drevnaté liany**. Odlišujú sa v individuálnom vývine (ontogenéze) a v rôznorodosti životných foriem podľa podmienok prostredia, v ktorých žijú (SEREBRJAKOV 1962, 1964). Pri botanických opisoch druhov drevín sa preto často uvádza „ker alebo menší strom“ (napr. PAGAN & RANDUŠKA 1987).

MORFOLOGICKÁ PLASTICITA DREVÍN

Morfologická plasticita drevín sa prejavuje v rôznych životných formách, ekobiomorfách, rastových formách (ELIÁŠ 1997). Životné formy stromov a krov analyzoval SEREBRJAKOV (1962, 1964) podľa morfologických a ekologických znakov. Ukázal, že morfologická premenlivosť drevín je väčšia ako sa uvádzalo.

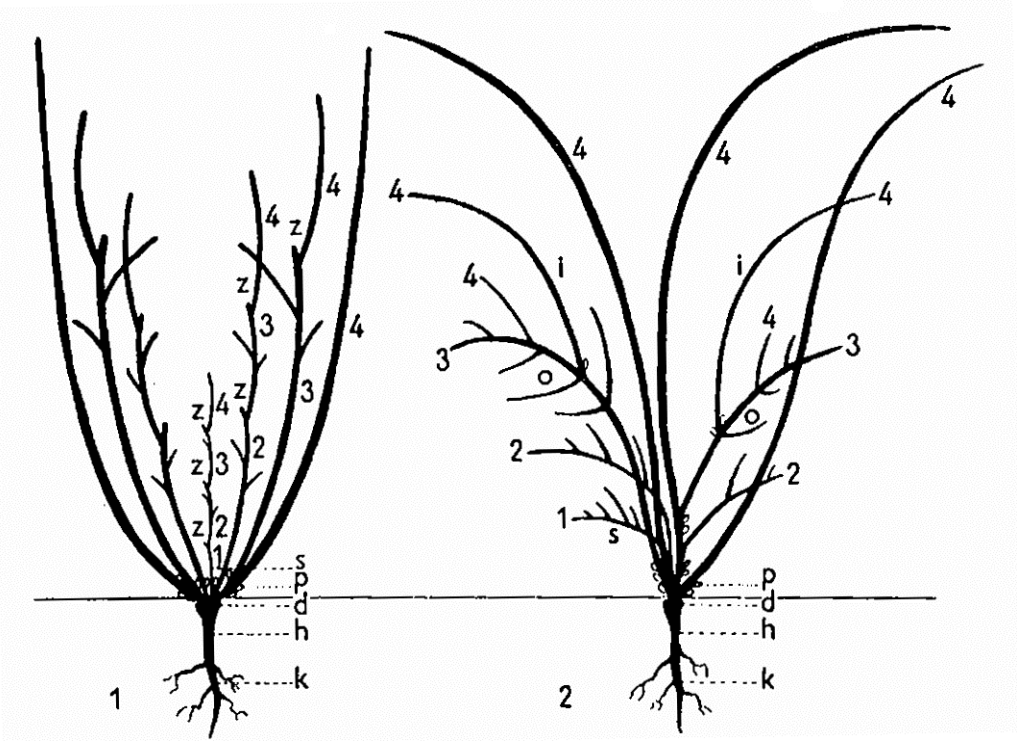
Strom (*arbor*) je rastlina s drevnatou stonkou (drevina), hlavná stonka (aspoň v dolnej časti) je viacmenej priama, jednoduchá (označuje sa kmeň) a hore sa rozkonáruje do koruny (DOSTÁL 1958). Strom je teda drevina s kmeňom hore rozkonáreným do koruny (SLAVÍKOVÁ 1988). Kmeň (*truncus*) je drevnatá, nerozkonárená stonka stromov, ktorá druhotne hrubne (ČERVENKA 1968). Koruna, tiež *„stromová koruna“* (KOLEKTÍV 1959) (*corona arboris*), je sústava konárov vyrastajúca z hornej časti kmeňa, *„súbor konárov stromu“* (KOLEKTÍV 1959).

Definícia stromu podľa FAO zohľadňuje veľkosť stromu: za strom je považovaný jedinec, ktorý v dospelosti dosiahol výšku minimálne 5 m, hrúbku kmeňa v prsnej výške minimálne 7,5 cm a rozkonárenie kmeňa na korunu. Odlišujú sa od krov dlhovekosťou nadzemných stoniek (kmeňov) a veľkými rozmermi kmeňov a korún dospelých rastlín (KRYLOV 1984).

Kry sú dreviny menších rozmerov ako stromy, dorastajúce do výšky 2-4 metrov. SEREBRJAKOV (1962) považuje za kry životné formy drevín s výškou 0,5 až 6-10 m. KRYLOV (1984) podľa rozmerov rozlíšil vysoké (nad 2 m), stredne vysoké (1-2 m) a nízke (pod 1 m) kry. Krík (*fruticulus*) je drobný ker, väčšinou do 0,5 m vysoký (SLAVÍKOVÁ 1988). Podľa Kolektívu (1959), Červenku (1968) a Pagana & Randušku (1987) je to kríček.

Pri definovaní krov sa za dôležitý znak považuje rozkonárovanie hneď nad zemou. Podľa Kolektívu (1959) *„ker (frutex) je drevina, ktorá sa rozkonáruje hneď nad zemou a na ktorej všetky konáriky drevnatejú*". Podobne DOSTÁL (1966: 265) definuje ker ako drevinu s celými stonkami drevnatejúcimi a už od bázy rozkonárenými.

Kry sa odlišujú od stromov tým, že majú veľa stoniek (Obr. 1). Podľa niektorých autorov kry nemajú kmeň, je to drevina už zdola rozkonárená, bez kmeňa (SLAVÍKOVÁ 1988). KOLEKTÍV (1959) však uvádza termín *„stromovitý ker*", ktorý je prechodným útvarom medzi stromom a krom, je to *„ker, ktorý má nízky pníček*".



Obr. 1 Náčrty rastových foriem a rozkonárovania krov: 1 – lieska obyčajná (*Corylus avellana*), 2 – baza čierna (*Sambucus nigra*). Čísla 1-4 označujú stonky vyrastajúce v časovej postupnosti (prekreslené z Rauha, ČERNOHORSKÝ 1964).

NEJEDNOTNÁ MORFOLOGICKÁ TERMINOLÓGIA PRE KRY

Podľa Dostála (1966) kry nemajú korunu, len ***habitus*** (= vzhľad, vonkajšia podoba). Majú kmene vyrastajúce z koreňa. Rozlišuje jednokmeňový ker a viackmeňový ker, keď jedna veľká koreňová hlava (= horná časť koreňa) má väčší počet kmeňov. Nasledujú ho PAGAN & RANDUŠKA (1987). ČERVENKA & CIGÁNOVÁ (1974) používajú termíny výhonok, konár, konárik, prípadne kmienky. Pričom výhonok (*frons*) je nadzemná časť cievnatých rastlín rozlíšená na stonku a listy, konár (*ramus*) je bočná stonka, konárik (*ramulus*) je konár posledného stupňa (ČERVENKA 1968). PAGAN & RANDUŠKA (1987) používajú termín koruna aj pre kry. Namiesto termínu kmeň píšu o konároch a výhonkoch. Kmeň sa rozkonáruje na viacero konárov, u väčšiny listnatých drevín už v dolnej časti.

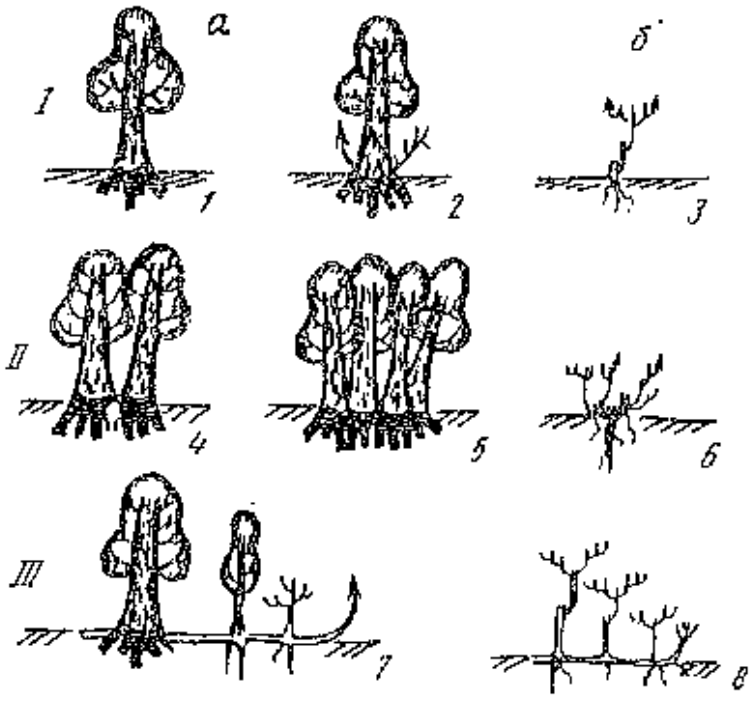
SZEGHY (1966) používa termíny konár, konárik, koruna, ale pri kroch aj „prúty" a „konáre prútovité" pri ostružine a „prútovité výhonky" a „mladé prúty" pri lieske. ČERNOHORSKÝ (1964)

termínom „prýt“ označuje stonku s listami. *„..nad púdou vytvářejí prýty, rozlišené ve stonky a listy*“. DOSTÁL (1966) pozná *„prútnatý ker“*, ktorý má konáre dlhé, prútovité, viacmenej nerozkonárené, viacmenej chabé, t.j. koncom k zemi ohnuté, niekedy i poliehavé alebo popínavé, pomerne krátkeho (1-3 roky) trvania, napr. *Rubus*, *Rosa*.

DEFINÍCIA JEDINCA PRI DREVINÁCH

Veľká morfologická premenlivosť drevín v prírode spôsobuje ťažkosti pri analýze veľkosti, štruktúry a dynamiky populácií stromov a krov v spoločenstvách (ELIÁŠ 1997, 1999, BARANEC a kol. , ELIÁŠ jun., POPADJUK a kol. 1994). Ako definovať a rozlíšiť jedinca pri drevinách?

Stromy v priaznivých podmienkach prostredia majú jednu stonku – kmeň s koreňom, a takýto jedinec sa vyvíja od semenáčika až po dospelého (generatívneho) a senilného jedinca. Životaschopné jedince stromov majú dobre vyvinutú hlavnú stonku, dosahujú veľké rozmery v každom vekovom štádiu (ČISTJAKOVA in POPADJUK a kol. 1994). Niektoré stromy tvoria koreňové a pňové výmladky vedúce k dvoj až viackmeňovej životnej forme stromu (Obr. 2). Vegetatívnym rastom sa môže vytvoriť difúzna forma klonálnej kolónie (v zmysle Čisťjakovovej). V nepriaznivých podmienkach prostredia (pri silnom zatienení, nedostatok vlahy, poškodenie živočíchmi), pri zníženej životaschopnosti, aj stromy pomaly rastú a vytvárajú odlišné životné formy s viacerými stonkami. V podraste lesa sa vyskytujú stromy veľkosti krov (cf. ELIÁŠ 1979, POPADJUK a kol. 1994), ktoré sa často nedožijú reprodukčného štádia. Čo pri takejto veľkej rôznorodosti životných foriem stromov a krov môžeme považovať za jedinca? V prípade jednostonkových stromov (s jedným kmeňom) je takouto jednotkou pre sčítanie jedinec semenného pôvodu (geneta), pri všetkých ostatných životných formách drevín je to rameta – jednostonkový štruktúrny prvok (nadzemný výhonok) „klonálnej kolónie“ (v zmysle Mullera 1951, cf. POPADJUK a kol. 1994).

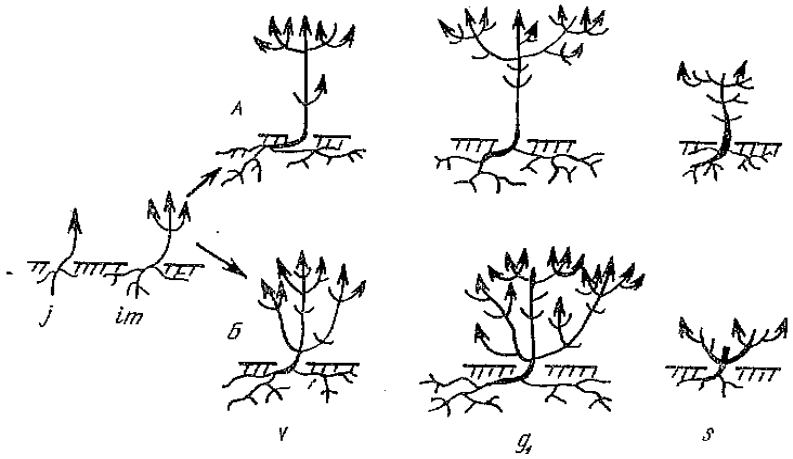


Obr. 2 Životné formy drevín v lesných spoločenstvách (ČISŤJAKOVA in POPAĎJUK a kol. 1994). Vývin stromov s jedným (I), viacerými (II) kmeňmi.

ISTOMINA (in POPADJUK a kol. 1994) v lesných porastoch rozlíšila tri skupiny krov (Obr. 3). Stromovité formy krov, podobné životnej forme stromu majú viac alebo menej výrazný kmeň a korunu (ako príklad uvádza druh *Corylus avellana*). Krovité formy krov sa vyznačujú veľkou

labilnosťou štruktúry jedinca a fytocenotickou tolerantnosťou (napr. *Euonymus verrucosa, E. europaea*).

Veľká rôznorodosť životných foriem drevín, stromov a krov, vyžaduje poznanie architektúry sledovaných druhov drevín. Priložený by mal byť detailný opis individuálnych jednotiek (genet či ramet), ktoré sa použijú ako jednotky sčítavania pre stanovenie veľkosti, štruktúry a dynamiky populácie („počet jedincov“).



Obr. 3 Vývin liesky obyčajnej (*Corylus avellana*): A semenná rada, ontogenéza stromom podobnej formy, B – ontogenéza vegetatívneho kra (ISTOMINA in POPAĐJUK a kol. 1994).

ZÁVER

Dreviny sú veľmi rôznorodou skupinou dlhožijúcich organizmov/rastlín, ktorá sa prejavuje v rozdielnom vývine (ontogenéze) a rôznorodosti životných foriem. Táto rôznorodosť spôsobuje ťažkosti pri definovaní/rozlíšení a opise jedinca. Nejednotná (morfologická) terminológia ukazuje na nedostatočné riešenie tejto problematiky, vyžaduje nový výskum a zjednotenie termínov používaných pri opise krov a krovitých stromov. Terénnemu výskumu cenopopulácií drevín by mala predchádzať analýza životnej formy, vývinu konárov, architektúry drevín, a na tomto základe definovanie a opis sledovaných jedincov. V prípade stromov s jedným kmeňom je jednotkou pre sčítanie jedinec semenného pôvodu (geneta), pri všetkých ostatných životných formách drevín je to rameta – jednostonkový štruktúrny prvok (nadzemný výhonok) „*klonálnej kolónie*“.

POĎAKOVANIE

Príspevok bol vypracovaný a prezentovaný s podporou výskumného projektu VEGA č. 1/0813/14, ktorý riešime na Katedre ekológie FEŠRR SPU v Nitre.

LITERATÚRA

BOND, W.J., MIDGLEY, J.J. 2001. Ecology of sprouting in woody plants: the persistence niche. Trends in Ecology and Evolution, roč. 16, s.

ČERNOHORSKÝ, Z. 1964. Základy rostlinné morfologie. 5. vydání, SPN Praha, 216 s plus obrázková príloha

ČERVENKA, M. 1968. Botanický terminologický slovník. Prírodovedecká fakulta Univ. Komenského, Bratislava, 236 s.

ČERVENKA, M., CIGÁNOVÁ, K. 1974. Kľúč na určovanie drevín podľa púčikov a konárikov. SPN Bratislava, 240 s. plus farebné prílohy.

DOSTÁL, J. 1966. Morfologická terminológia. In: Flóra Slovenska I, Vydavateľstvo SAV, Bratislava, p. 27-532.

ELIÁŠ, P. 1997a. Funkčné skupiny rastlín vo fytocenózach. Ekologické štúdie 1/97, SEKOS Bratislava, p.

ELIÁŠ, P. 1997b. Osobitosti populačne-biologické štúdia lesných drevín. In Eliáš P., ed, Populačná biológia rastlín V, SEKOS Bratislava, s.

ELIÁŠ, P. 1999. Terminologický slovník ekológie 1. Populačná ekológia rastlín. SEKOS Bratislava, p.

JENÍK, J. 1998. Stromy a stromovité formy. Zprávy České bot. Společn., roč. 33 (16), 5-10.
KOLEKTÍV 1959. Terminológia botanickej morfológie. Slovenská akadémia vied, Bratislava, 260 s.
KRAMER, P.J., KOZLOWSKI, T.T. 1979. Physiology of Woody Plants. Academic Press, Inc. New Yourk.
KRYLOV, A.G. 1984. Žiznennyje formy lesnych fitocenozov. Izdat. Nauka, Leningrad, 184 s.
LENARD, E. 2008. Habits of trees and shrubs in landscape design. Architecture-Civil Engineering-Environment, číslo 4/2008, s. 13-20.
LYR, H., POLSTER, H., FIEDLER, H.-J. 1967. Geholzphysiologie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
Mosbrugger, V., 1990: the Tree Habit in Land Plants.
PAGAN, J., RANDUŠKA, D. 1987. Atlas drevín. 1. Pôvodné dreviny. Obzor, Bratislava, 360 s.
POPADJUK, R.V. a kol. 1994. Vostočnojevropejskije širokolistvennyje lesa. Izdat. Nuaka, Moskva, 364 s.
Raimbault, P., 2006: A basis for morpho-physiological tree assessment.
SEREBRJAKOV, I.G. 1962. Ekologičeskaja morfologija rastenij. Moskva, 379 s.
SEREBRJAKOV, I.G. 1964. Žiznennyje formy vyssich rastenij i ich izučenije. In: Polevaja geobotanika, tom 3, Moskva, s. 146-205.
SLAVÍKOVÁ, Z. 1988. Terminologický slovník. In Květena České socialistickém republiky. 1. svazek, Academia, Praha, s. 130-153.
STEVENS, G.C., PERKINS, A.L. 1992. The branching habit and life histiry of woody plants. Amer. Naturalist, roč. 139, s. 267-275.
SZEGHY, I. 1966. Kľúč na určovanie drevín na území ČSSR divorastúcich a častejšie pestovaných. 2. vydanie, SPN, Bratislava, 196 s.
WILSON, B.F. 2000. Apical control of branch growth and angle in woody plants. Amer. J. Bot., roč. 87, 2000, s. 601-607.

Adresa autora

Prof. RNDr. Pavol Eliáš, CSc., Katedra ekológie, Fakulta európskych štúdií a regionálneho rozvoja, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Mariánska 10, 949 76 Nitra, e-mail: pavol.elias@uniag.sk

PREMENLIVOSŤ LISTOVÝCH ZNAKOV STROMOV V (LESNOM) SPOLOČENSTVE

VARIABILITY OF TREE LEAF TRAITS IN A (FOREST) COMMUNITY

PAVOL ELIÁŠ

ELIÁŠ, P. 2016. Premenlivosť listových znakov stromov v (lesnom) spoločenstve. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 59-64. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Trees are long-lived woody plant species with specific ontogeny. Seedlings, juvenile trees, immature and young (virginal) trees and mature reproductive trees, all individuals of the life stages are living in various light and other microclimatic environments of natural communities.Variations in leaf traits of deciduous tree species were analysed in relation to different age (ontogenic) stages and tree locations in forest communities. The oak-hornbeam forest at Báb, SW Slovakia (former I.B.P. Forest Research Site, now ILTER Site) have been used for the field studies. Specific leaf area (SLA), stomata density (SD), chlorophyll content (ChlC) and some other leaf traits were estimated / determined in dominant tree species (*Acer campestre, Carpinus betulus, Quercus cerris, Q. petraea*) of the forest stand. Leaves from juvenile trees (“seedlings“) in herb layer, immature, young trees (“shrub-size individuals“) in shrub layer and tall mature trees (sun leaves from crown top and shade leaves from crown bottom) in tree layer were sampled and the leaf traits were estimated by methods published by Eliáš (1979). Large significant differences in the leaf traits were found between the tree life stages (including shade and sun leaves of tall adult trees). The leaf traits of the tree-species individuals lies close to the values of the layer in which they grow.

Key words: woody plants, trees, leaf traits, variations, forest stand, vertical profiles

ÚVOD

Dreviny sú dlhožijúce organizmy, ktoré sú počas svojho dlhého života vystavené odlišným životným podmienkam. Semenáčiky a mladé stromčeky (veľkosti krov) rastú často v podraste lesných spoločenstiev v tieni vysokých stromov. Naproti tomu dospelé stromy rastú obvykle v podmienkach plného slnečného osvetlenia. Rôzny vek a veľkosť stromov a z neho vyplývajúce rozdielne postavenie v poraste sa odráža vo vlastnostiach listov a ostatných orgánov stromov (KRAMER & KOZLOWSKI 1979, HINCKLEY a kol. 1978, PALLARDY 2008). Tejto variabilite znakov (listov) sa pri ekofyziologickom výskume dosť často nevenuje primeraná pozornosť, keď sa pokusy a merania uskutočňujú často na semenáčikoch či mladých rastlinách stromov. Prinajmenšom pri interpretácii získaných výsledkov je potrebné tieto skutočnosti zohľadniť (ELIÁŠ 2016).

Veľké rozmery stromov, predovšetkým koruny stromu, spôsobujú nemalý technický a metodický problém (cf. HUBER, LYR a kol. 1967, ELIÁŠ 1978, 1979, HUZULÁK & ELIÁŠ 1975). Pre odber listov z koruny a merania priamo v korune stromu je potrebné lešenie, resp. veža (ELIÁŠ 1989a,b, 1994, 2000).

MATERIÁL A METÓDY

Výskum sa uskutočnil v Bábskom lese pri Nitre (Nitrianska pahorkatina, juhozápadné Slovensko), kde sa nachádza bývalá Výskumná plocha Medzinárodného biologického programu - I.B.P. (ELIÁŠ 2007b), teraz ILTER (ELIÁŠ & OSZLÁNYI 2000, ELIÁŠ a kol. 2016). Nadmorská výška je ca 193 m. Pôdny typ je černozem, vysychajúca počas letného obdobia (HRAŠKO in JURKO & DUDA, 1970, PELÍŠEK in BISKUPSKÝ 1975). Priemerná ročná teplota je 9,7 ^{o}C a priemerný ročný úhrn zrážok 580 mm (SMOLEN

in JURKO & DUDA 1970). KUBÍČEK & BRECHTL (1970) uvádzajú štyri typy lesných spoločenstiev: (a) *Primulo veris-Carpinetum, (b) Carici pilosae-Carpinetum, (c) Aceri-Carpinetum a (d) Corno-Quercetum* (Obr. 1).

Obr. 1 Pohľad z rúbaniska na dubovo-hrabový lesný porast na výskumnej ploche v Bábe pri Nitre. Foto P. Eliáš st.

Pre odber rastlinného materiálu z porastu (poschodia) a merania eko-fyziologických charakteristík listov v korunách stromov bola v lesnom poraste postavená veža (HUZULÁK 1981, ELIÁŠ 1989a,b, ELIÁŠ a kol. 2016). V druhej etape výskumu sa využila 25 metrov vysoká meteorologická veža (ELIÁŠ a kol. 2016, Obr. 2). V stromovom poschodí sa sledovali výslnné listy v hornej časti koruny stromov, tieňové listy v dolnej časti koruny stromov, listy jedincov druhov stromov veľkosti krov v kerovom poschodí a semenáčikov stromov v bylinnom poschodí (ELIÁŠ 1979).

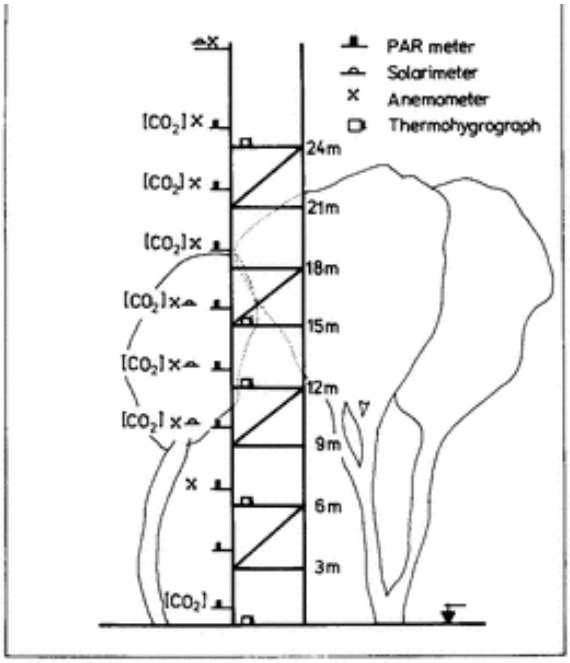


Fig. 1. Schematic diagram of the positioning of instruments for microclimatic measurements in and above the oak-hornbeam forest at Báb

Obr. 2 Schéma meteorologickej veže v lesnom poraste v Bábe s rozmiestnením prístrojov na mikrometeorologické merania (ELIÁŠ a kol. 1989).

Sledovali sme nasledujúce listové znaky stromov: špecifická listová plocha (SLA), hustota a vodivosť prieduchov (odtlačková metóda, porometer), obsah chlorofylov a karotenoidov (acetónové extrakty, chlorofylmeter), intenzita fotosyntézy (gazometricky, Li-Cor), intenzita transpirácie a vodný sýtostný deficit (VSD) listov (cf. ELIÁŠ 1978, 1979, 1980, 1997, ELIÁŠ a kol. 1989, MAREK a kol. 1989 a i.).

VÝSLEDKY

Uvádzame na ilustráciu údaje pre tri listové znaky - dve eko-fyziologické charakteristiky a jednu kvantitatívnu anatomickú charakteristiku listov stromov.

Špecifická listová plocha (SLA) výslnných listov stromov v hornej časti koruny bola výrazne nižšia (pod 20 mm^2 mg^{-1}) ako v tieňových listoch v dolnej časti koruny (Obr. 3). Hodnoty SLA listov druhov stromov v kerovej a bylinnej etáži boli blízke tieňovým listom. Pritom ale podobné hodnotám SLA ostatným druhom v kerovom poschodí a v bylinnom poschodí.

Vodný sýtostný deficit listov (VSD) stromov bol všeobecne najnižší, pričom hodnoty VSD tieňových listov boli nižšie ako výslnných listov (Obr. 4). Výnimkou boli len listy *Carpinus betulus*. Hodnoty VSD listov stromov boli najnižšie medzi druhmi aj v kerovom a bylinnom poschodí.

Hustota prieduchov v listoch stromov preukazovala značnú premenlivosť medzi druhmi, ale aj v rámci druhu (Obr. 5). Vyššia hustota prieduchov bola však vo výslnných listoch ako v tieňových.

Výsledky sú podrobnejšie prezentované v publikovaných prácach (cf. ELIÁŠ 1978, 1979, 1980, 1997, ELIÁŠ a kol. 1989, MAREK a kol. 1989 a i.).

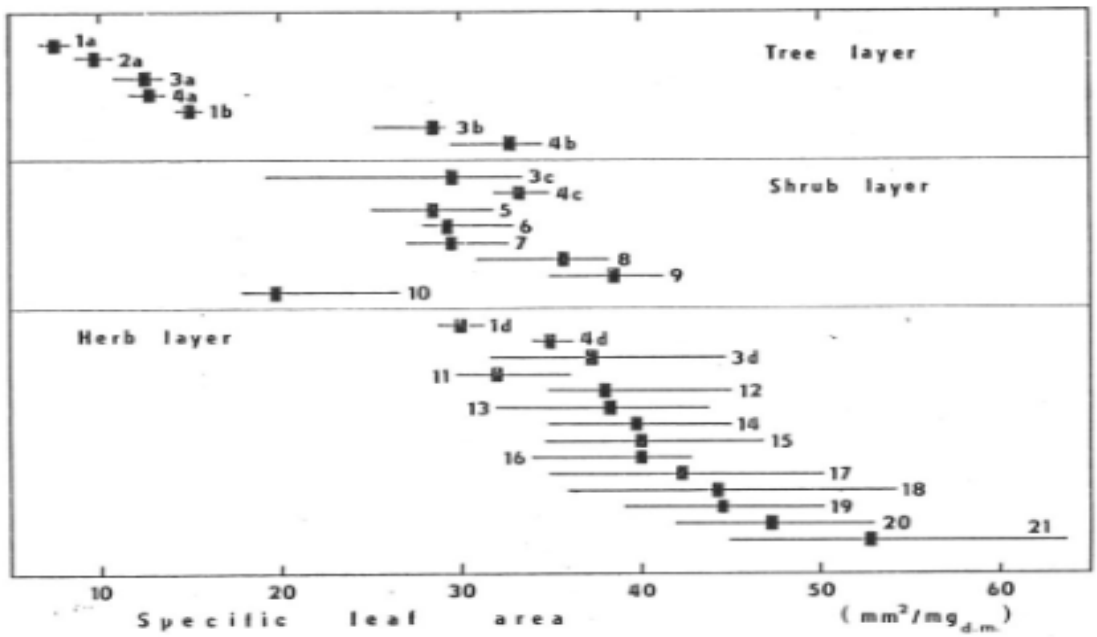


Fig. 4. Specific leaf area of plants growing in the oak-hornbeam forest near Báb. — Trees: see Fig. 3. Shrubs: 5 *Euonymus europea*, 6 *Crataegus laevigata*, 7 *Ligustrum vulgare*, 8 *Euonymus verrucosa*, 9 *Cornus mas*, 10 *Hedera helix*. Herbs: 11 *Pulmonaria officinalis*, 12 *Mercurialis perennis*; 13 *Geum urbanum*, 14 *Sanicula europaea*, 15 *Viola mirabilis*, 16 *Fragaria moschata*, 17 *Glechoma hirsuta*, 18 *Galeobdolon luteum*, 19 *Convallaria majalis*, 20 *Polygonatum latifolium*, 21 *Galium odoratum*.

Obr. 3 Premenlivosť hodnôt špecifickej listovej plochy (SLA) v dubovo-hrabovom lese v Bábe pri Nitre (ELIÁŠ 1979a). Údaje pre jednotlivé druhy (priemerná hodnota a rozpätie hodnôt) sú znázornené podľa poschodí (stromová, kerová a bylinná etáž). Čísla označujú jednotlivé druhy. Stromy: 1 – *Acer campestre*, 2 – *Quercus cerris*, 3 – *Carpinus bdetulus*, a – výslnné listy, b – tieňové listy, c- jedince veľkosti krov, d – semenáčiky

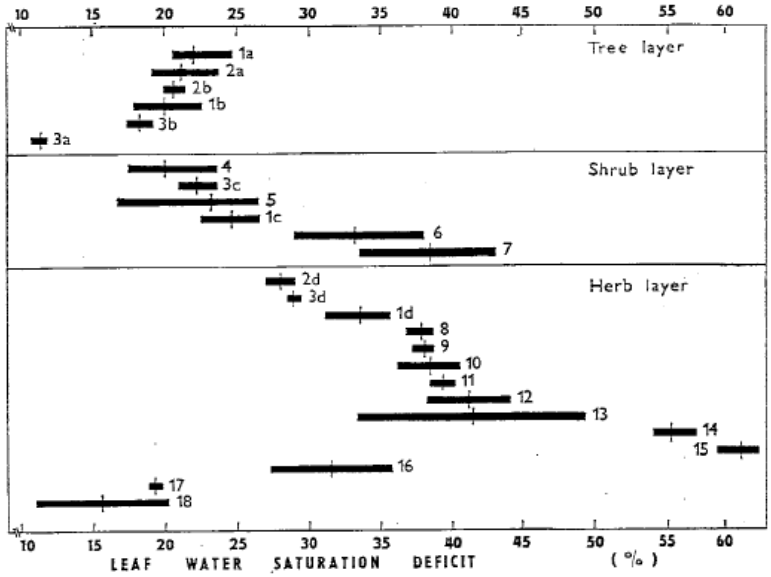


Fig. 4. — Afternoon pattern of water saturation deficits of leaves of 18 forest plant species o oak-hornbeam forest at Báb in drought summer period (July 6, 1976). Leaf-disc method, satuf ration time 6 hours. — Adult trees: 1 *Acer campestre*, 2 *Quercus cerris*, 3 *Carpinus betulus*,- a — sun leaves from crown top, b — shade leaves from crown bottom. Shrub layer species: 1c *Acer campestre*, 3c *Carpinum betulus*, 4 *Cornus mas*, 5 *Ligustrum vulgare*, 6 *Crataegus oxyacantha*, 7 *Euonymus verrucosa*. Herb layer species: 1d *Acer campestre* seedlings, 2d *Quercus cerris* seedlings, 3d *Carpinus betulus* seedlings, 8 *Viola mirabilis*, 9 *Pulmonaria officinalis*, 10 *Geum urbanum*, 11 *Mercurialis perennis*, 12 *Fragaria moschata*, 13 *Galeobdolon luteum*, 14 *Glechoma hirsuta*, 15 *Asperula odorata*, 16 *Sanicula europea*, 17 *Polygonatum latifolium*, 18 *Hedera helix*.

Obr. 4 Premenlivosť hodnôt vodného sýtostného deficitu listov (VSD) v dubovo-hrabovom lese v Bábe pri Nitre (ELIÁŠ 1979a). Údaje pre jednotlivé druhy (priemerná hodnota a rozpätie hodnôt) sú znázornené podľa poschodí (stromová, kerová a bylinná etáž). Čísla označujú jednotlivé druhy. Stromy: 1 – *Acer campestre*, 2 – *Quercus cerris*, 3 – *Carpinus bdetulus*, a – výslnné listy, b – tieňové listy, c- jedince veľkosti krov, d – semenáčiky.

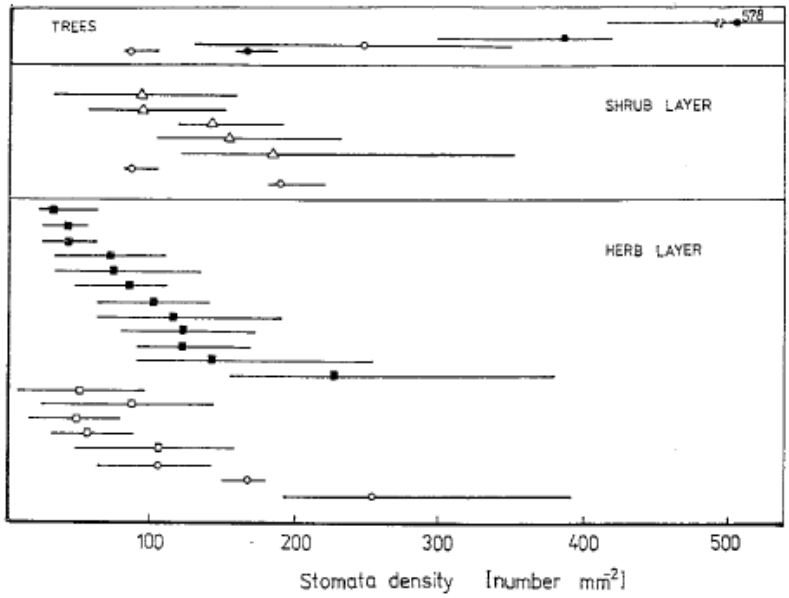


Fig. 4. Variations in stomata density of plants forming an oak-hornbeam forest in SW Slovakia. Data from ELIÁŠ (1979) for sun and shade leaves of trees (circles), shrubs (triangles) and herbaceous species (quadrats) were used.

Obr. 5 Premenlivosť hustoty prieduchov rastlín v dubovo-hrabovom lese v Bábe pri Nitre (ELIÁŠ 1980). Údaje pre jednotlivé druhy (priemerná hodnota a rozpätie hodnôt) sú znázornené podľa poschodí (stromová, kerová a bylinná etáž).

DISKUSIA

Premenlivosť listových znakov stromov v poraste a v korune stromu určuje celý rad faktorov, ktoré nemajú rovnakú váhu (ELIÁŠ 1979, 1992). Sú to spôsob rastu (solitér, skupina stromov, porast), vek stromu (vekové štádium), architektúra stromu, štruktúra porastu, postavenie stromu v poraste (Kraftsove stromové triedy, svetliny, okraj porastu), hustota porastu ai. Tieto faktory určujú svetelné pomery v korune stromu a v poraste a tým aj fotosyntézu, dýchanie, rast listov atď. (LYR a kol. 1967, KRAMER & KOZLOWSKI 1979, HINCKLEY a kol. 1978, PALLARDY 2008).

ZÁVERY

Listové znaky stromov v poraste sa menia v závislosti od umiestnenia v poraste (vertikálne poschodia, okraj lesného porastu), postavenia v korune stromu (výslnná a tienená časť koruny, obvodová a vnútorná časť koruny) a na konáriku bežného roka. Odrážajú vplyv veku rastliny a listu a mikroklimatických podmienok rastu. Túto premenlivosť listových znakov je potrebné zohľadniť pri ekofyziologickom výskumu stromov.

Pri analýze variability listov v korune stromu, resp. v poraste je potrebné uvažovať nasledujúce aspekty: výškové úrovne, svetové strany, časť konára, dlhé a krátke konáre, postavenie na konáriku.

POĎAKOVANIE

Príspevok bol vypracovaný a prezentovaný s podporou výskumného projektu VEGA č. 1/0813/14, ktorý riešime na Katedre ekológie FEŠRR SPU v Nitre.

LITERATÚRA

ELIÁŠ, P. 1978. Water deficit of plants in a oak-hornbeam forest. In Preslia, roč. 50, s. 173-188.

ELIÁŠ, P. 1979A. Some ecophysiological features of plants in an oak-hornbeam forest. Folia Geobot. Phytotax., roč. 14, s. 29-42.

ELIÁŠ, P. 1979B. Správanie sa prieduchov dospelých stromov v lesnom poraste. Kandidátska dizertačná práca. Ústav experimentálnej biológie a ekológie SAV, Bratislava, s.

ELIÁŠ, P. 1980. Stomata in forest communities: density, size and conductance. Acta Univ. Carolinae, Ser. Biologica, roč. 31, s. 27-41.

ELIÁŠ, P. 1989A. Ekofyziologický výskum drevín v lesnom poraste: (na príklade dubovo-hrabového lesa v Bábe pri Nitre). In V. dny rostlinné fyziologie. Praha: Československá botanická společnost, 1989.

ELIÁŠ, P. 1989b. K organizácii mikroklimatologických meraní v lesných porastoch. In Rozvoj bioklimatologie a uplatnění jejích poznatků v socialistické společenské praxi : 10. čs. bioklimatologická konference, Brno 6.-8. září 1988, sborník referátů a diskusních příspěvků. [Sv.] 1. Praha: Československá bioklim. spol. při ČSAV ; 1989, s. 400-402.

ELIÁŠ, P. 1990. Effects of the canopy position on shoots and leaves in various trees of an oak-hornbeam forest. In Biológia, roč. 45, s. 31-42.

ELIÁŠ, P. 1992. Variabilita veľkosti listov a stanovenie listovej plochy stromu a porastu. In: Metodológia v produkčnej ekológii, zborník z odborného seminára. Arborétum Mlyňany-Ústav dendrobiológie SAV, Vieska nad Žitavou, 20.5.2016, p. 137-139.

ELIAS, P. 1994. Comparative analysis of leaf features in plant species of an oak-hornbeam forest. In: Tallis, J.H., Norman, H.J., Begon, R.A. (eds.), Progress to meet the Challenge of Environmental Change. Proceedings of the VI. International Congress of Ecology, 21 to 26 August 1994, Manchester, s. 62.

ELIÁŠ, P. 2000. Eco-physiological and/or functional-ecological studies of plants in an oak-hornbean forest at Báb (I.B.P. Forest Research Site). In *Long term ecological research.* Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, Slovenská ekologická spoločnosť a Ústav krajinnej ekológie SAV v Nitre, 2000, s. 17.

ELIÁŠ, P. 2007a. Funkčná diverzita rastlín lesného spoločenstva. In KRIŽOVÁ, E. & UJHÁZY, K. (eds.), *Dynamika, stabilita a diverzita lesných ekosystémov.* Zvolen: Technická univerzita Zvolen, 2007, s. 175-181.

ELIÁŠ, P. 2007B. Výskumný projekt (Báb): 1967-2007. In Dynamika, stabilita a diverzita lesných ekosystémov. Zvolen: Technická univerzita Zvolen, 2007, ISBN 978-80-228-1821-6.

ELIÁŠ, P. 2016. Leaf traits of forest trees in a plant community: age and micro-environment effects. In: Plant Biology Europe, ESPO/FESPB 2016 Congress, Prague, June 26-30, 2016 Book of Abstracts, URL: http://www.europlantbiology2016.org/programme/abstracts/.

ELIÁŠ, P., KRATOCHVILOVA, I., JANOUS, D., MAREK, M., MASAROVICOVA, E. 1989. Stand microclimate and physiological activity of tree leaves in an oak–hornbeam forest. I. Stand microclimate. Trees, roč. 4, s. 227–233.

ELIÁŠ, P., MASAROVIČOVÁ, E. 1980. Chlorophyl content in leaves of plants in an oak - hornbeam forest 3. Three species. In *Photosynthetica, roč.* 14, s. 604-610.

ELIÁŠ, P., OSZLÁNYI, J. 2000. Long term ecological research in Slovakia. In: The International Long Term Ecological Research Network 2000. University of New Mexico, Department of Biology, p. 48 – 50.

ELIÁŠ, P. A KOL. 2016. Dubovo-hrabový les v lokalite Báb - bývalá výskumná plocha Medzinárodného biologického programu na Slovensku. Životné prostredie, roč. 50, s. 10-17.

HINCKLEY, T. M., LASSOIE, J. F., RUNNING, S.W. *1978*. Temporal and spatial variations in the water status of *forest trees*. Forest Science, roč. 24, s. 1–72.

HUZULÁK, J. 1981. Ekologicko-fyziologická štúdia vodného režimu lesných drevín. Biologické práce, roč. 27, 5, s. 3 – 142.

HUZULÁK, J., ELIÁŠ, P. 1975. Within-crown pattern of ecophysiological features in leaves of *Acer campestre* and *Carpinus betulus*. Folia geobot. phytotax., roč. 10, s. 337-350.

KRAMER, P.J., KOZLOWSKI, T.T. 1979. Physiology of Woody Plants. Academic Press, Inc. New Yourk.

KUBÍČEK, F. & BRECHTL, J. 1970. Charakteristika skupín lesných typov výskumnej plochy v Bábe pri Nitre. *Biológia (Bratislava)*, 25, p. 27−38.

LYR, H., POLSTER, H., FIEDLER, H.-J. 1967. Geholzphysiologie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

MAREK, M., MASAROVICOVA, E., KRATOCHVILOVA, I., ELIAS, P., JANOUS, D. 1989. Stand microclimate and physiological activity of tree leaves in an oak–hornbeam forest. II. Leaf photosynthetic activity. Trees, roč. 4, s. 234–240.

PALLARDY, S.G. 2008. Physiology of Woody Plants. Third Edition. Elsevier & Academic Press, Amsterdam.

Adresa autora

Prof. RNDr. Pavol Eliáš, CSc., Katedra ekológie, Fakulta európskych štúdií a regionálneho rozvoja, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Mariánska 10, 949 76 Nitra, e-mail: pavol.elias@uniag.sk

CENOLOGICKÉ NÁROKY SKALNÍKA MATRANSKÉHO (*COTONEATER MATRENSIS*) V NPR ZOBORSKÁ LESOSTEP (POHORIE TRÍBEČ)

COENOTIC AFINITY OF *COTONEASTER MATRENSIS* IN THE ZOBORSKÁ LESOSTEP NATIONAL NATURE RESERVE (TRIBEČ MTS.)

PAVOL ELIÁŠ jun. – ĽUBA ĎURIŠOVÁ – TIBOR BARANEC

ELIÁŠ, P. jun. – ĎURIŠOVÁ, Ľ. – BARANEC, T. 2016. Cenologické nároky skalníka matranského (*Cotoneater matrensis*) v npr Zoborská lesostep (pohorie Tríbeč). In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 65-70. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
In 2015, we studied shrub vegetation with the presence of *Cotoneaster matrensis* in the Zoborská lesostep National Nature Reserve (Tribeč Mts.). Phytosociological relevés were sampled according to the Zürich-Montpellier approach using the adapted nine-grade Braun-Blanquet's scale. Analysed stands were characterized by a relatively high diversity of shrubby plants, we recorded a 8 – 9 taxa per relevé. *Cerasus mahaleb* dominated at all relevé plots and it was accompanied most often by *Cornus mas*, *Fraxinus ornus*, *Rosa canina* agg. and *Cotoneaaster matrensis*, as well. The herbaceous layer E_1 reached also high species diversity, we recorded 46 taxa of vascular plants per plot in average (maximum 55 taxa in relevé 1). This vegetation of xerophilous shrubs belongs to the class *Rhamno-Prunetea*, ordo *Prunetalia spinosae*, alliance *Berberidion vulgaris* (syn. *Prunion spinosae*) and association *Violo hirtae-Cornetum maris*, which is a new plant association to Slovakia. We expect the presence of this vegetation unit also in other locations in Slovakia and therefore further field research is needed.

Key words: *Cotoneaster*, shruby vegetation, *Rhamno-Prunetea*, Tribeč Mts.

ÚVOD

Rod skalník (*Cotoneaster* Medic.) je na Slovensku zastúpený štyrmi autochtónnymi druhmi (MARHOLD et al. 1998), jedným z nich je i *Cotoneaster matrensis* Domokos [syn. *C. alaunicus* Golitsin, *Cotoneaster niger* subsp. *matrensis* (Domokos) Hrabětová] (obr. 1) patriaci medzi vzácnejšie druhy s nedostatočne známym rozšírením a ohrozením (ELIÁŠ et al. 2015). Tak ako ostatní zástupcovia rodu i tento taxón je viazaný na výslnné skalnaté biotopy, pričom sa uvádza najmä v spoločenstvách zväzov *Seslerio-Festucion duriusculae* a *Prunion spinosae* (BARANEC 1992). Treba však konštatovať, že presnejšie údaje o jeho cenotických väzbách chýbajú, čo zrejme súvisí i s doposiaľ neuspokojivo vyriešeným taxonomickým statusom (ĎURIŠOVÁ et al. 2015). Predkladaný príspevok má preto za cieľ aspoň čiastočne ozrejmiť fytocenologické nároky uvedeného taxónu na juhozápadnom Slovensku.

MATERIÁL A METÓDY

Výskum prebiehal počas vegetačnej sezóny roka 2016 v Národnej prírodnej rezervácii Zoborská lesostep (obr. 2). Rezervácia bola vyhlásená v roku 1952 na výmere 26 ha (MERAVÝ 1991). Leží v pohorí Tribeč, v jednej z jeho piatich samostatných častí označovanej ako skupina Zobora. Táto skupina predstavuje jeho najjužnejšiu a najvýznamnejšiu časť. Zobor ako orografický celok je súčasťou vnútrokarpatských predhorí, pričom je vysunutý ďaleko do Podunajskej nížiny (MAZÚR, LUKNIŠ 1986).

Z fytogeografického hľadiska patrí skupina Zobora do obvodu predkarpatskej kveteny (*Praecarpaticum*) v rámci oblasti západokarpatskej kveteny (*Carpaticum occidentale*). Význačné

zložky predkarpatskej flóry sa uplatňujú najmä v zložení bylinnej etáže lesných a lemových spoločenstiev. Naopak, výskyt mnohých elementov panónskej flóry je sústredený na skalné a trávnaté stepi (ŘEHOŘEK et al. 2007).

Nomenklatúra taxónov je uvedená podľa Zoznamu nižších a vyšších rastlín Slovenska (MARHOLD et al. 1998), nomenklatúra syntaxónov podľa práce JAROLÍMEK a ŠIBÍK (2008), ak sa v uvedenej práci vegetačná jednotka nenachádza, uvádzame ju i s menami autorov opisu. Fytocenologické zápisy boli snímkované metódami zürišsko-montpellierskej školy, s použitím upravenej 9-člennej stupnice abundancie a dominancie (BARKMAN et al. 1964). V zápisoch uvádzame číslo poľa stredoeurópskej mapovacej siete (JASIČOVÁ, ZAHRADNÍKOVÁ 1976), zemepisné súradnice zápisov a nadmorská výška boli získané pomocou prístroja Garmin GPSmap 60CS.

Obr. 1 Detail raméty skalníka matranského (*Cotoneaster matrensis* Domokos) v NPR Zoborská lesostep (foto P. Eliáš jun.)
Fig. 1 Detail of *Cotoneaster matrensis* Domokos rameta in the Zoborská lesostep National Nature Reserve (photo P. Eliáš jun.).

Obr. 2 Lesné lemy s krovitou vegetáciou zväzu *Berberidion* v NPR Zoborská lesostep (foto P. Eliáš jun.).
Fig. 2 Forest edges with shrub vegetation of the alliance *Berberidion* in the Zoborská lesostep National Nature Reserve (photo P. Eliáš jun.).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Skalník matranský sme v NPR Zoborská lesostep zaznamenali v porastoch lesných okrajov a lesostepných enkláv zvyčajne na juhozápadných, resp. západných svahoch. To potvrdzuje publikované údaje o svetlo- a teplomilnosti tohto taxónu (BROWICZ 1959; BARANEC 1992; BENČAŤOVÁ 2001). Cenotické pomery druhu na lokalite uvádzame v nasledujúcich zápisoch:

Zápis 1. Tribeč, Nitra, NPR Zoborská lesostep, okraj lesa, plocha 15 × 3 m, exp. JZ, sklon 30°, 370 m n. m., 7674a, 48°20'51,2" s. š., 18°05'40,6" v. d., $E_{celk.}$ 80%, E_3 20%, E_2 60%, E_1 60%, 27. 5. 2016, P. Eliáš jun., Ľ. Ďurišová.
E_3: *Quercus pubescens* 2b.
E_2: *Cerasus mahaleb* 3, *Rosa canina* agg. 2b, *Euonymus verrucosus* 1, *Fraxinus ornus* 1, *Rhamnus cathartica* 1, *Viburnum lantana* 1, *Cotoneaster matrensis* +, *Ligustrum vulgare* +.
E_1: *Cyanus triumfettii* 2a, *Galium aparine* 2a, *Geranium sanguineum* 2a, *Teucrium chamaedrys* 2a, *Anthriscus cerefolium* 1, *Bromus sterilis* 1, *Festuca pallens* 1, *F. valesiaca* 1, *Fragaria vesca* 1, *Galium glaucum* 1, *Geranium columbinum* 1, *Glechoma hirsuta* 1, *Medicago minima* 1, *Melica uniflora* 1, *Polygonatum odoratum* 1, *Valerianella locusta* 1, *Vicia sativa* 1, *Acosta rhenana* +, *Allium flavum* +, *Alyssum alyssoides* +, *Arenaria serpyllifolia* 1, *Artemisia campestris* +, *Bromus squarrosus* +, *Cruciata pedemontana* +, *Dactylis polygama* +, *Dianthus pontederae* +, *Echium vulgare* +, *Erysimum odoratum* +, *Galium verum* +, *Geranium lucidum* +, *Geum urbanum* +, *Helianthemum grandiflorum* +, *Hylotelephium maximum* +, *Hypericum perforatum* +, *Lamium purpureum* +, *Melica ciliata* +, *Myosotis ramosissima* +, *Phlomis tuberosa* +, *Pilosella bauhinii* +, *Phleum phleoides* +, *Poa bulbosa* +, *Potentilla arenaria* +, *Salvia pratensis* +, *Sanguisorba minor* +, *Sedum album* +, *S. sexangulare* +, *Stachys recta* +, *Thymus praecox* +, *Tithymalus cyparissias* +, *T. epithymoides* +, *Veronica teucrium* +, *Vicia hirsuta* +, *Viola arvensis* +, *V.* cf. *reichenbachiana* +, *Hesperis tristis* r.

Zápis 2. Tribeč, Nitra, NPR Zoborská lesostep, okraj lesa, plocha 15 × 4 m, exp. JZ, sklon 30°, 384 m n. m., 7674a, 48°20'53,4" s. š., 18°05'41,2" v. d., $E_{celk.}$ 70%, E_3 20%, E_2 60%, E_1 60%, 27. 5. 2016, P. Eliáš jun., Ľ. Ďurišová.
E_3: *Fraxinus excelsior* 2a, *Quercus pubescens* 1, *Sorbus aria* 1.
E_2: *Cerasus mahaleb* 2b, *Cornus mas* 2a, *Cotoneaster matrensis* 2a, *Crataegus monogyna* 1, *Fraxinus ornus* 1, *Ligustrum vulgare* 1, *Rosa canina* agg. 1, *Rhamnus cathartica* +.
E_1: *Geranium sanguineum* 2b, *Brachypodium pinnatum* 2a, *Cyanus triumfettii* 2a, *Glechoma hirsuta* 2a, *Teucrium chamaedrys* 2a, *Aconitum anthora* 1, *Anthriscus cerefolium* 1, *Dictamnus albus* 1, *Elytrigia intermedia* 1, *Festuca pallens* 1, *Galium aparine* 1, *G. glaucum* 1, *Geranium lucidum* 1, *Polygonatum odoratum* 1, *Sanguisorba minor* 1, *Veronica chamaedrys* 1, *Viola arvensis* 1, *Acinos arvensis* +, *Acosta rhenana* +, *Allium flavum* +, *Anthericum ramosum* +, *Anthyllis vulneraria* +, *Arenaria serpyllifolia* +, *Asplenium trichomanes* +, *Bromus squarrosus* +, *Cerastium brachypetalum* +, *Erysimum odoratum* +, *Geranium columbinum* +, *Geum urbanum* +, *Helianthemum grandiflorum* +, *Hylotelephium maximum* +, *Iris pumila* +, *Melica ciliata* +, *Potentilla arenaria* +, *Salvia pratensis* +, *Sedum album* +, *Stachys recta* +, *Stellaria media* +, *Thesium linophyllon* +, *Thymus praecox* +, *Tithymalus cyparissias* +, *Valerianella locusta* +, *Veronica teucrium* +, *Vincetoxicum hirundinaria* +, *Hesperis tristis* r, *Thlaspi jankae* r.

Zápis 3. Tribeč, Nitra, NPR Zoborská lesostep, okraj lesa, plocha 18 × 4 m, exp. Z, sklon 45°, 406 m n. m., 7674a, 48°20'56,9" s. š., 18°05'44,0" v. d., $E_{celk.}$ 70%, E_3 5%, E_2 60%, E_1 50%, 27. 5. 2016, P. Eliáš jun., Ľ. Ďurišová.
E_3: *Tilia platyphyllos* 1.
E_2: *Fraxinus ornus* 2b, *Cerasus mahaleb* 2b, *Cornus mas* 2a, *Cotoneaster matrensis* 2a, *Rosa canina* agg. 1, *Crataegus monogyna* 1, *Acer campestre* +, *Viburnum lantana* +, *Ligustrum vulgare* +.
E_1: *Geranium sanguineum* 2b, *Aconitum anthora* 2a, *Galium aparine* 2a, *Geranium lucidum* 2a, *Glechoma hirsuta* 2a, *Fragaria vesca* 2a, *Teucrium chamaedrys* 2a, *Asplenium trichomanes* 1,

Brachypodium sylvaticum 1*, Cyanus triumfettii* 1, *F. valesiaca* 1*, Filipendula vulgaris* 1, *Galium glaucum* 1, *Melica uniflora* 1, *Phleum phleoides* 1, *Salvia pratensis* 1, *Stellaria media* 1, *Viola arvensis* 1, *Anthriscus cerefolium* +, *Dianthus pontederae* +, *Erysimum odoratum* +, *Geranium columbinum* +, *Geum urbanum* +, *Helianthemum grandiflorum* +, *Hylotelephium maximum* +, *Mycelis muralis* +, *Pilosella bauhinii* +, *Potentilla arenaria* +, *Sanguisorba minor* +, *Sedum album* +, *S. sexangulare* +, *Stachys recta* +, *Thymus praecox* +, *Tithymalus epithymoides* +, *Valerianella locusta* +, *Veronica teucrium* +, *Vicia* sp. +, *Vincetoxicum hirundinaria* +.

Zápis 4. Tribeč, Nitra, NPR Zoborská lesostep, lesná enkláva v hornej časti rezervácie, plocha 14 × 4 m, exp. JZ, sklon 10°, 420 m n. m., 7674a, 48°20'57,5" s. š., 18°05'48,0" v. d., $E_{celk.}$ 80%, E_3 5%, E_2 60%, E_1 70%, 27. 5. 2016, P. Eliáš jun., Ľ. Ďurišová.
E_3: *Quercus pubescens* 1.
E_2: *Cerasus mahaleb* 2b, *Rosa canina* agg. 2b, *Cornus mas* 2a, *Fraxinus ornus* 2a, *Ligustrum vulgare* 2a, *Crataegus monogyna* 1, *Euonymus verrucosus* 1, *Viburnum lantana* 1, *Cotoneaster matrensis* +.
E_1: *Geranium sanguineum* 2b, *Brachypodium sylvaticum* 2a*, Filipendula vulgaris* 2a, *Fragaria vesca* 2a, *Galium aparine* 2a, *G. glaucum* 2a, *Teucrium chamaedrys* 2a, *Anthriscus cerefolium* 1, *Elytrigia intermedia* 1, *F. valesiaca* 1*, Geranium columbinum* 1, *Lamium maculatum* 1, *Melica uniflora* 1, *Phlomis tuberosa* 1, *Veronica chamaedrys* 1, *Vicia sativa* 1, *Aconitum anthora* +, *Cerastium holosteoides* +, *Cyanus triumfettii* +, *Dianthus pontederae* +, *Dictamnus albus* +, *Erysimum odoratum* +, *Fallopia convolvulus* +, *Geum urbanum* +, *Hedera helix* +, *Lamium purpureum* +, *Leopoldia comosa* +, *Linaria genistifolia* +, *Lithospermum arvense* +, *Melica ciliata* +, *Mycelis muralis* +, *Ornithogalum umbellatum* +, *Phleum phleoides* +, *Potentilla arenaria* +, *Pyrethrum corymbosum* +, *Salvia pratensis* +, *Sedum album* +, *S. sexangulare* +, *Sorbus torminalis* juv. +, *Stachys recta* +, *Stellaria media* +, *Thalictrum minus* +, *Thlaspi perfoliatum* +, *Thymus pannonicus* +, *Tithymalus cyparissias* +, *T. epithymoides* +, *Trifolium alpestre* +, *Viola arvensis* +, *V.* cf. *reichenbachiana* +, *Vincetoxicum hirundinaria* +.

Z fytocenologických zápisov je zrejmé, že ide o druhovo bohaté lesné lemy, kde v krovinovej etáži E_2 bolo zaznamenaných 8 až 9 taxónov drevín, pričom dominoval druh *Cerasus mahaleb* s pokryvnosťou až do 50% (zápis 1), zvyčajne však okolo 15 – 25% (zápisy 2, 3, 4). Spoludominantami boli druhy *Cornus mas* (pokryvnosť do 15%, zápisy 2, 3, 4), *Fraxinus ornus* (pokryvnosť 5 – 15%, zápisy 3 a 4), *Rosa canina* agg. (pokryvnosť do 25%, zápisy 1 a 4) i *Cotoneaaster matrensis* (pokryvnosť do 15%, zápisy 2 a 3). V stromovej etáži E_3 sme zaznamenali celkovo štyri druhy, najčastejšie zastúpeným bol dub plstnatý (zápisy 1, 2 a 4). Veľkou druhovou diverzitou sa vyznačovala i bylinná etáž E_1 – priemerne sme v nej zaznamenali 46 druhov, maximálne však až 55 (zápis 1). Najväčšie pokryvnosti dosahovali druhy *Geranium sanguineum* (5 – 25%) a *Veronica teucrium* (5 – 15%). Prítomnosť týchto taxónov poukazuje na kontakt nami skúmanej krovinnej vegetácie s teplomilnými lemovými spoločenstvami zväzu *Geranion sanguinei* reprezentovaných na lokalite predovšetkým asociáciou *Trifolio alpestris-Geranietum sanguinei* a pravdepodobne i *Geranio sanguinei-Dictamnetum albae*. V týchto porastoch sa však druh *Cotoneaster matrensis* zvyčajne nevyskytuje i keď sa tu niekedy uvádza (napr. ĎURIŠOVÁ et al. 2015).

Z fytocenologického hľadiska môžeme skúmané porasty s prítomnosťou skalníka matranského v NPR Zoborská lesostep zaradiť do vegetácie mezofilných a xerofilných krovín triedy *Rhamno-Prunetea*, radu *Prunetalia spinosae* a zväzu *Berberidion vulgaris* (syn. *Prunion spinosae*). Druhové zloženie najlepšie zodpovedá asociácii *Violo hirtae-Cornetum maris* Hilbig et Klotz in Rauschert 1990 (syn. *Prunetum mahaleb* Nevole 1931), ktorá sa zo Slovenska doposiaľ neuvádza (napr. VALACHOVIČ 2007; JAROLÍMEK, ŠÍBÍK 2008). Podľa SÁDLA a CHYTRÉHO (2013) je to teplomilné a suchomilné spoločenstvo s dominanciou vysokých netŕnitých krovín – prevládajú v ňom predovšetkým druhy *Cornus mas* a *Cerasus mahaleb*, ktoré s menšou pokryvnosťou sprevádzajú napr. *Viburnum lantana* a *Euonymus verrucosus*. V Českej republike väčšina porastov osídľuje svahy juhovýchodné, južné až západné na vápencových podkladoch alebo na metamorfovaných horninách s

podielom karbonátových vložiek. Líniové porasty tohto spoločenstva sa vytvárajú na okrajoch teplomilných dúbrav a prechádzajú do xerotermných travinno-bylinných spoločenstiev zväzov *Alysso alyssoidis-Sedion*, *Festucion valesiacae* alebo do lemových spoločenstiev zväzu *Geranion sanguinei* (SÁDLO, CHYTRÝ 2013). Všetky vyššie uvedené údaje korešpondujú s charakterom nami zaznamenaných porastov.

Porasty s dominanciou druhu *Cerasus mahaleb* (a tiež výskytom druhu *Cotoneaster matrensis*) sú u nás tradične zaraďované do rôznych teplomilných asociácií zväzov *Berberidion vulgaris* (VALACHOVIČ 2002) alebo *Prunion fruticosae* (JAROLÍMEK, ŠIBÍK 2008). V prípade prvého zväzu však v týchto teplomilných asociáciách (napr. *Ligustro-Prunetum*, *Crataego-Prunetum dasyphylae*) tvoria dominanty predovšetkým mohutnejšie pichľavé krovité taxóny *Prunus spinosa* agg., *Crataegus monogyna* agg. a *Crataegus laevigata* agg. a v prípade druhého zasa vzrastom nízke kry *Amygdalus nana* (asociácia *Prunetum tenellae*), *Cerasus fruticosa* (asociácia *Prunetum fruticosae*), *Rosa pimpinellifolia* (asociácia *Rosetum pimpinellifoliae*) či *Spiraea media* (asociácia *Waldsteinio geoidis-Spireetum mediae*). Domnievame sa, že vyčlenenie samostatnej asociácie *Violo hirtae-Cornetum maris* s dominanciou vysokých netŕnitých krovín v rámci zväzu *Berberidion* je opodstatnené a vyžaduje si na Slovensku ďalšie štúdium. Vzhľadom na rozšírenie druhu *Cerasus mahaleb* u nás (MARHOLD, WÓJCICKI 1992) sa výskyt tejto vegetačnej jednotky dá očakávať i v iných fytogeografických oblastiach Slovenska – najmä na Devínskej Kobyle, v Malých Karpatoch, Považskom Inovci, Burde, Ipeľsko-rimavskej brázde, v Slovenskom stredohorí a Slovenskom krase.

ZÁVER

Štúdium xerotermných krovitých porastov s prítomnosťou druhu *Cotoneaster matrensis* v NPR Zoborské vrchy (Tríbeč) ukazuje, že tieto porasty sa vyznačujú pomerne vysokou diverzitou krovitých drevín – zaznamenali sme 8 až 9 taxónov v zápise. Na všetkých plochách dominoval druh *Cerasus mahaleb* najčastejšie sprevádzaný taxónmi *Cornus mas*, *Fraxinus ornus*, *Rosa canina* agg. a *Cotoneaster matrensis*. Veľkou druhovou diverzitou sa vyznačovala i bylinná etáž E_1, priemerne sme v nej zaznamenali 46 druhov cievnatých rastlín (maximálne až 55). Táto vegetácia xerofilných krovín patrí do triedy *Rhamno-Prunetea*, radu *Prunetalia spinosae*, zväzu *Berberidion vulgaris* (syn. *Prunion spinosae*) a asociácie *Violo hirtae-Cornetum maris*, ktorá sa zo Slovenska doposiaľ neuvádzala. Prítomnosť tejto vegetačnej jednotky očakávame i na ďalších lokalitách na Slovensku a vyžaduje si preto ďalší výskum.

POĎAKOVANIE

Príspevok vznikol s finančnou podporou projektov VEGA č. 1/ 0731/14, č. 1/0083/16 a projektu č. 26220220180 „AgroBioTech“.

LITERATÚRA

BARANEC, T. 1992. *Cotoneaster* Medicus. In: BERTOVÁ, L. (ed.) Flóra Slovenska IV/3. Bratislava: Veda, s. 452-462.

BARKMAN, J. J., DOING, H., SEGAL, S. 1964. Kritische Bemerkungen und Vorschläge zur quantitativen Vegetationsanalyse. In: Acta Botanica Neerlandica, roč. 13, 1964, s. 394-419.

BENČAŤOVÁ, B. 2001. Cievnaté rastliny Pienin. Zvolen: Arbora Publishers, 2001, 177 s. ISBN 80-967088-0-5

BROWICZ, K. 1959. Gatunki z rodzaju *Cotoneaster* Ehrh. w Polsce. Kórnik: Arborétum Kórnickie, 1959, 108 s.

ĎURIŠOVÁ, Ľ., ŽABKA, M., BARANEC, T. 2015. Štruktúra lemového spoločenstva s *Cotonaester matrensis* Domokos v Zoborských vrchoch. In: LUKÁČIK, I., SARVAŠOVÁ, I. (eds.) Dendrológia strednej Európy. Zvolen: Technická univerzita, 2015, s. 135-141. ISBN 978-80-228-2777-5

ELIÁŠ, P. jun., DÍTĚ, D., KLIMENT, J., HRIVNÁK, R., FERÁKOVÁ, V. 2015: Red list of ferns and flowering plants of Slovakia, 5th edition (October 2014). In: Biologia, roč.. 70, 2015, s. 218-228.

JAROLÍMEK, I., ŠIBÍK, J. (eds.) 2008. Diagnostic, constant and dominant species of the higher vegetation units of Slovakia. Bratislava: Veda, 332 s. ISBN 978–80–224–1024–3

JASIČOVÁ, M., ZAHRADNÍKOVÁ, K. 1976. Organizácia a metodika mapovania rozšírenia rastlinných druhov v západnej tretine Slovenska. In: Biológia (Bratislava), roč. 31, 1976, s. 74-80.

MARHOLD, K., WÓJCICKI, J. J. 1992. *Cerasus* Miller. In: BERTOVÁ, L. (ed.) Flóra Slovenska 4/3. Bratislava: Veda, s. 509-533.

MARHOLD, K., GOLIAŠOVÁ, K., HEGEDÜŠOVÁ, Z., HODÁLOVÁ, I., JURKOVIČOVÁ, V. et al. 1998. Papraďorasty a semenné rastliny. In: MARHOLD, K., HINDÁK, F. (eds.) Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska. Bratislava: Veda, s. 333–687. ISBN 80-224-0526-4.

MAZÚR, E., LUKNIŠ, M. 1986. Geomorfologické členenie SSR a ČSSR. Časť Slovensko. Bratislava: Slovenská kartografia, 205 s. ISBN 80-88833-27-2

MERAVÝ, V. 1991. Predstavujeme chránené územia: Štátna prírodná rezervácia Zoborská lesostep. In: Rosalia 7, Nitra, 1991, s. 237-239.

SÁDLO, J., CHYTRÝ, M. 2013. KBB *Berberidion vulgaris* Br.-Bl. ex Tüxen 1952. In: CHYTRÝ, M. (ed.) Vegetace České republiky. 4. Lesní a křovinná vegetace. Praha: Academia, s. 87-93.

ŘEHOŘEK, V., SVOBODOVÁ, Z., ULRYCH, L., KUBINSKÁ, A., LACKOVIČOVÁ, A. 2007. Lišajníky, machorasty a cievnaté rastliny Zoborských vrchov, 163 s. ISBN 978-80-8069-897-3

VALACHOVIČ, M. 2002. Kr6 Teplomilné kroviny. In: STANOVÁ, V., VLACHOVIČ, M. (eds.) Katalóg biotopov Slovenska. Bratislava: Daphne – inštitút aplikovanej ekológie, s. 35-36.

VALACHOVIČ, M. 2007. Klasifikácia spoločenstiev krovín na Slovensku – možný koncept riešenia. In: Bulletin Slovenskej botanickej spoločnosti, roč. 29, 2007, s. 169-176.

Adresa autorov

doc. Ing. Pavol Eliáš, PhD., Ing. Ľuba Ďurišová, PhD., prof. RNDr. Tibor Baranec, CSc. – Katedra botaniky, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, email: pavol.elias.jun@gmail.com, luba.durisova@uniag.sk, tibor.baranec@uniag.sk

POTENCIÁL NOVÝCH MEDITERÁNNYCH DRUHOV DREVÍN PRE ZÁHRADNÚ A KRAJINÁRSKU TVORBU SLOVENSKÝCH MIEST

THE POTENTIAL OF NEW MEDITERRANEAN WOODY PLANT SPECIES FOR LANDSCAPE ARCHITECTURE IN SLOVAK TOWNS AND CITIES

ĽUBICA FERIANCOVÁ – GABRIEL KUCZMAN

FERIANCOVÁ, Ľ – KUCZMAN, G. 2016. Potenciál nových mediterránnych druhov drevín pre záhradnú a krajinársku tvorbu slovenských miest. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 71-75. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
There are real assumption that global climate changes and global warming will caused general advance moving of geography – climate zoning. They have influence to resistance of plants against winter low temperature. During global and regional warming should be open climatic barriers in the north and increase potential for plant migration process from south regions to north zones. As a reflection of those processes, there are new possibilities for applying of climatically sensitive woody plants, mainly from Mediterranean region for urban vegetation design in central Europe spaces, including Slovakia warmer climatic zone, but beside those should have invasive potential. The contribution will introduce some woody plant originated from Mediterranean zone and are successfully used for cultivation and green areas design in Slovakia.

Key words: Mediterranean zone, climate changes, introduced woody plants

ÚVOD

Dnes, s veľkým obdivom a úctou vzdávame hold zakladateľom AM, najvýznamnejšej zbierky stálozelených drevín pochádzajúcich od Stredomoria. Vtedy ich k tomu viedlo nadšenie pre pestovanie u nás netradičného. To páni Ambrózy – Migazzi a Mišák nemohli tušiť, že „nehostinné“ podmienky sa po viac ako 100 rokoch významne zmenia a nie nadšenci budú chodiť za drevinami do mediteránnu, ale teplomilné dreviny si budú nachádzať svoje pestovateľské prostredie u nás. Možno ochranári prírody budú namietať voči vnášaniu takýchto druhov do slovenských miest. No faktom je, že práve dreviny z aridných oblastí nám budú vedieť saturovať výpadok tých, ktoré nezvládnu nápor nastúpenej klimatickej zmeny. Pretože biodiverzitu, ktorá je zdrojom ekonomických, ekologických a kultúrnych hodnôt ohrozuje práve klimatická zmena. Oteplenie o 1 až 6 C° počas nasledujúcich sto rokov posunie k zemským pólom súčasné klimatické zóny o 150 až 550 km. Je ťažké odhadnúť možné reakcie ekosystémov na zmenu klímy a priebeh počasia na Slovensku, pretože existuje veľa spätných väzieb a vzájomných interakcií a nie je ani jednoznačný názor na priaznivý, alebo nepriaznivý vplyv zvýšenia koncentrácie CO_2 v atmosfére. Ak hodnotíme vyhliadky jednotlivých druhov, zistíme, že pre mnohé z nich je situácia beznádejná. Druhy rastlín rozšírené v najvyššie položených oblastiach alebo v malej vzdialenosti od polárnych morí, nemajú k dispozícií priestor pre migráciu. Tieto druhy budú vytláčať do vyšších zemepisných šírok i do vyšších nadmorských plôch kompetitívne druhy, ktoré využívajú teplejšiu klímu. Oteplenie o 2,5 C° sa rovná výškovému premiestneniu o 400 m, alebo v severnej Európe presunu zemepisnej šírky o viac ako 300 km od Severného mora. Pravdepodobne budú tieto druhy odsúdené k vyhynutiu. V európskom regióne je mnoho druhov rastlín, ktorých oblasť rozšírenia je limitovaná na južnej hranici častými obdobiami sucha a na severnej hranici nízkou teplotou. V priebehu otepľovania sa uvoľní na severnej hranici obmedzenie, čo umožní migráciu na sever a v rovnakom smere sa súčasne posunie južná hranica vďaka častejším epizódam sucha v priebehu teplého letného obdobia (ZELENÝ 2012).

Mnoho druhov rastlín bude v týchto podmienkach silne redukované a v prípade, že južná hranica dostihne severnú hranicu, konkrétny druh v tejto oblasti vymrie. Za ostatných 15 rokov sa červený zoznam ohrozených druhov rozšíril o takmer 270 rastlín, ktoré rastú aj na Slovensku. V súčasnosti je ich tam zapísaných okolo 1 270 druhov, čo je viac ako tretina zo všetkých slovenských vyšších rastlín. Doteraz už vyhynulo 73 druhov rastlín. Počet rastlinných druhov na Slovensku počas uplynulých desať rokov vzrástol v dôsledku ich postupu od našich južných susedov (HANUSKOVÁ 2008). S vylúčením invazívnych druhov, je skupina okrasných drevín, ktorým práve v kontexte nastúpenej klimatickej zmeny sa v našich podmienkach bude spoľahlivejšie dariť.

Úspešnosť introdukcie drevín z pôvodného areálu rozšírenia do nových geografických priestorov s odlišnými podmienkami klímy, sa posudzuje rôznymi metódami. K najznámejším patrí hodnotenie rastu a vývoja, vrátane zmien v morfologických znakoch vegetačných a generatívnych orgánov drevín, ako prejav odolnosti na nízke, resp. vyššie teploty v novom prostredí (HOŤKA 2010). Detailnejšie hodnotenie je založené aj na ekologicko- fyziologických markéroch, ako je obsah a kvalita chlorofylu, obsah cukrov, škrobu a iných metabolitov v listoch drevín. Takéto markéry boli použité pri hodnotení mrazuvzdornosti *Cupressus sempervirens* L. v rámci introdukčného procesu z mediteránnej zóny do podmienok Slovenska v geografickom celku Podunajskej roviny, v Botanickej záhrade SPU v Nitre. Výsledky výskumu autorov Alkurdi, Supuka v období 2011-2014 na 10 mediterránnych druhoch potvrdili schopnosť úspešného prezimovania vo vonkajších podmienkach 7 drevín: *Viburnum tinus* L*., Laurus nobilis* L*., Lagenstroemia indica* L*., Zizyphus jujuba* Mill*., Cupressus sempervirens* L*., Vitex agnus- castus* L*., Trachycarpos fortunei* (Hook.)H. Wendl*.* Naopak, naše klimatické podmienky nedokázali akceptovať a neprezimovali vo voľnej pôde *Pittosporum tobira* (Thunb.) W.T.Aiton*, Nerium oleander* L., *Callistemon laevis* Ball. (ALKURDI, SUPUKA 2015).

MATERIÁL A METÓDY

Pre oblasť mediteránu všeobecne platí, že zrážky sú takmer výhradne dažďové a sústreďujú sa do mesiacov kedy je u nás obdobie vegetačného kľudu (X.- IV.). V letných mesiacoch prší iba výnimočne pri búrkach z tepla. Takúto typickú mediterránnu klímu s miernou daždivou zimou a suchým horúcim letom spôsobuje s veľkou pravdepodobnosťou periodické posúvanie pásu subtropických anticyklónov (závislosť pohybu vzdušnej masy na sklone zemskej osi). V súčasnej dobe obdivujeme bujnú vegetáciu a bohatú škálu farieb, tvarov kvitnúcich bylín a drevín v okolí pláží i v prímorských mestách bez toho, aby sme si uvedomili, že pôvodný rastlinný kryt bol 8 000 rokov trvajúcou činnosťou človeka takmer úplne zmenený. Pôvodné lesy až na nepatrné zvyšky boli vypálené a takmer všetky porasty sú druhotne vzniknuté náhradné rastlinné spoločenstvá. Tu na rozdiel od našej stredoeurópskej oblasti, odlesnená krajina ponechaná svojmu vývoju zarastá lesom len veľmi pomaly a najmä v krasovom teréne to nie je vôbec možné. Pre Stredomorie posledný glaciál nemal tak zhubné následky ako pre strednú Európu, následkom čoho sa tam zachovali niektoré treťohorné druhy a ich dlhý nepretržitý vývoj viedol po morfologickej stránke k ich izolácii. Takýmto príkladom sú *Ceratonia siliqua* L*., Laurus nobilis* L*., Nerium oleander* L*, Cercis siliquastrum* L*, Myrtus communis* L. Tieto sa už stali súčasťou u nás pestovanej flóry a vďaka meniacej sa klíme môžeme a musíme predpokladať úspešnú aklimatizáciu aj iných, kedysi výlučne mediterránnych druhov. Predpokladá sa a peľové analýzy to potvrdzujú, že v závislosti na klimatických a pôdnych podmienkach pokrývali svahy kopcov a pobrežných hôr v nižších polohách Stredomoria stálozelené lesy. Tvorili ich hlavne neopadavé druhy dubov *Quercus ilex* L., *Q. coccifera* L., *Q. suber* L. a dreviny *Laurus nobilis* L*., Olea europea* L., *Pinus halepensis* Miller, *P. pinea* L., v podraste *Juniperus phoenicea* L., *J. oxycedrus* L., *Cupressus sempervirens* L., *Myrtus communis* L., *Pistacia lentiscus* L., *Arbutus andrachne* L., *Cistus ladanifer* L., *Rhamnus alaternus* L., *Viburnum tinus*, L. a mnoho polokríkov a bylín. Po deštrukcii lesov sa na vzniknutých plochách vytvorili hlavne v závislosti na zrážkach rôzne typy porastov. Na vlhkostne najpriaznivejších stanovištiach vyrástli husté 3-5 m vysoké makchie, s podrastom vresovcov *Erica scoparia* L., *E. multiflora* L., *E. sicula* Guss., *Ilex aquifolium* L., *Viburnum tinus* L. subsp. *tinus.*

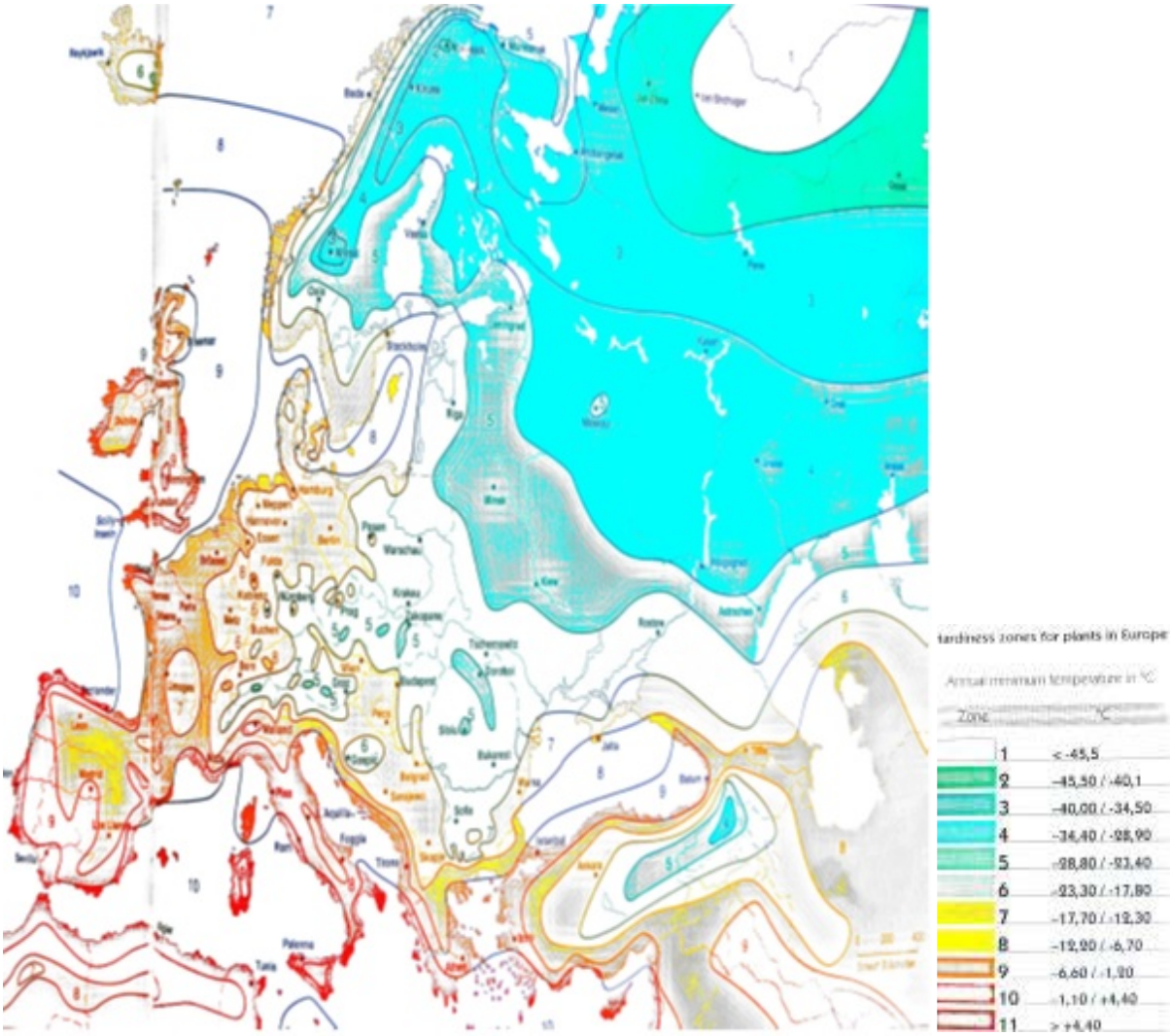
Na plytkých pôdach v oblastiach s nižšími zrážkami sa vyvinul nízky (30-50 cm) typ vegetácie označovaný „garrique“ reprezentovaný súvislými porastmi *Thymus vulgaris,* L. *Rosmarinus officinalis* L., *Lavandula angustifolia* Mill., *L. dentata* L., *L. stoechas* L.

Vo východnom Stredomorí (Grécko, Kréta, Cyprus) na vyprahnutých vápencových a dolomitových skalách (v ich štrbinách) rastú niektoré drevnaté druhy *Euphorbia acanthothamnos* Heldr. Et Sart.*, Genista hispanica* L.*, Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach*, Thymus capitatus* (L.) Hoffm. Et Link. *, Globularia alypum* L.*, Teucrium polium* L. subsp. *capitatum* (L.) Arc.

Niektoré mediteránne druhy dokážu reagovať na letné pôdne sucho znížením vlastného vodného potenciálu pod úroveň vodného potenciálu pôdy.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Je evidentné, že nastúpená zmena klímy prejavujúca sa otepľovaním spôsobuje, že niektoré z mediterránnych druhov spoľahlivo zastúpia tie druhy, ktoré nám nebudú v mestách zabezpečovať požadovanú kvalitu a tak sa stanú súčasťou u nás pestovaných rastlín. K už bežne pestovaným liečivým a aromatickým rastlinám budú pribúdať ďalšie, ktoré dokážu spoľahlivo zabezpečovať najmä v zastavanom území miest požiadavky zelene (TÓTH 2013).



Obr. 1 Geograficko-klimatická zonácia rastlín v Európe (ročné minimá teplôt v °C) (Bartels 1991).

V súčasnosti v našich podmienkach za osvedčené introdukované druhy pôvodom z mediteránnej oblasti možno považovať v tabuľke uvedené dreviny a ich kultivary Uvádzame krajinu pôvodu, resp. krajinu, kde kultivar bol vyšľachtený.

Tab. 1 Používané mediteránne druhy drevín na Slovensku.

druh	**pôvod**	**Pásmo výskytu**
Abies cephalonica	Grécko	8
Abies nebrodensis	Sicília	8
Arbutus unedo	mediterán	8
Arbutus unedo ´Compactum´	vyšľacht. vo Francúzsku	8
Arbutus unedo ´Rubra´	vyšľacht. vo Francúzsku	8
Cedrus atl. ´Glauca Pendula´	vyšľacht. vo Francúzsku	6
C. deodara ´Feelin Blue´	vyšľacht. v Holandsku	7
C. deodora ´Pendula´	vyšľacht. v Nemecku	7
*C.deodora´*Golden *Horizont´*	vyšľacht. v Holandsku	7
C. deodora ´Blue Triumph´	vyšľacht. v Taliansku	7
Celtis australis	mediterán	6
Chamaerops excelsa	mediterán	9
Cupressocyparis leylandii	vyšľacht. v Anglicku	7
*C. leylandii ´*Blue Jeans*´*	vyšľacht. v Anglicku	7
*C. leylandii ´*Gold Rider*´*	vyšľacht. v Holandsku	7
*C. leylandii ´*Variegatus*´*	vyšľacht. v Holandsku	7
Cupressus arizonica	Taliansko	8
C. a. ´Fastigiata´	vyšľacht. v Taliansku	8
C. a. ´Fastigiata Aurea´	vyšľacht. v Taliansku	8
*C. macrocarpa ´*Goldcrest*´*	vyšľacht. v Taliansku	9
C. sempervirens	mediterán	8
*C. semperv. ´*Pyramidalis*´*	vyšľacht. v Taliansku	8
C. semperv. ´Totem´	vyšľacht. v Taliansku	8
Eleagnus x ebbingei	mediterán	9
*E.x ebb. ´*Eleador*´*	vyšľacht. vo Francúzsku	7
E.x ebb. Gild Edge´	vyšľacht. vo Francúzsku	7
*E.x ebb. ´*Limelight*´*	vyšľacht. vo Francúzsku	7
Ficus carica	mediterán	8
Lavandula dentata	mediterán	9
L. stoechas	mediterán	9
Pinus pinea	mediterán	7
Prunus lusitanica	mediterán	8
*Prunus l. ´*Angustifolia*´*	vyšľacht. v Španielsku	8
Quercus ilex	mediterán	8
Q.x turneri ´Pseudoturneri´	vyšľacht. v Anglicku	7
Rosmarinus	mediterán	9
Zhymus	mediterán	6
Viburnum x bodnantense ´Down´	Wales	6
Viburnum x burkwoodii	Anglicko	6
Viburnum tinus	mediterán	8
Vitex agnus	mediterán	7
V. castus	mediterán	7

ZÁVER

Doterajšie skúsenosti s aklimatizáciou mediteránnych druhov poukazujú na úspešnosť pestovania niektorých v našich podmienkach, ak im je dopriata ľahšia, nezamokrená pôda a výslnné stanovište (*Salvia officinalis* L.*, Hysopus officinalis* L.*, Thymus vulgaris* L.*, Satureja montana* L.*, Ruta graveolens* L.*, Melissa officinalis* L.). Vcelku dobre prežívajú aj mrazivé zimy, keď po zakrátení omrznutých horných častí spoľahlivo obrašia.

Odporúčaným drevinám z mediteránu je dôležité zabezpečiť kľudové obdobie zaistením vyššej intenzity svetla, čo v stredoeurópskych podmienkach vplyvom krátkeho zimného dňa si vyžaduje prisvetlenie. Pre nutné zníženie asimilácie ich treba chrániť aj pred premokrením pôdy v období vegetačného kľudu. Dreviny pre vonkajšie podmienky vysádzať na JZ stanovištia chránené pred S a V vetrami. Pred mrazmi, veľkými výkyvmi teplôt a nadmernými zrážkami v zime sa osvedčuje chrániť ľahkou polykarbonátovou konštrukciou. Neodporúča sa ich zálievka pred zimou ani počas nej. Za akceptácie aj týchto odporúčaní je možné predpokladať úspešné pestovanie pôvodne mediteránnych druhov v našich stredoeurópskych podmienkach.

POĎAKOVANIE

Príspevok vznikol za podpory grantovej agentúry MŠ SR KEGA č. 001SPU- 4/2014, za čo jeho autori ďakujú.

LITERATÚRA

ALKURDI, M.I.S., SUPUKA, J. 2015. Assessment of Cupressus sempervirens L. hardiness throughcarbohydrates and pigments content in the leaves. .In: Acta scientiarum Polonorum. -- ISSN 1644-0765. -- Vol. 14, no. 2 (2015), s. 3-16.

BARTELS, A. 1991. Gartengehölze. Publisher: Ulmer (Eugen), Edition: Hardcover, ISBN:9783800163991, 396p.

HANUSKOVÁ, O. 2008. Klimatická zmena a nedostatok vody ako faktor produktivity rastlín. Nitra, SPU, Bc práca, 49 s. nepublik.

HOŤKA, P. 2010. Sprievodca po zbierkach Arboréta Mlyňany SAV. Bratislava: VEDA SAV, 73 s. ISBN 978-80-224-1129-5

TÓTH, A. 2013. Green Infrastructure: Planning for Sustainable Rural Development. In: Nemény, M. et al. (eds.) Procedings, University of West Hungary, Press, Gyor, Sopron pp. 392-397, ISBN 978-963-334-103-2.

ZELENÝ, V. 2012. Rostliny Středozemí. Praha: Academia, 507 s. ISBN 978-80-200-2088-8

Adresa autorov

prof. Ing. Ľubica Feriancová, PhD., KZKA FZKI SPU v Nitre, Tulipánová 7, 949 01 Nitra, 0907129483, lubica.feriancova@uniag.sk

Ing. Gabriel Kuczman, PhD., KZKA FZKI SPU v Nitre, Tulipánová 7, 949 01 Nitra, 0903972139, gabriel.kuczman@uniag.sk

ZDRAVOTNÝ STAV ZBIERKY RODODENDRONOV V ARBORÉTE MLYŇANY ÚEL SAV: SÚČASNOSŤ A VYHLIADKY DO BUDÚCNOSTI

HEALTH STATE OF RHODODENDRON COLLECTION IN MLYŇANY ARBORETUM IFE SAS: CURRENT STATE AND FUTURE PERSPECTIVES

PETER FERUS – PETER HOŤKA – JANA KONÔPKOVÁ – MARTIN PASTIRČÁK – MIROSLAVA MAJESKÁ – JOZEF GUBIŠ

FERUS, P. – HOŤKA, P. – KONÔPKOVÁ, J. – PASTIRČÁK, M. – MAJESKÁ, M. – GUBIŠ, J. 2016. Zdravotný stav zbierky rododendronov v Arboréte Mlyňany ÚEL SAV: súčasnosť a vyhliadky do budúcnosti. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 76-81. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
The objective of this work was the complex analysis of healthy state of rhododendron collection in Mlyňany Arboretum. Altogether 172 individuals of rhododendrons, belonging to 18 species and 17 cultivars, were surveyed. Most of shrubs (64%) exhibited weak healthy problems and only 8% showed medium (worst) injury (especially ´Cunningham´s White´ and ´Purpureum Elegans´). As the most frequent type of health troubles, leaf damage caused by fungal parasites and twig dieback leading to crown thinning (72 and 42% individuals, respectively), were detected. In *Rhododendron fortunei*, the most common botanical species in the arboretum, mostly weak damage - leaf damage caused by fungal parasites and leaf damage caused by physiological problems, were observed. *Rhododendron* x ´Cunningham´s White´, the most common cultivar, showed also similar number of slightly and medium injured individuals. Despite of large spectra of health trouble types, the most often observed ones followed the general trend. From recent cultivars, tested for resistance to fungal and physiological constraints, only few seem to be suitable for arboretum conditions. Therefore, more attention to their optimalization should be paid.

Key words: arboretum, rhododendrons, health state, fungal diseases, resistance of recent cultivars

ÚVOD

Rododendrony, jedna z najdekoratívnejších skupín krov, vyznačujúca sa širokou diverzitou farieb a tvarov, sú neoddeliteľnou súčasťou botanických záhrad, arborét, parkov, mestskej zelene a čoraz viac aj súkromných zbierok. Ich geografické rozšírenie zahŕňa predovšetkým strednú Čínu, Tibet, Japonsko, Severnú Ameriku, európske vysokohorské oblasti a Indonéziu (KRÜSSMANN, 1962), a American Rhododendron Society v súčasnosti eviduje 316 druhov a 1125 kultivarov (http://www.rhododendron.org/rhododendronA-Z.htm).

Kvitnúce rododendrony sú na začiatku sezóny významnou atrakciou aj pre návštevníkov Arboréta Mlyňany. Posledná inventarizácia tu odhalila takmer 200 jedincov vždyzelených rododendronov, taxonomicky zaradených do 19 druhov a 18 kultivarov (HOŤKA A BARTA, 2012). Udržiavanie dobrého zdravotného stavu týchto krov je teda jednou z kľúčových úloh starostlivosti o kolekciu drevín v arboréte. Prvým krokom k tomuto cieľu je analýza súčasného stavu, na ktorú sme sa zamerali v tejto práci.

MATERIÁL A METÓDY

Koncom júna 2015 bol realizovaný prieskum zdravotného stavu zbierky rododendronov v parku Arboréta Mlyňany podľa metodiky JUHÁSOVEJ A SERBINOVEJ (1997). Analyzovaný bol celkový

zdravotný stav a stupeň poškodenia krov ako aj najčastejšie typy poškodenia u 172 jedincov rododendronov (Tabuľka 1).

Tab. 1 Kolekcia rododendronov Arboréta Mlyňany podrobená analýze zdravotného stavu. Hrubo označené – najviac zastúpené botanické druhy a kultivary.

Druh	Počet	Kultivar	Počet
R. augustinii	2	*R. catawbiense* ´Album´	3
R. catawbiense	4	*R.* x ´Anuschka´	1
R. caucasicum	1	*R.* x ´Balalaica´	2
R.dauricum	3	*R.* x ´Boursault´	4
R. decorum	**8**	***R.* x ´Cunningham´s White´**	**20**
R. fargesii	2	*R.* x ´Darius´	1
R. fortunei	**26**	***R.* x ´Dreamland´**	**7**
R. keiskei	2	*R.* x ´Duke of York´	4
R. macrophyllum	**7**	***R.* x ´Purpureum Elegans´**	**11**
R. makinoi	1	*R.* x ´Love Song´	5
R. maximum	2	*R.* x ´Marlis´	5
R. micranthum	1	***R.* x ´Nova Zembla´**	**7**
R. orbiculare	1	***R.* x ´Polaris´**	**11**
R. oreodoxa	2	*R.* x ´Purpureum Grandiflorum´	2
R. palustre	1	*R.* x ´Schneekrone´	2
R. ponticum	**6**	*R.* x ´Sneezy´	4
R. smirnowii	**8**	*R.* x ´Tamarindos´	5
R. yunnanense	1		
Spolu	**78**	**Spolu**	**94**

V rámci hodnotenia celkového zdravotného stavu a stupňa poškodenia rododendronov boli identifikované nasledovné kategórie:

0 – stromy sú zdravé bez príznakov poškodenia

1 – na stromoch sa ojedinele vyskytujú pôvodcovia ochorenia (slabé poškodenie)

2 – výskyt mikroskopických a drevokazných húb má za následok čiastočné presychanie stromu, na kmeni sú dutiny malých rozmerov, stabilita nie je narušená (mierne poškodenie)

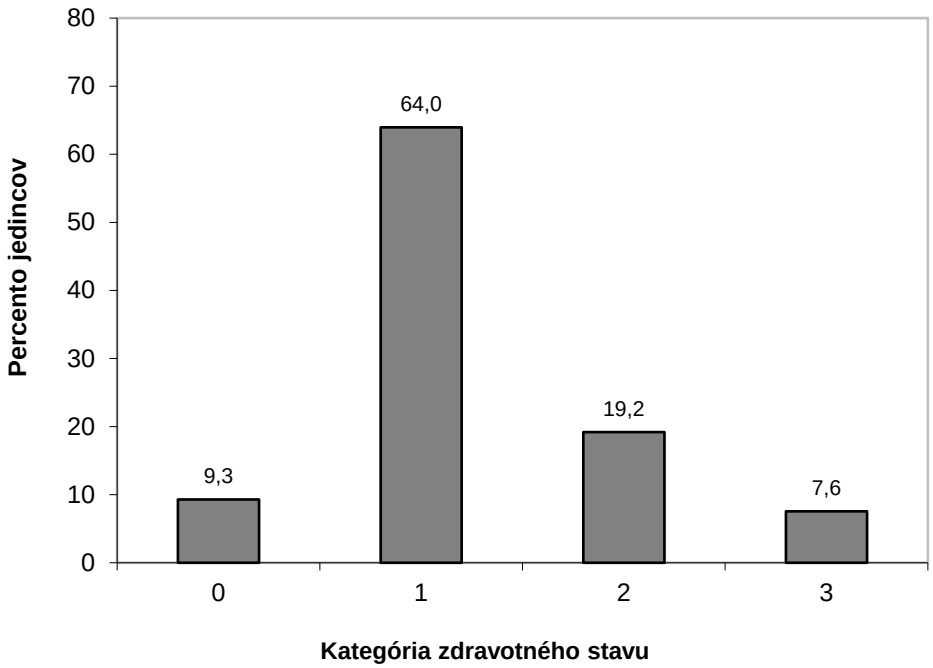
3 – v dôsledku infekcie hubami alebo poškodenia živočíšnymi škodcami usychajú konáre v objeme 1/3 koruny, na kmeni sú stredne veľké dutiny spôsobené drevokaznými hubami, hmyzom, mechanickým poškodením, klimatickými faktormi a pod. Strom je po ošetrení vhodný na ďalšie pestovanie (stredné poškodenie).

Najčastejšie typy poškodenia krov sú kumulatívnym vyjadrením súvisiacich kategórií poškodenia. Jedná sa o nasledovné typy: I. Preriednutá koruna a suché konáriky, II. Dutiny v kmeni, III. Zle založená, nevyvážená a nestabilná koruna, IV. Poškodenia listov spôsobené hubami, V. Poškodenia listov spôsobené fyziologickými poruchami, VI. Hmyz na listoch a dreve, a VII. Nekvalitný rez.

V rokoch 2014 a 2016 bol zakúpený nový (1-2 ročný) rastlinný materiál určený na testovanie stability zdravotného stavu v podmienkach arboréta. Tento bol kultivovaný v polotieni v plastových nádobách (priemer 17, 21 a 29 cm) so substrátom pre azalky a rododendrony (AgroCS, Slovensko) resp. zmesou perlitu a kyslej rašeliny (Bora, Slovensko) v pomere 1:1, a hodnotený z hľadiska nasledovných kondičných charakteristík: I. Preriednutá koruna a suché konáriky, IV. Poškodenia listov spôsobené hubami, V. Poškodenia listov spôsobené fyziologickými poruchami.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýza celkového zdravotného stavu a stupňa poškodenia ukázala, že zdravých bolo len 9,3% jedincov (Obrázok 1). Drvivá väčšina hodnotených rododendronov vykazovala len slabé poškodenie (kategória 1 – 64%). Kategória 3 – stredné poškodenie, predstavujúca v našom teste najvyšší stupeň poškodenia (škála má rozsah 0-5), bola pozorovaná len u 7,6% krov, medzi ktorými dominovali jedince ´Cunningham´s White´ a ´Purpureum Grandiflorum´.



Obr. 1 Kategorizácia celkového zdravotného stavu a stupňa poškodenia rododendronov v parku arboréta.

Najčastejším typom poškodenia boli IV. Poškodenia listov spôsobené hubami (Tabuľka 2). Trpelo ním viac ako 70% jedincov rododendronov v Arboréte Mlyňany. Druhým najbežnejším poškodením bola I. Preriednutá koruna a suché konáriky (42,4%). Nasledovala III. Zle založená, nevyvážená a nestabilná koruna, V. Poškodenia listov spôsobené fyziologickými poruchami, VI. Hmyz na listoch a dreve, II. Dutiny v kmeni a VII. Nekvalitný rez.

Tab. 2 Frekvencia najčastejších typov poškodenia rododendronov v zbierke Arboréta Mlyňany.

Typ poškodenia	Počet	%
I. Preriednutá koruna a suché konáriky	73	42,4
II. Dutiny v kmeni	4	2,3
III. Zle založená, nevyvážená a nestabilná koruna	47	27,3
IV. Poškodenia listov spôsobené hubami	123	71,5
V. Poškodenia listov spôsobené fyziologickými poruchami	35	20,3
VI. Hmyz na listoch a dreve	9	5,2
VII. Nekvalitný rez	4	2,3

Hodnotenie najviac zastúpených druhov a kultivarov odhalilo značné odlišnosti v celkovom zdravotnom stave ako aj v štruktúre najvýznamnejších typov poškodenia (Tabuľka 3). Jedince *Rhododendron decorum* vykazovali väčšinou len slabé zdravotné problémy (7 z 8 jedincov), za ktoré zodpovedali hlavne poškodenia na listoch vyvolané parazitickými hubami a uschnutými konárikmi (7 z 8 jedincov). U *Rhododendron fortunei* predstavovali značný podiel aj kry s miernym poškodením.

Zároveň namiesto usychania konárikov pribudol ďalší významný typ poškodenia – fyziologické poruchy listov. V prípade *R. macrophyllum* a *R. ponticum* dominovali opäť poškodenia listov spôsobené hubami. *Rhododendron smirnowii* možno považovať za najodolnejší druh, keďže 5 z 8 analyzovaných krov nejavilo žiadne známky poškodenia. Najvážnejším problémom tohto druhu rododendronu bola nestabilná koruna.

Tab. 3 Kategórie celkového zdravotného stavu a najčastejšie typy poškodenia u najfrekventovanejších druhov a kultivarov rododendronov v Arboréte Mlyňany.

Druh	Kategórie zdravotného stavu	Najčastejšie typy poškodenia	Kultivar	Kategórie zdravotného stavu	Najčastejšie typy poškodenia
R. decorum	0 – 1 1 – 7	I. – 7 III. – 2 IV. – 7 VI. – 1	*R.* x ´Cunningham´s White´	1 – 9 2 – 6 3 – 5	I. – 7 II. – 2 III. – 8 IV. – 18 V. – 3 VI. – 1 VII. – 1
R. fortunei	0 – 1 1 – 17 2 – 8	I. – 7 III. – 5 IV. – 13 V. – 12 VI. – 1 VII. – 1	*R.* x ´Dreamland´	1 – 6 3 – 1	I. – 5 IV. – 2 V. – 6
R. macrophyllum	0 – 3 1 – 3 2 – 1	I. – 1 III. – 2 IV. – 4	*R.* x ´Purpureum Elegans´	1 – 10 3 – 1	I. – 1 II. – 1 III. – 6 IV. – 11 VI. – 1 VII. – 1
R. ponticum	0 – 1 1 – 3 2 – 2	I. – 3 III. – 3 IV. – 5	*R.* x ´Nova Zembla´	1 – 7	I. – 3 IV. – 4 V. – 3 VI. – 4
R. smirnowii	0 – 5 1 – 3	I. – 2 III. – 4 IV. – 3	*R.* x ´Polaris´	0 – 3 1 – 5 2 – 2 3 – 1	I. – 5 IV. – 3 V. – 4 VI. – 1 VII. – 1

V rámci analýzy kultivarov predstavoval ´Cunningham´s White´ najväčšmi poškodený genotyp. Hoci najviac jedincov vykazovalo slabé poškodenie, značný podiel tvorili aj mierne a stredne poškodené kry. Tento kultivar najčastejšie trpel hubovými chorobami listov ako aj zle založenou a čiastočne preschnutou korunou. U kultivaru ´Dreamland´ boli nájdené takmer výhradne slabo poškodené jedince, u ktorých sa najčastejšie vyskytovali fyziologické poruchy listov a presychanie spodných konárikov. Podobná situácia čo sa týka celkového zdravotného stavu bola zistená aj u ´Purpureum Elegans´. Medzi širokou škálou poškodení vynikali listové škvrnitosti spôsobené hubami

ako aj nestabilná resp. zle založená koruna. Všetky kry ´Nova Zembla´ vykazovali slabé poškodenie s podobným zastúpením nasledovných typov porúch: I. Preriednutá koruna a suché konáriky, IV. Poškodenia listov spôsobené hubami, V. Poškodenia listov spôsobené fyziologickými poruchami a VI. Hmyz na listoch a dreve. Okrem zdravých a dominujúcich slabo poškodených jedincov sa u kultivaru ´Polaris´ vyskytli aj mierne a stredne poškodené kry, u ktorých boli najčastejšie pozorované suché spodné konáriky, fyziologické poruchy listov a škvrnitosti vyvolané hubovou infekciou.

Hodnotenie súčasného sortimentu rododendronov z hľadiska výskytu zdravotných porúch pozorovateľných v ranom veku a pri zabezpečení takmer optimálnych pôdno-klimatických podmienok kultivácie (Tabuľka 4) ukázalo, že žiadne poškodenia listov (hubového resp. fyziologického charakteru) vedúce k postupnému odumretiu konárikov, neboli zistené iba u kultivaru ´Red Jack´. Fyziologické poruchy listov vykazovali genotypy *R. groenlandicum* ´Helma´ a *R. impeditum* ´Purple Pillow´. Listové škvrnitosti hubového pôvodu boli zasa charakteristické pre oba kultivary *R. repens* ako aj ´Amaretto´, ´Goldkrone´, ´Percy Wiseman´ a ´Polarnacht´. Oboma typmi porúch trpeli kultivary *R. keleticum* ´Robert Seleger´, ´Album Novum´ a ´Boulevard´.

Tab. 4 Charakteristiky súčasných kultivarov rododendronov s potenciálom nahradiť prestarnuté a silne poškodené jedince v parku arboréta.

Kultivar	Najčastejšie typy poškodenia		
	I.	IV.	V.
R. groenlandicum ´Helma´			x
R. impeditum ´Purple Pillow´	x		x
R. keleticum ´Robert Seleger´	x	x	x
R. repens ´Carmen´	x	x	
R. repens ´Scarlet Wonder´	x	x	
R. x ´Album Novum´	x	x	x
R. x ´Amaretto´	x	x	
R. x ´Boulevard´	x	x	x
R. x ´Goldkrone´	x	x	
R. x ´Percy Wiseman´	x	x	
R. x ´Polarnacht´		x	
R. x ´Red Jack´			

Najčastejšie ochorenia rododendronov popisuje manuál ANTONELLIHO et al.(2006). Vedecká literatúra rozoberá predovšetkým odolnosť genotypov rododendronov voči karanténnym patogénom z rodu *Phytophthora* (napr. KREBS A WILSON, 2002; DE DOBBELAERE et al., 2010) resp. šírenie sa múčnatky rododendronov (*Erysiphe azaleae*) u nás a v okolitých krajinách (BACIGÁLOVÁ A MARKOVÁ, 2006; LEBEDA et al., 2007; APINE et al., 2013).

PASTIRČÁK et al. (2014) však analyzovali hubových pôvodcov listových škvrnitostí vybraných jedincov rododendronov priamo v Arboréte Mlyňany. Identifikovali patogény nasledovných rodov: *Coleophoma*, *Mycosphaerella*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Cercospora*, a *Guignardia*.

Na nekrotizovaných konárikoch týchto jedincov neskôr identifikovali najčastejšie mikroskopické huby z rodu: *Cytospora*, *Phomopsis* a *Fusicoccum*. Medzi ďalšie frekventované rody patrili: *Camarosporium*, *Didymosphaeria*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Hypoderma*, *Chalara*, *Lembosia*, *Macrodiplodia*, *Melanomma* a *Protoventuria* (PASTIRČÁK et al., 2016).

Podmienky Arboréta Mlyňany vytvárajú predpoklady pre intenzívne šírenie sa hubových ochorení rododendronov. Napriek opakovanému primiešavaniu kyslej rašeliny do povrchových vrstiev pre tieto okrasné kry málo vyhovujúcej pôdy a vďaka v niektorých prípadoch nedostatočnému osvetleniu a častému výskytu sucha v jarnom a letnom období sú tunajšie rododendrony čoraz viac

oslabované a ľahko podliehajú týmto patogénom. Na druhej strane, silné slnečné žiarenie v kombinácii s nedostatkom vody v pôde resp. minerálny stres spôsobený nevhodným pH pôdy je predpokladom výskytu fyziologických porúch listov (plošné poruchy zafarbenia). Opakovaný biotický a/alebo biotický stres vedie k rozširovaniu uvedených symptómov na ďalšie konáriky, čím dochádza k preriednutiu koruny kra. Staršie jedince majú potom ťažkosti so stabilitou.

Zo súčasných genotypov rododendronov, ktoré boli v týchto podmienkach pestované, len málo odoláva náporu hubových parazitov resp. nevyskytli sa u nich fyziologické poruchy. Jednou z ciest riešenia tohto problému by mohlo byť ďalšie hľadanie rezistentných kultivarov, no za efektívnejšiu považujeme vypracovanie plánu optimalizácie pôdno-klimatických pomerov pre vysadené ako aj nové genotypy.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla s podporou projektu vedeckej grantovej agentúry VEGA č. 2/0183/14 „Environmentálne riziká kultivácie zbierok rododendronov v Arboréte Mlyňany SAV“.

LITERATÚRA

ANTONELLI, A.L., BYTHER, R.S., MALEIKE, R.R., COLLMANN, S.J., DAVISON A.D. 2006. How to identify rhododendron and azalea problems. Washington: Washington State University, 28 p.

APINE I., BANKINA B., NIKOLAJEVA V., TOMSONE S. 2013: Powdery mildew on Rhododendron caused by *Erysiphe azaleae* in Latvia. In: Czech Mycology, vol. 65(1), 2013, p. 113–123.

BACIGÁLOVÁ, K., MARKOVÁ, J. 2006. *Erysiphe azaleae* (Erysiphales) – a new species of powdery mildew for Slovakia and further records from the Czech Republic. In: Czech Mycology, vol. 58(3-4), 2006, p. 189-199.

DE DOBBELAERE I., VERCAUTEREN A., SPEYBROECK N., BERKVENS D., VAN BOCKSTAELE E., MAES M. AND HEUNGENS K. 2010. Effect of host factors on the susceptibility of *Rhododendron* to *Phytophthora ramorum*. In: Plant Pathology, vol. 59, 2010, p. 301–312.

HOŤKA, P., BARTA, M. 2012. Dreviny Arboréta Mlyňany SAV, Bratislava: Veda, 132 s. ISBN 978-80-224-1252-0.

JUHÁSOVÁ, G., SERBINOVÁ, K. 1997. Metódy hodnotenia zdravotného stavu drevín v mestskom prostredí. In: Pestovanie a ochrana rastlín v mestskom prostredí, ošetrenie chránených a pamätných stromov: Zborník zo seminára. Nitra, 1997, s. 42-68.

KREBS, S.L., WILSON, M.D. 2002. Resistance to *Phytophthora* to root rot in contemporary *Rhododendron* cultivars. In: HortScience, vol. 37(5), 2002, p. 790-792.

KRÜSSMANN, G. 1962. Handbuch der Laubgehölze. Berlin: Paul Parey, 495 p.

LEBEDA, A., SEDLAROVA, M., JANKOVSKY, L., SHIN, H.D. 2007. First report of rhododendron powdery mildew on *Rhododendron* spp. in the Czech Republic. In: Plant Pathology vol. 56, 2007, p. 354.

PASTIRČÁK, M., MAJESKÁ, M., FERUS, P., GUBIŠ, J. 2014. Choroby rododendronov spôsobené hubovými patogénmi. In: Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2014: Zborník referátov z vedeckej konferencie, 18.09.2014, Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany ÚEL SAV, Slovenská spoločnosť pre poľnohospodárske a veterinárske vedy pri SAV, 2014, s. 145-149. ISBN 978-80-971113-2-8.

PASTIRČÁK, M., MAJESKÁ, M., FERUS, P., GUBIŠ, J. 2016. Diverzita mikroskopických húb na konároch rododendronov v Arboréte Mlyňany. In: Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016: Zborník referátov z vedeckej konferencie. 5.10.2016, Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany ÚEL SAV, Slovenská spoločnosť pre poľnohospodárske a veterinárske vedy pri SAV, 2016, v tlači.

Adresy autorov

Ing. Peter Ferus, PhD., Ing. Peter Hoťka, PhD., Ing. Jana Konôpková, PhD., Arborétum Mlyňany, Ústav ekológie lesa SAV, Vieska nad Žitavou 178, 95152 Slepčany, Tel: +421-37-6334211, e-mail: peter.ferus@savba.sk, peter.hotka@savba.sk, jana.konopkova@savba.sk

Mgr. Martin Pastirčák, PhD., RNDr. Miroslava Majeská, PhD., Ing. Jozef Gubiš, PhD., Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Tel.: +421-33-7722311, e-mail: pastircak@vurv.sk, majeska@vurv.sk, gubis@vurv.sk

EFFECT OF THE CULTURE MEDIUM AND BIOTIC STIMULATION ON TAXANE PRODUCTION IN *TAXUS BACCATA L. IN VITRO* CULTURES

VPLYV KULTIVAČNÉHO MÉDIA A BIOSTIMULÁCIE NA PRODUKCIU TAXÁNOV V *IN VITRO* KULTÚRE *TAXUS BACCATA L.*

ANGELIKA FILOVÁ

FILOVÁ, A. 2016. Effect of the culture medium and biotic stimulation on taxane production in *Taxus baccata* L. *in vitro* cultures. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016", 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 82-89. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
In this study, callus cultures from leaves and young shoots of *Taxus baccata* were established in Gamborg's B5 medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxiacetic acid (2 mg/L), kinetin (0.5 mg/L) and gibberellic acid (0.25 mg/L). Callus growth and taxane production were evaluated using two culture media: Woody Plant Medium and Gamborg's B5 supplemented with picloram (2 mg/L), kinetin (0.1 mg/L) and gibberellic acid (0.5 mg/L). The effect of the inoculum size (50, 100 and 150 g FW/L) and culture media (Woody Plant Medium and Gamborg's B5) with and without the presence of methyl jasmonate (100 µM) on *T. baccata* cell suspensions was assessed. Taxane analysis revealed that the calli in Gamborg's B5 produced taxol (50 µg/g DW), baccatin III, 10-deacetyl baccatin III and 10-deacetyl taxol. Woody Plant Medium also induced the production of taxol, although to a lesser extent. The optimum inoculum size was 50 g FW/L. In cell suspension cultures, both media had a significant effect on taxane production when supplemented with methyl jasmonate. In WPM, at day 14, a total concentration of 185.35 µg/L of taxol, 172.98 µg/L of baccatin III, 658.97 µg/L of 10-deacetyl baccatin III and 259.75 µg/L 10-deacetyl taxol were obtained, with total excretion of baccatin III and 10-deacetyl taxol to the culture medium. The best culture conditions for producing taxol were found to be WPM supplemented with MeJ. The taxol level achieved in these conditions was 3.4 higher than in the same medium without elicitation and over 9 times higher than in the cultures grown in B5, elicited or not.

Key words: anticancer agent, *in vitro* cultures, methyl jasmonate, taxanes, *Taxus baccata*

INTRODUCTION

In vitro cultures are an attractive alternative for obtaining high added value metabolites when these are produced in plants at low concentrations, their chemical synthesis is economically unfeasible, or their semi synthesis is also difficult and expensive (ARIAS et al., 2009). One of the strategies to consider for in vitro plant secondary metabolite production is the selection of productive species or explants that naturally accumulate the target compounds (EXPOSITO et al., 2010). The diterpenoid compound Paclitaxel (Taxol) has important anticarcinogenic properties and is produced mainly by species of the *Taxus* genus (SCHIFF AND HORWITZ, 1979). Production is variable among species and generally occurs at low concentrations, so the most viable option is *in vitro* culture of callus and cell suspension cultures (VAN ROZENDAAL et al., 2000). Various biotechnological strategies have been evaluated in *in vitro* cultures of different *Taxus species*, including the type of media, supplementation of culture medium with different growth regulators, biotic and abiotic elicitation, and different types of culture techniques such as two-phase culture, immobilized cells and scaling up to bioreactor level (MALIK et al., 2011). *Taxus baccata* or the European yew is distributed throughout the temperate zones of the northern hemisphere. It is a smallto medium-sized evergreen tree that historically has been used for weapon-making and medicine, and is poisonous except for the fruit. The genus *Taxus* belongs to the Class *Pinopsida,* the Order *Taxales* and the Family *Taxaceae*. As the species are highly similar, they are often easier to separate geographically than morphologically. Typically, eight species are recognized: *T. baccata* (European or English yew), *T.*

brevifolia (Pacific yew or Western yew), *T. canadensis* (Canadian yew), *T. chinensis* (Chinese yew), *T. cuspidata* (Japanese yew), *T. floridana* (Florida yew), *T. globosa* (Mexican yew) and *T. wallichiana* (Himalayan yew). There are also two recognized hybrids: *Taxus × media* = *T. baccata × T. cuspidata* and *Taxus × hunnewelliana* = *T. cuspidata × T. canadensis* (COPE, 1998).

The genus *Taxus* has generated considerable interest due to its content of diterpene alkaloids, particularly taxol (known also as the generic drug paclitaxel and by the registered trade name Taxol® BMS [Bristol-Myers Squibb]). The anticancer properties of taxol were discovered in *T. brevifolia* extracts in 1971 (WANI et al., 1971), while in 1979 Schiff, working with *T. baccata*, found that the cellular target of taxol was tubulin (SCHIFF - HORWITZ, 1979). Since the discovery of taxol, considerable energy has been invested in trying to increase its extraction. A serious obstacle to overcome is the low concentration (0.001–0.05%) of taxol found even in the most productive species, *T. brevifolia*. Since it is necessary to take 10,000 kg of *Taxus* bark or 3000 yew trees to produce only one kilogram of the drug and a cancer patient needs approximately 2.5–3 g of paclitaxel (GANEM et al., 2007) the treatment of each patient consumes about eight 60-year-old yew trees. Additionally, extraction of taxol from yew trees requires a complex system and specific purification techniques using advanced and expensive technology. Taking into account the above facts, together with the seasonal variation in taxane concentration in *Taxus* (CAMERON et.al., 2008) and the high demand for the drug, there is an urgent need to find other alternative sources of taxol production.

More studies on the *in vitro* production of taxanes in cell cultures of *T. baccata* are, therefore, required. In the work presented here, we first evaluated the nutritional impact of two culture media, Woody Plant Medium (WPM) and Gamborg medium (B5), and elicitation with methyl jasmonate (MeJ) (100 μM) on *T. baccata* cell growth, with the aim of increasing the in vitro production of taxol and related taxanes and their excretion from the producer cells to the culture medium.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Establishment of *T. baccata* in vitro cultures Explants were obtained from leaves and young stems of wild *T. baccata* in October 2014. The explants were surfacesterilized and after stripping the needles, longitudinally halved stem sections (length 0.8–1.0 cm) and leaves were inoculated onto hormone-free Gamborg medium (B5) (GAMBORG et al., 1968) for 20 days to verify the absence of bacteria and fungi. To obtain calli from the aseptic explants, leaves and stems were then cultured for 2 months in B5 supplemented with 2,4-dichlorophenoxiacetic acid (2,4-D) (2 mg/L), kinetin (KN) (0.5 mg/L), gibberellic acid (GA_3) (0.5 mg/L) and sucrose (3 %), and solidified with 0.3 % phytagel (Sigma) (TI), or B5 supplemented with picloram (PIC) (2 mg/L), KN (0.1 mg/L), GA_3 (0.5 mg/L) and sucrose (3 %), and solidified with 0.3 % phytagel (TII). The cultures were maintained at 25 ± 2 ^{0}C in the dark. The established calli were then subcultured every 10 or 12 days on B5 supplemented with 2,4-D (2 mg/L), benzyl aminopurine (BAP) (0.1 mg/L), GA_3 (0.5 mg/L) and sucrose (3 %), and solidified with 0.3 % phytagel (TIII) until a high biomass of friable calli was obtained (CUSIDO´ et al., 2002).

Measuring growth and taxane production in T. baccata calli

To determine the kinetics of growth and production in two different basal media, 500 mg FW of calli was inoculated onto petri dishes containing 20 mL of WPM (McCown and Lloyd, 1981) with sucrose (1 %) + fructose (1 %), or B5 with sucrose (3 %), both media being supplemented with the growth regulators PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA_3 (0.5 mg/L), and solidified with 0.3 % phytagel. To determine the growth measured as fresh weight (FW), 20–25 callus pieces grown in each culture media were harvested every week during a culture period of 6 weeks, and weighed separately. Dry weight (DW) was recorded from lyophilized callus pieces. The growth parameters of growth index (GI) (KETCHUM et al., 1995) and average doubling time (dt) were established based on the FW (BRUNAKOVA et al., 2004). The dry plant material was extracted to analyze the taxane content following the methodology described below.

Establishing T. baccata cell suspension cultures

T. baccata cell suspension cultures were established by inoculating 10 g FW calli into a 250-mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of WPM supplemented with PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA_3 (0.5 mg/L). The cultures were maintained in a rotary shaker at 100 rpm in the dark at 25 ^{0}C for 12 or 15 days, until sufficient biomass was obtained for subsequent studies.

Inoculum size

Growth kinetics was measured in the *T. baccata* cell suspensions established to determine the inoculum size for an optimum growth. We evaluated the following inoculum sizes: 50, 100, and 150 g FW/L. Cells were cultured in WPM supplemented with PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA_3 (0.5 mg/L) for 30 days. The flasks were shaken (110 rpm) at 25 ± 2 ^{0}C in the dark. Triplicate samples were taken every 3 days. The measured variables were: fresh and dry weight, GI, viability, final volume of the medium and high resolution liquid chromatography (HPLC) quantification of taxanes in the biomass and culture medium (ZHANG et al., 2002).

Effect of methyl jasmonate (MeJ) elicitation of T. baccata cell suspension cultures

The effect of two basal media, WPM and B5, both supplemented with PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA_3 (0.5 mg/L), on cell growth and taxane production, with and without MeJ, was evaluated. The previously established *T. baccata* cells were filtered and those with the optimized inoculum size (50 g FW/L) were placed into 125 mL Erlenmeyer flasks with 10 mL of the indicated media. MeJ (Aldrich) (100 μM) (EXPOSITO et al., 2010).

Cell viability

The cell viability in all the culture conditions was studied using the method described by DUNCAN AND WIDHOLM (1990). The results are expressed as the percentage of living cells from the total cells.

Quantification of taxanes by high resolution liquid chromatography (HPLC)

The production of taxol and other taxanes was determined following the methodology described by RICHHEIMER et al. (1992).

RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of callus cultures

The sterilization process used in this experiment was more effective for leaves than stems, 97 and 89 % of respective explants being without contamination after 15 days. Two different auxins (2,4-D and PIC) at the same concentration, Media TI and TII, were assayed for callus development. Calli were obtained after 20 days in both media, but with varying success. In TI (Figure 1), the percentage of leaves and stem forming calli was 100 and 80 %, respectively, while in TII it was no higher than 40 %. The calli obtained from leaves were more light-cologreen and friable than those established from stems. It is possible that the dedifferentiation of leaf explants was due to the effect of the auxin 2,4-D on meristematic areas of petioles and the apex of the leaves, which increased cell division by inhibiting morphogenesis and resulted in an early callus formation. In contrast, the induction of calli from stems was lower.

The synthetic auxin 2,4-D is known to be a general promoter of biomass formation since it induces cell dedifferentiation leading to callus development (MIHALJEVIC et al., 2002). BA was used as the cytokinin because it has proven very effective for the growth of cell cultures of several *Taxus* species: *T. baccata* (PALAZO´N et al., 2003), *T. cuspidata* and *T. canadiensis* (FILOVÁ et al., 2011), *T. cuspidata* (NIMS et al., 2006), and *T. brevifolia* (KHOSROUSHAHI et al., 2011) as well as other plant cell cultures.

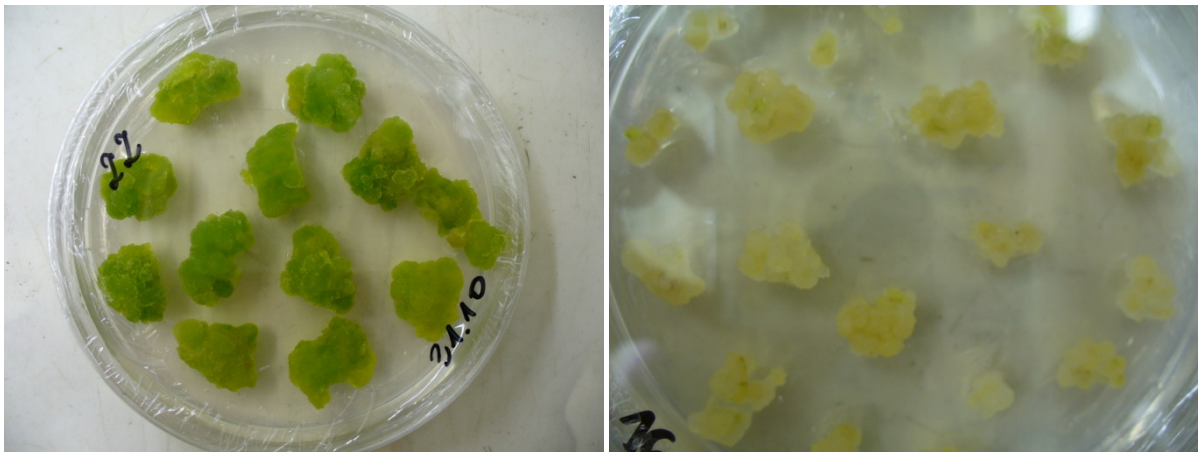


Fig. 1 Callus cultures of *T. baccata* (a) WPM medium and (b) in B5 medium.

Growth and taxane production of T. baccata calli

Friable calli obtained as described above were selected with the aim of determining their capacity for growth and taxane production in the two different basal media. In addition, after assaying 48 different media, we have previously shown that optimum improvement of taxol production in *T. baccata* cell cultures. As shown in Figure 2, *T. baccata* calli grown in WPM achieved the highest growth after 4–6 weeks of culture, with a growth index (GI) of 0.70 and an average doubling time (dt) of 13.2 days. When calli were grown in B5 medium, the highest growth was observed at week 4. After this point, the cells entered the stationary growth phase, which lasted 1 week, decreasing thereafter. In both assayed media, the lag phase lasted at least 2 weeks. In B5 medium, the GI was 0.44 and the dt was 13.8 days. The average dt obtained in the callus cultures was within the range reported for other *Taxus* species: *T. globosa* (14 days) (BARRADAS et al., 2010), *T. media* and *T. baccata* (13 days) (WICKREMESINHE AND ARTECA, 1993).

The calli grown in both media produced taxanes throughout the time period studied. Total taxane content at the end of the experiment (6 weeks of culture) in calli grown in B5 was more than two times higher than in WPM-cultured calli. The main taxane found in calli grown in B5 was 10-DAT followed by taxol. After phytochemical screening of the calli, it was observed that taxol production occurred in cycles, and not at a constant rate during the culture period. Taxol production and accumulation in WPM-cultured calli occurred mainly in the first week (16 µg/g DW) and week 6 (24 µg/g DW). In contrast, the production of 10-deacetyl taxol in these cultures remained constant throughout the culture, accumulating at levels similar to taxol (23.87 µg/g DW). Meanwhile, taxol production and accumulation in B5-cultured calli peaked in the first week (50 µg/g DW) (Table 1).

Tab. 1 Taxane contents (expressed as mg/g DW) of *T. baccata* calli grown in B5 or WPM, both supplemented with growth regulators: PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA_3 (0.5 mg/L), after 6 weeks of culture.

Medium	Taxol	BIII	10-DAB III	10-DAT	Total
B5	50	38.06	8.73	80.82	177.61
WPM	24	22.03	16.02	23.87	85.92

BIII baccatin III, 10-DAB III 10-deacetyl baccatin III, 10-DAT 10-deacetyl taxol,

The production of taxol and related taxanes obtained in *T. baccata* callus cultures was double that reported by BARRIOS et al. (2009), and significantly higher than that reported by FILOVÁ et al. (2011).

Optimizing the inoculum size in T. baccata cell suspensions

To establish *T. baccata* cell suspensions with good growth, three different inoculum sizes (50, 100 and 150 g FW/L) were assayed in WPM. During 30 days, the color of the cultures was observed to change from light yellow to reddish. This effect was especially noticeable when the inoculum was 100 and 150 g FW/L, together with the formation of green-brown cell aggregates. In cultures started with the higher inocula (100 and 150 g FW/L), the biomass increased very little during the 30-day period, the highest growth being only 18.5 % of the maximum achieved by cell cultures inoculated with 50 g FW/L. The GI corresponding to cell suspensions inoculated with 50 g/L of cells was 6.5, with a dt of 3.9 days.

All three cultures showed a capacity to produce taxol and related taxanes. Table 2 presents the highest levels obtained of each taxane and their respective volumetric productivities. In cell cultures inoculated with 50 g FW/L of biomass, volumetric productivities were higher (except for 10-deacetyl baccatin III and 10-deacetyl taxol) than those of the other inoculum sizes studied and the 5 target taxanes were only found with this inoculum (Table 2). Moreover, when using 50 g of cells, the highest taxane content was generally obtained earlier than when starting with 100 and 150 g FW/L of cells (data not shown). Taxane excretion, although always very low, was also higher with the inoculum of 50 g FW/L (data not shown).

Tab. 2 Effect of inoculum size (FW) on taxane production in *T. baccata* cell suspension cultures.

Inoculum g FW/L	Taxol µg/L	Baccatin III µg/L	10-DAB III µg/L	10-DAT µg/L
50	62.98	125.57	515.39	135.25
100	50.76	149.58	454.75	879.56
150	35.59	64.24	689.45	1008.25

10-DAB III 10-deacetyl baccatin III, 10-DAT 10-deacetyl taxol

Effect of methyl jasmonate (MeJ) elicitation on T. baccata cell suspensions

To study the effect of the elicitor methyl jasmonate (MeJ) (100 µM) on growth and taxane production and the interaction between the elicitor and the basal medium contents, *T. baccata* cell cultures were established in WPM and B5, with and without MeJ. The WPM and B5 media used for the control cultures turned green-brown, which lasted throughout the experiment, whereas those of the elicited cultures remained pale yellow. The biomass corresponding to the WPM cultures turned brown with time in all the conditions assayed, in contrast with cells maintained in B5, which did not darken in either control or elicited conditions. This change in the color of the cultures, also reported in other *Taxus species*, was mainly due to the intracellular accumulation of phenolic compounds, which was provoked by submitting the cultures to nutritional stress. In our case, the cell suspension cultures grown in WPM produced the highest quantity of phenolic compounds, which were then excreted to the medium.Cell suspensions in WPM without elicitation presented a lag phase of 3 days and continued growing until the end of the experiment, whereas the presence of the elicitor dramatically inhibited the increase of biomass. The dt in control cultures was 2.32 days and the GI was 6.14, whereas in the MeJ-treated cultures the dt was 3.06 days and the GI 0.77. Cultures grown in B5 medium did not present significant differences between the control and elicited conditions, the increase of biomass being very low throughout in both cases.

Taxane production in cell suspensions of T. baccata

Table 3 shows the contents and productivity of the total taxanes studied (cell-associated plus extracellular) in *T. baccata* cell cultures grown in WPM or B5, with or without MeJ. As can be seen, taxol production was most induced by the effect of WPM supplemented with MeJ. In WPM the highest total taxol content was observed at day 14: 185.35 µg/L, with a productivity of 13.239 µg/L day^{-1}. The taxol precursors 10-deacetyl baccatin III (658.97 µg/L) and baccatin III (172.98 µg/L) also accumulated at the highest concentration at day 20, together with 10-deacetyl taxol (259.75 µg/L),

which was excreted in its entirety into the medium. In summary, productivity in control conditions was higher in WPM than in B5 for all the taxanes studied except baccatin III. The elicitation of taxane production by MeJ in vitro has been extensively reported for other *Taxus* species (BONFILL et al., 2006).

Tab. 3 Influence of the culture conditions on taxane production in *T. baccata* cell suspension cultures.

Culture conditions	Time[a] (days)	Concentration (µg/L)	Productivity (µg/L d^{-1})
Taxol			
WPM-C	14	68.25	4.875
WPM-MeJ	14	185.35	13.239
B5-C	14	17.75	1.268
B5-MeJ	20	31.56	1.578
Baccatin III			
WPM-C	20	138.56	6.928
WPM-MeJ	20	172.98	8.649
B5-C	14	83.46	5.961
B5-MeJ	14	104.72	7.480
10-Deacetyl baccatin III			
WPM-C	14	499.99	35.714
WPM-MeJ	14	658.97	47.069
B5-C	20	70.59	3.529
B5-MeJ	20	38.95	1.948
10-Deacetyl taxol			
WPM-C	14	216.25	15.446
WPM-MeJ	14	259.75	18.554
B5-C	14	91.45	6.532
B5-MeJ	14	33.85	2.417

Highest taxane concentration (cell-associated plus extracellular taxane contents) and productivity, days of culture when the highest taxane production was achieved WPM-C Control WPM, WPM-MeJ WPM supplemented with MeJ (100 µM), B5-C Control B5 medium, B5-MeJ B5 medium elicited with MeJ (100 µM)
[a] Time in which occurs the greater production of the different taxanes, by the effect of each culture conditions

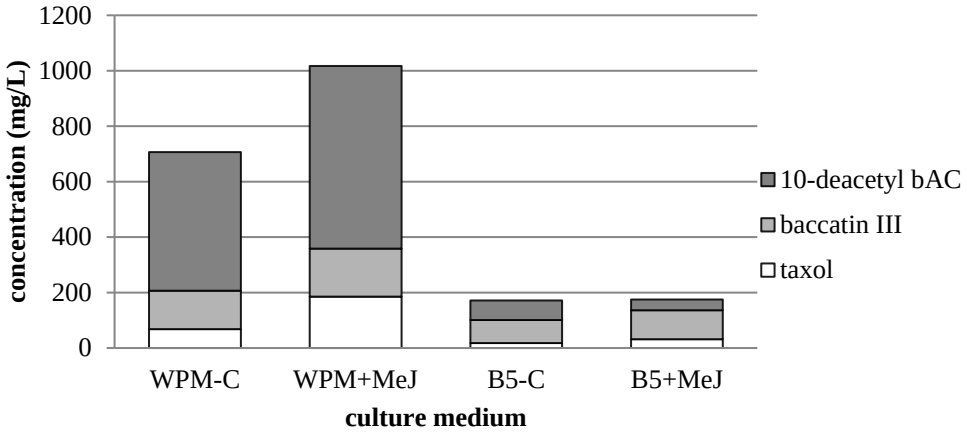


Fig. 2 Effect of culture media WPM and B5 and MeJ elicitation on taxol production in *T. baccata* cell suspensions. WPM-C, B5-C: Cultures grown in WPM and B5 medium without elicitation; WPM MeJ and B5-MeJ: Cultures grown in WPM and B5 medium supplemented with MeJ (100 µM). Data represent average values from three separate experiments ± SD, *p\0.0001.

The best culture conditions for producing taxol (Figure 2) were found to be WPM supplemented with MeJ. The taxol level achieved in these conditions was 3.4 higher than in the same medium without elicitation and over 9 times higher than in the cultures grown in B5, elicited or not. Moreover, in WPM MeJ elicitation increased the productivity of taxol and baccatin III, but not the other 3 taxanes. However, the taxol biosynthesized by cells grown in WPM was not excreted to the medium. In contrast, cells grown in B5 excreted a high percent of all taxanes to the medium (Table 3), although their productivity was generally lower than in WPM medium (except for baccatin III). Briefly, the productivity increase of taxol and baccatin III was achieved using WPM-MeJ and of 10-deacetyl taxol and 10-deacetyl baccatin III using WPM without elicitation. Taxol production in *T. baccata in vitro* cultures has been studied by three other research groups. Furthermore, we increased the concentration of taxol 3.96-fold in cell suspensions, as well as that of baccatin III (4.22-fold), 10-deacetyl baccatin III (39.5-fold) and 10-deacetyl taxol (13.93-fold), mainly due to the use of WPM in combination with MeJ. Our taxol production was also similar to that reported for other *Taxus* species: 550 µg/L day^{-1} in *T. baccata* (HIRASUNA et al., 1996).

A rational approach might provide new insight into how the taxol biosynthetic pathway is regulated, with genetic and metabolic engineering techniques, differential genetic expression, transcription factors and key genes leading to higher taxol yields. One aspect to take into account is the mechanism of taxol excretion from cells, which could be enhanced by employing a two-phase culture system, so far not assayed in *T. baccata* cell suspensions (FILOVÁ, 2013). Future perspectives could be focused on the simultaneous use of empirical and rational approaches and assaying the two-phase culture system in order to develop a biotechnological system for high taxol production.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by project: Vybudovanie výskumného centra ,,AgroBioTech“, ITMS kód: 26220220180.

REFERENCES

ARIAS, Z.M., ANGARITA, V.M.J., AGUIRRE, C.A.M., RESTREPO, F.J.M., MONTOYA, V.C. 2009. Estrategias para incrementar la produccio´n de metabolitos secundarios en cultivos de ce´lulas vegetales. Rev Fac Nal Agr Medellin 62:4881–4895.

BARRADAS-DERMITZ, D.M., HAYWARD-JONES, P.M., MATA-ROSAS, M., PALMEROS-SANCHEZ, B., PLATAS-BARRADAS, O.B.J., VELA´ZQUEZ-TOLEDO, R.F. 2010. *Taxus globosa* S. cell lines: initiation, selection and characterization in terms of growth, and of baccatin III and paclitaxel production. Biocell 34:1–6.

BARRIOS, H., ZHANG, Y.L., SANDOVAL, C., XIAO, Z.A. 2009. Increase of taxol production in *Taxus globosa* shoot callus by chlorocholine chloride. Open Nat Prod J 2:33–37.

BONFILL, M., EXPOSITO, O., MOYANO, E., CUSIDO´, R.M., PALAZO´N, J., PIN˜OL, M.T. 2006. Manipulation by culture mixing and elicitation of paclitaxel and baccatin III production in *Taxus baccata* suspension cultures. In Vitro Cell Dev Biol Plant 42:422–426.

BRUNAKOVA, K., BABINCOVAZ, Z., TAKAC, M., CELLAROVA, E. 2004. Selection of callus cultures of *Taxus baccata* L. as a potential source of paclitaxel production. Eng Life Sci 4:465–469.

CAMERON, S., SMITH, R. 2008. Seasonal changes in the concentration of major taxanes in the biomass of wild Canada Yew (*Taxus canadensis* Marsh). Pharm Biol 46:35–40.

COPE, E.A. 1998. *Taxaceae*: the genera and cultivated species. Bot Rev 64:291–322.

CUSIDO´, R.M., PALAZO´N, J., BONFILL, M., NAVIA-OSORIO, A., MORALES, C., PIN˜OL, M.T. 2002. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. Biotechnol Prog 18:418–423.

DUNCAN, D.R., WIDHOLM, J.M. 1990. Measurements of viability suitable for plant tissue cultures. Methods Mol Biol 6:29–37.

EXPOSITO, O., SYKLOWSKA-BARAREK, K., MOYADO, E., ONRUBIA, M., BONFILL, M., PALAZON, J., CUSIDO´, R.M. 2010. Metabolic responses of *Taxus media* transformed cell cultures to the addition of methyl jasmonate. Biotechnol Prog 26(4):1145–1153.

FILOVÁ, A. 2013. Plant tissue cultures in pharmaceuticals. Acta biologica cracoviensia series botanica. 55, suppl. 2: 44.

FILOVÁ, A., ROVNÁ, K. 2011. Explantate culture of yew (*Taxus* sp.) as alternative production systems for taxane metabolites . Acta horticulturae et regiotecturae 14 (1): 19-23.

GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50:151–158.

GANEM, B., FRANKE, R.R. 2007. Paclitaxel from primary taxanes: a perspective on creative invention in organozirconium chemistry. J Org Chem 72:3981–7.

KETCHUM, R.E.B., GIBSON, D.M., GALLO, L.G. 1995. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew.Plant Cell Tissue Organ Cult 42:185–193.

KHOSROUSHAHI, A.Y., NADERI-MANESH, H., SIMONSEN, H.T. 2011. Effect of antioxidants and carbohydrates in callus cultures of *Taxus brevifolia*: evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production. BioImpacts 1(1):37–45.

MALIK, S., CUSIDO´, R.M., MIRJALILI, M.H., MOYANO, E., PALAZO´N, J., BONFILL, M. 2011. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspensio´n cultures: a review. Process Biochem 46:23–34.

MCCOWN, B.H., LLOYD, G. 1981. Woody Plant Medium (WPM)—a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. Hortic Sci 16:543.

MIHALJEVIC, S., BJEDOV, I., KOVAC, M., LAVANIC, D.L., JELASKA, S. 2002. Effect of explant source and growth regulators on in vitro callus growth of *Taxus baccata* L. Washingtonii. Food Technol Biotechnol 40:299–303.

NIMS, E., DUBOIS, C.P., ROBERTS, S.C., WALKER, E.L. 2006. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. Metab Eng 8:385–394.

PALAZO´N, J., CUSIDO´, R.M., BONFILL, M., MORALES, C. 2003. Inhibition of paclitaxel and baccatin III accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. J Biotechnol 101:57–63.

RICHHEIMER, S.L., TINNERMEIER, D.M., TIMMONS, D.W. 1992. Highperformance liquid chromatographic assay of taxol. Anal Chem 64:2323–2326.

SCHIFF, P.B., HORWITZ, S.B. 1979. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. Nature 277:665–667.

VAN ROZENDAAL, E.L.M., LELYVELD, G.P., VAN BEEK, T.A. 2000. Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related taxoids. Phytochemistry 53:383–389.

WANI, M., TAYLOR, H., WALL, M., COGGON, P., MCPHAIL, A. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc 93:2325–2327.

WICKREMESINHE, E.R.M., ARTECA, R.N. 1993. Taxus callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production. Plant Cell Tissue Organ Cult 35:181–193.

Adresa autora

Ing. Angelika Filová, PhD., Katedra fyziológie rastlín, FAPZ, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 16, 949 01 Nitra, E-mail: angela.filova@uniag.sk

MIKROPROPAGÁCIA INTRODUKOVANÝCH DRUHOV DROBNÉHO OVOCIA: *AMELANCHIER ALNIFOLIA*

MICROPROPAGATION OF INTRODUCED SMALL FRUIT SPECIES: *AMELANCHIER ALNIFOLIA*

ALENA GAJDOŠOVÁ – JÚLIA HUNKOVÁ – GABRIELA LIBIAKOVÁ

GAJDOŠOVÁ, A. – HUNKOVÁ, J. – LIBIAKOVÁ, G. 2016**.** Mikropropagácia introdukovaných druhov drobného ovocia: *Amelanchier alnifolia*. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 90-93. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Genus *Amelanchier* represents less known group of deciduous shrubs and smaller trees belonging into Rosaceae family. The genus involves totally around 25 species which can be devided according to their occurence on North American, Asian and European. Species *Amelanchier alnifolia* is native to North America but there are also the proper conditions for its growing on Slovak territory. However, its commercial cultivation is not yet spread in Slovakia. Some of the reasons are lack of information on this species and unavailability of the planting material. In our work, we focused on elaboration of system for *Amelanchier* propagation *in vitro* using dormant buds as primary explants. From the 4 tested medium variants, Murashige and Skoog medium supplemented with 1 $mg.l^{-1}$ BAP, 0.1 $mg.l^{-1}$ IBA and 0.1 $mg.l^{-1}$ GA_3 was the best for shoot multiplication.

Key words: *Amelanchier alnifolia*, dormant buds, micropropagation

ÚVOD

Slovensko je krajinou s rozmanitými prírodnými podmienkami. Krajina je situovaná v miernom podnebnom pásme, ale klíma je lokálne významne ovplyvňovaná nadmorskou výškou a typom reliéfu. Prírodné podmienky Slovenska vytvárajú vhodné podmienky pre introdukciu rastlín mierneho pásma (PORHAJAŠ 2003). *Amelanchier* spp. (muchovník) je stále málo známa skupina opadavých kríkov a menších stromov, ktoré sú nielen dekoratívne, ale zároveň aj užitočné svojimi jedlými plodmi. Muchovníky sa radia do čeľade *Rosaceae* - ružovité (CATLING, MITROW 2006) a obsahujú viac ako 20 rôznych druhov. Jednotlivé druhy muchovníka je možné rozdeliť podľa výskytu na severoamerické, ázijské a európske (FRALISH, FRANKLIN 2002). V poslednom desaťročí sa zvýšil záujem o pestovanie muchovníkov práve pre ich dekoratívny vzhľad a atraktívne plody. Vysádzajú sa v záhradách ako okrasné kry alebo živé ploty, kvitnúce na jar početnými bielymi kvetmi. Niektoré druhy muchovníka majú jedlé a veľmi chutné plody podobajúce sa čučoriedkam. Najrozšírenejším jedlým druhom je *Amelanchier alnifolia*. Plodom je malvica, ktorá má v zrelosti tmavo červenú, fialovú až čiernu farbu. Plody sa vyznačujú vysokou nutričnou hodnotou (OCHMIAN et al. 2013; ROP et al. 2013). *Amelanchier alnifolia* pochádza pôvodne zo Severnej Ameriky, ale aj na našom území sú vhodné podmienky pre jeho pestovanie. Muchovník je mimoriadne mrazuvzdorná rastlina, v prípade *A. alnifolia* bola zaznamenaná odolnosť až do -45°C (JUNTTILA et al. 1983). Napriek všetkým týmto benefitom je muchovník, ako netypické ovocie na Slovensku, prakticky neznámy a jeho pestovanie nie je rozšírené. Jedným z dôvodov je aj nedostatok sadbového materiálu širšieho sortimentu odrôd. Riešením problému môže byť práve využitie pletivových kultúr, ktoré umožňuje efektívne množenie veľkého množstva genotypovo identických rastlín v podmienkach *in vitro*.

MATERIÁL A METÓDY

Ako primárne explantáty sme použili dormantné púčiky *Amelanchier alnifolia* (Nutt.) var. *cusickii* odobraté v októbri 2013 v lokalite Nitra. Púčiky sme sterilizovali 1 min. v 70% EtOH, 5 min

v 0,1% $HgCl_2$ a premyli 3 x 10 min v sterilnej destilovanej H_2O. Kultivácia prebiehala v Petriho miskách (60 mm priemer) v kultivačnej miestnosti pri 22°C, fotoperióde 16h a intenzite svetla 50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Pre založenie *in vitro* kultúr sme ako iniciačné médium použili Murashige a Skoog médium (MURASHIGE, SKOOG 1962) s obsahom 1 $mg.l^{-1}$ BAP. Získané *in vitro* výhonky sme použili pre testovanie vplyvu zloženia kultivačného média na multiplikáciu výhonkov. Testovali sme Murashige a Skoog (1962) médium a modifikované Murashige a Skoog médium (VAN DER SALM et al. 1994), ktoré sa líšili zdrojom železa (označené ako MS 30 a MS 30 mod.). Média boli doplnené 30 $g.l^{-1}$ sacharózy, 8 $g.l^{-1}$ fytoagaru a rôznymi variantami rastových látok pre proliferáciu výhonkov (Tab. 1) pri pH média 5,7. Explantáty sme inkubovali v plastových kultivačných nádobách v počte 6 explantátov/nádobu. Všetky varianty boli sledované súbežne a celkovo bolo vysadených 30 explantátov pre každú variantu média. Zakoreňovanie prebehlo na médiu s 1 $mg.l^{-1}$ IBA, pričom na úspešné zakorenenie bola potrebná minimálne mesačná inkubácia na médiu. Hodnotili sme počet výhonkov vytvorených na explantát po 6 týždňoch kultivácie. Výsledky boli štatisticky spracované pomocou analýzy rozptylu programom Statgraphics 6 na 95% hladine významnosti ($P<0,05$).

Tab. 1 Média pre testovanie proliferácie výhonkov pri *A. alnifolia.*

Variant média	**Rastové látky ($mg.l^{-1}$)**			
	BAP	IBA	GA_3	NAA
1) MS 30 mod.	1	1	-	-
2) MS 30	0,5	0,5	-	-
3) MS 30	1	0,1	0,1	-
4) MS 30	0,5	-	-	0,5

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnotenie multiplikácie výhonkov na 4 rôznych variantoch média ukázalo, že najvyšší celkový počet výhonkov (298 výhonkov) bol získaný na médiu MS 30 s 1 $mg.l^{-1}$ BAP, 0,1 $mg.l^{-1}$ IBA a 0,1 $mg.l^{-1}$ GA_3 (variant 3). Na MS 30 médiu s 0,5 $mg.l^{-1}$ BAP a 0,5 $mg.l^{-1}$ NAA (variant 4) bola zaznamenaná tvorba najnižšieho celkového počtu výhonkov (106 výhonkov). Celkový počet výhonkov vytvorených na médiu MS 30 mod. s 1 $mg.l^{-1}$ BAP a 1 $mg.l^{-1}$ IBA (variant 1) bol 219 a na médiu MS 30 s 0,5 $mg.l^{-1}$ BAP a 0,5 $mg.l^{-1}$ IBA (variant 2) bolo celkovo vytvorených 176 výhonkov.

Z výsledkov štatistického hodnotenia (Tab. 2) jasne vyplýva, že z testovaných médií je variant média 3 s pridaním rastovej látky GA_3 štatisticky preukazne najvhodnejší pre proliferáciu výhonkov pri *Amelanchier alnifolia* v porovnaní so všetkými ostatnými variantmi. Rozdiely medzi variantmi M1 a M2 neboli štatisticky preukazné, čo naznačuje, že koncentrácie BAP a IBA (1 $mg.l^{-1}$ alebo 0,5 $mg.l^{-1}$ rovnako pri oboch typoch hormónov) v pomere 1:1 nemajú zásadne rozdielny vplyv na proliferáciu výhonkov, avšak sú štatisticky preukazne rozdielne oproti variantu média 3 a 4. Nahradenie auxínu IBA auxínom NAA vo variante média 4 ukázalo, že NAA nie je vhodným typom auxínu pre proliferáciu výhonkov pri *Amelanchier alnifolia*.

Naše získané výsledky zodpovedajú publikovaným prácam, ktoré sa zaoberajú problematikou mikropropagácie *Amelanchier* spp. DU et al. (2011) dosiahli multiplikáciu výhonkov pri mikropropagácii *A. alnifolia* použitím IAA (namiesto IBA) v nízkych koncentráciách (0,1 $mg.l^{-1}$) v kombinácii s 2 $mg.l^{-1}$ BAP. Je známe, že kyselina giberelová podporuje iniciáciu, rast a multiplikáciu výhonkov (SAHOO, CHAND 1998) rovnako, ako sa to prejavilo v našom experimente. Po pridaní GA_3 do média sme získali najviac výhonkov na explantát v porovnaní s inými typmi médií (Obr. 1 A,B). Rovnaké výsledky dosiahli aj GONBAD et al. (2014) ktorí pozorovali pozitívny účinok GA_3 v kombinácii s BAP na proliferáciu a rast výhonkov iniciovaných z nodálnych segmentov pri *Camellia sinensis*.

PRUSKI et al. (1990) použili pre proliferáciu výhonkov *A. alnifolia* MS médium so samotným BAP v koncentrácii 2-3 mg.l^{-1}, zatiaľ čo v našich pokusoch sa koncentrácia 1 mg.l^{-1} BAP javí ako dostatočná. Na rozdiel od našich výsledkov, LINEBERGER (1981) úspešne použil pre multiplikáciu výhonkov *A. laevis* auxín 0,1 mg.l^{-1} NAA v kombinácii s 2,5 mg.l^{-1} BAP.

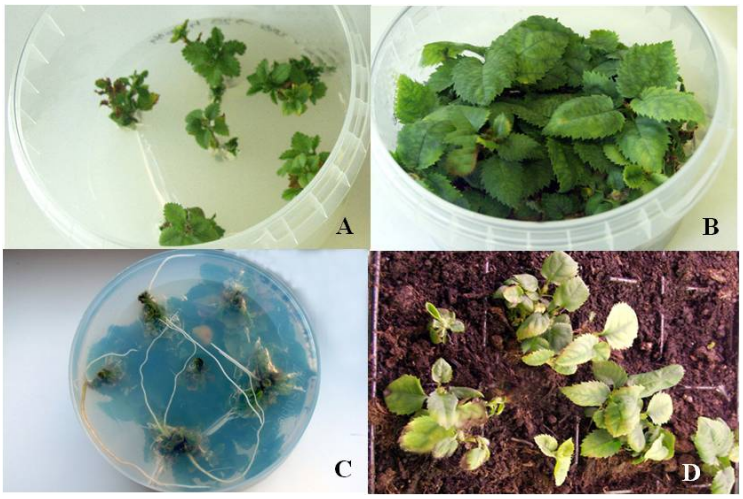
Tab. 2 Vplyv variantov média na priemerný počet výhonkov na explantát hodnotený analýzou rozptylu.

Variant média	n	Priem.počet výh. /expl.	Homogénne skupiny
M4	30	3,53	x
M2	30	5,87	x
M1	30	7,30	x
M3	30	9,93	x

	Rozdiely	+/- limity
M1-M2	1,43333	2,26062
M1-M3	2,63333	2,26062 *
M1-M4	3,76667	2,26062 *
M2-M3	4,06667	2,26062 *
M2-M4	2,33333	2,26062 *
M3-M4	6,40000	2,26062 *

* označuje štatisticky preukazné rozdiely

Zakorenenie výhonkov v našom experimente bolo dosiahnuté na MS 30 médiu s 1 mg.l^{-1} IBA v hodnote okolo 35 % (Obr. 1 C), zatiaľ čo PRUSKI et al. (1990) a tiež PINKER a WAGNER (2004) použili NAA v koncentrácii 0,2-2 mg.l^{-1} pre zakoreňovanie výhonkov *A. alnifolia* a *A. lamarckii*. Problémom pri mikropropagácii ako aj pri zakoreňovaní odrezkov *Amelanchier* spp. je prekonanie dormancie a pokračovanie rastu už zakorenených rastlín (Obr. 1 D). PRUSKI et al. (1990) úspešne využili 0,2 mg.l^{-1} GA_3 na prekonanie dormancie novo zakorenených mladých rastlín *A. alnifolia*, čo plánujeme otestovať aj v našich nasledujúcich experimentoch.



Obr. 1 Explantáty *A. alnifolia* počas multiplikačnej fázy (A, B); zakladanie koreňov *in vitro* (C); rastlinky v *ex vitro* podmienkach (D).

ZÁVER

Cieľom práce bolo vypracovať systém pre množenie *A. alnifolia v in vitro* podmienkach. Ako najefektívnejšie médium sa ukázalo byť MS 30 doplnené o 1 mg.l^{-1} BAP, 0,1 mg.l^{-1} IBA a 0,1 mg.l^{-1} GA_3.

Publikované údaje o mikropropagácii *A. alnifolia* sú veľmi limitované a väčšinou staršieho dáta, preto je potrebné doplniť v tejto oblasti ďalšie informácie najmä týkajúce sa problému dormancie už zakorenených rastlín.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla s finančnou podporou projektu VEGA 2/0140/14 a projektu Európskeho spoločenstva: Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech", projekt číslo 26220220180.

LITERATÚRA

CATLING, P.M., MITROW, G. 2006. Regional variation in *Amelanchier* in the Whitewood area of southeastern Saskatchewan and the first Saskatchewan records of *Amelanchier sanguinea*. Can Field Nat. 120 (4): 428–432.

DU, B. G., YANG, F. L., YANG, T. X., WEI, A. Z. 2011. Experiment of rooting culture and transplantation of *Amelanchier alnifolia* Nutt. *Northern Hortic.* 16: 056.

FRALISH, J.S., FRANKLIN, S.B. 2002. Taxonomy and ecology of woody plants in North American forests (excluding Mexico and subtropical Florida). John Wiley & Sons, New York, p. 342

GONBAD, R.A., SINNIAH, U.R., AZIZ, M.A., MOHAMAD R. 2014. Influence of Cytokinins in Combination with GA3 on Shoot Multiplication and Elongation of Tea Clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). The Scientific World Journal, Vol. 2014, Article ID 943054, p. 1-9, http://dx.doi.org/10.1155/2014/943054

JUNTTILA, O., C. STUSHNOFF, and L.V. GUSTA 1983. Dehardening in flower buds of saskatoon-berry, *Amelanchier alnifolia*, in relation to temperature, moisture content, and spring bud development. Can. J. Bot. 61: 164-170.

LINEBERGER, R.D. 1981. Shoot tip culture of *Amelanchier laevis*. Ohio Agric Res Dev Center Res. Circ. 263: 17-19.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum, 15(3): 473-497.

OCHMIAN, I., KUBUS, M., DOBROWOLSKA, A. 2013. Description of plants and assessment of chemical properties of three species from the *Amelanchier* genus. Dendrobiology, 70: 59-64.

PINKER, I., WAGNER, T. 2004. Stem development of *Amelanchier lamarckii* (F.G. Schroeder) *in vitro* and its importance for *in vitro* rooting. Prop Orn Plants, 4(1): 53-57.

PORHAJAŠ, V. 2003. Perspektívy pestovania čučoriedky chocholíkatej na Slovensku (Perspectives of the canadian blueberries cultivation in Slovakia). In: Faktory podnikovej úspešnosti 2003: zborník z medzinárodnej vedeckej konferencie. Nitra: SPU. ISBN: 80-8069-434-6, s. 371.

PRUSKI, K. NOWAK, J., GRAINIER, G. 1990. Micropropagation of four cultivars of Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). Plant Cell Tiss Org. 21(2): 103-109.

ROP, O., MLCEK, J., JURIKOVA, T., SOCHOR, J., KIZEK, R. 2013. Antioxidant properties of saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) fruits. Fruits, 68 (5), pp. 435-444.

SAHOO, Y., CHAND, P.K. 1998. Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. Plant Cell Reports, v.18, n.3-4, p.301-307.

VAN DER SALM TPM, VAN DER TOORN CJG, HÄNISCH TEN CATE CHH, DUBOIS LAM, DE VRIES DP, DONS JJM 1994. Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida*L. 'Moneyway'. Plant Cell Tiss Organ Cult 37: 73–77.

Adresa autorov

RNDr. Alena Gajdošová, CSc, Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra,
Tel: 037 6943 315 , e-mail: alena.gajdosova@savba.sk
Mgr. Júlia Hunková, Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra,
Katedra molekulárnej biológie, PriF UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Tel: 037 6943 314,
e-mail: julia.hunkova@savba.sk
RNDr. Gabriela Libiaková, CSc., Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra,
Tel: 037 6943 315, e-mail: gabriela.libiakova@savba.sk

KRÍŽITEĽNOSŤ DRUHOV *PINUS SYLVESTRIS* L., *PINUS MUGO* TURRA A ICH PREDPOKLADANÝCH HYBRIDNÝCH ROJOV

CROSABILITY BETWEEN *PINUS SYLVESTRIS* L., *PINUS MUGO* TURRA AND THEIR HYBRID SWARMS INDIVIDUALS

MARTIN GALGÓCI – ANDREJ KORMUŤÁK – DENISA SÚKENÍKOVÁ – EVA TOKOŠOVÁ – DUŠAN GÖMÖRY

GALGÓCI, M. – KORMUŤÁK, A. – SÚKENÍKOVÁ, D. – TOKOŠOVÁ, E. – GÖMÖRY, D. 2016. Krížiteľnosť druhov *Pinus sylvestris* L., *Pinus mugo* Turra a ich predpokladaných hybridných rojov. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 94-99. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Crossability relationships between Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and mountain dwarf pine (*P. mugo* Turra) was studied using artificial pollination approach. Partial compatibility of the reciprocal crossings of these species was proved experimentally validating the idea of a spontaneous formation of their hybrid swarms in nature. Based on percentage of filled seeds, the interspecific crossings lagged profoundly behind the controlled outcrossings of *P. sylvestris* and *P. mugo* species and behind the quality of their offspring from open pollination. Both species were found to intercross readily with individuals of their putative hybrid swarm. *P. mugo* has exhibited a higher hybridological affinity towards putatively hybrid individuals than *P. sylvestris*.

Key words: Crossability. *Pinus sylvestris* L. *Pinus mugo* Turra. Seed quality.

ÚVOD

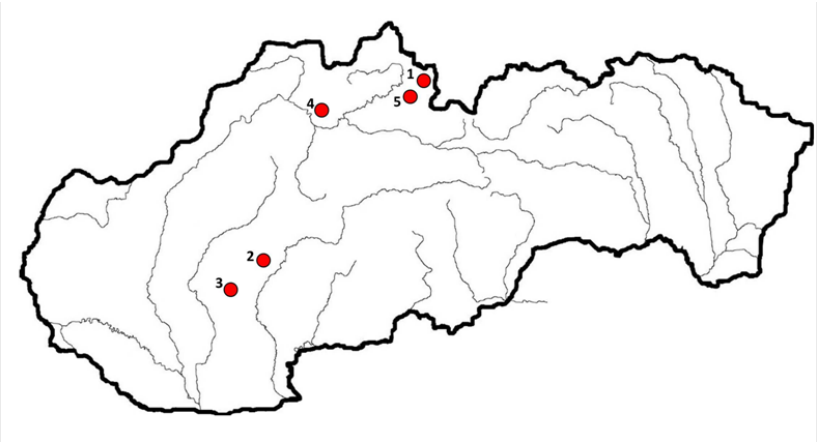
Reprezentatívnou črtou v rámci rodu *Pinus* je nepravidelný charakter hybridologických vzťahov medzi jednotlivými zástupcami tohto rodu. Druhy patriace do taxonomicky vzdialených skupín sa často pomerne dobre krížia a naopak. Z tohto pohľadu môžeme hovoriť o nerovnako vyvinutých reprodukčných bariérach (MIRROV 1967). Tento koncept možno aplikovať aj na príklade druhov borovice lesnej (*Pinus sylvestris*, L.) a borovice horskej (*Pinus mugo* Turra), ktoré spolu s borovicou limbou (*Pinus cembra* L.) patria medzi naše jediné autochtónne druhy borovíc. Druhy *P. sylvestris* a *P. mugo* patria taxonomicky do podrodu *Diploxylon*, zatiaľ čo borovica limba do sekcie *Strobus* (LITTLE, CRICHHFIELD 1969). Druhy *P. sylvestris* a *P. mugo* sú síce taxonomicky veľmi príbuzné, avšak ekologicky v prevažnej miere značne diferencované, nakoľko v ich areáli výskytu sú v tomto ohľade alopatrické. Výškové rozmiestnenie borovice lesnej sa pohybuje v rozmedzí 200 až 1465 m n. m (FUTÁK et al. 1966), kým areál výskytu borovice horskej je zasadený do vyšších nadmorských výšok v rozmedzí 1400 až 1800 m n. m. (SOMORA, 1981). Avšak na severnom Slovensku existujú endemické mikropopulácie týchto dvoch druhov rastúce na rovnakých stanovištiach, takže ich areály sú sympatrické. V tomto prípade na tzv. hybridných zónach dochádza k procesom spontánnej hybridizácie oboch spomínaných druhov. V hybridných rojoch dochádza k spätnému kríženiu hybridov s jedným alebo druhým rodičovským druhom v rôznom rozsahu. Uvedený proces introgresívnej hybridizácie výraznou mierou prispieva k variabilite hybridogénnych populácií (ANDERSON 1949). Hybridné roje predstavujú v tomto ohľade plynulé prechody od druhu *Pinus sylvestris* L. až po *Pinus mugo* Turra. Viaceré pokusy s umelou hybridizáciou potvrdili, že tieto druhy produkujú životaschopné hybridy (MARCET 1967, KORMUŤÁK et al. 2005, WACHOVIAK et al. 2005). Existenciu spontánnych hybridov medzi *P. mugo* a *P. sylvestris* predpokladal už v druhej polovici 19. storočia CHRIST (1864). V súčasnej dobe sa k všeobecne uznávaným lokalitám výskytu predpokladaných hybridných rojov zaraďujú Rila Planina a Rodopy v Bulharsku (DOBRINOV 1965), švajčiarske Alpy (NEET-SARQUEDA et. al. 1988), Šumava v Českej republike, lokalita Zywiec v Poľsku a

ďalšie (WACHOVIAK et al. 2005) a nižšie uvedené lokality na Slovensku. Podľa BUSINSKÉHO (1999) kontaktné zóny sú zaujímavé po taxonomickej aj genetickej stránke. Z genetického uhla pohľadu predstavujú intermediárny stupeň divergencie jednotlivých populácií až po úroveň úplnej speciácie (HEWITT 1988).

Kontaktné zóny výskytu týchto druhov sa nachádzajú na doteraz zopár známych stanovištiach na Slovensku. Jednou z nich je lokalita Sokolie (Obšívanka) v Malej Fatre, ktorá predstavuje skalnatý biotop vápencových brál. Naopak lokality ako Habovka (Medzi Bormi), Tisovnica, Suchá Hora predstavujú biotopy kyslých rašelinísk. Hybridný charakter týchto populácií sa výrazne podieľa na ich reprodukčnom správaní, ktoré podrobnejšie analyzujeme v predloženej práci.

MATERIÁL A METÓDY

Ako materiál v predloženej štúdii sme použili hybridné roje borovice horskej *Pinus mugo* Turra a borovice lesnej *Pinus sylvestris* L., ktoré prirodzene rastú na rašelinisku Severného Slovenska na lokalite „Medzi bormi“ (v nadmorskej výške 815 m n. m.) blízko Zuberca. Jedince *Pinus sylvestris* L. využité v hybridizačnom experimente pochádzali z lokalít Oravice, Veľká Lehota, ako aj z Arboréta Mlyňany SAV vo Vieske nad Žitavou. Jedince *P. mugo* Tura pochádzali z lokality ich spontánneho výskytu Vrátna Dolina v Malej Fatre a z umelej výsadby *P.mugo* z Arboréta Mlyňany. Prehľad jednotlivých lokalít výskytu analyzovaných jedincov je graficky znázornený na Obr. 1.



Obr. 1 Lokality výskytu populácií *Pinus sylvestris* L., *Pinus mugo*, Turra., a ich predpokladaných hybridných rojov použitých v umelom hybridizačnom procese.

Umelá hybridizácia

Experimenty s umelou hybridizáciou boli uskutočnené v roku 2013, štandardným postupom využívaným pri opeľovaní ihličnanov. Samičie strobily materských stromov boli izolované s papierovými vreckami 3 až 5 dní pred receptivitou strobilov. Samičie strobily boli následne opelené pomocou mäkkého štetca peľom. Pred uskutočnením samotného procesu opeľovania bol peľ otestovaný *in vitro* na parametre jeho kvality. Počas opeľovania boli izolátory z vetiev s makrostrobilmi odstránené a po opelení študovaným peľom, následne späť zaizolované. K definitívnemu odstráneniu izolátorov došlo po uzavretí receptívnych makrostrobilov, ktoré boli opeľované resp. uzavreté v izolátore. Následne prebiehal vývin v už uzavretom makrostrobile v časovom horizonte približne dvoch týždňov po opelení. V rámci experimentu sme sa zamerali predovšetkým na kríženie *P. sylvestris* a *P. mugo* a ich spätné kríženie, kríženie predpokladaných hybridných rojov, rovnako ako aj na ich samoopelenie, kontrolované cudzoopelenie a voľné opelenie. V tomto štádiu pokusu bol zaznamenaný počet opelených samičích strobilov jednotlivých variant kríženia. Materské stromy *P. mugo* č. 2, 3 a 4 boli opelené peľom *P. uncinata* a tiež peľom dvoch jedincov hybridných rojov z lokality „Medzi Bormi“ (hybrid č. 3 a 6). Štyri materské stromy hybridných rojov v Zuberci (Medzi Bormi) boli opelené peľom z jedincov *P. sylvestris* a *P. mugo* a peľom jedinca č.

6 hybridného charakteru z tejto lokality. Prehľad jednotlivých variant kríženia so získanými výsledkami podáva Tab. 1.

Tab. 1 Výsledky umelej hybridizácie jednotlivých materských stromov *P. sylvestris*, *P. mugo* a ich predpokladaných hybridných rojov.

Kríženie	Opelené samičie strobily	Zozbierané šišky	Celkový počet semien	Počet semien na šišku	Plné semená (%)
P. sylvestris 1 – samoopelenie	49	27	205	7.5	3.2
P. sylvestris 1 × *P. sylvestris* 2	59	46	935	20.3	100.0
P. sylvestris 1× *P. mugo* 5	158	128	855	6.6	16.9
P. sylvestris 2 – samoopelenie	44	13	308	23.6	12.5
P. sylvestris 2 × *P. sylvestris* 3	45	17	509	29.9	93.4
P. sylvestris 2 × *P. mugo* 5	88	22	160	7.2	15.6
P. sylvestris 2 – voľné opelenie	0	23	693	30.1	64.1
P. sylvestris 3 – samoopelenie	14	9	83	9.2	11.0
P. sylvestris 3 × *P. mugo* 5	63	12	13	1.0	0
P. sylvestris 3 – voľné opelenie	0	21	582	27.7	21.0
P. mugo 1 – samoopelenie	21	18	821	45.6	61.7
P. mugo 1 × *P. mugo* 4	25	22	589	26.7	62.5
P. mugo 1 × *P. sylvestris* 1	58	33	85	3.9	15.2
P. mugo 1- voľné opelenie	0	27	1506	55.7	48.9
P. mugo 2 – samoopelenie	74	72	662	9.2	51.7
P. mugo 2 × *P. mugo* 4	59	44	1021	23.2	82.9
P. mugo 2 × *P. sylvestris* 1	60	40	246	6.1	44.6
P. mugo 2 × *P. sylvestris* 2	68	52	27	0.5	0
P. mugo 2 × hybrid 3	26	25	222	8.8	29.7
P. mugo 2 × hybrid 6	93	63	304	4.8	40.0
P. mugo 2 × *P. uncinata*	57	57	945	16.5	50.0
P. mugo 2 – voľné opelenie	0	31	1743	56.2	60.4
P. mugo 3 – samoopelenie	31	11	312	28.3	57.1
P. mugo 3 × *P. sylvestris* 1	89	14	46	3.2	35.2
P. mugo 3 × hybrid 6	56	39	255	6.5	18.3
P. mugo 3 × *P. uncinata*	54	28	740	26.4	74.0
P. mugo 3 – voľné opelenie	0	45	2430	54.0	58.1
P. mugo 4 – samoopelenie	48	41	325	7.9	4.0
P. mugo 4 × *P. mugo* 1	37	36	1967	54.6	59.3
P. mugo 4 × *P. sylvestris* 2	16	9	8	0.8	0
P. mugo 4 × hybrid 3	52	36	1640	45.5	56.8
P. mugo 4 × *P. uncinata*	16	10	402	40.2	25.0
P. mugo 4 – voľné opelenie	0	27	1364	50.5	62.5
hybrid 2 – samoopelenie	6	2	40	20.0	5.0
hybrid 2 × *P. sylvestris* 2	5	5	43	8.6	77.5
hybrid 2 – voľné opelenie	0	8	152	19.0	13.7
hybrid 3 × *P. sylvestris* 1	15	2	2	1.0	50.0
hybrid 3 × *P. sylvestris* 2	16	5	22	4.4	22.4
hybrid 3 × hybrid 6	38	28	17	0.6	43.7
hybrid 3 – voľné opelenie	0	4	211	52.7	36.7
hybrid 5 – samoopelenie	19	10	219	21.9	60.9
hybrid 5 × *P. sylvestris* 1	11	3	7	2.3	0
hybrid 5 × *P. mugo* 5	28	19	304	16.0	84.7
hybrid 6 – samoopelenie	9	5	45	9.0	41.1
hybrid 6 × *P. sylvestris* 1	12	6	3	0.5	66.6
hybrid 6 × *P. mugo* 5	22	18	71	3.9	59.5
hybrid 6 – voľné opelenie	0	10	33	3.3	63.6

Hodnotenie kvality semien

Počet testovaných stromov kontrolných populácií rodičovských druhov *P. sylvestris* a *P. mugo* a predpokladaných hybridných rojov na lokalitách Medzi Bormi a Tisovnica bol v rozmedzí medzi 29 až 33. V prípade veľkej hybridnej populácie Sokolie a Suchá Hora počet vzoriek jednotlivých stromov bol 52 až 55. Priemerný počet šišiek varíroval medzi 20 až 34 z rodičovských populácií druhov a v hybridných populáciách sa pohyboval v rozmedzí 7 až 21. Šišky *P. mugo* hybridných rojov boli zbierané v mesiacoch september až október, kým šišky *P. sylvestris* koncom novembra rovnakého roku. Následne boli extrahované semená podrobené testom klíčivosti na papierovej vate v Petriho miskách pri teplote 25°C. Z každého stromu bolo použitých na test klíčivosti 150 semien. Počet semien na strom sa na lokalite Hruštín pohyboval medzi 52 až 150 semien, kým v hybridných rojoch v rozmedzí 28 až 150 semien na lokalite Zuberec, 21 až 150 semien v lokalite Tisovnica a 137 až 150 semien v Suchej hore a 20 až 150 semien na lokalite Sokolie. Súbežne s testom klíčivosti boli následne hodnotené neklíčiace semená, z ktorých sme hodnotili plne vyvinuté a nedovyvinuté semená.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Križiteľnosť

Úspešnosť medzidruhovej hybridizácie *P. sylvestris* × *P. mugo* bola testovaná s troma materskými stromami, pričom všetky boli opelené peľom druhu *P. mugo* (číslo 5). Oba materské stromy vykazovali produkciu plne vyvinutých semien v rozmedzí 16,9 až 15,6%. Hybridná kombinácia *P. sylvestris* 3 × *P. mugo* 5 produkovali nedovyvinuté semená (Tab. 1). Z celkového počtu 1028 získaných semien a 111 plne vyvinulo (10,8%). Samoopelenie materských stromov vykazovalo v dôsledku očakávaných zákonitostí znížený počet plne vyvinutých semien (3,2 až 12,5%). Zaujímavá je zistená skutočnosť, že varianty z kontrolovaného cudzoopelenia rozdielnych stromov mali všetky semená nedovyvinuté. V prípade hybridných kombinácií *P. sylvestris* 1 × *P. sylvestris* 2 a *P. sylvestris* 2 × *P. sylvestris* 3 vykazovali tiež veľmi vysokú mieru nedovyvinutých semien 93,4%. Tiež veľmi vysoká hodnota nedovyvinutých semien bola získaná v prípade kríženia druhov *P. sylvestris* 2 a *P. sylvestris* 3 z voľného opelenia (64.1% a 21.0%). Kvalita semien bola v istej korelácii s ďalším sledovaným ukazovateľom počtom semien na šišku jednotlivých variant kríženia, čo ilustruje Tab. 2. Zaujímavým zistením je miera percenta opadu samičích strobilov. Najvyššia bola zaznamenaná v prípade variantu zo samoopelenia (54,2%), nasledujú varianty *P. sylvestris* × *P. mugo* (47,6%) a kontrolované cudzoopelenie (39,5%, Tab.2).

Pri porovnaní *P. sylvestris* ako materského stromu a testovanými štyrmi jedincami *P. mugo* tiež ako materskými stromami, boli predpokladané hybridné roje v tomto ukazovateli prechodmi medzi týmito druhmi a *P. uncinata* . Zaujímavé zistenia boli v prípade skupiny *P. mugo* × *P. sylvestris* a ich spätného kríženia. Pri opelení *P. mugo* ako materského stromu 1,2 a 3 peľom *P. sylvestris 1* sa produkcia nedovyvinutých semien pohybovala v rozmedzí 15.2 % a 44.6 % (Tab. 2). Naopak vyššie zastúpenie plne vyvinutých semien bolo zaznamenané z opelenia *P. mugo* ako materského stromu č. 2 a 4 peľom *P. sylvestris* 2. Celkový počet zrelých zozbieraných šišiek bol 148 zo štyroch jedincov *P. mugo*. Variant kríženia *P. mugo* x *P. sylvestris* obsahoval 412 semien s 19,0% zastúpením plne vyvinutých semien (Tab. 2). *P. sylvestris*, zo samoopelenia a tiež *P. mugo* produkovali vysokokvalitné potomstvo s množstvom plne vyvinutých semien (51.7% a 61.7%). Výnimočný v tomto ohľade bol jedinec *P. mugo* č. 4 s 4,0% produkciou nedovyvinutých semien. Vysoká miera križiteľnosti bola zistená medzi *P. mugo* použitým ako materským stromom a predpokladanými hybridnými jedincami so zvyšujúcou sa mierou plne vyvinutých semien pri krížení *P. mugo* 2 × hybrid 3 (29.7%), *P. mugo* 2 × hybrid 6 (40.0%), *P. mugo* 3 × hybrid 6 (43.7%) a *P. mugo* 4 × hybrid 3 (56.8 %). O niečo vyššia miera križiteľnosti bola zistená medzi *P. mugo* použitého ako materského stromu č. 2, 3 a 4 a donorom peľu *P. uncinata* , ktorý produkoval 25.0 - 74.0% plne vyvinutých semien. Existencia korelácie medzi ukazovateľom plne vyvinutých semien a počtom semien na šišku znázorňuje Tab. 2.

Vysokú mieru percenta opadu vyvíjajúcich sa makrostrobilov sme zaznamenali s klesajúcou tendenciou pri krížení *P. mugo* × *P. sylvestris* (49.2 %) spolu s *P. mugo* × hybrid (28.2 %) a *P. mugo* × *P. uncinata* (25.2 %) (Tab. 2).

Tab. 2 Súhrnné údaje testovaných jedincov v hybridizačnom procese.

Varianty kríženia	Opelené samičie strobily	Zrelé šišky (zozbierané)	Opad makrostrobilov (%)	Celkový počet semien	Počet semien na šišku	Plné semená (%)
P. sylvestris – samoopelenie	107	49	54.2	596	13.4	8.9
P. sylvestris × *P. sylvestris*	104	63	39.5	1444	25.1	96.7
P. sylvestris × *P. mugo*	309	162	47.6	1028	4.9	10.8
P. sylvestris – voľné opelenie	0	44		1275	28.9	42.5
P. mugo – samoopelenie	174	142	18.4	2120	22.7	43.6
P. mugo × *P. mugo*	121	102	15.7	3577	34.8	68.2
P. mugo × *P. sylvestris*	291	148	49.2	412	2.9	19.0
P. mugo × hybrid	227	163	28.2	2166	16.4	36.2
P.mugo × *P. uncinata*	127	95	25.2	2087	27.7	49.6
P. mugo – voľné opelenie		130		7043	54.1	57.4
hybrid – amoopelenie	34	17	50.0	304	16.9	35.6
hybrid × *P. sylvestris*	59	21	64.5	77	3.3	43.3
hybrid × *P. mugo*	50	37	26.0	375	9.9	72.1
hybrid × hybrids	38	28	26.4	17	0.6	43.7
hybrids – voľné opelenie		22		396	25.0	38.0

Umelá hybridizácia predpokladaných hybridov s *P. sylvestris* a *P. mugo* je výsledkom ich vysokej miery krížiteľnosti. Na základe ukazovateľa počtu semien na šišku, spätné hybridy *P. mugo* a *P. sylvestris* vykazujú v tomto parametre hodnotu (3,3 a 9,9) semena na šišku, pričom počet plne vyvinutých semien na šišku sa pohyboval v rozmedzí (43.3% and 72.1%), v týchto ukazovateľoch je táto kombinácia efektívnejšia ako samoopelenie a voľné opelenie predpokladaných hybridov materských stromov (Tab. 2 a 3). Rozdiely v dĺžke šišiek jednotlivých variant kríženia, testovaných v tomto experimente, medzi *P. sylvestris* , *P. mugo* a ich domnelých hybridov neboli nájdené.

Viaceré práce sa zaoberajú umelou hybridizáciu medzi druhmi *P. mugo* a *P. sylvestris*. Morfometrickými charakteristikami ihlíc, tvarom šišiek, farbou púčiku ako charakteristických znakov na odlíšenie hybridov sa zaoberali práce (MARCET 1967; CHRISTENSEN AND DAR 1997, 2003). MOULALIS et al. (1976) vo svojich prácach popisuje efektivitu medzidruhovej hybridizácie medzi *P. sylvestris* a *P. mugo* na základe veľkosti šišiek a kvality semien. My sme v našej štúdii v porovnaní s ním získali o 6 % menší počet plne vyvinutých semien. Z 1051 analyzovaných semien bolo 10,8 % plne vyvinutých. Podobné výsledky získal v porovnaní s týmto autorom pri krížení 3 materských stromov KORMUTAK et al. (2005). Podobne WACHOVIAK et al. (2005) z umelého hybridizačného procesu zo 436 semien získal len 4 plné semená. Všetky tieto údaje potvrdzujú čiastočnú kompatibilitu spätného kríženia *P. mugo* × *P. sylvestris*. Variabilná miera krížiteľnosti spätného kríženia v tejto práci, môže poslúžiť na popis a charakteristiku rozdielnych hybridologických vzťahov rodičovských stromov zúčastnených v hybridizačnom procese. Nami získané výsledky potvrdzujú nekompletnú existenciu prezygotických reprodukčných bariér popísaných medzi zástupcami podrodu *Diploxylon* (KRIEBEL 1975). Pravdepodobne existuje obmedzený tok génov medzi spätnými krížencami *P. mugo* a *P. sylvestris.* Základom prezentovaných hybridologických údajov je čiastočná kompatibilita spätného kríženia medzi druhmi *P. mugo* a *P. sylvestris,* čo podporuje existenciu spontánnej hybridizácie v hybridných zónach, kde sa habitáty týchto druhov vzájomne prekrývajú. Umelá medzidruhová hybridizácia medzi spontánnymi hybridmi a rodičovskými druhmi *P. mugo* and *P. sylvestris* je vhodným nástrojom na popísanie evolučných fylogenetických vzťahov medzi týmito taxonomicky príbuznými druhmi a v neposlednom rade môže priniesť viac svetla na objasnenie vzťahov spontánnej medzidruhovej hybridizácie v hybridných zónach.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla za podpory projektu COST European Cooperation in Science and Technology, Brussel, projekt COST, FP 1106 projekt a operačný program Výskum a vývoj a Vývojového projektu ITMS 26220220192.

LITERATÚRA

ANDERSON, E. 1949. Introgresive hybridization. Wilrx snd Sons, New York, 109s

BUSINSKÝ R. 1999. Taxonomická studie agregátu *Pinus mugo* a jeho hybridních populací. Acta Průhoniciana 68: 123-144

CHRIST H. 1864. Beiträge zur Kenntnis europäischer *Pinus* - Arten. III. Die Formen der Pinus sylvestris des Ober-Engadins (Ctn. Graubünden). Flora 22:147-160

CHRISTENSEN K.I.., DAR G.H. 1997. A morphometric analysis of spontaneous and artificial hybrids of *Pinus mugo* × *sylvestris* (Pinaceae). Nord J Bot. 17 77-86

CHRISTENSEN K.I., DAR GH. 2003. A morphometric study of hybridization between *Pinus mugo* and *P. sylvestris* (Pinaceae). In: Mill RR (ed.), Proc. 4th IS on Conifer, Acta Hort 615:211-221

DOBRINOV I. 1965. Study on natural hybrids between *Pinus sylvestris* and *Pinus mugo* var. *mughus* in Bulgaria. Naučne Trudy Lesotechnitscheskoho Inst. 13:39-48 [In Bulgarian]

FUTÁK, J. JASIČOVÁ, M., SCHIDLAY, E. 1966. Flóra Slovenska II. Pteridophyta, Coniferophytina. Vydacvatelstvo SAV, 345s.

HEWITT, G.M. 1988. Hybrid zones - - natural laboratories for evolutionary studies. In: Tree, 3, s. 158-167.

KORMUTAK A., OSTROLUCKA M., VOOKOVA B., PRETOVA A., FECKOVA M. 2005. Artificial hybridization of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus mugo* Turra. Acta Biol Crac Ser Bot 47:129-134

KRIEBEL H.B. 1975. Interspecific incompatibility and inviability problems in forest trees. In: Proc 14th Meeting Can Tree Improv Assoc, August 28-30, 1973, Part 2, Fredericton, New Brunswick, Canada

LITTLE E.L., CRITCHFIELD W.B. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus* (Pines). U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C. Forest Service Miscellaneous Publication No. 1144

MARCET E. 1967. Über den Nachweis spontaner Hybriden von *Pinus mugo* Turra und *Pinus sylvestris* L. aufgrund von Nadelmerktmalen. Ber Schweis Bot Ges 77:314-361

MIROV N.T. 1967. The genus *Pinus*. The Ronald Press Company, New York

MOULALIS D., BASSIOTIS C., MITSOPOULOS D. 1976. Controlled pollinations among pine species in Greece. Silvae Genet 25:95-107

NEET-SARQUEDA C., PLUMETTAZ CLOT A.C., BÉCHOLEY I. 1988. Mise en évidence de l'hybridation introgressive entre *Pinus sylvestris* L. et *Pinus uncinata* DC. En Valais (Suisse) par deux méthodes multivariées. Bot Helv 98:161-169

SOMORA, J. 1981. Kosodrevina (Pinus mugo Turra) v Tatranskom národnom parku (rozšírenie, vzrastové formy). In Zborník prác o Tatranskom národnom parku, 22, s. 31-76

WACHOWIAK W, LEWANDOWSKI A, PRUS-GŁOWACKI W. 2005. Reciprocal controlled cross between *Pinus sylvestris* and *P. mugo* verified by a species-specific *cp*DNA marker. J Appl Genet 46:41-43

Adresa autorov

RNDr. Martin Galgóci, PhD., RNDr. Andrej Kormuťák, DrSc.,
Ústav Genetiky a Biotechnológií rastlín SAV, Akademická 21, P.O. Box 39 A, 950 07 Nitra, e-mail: dactylorhiza.incarnata@gmail.com
Mgr. Denisa Súkeníková, Mgr. Eva Tokošová
Katedra Botaniky a Genetiky, Fakulta Prírodných vied, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 74 Nitra
Prof. Ing. Dušan Gömöry, DrSC
Katedra fytológie, Lesnícka fakulta, Technická univerzita vo Zvolene, T.G. Masaryka 24, 960 53, Zvolen

CHARACTERIZATION AND HOST RANGE OF THE WOOD-DECAYING POLYPORE *FOMES FASCIATUS*

CHARAKTERISTIKA A HOSTITEĽSKÉ SPEKTRUM DREVOROZKLADAJÚCEHO TRÚDNIKA *FOMES FASCIATUS*

JÁN GÁPER – KATEŘINA NÁPLAVOVÁ

GÁPER, J. – NÁPLAVOVÁ, K. 2016. Characterization and host range of the wood-decaying polypore *Fomes fasciatus*. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 100-105. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
The wood-decaying polypore *Fomes fasciatus* (*Polyporaceae*, Basidiomycota) is distributed throughout the southeastern United States and Arizona to South America. It is externally almost indistinguishable species from *Fomes fomentarius* as the most widely understood in Europe. In this paper, consequently the morphological and anatomical features of *F. fasciatus* basidiomes/strains are given. In total, 42 woody host species are associated with this polypore. The greatest number of the fungal records came from oaks *Quercus* spp., namely *Q. alba*, *Q. arizonica*, *Q. falcata*, *Q. laurifolia*, *Q. nigra*, *Q. phellos*, *Q. virginiana*, and *Quercus* sp. These were followed in decreasing frequency by *Carya* spp., *Inga* spp., *Celtis* spp., *Magnolia* spp., *Hevea* spp., *Apuleia leiocarpa*, *Andira* sp., *Betula* spp., *Castilla elastica*, *Casuarina* spp., *Delonix regia*, *Fraxinus* sp., *Ulmus* sp. The majority of host genera was recorded only once.

Key words: *Fomes fasciatus*, polypores, trees, white rot.

INTRODUCTION

The species *Fomes fasciatus* (Sw.) Cooke causes a white rot in the wood of living and dead trees. It is a taxon accepted in the genus *Fomes* in the Polyporaceae family of Polyporales order in subclass Incertae sedis, class Agaricomycetes, subphylum Agaricomycotina and phylum Basidiomycota. It was first described by Swedish botanist Olof Swartz from specimens collected in Jamaica in his Nova genera et species Plantarum seu prodromus descriptioneum vegetabilium maximam parte incognitorum qua sub itinere in Indiam Occidentalem annis 1783-1787 (SWARTZ 1788).

However, two externally almost indistinguishable species occur in the genus Fomes: *Fomes fomentarius* (L.) Fr. as commonly understood in North America, North Africa, Asia, and all over Europe (JÚDOVÁ et al. 2012), and *F. fasciatus* (GÁPER et al. 2016). *F. fomentarius* is essentially a boreal taxon and *F. fasciatus* is a southern and neotropical taxon. Recently, it occurs throughout the southeastern United States and Arizona (MCCORMICK et al. 2013) to South America: Mexico (HEREDIA 1989; FARR, ROSSMAN 2016), Cuba (KOTLABA, POUZAR 2003; FARR, ROSSMAN 2016), Trinidad and Tobago (SUTHERLAND, VENKOBACHAR 2013; FARR, ROSSMAN 2016), Jamaica (SWARTZ 1788; FARR, ROSSMAN 2016), Puerto Rico and Virgin Islands (STEVENSON 1975; FARR, ROSSMAN 2016), West Indies (MINTER et al. 2001; FARR, ROSSMAN 2016), Brazil (GIBERTONI et al. 2007; DRECHSLER-SANTOS et al. 2009; FARR, ROSSMAN 2016), Argentina (MINTER et al. 2001; COCKLE et al. 2012; RAJCHENBERG, ROBLEDO 2013; FARR, ROSSMAN 2016), Chile (MUJICA, VERGARA 1945; FARR, ROSSMAN 2016), Panama, French Guiana, Guyana, Uruguay, Paraguay, Colombia, El Salvador, Honduras, Costa Rica, Peru, Ecuador, Guatemala, Haiti, Dominican Republic, Nicaragua, Venezuela, Bolivia, Suriname and Martinique (GBIF 2016; FARR, ROSSMAN 2016). However, there are a few known instances [China (REINKING 1919; CHEN 2002; FARR, ROSSMAN 2016), Indonesia, New Caledonia, India, Japan, Sri Lanka, Australia - Tasmania, Marshall Islands, Philippines, Singapore and Madagascar (GBIF 2016; FARR, ROSSMAN 2016)] where the species has probably been

confused. So, then a revision of these data is necessary. *F. fasciatus* generally fruits after the tree´s death or on dead stems/branches of living trees (RAJCHENBERG, ROBLEDO 2013)

The aims of the present study consequently were to: (1) create synonyms list of the *Fomes fasciatus* current name, (2) characterize the morphology and the culture features of *Fomes fasciatus* basidiomes/strains and (3) analyze the host range in association with the geographic distribution of this polypore species.

MATERIAL AND METHODS

The characterization and host range of *Fomes fasciatus* were compiled by examination of relevant articles and the results of literature search of ISI Web of Knowledge, Scopus, PubMed, MEDLINE, ProQuest Central, and Google as well as a critical assessment of records from online databases [BPI (FARR, ROSSMAN 2016), Datasets with *Fomes fasciatus* - GBIF (GBIF 2016), CABI (2016), and FRDBI (KIRK, COOPER 2016)].

Nomenclature and authorities are from Index Fungorum (CABI 2016) for fungi and THE PLANT LIST (2013) for woody plants.

RESULTS AND DISCUSSION

Fomes fasciatus has been reported under several synonyms (see the list of current name and synonyms below).

Current name and synonyms list
Current name: *Fomes fasciatus* (Sw.) Cooke, Grevillea 14(69): 21 (1885)
Boletus fasciatus Sw., Flora Indiae Occidentalis 3: 1922 (1806)
Polyporus fasciatus (Sw.) Fr., Systema mycologicum (Lundae) 1: 373 (1821)
Polyporus sclerodermeus Lév., Annales des sciences naturelles. Botanique (3e série) 5: 129 (1846)
Polyporus marmoratus Berk.& M. A. Curtis, Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences 4: 122 (1860) [1858]
Fomes marmoratus (Berk.& M. A. Curtis) Cooke, Grevillea 14(69): 18 (1885)
Fomes sclerodermeus (Lév.) Cooke, Grevillea 14(69): 18 (1885)
Myriadoporus dussii Pat., Bulletin de la Société Mycologique de France 5(2-3): 85 (1889)
Scindalma fasciatum (Sw.) Kuntze, Revisio generum plantarum (Leipzig) 3(2): 518 (1898)
Scindalma marmoratum (Berk. & M. A. Curtis) Kuntze, Revisio generum plantarum (Leipzig) 3(2): 519 (1898)
Scindalma sclerodermeum (Lév.) Kuntze, Revisio generum plantarum (Leipzig) 3(2): 519 (1898)
Fomes subfomentarius Romell, Bihang till Kongliga svenska vetenskaps-akademiens handlingar (afdelning 3) 26(16): 19 (1901)
Elfvingia fasciata (Sw.) Murrill, Bulletin of the Torrey Botanical Club 30(5): 298 (1903)
Ungulina scleroderma (Lév.) Pat., in Duss RP. Énumération méthodique des champignons recueillis à la Guadeloupeet à la Martinique (Lons-le-Saunier): 35 (1903)
Elfvingiella fasciata (Sw.) Murrill, Tropical polypores: 90 (1915)
Elfvingiella marmorata (Berk.& M. A. Curtis) Murrill, Mycologia 12(1): 14 (1920).

Basidioma description

Fomes fasciatus is well characterized by its perennial, sessile, ungulate to applanate basidiomes with a granular cores. It is usually light brown in colour, soon becoming gray to dark brown or black. The upper side is at first faintly zoned and minutely tomentose, soon becoming hard and glabrous, concentrically sulcate, zonate or azonate. The lower surface is light brown, darkening with age. The pores are small (4-5 per mm), circular. The context is punky, thin, ferruginous to fulvous, distinctly to faintly zonate, 3-5 mm thick, with a dark crustose upper layer up to 1 mm thick. The tubes are indistinctly stratified, sometimes separated by a thin layer of context.

Hyphal system is trimitic; contextual generative hyphae thin-walled, with clamps, 2.5-4 µm in diam.; contextual skeletal hyphae thick-walled, aseptate, pale yellowish brown in KOH, 3-8 µm in diam.; contextual binding hyphae thick-walled, much branched, hyaline to pale yellowish brown in KOH, 1.5-4 µm in diam. Cystidioles thin-walled, fusoid, 20-25 x 6.5-8 µm, with a basal clamp. Basidia broadly clavate, 4-sterigmate, usually with a basal clamp, 19-22 x 8-10 µm. Basidiospores cylindric, hyaline, smooth, negative in Melzer´s reagent, 12-14 × 4-4.5 µm (MURRILL 1915; LLOYD 1915; GILBERTSON, RYVARDEN 1986).

Strain description

Growth is slow, the colony reaching a radius of 30-40 mm in seven days. The texture is at first appressed, white to pale yellow orange, later faintly to prominently zonate, somewhat cottony with radiating growth lines, ochraceous or deepening to cinnamon buff and cinnamon, cinnamon brown or russet. Superficial hyphae uniformly 2-3 (-4) µm wide, thick-walled, colored or hyaline. Submerged hyphae 2-4 (-6) µm wide, clamps abundant. Oidia rare to fairly abundant, thin-walled, 3-5 x (up to) 35 µm (CAMPBELL 1938; STALPERS 1978).

Host range

In total, 42 host species are associated with *Fomes fasciatus*. It was recorded on:
Acer saccharum subsp. *floridanum* (Chapm.) Desmarais (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013; FARR, ROSSMAN 2016;
Alchornea triplinervia (Spreng.) Müll. Arg. (1 record): Argentina, COCKLE et al. 2012; RAJCHENBERG, ROBLEDO 2013; FARR, ROSSMAN 2016;
Andira sp. (2 records): Puerto Rico and Virgin Islands, STEVENSON 1975; FARR, ROSSMAN 2016;
Apuleia leiocarpa (Vogel) J. F. Macbr. (3 records): Argentina, COCKLE et al 2012;
Betula alleghaniensis Britton (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Betula sp. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Bursera simaruba (L.) Sarg. (1 record): Cuba, KOTLABA, POUZAR 2003;
Carya cordiformis (Wangenh.) K. Koch (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Carya illinoinensis (Wangenh.) K. Koch (8 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Carya sp. (7 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Cassine xylocarpa Vent. (1 record): West Indies, MINTER et al. 2001; FARR, ROSSMAN 2016;
Castilla elastica Cerv. (2 records): Dominican republic and Haiti, CIFERRI 1961; FARR, ROSSMAN 2016;
Casuarina equisetifolia L. (1 record): West Indies, MINTER et al. 2001; FARR, ROSSMAN 2016;
Casuarina glauca Sieber ex Spreng. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Celtis laevigata Willd. (3 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Celtis mississippiensis Bosc (2 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Celtis sp. (2 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Citrus sinensis (L.) Osbeck (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Delonix regia (Hook.) Raf. (2 records). Puerto Rico and Virgin Islands, STEVENSON 1975; FARR, ROSSMAN 2016;
Drypetes alba Poit. (1 record): West Indies, MINTER et al. 2001; FARR, ROSSMAN 2016;
Fraxinus sp. (2 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Guazuma ulmifolia Lam. (1 record): Puerto Rico, FARR, ROSSMAN 2016;
Gleditsia aquatica Marshall (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Gordonia lasianthus (L.) Ellis (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Hevea brasiliensis (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. (3 records): Brazil and Mexico, FARR, ROSSMAN 2016;
Hevea sp. (2 records): Mexico and Honduras, FARR, ROSSMAN 2016;
Hicoria sp. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Inga edulis Mart. (1 record): El Salvador, FARR, ROSSMAN 2016;
Inga laurina (Sw.) Willd. (1 record): Puerto Rico, FARR, ROSSMAN 2016;
Inga ruiziana G. Don (2 records): Puerto Rico and Virgin Islands, STEVENSON 1975; FARR, ROSSMAN 2016;
Inga vera Willd. (2 records): Puerto Rico and Virgin Islands, STEVENSON 1975; FARR, ROSSMAN 2016);
Inga sp. (4 records): USA, MCCORMICK et al. 2013; Puerto Rico and Honduras, FARR, ROSSMAN 2016;

Iriartea deltoidea Ruiz & Pav. (1 record): Brazil, FARR, ROSSMAN 2016;
Juglans australis Griseb. (1 record): Argentina, MINTER et al. 2001; RAJCHENBERG, ROBLEDO 2013;
Liquidambar styraciflua L. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Magnifera indica L. (1 record): West Indies, MINTER et al. 2001; FARR, ROSSMAN 2016;
Magnolia grandiflora L. (3 records): USA, MCCORMICK et al. 2013; FARR, ROSSMAN 2016;
Magnolia virginiana L. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Magnolia sp. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Metopium brownei (Jacq.) Urb. (1 record): West Indies, MINTER et al. 2001; FARR, ROSSMAN 2016);
Nectandra lanceolata Nees. & Mart. (1 record): Argentina, COCKLE et al 2012; RAJCHENBERG, ROBLEDO 2013; FARR, ROSSMAN 2016;
Nothofagus sp. (1 record): Chile, MUJICA, VERGARA 1945; FARR, ROSSMAN 2016;
Nyssa sp. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Oxandra lanceolata (Sw.) Baill. (1 record): West Indies, MINTER et al. 2001; FARR, ROSSMAN 2016;
Persea borbonia (L.) Spreng. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Prunus domestica L. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Quercus alba L. (2 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Quercus arizonica Sarg. (2 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Quercus falcata Michx. (2 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Quercus laurifolia Michx. (2 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Quercus nigra L. (5 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Quercus phellos L. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Quercus virginiana Mill. (3 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Quercus sp. (28 records): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Salix sp. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Ulmus americana L. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013;
Ulmus sp. (1 record): USA, MCCORMICK et al. 2013
Some of these records are also included in FARR et al. (1989). The greatest number of the records came from *Quercus* spp. (45 records). These were followed in decreasing frequency by *Carya* spp., *Inga* spp., *Celtis* spp., *Magnolia* spp., *Hevea* spp., *Apuleia leiocarpa*, *Andira* sp., *Betula* spp., *Castilla elastica*, *Casuarina* spp., *Delonix regia*, *Fraxinus* sp., *Ulmus* sp. The majority (61 %) of host genera was recorded only once.

CONCLUSIONS

Fomes fasciatus (Polyporaceae, Basidiomycota) is externally almost indistinguishable species from *Fomes fomentarius* as the most widely understood in Europe. In this paper, consequently the morphological and anatomical features of *F. fasciatus* basidiomes/strains are given. In total, 42 host species are associated with this polypore. The greatest number of the fungal records came from oaks *Quercus* spp. (45 records). These were followed in decreasing frequency by *Carya* spp., *Inga* spp., *Celtis* spp., *Magnolia* spp., *Hevea* spp., *Apuleia leiocarpa*, *Andira* sp., *Betula* spp., *Castilla elastica*, *Casuarina* spp., *Delonix regia*, *Fraxinus* sp., *Ulmus* sp. The majority (61 %) of host genera was recorded only once.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by grants from the Grant Agencies of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic (VEGA No. 1/0622/16 and KEGA No. 033UMB-4/2016) and the Faculty of Sciences of the University of Ostrava, Czech Republic (SGS No. 16/PřF/2016).

REFERENCES

CABI, 2016. PlantWise Knowledge Bank. Available at www.plantwise.org/KnowledgeBank (accessed 25.06.2016).

CAMPBELL, W. A. 1938. The cultural characteristics of the species of Fomes. In: Bulletin of the Torrey Botanical Club vol. 65, 1938, s. 31–69.

CHEN, M. M. 2002. Forest fungi phytogeography: Forest fungi phytogeography of China, North America, and Siberia and international quarantine of tree pathogens. Sacramento: Pacific Mushroom Research and Education Center, 469 s. ISBN not available.

CIFERRI, R. 1961. Mycoflora Domingensis integrata. In: Quadermo vol. 19, 1961, s. 1–539.

COCKLE, K. L., MARTIN, K., ROBLEDO, G. L. 2012. Linking fungi, trees, and hole-using birds in a Neotropical tree-cavity network: Pathways of cavity production and implications for conservation. In: Forest Ecology and Management vol. 264, 2012, s. 210–219.

DRECHSLER-SANTOS, E. R., GIBERTONI, T. B., GÓES-NETO, A., CAVALCANTI, M. A. Q. 2009. A re-evaluation of the lignocellulolytic Agaricomycetes from the Brazilian semi-arid region. In: Mycotaxon vol. 108, 2009, s. 241–244.

FARR, D. F., BILLS, G. F., CHAMURIS, G. P., ROSSMAN, A. Y. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. St Paul: APS Press, 1252 s. ISBN 0-89054-099-3.

FARR, D. F., ROSSMAN, A. Y. 2016. Fungal databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Available at http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/ (accessed 23.06.2016).

GÁPER, J., GÁPEROVÁ, S., PRISTAŠ, P., NÁPLAVOVÁ, K. 2016. The Tinder polypore, *Fomes fomentarius* is heterogeneous species of medicinal mushroom. A Review. In: International Journal of Medicinal Mushrooms vol. 18, 2016, accepted.

GBIF, 2016. Datasets with *Fomes fasciatus* - GBIF Global Biodiversity Information facility. Available at http://www.gbif.org/species/108374415 (accessed 10.08.2016).

GIBERTONI, T. B., SANTOS, P. J. P., CAVALCANTI, M. A. Q. 2007. Ecological aspects of Aphyllophorales in the Atlantic rain forest in northeast Brazil. In: Fungal Diversity vol. 25, 2007, s. 49–67.

GILBERTSON, R. L., RYVARDEN, L. 1986. North American polypores. Vol. 1. Abortiporus-Lindtneria. Oslo: Fungiflora, 433 s. ISBN not available.

HEREDIA, G. 1989. Estudio de los hongos de la reserva de la biosfera el cielo, tamaulipas consideraciones sobre da distribucion y ecologia de alguinas especies. In: Acta Botanica Mexicana vol. 7, 1989, s. 1–18.

JÚDOVÁ, J., DUBÍKOVÁ, K., GÁPEROVÁ, S., GÁPER, J., PRISTAŠ, P. 2012. The occurrence and rapid discrimination of *Fomes fomentarius* genotypes by ITS-RFLP analysis. In: Fungal Biology UK vol. 116, 2012, s. 155–160.

KIRK, P., COOPER, J. 2016. Fungal records database of Britain and Ireland. British Mycological Society. Available at http://www.fieldmycology.net/FRDBI/FRDBI.asp (accessed 22.06.2016).

KOTLABA, F., POUZAR, Z. 2003. Polypores (Polyporales s. l.) collected in Cuba. In Czech Mycology vol. 55, 2003, s. 7–50.

LLOYD, C. G. 1915. Synopsis of the genus Fomes. Cincinnati: Lloyd, 294 s. ISBN not available.

MCCORMICK, M. A., CUBETA, M. A., GRAND, L. F. 2013. Geography and hosts of the wood decay fungi *Fomes fasciatus* and *Fomes fomentarius* in the United States. In: North American Fungi vol. 8, 2013, s. 1–53.

MINTER, D. W., RODRIGUEZ HERNANDEZ, M., MENA PORTALES, J. 2001. Fungi of the Carribean: an annotated checklist. Isleworth: PDMS Publishing, 946 s. ISBN not available.

MUJICA, F., VERGARA, C., 1945. Flora fungosa Chileana. Indice preliminar de los huespedes de los hongos chilenos y sus referencias bibliograficas. Stanley: Imprenta Stanley. 199 s. ISBN not available.

MURRILL, W. A. 1915. Southern polypores. New York: Murril, 66 s. ISBN not available.

RAJCHENBERG, M., ROBLEDO, G., 2013. Pathogenic polypores in Argentina. In: Forest Pathology vol. 43, 2013, s. 171–184.

REINKING, O. A. 1919. Diseases of economic plants in Southern China. In: Philippine Agriculture vol. 8, 1919, s. 109–135.

STALPERS, J. A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. In: Studies in Mycology vol. 16, 1978, s. 1–248.

STEVENSON, J. A., 1975: The fungi of Puerto Rico and the Virgin Islands. Baltimore: Baltimore Md Verlag, 743 s. ISBN not available.

SUTHERLAND, C., VENKOBACHAR, Ch. 2013: Equilibrium modeling of Cu (II) biosorption onto untreated and treated forest macro-fungus Fomes fasciatus. In: International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences vol. 3, 2013, s. 193–203.

SWARTZ, O. P. 1788. Nova genera et species Plantarum seu prodromus descriptioneum vegetabilium maximam parte incognitorum qua sub itinere in Indiam Occidentalem annis 1783-1787. Stockholm: Holmiae, 148 s. ISBN not available.

THE PLANT LIST. 2013. Version 1.1 (September 2013). Available at http://www.theplantlist.org. (accessed 22.06.2016).

Author's addresses

Prof. RNDr. Ján Gáper, CSc., Technical University in Zvolen, Faculty of Ecology and Environmental Sciences, T. G. Masaryka 24, 960 63 Zvolen, Slovak Republic, e-mail: jan.gaper@tuzvo.sk

University of Ostrava, Faculty of Sciences, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, Czech Republic, e-mail: jan.gaper@osu.cz

Mgr. Kateřina Náplavová, University of Ostrava, Faculty of Sciences, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, Czech Republic, e-mail: naplavova.katerina@gmail.com

CEB-Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

ATAKCIA DREVÍN DREVOROZKLADAJÚCIMI TRÚDNIKMI V SÍDLACH TEKOVA

WOOD-DECAYING POLYPORES THAT ATTACK WOODY PLANTS WITHIN SELECTED SETTLEMENTS OF TEKOV REGION

SVETLANA GÁPEROVÁ – MICHAELA KRUŽLÍKOVÁ – JÁN GÁPER – TERÉZIA GAŠPARCOVÁ

GÁPEROVÁ, S. – KRUŽLÍKOVÁ, M. – GÁPER, J. – GAŠPARCOVÁ, T. 2016. Atakcia drevín drevorozkladajúcimi trúdnikmi v sídlach Tekova. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 106-112. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
This paper deals with first results of tree evaluation vs. wood-decaying polypores (including some ITS and MALDI-TOF mass spectrometry analyses) obtained within seven settlements of the Tekov region (South-western Slovakia) during 2015 - 2016. Totally, the 9 polypore taxa were found. The number of attacked autochthonous and allochthonous woody plant species was 16.

Key words: wood-decaying polypores, Tekov region, settlements

ÚVOD

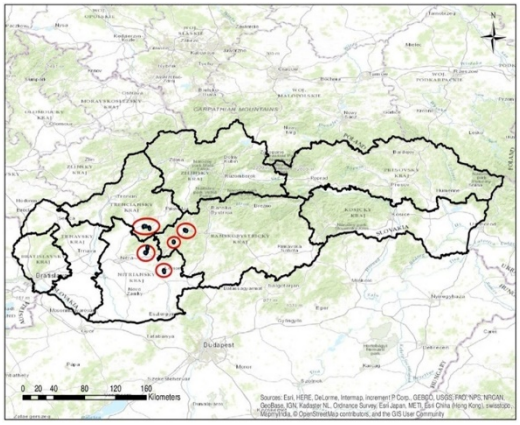
Dreviny v sídlach majú mimoriadny význam z hľadiska ochrany a tvorby životného prostredia. Stromová vegetácia v mestách znižuje intenzitu UV žiarenia, intenzitu pôsobenia stresových faktorov prostredia, percento depresií a prejavov agresívneho správania a prispieva k zvyšovaniu fyzickej kondície obyvateľstva (SUPUKA, FERIANCOVÁ 2008). Tieto funkcie môžu zabezpečovať len zdravé jedince. Chradnúce a usychajúce stromy, dutiny na kmeňoch a konároch, usychanie konárov, hniloby, to sú časté a viditeľné prejavy zníženej vitality drevín vyskytujúcich sa v rôznych funkčných segmentoch sídiel. Výrazné riziko pre dreviny predstavujú drevokazné huby, hlavne drevorozkladajúce trúdniky (TELLO et al. 2005). Cieľom nášho príspevku je zistiť dreviny, ktoré sú najčastejšie atakované drevorozkladajúcimi trúdnikmi vo vybraných sídlach Tekova a porovnať diverzitu týchto húb na študovaných územiach.

Územie Tekova je totožné s územím bývalej Tekovskej župy. Dnes je rozdelené do troch krajov: Nitrianskeho, Banskobystrického a malá časť je v Trenčianskom kraji. Najvýznamnejším a najväčším mestom sú Levice. Územie Tekova začína na rozľahlých úrodných nížinách na juhu západného Slovenska a končí na úpätí Štiavnických vrchov. Týmto regiónom preteká rieka Hron, ktorá spoluvytvára jeho charakter (LISA 2016).

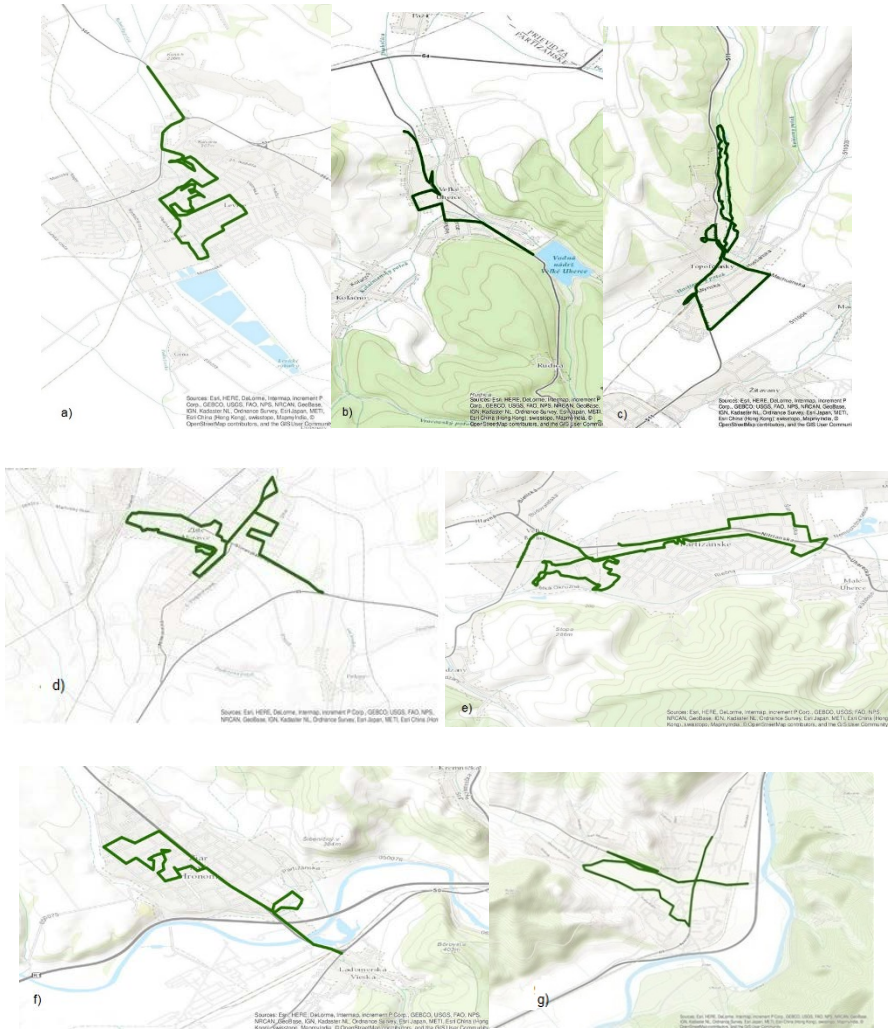
MATERIÁL A METÓDY

Výskyt drevorozkladajúcich trúdnikov na domácich a introdukovaných drevinách sme monitorovali na území Tekova (obr. 1) v sídlach Levice, Zlaté Moravce, Topoľčianky, Veľké Uherce, Partizánske, Žiar nad Hronom a Žarnovica na vyznačenom území (obr. 2). Monitoring bol realizovaný od februára 2015 do mája 2016. Každé sídlo sme navštívili trikrát. Dreviny atakované trúdnikmi sme pozorovali v rôznych kategóriách funkčnej vegetácie sídiel, ako sú parky, vegetačné prvky celomestského významu, vyhradená zeleň obytných súborov a škôl a špeciálna zeleň cintorínov. Názvoslovie drevín sme upravili podľa Zoznamu nižších a vyšších rastlín Slovenska (MARHOLD, HINDÁK eds. 1998) a názvoslovie húb podľa Index Fungorum CABI (2016). Zaznamenávali sme výskyt drevorozkladajúcich trúdnikov na drevinách, lokalitu výskytu trúdnikov sme popísali a zamerali prístrojom GPS (Garmin Dakota 20). Pokiaľ nebolo možné huby determinovať priamo v teréne, odoberali sme plodnice, ktoré sme následne podrobili mikroskopickej analýze. V prípade

determinácie druhov z rodu *Ganoderma* (3 plodnice) sme využili metódu MALDI-TOF MS analýzy. V prípade určenia genotypu druhu *Fomes fomentarius* (jedna plodnica) sme použili metódy ITS. Použili sme čisté kultúry pestované na sladinovom agare v termostate pri teplote 24 ± 1°C. Plodnice trúdnikov sú uložené v Herbári Katedry biológie a ekológie FPV UMB v Banskej Bystrici a izoláty v Laboratóriu experimentálnej mykológie FPV UMB v Banskej Bystrici v chladničke pri teplote 9°C.



Obr. 1 Monitorované územia (vyznačené červenou farbou) výskytu drevorozkladajúcich trúdnikov na drevinách na území Tekova v rámci Slovenska.



Obr. 2 Monitorovacie trasy vo vybraných sídlach Tekova (a – Levice, b – Veľké Uherce, c – Topoľčianky, d – Zlaté Moravce, e – Partizánske, f – Žiar nad Hronom, g – Žarnovica).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Monitoring na území mesta Zlaté Moravce bol realizovaný na trase (obr. 2d), do ktorej patrili parky, vegetačné prvky celomestského významu a vyhradená zeleň obytných súborov, škôl, obchodných centier a zdravotných objektov. Na tomto území sme zaznamenali výskyt 5 druhov húb (tab. 1), v rámci druhu *Fomes fomentarius* jeden genotyp B. Atakovaných bolo 31 drevín, patriacich k 9 druhom. Najčastejšie sa vyskytovali trúdniky *Fomes fomentarius* a *Trametes versicolor*. Najviac atakovanou introdukovanou drevinou bol pagaštan *Aesculus hippocastanum*, najviac atakovanou domácou drevinou *Cerasus avium.*

Monitoring na území Topoľčianok bol realizovaný na trase, kde boli parky, vegetačné prvky celomestského významu, vyhradená zeleň obytných súborov, škôl a špeciálna zeleň cintorínov (obr. 2c). Zaznamenali sme výskyt 8 taxónov húb, ktoré sa vyskytovali na 55 atakovaných drevinách, patriacich k 8 druhom (tab. 1). Najčastejšie sa vyskytovali trúdniky *Trametes versicolor* a *Fomes fomentarius*. Najviac atakovanými boli domáce dreviny *Fagus sylvatica a Quercus robur*.

Monitoring na území mesta Levice bol realizovaný na trase, do ktorej patrili parky, vegetačné prvky celomestského významu, vyhradená zeleň obytných súborov, škôl, obchodných centier, zdravotných objektov a špeciálna zeleň cintorínov (obr. 2a). Zaznamenali sme 6 taxónov drevokazných trúdnikov, najčastejším bol *Fomes fomentarius* Celkovo atakovaných bolo 23 drevín (tab. 1), z toho najčastejšou bola domáca drevina *Salix alba*.

Monitoring na území obce Veľké Uherce bol realizovaný na trase (obr. 2b), do ktorej patrili parky, vegetačné prvky celomestského významu, vyhradená zeleň obytných súborov, škôl a špeciálna zeleň cintorínov. Zaznamenali výskyt 2 druhov drevokazných trúdnikov *Fomes fomentarius* a *Trametes versicolor*, ktoré sa vyskytovali (tab. 1) na 28 atakovaných drevinách a to najčastejšie na introdukovanej *Cerasus serrulata* a domácej *Tilia phatyphyllos*.

Monitoring na území mesta Partizánske bol realizovaný na trase, do ktorej patrili parky, vegetačné prvky celomestského významu, vyhradená zeleň obytných súborov, škôl, zdravotných centier a špeciálna zeleň cintorínov (obr. 2e). Zaznamenali sme výskyt 4 druhov trúdnikov. Najpočetnejšie zastúpenie (tab. 1) mal *Trametes versicolor* na domácej drevine *Tilia platyphyllos* a *Daedaleopsis confragosa* na introdukovanej drevine *Cerasus serrulata*.

Monitoring na území mesta Žiar nad Hronom bol realizovaný na trase do ktorej patrili parky, vegetačné prvky celomestského významu, vyhradená zeleň obytných súborov, škôl, zdravotných objektov a špeciálna zeleň cintorínov (obr. 2f). Zaznamenali sme 7 taxónov trúdnikov (tab. 1), ktoré sa vyskytovali na 38 atakovaných drevinách, patriacich k 6 druhom. Najčastejšie atakoval *Trametes vericolor* domácu drevinu *Acer platanoides.*

Monitoring na území mesta Žarnovica bol realizovaný na trase, do ktorej patrili vegetačné prvky celomestského významu a vyhradená zeleň obytných súborov a škôl (obr. 2g). Na monitorovanej trase sme zaznamenali výskyt troch druhov trúdnikov (tab. 1). Najpočetnejší bol *Trametes versicolor* na domácej drevine *Tilia phatyphyllos.*

Determinácia vybraných lesklokôroviek a určenie genotypu práchnovca kopytovitého

Druhy z rodu *Ganoderma* patria k významným pôvodcom hnilôb dreva živých drevín. Klasická identifikácia húb rodu *Ganoderma j*e založená na analýze a porovnaní anatomicko-morfologických charakteristík plodníc. Na území Tekova sme zaznamenali niekoľko plodníc z tohto rodu, vybrali sme tri plodnice (v tab. 1 označené *) na determináciu pomocou MALDI-TOF MS analýzy - hmotnostnej spektrometrie proteínových profilov:
G2ZH *Ganoderma* sp., Žiar nad Hronom, park Štefana Moyzesa, na *Tilia platyphyllos,* 09.01.2016;
G1ZH *Ganoderma* sp., Žiar nad Hronom, park Štefana Moyzesa, na *Acer platanoides* 09.01.2016;
M2 *Ganoderma* sp., Topoľčianky, park, na *Tilia platyphyllos,* 25.10.2015; Metódou MALDI-TOF MS sme izoláty determinovali:

G2ZH determinované ako *G. adspersum* (tab. 1)
G1ZH determinované ako *G pfeifferi* (tab. 1)
M2 determinované ako *G pfeifferi* (tab. 1).

V prípade určenia genotypu druhu *Fomes fomentarius* sme použili metódu štiepenia ITS sekvencií izolátov restrikčnou endonukleázou BsuRI. Analyzovali sme izolát z plodnice (v tab. 1 označený **):
M17 Zlaté Moravce, ul. A. Kmeťa, na *Salix fragilis*, 25.10. 2515;
Zistili sme, že nami študovaný izolát *Fomes fomentarius* predstavuje genotyp B.

Tab. 1 Drevorozkladajúce trúdniky a ich väzba na dreviny v sídlach Tekova.

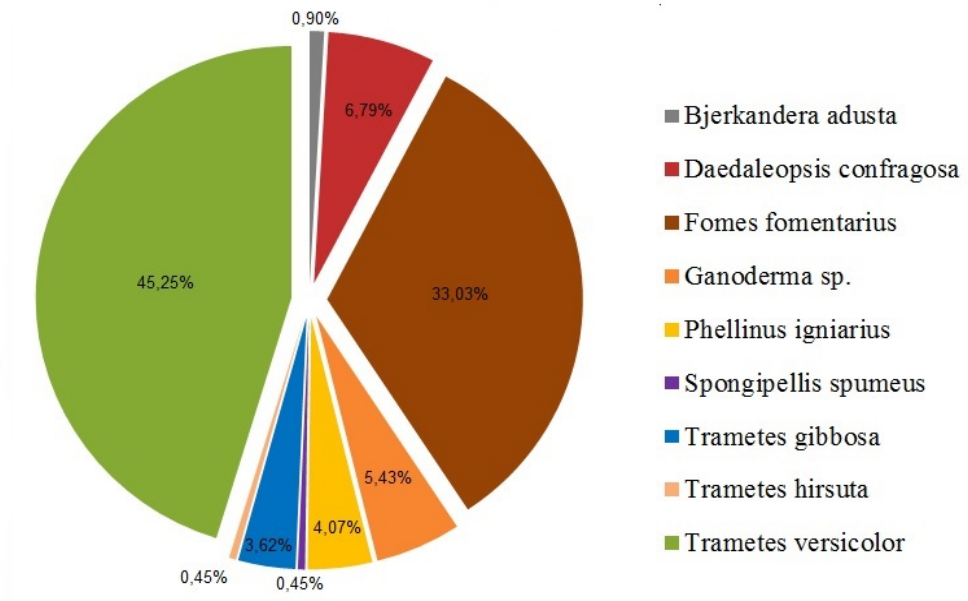
Trúdnik	Drevina	Počet atakovaných drevín
LEVICE		
Daedaleopsis confragosa (Bolton) J. Schröt.	*Salix alba* L.	1
Fomes fomentarius (L.) Fr.	*Aesculus hippocastanum* L. *Cerasus avium* (L.) Moench *Fraxinus excelsior* L. *Salix alba* L. *Tilia platyphyllos* Scop.	1 2 1 11 1
Ganoderma sp.	*Aesculus hippocastanum* L.	1
Phellinus igniarius (L.) Quél.	*Cerasus avium* (L.) Moench *Juglans regia* L.	2 1
Trametes hirsuta (Wulfen) Pilát	*Cerasus avium* (L.) Moench	1
Trametes versicolor (L.) Lloyd	*Acer platanoides* L.	1
ZLATÉ MORAVCE		
Bjerkandera adusta (Willd.) P. Karst.	*Acer platanoides* L.	1
Daedaleopsis confragosa (Bolton) J. Schröt.	*Salix alba* L	4
Fomes fomentarius (L.) Fr.	*Acer platanoides* L. *Aesculus hippocastanum* L. *Salix alba* L. *Tilia platyphyllos* Scop.	1 6 3 2
***Fomes fomentarius* (L.) Fr. genotyp B	*Salix fragilis*	1
Phellinus igniarius (L.) Quél.	*Malus sylvestris* Mill.	1
Trametes versicolor (L.) Lloyd	*Acer platanoides* L. *Betula pubescens* Ehrh. *Cerasus avium* (L.) Moench *Cerasus serrulata* (Lindl.) G. Don *Tilia platyphyllos* Scop.	3 1 6 1 1
TOPOĽČIANKY		
Daedaleopsis confragosa (Bolton) J. Schröt.	*Acer pseudoplatanus* L. *Fagus sylvatica* L. *Quercus robur* L.	1 2 1
Fomes fomentarius (L.) Fr.	*Acer pseudoplatanus* L. *Cerasus avium* (L.) Moench *Fagus sylvatica* L. *Fraxinus excelsior* L. *Salix alba* L. *Quercus robur* L. *Tilia cordata* Mill.	1 1 7 1 1 5 3

Ganoderma sp.	*Fagus sylvatica* L. *Quercus robur* L.	4 1
**Ganoderma pfeifferi* Bres. determinovné MALDI-TOF MS	*Tilia platyphyllos* Scop.	1
Phellinus igniarius (L.) Quél.	*Quercus robur* L.	4
Spongipellis spumeus (Sowerby) Pat.	*Quercus robur* L.	1
Trametes gibbosa (Pers.) Fr.	*Acer pseudoplatanus* L. *Fagus sylvatica* L. *Quercus robur* L. *Salix alba* L.	1 1 1 1
Trametes versicolor (L.) Lloyd	*Acer platanoides* L. *Cerasus avium* (L.) Moench *Fagus sylvatica* L. *Fraxinus excelsior* L. *Quercus robur* L. *Salix alba* L.	2 1 6 1 5 2
VEĽKÉ UHERCE		
Fomes fomentarius (L.) Fr.	*Acer platanoides* L. *Cerasus serrulata* (Lindl.) G. Don	7 4
Trametes versicolor (L.) Lloyd	*Cerasus serrulata* (Lindl.) G. Don *Tilia platyphyllos* Scop.	8 9
PARTIZÁNSKE		
Daedaleopsis confragosa (Bolton) J. Schröt.	*Cerasus avium* (L.) Moench *Cerasus serrulata* (Lindl.) G. Don	1 4
Fomes fomentarius (L.) Fr.	*Malus sylvestris* Mill. *Salix alba* L. *Populus alba L.*	1 3 3
Phellinus igniarius (L.) Quél.	*Cerasus serrulata* (Lindl.) G. Don	1
Trametes versicolor (L.) Lloyd	*Salix alba* L. *Tilia platyphyllos* Scop.	1 17
ŽIAR NAD HRONOM		
Bjerkandera adusta (Willd.) P. Karst.	*Acer platanoides* L.	1
Daedaleopsis confragosa (Bolton) J. Schröt.	*Quercus robur* L.	1
Fomes fomentarius (L.) Fr.	*Acer platanoides* L. *Salix alba* L. *Tilia platyphyllos* Scop.	1 2 1
Ganoderma sp.	*Fagus sylvatica* L. *Salix alba L.*	3 1
**Ganoderma pfeifferi* Bres determinovné MALDI-TOF MS	*Acer platanoides* L.	1
**Ganoderma australe* (Fr.) Pat. determinovné MALDI-TOF MS	*Tilia platyphyllos* Scop.	1
Trametes versicolor (L.) Lloyd	*Acer platanoides* L. *Fraxinus excelsior* L.	21 2
ŽARNOVICA		
Fomes fomentarius (L.) Fr.	*Juglans regia* L. *Tilia platyphyllos* Scop.	1 2
Trametes gibbosa (Pers.) Fr.	*Tilia platyphyllos* Scop.	1
Trametes versicolor (L.) Lloyd	*Tilia platyphyllos* Scop.	12

ZÁVER

Na základe výsledkov monitoringu na sledovaných územiach v sídlach Tekova sme zaznamenali 9 taxónov drevorozkladajúcich trúdnikov (obr. 3) na 16 druhoch hostiteľských drevín. Medzi najčastejšie atakované dreviny patrili z domácich druhov *Acer platanoides* (39 nálezov), *Tilia platyphyllos* (48 nálezov) a *Salix alba* (30 nálezov). Najčastejšie atakované introdukované dreviny boli *Cerrasus serrulata* (18 nálezov) a *Aesculus hippocastanum* (8 nálezov). Najčastejšie sa na drevinách vyskytovali trúdniky *Fomes fomentarius a Trametes versicolor* (obr. 3). Najviac atakovaných drevín hubami bolo na lokalitách v Žiari nad Hronom (35 jedincov atakovaných drevín). Týmto bolo potvrdené aj zistenie (GÁPEROVÁ et al. 2010), ktorí hodnotili stav zelene v meste Žiar nad Hronom pred otvorením rýchlostnej cesty R1 a zistili, že najhorší zdravotný stav majú z introdukovaných drevín pagaštany *Aesculus hippocastanum* a najširšiu škálu spôsobov (typov) poškodení majú lipy *Tilia platyphyllos*. Predpokladá sa, že všetky jedince javora vysadené na území Žiar nad Hronom, konkrétne na lokalite ul. Štefana Moyzesa, boli napadnuté patogénom už v štádiu semenáčikov. Tento náš príspevok dopĺňa a potvrdzuje aj výsledky výskumu stupňa poškodenia drevín v historickom parku v Topoľčiankach, ktorý realizovala JUHÁSOVÁ (2002).

Použitá MALDI-TOF MS analýza ukázala, že touto metódou je možné rozlíšiť druhy rodu *Ganoderma* a tak pomerne rýchlo tieto druhy determinovať, pokiaľ sa nám podarí získať čistú kultúru. Metódou štiepenia ITS sekvencií izolátov restrikčnou endonukleázou BsuRI TS analýzou sme zistili u druhu *Fomes fomentarius* genotyp B, nakoľko v minulosti bolo zistené (JÚDOVÁ et al. 2012), že na území Slovenska sa vyskytujú dva genotypy *Fomes fomentarius*.



Obr. 3 Percentuálne zastúpenie drevorozkladajúcich trúdnikov na drevinách vo vybraných sídlach Tekova.

POĎAKOVANIE

Autori ďakujú grantovej agentúre KEGA za finančnú podporu (KEGA 049UMB - 4/2016).

LITERATÚRA

CABI, 2016. PlantWise Knowledge Bank. Available at www.plantwise.org/KnowledgeBank (accessed 25.08.2016).

GÁPEROVÁ, S., BARANOVÁ, J., GÁPER, J., VALENČÁKOVÁ, 2010. Vyhodnotenie stavu zelene v meste Žiar nad Hronom pred otvorením rýchlostnej cesty R1. In: Dreviny vo verejnej zeleni, zborník príspevkov z vedeckej konferencie konferencie s medzinárodnou účasťou, 22. – 23.6.2010. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2010, s. 54-59. ISBN 978-80-89408-08-5.

MARHOLD, K., HINDÁK, F. (eds), 1998. Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska. Bratislava : VEDA, vydavateľstvo SAV, 688 s. ISBN 8022405264.

JUHÁSOVÁ, G., 2002. Zdravotný a kondičný stav drevín v parku Topoľčianky. In: Folia oecologica, 29, 2002, s. 207-217.

JÚDOVÁ J., DUBÍKOVÁ K., GÁPEROVÁ S., GÁPER J. & PRISTAŠ P. 2012. The occurrence and rapid discrimination of Fomes fomentarius genotypes by ITS-RFLP analysis. In: Fungal Biology 116, 2016, s. 155-160.

LISA 2016. Slovakregion – Tekov. Multimediálna agentúra. Dostupné na www.slovakregion.sk, (citované 29.8.2016).

SUPUKA, J., FERIANCOVÁ, Ľ., 2008. Vegetačné štruktúry v sídlach: parky a záhrady, SPU, Nitra, 499 s. ISBN 80-552-0067-5.

TELLO, M. L., TOMALAK, M., SIWECKI, R., GÁPER, J., MOTTA, E., MATEO-SAGASTA, E. 2005. Chapter 12. Biotic urban growing conditions – threats, pests and diseases. In Konijnendijk, C. C., Nilsson, K., Randrup, T. B., Schipperijn, J. (eds), Urban forests and trees, Berlin - Heidelberg - New York. s. 327-365. ISBN 978-3-540-25126-2.

Adresy autorov

Doc. RNDr. Svetlana Gáperová PhD., Univerzita Mateja Bela. Fakulta prírodných vied, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica. e-mail: Svetlana.Gaperova@umb.sk

Bc. Michaela Kružlíková, Univerzita Mateja Bela, Fakulta prírodných vied, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica. e-mail: Michaela.Kruzlikova@umb.sk

Prof. RNDr. Ján Gáper, CSc.

Technická univerzita Zvolen, Fakulta ekológie a environmentalistiky, T. G. Masaryka 24, 960 63 Zvolen, e-mail: jan.gaper@tuzvo.sk

Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, e-mail: jan.gaper@osu.cz

Mgr. Terézia Gašparcová, Univerzita Mateja Bela, Fakulta prírodných vied, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica. e-mail: Terezia.Gasparcova@umb.sk

ASSESSING INVASIVE TERRESTRIAL PLANT SPECIES IN SELECTED PROTECTED AREAS IN ROMANIA. A GEOGRAPHICAL APPROACH

INES GRIGORESCU – GHEORGHE KUCSICSA – MONICA DUMITRAŞCU – MIHAI DOROFTEI

GRIGORESCU, I. – KUCSICSA, G. – DUMITRAŞCU, M. – DOROFTEI, M. 2016. Assessing invasive terrestrial plant species in selected protected areas in Romania. A geographical approach. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 113-120. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
The study aims at presenting some of the key findings of *FP7 enviroGRIDS project - Building Capacity for a Black Sea Catchment Observation and Assessment supporting Sustainable Development;* WP5 – Impacts on Selected Societal Benefit; *Sub-task 5.6.2: Terrestrial Invasive Plant Species Areas.* The authors focus on the assessment of the occurrence, development and spread of the main Invasive Terrestrial Plant Species (ITPS) in the Romanian protected areas in relation to their key environmental driving forces. The overall research was centred on several protected areas (one for each biogeographical region in Romania) of which, some relevant examples are shown in the current paper: Mureş Floodplain Natural Park (Pannonic region), Comana Natural Park (Continental region), Măcin Mountains National Park (Steppic region). Moreover, an integrated methodology for the assessment of the spatial potential distribution of ITPS (ITPS-podismod) was also developed and applied for the selected case-studies.

Key words: Invasive Terrestrial Plant Species (ITPS), protected areas, potential distribution model (PODISMOD), FP7 enviroGRIDS project, Romania

INTRODUCTION

Under the current global environmental changes, biological invasions range among the most critical ecological threats to biodiversity and ecosystem services, thus becoming central issues for the conservation of biodiversity. Many of the introduced species establish, spread and invade areas where they are not native, thus affecting all environments, ecosystem services, as well as human physical and cultural health (IUCN Policy Brief, 2012). Consequently, invasive species continue to be acknowledged as economic, environmental, or social threats (CHARLES and DUKES 2006; MCGEOCH *et al*., 2010) through their high adaptive capacity enabling them to penetrate natural geographic barriers or political boundaries (RICHARDSON *et al.,* 2000; ANASTASIU *et al.*, 2008; ANDREU and VILA, 2010).

In protected areas, in particular, biological invasions are disturbing drivers for species, habitats and ecosystem functioning and structure. In Romania, the first invasive plants species have been reported at the beginning of 18th century and ever since, important information was been regularly published (ANASTASIU and NEGREAN, 2005). As a result, an increased number of invasive species were identified and referred to in various scientific works or floristic lists synthesized by SĂVULESCU (1952-1972), CIOCÂRLAN (1988, 1990, 2000, 2009), SÎRBU *et al*. (2012, 2013), OPREA *et al.* (2011, 2012), SÎRBU and OPREA (2013). The invasive flora of Romania includes 671 species, of which only 112 can be considered genuine invasive due to their high adaptive capacity and the negative impacts on biodiversity and human health (SÎRBU and OPREA, 2011). The current research focuses on some of the most threatening terrestrial invasive plant species (ITPS) in Romania: *Amorpha fruticosa* and *Ailanthus altissima* in selected case-studies from the Romanian protected areas (Fig. 1).

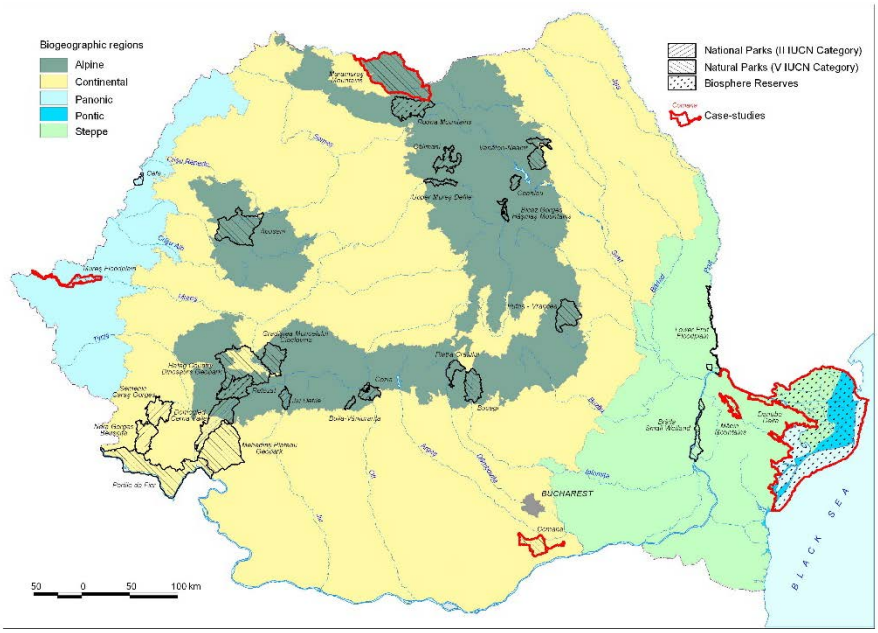


Fig. 1 Selected case-studies in the Romanian natural protected areas (FP7 project enviroGRIDS http://www.envirogrids.net/)

MATERIAL AND METHODS

The continuous expansion of invasive species has led to new approaches of biological invasions, such as understanding the causal relationships with the environmental conditions and triggering driving forces (Tab. 1) and developing prediction models (KUCSICSA *et al.,* 2013; KUCSICSA et al., 2016a). The current approach involved ITPS mapping, database elaboration and the development of a GIS-based potential distribution model.

Tab. 1 The main environmental driving forces responsible for the introduction and spread of the ITPS in the Romanian protected areas.

Major driving forces		Consequent driving forces
NATURAL	**soil**	soil type, soil texture, chemical properties
	relief characteristics	altitude, slope exposure, slope declivity etc.
	vegetation	dominant vegetation types, fragmentation
	water bodies, wetlands	lakes, rivers, ponds, marches
	climate	air/soil temperature, precipitation, air/soil humidity, wind, climate change-related signals
	extreme events	floods, wind/snow felling, heavy rainfall, aridity and drought
HUMAN INDUCED	**planting invasive species**	ornamental/recreation, forestry, land management (e.g. rails, tailings, dams), soil erosion prevention and reduction
	agricultural practices	crop type, land abandonment, fertilizers
	forest exploitation	deforestation/forest fragmentation, forest infrastructure
	grazing	pastures and land degradation
	urban development	waste deposits, transport network, buildings, urban green areas

Source: Dumitraşcu *et al.*, 2011, 2012, 2013; Kucsicsa *et al.,* 2013

ITPS mapping and database elaboration relied on different GIS-based procedures useful for gathering large datasets for modelling habitat quality and distribution of invasive species using various data sources (e.g. soil maps, DEM, land use/cover maps, derived proximity maps) covering both raster and vector information at large and medium scale (KUCSICSA et al., 2016a). Based on the primary ITPS assessment an integrated geographical GIS-based model (PODISMOD–ITPS) aimed at assessing the occurrence and potential distribution of ITPS in relation to the importance of the identified key explanatory factors was developed (Fig. 2).

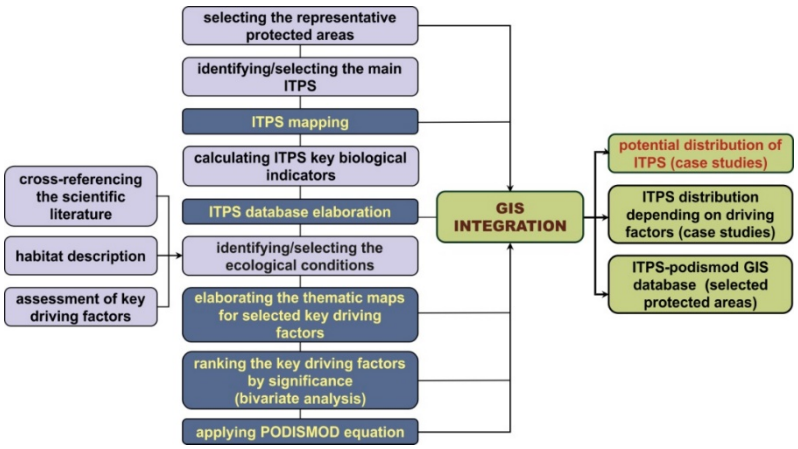


Fig. 2 ITPS podismod scheme (Kucsicsa et al., 2016).

The proposed methodology relies on the ranking (resulting by bivariate analysis) and weighting (based on expert judgement) of each selected driving factor depending on the relationship with the analysed species. Thus, the resulted index was computed based on grid type information, according to the following mathematical operation:

$$PODISMOD = F1_{wr} + F2_{wr} + F3_{wr} \ldots\ldots Fn_{wr}$$

where: PODISMOD = potential distribution model; *r* = rank; *w* = weigh *(1…3);* F1, F2, F3 … Fn = selected driving factors.

Finally, a map displaying areas with different probability of occurrence of ITPS in each study-area has resulted.

RESULTS AND DISCUSSION

The characteristics of the natural and human-induced factors can cause a species to invade, persist and expand its area. Thus, an important step in assessing the spreading potential of a species is identifying the main environmental factors affecting their dynamics. E.g. relief features, lithology and soils, climate, hydrography, land use/cover, insertion of invasive species, mining activities, transportation network.

Relief features through the morphological diversity could become either favourable or restrictive driving forces for species' development. Thus, relief morphography and morphometry (hypsometry, fragmentation, and declivity) lead to the differentiation of other natural factors (e.g. lithology, soils, vegetation, climate), ultimately providing a specific natural potential to ITPS. E.g. slopes' exposure influences the development of *Ailanthus altissima* mainly on the southern, south-western and western slopes due to species' preference for light in Măcin Mountains National Park.

Lithology and soils, tackled together due to their related physico-chemical characteristics, influences species preference for certain environments. E.g. soils rich in nitrogen support the

development of *Rumex longifolius*, alluvial soils favour the presence of *Impatients glandulifera, Lathyrus aphaca* (SÎRBU and OPREA, 2011) or *Amorpha fruticosa* (DOROFTEI, 2009; DUMITRAŞCU *et al.,* 2011, 2012), *Ailanthus altissima* prefers degraded soils.

Climate features influence the occurrence and dynamics of invasive species through the characteristics of air and soil's thermal regime, hygrometric regime, rainfall and wind patterns. However, due to their high capacity of adaptation to various environment types, invasive species can tolerate disturbed sites, thus establishing in areas affected by extreme weather phenomena.

Hydrography. Wetland ecosystems are most likely the most susceptible ones because of regular hydrological imbalances (floods) that destroy riparian vegetation causing niches that favour the penetration of invasive species. Thus, rivers act as natural vectors and dispersing agents facilitating the spread of invasive species (FENESI *et al.,* 2009).

Land use/cover has a significant influence on the distribution and spread of invasive species. Researches on phytoremediation have shown that high fertilization, mainly the organic kind, has improved the growth rate of the species (Li, 2006; SEO *et al,* 2008; MARIAN *et al,* 2010; XIANG *et al.,* 2011). Recent studies have shown that *Amorpha fruticosa* has improved its invasive potential on meadows and bushes (SĂRĂŢEANU, 2010) and *Ailanthus altissima* in areas covered by pastures (DUMITRAŞCU *et al.,* 2011; 2012) (Fig. 3). In contrast, forests may represent a limiting factor (for light-loving species i.e. *Amorpha fruticosa*).

Man-induced activities bring about changes in the distribution, structure and composition of plant formations that sometimes can encourage the penetration of invasive species competing with native vegetation. E.g. agricultural practices can influence the dynamics of invasive species through some features such as crop type, land fragmentation, agricultural pollution, land abandonment; forest exploitation through fragmentation and land degradation encourage the penetration and expansion of invasive species by overtaking the affected areas and competing with existing native species (Fig. 3); overgrazing has led to degradation and hence to the decrease in biological diversity and productivity of grasslands.

Insertion of invasive species for ornamental/recreational, forestry purposes or for the ecological restoration of degraded lands sometimes leads to species getting out of control, becoming locally abundant and entering into competition with other native species.

Mining activities results in a modification of the physical, chemical and biological factors by storing mine tailings or mine water thus favouring the introduction of invasive species (e.g. *Conyza canadensis, Impatiens glandulifera, Helianthus tuberosus, Echinocystis lobata*) that may constitute a threat to local biodiversity. Therewith, the penetration of invasive species can also be achieved through re-naturalization actions on affected lands using species that can grow excessively.

The transportation network is another key factor both as a source of contamination (LI, 2006; SEO *et al.,* 2008, MARIAN *et al.,* 2010; XIANG *et al*, 2011), as well as a way of introduction/dissemination of invasive species. E.g., in Comana Natural Park ***railways*** and ***major roads*** show an excellent development potential for *Amorpha fruticosa*, especially along non-electrified routes (DUMITRAŞCU *et al.,* 2011) (Fig. 3).

Potential distribution model. Based on the developed methodology, potential distribution maps were performed for *Amorpha fruticosa* and *Ailanthus altissima* in the selected case-studies. In applying the potential distribution model of the selected ITPS, several driving factors were selected depending on their role in the development of each species in the analysed protected areas. E.g. land use/land cover, soil type, soil texture, distance to wetlands, distance to streams, distance to transport network and distance to forest areas for *Amorpha fruticosa* in Comana Natural Park; soil type, soil texture, land use/land cover, hypsometry, slope declivity, and slope exposure for *Ailanthus altissima* in Măcin Mountains Natural Park.

Fig. 3 *Ailanthus altissima* invading natural pastures (Măcin National Park) (left), compact area with *Amorpha fruticosa* on former forested areas (Mureş Floodplain Natural Park) (centre) and areas with *Amorpha fruticosa* along railroads (Comana Natural Park) (right) (photo: Gheorghe Kucsicsa).

PODISMOD map for *Amorpha fruticosa* in Comana Natural Park points to high and very high potential distribution (6.3%) along railways and riverbeds, forest outskirts and along the banks of Comana Wetland. Medium values cover 17.7% of the study-area, mainly in the floodplain area, close to secondary water courses and close to the forest roads of the southern half of the park area. Low and very low potential distribution (76%) is found within arable lands and compact forests areas (Fig. 5). Relating the mapped *Amorpha fruticosa* with the potential distribution areas resulted from PODISMOD revealed very good correspondence between species existing and prospective spread territories. Thus, over 88% of *Amorpha fruticosa* mapped areas overlap the high and very high potential distribution resulted from the model, while nearly 6% match with low and very low potential values (Fig. 6) (GRIGORESCU et al., 2016).

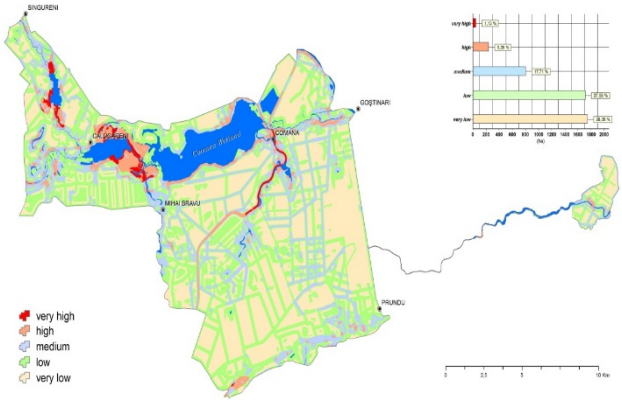


Fig. 4 PODISMOD of *Amorpha fruticosa* in Comana Natural Park.

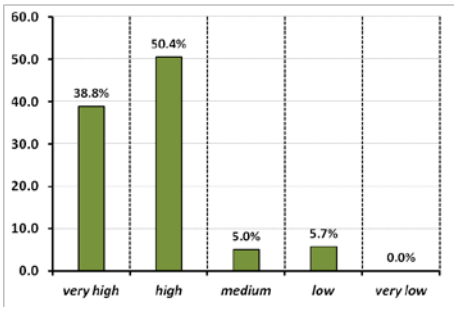


Fig. 5 The distribution of *Amorpha fruticosa* (mapped areas) in relation to PODISMOD.

PODISMOD map for *Ailanthus altissima* in Măcin Mountains National Park mainly highlights low and very low potential distribution (60.3%), especially on the eastern and north-eastern slopes of Măcin Mountains where large oak, hornbeam, ash and linden covered forests are found. Areas displaying medium potential distribution cover nearly 26%, mostly found on Valea Plopilor and Cerna basins upper slopes. Moreover, medium values overlap areas located near Dealu Vinului (323 m) and along Pietrosu and Curătura valleys. High and very high potential cover 14.1% of Park's area, on the western and south-western slopes of Măcin Mountains, predominantly on the southern half of Pricopan Ridge, Şaua Mare Ridge, Moroianu Hill and forest glades (Fig. 6). Comparing the plots where *Ailanthus altissima* was found with the spatial distribution of the PODISMOD classes resulted that almost 70% of the mapped areas overlap the high and very high potential distribution, while approximately 5% match with low and very low potential values, thus pointing to a good validation of the model outputs (Fig. 7) (DUMITRAŞCU et al., 2016).

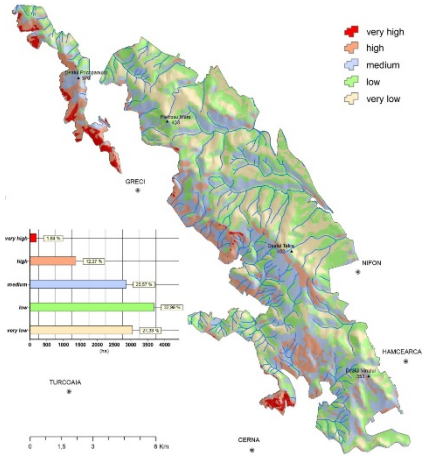


Fig. 6 PODISMOD of *Ailanthus altissima* in Măcin Mountains National Park.

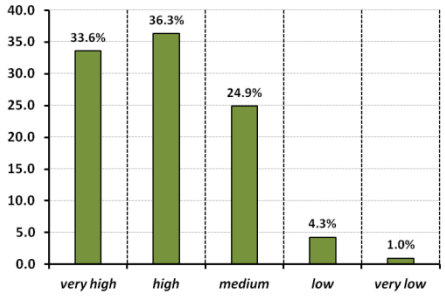


Fig. 7 The distribution of *Ailanthus altissima* (mapped areas) in relation to PODISMOD.

PODISMOD map for *Amorpa 118ruticose* in Mureş Floodplain Natural Park highlights areas with high (39.5%) and very high (8.5%) potential distribution in the proximity of Mureş River and close to the north-central and south-eastern Park border. Here, species prevalence is favoured by the occurrence of protisols and erodisols with varied texture developed under the fragmented forested and shrubby surfaces, especially by forest roads. Medium PODISMOD values cover the largest extent of Park's area (42.1%), particularly south of Mureş River, where arable lands and pastures developed on fluvisols and haplic chernozems with sand-loam and clay-loam textures are extended. Areas with low and very low PODISMOD values (9.9%) are located in the eastern half of Mureş Floodplain Natural Park, within forested and arable areas (Fig. 8).

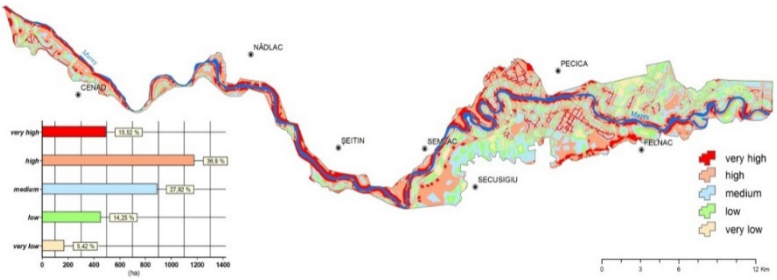


Fig. 8 PODISMOD of *Amorpha 118ruticose* in Mureş Floodplain Natural Park.

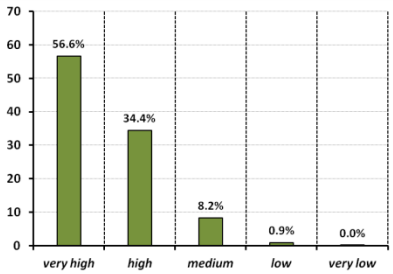


Fig. 9 The distribution of *Amorpha fruticosa* (mapped areas) in relation to PODISMOD.

Relating the mapped areas with *Amorpha fruticosa* with the spatial distribution of the PODISMOD classes resulted that over 90% of the mapped areas overlap the high and very high potential distribution resulted from the model, while less than 1% match low and very low potential values (Fig. 9) (KUCSICSA et al., 2016b).

CONCLUSIONS

The assessment of ITPS in protected areas is an important research direction especially since biological invasions have become increasingly dynamic in native ecosystems, thus requiring complex interdisciplinary and transdisciplinary approaches. The development of a comprehensive geographical assessment of ITPS in relation to their main natural and human-induced driving factors through GIS-based investigations and integrated spatial analysis brings in important information in monitoring changes, identifying the potential distribution of species and predict their impacts. Consequently, similar approaches may provide essential information to stakeholders, decision

makers and park's administrations in terms of identifying the areas with high and very high spreading potential, acknowledging the increased threat to ecosystems and ecosystem services in order to set up the best management measures and actions for the eradication/limitation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The entire study is developed in the framework of the FP7 – Building Capacity for Black Sea Catchments Observation and Assessment System supporting Sustainable Development (EnviroGRIDS); http://www.envirogrids.net/.

REFERENCES

ANASTASIU, P. NEGREAN, G. 2005, Alien plants in Romania, In: Analele Ştiinţifice ale Universităţii "Alexandru Ioan Cuza" Iaşi, vol. LI Biologie vegetală, 2005, p. 87-96.

ANASTASIU, P., NEGREAN, G., BAS, C., SÎRBU C., OPREA A. 2008, A preliminary study on the neophytes of wetlands in Romania, In: Biological Invasions – from Ecology to Conservation, NEOBIOTA 7, 2008, p. 181-192.

ANDREU, J., VILA, M. 2010, Risk analysis of potential invasive plants in Spain, In: Journal for Nature Conservation, 18, 2010, p. 34-44.

CIOCÂRLAN, V. (coord.) 1988 – 1990, Flora Ilustrată a României, vol. I –II, Bucureşti: Edit. Ceres, 897 p.

CIOCÂRLAN, V. 2000, Flora ilustrată a României. Pteridophyta et Spermatophyta (ed. II), Bucureşti: Edit. Ceres, 1138 p.

CIOCÂRLAN, V. (2009), Flora ilustrată a Romaniei. Pteridophyta et Spermatophyta (ed. III), Bucureşti: Edit. Ceres, 1141 p.

CHARLES H., DUKES J.S. 2006, Impacts of Invasive Species on Ecosystem Services in Ecological Studies, In: Biological Invasions, 193, 2006, p. 9-15

DOROFTEI, M. 2009, Ecology of some alien plant species in Danube Delta, In: Annals of Natural Sciences, Biology – Ecology Series, "Ovidius" University Constanţa, vol. 9, p. 33-40.

DUMITRAŞCU, M., GRIGORESCU, I., KUCSICSA, G., DRAGOTĂ, C.S, NĂSTASE, M. 2011, Non-native and native invasive terrestrial plant species in Comana Natural Park. Case-studies: Amorpha fruticosa and Crategus monogyna, In: Romanian Journal of Geography, vol. 55 (2), 2011, p. 81-89.

DUMITRAŞCU, M., KUCSICSA, G., GRIGORESCU, I., DRAGOTĂ, C.S., NĂSTASE, M. 2012, Invasive terrestrial plant species in the Romanian protected areas. Case study: *Fallopia japonica* in Maramureş Mountains Natural Park, In: Geographical Phorum, vol. XI, 2012, p. 45-53.

DUMITRAŞCU, M., GRIGORESCU, I., DOROFTEI, M., KUCSICSA, G., MIERLĂ, M., DRAGOTĂ, C., NĂSTASE, M. 2013, *Amorpha* fruticosa in three wetland areas: Danube Delta Biosphere Reserve, Comana and Mureş Floodplain Natural Parks, The 13th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM, Albena, Bulgaria, Ecology, Economics, Education and Legislation Conference Proceedings, vol. I, 2013, p. 113-124.

DUMITRAŞCU M., KUCSICSA G., GRIGORESCU I., NĂSTASE M., DRAGOTĂ C.S. 2016, Potential distribution of Invasive Terrestrial Plant Species (ITPS) in the Romanian Protected Areas. ITPS in Măcin Mountains National Park in Invasive Terrestrial Plant Species in the Romanian Protected Areas. A Geographical Approach, Dumitraşcu Monica, Grigorescu Ines (Eds.), Dumitraşcu M., Grigorescu I. (Eds.), Bucureşti: Editura Academiei Române, pp. 98-102, ISBN 978-973-27-2647-1.

GRIGORESCU I., KUCSICSA G., DUMITRAŞCU M., NĂSTASE M., DRAGOTĂ C.S. 2016, Potential distribution of Invasive Terrestrial Plant Species (ITPS) in the Romanian Protected Areas. ITPS in Comana Natural Park in Invasive Terrestrial Plant Species in the Romanian Protected Areas. A Geographical Approach, Dumitraşcu M., Grigorescu I. (Eds.), Bucureşti: Editura Academiei Române, pp. 81-86. ISBN 978-973-27-2647-1.

IUCN Policy Brief 2012, Biological invasions: a growing threat to biodiversity, human health and food security, 2012, 14 p., http://www.issg.org/pdf/riopolicybrief.pdf

KUCSICSA, G., GRIGORESCU, I, DUMITRAŞCU, M. 2013, Integrated methodology for the assessment of Invasive Terrestrial Plant Species potential distribution in the Romanian Protected Areas. A GIS-based approach, Proceedings of 9th WSEAS International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development, Recent Advances in Environmental Science, 2013, p. 150-155.

KUCSICSA GH., DUMITRAŞCU M., GRIGORESCU I., NĂSTASE M. 2016a, Potential distribution of Invasive Terrestrial Plant Species (ITPS) in the Romanian Protected Areas**.** ITPS in Mureş Floodplain Natural Park in Invasive Terrestrial Plant Species in the Romanian Protected Areas. A Geographical Approach, Dumitraşcu M., Grigorescu I. (Eds.), Bucureşti: Editura Academiei Române, pp. 93-97. ISBN 978-973-27-2647-1.

KUCSICSA G., GRIGORESCU I, DUMITRAŞCU M. 2016b, Potential distribution of Invasive Terrestrial Plant Species (ITPS) in the Romanian Protected Areas, In: Integrated methodology and data in Invasive Terrestrial Plant Species in the Romanian Protected Areas. A Geographical Approach, Dumitraşcu M., Grigorescu I. (Eds.), Bucureşti: Editura Academiei Române, p. 75-80, ISBN 978-973-27-2647-1.

LI, M.S. 2006, Ecological restoration of mineland with particular reference to the metalliferous mine wasteland in China: a review of research and practice, Science of the Total Environment, vol. 357, 2006, p. 38-53.

MARIAN, M., NICULA, C., MIHALY-COZMUTA, L., PETER, A., MIHALY-COZMUTA A. 2010, Participation of the indigenous vs. alien herbaceous species to the constitution of vegetal layer on the Bozânta Mare tailing ponds, In: Analele Universităţii din Oradea - Fascicula Biologie, vol. XVII, 1, 2010, p. 134-141.

MCGEOCH, M.A., STUART, H.M., SPEAR, D., MARAIS, E., KLEYNHANS, E.J., SYMES A., CHANSON, J., HOFFMANN, M., 2010, Global indicators of biological invasion: species numbers, biodiversity impact and policy responses, In: Diversity and Distributions, vol. 16 (1), 2010, p. 95-108.

OPREA, A., SÎRBU, C., DOROFTEI, M. 2011, New contributions to the flora of Romania, In: Analele Şti. Univ. "Alexandru Ioan Cuza" Iaşi, f. 1, s. II, a. Biol. veget., LVII, 2, 2011, p. 79-90.

OPREA, A., SÎRBU, C., ELIÁŠ, P. Jun., FERUS, P. 2012, New data addition to the Romanian alien flora, In: Journal of Plant Development, vol. 19, 2012, p. 141-156.

RICHARDSON, D.M., PYSEK, P., REJMÁNEK, M., BARBOUR, M.G., PANETTA, F.D., WEST, C.J. 2000, Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions, In: Diversity and Distributions, vol. 6, 2000, p. 93-107.

SĂVULESCU, TR. (ed.), 1952, 1957, 1960, 1961, 1966, 1972, 1976, Flora R. P. Române – R. S. România. I, V, VII, VIII, XI, XII, XIII, Bucureşti: Edit. Academiei Române.

SÎRBU, C. (coord), OPREA, A. 2011, Plante adventive în flora României, Iaşi: Editura "Ion Ionescu de la Brad", 737 p. ISBN 978-973-147-096-2.

SÎRBU, C., OPREA, A., ELIÁŠ, P. jun., FERUS, P. 2012, New data addition to the Romanian alien flora, In: Journal of Plant Development, vol. 19, 2012, p. 141-156.

SÎRBU, C., OPREA, A. 2013, A new contribution on the vascular flora of Romania, In: Acta Horti Bot., vol. 40, 2013, p. 19-26.

XIANG, S., XIAOLEI, Z., GUANGCAI, C., YITAI, C., LING, W., XIAOQUAN, S. 2011, Seedling growth and metal accumulation of selected woody species in copper and lead/zinc mine tailings, In: Journal of Environmental Sciences, vol. 23 (2), 2011, p. 266-274.

Authors' addresses

Dr. Ines Grigorescu Dr. Gheorghe Kucsicsa, Dr. Monica Dumitrascu
Institute of Geography RA, Dimitrie Racovita 12, 023993 Bucharest, Romania, tel.: +40 213135990, fax: +40 213111242; e-mail: inesgrigorescu@yahoo.com, mondy_ghe@yahoo.com, stefania_dumitrascu@yahoo.com
Dr. Mihai Doroftei
Danube Delta National Institute for Research and Development (DDNI), Babadag street 165, 820112 Tulcea, Romania, tel: +40(0)240 524546, fax: +40(0)240 533547; e-mail: mihai.doroftei@ddni.ro

MIKROBIÁLNE OSÍDLENIE KOREŇOV A LISTOV DREVÍN S DÔRAZOM NA *GLEDITSIA TRIACANTHOS*

MICROBIAL INHABITATION OF ROOTS AND LEAVES OF WOODY PLANTS WITH EMPHASIS ON *GLEDITSIA TRIACANTHOS*

NIKOLA HRICÁKOVÁ – JURAJ MEDO – JANA ŽIAROVSKÁ – PETER FERUS – MAREK BARTA

HRICÁKOVÁ, N. – MEDO, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – FERUS, P. – BARTA, M. 2016. Mikrobiálne osídlenie koreňov a listov drevín s dôrazom na *Gleditsia triacanthos*. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 121-128. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
The ability of some plants to fix nitrogen has significant ecological and economic effect. In addition of plant species living in symbiosis with nodulating bacteria, there were also identified different species which fix nitrogen in different form of cohabitation. In this study, we analysed four plant species *Gleditsia triacanthos, Gleditsia japonica, Robinia pseudoacacia,* and *Betula pendula* from different localities for determination microbial communities associated with roots and leaves. Samples were obtained from soil and three different areas of plant-root surface, root tissue and leaves of the plants. We used the high through sequencing on Illumina MiSeq. According to the analyses, the most occurring microorganisms belonged to genera *Actinomycetes* and *Proteobacteria*. The number of detected OTU (Operation Taxonomic Unit) decreased in the order - soil, root surface, root tissue, and leaves. It was found high degree of similarity among bacterial communities in plant leaves tissues. For species of *Gleditsia triacanthos*, no specific community of microorganisms was detected. Bacteria *Rhizobiales*, responsible for nitrogen fixation, were present in the range of 5.1 to 16.3%. Interestingly, differences between microbial communities of *Betula pendula* and *Gleditsia* were not found. Taxonomic analysis did not confirm any specific group of microorganisms.

Key words: nitrogen fixation, endophytic microflora, *Gleditsia triacanthos*

ÚVOD

Gledíčia trojtŕňová (*Gleditsia triacanthos* L.) patrí do čeľade *Caesalpiniaceae (Fabaceae)*, ktorá zahrňuje približne 2 250 tropických a subtropických stromov (LEWIS 2005). Rod *Gleditsia* obsahuje 14 druhov rastúcich v tropických a teplých oblastiach (ALDEN 1994). Gledíčiu trojtŕňovú zaraďujeme medzi rýchlorastúce listnaté dreviny, ktoré sa dožívajú v priemere 125 rokov (BLAIR 1990). Je to opadavý, tŕnistý strom dorastajúci do výšky 20m, pôvodom zo Severnej Ameriky, ktorý sa v Európe po prvý krát objavil približne v roku 1700 (CSURHES, MAKULA 2010). Podľa Benčaťa (BENČAŤ 1982) prvá výsadba na území Slovenskej republiky bola evidovaná v roku 1806 pri kaštieli v Dolnej Krupej. Patrí medzi časté okrasné dreviny parkov a tvorí súčasť stromových alejí z dôvodu vysokej prispôsobivosti na rôzne typy pôd a odolnosti voči suchu a je úplne mrazuvzdorná. Zaraďujeme ju medzi potenciálne invazívne rastliny, čo z biologického hľadiska znamená vlastnosť meniť zloženie a komunitnú štruktúru napadnutých oblastí (VITOUŠEK 1990). Príkladom je zalesnenie pampy. Pri kolonizácii gledíčiou dochádza v tomto prípade k zmene bylinnej vegetácie na stromy a tým k zmene kvality pôdy (GESSNER, CHAUVET 2002).

Biologická fixácia predstavuje redukciu vzdušného dusíka na amoniak pomocou prokaryotických organizmov obsahujúcich enzým nitrogenázu. Atmosferický dusík viažu buď voľne žijúce alebo symbiotické mikroorganizmy, ktoré žijú v symbióze s vyššími rastlinami (BURNS et al. 2012). Veľký význam má fixácia vzdušného dusíka pomocou hrčkotvorných baktérií z rodu *Rhizobium*, ktoré na premenu využívajú energiu získavanú fotosyntézou. Rhizobiálne baktérie poskytujú rastlinám 80-98% dusíka (FECENKO, LOŽEK 2000). Schopnosť gledíčie fixovať dusík je diskutabilná.

V minulosti viaceré vedecké zdroje tvrdili, že fixácia dusíka u tohto druhu nie je možná (ALLEN 1981). Dôvodom je fakt, že na koreňoch nebola pozorovaná tvorba hrčiek (nódov) so symbiotickými baktériami, ktoré sa na samotnom procese rozkladu dusíka podieľajú. To znamená, že bez ich prítomnosti nie je fixácia dusíka možná. Existuje však predpoklad, že ku fixácii dusíka dochádza aj napriek absencii hrčiek pomocou iného mechanizmu (DJUMAEVA et al. 2010).

Vzájomné pôsobenie mikrobiálnych spoločenstiev zohráva úlohu v kolobehu živín, tým, že napomáha rozkladu organického materiálu v pôde potrebného pre rast rastlín (LUGHTENBERG 2009). Mikroorganizmy sú súčasťou solubilizačných procesov, chelatácie, oxidačných a redukčných reakcií. Okrem toho sú schopné uvoľňovať do pôdy látky so stimulačným alebo inhibičným účinkom na koreňovú sústavu (ADESEMOYE, KLOEPPER 2009). Určenie zastúpenia jednotlivých druhov pôdnych mikroorganizmov určuje akosť pôdy a taktiež môže viesť k zlepšeniu kvality pôdy. Nedávne štúdie poukazujú na fakt, že rastliny majú schopnosť formovať rhizosféru a vytvárať vhodné prostredie pre prítomnosť mikroorganizmov slúžiacich na ochranu pred patogénmi (BADRI, VIVANCO 2009). Endofyty predstavujú baktérie a huby, žijúce v rastlinných pletivách, ktoré ochraňujú rastlinu pred vplyvom patogénov. Endofytické baktérie obývajú väčšinu druhov jednoklíčnolistových aj dvojklíčnolistových rastlín (LODEWYCK et al. 2002). Baktérie žijúce v asociácii s rastlinami sú na základe ich pôsobenia na rast rastlín klasifikované do viacerých tried (DOBBELAERE et al. 2003). Spoločenstvá mikroorganizmov sa v pomerne veľkom zastúpení vyskytujú aj v iných častiach rastliny. V listoch sú mikoorganizmy vystavené teplotným výkyvom, UV žiareniu a ich výskyt ovplyvňuje obmedzený prístup k živinám (HIRRANO, UPPER 2000).

V súčasnosti je známych viacero mikrobiologických postupov slúžiacich na vyhodnotenie zastúpenia mikroorganizmov v pôde (BERENDSEN et al. 2012). Skúmanie endofytických baktérií je do istej miery obmedzené. Štúdium sekvencií génov 16S rRNA môže poskytnúť ďalšie informácie pre analýzu zastúpenia baktérií v pôde, ale aj endofytov v rastlinách (DUNBAR et al. 1999). Existuje niekoľko dôvodov na využívanie génu pre 16S rRNA v metagenomických štúdiách. Obsahujú konzervatívne oblasti, na ktoré je možné navrhovať priméry a hypervariabilné oblasti umožňujúce rozlíšenie baktérií vo vzorke (CHAKRAVORTY et al. 2007). Využitie sekvenátorov ďalšej generácie predstavuje výkonnú alternatívu pre analýzu mikrobiálnych spoločenstiev v porovnaní so sekvenovaním 16S rDNA kultivovaných bakteriálnych izolátov alebo knižníc klonov (RIESENFELD et al. 2004).

Cieľom tejto práce bolo zistiť pomocou metagenomickej analýzy bakteriálne zastúpenie v rôznych častiach rastlín gledíčie s dôrazom na korene a porovnať druhové spektrum s rastlinou relatívne príbuznou - agát biely a nepríbuznou - breza previsnutá.

MATERIÁL A METÓDY

Pre daný výskum boli odobrané vzorky 4 druhov drevín z 8 jedincov v auguste 2016 (tabuľka 1). Skúmané dreviny sme označili písmenami A-H. Jednalo sa o druhy: gledíčia trojtŕňová (*Gleditsia triacanthos* L.), gledíčia japonská (*Gleditsia japonica* L.), breza previsnutá (*Betula pendula* Roth.) a agát biely (*Robinia pseudoacacia* L.). Z každej dreviny boli spracované 4 vzorky: Z okolia dreviny boli odobrané vzorky pôdy (1), ďalej vzorka z rizosféry - z povrchu koreňa (2), vzorka z pletív povrchovo sterilizovaného koreňa (3) a vzorka listov (4). Zo vzoriek bola izolovaná DNA s cieľom zistiť druhové spektrum mikroorganizmov nachádzajúcich sa vo vzorke.

Na izoláciu DNA bol použitý kit MoBio Power Soil. Na izoláciu DNA z pôdy bolo použitých 0,25g pôdy. Korene rastlín (10g) boli mechanicky očistené od častíc pôdy a boli ponorené do 25ml fyziologického roztoku v 50 ml skúmavke. Následne sa trepali 20 minút na trepačke, čím došlo k uvoľneniu rizosférových mikroorganizmov prítomných na povrchu koreňov. Korene boli vytiahnuté z roztoku a roztok bol centrifugovaný 20min. pri 6000×g. Po centrifugácii bol roztok vyliaty a z usadeniny bola izolovaná DNA rovnakým spôsobom ako z pôdy. Korene boli ďalej opláchnuté pod tečúcou vodou, vložené do roztoku 5% NaHClO na 2 minúty a následne opláchnuté 2× sterilnou

vodou. Tento krok zabezpečil likvidáciu DNA na povrchu koreňov. Korene boli potom nastrihané (0,25g) a rozdrvené v homogenizátore Beadbug a následne bola vyizolovaná DNA. Listy rastlín boli spracované rovnakým spôsobom.

Približne 500 bp dlhý úsek génu pre 16S rRNA baktérií bol amplifikovaný pomocou PCR s univerzálnymi primérmi pre baktérie, ktoré boli upravené pre použitie so sekvenátormi Illumina (KLINDWORTH et al. 2013). Reakčná zmes obsahovala 10µl KAPA HiFi polymerase mastermix, 4µl každého priméru a 2µl izolovanej DNA. Podmienky reakcie boli: úvodná denaturácia 3 min. pri 95°C bola nasledovaná 40 cyklami denaturácie pri 98°C počas 15s, annealing 20s pri 60°C a polymerizácia 30s pri 72°C a záverečný polymerizačný krok 2 min. pri 72°C. Na PCR produkty boli naviazané indexy a adaptory pre Illuminu MiSeq pomocou ôsmich cyklov PCR a Nextera XT index kit podľa návodu výrobcu. Knižnica pre Illumina MiSeq bola pripravená podľa protokolu (Illumina) a čítanie prebiehalo s kitom V3 2×300bp na katedre zoológie UKF v Nitre.

Získané sekvencie boli spracované v programe Seed (VĚTROVSKÝ, BALDRIAN 2013) a následne boli zoskupené do zhlukov s podobnosťou 97% pomocou algoritmu Uparse (EDGAR, 2013). Pre každý zhluk bola získaná reprezentatívna sekvencia, ktorá bola identifikovaná pomocou databázy Silva (YILMAZ et al. 2014) na úroveň rodu. Teplotná mapa bola vytvorená v softvéri R s využitím knižníc gplot, annheatmap2 a vegan.

Tab.1 Zoznam odberných miest s potrebnými informáciami o vzorkách.

Označenie vzorky	Druh	Vek rastliny	Miesto odberu	Poznámka
A	Breza previsnutá	15-20 rokov	Arborétum Mlyňany SAV	Vysadená v arboréte
B	Agát biely	5-10 rokov	Arborétum Mlyňany SAV	Náletová drevina
C	Gledíčia trojtŕňová	2-3 roky	Komiatice	Samovoľný výsev
D	Gledíčia trojtŕňová	15-20 rokov	Komiatice	Vysadená - vinice
E	Gledíčia japonská	15-20 rokov	Arborétum Mlyňany SAV	Vysadená v arboréte
F	Gledíčia trojtŕňová	1 rok	Arborétum Mlyňany SAV	Pestovaná v nádobe
G	Gledíčia trojtŕňová	2 roky	Arborétum Mlyňany SAV	Pestovaná v nádobe
H	Gledíčia trojtŕňová	25-30 rokov	Arborétum Mlyňany SAV	Vysadená v arboréte

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýzou všetkých vzoriek bolo spolu získaných 84 365 sekvencií, teda priemerne 2 636 sekvencii na vzorku. Po zhlukovej analýze bolo vytvorených 8 552 zhlukov a 7 762 sekvencií bolo vylúčených ako chiméry. Do fylogenetickej analýzy sme zaradili len operačné taxonomické jednotky (OTU) – zhluky ktoré obsahovali viac ako 3 sekvencie. Po identifikácii však bolo zistené, že viac ako 43 tisíc sekvencií patrí chloroplastom. Takéto sekvencie sa nachádzali predovšetkým vo vzorkách listov, kde predstavovali viac ako 95% všetkých získaných dát. Vyskytovali sa tiež vo vzorkách koreňov, aj keď v menšom množstve. Pre úspešné využitie metódy je preto potrebné uvažovať o použití techník, ktoré z analýzy vylučujú chloroplasty, avšak zachovávajú DNA mikroorganizmov. Vo všeobecnosti sú skúmané 2 možnosti - využitie špecifických primérov, ktoré pri PCR neamplifikujú chloroplastovú DNA (HANSHEW et al. 2013), alebo použitie reštrikčného enzýmu, ktorý štiepi chloroplastovú DNA, ktorá sa následne neamplifikuje (RASTOGI et al. 2010).

Z hľadiska mikrobiálneho osídlenia bol najvyšší počet OTU zaznamenaný vo vzorkách pôdy (56-564 OTU) a z rizosféry. Vnútorná časť koreňov obsahovala menej OTU a najnižšia diverzita bola zistená v listoch (11-26 OTU). Tento fakt však možno pripísať aj nízkemu počtu mikrobiálnych sekvencií z listov v pomere k chloroplastovým sekvenciám. Indexy biodiverzity a počty zistených OTU pre jednotlivé vzorky sú znázornené v grafe obrázok 1. Taxonomická príslušnosť jednotlivých OTU na

úrovni kmeňa je znázornená v grafe obrázok 2. Najčastejšie sa vyskytovali proteobaktérie a aktinomycéty, menej acidobaktérie a *Verrucomicrobia.* Teplotná mapa s vyznačením podobnosti mikrobiálneho zastúpenia medzi vzorkami a podobnosti výskytu mikroorganizmov vo vzorkách je znázornená na obrázku 3. Z obrázku vyplýva jednoznačné odčlenenie väčšiny vzoriek z listov od ostatných vzoriek, pričom vzorky z pôdy a koreňov nie sú viditeľne rozdielne.

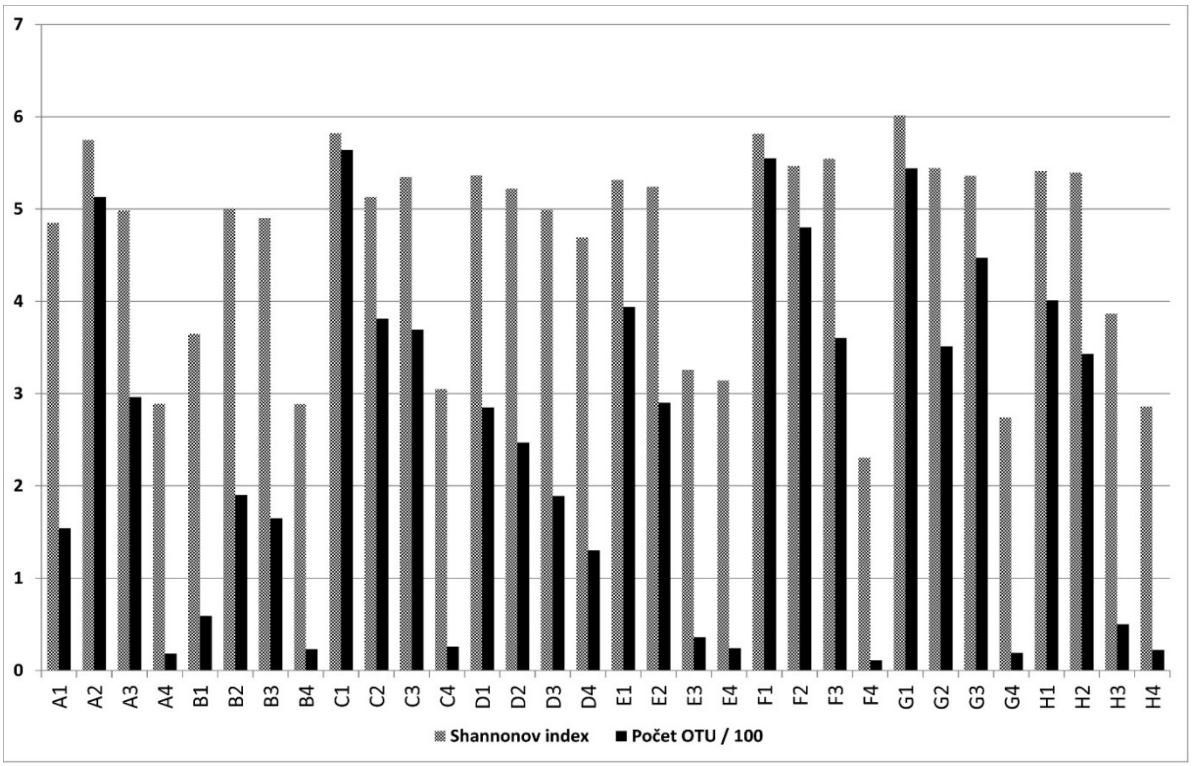
Pri skúmaní výskytu baktérií z radu *Rhizobiales* vo vnútri koreňov sme zistili, že ich podiel je v rozsahu od 5,1 do 16,3%. U gledíčie trojtŕňovej tvorili 5,1 až 8,3% ale u brezy predstavovali až 15,6%. U gledíčie japonskej 16,3%. V tejto skupine sa ale nachádzajú rôzne rody, ako *Bradyrhizobium, Rhodoplanes, Mesorhizobium* ale aj *Agrobacterium*. U brezy a *Gleditsia japonica* bol najvýraznejšie zastúpený rod *Rhodoplanes*, v oboch viac ako 10%. Vo vzorkách *Gleditsie japonica* nemala žiadna OTU z radu *Rhizobiales* zastúpenie vyššie ako 1,6%. Baktérie z radu *Rhizobiales* patrili medzi časté OTU detegované aj vo vzorkách z povrchu koreňov v zastúpení 5-12%. Výskyt týchto baktérií bol však pomerne vysoký aj v pôde v rozsahu 5-7%. U nodulujúcich druhov hlavnú úlohu pri procese fixácie dusíka zohrávajú baktérie z čeľade *Rhizobiaceae*, ktoré sú uzavreté v hrčkách koreňov (WILLEMS 2006). Efektívna biologická fixácia dusíka rhizobiami je uskutočňovaná vďaka týmto hrčkám (DIXON, KAHN 2004). Rod *Bradyrhizobium* z čeľade *Rhizobiaceae* patrí medzi druhy so schopnosťou fixovať atmosferický dusík. Vo väčšine prípadov sa vyskytuje vo forme hrčiek, ktoré sa na koreňoch gledíčie nenachádzajú. Na základe našich výsledkov bol tento rod vyhodnotený ako jeden z najpočetnejších. Vzhľadom na fakt poukazujúci na prítomnosť *Bradyrhizobium* predovšetkým u nodulujúcich rastlín nie je jeho funkcia u nenodulujúcich rastlín potvrdená aj napriek jeho prítomnosti. V literatúre sú k dispozícii taxonomické, anatomické a morfologické dôkazy potvrdzujúce fixáciu dusíka u týchto zástupcov (BRYAN et al. 2011). Oba druhy, teda jedince s prítomnosťou a absenciou hrčiek, boli pozorované v prostredí s pôdou obsahujúcou nízku hodnotu dusíka. Výsledky poukázali na prítomnosť dusíka v týchto drevinách, ktorá v niektorých prípadoch dosahovala dokonca vyššie hodnoty ako u iných rastlín (BRYAN 1995). Elektrónová mikroskopia ukazuje na prítomnosť útvarov umiestnených v okolí vnútornej kôry koreňov, v malej vzdialenosti od xylému, pripomínajúce kolónie rhizobiálnych baktérií (ELKAN et al. 1995). Podľa BRYANA (1995) existujú viaceré tvrdenia pojednávajúce o prítomnosti rhizobiálnych baktérií v nenodulujúcich rastlinách. Ich prítomnosť bola pozorovaná počas infekcie v koreňových vláskoch gledíčie (ALLEN, ALLEN 1981).

Medzi ďalšie veľmi početné skupiny baktérií v koreňoch patrili rody *Flavobacterium, Pseudomonas* a *Lactococcus* a čeľaď *Enterobacteriaceae*, ktoré sa vyskytovali vo väčšine vzoriek. Poslednú pozorovanú skupinu tvorili vzorky listov u ktorých medzi najčastejšie baktérie patrili druhy z radov *Actinomycetales, Lactobacilales a Pseudomonadales*.

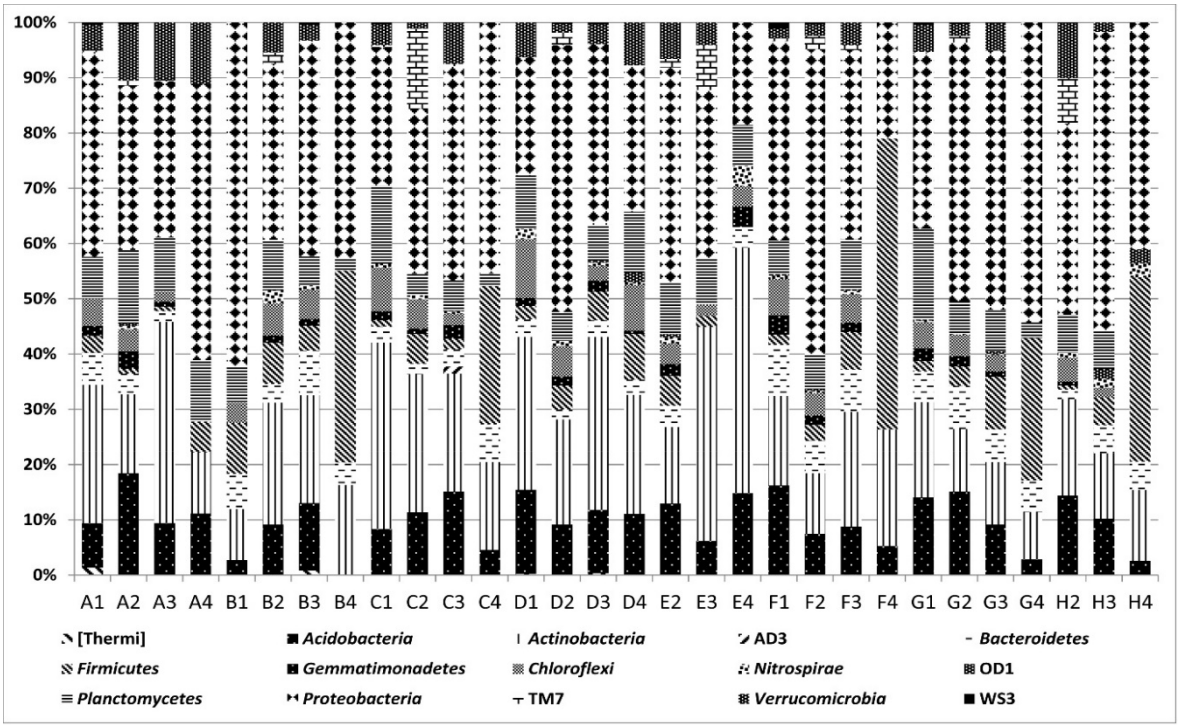
ZÁVER

Rôzne druhy rastlinných pletív poskytujú podmienky pre rast špecifických skupín mikroorganizmov a hoci mikrobiálne osídlenie pôdy na konkrétnom stanovišti ovplyvňuje aj výskyt mikroorganizmov v rastline, druhové zastúpenie mikroorganizmov vo vnútri rastliny sa výrazne líšilo. U nami pozorovaných druhov nebola nájdená špecifická skupina mikroorganizmov, ktorá by mala zastúpenie len u gledíčie. V jednotlivých vzorkách gledíčie mali baktérie radu *Rhizobiales* pomerne veľký podiel, aj keď v rastline neprodukujú nódy. Nami zvolená metóda metagenomického sekvenovania slúžiaca na detekciu zastúpenia jednotlivých rodov a radov mikroorganizmov narazila na limitáciu z dôvodu prítomnosti chloroplastov, ktoré pri vzorkách listov predstavovali najväčšie zastúpenie. Aj napriek tomu, že pôdu osídľovalo veľké množstvo mikroorganizmov, nie všetky prechádzali do koreňov rastlín. Jednou z funkcií koreňa je vylučovanie špecifických látok, tzv. atraktantov (flavonoidov), ktoré ovplyvňujú rozvoj mikroorganizmov. Podporujú aj tvorbu a vývoj hrčiek a pôsobia ako stimulátory nif génov. Nif gény v baktériách slúžia na fixáciu dusíka a syntetizáciu nitrogenázy. Ich výskyt bol pozorovaný predovšetkým v plazmidoch baktérií rodu *Rhizobium*. Vzhľadom na to by bolo vhodnejšie uskutočniť analýzu nif génov potrebných pre fixáciu

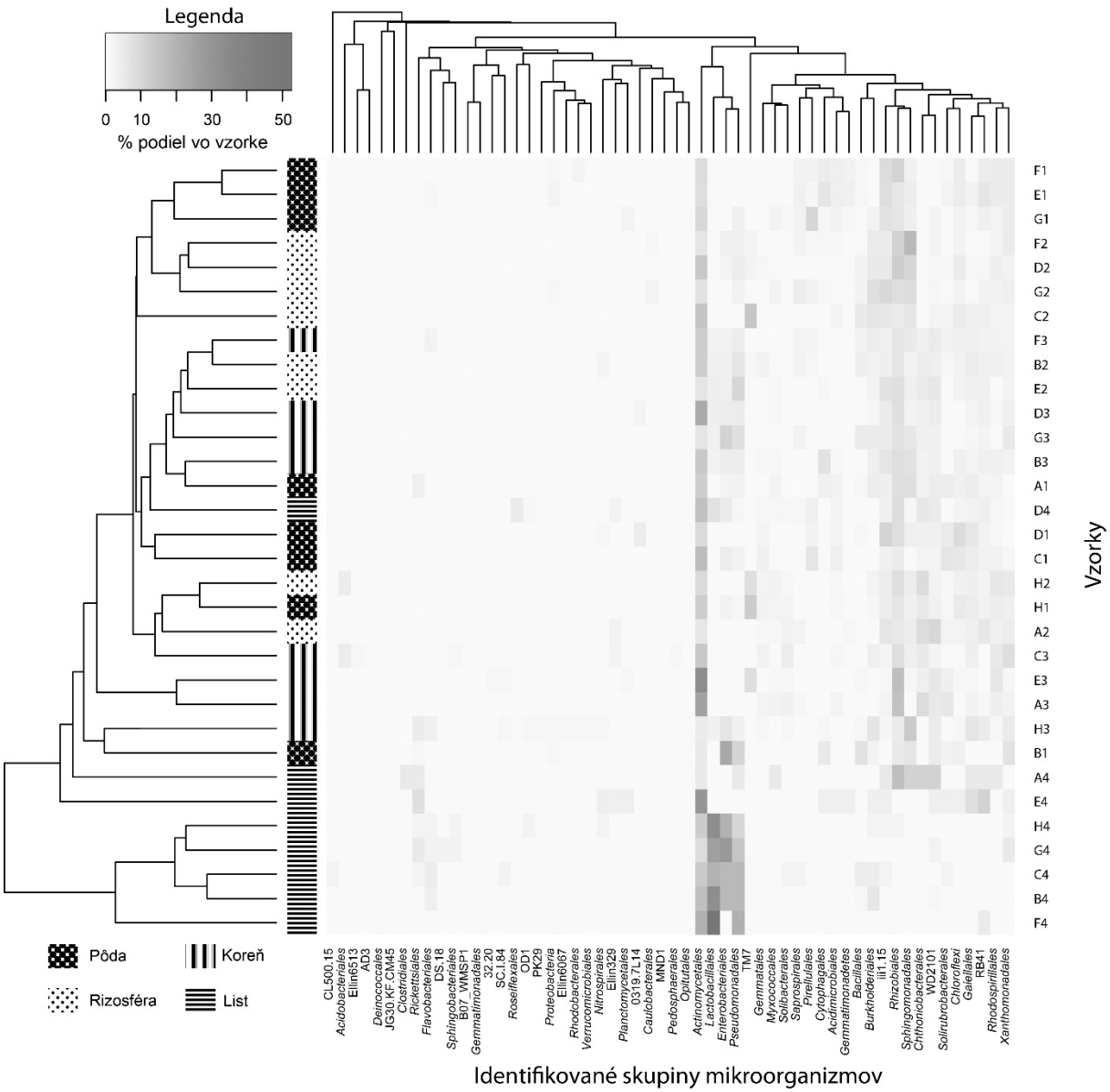
dusíka a na základe výsledkov zistiť ich vplyv u nenodulujúcich druhov *Gleditsia triacanthos* a *Gleditsia japonica*.



Obr. 1 Indexy biodiverzity bakteriálnych komunít a počty operatívnych taxonomických jednotiek (OTU) detegovaných v pôde a rôznych častiach drevín.



Obr. 2 Spektrum identifikovaných baktérií na úrovni kmeňa, prítomných v pôde a rôznych častiach drevín.



Obr. 3 Teplotná mapa zobrazujúca distribúciu najčastejších radov baktérií (s výskytom viac ako 1%) vo vzorkách pôdy a rôznych častí drevín.

POĎAKOVANIE

Práca bola finančne podporená projektom VEGA 2/0025/15 a európskym projektom „Building Research Centre AgroBioTech" s číslom 26220220180. Autori chcú poďakovať prof. RNDr. Radoslavovi Omelkovi PhD., za možnosť použiť prístroj Illumina MiSeq a PaeDr. Janke Medovej PhD. za pomoc s bioinformatickým spracovaním v programe R.

LITERATÚRA

ADESEMOYE, A.O., KLOEPPER, J.W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. In: Appl.Microbiol.Biotechnol. vol. 85. p. 1-12.

ALDEN, H.A. 1994. Technology transfer fact sheet: *Gleditsia Triacanthos*. Queensland: Center for Wood Anatomy Research, 17p.

ALLEN, O.N., ALLEN E.K. 1981. The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. USA: Univ. Wisc.Press. 812p. ISBN 9780333322215.

BADRI, D.V., VIVANCO, J.M. 2009. Regulation and function of root exudates. In: Plant Cell Environ. vol. 32. p. 666-681.

BENČAŤ, F. 1982. Atlas rozšírenia cudzokrajných drevín na Slovensku (Atlas of exotic tree species spreading in Slovakia). Bratislava: Veda. 368p.

BERENDSEN, R.L., PIETERSE, C.M.J., BAKKER, P.A.H.M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. In: Trend Plant Sci. vol. 17, p. 478-486.

BERG, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. In: Appl. Microbiol. Biotechnol. p. 11-18.

BROWN, R.G., BROWN, M. L. 1972. Woody plants of Maryland. Baltimore, MD: Port City Press. 347p. ISBN 21844.

BRYAN, J. A. 1995. Leguminous Trees with Edible Beans, with Indications of Rhizobial Symbiosis in Non-Nodulating Legumes. Doctorant dessertation. Yale University.

BRYAN, J. A., BERLYN, G.P., GORDON J.C. 2011. Toward a new concept of the evolution of symbiotic nitrogen fixation in the Leguminosae. In: Plant and Soil. p. 151-159.

BURNS, R. C., RALPH, W., HARDY, F. 2012. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Vol. 21. Dortrecht: Springer Science & Business Media, 192s. ISBN 978-3-6428-0926-2

CSURHES S., MARKULA, A. 2010. Honey locust (*Gleditsia triacanthos*) 1.st edition.Queensland: Department of Agriculture and Fisheries Biosecurity, 17p.

DIXON, R., KAHN, D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. In: Nature Reviews Microbiology vol. 2, no. 8, pp. 621-631. ISSN: 1740-1534.

DJUMAEVA, D., LAMERS J.P.A.,MARTIUS C. KHANZINA A., IBRAGIMOV N., VLEK P.L.G. 2010. Quantification of symbiotic nitrogen fixation by *Eaeagnus angustifolia* L. on salt-affected irrigated croplands using two 15N isotopic methods. In: Nutrient Cycling in Agroecosystems vol.88. p. 329-339.

DOBBELAERE S. VANDERLEYDEN J., OKON Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere, In: CRC Crit Rev Plant Sci. vol. 22. p. 107-149.

DUNBAR, J., TAKALA S. BARNS S.M., DAVIS J.A. KUSKE C.R. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. In: Appl Environ Microbial. vol. 56. p. 1662-1669.

GESSNER M.O., CHAUVET, E. 2002. A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. In: Ecological Applications vol.12. p. 498-510.

HIRRANO, S.S., UPPER, C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas* syringe, a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. In: Microbiol Mol Biol Rev. vol. 64. p. 624-653.

CHAKRAVORTY, S., HELB, D., BURDAY, M. CONNELL, N., ALLAND, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. In: Journal of Microbiological methods. vol. 69. p. 330-339.

EDGAR, R.C. 2013. UPRASE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. In: Nat Meth vol. 1O. p. 996-998.

FECENKO J., LOŽEK, O. 2000. Výživa a hnojenie poľných plodín. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita. 442p. ISBN 80-7137-777-5.

HANSHEW, A.S., MASON, C. J. RAFFA, K.F., CURRIE, C.R. 2013. Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities. In: J Microbiol Methods vol.95. p. 149-155.

KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R., ZABLOTOWITZ, R. M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productity. In: Trends Bio-technol. vol. 7. p. 39-43.

LEWIS, G.P. 2005. Legumes of the world. In: Kew Scientist vol.28. p. 1-8. ISSN 0967-8018.

LODEWYCK, C., VANGRONSVELD, J. PORTEOUS, F., MOORE, E.R.B., TAGHAVI, S., MEZGEAY, M., LELIE, D.V.D. 2002. Endophytic bacteria and their potential application. In: Crit Rev Plant Sci. vol. 86. p. 583-606.

LUGTENBERG, B., KAMILOVA, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. In: Ann, Rev. Microbiol. vol. 63. p. 541-556.

RASTOGI, G., TECH, J.J., COAKER, G.L., LEVEAU, J.H. 2010. A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments. In: J Microbiol Methods vol.83. p.127-132.

RIESENFELD, C.S., SCHLOSS, P.D, HANDELSMAN, J. 2004. Metagenomics: genomics analysis of microbial communities. In: Annu Rev Genet. vol. 38. p. 525-552.

SINGH, D.P, HOODA, M.S, BOONER, F.T. 1991. An evaluation of scarification methods for seeds of two leguminous trees. In: New Forests. Vol 5. p. 139-145.

ŰRGENÇ S. 1998. Genel Plantasyon ve Ağaçlandirma Teknği. Istanbul: Istanbul University, Faculty of Forestry

VITOUŠEK, P.M. 1990. Biological invasions and ecosystem processes: towards an integration of population biology and ecosystem studies. In: Ecosystem management vol.57. p. 7-13. ISBN 978-1-4162-4018-1.

WILLEMS, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. In: Plant and Soil vol. 287, no. 1-2, pp. 3-14. ISSN: 1573-5036.

YILMAZ, P., PARFREY, L.W., YARZA, P., GERKEN, J., PRUESSE, E., QUAST, C., SCHWEER, T., PEPLIES, J., LUDWIG, W., GLÖCKNER, F. O. 2014. The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. In: Nucl.Acids res. vol.42. p. 643-648.

Adresa autorov

Bc. Nikola Hricáková – Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Katedra mikrobiológie, Tr.A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: nika.hricakova@gmail.com

Ing. Juraj Medo, PhD. – Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Katedra mikrobiológie, Tr.A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: juraj.medo@uniag.sk

doc. Ing. PaedDr. Jana Žiarovská, PhD. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Katedra genetiky a šlachtenia rastlín, Tr.A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: jana.ziarovska@uniag.sk

Ing. Peter Ferus, PhD. a Ing. Marek Barta, PhD. – Arborétum Mlyňany SAV pobočka Ústavu ekológia lesa SAV, Vieska nad Žitavou 178, 951 52 Slepčany, e-mail: peter.ferus@savba.sk, marek.barta@savba.sk

ANALÝZA ZÁKLADNÝCH KLIMATICKÝH FAKTOROV V ARBORÉTE MLYŇANY SAV VO VIESKE NAD ŽITAVOU ZA OBDOBIE ROKOV 2001–2015

ANALYSIS OF THE ESSENTIAL CLIMATIC FACTORS IN THE ARBORETUM MLYNANY SAS IN VIESKA NAD ŽITAVOU FOR THE PERIOD 2001–2015

PAVEL HRUBÍK – DANIELA HOLEČKOVÁ

HRUBÍK, P. – HOLEČKOVÁ, D. 2016**.** Analýza základných klimatickýh faktorov v Arboréte Mlyňany SAV vo Vieske nad Žitavou za obdobie rokov 2001–2015. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 129-136. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Analysis of meteorological records and climate conditions in Arboretum Mlyňany SAS for the period 2001 - 2015 (air temperature, atmospheric precipitation and evaluation of each season), points to the real climate change on that area, and their impact on alien tree species grown in the world-famous dendrological facility. More detailed results are shown in Table 1, 2 and 3.

Key words: exotic woods, analysis of major meteorological elements, climate conditions, Arborétum Mlyňany SAS.

ÚVOD

Od začiatku nášho dlhodobého sledovania základných klimatických faktorov (teplota vzduchu, atmosférické zrážky, relatívna vlhkosť vzduchu, rýchlosť vetra, celkové hodnotenie jednotlivých ročných období) v roku 1971, sme ich vždy hodnotili ako významný ekologický faktor v celkovom procese aklimatizácie a introdukcie drevín, najmä v súvislosti s extrémnymi teplotami (poškodenie mrazom, suchom), ako aj snehové a vetrové polomy a kalamity. Klimatické podmienky považujeme za jeden z dôležitých ekologických faktorov pre introdukované dreviny v našich podmienkach (tolerancia proti nízkym teplotám vzduchu – výskum mrazuvzdornosti; tolerancia proti vysokým teplotám a deficit atmosférických zrážok – výskum tolerancie proti suchu).

Z uvedenej problematiky sme publikovali viacej prác (evidované v Bibliografii Arboréta Mlyňany SAV), ako aj novšie práce, napr. HRUBÍK, TOMAŠKO, HOŤKA, KUBA (2006), HRUBÍK, HOŤKA (2007), HRUBÍK, KOLLÁR (2008), HRUBÍK, HOŤKA, KOLLÁR (2009), HRUBÍK, HOŤKA, KUBA, FOGADOVÁ (2010 a 2011).

Na základe dlhodobých výsledkov za uplynulých 45 rokov (1971–2015), v súčasnosti akceptujeme ako podklad pre ďalšie výskumy v Arboréte Mlyňany SAV, nový dlhodobý normál za obdobie 30 rokov (1971–2000): priemerná teplota vzduchu 10,6 °C a ročný úhrn zrážok 541 mm (tabuľka 1 a 2). Klimatické charakteristiky jednotlivých ročných období za obdobie 1975–2004 a aktuálne obdobie za ostatných 11 rokov (2005–2015), tabuľka 3.

V súvislosti s uplynulým rokom 2015 sme v dennej tlači zachytili niekoľko názorov odborníkov k aktuálnym klimatickým podmienkam, ktoré sme zahrnuli aj do úvodnej časti tohto príspevku. Rok 2015 prekvapil klimaticky, podľa meteorologických záznamov od roku 1898 také teplé leto v Tatranskej Lomnici ešte nebolo."Na to, že sa počasie v posledných rokoch mení ako na hojdačke si už zvykáme. Zmeny v tomto roku však boli až extrémne. Aj keď sme nezaznamenali rekordné maximá, priemerná teplota bola vyššia od dlhodobého normálu takmer dva stupne. Aj zrážkovo to bol jeden z najchudobnejších rokov v histórii", uviedol Peter Fleischer, vedúci Výskumnej stanice a Múzea Tatranského národného parku Štátnych lesov TANAP-u. V prípade tatranských prirodzene smrekových lesov prevažujú obavy z dôsledku meniacich sa podmienok (Klimatické zmeny

tatranským lesom neprospievajú. Pravda, piatok 27.11.2015, Slovensko správy). "Na väčšine Slovenska sa do konca týždňa môžeme tešiť na príjemné teploty" (Okrem Tatier na sneh zabudnite. Nový čas, štvrtok, 3. 12. 2015, Igor Ľudma). "Očakávame inverzné počasie, oteplí sa najmä vo vyšších polohách. Snežiť by nemalo dokonca ani v nadmorskej výške nad 1 500 metrov", povedal meteorológ SHMÚ Štefan Dlhoš.

Klimatologická konferencia v Paríži (14. 12. 2015), bola podľa odborníkov poslednou šancou na to, aby štáty zmiernili vplyvy globálneho otepľovania. "Konferencia je iba jedným z krokov, ktoré by mohli zabrzdiť vzostup globálnej teploty na Zemi. Rozhodujúce bude ich plnenie na úrovni jednotlivých štátov", povedal klimatológ Faško. Slovensko skončilo v rebríčku na 26. mieste z 58 krajín. Podľa slov klimatológa globálne otepľovanie v prírodných podmienkach Slovenska spôsobuje vzostup teploty vzduchu a mení režim zrážok. „Treba riešiť aj problém jadrového odpadu. V súvislosti s produkciou oxidu uhličitého sme vo výhodnej pozícii aj preto, že sa u nás po roku 1989 zmenila štruktúra ťažkého priemyslu a mnohé prevádzky boli zrušené. Takže sa nám doteraz celkom darilo plniť kritériá“, hovorí o našom umiestnení Pavol Faško.

Lídri takmer dvoch stoviek štátov sa na klimatologickej konferencii v Paríži dohodli na viacerých bodoch, ktoré majú zmierniť globálne otepľovanie a prispieť k zmenšovaniu stále sa zvyšujúcich extrémov v počasí. V praxi to znamená, že v druhej polovici storočia by mal nastať stav, keď sa vypustí len toľko emisií, koľko bude príroda schopná spotrebovať. Schváleným opatreniam sa bude musieť prispôsobiť aj Slovensko.

Množstvo odborníkov považuje za veľký problém pre životné prostredie práve globálne otepľovanie. Podľa aktuálnych prepočtov by bez spoločného zásahu krajín do konca storočia narástla teplota na Zemi o viac ako 3 °C, čo by znamenalo zvýšenie hladiny oceánov a zaplavenie nižšie položených oblastí. Podľa OSN by sa to dotklo minimálne piatich stoviek miliónov ľudí a nastala by oveľa väčšia migračná kríza ako v súčasnosti (2015). Stále častejší je aj výskyt extrémnych poveternostných javov – záplav, veľkých horúčav, či hurikánov. Parížska dohoda sa katastrofické predpovede snaží zvrátiť. Takmer dve stovky krajín sa v nej zaviazali, že chcú dostať otepľovanie k 1,5 °C oproti teplotám z predindustriálneho obdobia. Dokument je veľkým úspechom a signalizuje ústup od fosílnych palív. Zaväzuje nás však k znižovaniu emisií a postupné prebudovanie našej ekonomiky k nízkouhlíkovej budúcnosti. Nie sú síce stanovené konkrétne ciele obmedzenia pre jednotlivé krajiny. Problémový je návrh aj v tom, že neposkytuje garancie na dostatok financií pre chudobné krajiny, ktoré sú zároveň aj najviac postihnuté klimatickou zmenou.

Dosahy globálneho otepľovania zažívame už aj na vlastnej koži. V čase, keď sme sa pred rokmi brodili v snehu, fúka mierny vietor a je 10 °C nad nulou, v lete nás a v miernom teplotnom pásme sužujú tropické horúčavy. Ak celosvetovo nenájdeme spôsob, ako týmto zmenám zabrániť, môžu byť následky katastrofálne. Zmena klímy môže ľuďom zničiť živobytie, destabilizovať spoločnosť a zabrániť rozvoju. Môže mať dokonca vplyv na migráciu miliónov ľudí, ktorých z domovov vyženú extrémne suchá, zosuvy pôdy, záplavy, extrémne meteorologické javy (hurikány, cunami), zmena podnebia ovplyvňuje aj poľnohospodárstvo, t. j. schopnosť dopestovať si potraviny (ohrozené bude aj lesníctvo). Európa je v oblasti zmierňovania dosahov zmeny klímy svetovým lídrom. Ako prvá na svete sa podujala prijať záväzné ciele a onedlho sa stane globálnym lídrom vo využívaní obnoviteľných zdrojov energie.

MATERIÁL A METÓDY

Základným predpokladom pre náš dlhodobý výskum boli pravidelné záznamy Meteorologického observatória (predtým pracovisko Geofyzikálneho ústavu SAV v Bratislave), v súčasnosti v správe Arboréta Mlyňany SAV, vo Vieske nad Žitavou, ktoré boli cenným zdrojom podrobných denných záznamov o biometeorologických prvkoch (teplota vzduchu, atmosférické zrážky, vrátane snehu, záznamy o sile vetra), vždy vo vzťahu k bohatému sortimentu

introdukovaných (a autochtónnych) drevín, rastúcich na území dendrologického objektu, s rozlohou takmer 70 ha, svetového významu a úctyhodného veku (rok založenia 1892).

Získané meteorologické údaje podrobnejšie analyzujeme v mesačných a ročných intervaloch, príležitostne publikujeme alebo referujeme o nich na vedeckých a odborných komisiách. Pre účely vedeckého výskumu sme stanovili nový dlhodobý normál za uplynulých 30 rokov (1971–2000): priemerná ročná teplota vzduchu 10,6 °C a ročný úhrn zrážok dosahujúci 541 mm. Vypracovali sme súhrnné tabuľkové prehľady pre teplotu vzduchu (Tabuľka 1), atmosférické zrážky (Tabuľka 2) za obdobie ostatných 15 rokov (2001–2015) a klimatické charakteristiky jednotlivých ročných období za roky 2005–2015 (11 rokov), ktoré potom v ďalšom texte príspevku podrobnejšie komentujeme.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Klimatické podmienky sa neustále menia a ich dôsledky sa prejavujú a bezprostredne vplývajú na dlhoveké organizmy, ako rastliny (v našom prípade dlhoveké stromy) sú. V tomto príspevku sa zaoberáme podrobnejšou analýzou klimatických podmienok za obdobie ostatných rokov (2001–2015), vo vzťahu k celkovým ekologickým podmienkam, ktoré na uvedenom území Arboréta Mlyňany SAV, majú vplyv na pestované cudzokrajné dreviny.

Výrazný nedostatok, resp. dlhodobá absencia výživy (formou organických, či minerálnych hnojív, prípadne kvalitných kompostov) a celkové skvalitnenie pôdnych podmienok, deficit až výrazný nedostatok pôdnej vlahy, extrémne a dlhotrvajúce horúčavy, mierne zimy s nedostatkom snehu, zanedbanie pestovateľských a výchovných opatrení parkových porastov, obmedzujúcich aj výsadby nových, mladých drevín, vo veľkej miere ovplyvňujú alebo znemožňujú obnovu prestarnutých porastov stromov a krov pre dominantné cudzokrajné, v našich podmienkach introdukované dreviny.

Pre účely tohto príspevku (ako sme už uviedli) sme podrobnejšie charakterizovali základné klimatické podmienky (teplota vzduchu, atmosférické zrážky, ako aj ich hodnotenie podľa jednotlivých ročných období), za uplynulých 15 rokov (2001–2015), v Arboréte Mlyňany SAV vo Vieske nad Žitavou.

Ak zoberieme do úvahy aktuálny dlhodobý normál (1971–2000), s priemernou teplotou vzduchu 10,6°C, a úhrnom atmosférických zrážok 541 mm, môžeme hodnotené obdobie považovať po teplotnej stránke za zhodné (10,6°C) a pri porovnaní atmosférických zrážok za mierne nadnormálne (596 mm). V konkrétnom období sa iba štyrikrát vyskytli roky s priemernou ročnou teplotou vzduchu pod 10°C (9,5°C v r. 2005; 9,8°C v r. 2004, 2010; 9,9°C v r. 2001). Pričom sme v tomto období zaznamenali štyrikrát vyššie priemerné teploty vzduchu ako 11 °C (11,7°C v r. 2014; 11,2°C v r. 2007 a 2015; 11,1°C v r. 2008). Priemerné ročné teploty vzduchu zhodné s dlhodobým normálom (10,6°C), alebo pohybujúce sa v blízkosti tohto priemeru sme zaznamenali sedemkrát (10,1°C v roku 2006; 10,4°C v roku 2003; 10,5°C v r. 2011; 10,6°C v r. 2013; 10,7°C v r. 2002; 10,9°C v r. 2009 a 2012). Pri porovnaní priemerných mesačných teplôt vzduchu boli najteplejšie mesiace jún, júl a august (19,1–21,4°C) v hodnotenom 15 ročnom období. Extrémne mesačné teploty boli zaznamenané v júli 2006 (22,8°C), v júli 2010 (22,2°C), v auguste 2003 (22,3°C), v júli 2012 (22,1°C). Mesačné teploty vzduchu, klesajúce pod bod mrazu sa vyskytovali prevažne v januári (- 4,0°C v r. 2006; -3,4°C v r. 2004; -2,6°C v r. 2010) a v mesiaci december, s minimom - 5,8°C v r. 2001; -2,1°C v r. 2010; -1,4°C v r. 2012. Pre potvrdenie reálne existujúcich klimatických zmien, ktoré sme evidovali aj na území rozsiahleho, vyše 120 ročného dendrologického objektu – Arboréta Mlyňany SAV, môžu slúžiť údaje o priemernej ročnej teplote vzduchu, presahujúce dlhodobý normál (10,6°C), ale najmä hodnoty na hranici 11,0°C (maximum 11,7°C v r. 2014). Podrobnejšie údaje sú uvedené v Tabuľke 1.

Pri podrobnejšej analýze atmosférických zrážok (v mm), za hodnotené obdobie (2001– 2015), konštatujeme výrazný deficit atmosférických zrážok počas rokov 2003 (404 mm), 2011 (439 mm) a 2012 (447 mm). Na druhej strane boli zasa roky s výrazne nadnormálnym ročným úhrnom atmosférických zrážok: 918 mm v r. 2010; 769 mm v r. 2005; 694 mm v r. 2002; 637 mm v r. 2009; 625 mm v r. 2007; 616 mm v r. 2004. Ak hodnotíme mesačné úhrny atmosférických zrážok, absolútne

maximum bolo dosiahnuté v mesiaci august v r. 2015 - 166 mm; 139 mm v auguste 2010; 131 mm v júni 2010. Stomilimetrové mesačné úhrny atmosférických zrážok sa v hodnotenom období vyskytli 15 krát. Naopak, zasa minimálne mesačné úhrny atmosférických zrážok sme zaznamenali v novembri 2011 a v apríli 2007 (0,0 mm), v marci 2003 a 2012 (1,0 mm), v auguste 2012 (3,0 mm). Uplynulé 15-ročné obdobie môžeme v Arboréte Mlyňany SAV charakterizovať ako mierne nadnormálne (596 mm), oproti dlhodobému normálu 541 mm.

Tab. 1 Teplota vzduchu (v °C), priemerné mesačné, ročné (a dlhodobý normál) hodnoty v Arboréte Mlyňany SAV za obdobie 2001–2015 (15 rokov).

Rok	Dlhodobý normál: 1931–1960												
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	Rok
	-2,6	-0,7	3,7	9,6	14,6	17,7	19,6	18,7	14,8	9,2	4,4	0,1	9,1
	Dlhodobý normál: 1971–2000												
	-1,9	1,7	4,9	12,0	16,4	19,1	19,3	20,7	15,0	11,6	6,2	1,3	10,6
	Dlhodobý normál: 1971-2011 (HOŤKA, BARTA 2012)												
	-1,2	0,9	5,0	10,4	14,7	18,2	20,1	19,8	15,1	9,9	4,4	0,2	10,6
	Aktuálne obdobie za ostatných 15 rokov (2001–2015)												
2001	1,0	2,2	6,2	9,9	16,9	17,1	20,9	21,5	13,5	12,7	3,0	-5,8	9,9
2002	-1,5	4,1	6,9	10,3	17,4	19,3	21,9	20,4	14,2	8,9	7,7	-1,1	10,7
2003	-2,3	-2,2	5,2	10,0	18,0	21,7	21,3	22,3	16,0	7.2	6,8	0,9	10,4
2004	-3,4	1,0	4,5	11,4	13,5	17,5	19,8	20,2	15,2	11,7	5,5	0,7	9,8
2005	-0,2	-2,8	2,4	11,2	15,4	18,0	20,3	18,5	16,4	10,6	3,7	0,0	9,5
2006	-4,0	-1.8	3,1	11,9	14,3	19,0	22,8	17,4	17,1	12,0	7,3	2,6	10,1
2007	3,9	4,3	8,4	12,4	17,0	20,4	22,0	21,0	13,2	9,5	3,3	-1,0	11,2
2008	1,6	2,9	5,2	11,1	16,2	20,3	20,1	19,9	14,8	11,4	7,0	2,9	11,1
2009	-2,3	0,8	5,1	14,8	16,0	17,9	21,7	21,4	17,8	9,8	6,4	1,0	10,9
2010	-2,6	0,6	5,3	10,7	15,1	19,4	22,2	19,1	13,8	8,0	7,8	-2,1	9,8
2011	-0,7	-0,5	6,3	13,5	16,4	19,1	19,1	20,8	17,8	9,9	3,1	1,7	10,5
2012	0,8	-2,9	6,9	11,5	16,8	19,9	22,1	21,6	17,3	10,6	7,5	-1,4	10,9
2013	-1,2	1,3	2,8	11,7	15,3	18,7	21,8	21,6	14,1	12,0	6,7	2,1	10,6
2014	2,7	4,5	9,0	12,0	15,0	18,8	21,6	18,4	16,4	11,8	8,0	2,8	11,7
2015	1,3	1,4	5,9	10,2	15,0	19,3	23,2	23,2	16,8	10,1	6,0	2,3	11,2
Priemer	-0,5	0,9	5,6	11,5	15,9	19,1	21,4	20,5	15,6	10,4	6,0	0,4	10,6

Zdroj: Dlhodobé záznamy Meteorologického observatória (predtým pracovisko Geofyzikálneho ústavu v Bratislave SAV), v súčasnosti v správe Arboréta Mlyňany.

Osobitne sa zmienime o roku 2015, ktorý bol v celoslovenskom meradle považovaný za extrémny vo viacerých smeroch. V prípade deficitu atmosférických zrážok to môžeme potvrdiť, s výnimkou mesiaca august, kedy sme zaznamenali v rozmedzí štyroch dní (16.–19. 8. 2015), rekordný mesačný úhrn atmosférických zrážok 166 mm, pričom rok 2015 patrí v tomto smere k mierne podnormálnym (521 mm v porovnaní s dlhodobým normálom 541 mm).

Za pozornosť stojí konštatovanie, že v ostatných piatich rokoch (2011–2015), sme zaznamenali dlhodobý deficit atmosférických zrážok v mesačných úhrnoch. Výrazne prevládali dni v roku bez zrážok (0,0 mm) v rozsahu 69,6% v r. 2015; až 63,3% v r. 2013, s počtom dní 231–254 dní za rok. Počet dní s úhrnom zrážok do 5,0 mm bol najvyšší v r. 2013 (97 dní, t. j. 26,6%; 96 dní a 26,3% v r. 2014). Mesačný úhrn zrážok do 10,0 mm sa zaznamenal počas 23 dní, t. j. 6,3% v r. 2013; 4,7% v r. 2014. Atmosférické zrážky nad 10,0 mm, sme zaznamenali len ojedinele (11–15 dní ročne), pričom išlo o prívalové jednodenné alebo v jednom prípade štvordňové atmosférické zrážky (august 2015), čo predstavuje 3,0 až 4,1%. Podrobnejšie údaje sú uvedené v Tabuľke 2.

Klimatické charakteristiky jednotlivých ročných období (maximálna, minimálna a priemerná teplota vzduchu v °C; úhrn atmosférických zrážok za ročné obdobie v mm) sme v dlhodobom normále za obdobie 1975–2004 (30 rokov), spracovali v predchádzajúcich publikovaných príspevkoch a pre účely tejto práce analyzujeme obdobie ostatných 11 rokov (2005–2015). Podľa priemernej teploty vzduchu v jednotlivých ročných obdobiach, bola najteplejšia jar v r. 2007 (14,8°C) a v r. 2011 (14,5°C). Najchladnejšia jar bola zasa v r. 2013 (11,8°C) a v r. 2006 (12,8°C). Z hľadiska atmosférických zrážok, patrí k extrémne vlhkým jar r. 2000 (340 mm) a v r. 2006 (190 mm), 2013 (189 mm).

Pri posudzovaní letného obdobia, hodnotíme ako najteplejšie ročné obdobie, leto v r. 2012 (20,5°C), 2015 (20,4°C) a r. 2008 (20,3°C), pričom maximálne mesačné teploty za toto ročné obdobie, boli 27,4°C v r. 2012 a 26,9°C v r. 2015. Podľa úhrnu atmosférických zrážok, bolo najviac zrážok v lete r. 2014 (297 mm) a v r. 2010 (276 mm). Naopak najsuchšie letné obdobie sme zaznamenali v r. 2013 (123 mm) a v r. 2012 (156 mm).

Tab. 2 Atmosférické zrážky (v mm), priemerné mesačné, ročné (a dlhodobý normál) v Arboréte Mlyňany SAV za obdobie 2001–2015 (15 rokov).

Rok	**Dlhodobý normál: 1931–1960**												
	I	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	Rok
	40	**38**	**36**	**37**	**62**	**73**	**64**	**58**	**39**	**51**	**59**	**48**	**605**
	Dlhodobý normál: 1971–2000												
	31	**25**	**29**	**45**	**58**	**67**	**56**	**53**	**44**	**43**	**49**	**41**	**541**
	Dlhodobý normál: 1971-2011 (HOŤKA, BARTA **2012)**												
	36	**29**	**34**	**43**	**63**	**68**	**62**	**59**	**47**	**42**	**50**	**45**	**578**
	Aktuálne obdobie za ostatných 15 rokov (2001–2015)												
2001	36	23	49	30	59	19	89	101	110	12	42	27	597
2002	19	45	26	43	122	74	49	82	72	65	51	46	694
2003	45	5	1	22	43	17	108	22	24	63	26	28	404
2004	61	45	53	40	82	93	45	21	41	37	56	40	616
2005	54	82	6	83	52	44	95	100	57	19	47	130	769
2006	50	43	38	38	101	88	39	106	15	27	28	7	580
2007	78	51	50	0	68	53	19	105	82	32	58	29	625
2008	37	22	66	25	55	80	116	25	34	31	39	61	591
2009	42	42	67	6	49	57	49	60	18	87	56	104	637
2010	44	36	30	73	126	131	81	139	87	22	96	53	918
2011	19	8	38	15	36	90	116	49	18	21	0	29	439
2012	53	23	1	23	19	60	93	3	44	70	17	41	447
2013	67	72	101	18	78	49	2	42	57	18	61	15	580
2014	25	40	18	34	51	39	71	99	90	5	16	29	517
2015	52	13	37	15	71	18	18	166	47	44	33	7	521
Priemer	45	37	39	31	67	61	66	75	53	37	42	43	596

Zdroj: Dlhodobé záznamy Meteorologického observatória (predtým pracovisko Geofyzikálneho ústavu v Bratislave SAV), v súčasnosti v správe Arboréta Mlyňany.

Maximálne teploty vzduchu za jesenné ročné obdobie sa pohybovali v rozmedzí 10,9°C (v r. 2010), až 14,9°C (v r. 2006). Priemerná teplota vzduchu v jesennom ročnom období dosiahla maximum 10,1°C (v r. 2006) a minimum 7,0°C (v r. 2007). Jeseň bola najbohatšia na atmosférické zrážky v r. 2009 (192 mm) a v r. 2010 (181 mm). Za extrémne suchú môžeme zasa považovať jeseň v r. 2011 a r. 2014 (48 mm), prípadne aj jeseň v r. 2006 (61 mm).

Zimné ročné obdobie býva obvykle charakterizované mínusovými teplotami vzduchu, pričom za najchladnejšiu zimu môžeme považovať zimu r. 2004/2005 (-4,4°C, s priemerom – 1,7°C za ročné obdobie). Mínusové zimné teploty vzduchu sme ešte zaznamenali v r. 2009/2010 (-3,4°C) a v r. 2010/2011 (-2,8°C). Priemerné teploty vzduchu za zimné obdobie boli najnižšie v zime r. 2007/2008 (0,3°C) a v r. 2009/2010 (0,4°C). Najbohatšia na atmosférické zrážky bola zasa zima v r. 2011/2012 (185 mm) a v r. 2005/2006 (170 mm). Naproti tomu najsuchšia bola zima v r. 2013/2014 (73 mm), v r. 2009/2010 (79 mm) a v r. 2012/2014 (79 mm).

Pri bilancovaní 15–ročného obdobia, uvádzame priemerné údaje za príslušné ročné obdobie: maximálna teplota na jar 19,5°C; minimálna teplota 7,6°C; priemer za ročné obdobie 13,6°C; 153 mm priemerný úhrn zrážok. V letnom ročnom období boli zistené hodnoty nasledovné: 25,4°C; 13,5°C; 19,5°C priemer za ročné obdobie; 213 mm priemerný úhrn zrážok. V jesennom ročnom období: 12,4°C; 4,3°C; 8,2°C priemer za ročné obdobie; 117 mm priemerný úhrn zrážok za ročné obdobie. Pre zimné ročné obdobie boli zistené hodnoty nasledovné: 4,9°C; 1,9°C; 2,0°C priemer za ročné obdobie; 121 mm priemerný úhrn zrážok za zimné ročné obdobie. Podrobnejšie údaje sú uvedené v Tabuľke 3.

Keďže počas hodnoteného obdobia bola vydaná kľúčová publikácia autorov HOŤKA, BARTA 2012. Pristavíme sa pri jej význame pre rozširovanie dendrologických zbierok tohto objektu. Súčasťou publikácie je mapka rozmiestnenia jednotlivých častí (expozícií) arboréta s oddeleniami, kde sú uvedené taxóny drevín rastúcich v Arboréte Mlyňany SAV do roku 2012. Atraktivitu publikácie zvyšuje kvalitná fotografická príloha, veľmi prehľadne a precízne spracovaná, v ktorej nájdeme jednotlivé pestované dreviny. Predkladaný zoznam drevín (celkove 1933 taxónov, čo je oproti roku 1992 - 100. výročie založenia Arboréta Mlyňany SAV (evidovaných 2183 taxónov), o 250 taxónov menej za uplynulých 20 rokov (1992–2012). Nazdávame sa, že uvedený úbytok bol, okrem iných okolností, zapríčinený aj spresnením evidencie prírastku a úbytku taxónov v jednotlivých rokoch; výrazná fluktuácia na vedúcich pracovných pozíciách a odchod vedeckých, výskumných a odborných pracovníkov; absencia výsadieb nových drevín, nedostatok údržby, ale predovšetkým reálne klimatické zmeny (extrémne teploty vzduchu a minimálne atmosférické zrážky) a následné usychanie a odumieranie hodnotených drevín. Pre účely publikácie sa síce nepoužil nový dlhodobý normál za obdobie 1971–2011, s priemernou teplotou vzduchu 10,6°C a úhrnom atmosférických zrážok 541 mm, ale určitá „modifikácia“ (1971– 2011), s priemernou teplotou vzduchu 9,8°C a úhrnom atmosférických zrážok 578 mm (HOŤKA, BARTA, 2012).

Tab. 3 Klimatické charakteristiky jednotlivých ročných období (priemerné teplota vzduchu v °C, úhrn atmosférických zrážok v mm); dlhodobý normál za obdobie 1975–2004; aktuálne obdobie za ostatných 11 rokov (2005–2015) v Arboréte Mlyňany SAV.

Dlhodobý normál: 1975-2004																
Jar	21. 3.–21. 6.				Priemerná teplota vzduchu			12,4 °C			Úhrn zrážok				162,7 mm	
Leto	22. 6.–22. 9.							18,5 °C							160,6 mm	
Jeseň	23. 9.–21. 12.							7,0 °C							136,4 mm	
Zima	21. 12.–20. 3.							1,0 °C							96,0 mm	
Aktuálne obdobie za ostatných 11 rokov (2005–2015)																
2005	18,2	7,4	12,9	179	25,6	13,6	19,2	237	11,8	3,9	7,3	169	1,6	-4,4	-1,7	158
2006	18,6	7,4	12,8	190	23,7	12,7	20,1	215	14,9	6,6	10,1	61	7,7	0,4	3,8	170
2007	21,2	8,6	14,8	120	24,4	15,7	18,1	239	11,5	3,5	7,0	128	4,4	-1,8	1,1	108
2008	19,1	7,0	12,9	126	26,0	13,0	20,3	224	12,4	4,3	9,0	130	3,7	-2,6	0,3	124
2009	19,3	7,3	13,6	106	26,7	13,5	20,1	161	12,4	3,9	8,0	192	3,8	-2,2	3,5	154
2010	19,4	8,9	14,1	340	24,1	13,6	18,7	276	10,9	3,2	7,8	181	4,1	-3,4	0,4	79
2011	20,7	7,1	14,5	124	24,5	13,1	19,2	210	12,9	3,2	7,8	48	4,9	-2,8	2,4	80
2012	21,4	7,8	14,4	82	27,4	13,7	20,5	156	12,3	4,3	8,3	123	4,2	-2,3	0,8	185
2013	16,9	6,8	11,8	189	25,2	12,5	18,8	123	12,0	4,7	7,9	89	8,5	1,6	5,1	79
2014	20,6	7,9	14,1	97	25,0	13,2	18,9	297	13,4	5,8	9,3	48	6,0	-1,9	4,1	73
2015	19,2	7,0	13,2	133	26,9	14,0	20,4	201	12,1	4,4	8,2	117	5,4	-1,3	2,0	131
Priemer	19,5	7,6	13,6	153	25,4	13,5	19,5	213	12,4	4,3	8,2	117	4,9	1,9	2,0	122

Zdroj: Dlhodobé záznamy Meteorologického observatória (predtým pracovisko Geofyzikálneho ústavu v Bratislave SAV), v súčasnosti v správe Arboréta Mlyňany.

ZÁVER

Na základe výsledkov hodnotenia dlhodobých meteorologických záznamov v Arboréte Mlyňany SAV, opätovne konštatujeme reálne a aktuálne klimatické zmeny, prejavujúce sa dlhodobým zvyšovaním maximálnych a priemerných teplôt vzduchu počas vegetačného obdobia, so súčasným výrazným deficitom atmosférických zrážok. Pri hodnotení atmosférických zrážok za ostatných päť rokov (2011–2015) sme zistili až 69,6% dní počas roka, kedy sa nevyskytli žiadne atmosférické zrážky (napr. v r. 2015 to bolo 254 dní, t. j. 69,6%). V prípade, že denné úhrny atmosférických zrážok v intenzite 5,0 mm, považujeme pre dlhoveké rastliny (stromy) za minimálne, narastie nám percento dní so zanedbateľnými zrážkami o 26,6 (97 dní v r. 2013).

Následky sa prejavujú sekundárnou aktivizáciou hubových chorôb a živočíšnych škodcov, dlhodobým oslabením drevín, predčasným žltnutím, vädnutím a usychaním listov a ihlíc, v čase kvitnutia aj rýchlym odkvitaním, prípadne nadmerným plodením ihličnatých a listnatých drevín. Pokračuje celkové znižovanie odolnosti a estetickej hodnoty, ročných prírastkov drevín, ako aj zníženie vitality drevín, domácich a introdukovaných v parkových objektoch, arborétach, ale najmä v extrémnych podmienkach urbanizovaného prostredia na Slovensku.

Osobitne pre podmienky Arboréta Mlyňany SAV, odporúčame aj vzhľadom na optimálny vek pestovaných cudzokrajných drevín (vo viacerých konkrétnych prípadoch ide skôr o maximálny vek stromov), postupne zlepšovať aj pôdne podmienky, pretože dlhodobo absentuje hnojenie pôdy (či už organickými, minerálnymi hnojivami, prípadne kvalitným kompostom) pod parkovými porastmi, skupinovými alebo solitérnymi výsadbami stromov a krov.

Nevyhnutnou podmienkou pre pestovanie okrasných rastlín bude výstavba rezervných vodných nádrží a iných zdrojov vody na polievanie a zavlažovanie vysadených drevín v parkových a dendrologických objektoch, arborétach, botanických záhradách. Dôležitá požiadavka pri pestovaní rastlín (najmä drevín) v zmenených klimatických podmienkach, bude zabezpečenie dostatku úžitkovej vody. Nedostatok vody zostáva limitujúcim faktorom biotechnických opatrení pri pestovaní okrasných rastlín aj na Slovensku.

LITERATÚRA

HOŤKA, P., BARTA, M. 2012. Dreviny Arboréta Mlyňany SAV. Bratislava:VEDA, Arborétum Mlyňany SAV, 132 s. ISBN 978-80-224-1252-0.

HRUBÍK, P., HOŤKA, P. 2007. Charakteristika klimatických podmienok Arboréta Mlyňany SAV za obdobie 1971 – 2006 (2007). In: Aklimatizácia a introdukcia drevín v podmienkach globálneho otepľovania: Zborník referátov z vedeckej konferencie, Arborétum Mlyňany SAV, 11.–12. september 2007, s. 28–37. ISBN 978-80-969760-1.

HRUBÍK, P., HOŤKA, P., KOLLÁR, J. 2009. Klimatické podmienky ako významný ekologický činiteľ pri pestovaní introdukovaných drevín. In: Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany 2009. Vždyzelené dreviny v strednej Európe – ich introdukcia a využitie. Arborétum Mlyňany SAV, 2009. ISBN 978-80-970254-4-1.

HRUBÍK, P., HOŤKA, P., KUBA, J. , FOGADOVÁ, K., 2010. Dlhodobá charakteristika klimatických podmienok v Arboréte Mlyňany SAV vo Vieske nad Žitavou: Zborník referátov z vedeckej konferencie, 2010.

HRUBÍK, P., KOLLÁR, J., 2008. Klimatické zmeny a ich vplyv na dreviny v urbanizovanom prostredí. In: Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2008: Zborník referátov z vedeckej konferencie: Arborétum Mlyňany SAV, 15.–16. október 2008: Arborétum Mlyňany SAV, 2008, s. 175–182, ISBN 978-80-970028-9-9.

HRUBÍK, P., KUBA, J., HOŤKA, P., FOGADOVÁ, K., 2011. Tabuľkový prehľad hlavných klimatických charakteristík v Arboréte Mlyňany SAV. In: Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2011: Zborník referátov z vedeckej konferencie, 2011.

HRUBÍK, P., TOMAŠKO, I., HOŤKA, P., KUBA, J., 2006. Klimatické podmienky Arboréta Mlyňany SAV vo vzťahu k introdukovaným drevinám. In: Sídlo-Park-Krajina IV. Kultúrne vegetácia v sídlach a krajine: Zborník referátov z konferencie s medzinárodnou účasťou a 11. Kolokvia, Nitra, 22. 11. 2006. ISBN 80-8069-809-0.

Adresa autorov
prof. Ing. Pavel Hrubík, DrSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva, emeritný profesor, Dunajská 16, 949 11 Nitra, ginkgo.ph@gmail.com,
Ing. Daniela Holečková, Arborétum Mlyňany SAV, Vieska nad Žitavou, 951 52 Slepčany, detašované pracovisko Ústavu ekológie lesa SAV, Zvolen, daniela.holeckova@savba.sk

VÝSKYT A CHARAKTERISTIKA HÚB *PESTALOTIOPSIS FUNEREA* A *TRUNCATELLA HARTIGII* NA VYBRANÝCH DRUHOCH BOROVÍC V ARBORÉTE MLYŇANY

OCCURRENCE AND CHARACTERISTIC OF FUNGI *PESTALOTIOPSIS FUNEREA* AND *TRUNCATELLA HARTIGII* ON SELECTED *PINUS* SPECIES IN ARBORÉTUM MLYŇANY

HELENA IVANOVÁ

IVANOVÁ, H. 2016. Výskyt a charakteristika húb *Pestalotiopsis funerea* a *Truncatella hartigii* na vybraných druhoch borovíc v Arboréte Mlyňany. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 137-140. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
During 2015-2016 the similarity and the differences of fungi *Pestalotiopsis funerea* and *Truncatella hartigii* damaged the needles of the host plants: *Pinus ponderosa, Pinus coulteri* and *Pinus nigra* planted in Arborétum Mlyňany, with emphasis on comparison of morphology their conidia and appendages were evaluated. Conidia of *Pestalotiopsis funerea* were ellipsoid, straight to slightly curved, 4-septate with 3(4-6) apical sometimes branched appendages. Basal cell was short, hyaline, obtuse and thin-walled with single appendage. Conidia of *Truncatella hartigii* were 3-septate, without basal appendages. 2-3 apical appendages arising of the apical cell were attenuated, flexuous, sometimes dichotomously branched.

Key words: parasitic microscopic fungi, *Pestalotiopsis funerea*, *Pinus coulteri*, *Pinus nigra*, *Pinus ponderosa*, *Truncatella hartigii*

ÚVOD

Endofyt je organizmus, ktorý určitú časť života, prípadne celý život žije v tele rastlín pričom nespôsobuje svojim hostiteľom viditeľné príznaky poškodenia. Prenáša sa z generácie na generáciu prostredníctvom pletív semien hostiteľa alebo jeho časťami pri vegetatívnom rozmnožovaní. Často vytvorí s hostiteľom jeden celok, čo dáva obom lepšie šance na prežitie. Endofyt býva odolný voči stresu, čím pomáha hostiteľským rastlinám lepšie sa adaptovať v rôznych environmentálnych podmienkach. Aktivizuje sa len pri špecifických zmenách týchto podmienok (WRIGHT et al. 1998; HOPKINS, MCQUILKEN 2000). Jedným z najčastejších endofytov sú huby, ktorých hýfy prenikajú do pletív rastlín, v nich tvoria mycélium a na povrchu rastliny tvoria rozmnožovacie plodničky. Asymptomatický rast endofytických húb v hostiteľovi naznačuje, že endofyty nie sú pre hostiteľa nebezpečnými. Ich vzťah môže byť premenlivý, od symbiózy po parazitizmus. Nepovažujú sa za saprofyty, pretože môžu pozitívne pôsobiť na hostiteľa produkciou rôznych metabolitov, vrátane hormónov, ďalej tvorbou antifugálnych a antibakteriálnych látok a toxínov, ktoré chránia rastlinu pred škodcami. Rastliny poskytujú endofytom živiny potrebné pre ich život a rast, iniciujú biologickú degradáciu odumretých častí rastlín, čím prispievajú ku kolobehu živín v prírode. Produkciou rôznych sekundárnych metabolitov: toxínov, fytohormónov, enzýmov alebo farmaceutických liečiv – antibiotík, ničia patogénne druhy húb, a tak sa stávajú dôležité v prevencii a vo vitalite rastlín. Preto ich zástupcovia v poslednom čase priťahujú veľkú pozornosť nielen pre ich pôsobenie ako rastlinných patogénov, ale aj ako endofytov, ktoré produkujú široké spektrum chemicky nových metabolitov (XU et al. 2010; DEBBAB et al. 2011, 2012; MAHARACHCHIKUMBURA et al. 2011, 2013).

Zvýšený výskyt endofytických húb *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert (syn. *Pestalotia funerea* Desm.) a *Truncatella hartigii* (Tubeuf) Steyaert (syn. *Pestalotia hartigii* Tubeuf), ktorý sme zaznamenali pri sledovaných boroviciach v parku Arboréta Mlyňany indikuje výskyt a pôsobenie

rôznych stresových faktorov, ktoré nepriaznivo ovplyvňujú vitalitu týchto drevín a ktoré budú predmetom ďalšieho skúmania.

MATERIÁL A METÓDY

Materiálom boli poškodené ihlice zozbierané v roku 2015 a na jar roku 2016 z drevín *Pinus ponderosa* Douglas ex C. Lawson, *Pinus coulteri* D. Don. a *Pinus nigra* L. rastúcich v Arboréte Mlyňany. Vzorky biologického materiálu sú uložené v Herbáre Ústavu ekológie lesa SAV, Pobočka biológie drevín Nitra. Kultivácia prebiehala v kultivačnej komore MLR-351H - Sanyo s konštantnou teplotou a vlhkosťou (24 ± 1 °C a 45%). Na izoláciu a kultiváciu čistých kultúr sme použili 3% PDA médium. Štúdium štruktúr húb sme uskutočnili svetelným mikroskopom BX41 (Olympus), zv. 400× a 1000× pomocou QuickPhotomicro 2.2 programu. Morfometrické hodnoty sme porovnávali s výsledkami autorov STEYAERT (1949), GUBA (1961), NAG RAJ (1993), PITT, HOCKING (1997), LEE et al. (2006), HU et al. (2007). Huby sme identifikovali podľa kľúčov autorov DUBE, BILGRAMI (1965) a SUTTON (1980).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na viacerých druhoch borovíc (*Pinus ponderosa, Pinus coulteri, Pinus nigra*) rastúcich v prostredí parku Arborétum Mlyňany sme identifikovali endofytické huby *Pestalotiopsis funerea* a *Truncatella hartigii*. Rozdiely medzi nimi sú predovšetkým v počte konídiálnych priehradiek – sept a v počte príveskov vyskytujúcich sa na oboch koncoch konídií. Charakter konídií – ich dĺžka, ďalej šírka a farba mediálnych buniek sú pri hube *Pestalotiopsis* stabilné, mení sa len dĺžka a počet apikálnych a bazálnych príveskov. Diferenciácia rodu je na základe septácie konídií a na počte príveskov (NAG RAJ 1993).

Pestalotiopsis tvorí veľký počet suchých spór, ktoré sa ľahko rozširujú vetrom alebo kvapkami vody. Huba vyvoláva široké spektrum ochorenia rastlín zahŕňajúce rakovinové lézie, uschýnanie vrcholov, škvrnitosť listov a chlorózy (HOPKINS, MCQUILKEN 2000). Do hostiteľa huba penetruje cez lenticely a hydatódy (AGRIOS 2005). Predpokladá sa, že huba infikuje len poškodené rastliny alebo rastliny stresované hmyzom a pesticídmi (WRIGHT et al. 1998, HOPKINS, MCQUILKEN 2000), prípadne sa na vzniku ochorenia podieľa zvýšené množstvo zrážok, vysoká teplota, ako aj zvýšená ľudská činnosť (TUSET et al. 1999; HOPKINS, MCQUILKEN 2000; ELLIOTT et al. 2004).

V našich pokusoch poškodené ihlice borovíc uložené na PDA médiu prekryli sivobiele kultúry huby *Pestalotiopsis funerea.* Z jej plodničiek sa uvoľňovala masa konídií odškrcujúcich sa z konídiofórov. Konídie boli elipsoidného tvaru, rovné alebo mierne ohnuté, 4-priehradkové, 16.8–20(23) – (30) × 5(10) µm veľké, s troma centrálnymi tmavohnedými hrubostennými bunkami a krátkou hrubostennou hyalinnou bazálnou bunkou. Bezfarebná apikálna bunka bola kónická, zakončená tromi, štyrmi až šiestimi apikálnymi niekedy rozvetvenými príveskami. Bazálne prívesky boli hyalinné, vláknité, nedelené a nevetvené (Tab. 1, obr. 1).

Ďalšia pozorovaná mikroskopická huba *Truncatella hartigii* je spojená s poškodením mnohých ihličnatých drevín, ako sú *Abies* spp., *Picea* spp., *Pinus* sp., kde spôsobuje odumieranie ihlíc (VUJANOVIC et al. 2000). Vyznačuje sa konídiami delenými troma priehradkami, čím sa odlišuje od huby *Pestalotiopsis*, ktorej konídie sú delené 4 priehradkami (JEEWON et al. 2002). Ďalšia odlišnosť je v tvorbe a v umiestnení príveskov. Kým huba *Pestalotiopsis* má prívesky na oboch koncoch konídií, huba *Truncatella* má prívesky len na apikálnom konci. Príveskov je viac, často sú nepravidelne rozvetvené, vo viacerých prípadoch tvoria dve rovnaké vetvy (STEYAERT 1955; LEE et al. 2006).

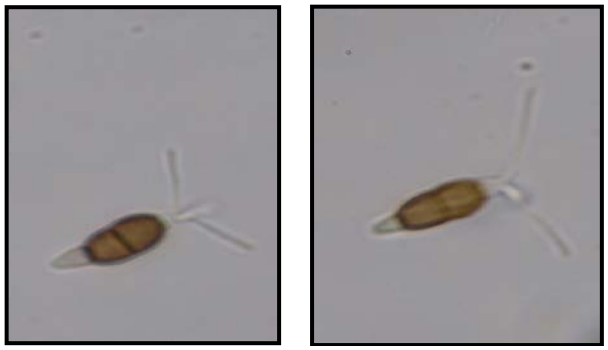
Plodničky huby boli v našich pozorovaniach subepidermálne, často ponorené do pletiva. Konídiofory a konídiálne bunky boli hyalinné, cylindrické. Konídie boli trojpriehradkové, hyalinné, hrubostenné, veľké (20–)25 × (2.5–)3(–5)(–7.5) µm. Stredná bunka konídií bola hnedá, hrubostenná, apikálna bunka kónická s 2 až 3 príveskami, niekedy vetvenými, bazálna bunka bola hyalinná a bez príveskov (Tab. 1, obr. 2).

Tab. 1 Porovnanie niektorých parametrov sledovaných mikroskopických húb.

Mikroskopická huba/parametre	***Pestalotiopsis funerea***	***Truncatella hartigii***
Veľkosť konídií (µm)	16.8–20(23) – (30) × 5(10) 16	(20–)25 × (2.5–)3(–5)(–7.5)
Farba strednej bunky	tmavohnedá až olivová	hnedá
Apikálne prívesky		
počet (ks)	3(4–6)	2–3
dĺžka (µm)	(4–6)15–20–24–30	5–10(15)–21–30
vetvenie	jednotlivé alebo rozvetvené	rozvetvené
pozícia	na vrchole	na vrchole
Bazálne prívesky		
počet (ks)	1	-
dĺžka (µm)	2–4	-
vetvenie	nerozvetvené	-
pozícia	na báze	-

Podobné výsledky publikovali aj PITT, HOCKING (1997) a LEE et al. (2006). Plodničky huby *Truncatella hartigii* boli viditeľné na povrchu tmavej konídialnej masy, vetvené konídiofory niesli 3-priehradkové konídie veľké (16-)17-18(-20) × (6-)7(-8)µm , (av. 17.8 × 7.1µm). Apikálna hyalinná bunka mala kónický tvar, bola hrubostenná, jej veľkosť bola 2.5–3 × 2.5–4 µm, hnedá stredová bunka bola 11(13)–14 × 7 µm veľká, hyalinná bazálna bunka bola 2–3 × 2–3 µm veľká. Apikálne prívesky v počte 2-4(5) vyrastajúce z vrcholu apikálnej bunky boli 26-31 × 1µm dlhé, zatočené, 1-2 prívesky boli nepravidelne, často dichotomicky vetvené. Bazálne prívesky absentovali.

Obr. 1 Mikroskopická huba *Pestalotiopsis funerea*.



Obr. 2 Mikroskopická huba *Truncatella hartigii*.

ZÁVER

Endofytické huby sú latentní patogéni, ktorí sa aktivizujú a reprodukujú len pri špecifických zmenách environmentálnych podmienkach alebo keď je ich hostiteľ stresovaný, prípadne prestarnutý. Zvýšený výskyt endofytických húb *Pestalotiopsis funerea* a *Truncatella hartigii* v našich pozorovaniach indikuje výskyt a pôsobenie stresových faktorov (zmenené ekologické podmienky – teplota, voda) vplývajúcich na vlastnosti sledovaných borovíc.

POĎAKOVANIE

Práca bola vypracovaná za podpory grantov VEGA č. 2/0069/14 č. 2/0071/14.

LITERATÚRA

AGRIOS, G.N. 2005. Plant Pathology, 5th edn. Elsevier Academic, USA. CA, 922p. ISBN 9780120445653.

DEBBAB, A., ALY, A.H., PROKSCH, P. 2011. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. In: Fungal Diversity, vol. 49, 2011, p. 1–12.

DEBBAB, A., ALY, A.H., PROKSCH, P. 2012. Endophytes and associated marine derived fungi — ecological and chemical perspectives. In: Fungal Diversity vol. 57, 2012, p. 45–83.

DUBE, H.C., BILGRAMI, K.S. 1965. *Pestalotia* or *Pestalotiopsis*. In: Mycopathologia et Mycologia Applicata vol. 29, 1965, p. 33–54.

ELLIOTT, M.L., BROSCHAT, T.K., UCHIDA, J.Y., SIMONE, G.W. (eds.) 2004. Diseases and disorders of ornamental palms. American Phytopathological Society, St. Paul., APS 71p. ISBN 0-89054-314-3.

GUBA, E.F. 1961. Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia,* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 342p. ISBN 0-85199-826-7.

HOPKINS, K.E., MCQUILKEN, M.P. 2000. Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. Eur. In: Journal of Plant Pathology vol. 106, 2000, p. 77–85.

HU, H.I., JEEWON, R., ZHOU, T.X., ZHOU, T.X., HYDE, K.D. 2007. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β-tubulin genetic phylogenies. In: Fungal Diversity vol. 24, 2007, p. 1–22.

JEEWON, R., LIEW, E.C.Y., HYDE, K.D. 2002. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. In: Molecular Phylogenetics and Evolution vol. 25, 2002, p. 378–392.

LEE, S., CROUS, P.W., WINGFIELD, M.J. 2006. *Pestalotioid* fungi from *Restionaceae* in the Cape Floral Kingdom. In: Studies in Mycology vol. 55, 2006, p. 175–187.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N., GUO, L.D., CHUKEATIROTE, E., BAHKALI, A.H., HYDE, K.D. 2011. *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. In: Fungal Diversity vol. 50, 2011, p. 167–187.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N., CHUKEATIROTE, E., GUO, L.D., CROUS, P.W., MCKENZIE, E.H.C., HYDE, K.D. 2013. *Pestalotiopsis* species associated with *Camellia sinensis* (tea). In: Mycotaxon vol. 123, 2013, p. 47–61.

NAG RAJ, T.R. 1993. Coelomyceteous anamorphs with appendage-bearing conidia. Mycologue Publications, Waterloo, Ontario, Canada. 1101p. ISBN 0969223722 9780969223726.

PITT, J.I., HOCKING, A.D. 1997. Fungi and food spoilage. Springer-Science-Business Media, B.V., 577p. ISBN978-0-387-92207-2.

STEYAERT, R.L. 1949. Contribution á l`étude monographigue de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. Nov.). In: Bulletin Jardin Botanique de l´État à Bruxelles vol. 19, 1949, p. 285–354.

STEYAERT, R.L. 1955. *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* et *Truncatella*. In: Bulletin Jardin Botanique de l´État à Bruxelles vol. 25, 1955, 191–199.

SUTTON, B.E. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK. 696p. ISBN 81-09335-03-0.

TUSET, J.J., HINAREJOS, C., MIRA, J.L. 1999. First report of leaf blight on sweet persimmon tree by *Pestalotiopsis theae* in Spain. In: Plant Disease vol. 83, 1999, p. 1070.

VUJANOVIC, V., ST-ARNAUD, M., NEUMANN, P.J. 2000. Susceptibility of cones and seeds to fungal infection in a pine (*Pinus* spp.) collection. In: Forest Pathology vol. 30, no. 6, 2000, p. 305–320.

WRIGHT, E.R., RIVERA, M.C., FLYNN, M.J. 1998. First report of *Pestalotiopsis guepinii* and *Glomerella cingulata* on blueberry in Buenos Aires (Argentina). In: Boletín vol. 28, 1998, p. 219–220.

XU, J., EBADA, S.S., PROKSCH, P. 2010. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. In: Fungal Diversity vol. 44, 2010, p. 15–31.

Adresa autora

RNDr. Helena Ivanová, CSc., Ústav ekológie lesa SAV Zvolen, Pobočka biológie drevín, Akademická 2, 949 01 Nitra**,** tel. +421 37 69 43 357, e-mail: helena.ivanova@savzv.sk

MIKROPROPAGÁCIA RODODENDRONOV

MICROPROPAGATION OF RHODODENDRONS

JANA KONÔPKOVÁ – DOMINIKA BOŠIAKOVÁ – PETER HOŤKA – PETER FERUS

KONÔPKOVÁ, J. – BOŠIAKOVÁ, D. – HOŤKA, P. – FERUS, P. 2016. Mikropropagácia rododendronov. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 141-145. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Rhododendrons belong to the most beautiful ornamental trees and shrubs. The genus *Rhododendron* contains more than 1000 species distributed almost on the whole northern hemisphere. The aim of this work was to evaluate the process of micropropagation of selected rhododendron species (*Rhododendron forrestii* Balf.f. ex Diels. and *Rhododendron × hybridum* 'Azurro'). We focused on testing the reaction of explants to the different type of culture medium and concentration of growth regulators. Obtained results point to the different reaction of *Rhododendron forrestii* Balf.f. ex Diels. and *Rhododendron × hybridum* 'Azurro' to selected culture media. Due to the higher values of total capacity of proliferation (355.9 mm /explant) and the number of shoots per explant (26.88) Anderson culture medium (1984) is more suitable for *R*. × 'Azurro' than Economou and Read culture medium (1984). Higher concentrations of 2iP had negative effect on proliferation of *R*. × 'Azurro' shoots. Stable tissue culture of *Rhododendron forrestii* Balf.f. ex Diels. was cultivated only on Economou and Read culture medium. The highest concentration of BAP (2 $mg.l^{-1}$) had positive effects on the growth parameters except for the lenght of shoots. Cultivation on Economou and Read culture medium with 2 $mg.l^{-1}$ BAP led to significant spontaneous rhizogenesis of *Rhododendron forrestii* Balf.f. ex Diels. explants.

Key words: *Rhododendron × hybridum* ´Azurro', *Rhododendron forrestii* Balf.f. ex Diels., micropropagation, multiplication, culture medium

List of abbreviations: 2iP – (N^6-[2-Isopentenyl]adenine), BAP – 6-Benzylaminopurine, IAA – Indolyl-3-acetic acid.

ÚVOD

Krásu rododendronov poznali už starí Gréci a Rimania, avšak s ich kultúrnym pestovaním sa začalo až okolo roku 1630 v Anglicku, ktoré z Európskych štátov svojimi klimatickými podmienkami (vlhké letá a mierne zimy) už od začiatku introdukcie najlepšie vyhovovalo dovážaným druhom. Rod *Rhododendron* (± 1000 druhov) je rozdelený na 8 podrodov, medzi 4 najvýznamnejšie podrody patria Tsutsusi (vždyzelené azalky, 117 druhov), Pentanthera (opadavé azalky, 30 druhov), Rhododendron (šupinaté rododendrony, 542 druhov) a Hymenanthes (bezšupinaté rododendrony, 302 druhov). Tieto podrody sú ekonomicky významné vďaka ich dekoratívnej hodnote: pričom posledné dva zahŕňajú tie druhy, ktoré záhradkári voľne označujú ako 'záhradné rododendrony', zatiaľ čo druhy podrodov Tsutsusi a Pentanthera sú pôvodcami mnohých skupín hybridov azaliek, pestovaných vo vonkajších alebo vnútorných podmienkach (CHAMBERLAIN et al., 1996). Geografické rozšírenie rododendronov zahŕňa predovšetkým oblasti strednej Číny, Tibetu, Japonska, Severnej Ameriky, Malej Ázie, Kaukazu, ale aj vysokohorské oblasti Európy (KRÜSSMANN, 1962).

Na Slovensku boli prvýkrát vysádzané pôvodné, botanické druhy vždyzelených rododendronov v rokoch 1900 - 1925 v Arboréte Mlyňany za éry zakladateľa Dr. Štefana Ambrózy–Migazziho. Jeho záhradník Jozef Mišák už v roku 1907 píše o prvých skúsenostiach pri pestovaní týchto drevín. Podľa poslednej inventarizácie je v zbierkach drevín Arboréta Mlyňany takmer 200 jedincov vždyzelených rododendronov, taxonomicky zaradených do 19 druhov a 18 kultivarov (HOŤKA, BARTA, 2012). Rododendrony rozmnožujeme – pohlavne generatívne (semenom) a

nepohlavne – vegetatívne (rezkovaním, vrúbľovaním, potápaním), ale aj metódami *in vitro* (KAMENICKÁ et al., 2004).

Na rozmnožovanie väčšiny druhov rododendronov sa zvyčajne používajú rezky stoniek, avšak mikropropagácia v podmienkach *in vitro* sa stáva čoraz viac dôležitou a rozšírenou pre ich komerčnú produkciu (ECKHAUT et al., 2010). Mikropropagácii rododendronov sa už niekoľko rokov venuje pozornosť aj v Arboréte Mlyňany a v súčasnosti genobanku pletivových kultúr rododendronov tvoria tieto druhy: *R*. × 'August Lamken', *R*. × 'Nova Zembla', *R*. × 'Elsie Straver', *R*. × 'Bluebell', *R*. × 'Omega', *R*. × 'Pink Cherub', *R*. × 'Ornament', *R*. × 'Kokardia', *R*. × 'Osmar', *R*. × 'Lachsgold', *R*. × 'Azurro', *R*. × 'Manuela', *R*. × 'Furnivall's Daughter', *R*. × 'Balalaika', *R.* × 'Kalinka', *R*. × 'Anilin', *Rhododendron forrestii* Balf.f. ex Diels. V práci sme sa zamerali na zhodnotenie procesu mikropropagácie druhov *Rhododendron × hybridum* 'Azurro' a *Rhododendron forrestii* Balf.f. ex Diels. (rododendron horský) v snahe o vytvorenie efektívnych protokolov ich rozmnožovania.

MATERIÁL A METÓDY

Donorovým materiálom boli mladé sadenice druhov *Rhododendron forrestii* Balf.f. ex Diels. a *Rhododendron × hybridum* 'Azurro', zakúpené do Arboréta Mlyňany SAV za účelom rozšírenia genofondu rododendronov. Odroda *Rhododendron × hybridum* 'Azurro' hybrid ('Nova Zembla' × 'Purple Splendour') × 'Purple Splendour') bola vyšľachtená v roku 1986 v nemeckej škôlkárskej firme Hachmann. Je to vždyzelený široko rozvetvený, kompaktný ker s vajcovitými, kožovitými listami, tmavozelenej a na rube svetlozelenej farby, mrazuvzdorný až do – 26°C. Kvitne od konca mája do polovice júna tmavofialovými kvetmi s priemerom 7- 8 cm.

Rhododendron forrestii Balf.f. ex Diels. patrí k vždyzeleným druhom rododendronov, ktorý má svoj pôvod v Ázii (v oblasti Tibet, Jün–nan, Barma). Je to nízky poliehavý ker, dorastajúci do výšky 3 – 50 cm. Kvitne v apríli až máji kvetmi s trubkovito – zvonkovitou korunou, veľkosti 25 – 40 mm. Tento druh je pomerne chúlostivý, ale má mnoho pekných aj odolnejších hybridov (HORÁČEK, 2007).

Na iniciáciu primárnej aseptickej kultúry v podmienkach *in vitro* boli z oboch druhov v období intenzívneho rastu odobraté apikálne výhonky obshujúce 2 – 3 internódiá. Upravené, odlistené výhonky boli sterilizované 0,1 % roztokom $HgCl_2$ s prídavkom Tweenu 20 (0,01–0,02 %) a následne 3 až 5 krát premyté redestilovanou vodou. V aseptických podmienkach boli vysterilizované výhonky rozdelené na 2 – 3 segmenty a pripravené na realizáciu nasledovných pokusov.

Experiment č. 1: Sledovanie účinku rôznych druhov kultivačných médií (Andersonovo kultivačné médium (1984) a kultivačné médium Economou-Read (1984)) pri rovnakej koncentrácii cytokinínov na multiplikáciu výhonkov *Rhododendron forrestii* Balf.f. ex Diels. a *Rhododendron × hybridum* 'Azurro'.

Experiment č. 2: Účinok rôznych koncentrácií cytokinínov na mikropropagáciu vybraných druhov rododendronov.

Cieľom oboch realizovaných pokusov bolo vyhodnotenie reakcií explantátov na kultivačné podmienky a na základe získaných výsledkov stanovenie čo najoptimálnejších podmienok pre mikropropagáciu rododendronov v podmienkach *in vitro*.

Pri realizácii experimentu č.1 boli na kultiváciu explantátov rododendronov použité dva druhy kultivačných médií: podľa Andersona a Economou-Read s obsahom 20,0 $g.l^{-1}$ sacharózy a 8,0 $g.l^{-1}$ agaru. Obe kultivačné médiá mali rovnaký obsah rastových regulátorov. Pri rododendrone horskom to bol cytokinín BAP v koncentrácii 2 $mg.l^{-1}$ a pri *R. ×* 'Azurro' to bol zo skupiny cytokinínov 2iP v koncentrácii 8,0 $mg.l^{-1}$ a zo skupiny auxínov IAA koncentrácii 1,0 mg. l^{-1}.

Pri experimente č. 2 bolo na kultiváciu explantátov rododendronu horského použité kultivačné médium Economou-Read a cytokinín BAP v koncentráciach 0,5; 1,0 a 2,0 $mg.l^{-1}$. Účinok rôznych koncentrácií cytokinínov na mikropropagáciu *R*. × 'Azurro' sa sledoval na Andersonovom

kultivačnom médiu s rôznymi koncentráciami 2iP (4,0; 6,0; 8,0 a 15,0 mg.l^{-1}) a prídavkom IAA v množstve1,0 mg. l^{-1}.

Pri oboch pokusoch boli segmenty pestované v 100 ml kultivačných nádobách, ktoré obsahovali 20 ml kultivačného média. V každej nádobe boli uložené 2 – 3 primárne explantáty. Kultúry boli pestované v kultivačnej miestnosti pri teplote 22 ± 2 °C/deň, a 18 – 20 °C/noc a 16/8 hod. deň/noc fotoperióde, intenzite osvetlenia 50 – 60 µmol.m^{-2}.s^{-1} a 90 % relatívnej vlhkosti. Po 14 týždňoch pestovania boli pri oboch druhoch rododendronov vyhodnotené rastové charakteristiky a to: dĺžka výhonkov, počet axilárnych výhonkov, biomasa výhonkov a sušina biomasy stanovená gravimetricky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vyhodnotenie procesu mikropropagácie poukázalo na rozdielnu reakciu rododendronu horského a *R*. × 'Azurro' na použité kultivačné médiá (pokus č.1). Kým pri *R*. × 'Azurro' sa podarilo dopestovať stabilnú pletivovú kultúru na oboch kultivačných médiách, pri rododendrone horskom sa to podarilo len na kultivačnom médiu Economou-Read. Potvrdili sa tým doterajšie poznatky, že v samotnej morfogénnej reakcii explantátov môžu byť veľké rozdiely, a to aj v rámci toho istého druhu alebo kultivarov toho istého druhu (SALAJ a BLEHOVÁ, 2006). K podobným záverom dospela aj ŠEDIVÁ (1998), ktorá sa zaoberala rozmnožovaním vždyzelených rastlín z čeľade *Ericaceae*.

V rastových charakteristikách rastlín *R*. × 'Azurro' pestovaných v podmienkach *in vitro* na Andersonovom kultivačnom médiu a médiu Economou-Read s rovnakým prídavkom cytokinínu 2iP (8 mg.l^{-1}) sú tiež výrazné rozdiely (Tab. 1). Na základe vyššej hodnoty celkovej kapacity proliferácie (355,9 mm/explantát) a počtu výhonkov/explantát (26,88) sa na mikropropagáciu *R*. × 'Azurro' ako vhodnejšie javí Andersonovo kultivačné médium, ktoré uvádza ako najvhodnejšie na pestovanie rododendronov aj BOJARCZUK (1995). Dĺžka výhonkov a ich kvalita bola takmer identická na oboch kultivačných médiách. Hodnotením účinkov rôznych koncentrácií cytokinínov na multiplikáciu výhonkov *R*. × 'Azurro' (experiment č.2) bol zistený negatívny účinok vyšších koncentrácií 2iP na proliferáciu výhonkov (Tab. 2). Najvyššia hodnotu počtu výhonkov/explantát (41,28) bola stanovená pri minimálnej koncentrácii 2iP použitej v Andersonovom kultivačnom médiu. Naopak elongáciu výhonkov a ich kvalitu, vyjadrenú produkciou biomasy a hodnotou sušiny biomasy pozitívne ovplyvňovala vyššia koncentrácia cytokinínu (15 mg.l^{-1}). Úplne odlišné reakcie na rozdielne koncentrácie cytokinínu (BAP) v kultivačnom médiu Economou-Read boli zistené pri rododendrone horskom (Tab. 3). Pri tomto druhu mala najvyššia koncentrácia BAP (2 mg.l^{-1}) pridaná do kultivačného média pozitívny účinok na všetky rastové parametre s výnimkou dĺžky výhonkov. Táto bola najvyššia (11,93 mm) pri výhonkoch rastúcich na kultivačnom médiu s najnižšou koncentráciou cytokinínu. Na kultivačnom médiu s prídavkom (2 mg.l^{-1}) BAP bola pozorovaná aj výrazná spontánna rizogenéza. Zakorenené výhonky boli prenesené do podmienok *in vivo* – do pôdneho substrátu (zmes KLASMAN SUBSTRAT 1 a Perlit v pomere 1:1). Po 8 týždňovej aklimatizácii bola vyhodnotená vitalita rastlín, ktorá dosahovala 98 %.

Tab. 1 Rastové parametre primárnej pletivovej kultúry *Rhododendron × hybridum* 'Azurro' pestovanej na odlišných kultivačných médiách pri rovnakých koncentráciách 2iP (8 mg.l^{-1}).

Rastové parametre ± SE [1]	Andersonovo médium	Economou-Read médium
Počet výhonkov/explantát	26,88 ± 0,854	13,35 ± 0,425
Priemerná dĺžka výhonkov [mm]	13,24 ± 0,104	13,24 ± 0,574
Čerstvá hmotnosť [g]	0,036 ± 0,007	0,068 ± 0,008
Sušina [g]	0,004 ± 0,013	0,008 ± 0,011
Pomer čerstvá hmotnosť/sušina	9,00	8,50
Celková kapacita proliferácie [mm/explantát]	355,9	176,75

SE[1] – stredná chyba aritmetického priemeru

Tab. 2 Rastové parametre primárnej pletivovej kultúry *Rhododendron × hybridum* 'Azurro' pestovanej na Andersonovom kultivačnom médiu s rôznymi koncentráciami 2iP.

Rastové parametre± SE[1]	Koncentrácia 2iP [mg.l^{-1}]			
	4,0	**6,0**	**8,0**	**15,0**
Počet výhonkov/explantát	41,28 ± 0,587	36,71 ± 0,083	26,88 ± 0,854	6,58 ± 0,841
Priemerná dĺžka výhonkov [mm]	13,82 ± 0,865	21,29 ± 0,345	13,24 ± 0,104	22,42 ± 0,106
Čerstvá hmotnosť [g]	0,027 ± 0,009	0,029 ± 0,010	0,036 ± 0,007	0,096 ± 0,045
Sušina [g]	0,003 ± 0,001	0,004 ± 0,010	0,004 ± 0,013	0,025 ± 0,030
Pomer čerstvá hmotnosť/sušina	9,00	7,25	9,00	3,84
Celková kapacita proliferácie [mm/explantát]	570,5	781,56	355,9	147,5

SE[1] – stredná chyba aritmetického priemeru

Tab. 3 Rastové parametre primárnej pletivovej kultúry *Rhododendron forrestii* Balf.f. ex Diels. pestovanej na kultivačnom médiu Economou-Read s rôznymi koncentráciami BAP.

Rastové parametre± SE[1]	Koncentrácia BAP [mg.l^{-1}]		
	0,5	**1,0**	**2,0**
Počet výhonkov/explantát	70,72 ± 2,471	95,49 ± 4,571	130,0 ± 6,161
Priemerná dĺžka výhonkov [mm]	11,93 ± 0,090	11,56 ± 0,087	11,46 ± 0,092
Čerstvá hmotnosť [g]	0,862 ± 0,102	1,127 ± 0,093	1,522 ± 0,171
Sušina [g]	0,104 ± 0,009	0,157 ± 0,011	0,256 ± 0,016
Pomer čerstvá hmotnosť/sušina	8,29	7,52	5,95
Celková kapacita proliferácie [mm/explantát]	843,7	1103,86	1489,81

SE[1] – stredná chyba aritmetického priemeru

ZÁVER

Práca ukázala význam mikropropagácie pri rozmnožovaní rododendronov, ktorá sa stáva čoraz viac dôležitou a rozšírenou aj pre ich komerčnú produkciu. Potvrdila tiež významný vplyv zloženia kultivačného média na priebeh morfo-fyziologických procesov, čo sa prejavilo aj v rozdielnych hodnotách rastových parametrov rastlín, rastúcich na odlišných kultivačných médiách.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla s podporou projektu vedeckej grantovej agentúry VEGA č. 2/0183/14 „Environmentálne riziká kultivácie zbierok rododendronov v Arboréte Mlyňany SAV“ a projektu VEGA č. 2/0072/16 „Biologicky aktívna látky vo vybraných druhoch okrasných drevín rodu Magnolia“

LITERATÚRA

ANDERSON, W.C., 1984. A revised Tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. In J. Amer. Soc. Hort. Sci., Vol.. 109, No. 3, p. 343 -347.

BOJARCZUK, K., 1995. Regeneracja wybranych gatunkov i odmian rozanecznikov z sadzonek pedowych i z kultur *in vitro*. Krakow: Plantress. 112 pp.

CHAMBERLAIN, D., HYAM, G., ARGENT, G., FAIRWEATHER, G., WALTER, K. S. 1996. The genus *Rhododendron*. Its classification & synonymy. Royal Botanical Garden Edinburg, 181 pp.

ECONOMOU, A.S., READ P.E., 1984. *In vitro* shoot proliferation of Minnesota Deciduous Azaleas. In Hort. Science, Vol. 19, No. 1, p. 60-61.

ECKHAUT,T., JANSSENS, K., DE KEYSER, E., DE RIEK, J., 2010. Micropropagation of *Rhododendron*. In *Protocols for In Vitro propagation of Ornamental Plants.* Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.) [online], Vol. 589, p. 141-152.

HORÁČEK, P. 2007. *Encyklopedie listnatých stromů a keřů*. Brno: Computer Press a.s. p.198 -203. ISBN 978-80-251-1708-8.

HOŤKA, P., BARTA, M. 2012. Dreviny Arboréta Mlyňany SAV, Bratislava: Veda, 132 s. ISBN 978-80-224-1252-0.

KRÜSSMANN, G. 1962. Handbuch der Laubgehölze. Berlin: Paul Parey, 495 p.

KAMENICKÁ, A., KUBA, J., TOMAŠKO, I., ZÁVODNÝ, V., 2004: Rozmnožovanie okrasných drevín. Bratislava: VEDA SAV, 238 s.

SALAJ, T., BLEHOVÁ, B., 2006. *In vitro kultúry vyšších rastlín* [*In vitro* cultures of higher plants]. Bratislava: Univerzita Komenského (Comenius University). 162 p. ISBN 80-223-2061-7

ŠEDIVÁ, J. 1998. Množení stálezelených dřevin v podmínkách in vitro. *Acta Průhoniciana* [online], 1998, roč. 66. Dostupné na internete: http://www.mzp.cz/ris/ais-ris-infocopy.nsf/aa943fb38bfdd406c12568e70070205e/3c20d43de945311080256801007539cf?OpenDocument

Adresa autorov

Ing. Jana Konôpková, PhD., RNDr. Dominika Bošiaková, Ing. Peter Hoťka, PhD., Ing. Peter Ferus, PhD., Arborétum Mlyňany, Ústav ekológie lesa SAV, Vieska nad Žitavou 178, 951 52 Slepčany, tel. +421-37-6334211, email: jana.konopkova@savba.sk dominika.bosiakova@savba.sk, peter.hotka@savba.sk, peter.ferus@savba.sk
RNDr. Dominika Bošiaková, Katedra botaniky a genetiky, Fakulta prírodných vied, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Nábrežie mládeže 91, 949 74 Nitra

ANTICANCER AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *MYRICA RUBRA* LEAVES

PROTIRAKOVINNÁ A PROTIZÁNĚTLIVÁ AKTIVITA LISTŮ *MYRICA RUBRA*

LENKA LANGHANSOVÁ – PETR MARŠÍK

LANGHANSOVÁ, L. – MARŠÍK, P. 2016. Anticancer and anti-inflammatory activity of *Myrica rubra* leaves. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 146-154. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Natural plant products have been an excellent source of anti-cancer drugs for many years. Moreover, cancer chemoprevention by substances occurring in fruit, vegetables and medicinal plants are now considered as a promising approach for decrease of cancer incidence. Among others, Asian fruit tree *Myrica rubra* seems to produce many of the compounds with interesting biological activity including possible chemotherapeutical and chemopreventive efficacy. In our study we summarize our findings on biological activity of *M. rubra* leafs. Leafs were extracted using water, ethanol, ethyl acetate, *t*-butylmethyl ether and hydrodistillation to evaluate its antioxidative, anti-inflammatory and antiproliferative activity.
Our results revealed a potential source of selective cyclooxygenase-1 inhibitor in butanol and aqueous fraction prepared form ethanol extract; and the dual 5-LOX/COX inhibitor in ethyl-acetate fraction of ethanol extract. The essential oil significantly inhibited cell proliferation in concentration- and time- dependent manner in all tested cancer cell lines. The efficacy of essential oil differed in individual cell lines, with CaCo2 being the most sensitive to *M. rubra* essential oil exposition. In the CaCo2 cells, the essential oil IC_{50} value of 1.5 µg/mL was obtained using xCelligence system for real- time cell monitoring. Contrary to cancer cells, the essential oil did not affect viability of isolated hepatocytes (as a model of normal non-cancerous cells).

Key words: *Myrica rubra*, antiproliferative activity, COX-1, COX-2, 5-LOX, antioxidative activity

INTRODUCTION

Chinese Bayberry (*Myrica rubra Sieb*. et *Zucc*.) is an evergreen fruit tree of considerable economic value in China. Majority of this fruit (21.88%) is cultivated in Zhejiang province (HE et al. 2004). Chinese bayberry fruits acquired local popularity for its unique sweet sour delicious taste (KANG et al. 2012). On the other hand, *M. rubra* bark and leaves are commonly used in folk medicine in China, Japan and Taiwan as an astringent, antidiarrheic, analgesics and antidote (SUN et al. 2013).

The main active components in *M. rubra* leaves were identified myricetin (TANG et al. 2006) and myricitrin (SHIMOSAKI et al. 2011). Myricetin was suggested as a possible cyclooxygenase 1 (COX-1) inhibitor with ani-platelet activity due to its potent analgesic activity tested *in vivo* (TONG et al. 2009). Miricitrin was reported as an anti-inflammatory and antinociceptive agent (SHIMOSAKI et al. 2011, MEOTTI et al. 2008). COX enzyme system comprises the isoenzymes COX-1 and cyclooxygenase 2 (COX-2), that are responsible for the conversion arachidonic acid into prostaglandins. Both cyclooxygenases as well as 5-lipoxygenase (5-LOX) are the key enzymes involved in inflammation in several diseases (BURNETT, LEVY 2012). Recently, a new promising approach for developing anti-inflammatory drugs with dual 5-LOX/COX inhibition was reported (LEVAL et al. 2002, MARTEL-PELLETIER et al. 2003). According to this approach, dual 5-LOX/COX inhibitors may enhance the anti-inflammatory effect avoiding cardiovascular problems associated with selective COX-2 inhibitors and ensure better safety towards the gastrointestinal tract associated with non-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs (BURNETT, LEVY 2012, DAVIES et al. 2013, FIORUCCI et al. 2001). COXs have also an important role in cancerogenesis. The COXs product prostaglandin E_2 (PGE_2) has been shown to promote growth and metastasis of tumor by inducing the angiogenesis necessary to supply oxygen

and nutrients to tumors. Thus it is suggested that COX inhibitors may limit or prevent tumor growth (PERONE et al. 2010).

The anticancer activity of *M. rubra* has been focused mainly on flavonoids that are presented in leaf extracts in high amounts. YANG et al (2003) isolated flavonoids from *M. rubra* leaf extracts that inhibited the viability of human cervical carcinoma cell line HeLa and mouse leukemia cell line P-388 in an *in vitro* assay. These antitumor principles revealed inhibition also in an *in vivo* P-388 tumor-bearing CDF_1 mouse model. Antiproliferative effects of cyanidin-O- glucoside from *M. rubra* were also observed in gastric cancer models (SUN et al. 2013). Moreover, chemopreventive effect of *M. rubra* ethanol extract in rats has been described (YANG et al. 2011).

Although protective mechanisms of human cells help control the level of reactive oxygen species (ROS) in organism, this system may be disrupted by various pathological processes and ROS may be overwhelmed during periods of oxidative stress (YOUDIM et al. 2002). Excessive ROS can damage cellular proteins and DNA, and results in the expression of proteins that control inflammation, cellular transformation, tumor cell proliferation and other pathological processes (GUPTA et al. 2012).Therefore, there is continuous attention towards the development and isolation of antioxidants from natural sources. Regarding *M. rubra*; the antioxidant capacity is well described with respect to high content of flavonoids and phenolic acids in fruit juice mainly (KANG et al. 2012). On the contrary, ROS may play an important role in cancer therapy and prevention. The cancer cells are more sensitive to ROS stress than normal cells. The ROS generation in cancer cell controls the expression of various tumor suppressor genes and suppresses tumor growth through the sustained activation of the cell-cycle inhibitor. Thus ROS may paradoxically act as cancer-suppressing as well as cancer-promoting (GUPTA et al. 2012).

In our study we examined different extracting solvents to *M. rubra* leaves for their antioxidative, anti-inflammatory, and antiproliferative properties. We aimed to identify promising candidates (group of compounds) for further thorough pharmacological studies. Antioxidative activity was evaluated by measuring its scavenging ability on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH assay) and peroxyl radical (ORAC assay). Anti-inflammatory activity was evaluated by measuring the inhibitory activity of these extracts toward pro-inflammatory enzymes COX-1, COX-2 and 5-LOX. The antiproliferative effect of obtained extracts and essential oil was tested in human colon and ileocecal adenocarcinoma cell lines HCT8, SW620, SW480, HT29 and Caco2. The measurement of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H_2DCF-DA) oxidation was used to study the pro-oxidation effect of *M. rubra* essential oil in cancer cells.

MATERIAL AND METHODS

Extracts and oil preparation

The leaves of *Myrica rubra* were collected in Zhejiang province, China. The air-dried and pulverized leaves were used to prepare four extracts: MR H_2O gained by extraction with deionized H_2O, MR EtOH gained by extraction with ethanol, MR EtAc gained by extraction with ethyl acetate and MR tBME gained by extraction with *t*-butylmethyl ether. Collected extracts were evaporated to dryness under reduced pressure and stored at -20 °C until used. The ratio of dried leaves to solvent was 1 g to 20 mL of each solvent.

Further we prepared fractions from the ethanol extract according to MASUDA et al. (2010). The ethanol extract was dissolved in 99% MeOH in H_2O and partitioned with Hexane (F1_Hex) to remove lypophilic substances. The residual solution was evaporated; dried solution was suspended in H_2O and partitioned subsequently with ethyl-acetate (F2_EtOAc) and water-saturated *n*-butanol (F3_BuOH). The residual water soluble solution (F4_H_2O) was evaporated to dryness equally as all the above described fractions.

The essential oil was extracted from fresh *M. rubra* leaves by hydrodistillation as described in LANGHANSOVA et al. (2014). All tested extracts, fractions and the oil were dissolved in DMSO and stored at -20°C before being used.

Antioxidant activity

Total phenol content - The concentration of total phenolic compounds was measured by modified Folin-Ciocalteau colorimetric method (SINGLETON et al. 1999) with a microplate reader Tecan Infinite M200 (Tecan Group) and expressed as milligram of gallic acid equivalents per gram of extract dry weight (mg-GA/g). All measurements were carried out in triplicate in three independent experiments.

DPPH assay - Antioxidant capacity was measured using the DPPH assay modified according to previously reported protocol by BRAND-WILLIAMS et al. (1995). Trolox was used as a positive control and the DPPH scavenging activity was expressed as IC_{50} value measured out of 7 different dilutions of the extracts with a microplate reader Tecan Infinite M200 (Tecan Group). All measurements were carried out in triplicate in three independent experiments.

ORAC assay - ORAC assay (Oxygen Radical Absorbance Capacity) based on scavenging peroxyl radical (ROO•) using azo-compound AAPH (2,2´-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride) for radical induction was performed to evaluate antioxidant capacity of our samples. The assay was performed according to SILVA et al. (2007). The antioxidant capacity was calculated according to CAO, PRIOR (1999) and expressed as gram of trolox equivalents per gram of extract dry weight. All measurements were carried out in triplicate in three independent experiments.

Anti-inflammatory activity

Evaluation of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) inhibitory acitivty - COX inhibitory activity was determined using cell free system with an enzyme immunoassay (EIA) screening ELISA kit (Cayman Chemical Company, USA) according to REININGER, BAUER (2006). The concentration of PGE_2 secreted into the substrate was determined by PGE_2EIA kit (Assay Designs Inc., USA) according to the manufacturer's instructions. The absorbance was measured with a microplate reader Tecan Infinite M200 (Tecan Group) at 405 nm. Indomethacin was used as a positive control in COX-1 assay and ibuprofen in COX-2 assay. The results were expressed as percentage inhibition of PGE_2 formation against untreated samples (DMSO), or as IC_{50} values measured out of 4 sequential concentrations. All measurements were carried with at least two replicates in three independent experiments.

Evaluation of 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibitory acitivty - The inhibition of LTB_4 produced by 5-LOX enzyme in human neutrophil granulocytes was determined by the modified method described previously (CUSAN et al. 2005). Neutrophil granulocytes were isolated from the blood collected from healthy donors (KUTIL et al. 2014). The concentration of LTB_4 was determined by LTB_4 ELISA kit (Enzo Life Sciences, USA) according to the manufacturer's instructions. The absorbance was measured with a microplate reader Tecan Infinite M200 (Tecan Group) at 405 nm. The results were expressed as percentage inhibition of LTB_4 formation against untreated samples (DMSO), or as IC_{50} values measured out of 4 sequential concentrations. Zileuton was used as a positive control. All measurements were carried with at least three replicates in five independent experiments.

Screening of antiproliferative activity

The extracts (water, ethanol, ethyl acetate, *t*-butylmethyl ether) and essential oil from *M. rubra* leaves were added (in concentration 100 µg/ml) to medium of cancer cells HCT8 and cell proliferation was continually monitored using xCelligence system for 48 hours (LANGHANSOVA et al. 2014). The viability of cells was assayed also using the neutral red uptake test (NRU) after 72-hour exposition as described in AMBROŽ et al. (2016).

Determination of cellular reactive oxygen species (ROS) formation

To assess ROS generation in CaCo2 cancer cells, measurement of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H_2DCF-DA) oxidation was used as described by AMBROŽ et al. (2016). Briefly, the CaCo2 cells were washed by PBS buffer and loaded with 5µM H_2DCF-DA and *M. rubra* essential oil. After incubation, fluorescence intensity was measured for 50 min. using a microplate reader Tecan at λ_{ex} = 485 nm and λ_{em} = 525 nm. The cells treated with PBS buffer only with pure DMSO without *M. rubra* essential oil and the cells treated with PBS buffer with soya oil (concentration 100 µg/ml; pre-dissolved in DMSO) were used as control samples. The 3 % H_2O_2 solutions was used as a positive control.

RESULTS AND DISCUSSION

In this paper we summarize our research on antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activity of *M. rubra* leaf extracts. We used four different solvents and we found the highest content of phenolic compounds (210.58 ± 9.91 mg-GA/g), measured by Folin-Ciocalteau assay in ethanol extract followed by aqueous extract (178.13 ± 9.91 mg-GA/g). The extracts of leaves dissolved in ethyl acetate and *t*-butyl-methylether reveal low concentration (41.23 ± 0.75 mg-GA/g and 29.23 ± 0.90 mg-GA/g respectively) of phenolic compounds and thus low potential of biological activity. The highest potential of ethanol extract was confirmed by measuring scavenging capacity of DPPH radical and proxyl radical scavenging capacity determined by ORAC assay (Table 1).

Tab. 1 Antioxidant capacity of *M. rubra* leaf extracts and fractions prepared from *M. rubra* ethanol extract, measured by DPPH and ORAC assays.

	DPPH	**ORAC**
Extracts	IC_{50} (mg/L)	g-equivalent trol/g of extract
M_H_2O	37,25 ± 5,01	0,42 ± 0,05
M_EtOH	11,68 ± 4,77	0,35 ± 0,03
M_EtOAc	202,16 ± 19,08	0,18 ± 0,04
M_TBM	253,37 ± 14,46	0,16 ± 0,03
Trolox	7,65 ± 0,89	
Fractions	IC_{50} (mg/L)	g equivalent trol/g
F2_EtOAc	50,35 ± 12,42	0,2946 ± 0,0450
F3_BuOH	16,43 ± 2,14	0,3713 ± 0,0389
F4_H_2O	27,39 ± 4,75	0,1433 ± 0,0314
Trolox	16,61 ± 4,51	

Trol, Trolox; M_H_2O, aqueous extract; M_EtOH, ethanol extract; M_EtOAc, ethyl acetate extract; M_TBM, *t*-butyl-methylether extract; F2_EtOAc, fraction of ethyl acetate-soluble compounds; F3_BuOH, fraction of *n*-butanol-soluble compounds; F4_H_2O, residual aqueous fraction

M. rubra leaf extracts were subsequently tested for their ability to inhibit COX-1, COX-2 and 5-LOX activity *in vitro* to determine potential anti-inflammatory activity. All extracts revealed strong inhibition at concentration 50 µg/ml to all enzymes, however moderately stronger inhibition of each tested extract was observed towards COX-1 and only ethanol extract revealed potent inhibition to 5-LOX enzyme. In overall the ethanol extract showed the highest potential as a source of active compounds with anti-inflammatory activity. At 50 µg/ml concentration, the ethanol extract showed 82.72 ± 1.01% inhibition to 5-LOX, 93.42 ± 1.33% to COX-1, and 75.71 ± 5.48% to COX-2.

Therefore, in our further study on anti-inflammatory activity, we focused on separation of ethanol extract. The ethanol extract was separated into four multiple fractions. The best potential according to total phenol content was observed in the butanol-soluble fraction (F3_BuOH), where

the Gallic acid equivalent was 379.50 ± 9.02 mg-GA/g. High content was observed also in aqueous fraction (F4_H_2O with 209.83 ± 5.80 mg-GA/g) followed by ethyl-acetate fraction (F2_EtOAc with 192.39 ± 14.85 mg-GA/g). This potential for antioxidant capacity was confirmed by DPPH and ORAC assay (Table 1). Contrary to our results, MASUDA et al. (2010) found ethyl acetate-soluble part of a methanol extract from leaves of *M. rubra* as the most active in inhibition of chemical and enzymatic (tyrosinase and lipoxygenase) oxidation. The discrepancy between our results and results of MASUDA et al. (2010) are caused probably by different antioxidant assays used. Analyses on chemical composition of our extracts using HPLC-PDA system (data will be published) revealed high content of myricitrin in butanol fraction (67.31 mg/g). Nevertheless the similar content was observed in ethyl-acetate fraction (66.98 mg/g), where only moderate antioxidant capacity was observed. Our results thus suggest need for further study to identify compounds responsible for antioxidant activity of butanol-soluble compounds from *M. rubra* leaf ethanol extract.

When we tested fractions prepared from the ethanol extract for their ability to inhibit COX-2 enzyme, at concentrations 10 and 1 µg/mL, we observed significant activity except with the hexane-soluble fraction. Therefore IC_{50} values were determined for all active fractions. The ethyl acetate-soluble fraction showed stronger inhibition to all tested enzymes with IC_{50} = 8.30 µg/mL for 5-LOX, 3.29 µg/mL for COX-1, and 2.54 µg/mL for COX-2. Butanol and aqueous-soluble fractions showed strong inhibitory activity to COX-1 enzyme with IC_{50} = 1.07 µg/mL and 0.71 µg/mL respectively (detailed data will be published). With respect to HPLC-PDA analyses and total phenol content, we assume that that gallocatechines in ethyl-acetate fraction contribute to COXs inhibition and flavonoid compounds to 5-LOX inhibition.

There is a continuing need to search for safe and effective anti-inflammatory compounds, from natural sources due to side effects, associated with commonly used nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). NSAIDs, such as indomethacin, aspirin, or ibuprofen are known to cause side effects on the liver, kidneys, and digestive tract (CHAKRABORTI et al. 2010). In our study, we found a potential source of dual 5-LOX/COX inhibitors in ethyl-acetate fraction of *M. rubra* leaf ethanol extract and the potential source of selective COX-1 inhibitor in butanol and aqueous fraction. As mentioned above, there is an expectation that dual 5-LOX/COX inhibitors may enhanced anti-inflammatory effect avoiding cardiovascular problems associated with selective COX-2 inhibitors and provide a better safety towards the gastrointestinal tract affected by long-term use of classical NSAIDs (BURNETT, LEVY 2012, FIORUCCI et al. 2001). Also, there is an increasing evidence that prostaglandins generated by COX-2 are involved not only in inflammation but also in homoeostasis processes with cardioprotective effect and the thromboxane catalyzed by COX-1 is involved in a risk of coronary heart disease (ARMSTRONG et al., 2011; MARTEL-PELLETIER et al., 2003). Therefore selective COX-1 were found effective in prevention of cardiovascular diseases as proved with application of low dose of aspirin, that is a preferential inhibitor of platelet COX-1 (PATRIGNANI et al. 1982). COX-1 is also a potent mediator of neuroinflammation (CHOI et al. 2009). Thus it is suggested that treatment with COX-1 selective inhibitors may be effective also in prevention of neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease, Parkinson disease, traumatic brain injury and others (PERRONE et al. 2010).

The effect on cancer cell proliferation of our extracts (water, ethanol, ethyl acetate, t-butylmethyl ether) and essential oil from *M. rubra* leaves were tested at the Faculty of Pharmacy, Charles University in Hradec Kralove. All tested extracts were added (in concentration 100 µg/mL) to medium of cancer cells HCT8 and cell proliferation was monitored using xCelligence system for 48 hours. Surprisingly, the ethanol and the ethyl-acetate extracts did not significantly affect cell proliferation while water extract even caused potentiation of cell proliferation in comparison to control (Fig. 1). On the other hand, the extract to *t*-butylmethyl ether and *M. rubra* oil significantly decreased proliferation of cancer cells. Moreover, the oil in tested concentration 100 µg/mL completely inhibited cell proliferation. Based on these results, *M. rubra* essential oil was chosen for consequent experiments that were published by LANGHANSOVA et al. (2014). The antiproliferative effect of *M. rubra* essential oil was tested in a panel of intestinal cell lines as high lipophilicity of the

M. rubra essential oil could present an advantage for their possible use for treatment of tumors in gastrointestinal tract. Five human cancer cell lines with different origin and growth characteristics were used: non-metastatic SW480 established from a primary adenocarcinoma of the colon, its metastatic derivative SW620, colorectal adenocarcinoma cells HT29, epithelial colorectal adenocarcinoma CaCo2 and ileocecal adenocarcinoma cell line HCT8. In all cell lines used *M. rubra* oil significantly inhibited cell proliferation in concentration- and time- dependent manner. The efficacy of *M. rubra* oil differed in individual cell lines, with CaCo2 being the most sensitive to *M. rubra* oil exposition. In CaCo2 and HCT8 cell lines, the IC_{50} values for *M. rubra* oil obtained by end-point test NRU (30 and 49 µg/ml) markedly differed with those observed by cell proliferation monitoring using xCelligence (1.0 and 6.5 µg/ml), where *M. rubra* oil appeared to be much more effective (Fig 2). This disagreement is probably based on different principle of both methods and indicates that *M. rubra* oil primarily affects cell adhesion before stopping of cell division, but this hypothesis needs further verification. Nevertheless, *M. rubra* oil exhibited pronounced antiproliferative effect in several intestinal cancer cell lines.

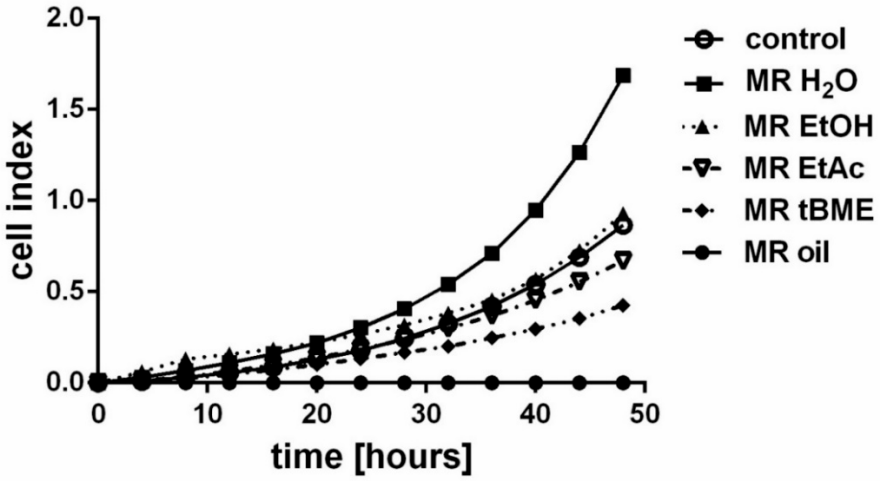


Fig. 1 Effect of various extracts (water, ethanol, ethyl acetate, *t*-butylmethyl ether) of *M. rubra* leaf and essential oil (all in concentrations 100 µg/mL) on number of HCT8 cells monitored using xCelligence system for real-time cell analysis. The data represent the mean from four parallel samples (S.D. was up to 10%)

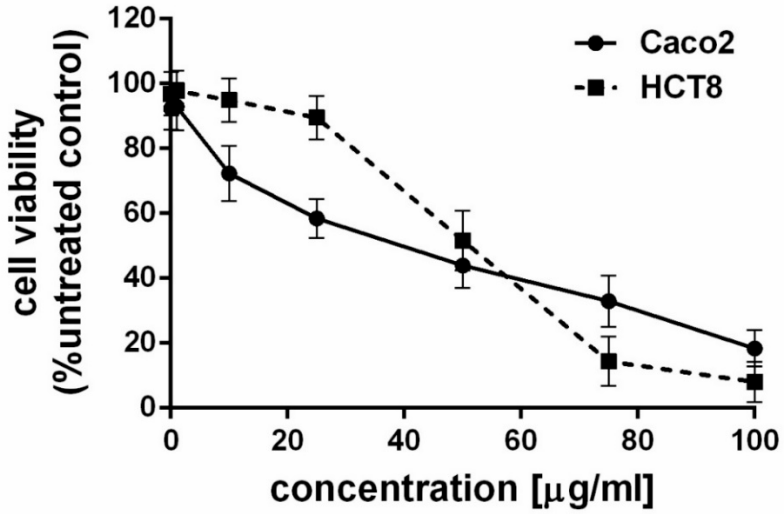


Fig. 2 Effect of *M. rubra* essential oil on cell proliferation of HCT8 and CaCo2 intestinal cancer lines. The viability was assayed using NRU test. The data, presented as percentage of control cells (=100%), represent the mean ± S.D. from 3 independent experiments (with 6 parallels in each).

The anti-cancer activity of plant essential oils has been mostly ascribed to terpenoids, the major compositions of these oils, as many of isolated terpenoids have been shown to possess anti-proliferative and chemopreventive activities in various models (reviewed in KUTTAN et al. 2011). The information about chemical composition of *M. rubra* essential oil using GCxGC-TOFMS, reported by LANGHANSOVA et al. (2014) signify that the high effect of the *M. rubra* oil might be probably based on high content of *α*-humulene and *β*-caryophylene.

The ability of *M. rubra* essential oil to generate ROS formation in cancer cell lines CaCo2 was tested using H_2DCF-DA probe and the results are demonstrated in Fig. 3. In cancer cells, the exposition to *M. rubra* essential oil led to significant increase in generation of ROS. The pro-oxidation effect of the oil was concentration- and time- dependent. The highest concentration of the oil (100 µg/mL) had very strong pro-oxidation effect, similar as the effect of hydrogen peroxide. On the other hand, the oil (even in the highest concentration) did not increase ROS formation in isolated hepatocytes (detailed data published in AMBROŽ et al. 2016).

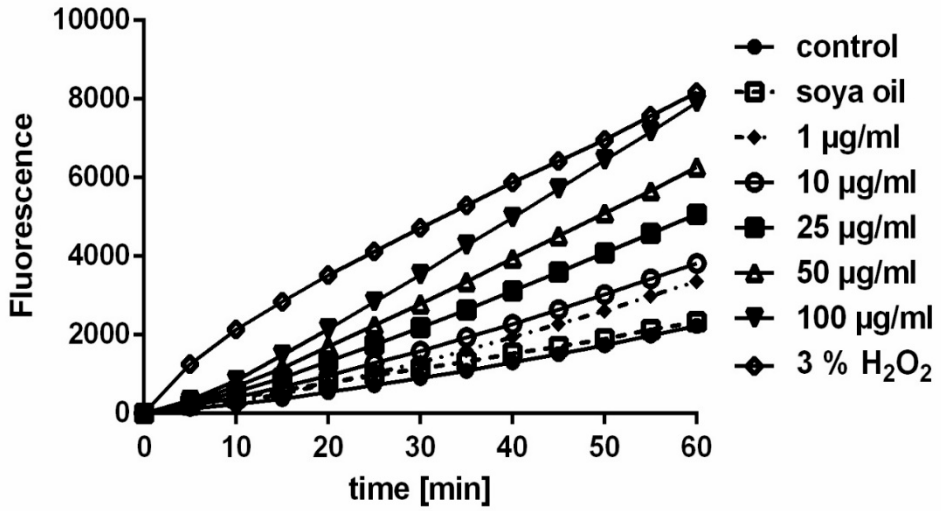


Fig. 3 The pro-oxidation effect of *M. rubra* essential oil. Formation of ROS in CaCo2 intestinal cancer lines was monitored in time, using H_2DCF-DA probe. The hydrogen peroxide (H_2O_2, 3%) was used as the positive control.

CONCLUSION

Taking together, our study provides research data supporting the traditional anti-inflammatory use of *M. rubra*. The data indicates a potential antioxidant capacity of buthanol-soluble compounds, potential source of dual 5-LOX/COX inhibitors in ethyl-acetate fraction and the potential source of selective COX-1 inhibitors in butanol and aqueous fractions of *M. rubra* leaf ethanol extract. Moreover, *M. rubra* essential oil significantly inhibits proliferation of intestinal cancer cells, but it is non-toxic for normal cells. Therefore, *M. rubra* essential oil and its contained substances seem to be promising potential chemotherapeutics and they would deserve further detailed studies.

ACKOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Zhu Li Yun, Ph.D. (College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China) for providing plant material and Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D. (Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové CZ-500 38, Czech Republic) for her help with antiproliferative assays. This work was supported by KONTAKT LH12165 project granted by Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic, and by the European Regional Development Fund under grant OPPK CZ.2.16/3.1.00/24014.

REFERENCES

AMBROŽ, M., HANUŠOVÁ, V., SKARKA, A., BOUŠOVÁ, I., KRÁLOVÁ, V., LANGHANSOVA, L., SKÁLOVÁ, L. 2016. Essential oil from *Myrica rubra* leaves potentiated antiproliferative and prooxidative effect of doxorubicin and its accumulation in intestinal cancer cells. In: Planta Med 82: 89-96.

ARMSTRONG, P. C., KIRKBY, N. S., ZAIN, Z. N., EMERSON, M., MITCHELL, J. A., WARNER, T. D. 2011. Thrombosis Is Reduced by Inhibition of COX-1, but Unaffected by Inhibition of COX-2, in an Acute Model of Platelet Activation in the Mouse. In: Plos One 6(5): 6.

BURNETT, B.P., LEVY, R.M. 2012. 5-Lipoxygenase metabolic contributions to NSAID-induced organ toxicity. In: Adv Ther 29(2): 79-98.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In: Food Science and Technology. 28(1): 25-30.

CAO, G., PRIOR, R.L. 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. In: Methods in Enzymology. 299: 50-62.

CHAKRABORTI, A.K., GARG, S.K., KUMAR, R., NOTIWALA, H.F., JADHAVAR, P.S. 2010. Progress in COX-2 inhibitors: A journey so far. In: Current medicinal Chemistry 17(15): 1563-1593.

CHOI, S. H., AID, S., BOSETTI, F. 2009. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. In: Trends in Pharmacological Sciences 30(4): 174-181.

CUSAN, C., SPALLUTO, G., PRATO, M., ADAMS, M., BODENSIECK, A., BAUER, R., TUBARO, A., BERNARDI, P., DA ROS, T. 2005. Synthesis and biological evaluation of new phenidone analogues as potential dual cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) and human lipoxygenase (5-LOX) inhibitors. In: Farmaco (Lausanne) 60(1): 7-13.

DAVIES, N. M., SMITH, G. D., WINDMEIJER, F., MARTIN, R. M. 2013. COX-2 Selective Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Risk of Gastrointestinal Tract Complications and Myocardial Infarction An Instrumental Variable Analysis. In: Epidemiology 24(3): 352-362.

FIORUCCI, S., MELI, R., BUCCI, M., & CIRINO, G. 2001. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? In: Biochemical Pharmacology 62(11):1433-1438.

GUPTA, S.C., HEVIA, D., PATCHVA, S., PARK, B., KOH, W., AGGARWAL B.B. 2012. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. In: Antioxidants and redox signaling 16(11): 1295-1322.

HE, X. H., CHEN, L. G., HU, X. Q., ASGHAR, S. 2004. Natural diversity of nodular microsymbionts of *Myrica rubra*. In: Plant and Soil 262(1-2): 229-239.

KANG, W., LI, Y., XU, Y., JIANG, W., TAO, Y. 2012. Characterization of Aroma Compounds in Chinese Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) and Olfactometry (GC-O). In: Journal of Food Science 77(10): C1030-C1035.

KUTIL, Z., TEMML, V., MAGHRADZE, D., PRIBYLOVA, M., DVORAKOVA, M., SCHUSTER, D., VANEK, T., LANDA, P. 2014. Impact of wines and wine constituents on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, and 5-lipoxygenase catalytic activity. In: Mediators of inflammation 2014: 178931-178931.

LANGHANSOVA, L., HANUSOVA, V., REZEK, J., STOHANSLOVA, B., AMBROZ, M., KRALOVA, V., VANEK, T., LOU, J.D., YUN, Z.L., YANG, J., SKALOVA, L. 2014. Essential oil from *Myrica rubra* leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. In: Industial Crops and Products 59: 20-26.

LEVAL, X. D., JULEMONT, F., DELARGE, J., PIROTTE, B., DOGNE, J.-M. 2002. New trends in dual 5-LOX/COX inhibition. In: Current medicinal chemistry 9(9): 941-962.

MASUDA, T., SOMEYA, T., FUJIMOTO, A. 2010. Phenolic inhibitors of chemical and enzymatic oxidation in the leaves of *Myrica rubra*. In: Biosci. Biotechnol. Biochem. 74(1): 212-215.

MARTEL-PELLETIER, J., LAJEUNESSE, D., REBOUL, P., PELLETIER, J. P. 2003. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: Annals of the Rheumatic Diseases 62(6): 501-509.

MEOTTI, F.C., SENTHILMOHAN, R., HARWOOD, D.T., MISSAU, F.C., PIZZOLATTI, M.G., KETTLE, A.J. 2008. Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: Implications for the pharmacological effects of flavonoids. In: Free Radical Biol. and Medicine 44(1): 109-120.

PATRIGNANI, P., FILABOZZI, P., PATRONO, C. 1982. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy-subjects. In: Journal of Clinical Investigation 69(6): 1366-1372.

PERRONE, M. G., SCILIMATI, A., SIMONE, L., VITALE, P. 2010. Selective COX-1 Inhibition: A Therapeutic Target to be Reconsidered. In: Current Medicinal Chemistry 17(32): 3769-3805.

REININGER, E.A., BAUER, R. 2006. Prostaglandin-H-synthase (PGHS)-1 and -2 microtiter assays for the testing of herbal drugs and *in vitro* inhibition of PGHS-isoenzymes by polyunsaturated fatty acids from *Platycodi radix*. In: Phytomedicine 13: 164-169.

SHIMOSAKI, S., TSURUNAGA, Y., ITAMURA, H., NAKAMURA, M. 2011. Anti-allergic effect of the flavonoid myricitrin from *Myrica rubra* leaf extracts *in vitro* and *in vivo*. In: Natural Product Research 25(4): 374-380.

SILVA, E.M., SOUZA, J.N.S., ROGEZ, H., REES, J.F., LARONDELLE, Y. 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. In: Food Chemistry 101: 1012-1018.

SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteru reagent. In: Methods in Enzymology 299: 152-178.

SUN, C.D., HUANG, H.Z., XU, C.J., CHEN, K.S. 2013. Biological activities of extracts from chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.): A review. In: Plant Food for Human Nutrition 68: 97-106.

TANG, L., ZHANG, L.J., WANG, M.Q. 2006. Research of the active ingredient myricetin in *Myrica rubra Sieb*. et *Zucc*. Chin. In: Tradit. Pat. Med. 28: 121-122.

TONG, Y., ZHOU, X.M., WANT, S.J., YANG, Y., CAO, Y.L. 2009. Analgesic activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves. In: Arch.Pharm.Res. 32 (4): 527-533.

YANG, L. L., CHANG, C. C., CHEN, L. G., WANG, C. C. 2003. Antitumor principle constituents of *Myrica rubra* var. acuminata. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(10): 2974-2979.

YANG, Z.F., CAO, S.F., ZHENG, Y.H. 2011. Chinese bayberry fruit extract alleviates oxidative stress and prevents 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. In: Food Chemistry 125: 701–705.

YOUDIM, K. A., MCDONALD, J., KALT,W., JOSEPH, J. A. 2002. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. In: J. Nutr. Biochem. 13: 282–288.

Authors' address

Ing. Lenka Langhansová, PhD. – e-mail: langhansova@ueb.cas.cz
Mgr. Petr Maršík, Ph.D. – e-mail: marsik@ueb.cas.cz
Laboratory of Plant Biotechnologies, Institute of Experimental Botany, CAS v.v.i., Rozvojová 263, Praha 6 CZ-165 02, Czech Republic, Phone: +420 225 106 803

HODNOTENIE RASTOVÝCH CHARAKTERISTÍK PÔVODOV BREZY SVALCOVITEJ (*BETULA PENDULA* ROTH. VAR. *CARELICA* MERKL.) Z NÍZKYCH BESKÝD VYSADENÝCH V ARBORÉTE BOROVÁ HORA

THE GROWTH CHARACTERISTICS EVALUATION OF CURLY BIRCH (*BETULA PENDULA* ROTH. VAR. *CARELICA* MERKL.) NÍZKE BESKYDY MTS. ORIGINS IN ARBORETUM BOROVÁ HORA

IVAN LUKÁČIK – IVANA SARVAŠOVÁ – PETRA JANKOVSKÁ

LUKÁČIK, I. – SARVAŠOVÁ, I. – JANKOVSKÁ, P. 2016. Hodnotenie rastových charakteristík pôvodov brezy svalcovitej (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merkl.) z Nízkych Beskýd vysadených v Arboréte Borová hora. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 155-160. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
The paper presents quantitative and qualitative characteristic measurement results of 49 oringins *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merkl. from Nízke Beskydy Mts. In the work are studied total height of individuals, crown width, thickness at the different heights on the stem, number and thick of branches, shape of curly stem parts and growth type of curly birch. Total number of evaluated individuals were 169 and came from three orographic units: Ondavská vrchovina (85 pc), Beskydské predhorie (76 pc), Busov (8 pc). The highest individuals were from Busov unit average 8.12 m. The thickest from Beskydské predhorie unit average $d_{0,15}$=29.59 cm. More than 30% evaluated individuals were tree-like growth type, remaining individuals bush - like growth type. Tree – like and bush – like individuals were mostly white bark, 18.4% dark bark were from Ondavská vrchovina unit. In the curly stem parts evaluation of Nízke Beskydy Mts. population origins was found 58% individuals with shallow curly stem parts, 23% with spherical curly stem parts, 16% with ring-shaped curly stem parts and 3% with dense curly stem parts.

Key words: curly birch, growth characteristics, Slovak origins, Nízke Beskydy Mts.

ÚVOD

Breza svalcovitá (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merkl.) je zriedkavou drevinou, pôvodnou vo viacerých európskych krajinách. Je to varieta brezy previsnutej výnimočná svojou dekoratívnou kresbou dreva, čo najviac vystihuje jej fínsky názov „Visa koivu“ - vzorkovaná breza. Severná a východná hranica jej prirodzeného rozšírenia začína v Rusku, pokračuje cez Fínsko Karelskou plošinou a súvislejší výskyt je zaznamenaný aj v severských a pobaltských krajinách a Bielorusku. Ostrovčekovito sa vyskytuje na Ukrajine, Poľsku, Česku a na Slovensku, kde je zaznamenaný jej najjužnejší výskyt (PAGAN, 1992).

Betula pendula Roth. var. *carelica* Merkl. je polymorfný taxón, ktorý zahŕňa viacero tvarových a výškových podôb. Jej variabilita podobne ako variabilita celého rodu *Betula* je veľmi široká. Breza svalcovitá je podľa karyotických analýz vzhľadom k rovnakému počtu chromozómov (2n=28) geneticky najbližšia druhu *Betula pendula* (JEVDOKIMOV 1989). V prírode sa však našli aj triploidné jedince tejto brezy (SARVAS 1958, KOZMIN a BUTORINA, 1985).

Breza svalcovitá prirodzene najčastejšie rastie na nevyužívaných poľnohospodárskych pôdach, svahoch ciest, násypoch, teda všade tam, kde je zabezpečené dostatočne množstvo svetla (PAGAN, 1987, SIBUL et al. 2011). Vyskytuje sa na lokalitách s menej kontinentálnou klímou ako *Betula pendula*, so zriedkavejším výskytom drsných zimných mrazov. Na pôdne podmienky nie je náročná. V minulosti bola považovaná za drevinu kamenistých, slabo vyvinutých štrkovitých pôd alebo pôd s vystupujúcou materskou horninou, často postihnutých eróziou (LJUBAVSKAJA 1978). V celej oblasti rozšírenia však rastie na rozličných pôdach, najprodukčnejšie porasty tvorí na úrodných, čerstvých,

piesčito hlinitých pôdach (JEVDOKIMOV 1989, PAGAN 1992). Prirodzene netvorí rovnorodé porasty, vyskytuje sa len vtrúsene. Väčšinou rastie v redších porastoch s *Betula pendula*, *Betula pubescens*, *Alnus incana, Salix caprea, Sorbus aucuparia, Prunus padus*, zriedkavejšie aj s *Pinus sylvestris* a *Picea abies* (PAGAN a PAGANOVÁ 1992).

MATERIÁL A METÓDY

V predkladanej práci sú hodnotené jedince brezy svalcovitej vysadenej v Arboréte Borová hora (ďalej ABH). Ide o vegetatívne potomstvo jedincov zo 49 lokalít orografickej oblasti Nízke Beskydy, z orografických celkov (OC) Ondavská vrchovina (30 lokalít), Beskydské predhorie (16 lokalít) a Busov (3 lokality).

Z pôvodných jedincov vyhľadávaných priamo v teréne boli vo februári 1979 odobraté vrúble na heterovegetatívne rozmnoženie a samotné výsadby v ABH boli realizované v rokoch 1982-1986. Merania prebiehali v jeseni 2014 a na jar 2015. Jedince archivované v ABH rastú v nadmorskej výške 291-377 m n. m., pri priemernej ročnej teplote 8,8 °C a priemernom ročnom úhrne zrážok 640 mm (LUKÁČIK et al., 2005). Väčšina lokalít pôvodného výskytu boli bývalé pasienky, sukcesne zarastajúce priekopníckymi drevinami. Konkretizácia pôvodov podľa evidenčných čísel je uvedená v tabuľke 1.

Tab. 1 Pôvody brezy svalcovitej z Nízkych Beskýd vysadené a archivované v genofondovej zbierke Arboréta Borová hora.
Tab. 1 Curly birch origins from Nízke Beskydy Mts. growing and archived in tree collection gene pool in Arboretum Borová hora.

ev.číslo	lokalita	nadm. výška	rozmery pôvodných jedincov (1979)		poznámka
			výška (m)	$d_{1,3}$ (cm)	
BUSOV					
2559	Cígeľka II, LZ Bardejov	520	17,0	40,0	tmavokôra
2560	Cígeľka, LZ Bardejov	500	13,0	18,0	
2561	Stebnícka huta, Zborov	500	5,0	8,0	
BESKYDSKÉ PREDHORIE					
1323	Ladomírov, Ublianska pah.	300-350	-	-	generatív. rozm.
1496	Ladomírov, Ublianska pah.	300-350	-	-	generatív. rozm.
2534	Strihovec, Ublianska pah.	420	7,0	17,0	
2535	Strihovec, Ublianska pah.	400	6,0	16,0	
2536	Ladomírov, Ublianska pah.	320	-	-	
2866	Ubľa	420	8,0	20,0	
2867	Klenová	320	9,0	22,0	
2868	Klenová	320	4,0	8,0	
2869	Klenová	320	6,0	12,0	
2870	Klenová	320	5,0	6,0	
2871	Klenová	320	7,0	12,0	
2878	Snina	350	6,0	7,0	
2879	Snina	350	4,0	6,0	
2943	Klenová	320	4,0	9,0	
3259a	Ladomírov, Ublianska pah.	300-350	4,0	5,0	
ONDAVSKÁ VRCHOVINA					
2562	Becherov - Ondávka	420	7,0	14,0	
2580	Strokov	330	6,0	16,0	
2581	Strokov	330	4,0	3,0	
2582	Strokov	330	6,0	12,0	tmavokôra
2584	Mestisko	220	7,0	7,0	výmoľ,

					tmavokôra
2873	Zborov	420	4,0	6,0	tmavokôra
2874	Zborov	420	5,0	10,0	tmavokôra
2875b	Zborov	420	11,0	25,0	
2876	Zborov	420	5,0	11,0	tmavokôra
2877	Zborov	420	3,0	5,0	tmavokôra
2884	Snakov, Lenartov	550	4,0	7,0	tmavokôra
2885	Snakov, Lenártov	550	7,0	15,0	
2886	Snakov, Lenártov	550	4,0	5,0	
2887	Snakov, Lenártov	550	2,0	3,0	
2888	Snakov, Lenártov	550	4,0	7,0	tmavokôra
2889	Hrabské, Lenártov	430	6,0	9,0	úžľabina
2890	Hrabské, Lenártov	430	6,0	21,0	
2891	Hrabské, Lenártov	430	5,0	9,0	
2892	Hrabské, Lenártov	430	5,0	9,0	
2893	Hrabské, Lenártov	430	6,0	8,0	
2894	Hrabské, Lenártov	430	4,0	4,0	
2895	Hrabské, Lenártov	430	6,0	9,0	
2896	Hrabské, Lenártov	430	5,0	4,0	
2906	Lukavica, Komárov	300	3,0	7,0	
2907	Lukavica, Komárov	300	4,0	6,0	
2910c	Podhradík, Kokošovce	600	4,0	7,0	delimitovaná plocha
2926	Kečkovce, Svidník	410	12,0	35,0	
2927	Stropkov	330	5,0	7,0	
2928	Stropkov	330	5,0	8,0	tmavokôra
2929	Stropkov	330	8,0	20,0	

Na meranie biometrických znakov a určovanie typov brezy svalcovitej sa použili nasledovné metodické postupy:

Merané znaky:

- → výška jedincov (v m, s presnosťou na 0,05 m)
- → hrúbka jedincov $d_{0,15}$ resp., $d_{1,3}$ (v cm, s presnosťou na 0,5 cm)
- → výška nasadenia koruny (v m, s presnosťou na 0,05 m)
- → šírka koruny, dva na seba kolmé priemety (v m, s presnosťou na 0,05 m)

Typ jedinca:

- → stromovitý: jeden priebežný kmeň s výskytom svalcov
- → kríkovitý: 3 najhrubšie konáre s hrúbkou 1/3 až 1/2 hrúbky spoločného kmeňa

Tvar svalcov

- → plytké
- → prstencovité
- → husté
- → guľovité
- → očkové

Tvar svalcov sa hodnotil osobitne pre stromovitý aj kríkovitý typ s ohľadom na farbu kôry podľa nasledovnej schémy:

Vzrastová forma	Farba kôry	Tvar svalcov	Označenie
stromovitá	biela	plytké	**SB1**
		prstencovité	**SB2**
		husté	**SB3**
		guľovité	**SB4**
		očkové	**SB5**
	tmavá	plytké	**ST1**
		prstencovité	**ST2**
		husté	**ST3**
		guľovité	**ST4**
		očkové	**ST5**
kríkovitá	biela	plytké	**KB1**
		prstencovité	**KB2**
		husté	**KB3**
		guľovité	**KB4**
		očkové	**KB5**
	tmavá	plytké	**KT1**
		prstencovité	**KT2**
		husté	**KT3**
		guľovité	**KT4**
		očkové	**KT5**

∗ SB stromovitá bielokôra, ST stromovitá tmavokôra, KB krovitá bielokôra, KT stromovitá tmavokôra

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z celej orografickej oblasti Nízkych Beskýd bolo hodnotených 169 jedincov, najviac z orografického celku Ondavská vrchovina - 85 jedincov, z Beskydského predhoria 76 jedincov a z Busova 8 jedincov. Priemerné hodnoty biometrických znakov za jednotlivé celky sú uvedené v tabuľke 2.

Namerané aj priemerné hodnoty biometrických znakov ukazujú, že breza svalcovitá je morfologicky veľmi variabilnou drevinou. Priemerné výšky z jednotlivých orografických celkov sú podobné ako pri pôvodných jedincoch na prirodzených lokalitách, niektoré však za tridsať rokov v podmienkach arboréta narástli aj do väčších rozmerov, ako napr. bielokôre jedince pôvodov 1323 a 1496, kde sú evidované najvyššie jedince (11-17,8 m, 7 ks). Tieto však boli rozmnožené generatívne. Veľmi cenný a zaujímavý je pôvod 2559 (Cígeľka II), ktorý je vyšší a štíhlejší ako pôvodný jedinec ($d_{1,3}$=26 cm) a vytvára tmavokôru formu s jemnými lýrovitými svalcami po celej dĺžke kmeňa (ST1). Väčšina tmavokôrych foriem brezy svalcovitej pochádza z Ondavskej vrchoviny, napr. vyšší stromovitý jedinec z celku Ondavská vrchovina, pôvod 2887 – Snakov, Lenártov (v=18,5 m, $d_{1,3}$=49 cm), opäť vytvárajúci formu ST1. Všetky pôvodne tmavokôre jedince si túto vlastnosť zachovali, vyskytujú prevažne v kríkovitých formách. Ich kríkovitý rast môže byť zapríčinený viacerými faktormi, napr. odobratím vrúbľov nie z vrcholových ale postranných konárov, tiež sa tu mohli v priebehu rastu výraznejšie uplatniť epigenentické faktory – zmenené faktory prostredia ap. Jedince s evidenčnými číslami 2559, 2560 a 2926 mali na prirodzených lokalitách stromovitý charakter rastu s výškou viac ako 10 m, s priemernou hrúbkou kmeňa $d_{1,3}$=22,5 cm. Pôvod 2875 zo Zborova, ktorý mal na prirodzenom stanovišti stromovitý rast sa v arboréte vyskytuje ako krovitá forma v rozmedzí výšok 5-5,6 m, s výškami nasadenia koruny 23-32 cm, s plytkými (KB1), prstencovými (KB2) aj guľovitými svalcami (KB4). Aj pri pôvodnom, materskom strome boli viditeľné viaceré druhy svalcov. Výskyt svalcov, v ktorých je sústredené vzácne mramorované alebo vzorkované drevo je podmienené

viacerými faktormi. MASHKINA et al. (2011) uvádza, že tvorba svalcovitého dreva koreluje so stupňom mixoploidie v somatických pletivách a je podmienená existenciou špecifického génu alebo skupinou viacerých génov (polygénov). Iní autori predpokladajú, že fenomenálna kresba dreva je spôsobená geneticky: mixoploidiou a rôznymi cytogenetickými abnormalitami a za pôsobenia vonkajších (epigenetických) faktorov napr. fyziologickými zmenami v bunkách spôsobenými extrémnymi životnými faktormi (teplota, osvetlenie, vzdušnej vlhkosti a zásobenia pôd živinami). Podľa GALIBINEJ et al. (2015a, 2015b) je tvorba svalcovitého dreva zapríčinená vysokým obsahom sacharózy, ktorý mení vývoj buniek v kambiálnej zóne brezy svalcovitej, čo môže podľa predpokladov autorov zapríčiňovať „vzorkovanú" štruktúru dreva.

Tab. 2 Priemerné hodnoty biometrických znakov a charakteristiky variability brezy svalcovitej v Nízkych Beskydách
Tab. 2 The biometrical characteristics average values and characteristics of variability of curly birch origins of area Nizke Beskydy Mts.

BESKYDSKÉ PREDHORIE (n=76)									
štatistické char.	**výška (m)**	**$d_{1,3}$ (cm)**	**$d_{0,15}$ (cm)**	**hrúbka konárov (cm)**			**výška nasadenia koruny (m)**	**hrúbka nasadenia koruny (cm)**	**šírka koruny priem. (m)**
				1.	2.	3.			
$x_{priemer}$	7,19	29,23	29,59	20,78	15,23	13,18	0,93	30,54	5,64
s_x	4,69	10,05	11,22	10,32	7,69	5,22	83,54	11,17	1,61
v_x%	65,24	34,38	37,94	49,69	50,49	39,61	90,06	36,58	28,47
max	17,8	47,5	68	47,5	40,5	24	380	70	10,15
min	2,3	6	6	6,5	3	4	14	10	2,99
BUSOV (n=8)									
$x_{priemer}$	8,12	-	24,38	15,63	3,83	2,5	0,90	21,93	6,34
s_x	4,93	-	4,95	6,52	0,29	0,71	58,31	6,23	1,74
v_x%	60,77	-	20,32	41,75	7,53	28,28	64,97	28,42	27,51
max	17,5	-	30	25	4	3	221	31	8,8
min	3,1	-	17	10	3,5	2	49	11	4,1
ONDAVSKÁ VRCHOVINA (n=85)									
$x_{priemer}$	5,68	23,25	24,82	15,13	15,06	13,22	0,70	28,49	5,22
s_x	2,39	8,05	8,86	6,19	7,05		27,28	9,77	1,53
v_x%	42,08	53,72	35,7	40,97	46,84		57,6	35,7	29,31
max	18,5	49	71	31	32	31,5	130	71	9,5
min	1,9	9,5	9,5	5	3	3	6	11,5	2,15

Zo všetkých hodnotených jedincov v ABH bolo viac ako 30 % stromovitého vzrastu (52 ks). Ostatné jedince (117 ks) boli hodnotené ako kríkovitá forma rastu brezy svalcovitej, pre ktorú je typické nízke nasadenie koruny, rozkonárenie do viac ako štyroch konárov a celkovou výškou do 6 m. Pri kríkovitých formách sú kvalitatívne najvyššie hodnotené prstencové a guľovité typy svalcov, podobne aj husté svalce na krátkych kmienkoch. Najmenej výraznú kresbu dreva pri kríkovitých formách majú plytké svalce. Stromovité formy s prevažne plytkým typom svalcov na dlhšom úseku kmeňa alebo konárov, sú najčastejšie využívané na výrobu dýh.

Z vyhodnotenia zastúpenia typov svalcov vyplynulo, že z hodnotených 169 jedincov malo 98 svalce plytké (najviac z Ondavskej vrchoviny 49 ks), 38 jedincov malo svalce guľovité, (Ondavská vrchovina 24 ks), a 28 jedincov svalce prstencové, najviac z Beskydského predhoria (14 ks). Vzácne, husté svalce sa vyskytovali u štyroch jedincov z Beskydského predhoria, a to u semenného pôvodu 1323, ktorých výška sa pohybuje od 2,8-5,6 m a výška nasadenia koruny od 0,18 do 0,44 m. Pôvod z Klenovej (2868) má výšku 4 m, hrúbku $d_{0,15}$=22 cm a vyskytuje sa u neho fenomén známy pre (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merkl.), kde hrúbka kmeňa v mieste nasadenia koruny (0,59 m) je väčšia, ako pri kmienku nad zemou (29 cm). Túto skutočnosť opisuje už FOKEĽ (1766 ex JEVDOKIMOV 1989), ktorý uvádza, že „v lesoch Laponska, Fínska a Karélie rastie taký druh brezy, ktorá je na kmeni smerom hore hrubšia a jej drevo sa podobá na mramor." Rozšírenie kmeňa smerom hore, t. j.

začiatok tvorby svalcov sme pozorovali u 89 jedincoch (takmer 53 %), najviac z Ondavskej vrchoviny (57 ks, t. j. 67 % z populácie orografického celku). Rozšírenie kmeňa smerom nahor je typické najmä pre krovitú formu rastu s nízko nasadenou korunou.

ZÁVER

Breza svalcovitá (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merkl.) je vzácnou, sporadicky sa vyskytujúcou drevinou na sukcesne zarastajúcich lúkach severného a severovýchodného Slovenska. Jej výskyt na Slovensku je hodnotený ako najjužnejší v rámci jej prirodzeného areálu rozšírenia. Premetom práce bolo analyzovať kvantitatívne a kvalitatívne charakteristiky pôvodov pochádzajúcich orografickej oblasti Nízke Beskydy, ktoré sú archivované v Arboréte Borová hora. Zo získaných výsledkov vyplynulo, že ide o morfologicky variabilný špecifický taxón, na ktorého charakter rastu vplývajú najmä podmienky prostredia. Väčšina hodnotených pôvodov si zachovala svoje charakteristické znaky (výška, farba kôry, typ rastu, typ svalcov). Niektoré však v nových stanovištných podmienkach zmenili svoj charakteristický rast, čo môže byť dôsledkom odlišných svetelných, vlhkostných a pôdnych podmienok. Tento predpoklad však bude nutné ďalej podrobnejšie overovať.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla v rámci projektu KEGA č. 007TU Z-4/2015 a KEGA 020TUZ-4/2015.

LITERATÚRA

GALIBINA N. A., NOVITSKAYA L. L., KRASAVINA M. S., MOSHCHENSKAJA YU. L., 2015a. Activity of Sucrose Synthase in Trunk Tissues of Karelian Birch durng Cambial Growth. Russian Journal of Plamt Physiology, 62 (3): 381-389.

GALIBINA N. A., NOVITSKAYA L. L., KRASAVINA M. S., MOSHCHENSKAJA YU. L., 2015b. Invertase activity in trunk tissues of Karelian Birch. Russian Journal of Plamt Physiology, 62 (6): 753-760.

JEVDOKIMOV, A. P., 1989. Biologia i kuľtura kareľskoj berezy. Izdateľstvo Lenigradskovo universiteta. Leningrad, 228 s. ISBN 5-288-00236-2

KOZMIN A. V., BUTORINA, A. K. 1985. Spontannyj triploid berezy kareľskoj. Lesovedenije 6:71-76.

LJUBAVSKAJA, A. JA., 1978. Kareľskaja bereza. Izdateľstvo Lesnaja promyšlennosť, Moskva, 142 s.

LUKÁČIK I., ČÍŽOVÁ M., JEŽOVIČ V., ŠKVARENINOVÁ J., 2005: Arborétum Borová hora 1965-2005. Vydavateľstvo TU vo Zvolene, Zvolen, 90 s.,ISBN 80-228-1479-2.

MASHKINA, O. S., BUTORINA A. K., TABATSKAJA, T. M., 2011. Karelian Birch (*Betula pendula* var. *carelica*) as a Model for Studying genetic and Epigenetic Variation related to the Formation of patterned Wood. Russian journal of Genetics, Vol. 47, No. 8:1073-1080.

PAGAN, 1992. Genofond brezy svalcovitej na Slovensku. In: International Symposium at the ocasion of The 100 th Anniversary of the Arboretum Mlyňany Foundation 1892-1992, Veda, Bratislava, 269-274.

PAGAN, J., PAGANOVÁ, V., 1994. Breza biela svalcovitá (*Betula alba* L. var. *carelica* Merk.) na Slovensku, Vedecké a pedagogické aktuality, Vydavateľstvo Tu vo Zvolene, 75 s. ISBN 80-228-0375-8.

SARVAS, R., 1958: Kaksi triploidista haapaa ja koiuvua. Communicationes Instituti Forestralis Fenniae, 49 (7): 1-25.

SIBUL I., HABICHT K. L., PLOOMI A., 2011. Curly birch stands and cultivattion results in Estonia. In: Structural and functional deviation from normal growth and development of plants. Petrozavodsk, 20.-24. June 2011. 310-313.

Adresa autorov

Doc. Ing. Ivan Lukáčik, CSc., ivan.lukacik@tuzvo.sk

Katedra pestovania lesa, Lesnícka fakulta Technickej univerzity vo Zvolene, T. G. Masaryka 2117/24, 960 53 Zvolen

Ing. Ivana Sarvašová, PhD., ivana.sarvasova@tuzvo.sk

Arborétum Borová hora Technickej univerzity vo Zvolene, Borovianska cesta 2171/66, 960 53 Zvolen

Ing. Petra Jankovská, Katedra prírodného prostredia, Lesnícka fakulta Technickej univerzity vo Zvolene

T. G. Masaryka 2117/24, 960 53 Zvolen

VPLYV ZALESŇOVANIA VINOHRADU NA VYBRANÉ CHEMICKÉ A BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI PÔDY V ARBORÉTE MLYŇANY

EFFECT OF AFFORESTATION OF VINEYARD ON SELECTED SOIL CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES IN ARBORÉTUM MLYŇANY

JANA MAKOVÁ – NORA POLLÁKOVÁ – SOŇA JAVOREKOVÁ – JURAJ MEDO – SILVIA KOVÁCSOVÁ – IVANA CHAROUSOVÁ – EVA HALENÁROVÁ

MAKOVÁ, J. – POLLÁKOVÁ, N. – JAVOREKOVÁ, S. – MEDO, J. – KOVÁCSOVÁ, S. – CHAROUSOVÁ, I. – HALENÁROVÁ, E. 2016. Vplyv zalesňovania vinohradu na vybrané chemické a biologické vlastnosti pôdy v Arboréte Mlyňany. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 161-166. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract

The aim of this work was to study the effect of afforested land formerly used as a vineyard (to year 1974) on selected chemical and biological properties of the soil in Arboretum Mlyňany, SAS Slovakia. The work was carried out on three stations: vineyard (soil located next to Arboretum Mlyňany), under tulip tree (*Liriodendron tulipifera* L.) and under oregon cedar (*Chamaecyparis lawsoniana* /Murr./Parl.). Afforestation of land, a statistically significantly changed of selected soil properties, but under the trees this effect was different. Under the tulip tree we found higher levels of soil organic carbon (C_{ox}) and humus compared to vineyard. The soil reaction compared vineyard land decreased by 0.1 to 0.2 units, but remained in slightly acidic soil reaction. The soil is characterized by a relatively high content of labile carbon (88.5% higher than in the vineyard), which in turn led to higher content of soil microbial biomass (51.8% higher than in the vineyard) and dehydrogenase activity. Dehydrogenase activity was under this trees species 6 times higher than in the soil of the vineyard. Under oregon cedar we found lower levels of C_{ox} and humus compared to the vineyard, but the humus was higher quality. Soil reaction is increased compared to the vineyard soil by 0.9 to 1.1 units (neutral or slightly alkaline). Labile carbon content decreased compared to the vineyard soil by 6.2%, which is then reflected in the biological characteristics of the dehydrogenase activity, which was not statistically different for the vineyard soil. However, biomass of soil microorganisms, compared to the vineyard has increased by 34%.

Key words: afforestation, microbial biomass carbon, dehydrogenase activity, organic carbon, trees, vineyard

ÚVOD

Zalesňovanie pôdy, pôvodne využívanej na poľnohospodárske účely predstavuje zmenu, pri ktorej ročný cyklus pestovania a zberu plodín je nahradený oveľa dlhším cyklom, s tvorbou väčšieho množstva biomasy vo forme opadu a nižším stupňom narušenia pôdy, charakteristickým pre lesný ekosystém (VESTERDAL et al., 2002). V ornej pôde je vstup organickej hmoty do pôdy nižší v porovnaní s lesnou pôdou a zároveň je vyšší stupeň mineralizácie organickej hmoty zvyčajne spojený s vyššou teplotou a vlhkosťou, prítomnosťou väčšieho množstva ľahko rozložiteľných látok a intenzívnejšieho obrábania pôdy. V prípade, keď je orná pôda zalesnená, tieto zmeny medzi obidvomi formami využívania pôdy by mali vyústiť do fázy čistej akumulácie C do pôdy a nového stavu rovnováhy, ktorý sa vytvorí podľa podielu vstupu a rozkladu organickej hmoty v pôde lesného ekosystému.

Zmena vegetácie a zmena využívania pôdy majú značný vplyv aj na pôdne vlastnosti, hlavne diverzitu pôdy, jej biologickú aktivitu a kvantitatívne a kvalitatívne parametre pôdnej organickej hmoty (VESTERDAL et al., 2002; POLLÁKOVÁ et al., 2016). Mikroorganizmy zohrávajú kľúčovú úlohu pri mnohých základných procesoch a funkciách uskutočňovaných v pôde a ovplyvňujú metabolizmus a rast rastlín (PAUL, CLARK, 1996).

Cieľom práce bolo sledovať zmeny vybraných chemických a biologických parametrov pôdy v Arboréte Mlyňany, ktorá bola pôvodne využívaná ako vinohrad a zalesnená výsadbou cudzokrajných drevín.

MATERIÁL A METÓDY

Arborétum Mlyňany SAV leží na západnom Slovensku, neďaleko miest Nitra a Zlaté Moravce, pri obciach Tesárske Mlyňany a Vieska nad Žitavou (HOŤKA, BARTA, 2012). Lokalita (48°19´s.š, 18°21´v.d.) sa rozprestiera na severnom okraji Podunajskej nížiny, v údolí rieky Žitavy, v nadmorskej výške 165-217 m n. m. Územie Arboréta Mlyňany patrí k najteplejším a najsuchším oblastiam Slovenska s priemernou teplotou 9,8 °C (1971-2012) a priemerným úhrnom zrážok 575,39 mm (1971-2012). Oblasť je charakteristická dlhotrvajúcim suchým obdobím na vrchole leta, niekedy takmer bez zrážok (POLLÁKOVÁ, KONÔPKOVÁ, 2012). Z pôdnych subtypov sú v Arboréte Mlyňany najviac zastúpené hnedozem pseudoglejová, hnedozem modálna a hnedozem kultizemná pseudoglejová (POLLÁKOVÁ et al., 2014).

Pôdne vzorky, z humusového A horizontu hnedozeme kultizemnej, sme odoberali z nasledovných lokalít:

Vzorka 1 – pôda pod porastom ľaliovníka tulipánokvetého (*Liriodendron tulipifera* L.) (0,00-0,20 m),

Vzorka 2 – pôda pod porastom cypruštека Lawsonovho (*Chamaecyparis lawsoniana*/Murr./Parl.) (0,00-0,30 m),

Vzorka 3 – pôda vinohradu (porovnávacia lokalita nachádzajúca sa hneď vedľa Arboréta Mlyňany) (0,00-0,20 m).

V pôdnych vzorkách sme analyzovali:

- obsah organického uhlíka (C_{ox}) oxidimetricky metódou Ťurina (ORLOV a GRIŠINA, 1981),
- frakčné zloženie humusu skrátenou frakcionáciou KONOVOVEJ a BEĽČIKOVEJ (1961),
- obsah labilného uhlíka (C_L) oxidovateľného 5 $mmol.dm^{-3}$ $KMnO_4$ v kyslom prostredí 2,5 obsah $mmol.dm^{-3}$ H_2SO_4 (LOGINOW et al., 1993),
- pH merané potenciometricky ako pH/H_2O a pH/KCl (1:2,5),
- uhlík pôdnej mikrobiálnej biomasy (C_{mic}) fumigačnou-extrakčnou metódou podľa VANCE et al. (1987),
- dehydrogenázovú aktivitu (DHA) metódou redukcie TTC (2,3,5 trifenyltetrazólium chlorid) podľa CASIDU et al., (1964).

Výsledky sme štatisticky hodnotili jednofaktorovou analýzou variance (ANOVA) v kombinácii s Fisherovým LSD testom na hladine významnosti $P<0,05$ v programe Statgrapics XV. Na porovnanie rozdielnosti všetkých analyzovaných chemických a biologických parametrov v sledovaných lokalitách sme použili analýzu hlavných komponentov (PCA), ktorú sme vypočítali v programe MVSP 3.13r (Multi-Variate Statistical Package 3.13r, Kovach Comuting Services).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V práci sme hodnotili do akej miery sa zmenili vlastnosti hnedozeme kultizemnej, ktorá bola pôvodne do roku 1974 využívaná ako vinohrad a na tejto pôde boli v Arboréte Mlyňany vysadené cudzokrajné dreviny ľaliovník tulipánokvetý a cypruštek Lawsonov.

Zalesňovanie poľnohospodárskej pôdy môže spôsobiť podstatné zmeny v chemických vlastnostiach pôdy. Rôzne druhy drevín majú odlišný vplyv na vývoj kvality pôdy a cyklus živín, najmä v dôsledku charakteristického chemického zloženia opadu a koreňových výlučkov, ovplyvnením mikroklímy ako aj bylinného spoločenstva pod porastom stromov (LABUDOVÁ, 2005). Približne za 40 rokov nastalo v A horizonte štatisticky preukazné zvýšenie obsahu celkového organického uhlíka o 72 % pod porastom ľaliovníka tulipánokvetého (C_{ox} 2,72 %) v porovnaní s pôdou z vinohradu (C_{ox} 1,58

%), ale preukazné zníženie C_{ox} o 14 % pod cypruštekom Lawsonovým (C_{ox} 1,36 %). Zreteľný bol aj rozdiel v obsahu C_{ox} medzi listnatými a ihličnatými stromami (ľaliovník tulipánokvetý a cypruštek Lawsonov), čo sa zhoduje s výsledkami POLLÁKOVEJ et al., (2014), ktorí potvrdili vyššie hodnoty C_{ox} pod listnatými drevinami (duby, vavrínovce a javory) ako pod ihličnatými drevinami (tisy a kryptomérie).

Kvalitu pôdnej organickej hmoty sme hodnotili podľa zastúpenia uhlíka humínových kyselín k fulvokyselinám (C_{HK}:C_{FK}). V humusových horizontoch sledovaných lokalít bola najvyššia kvalita humusu v pôde pod cypruštekom Lawsonovým, kde sme zistili fulvátovo-humátový typ humusu (pomer C_{HK}:C_{FK} bol v rozmedzí 1,5-1). Humátovo-fulvátový typ (v rozmedzí 1,0-0,5) sme zistili v pôde vinohradu a pod porastom ľaliovníka tulipánokvetého. Celkovo možno konštatovať, že kvalita humusu sa po zalesňovaní zvýšila iba pod porastom cypruštека Lawsonovho. Z výsledkov uvedených v tab. 1 vyplývajú aj rozdiely medzi listnatými a ihličnatými drevinami, s vyššou kvalitou pri ihličnanoch.

Tab. 1 Chemické parametre pôdy v sledovaných lokalitách.

Lokalita	C_{ox} [%]	humus [%]	C_{HK}:C_{FK}	C_L [mg.kg^{-1}]	pH/H_2O	pH/KCl
cypruštek Lawsonov	1,36^a	2,34^a	1,39^c	1907,0^a	7,35^c	6,65^c
ľaliovník tulipánokvetý	2,72^c	4,69^c	0,87^a	3833,7^c	6,13^a	5,56^a
vinohrad	1,58^b	2,72^b	0,89^b	2032,6^b	6,25^b	5,80^b

C_{ox} – celkový obsah organického uhlíka, humus – vypočítaný zo vzťahu C_{ox}.1,724, C_{HK}/C_{FK} – pomer zastúpenia uhlíka humínových kyselín a fulvokyselín v humuse, C_L – labilný organický uhlík, pH/H_2O – aktívna pôdna reakcia, pH/KCl – výmenná pôdna reakcia. Rozdielne písmená uvádzajú štatisticky preukazné rozdiely na hladine významnosti *P<0,05*, (n=9).

Pre priaznivý rozvoj mikroorganizmov v pôde je dôležité sledovať aj zastúpenie labilného, mikrobiálne ľahko rozložiteľného organického uhlíka (C_L). Zalesňovanie pôdy malo priaznivý vplyv na zastúpenie tejto frakcie organického uhlíka (tab. 1), čo sme dokázali štatisticky preukazne vyššími hodnotami C_L v porovnaní s pôdou z vinohradu (o 88,5 %), avšak iba pod porastom listnatej dreviny ľaliovníka tulipánokvetého (s hodnotou 3833,7 mg.kg^{-1}). Naopak pod ihličnatou drevinou cypruštekom Lawsonovým bol obsah C_L o 6,2 % nižší ako v pôde z vinohradu. ZSOLNAY (1996) uvádza, že koncentrácia rozpustnej/vodou extrahovateľnej organickej hmoty má tendenciu byť vyššia v lesnom ekosystéme ako v agroekosystéme. V lesnej pôde autor stanovil koncentráciu vodou rozpustného organického uhlíka od 1000 do 3000 mg .l^{-1}, zatiaľ čo v poľnohospodársky využívanej pôde od 5 do 900 mg.l^{-1}.

Acidifikácia pôdy vyvolaná zalesnením pôvodne orných pôd je popisovaná viacerými autormi (RITTER et al., 2003; SMAL, OLSZEWSKA, 2008) a zvyčajne najvýraznejšia zmena nastáva vo vrstve 0-5 cm.

Pôda vinohradu sa vyznačovala slabokyslou pôdnou reakciou s hodnotami pH/H_2O 6,25 a pH/KCl 5,80. Pod porastom ľaliovníka tulipánokvetého nastalo preukazné zníženie aktívnej i výmennej pôdnej reakcie oproti vinohradu, avšak iba o 0,1 až 0,2 jednotky a hodnoty zostali v rozsahu slabokyslej pôdnej reakcie (pH/H_2O 6,13 a pH/KCl 5,56). RITTER et al. (2003) zistili po 30 rokoch po zalesnení ornej pôdy smrekom nórskym na živinovo bohatej ornej pôde zníženie hodnoty pH/$CaCl_2$ o takmer 2 jednotky (zo 6 na 4) vo vrstve 0-5 cm a o niečo menej v hĺbke 5-15 cm. Acidifikácia zalesnených pôd môže byť spôsobená prirodzenými procesmi spojenými s rozkladom organickej hmoty v organických horizontoch. Rozpustné frakcie humusových kyselín ďalej migrujú v pôdnom profile a tým pôdu okysľujú. Pôdna reakcia pod porastom cypruštека Lawsonovho sa prekvapujúco oproti pôde vinohradu zvýšila do rozsahu hodnôt v oblasti neutrálnej až slabo alkalickej (pH/H_2O 7,35 a pH/KCl 6,65).

Zmena typu vegetácie a druhy stromov ovplyvňujú nielen chemické vlastnosti pôdy, ale aj biologické a biochemické parametre (PRIHA et al., 2001).

Obsah uhlíka mikrobiálnej biomasy sa pestovaním cudzokrajných drevín v Arboréte Mlyňany preukazne zvýšil oproti vinohradu pri obidvoch pestovaných drevinách (tab. 2). Pri cypruštеku Lawsonovom to bolo o 34 % a ľaliovníku tulipánokvetom o 51,8 %. Pri tomto biologickom parametri

sme zistili aj štatisticky preukazné rozdiely medzi listnatými a ihličnatými drevinami, v prospech listnatých drevín. Listnaté dreviny vo všeobecnosti priaznivejšie ovplyvňujú mikrobiálnu aktivitu v porovnaní s ihličnatými drevinami, pretože koreňové exsudáty, opad z listnatých drevín majú vyšší obsah vo vode rozpustných sacharidov, organických kyselín a aminokyselín (PRIHA, SMOLANDER 1997; PRIHA et al., 2001).

Percentuálny podiel uhlíka biomasy mikroorganizmov k obsahu organického uhlíka bol pod cypruštekom Lawsonovým vyšší ako pod ľaliovníkom tulipánokvetým a v pôde z vinohradu (tab. 2) čo indikuje, že v humusovom horizonte tejto dreviny je intenzívnejšie obohacovanie tejto vrstvy o mikrobiálnu biomasu ako o organickú hmotu.

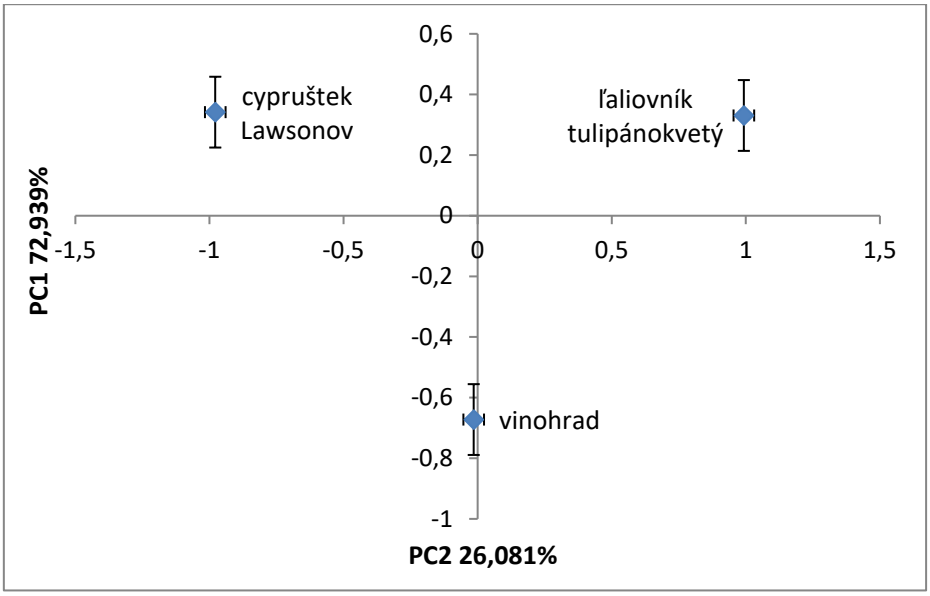
Zalesňovanie malo pozitívny vplyv na dehydrogenázovú aktivitu mikroorganizmov (DHA) iba pod porastom ľaliovníka tulipánokvetého (tab. 2). Pri tejto lokalite bola hodnota DHA 6-násobne, štatisticky preukazne, vyššia ako v pôde vinohradu. Zalesňovanie však neovplyvnilo DHA pod porastom cypruštеka Lawsonovho, kde hodnoty uvedeného parametra boli štatisticky zhodné s vinohradom. Dehydrogenázy sú enzýmami, ktoré sa vyskytujú iba v žijúcich bunkách mikróbov a ich aktivita sa považuje za indikátora všeobecnej mikrobiologickej aktivity v pôde (LASOTA, 2006).

Tab. 2 Biologické parametre pôdy v sledovaných lokalitách.

Lokalita	**C_{mic} [µg.g^{-1}]**	**C_{mic}/C_{ox} [%]**	**DHA [µg TPF.g^{-1}.h^{-1}]**
cypruštek Lawsonov	456,54^{b}	3,37^{b}	2,04^{a}
ľaliovník tulipánokvetý	516,97^{c}	1,90^{a}	12,88^{b}
vinohrad	340,53^{a}	2,16^{a}	2,00^{a}

C_{mic} – uhlík biomasy pôdnych mikroorganizmov, C_{mic}/C_{ox} – percentuálny podiel uhlíka biomasy mikroorganizmov k obsahu celkového organického uhlíka, DHA – dehydrogenázová aktivita. Rozdielne písmená uvádzajú štatisticky preukazné rozdiely na hladine významnosti *P<0,05*, (n=9).

Pri porovnaní rozdielnosti medzi lokalitami zahrnutím všetkých sledovaných chemických a biologických parametrov sme zistili, že analýza hlavných komponentov vysvetľuje 72,936% (pre PC1) a 26,081% (pre PC2) celkovej variability. Z rozptylu hodnôt na PC1 (obr. 1) je zrejmé, že všetky tri lokality (cypruštek Lawsonov, ľaliovník tulipánokvetý a vinohrad) boli navzájom od seba významne odlišné a z rozptylu hodnôt na PC2 je viditeľná významná odlišnosť pôdy vinohradu od pôdy cudzokrajných drevín. Korelácie chemických a biologických parametrov pri PC1 a PC2 uvádza tabuľka 3. Pri PC1 bola najvyššia korelácia zistená pri C_{ox} (0,388), C_L (0,372) a DHA (0,359) a pri PC2 pri C_{mic} (0,649), C_{HK}:C_{FK} (0,337) a DHA (0,339).



Obr. 1 Analýza hlavných komponentov (PCA) zobrazujúca rozdiely medzi sledovanými lokalitami.

Tab. 3 Korelácie chemických a biologických parametrov pri PC1 a PC2 v pôdach sledovaných lokalít.

Parameter	PC1	PC2
C_{ox} [%]	0,388	0,237
C_{HK}:C_{FK}	-0,359	0,337
C_L [mg.kg^{-1}]	0,372	0,301
pH/H_2O	-0,373	0,292
pH/KCl	-0,392	0,218
C_{mic} [µg.g^{-1}]	0,137	0,649
C_{mic}/C_{ox} [%]	-0,376	0,265
DHA [µg TPF.g^{-1}.h^{-1}]	0,359	0,339

ZÁVER

Zalesnenie pôdy, ktorá bola pôvodne využívaná ako vinohrad, štatisticky preukazne zmenilo vybrané chemické a biologické parametre pôdy. Pod sledovanými drevinami (ľaliovník tulipánokvetý a cypruštek Lawsonov) však bol tento vplyv rozdielny.

Pod ľaliovníkom tulipánokvetým sme oproti vinohradu zistili vyšší obsah C_{ox} a humusu (o 72%), s humátovo-fulvátovým typom humusu. Pôdna reakcia sa oproti pôde vinohradu znížila o 0,1 až 0,2 jednotky, ale zostala v oblasti slabokyslej pôdnej reakcie. Pôda sa vyznačovala pomerne vysokým obsahom labilného uhlíka (o 88,5% vyšším ako vo vinohrade), čo sa následne prejavilo vyšším obsahom pôdnej mikrobiálnej biomasy (o 51,8% vyšším ako vo vinohrade) a dehydrogenázej aktivity. Dehydrogenázová aktivita bola pod touto drevinou 6-násobne vyššia ako v pôde vinohradu.

Pod cypruštekom Lawsonovým sme zistili nižší obsah C_{ox} a humusu (o 14%) oproti vinohradu, avšak humus bol vyššej kvality s fulvátovo-humátovým typom. Pôdna reakcia sa zvýšila oproti pôde vinohradu o 0,9-1,1 jednotky do oblasti neutrálnej až slabo alkalickej. Obsah labilného, mikrobiálne dobre prijateľného uhlíka sa znížil oproti pôde vinohradu o 6,2%, čo sa následne prejavilo na dehydrogenázovej aktivite, ktorá nebola štatisticky preukazne odlišná od pôdy vinohradu. Množstvo biomasy mikroorganizmov sa však oproti vinohradu zvýšilo o 34%.

POĎAKOVANIE

Prezentované výsledky boli súčasťou riešenia projektu VEGA 1/0084/13 „Výskum introdukcie drevín na zmenu pôdnych vlastností prírodnej rezervácie Arborétum Mlyňany, SAV“ a VEGA 2/0025/15 „,Endofytické mikroorganizmy a ich potenciálna úloha pri zvyšovaní tolerancie drevín voči stresu“.

LITERATÚRA

CASIDA, L.E. – KLEIN, D.A. – SANTORO, T. 1964. Soil dehydrogenase activity. In: *Soil Science,* roč. 98, 1964, s. 371-376.

HOŤKA, P., BARTA, M. 2012. Dreviny Arboréta Mlyňany SAV. Bratislava: Veda, 132 s. ISBN 978-80-224-1252-0.

KONOVOVA, M., BEĽČIKOVA, N.P. 1961. Uskorennyje metody opredelenija sostava gumusa. In: Počvovedenie, 1961, s. 125-129.

LABUDOVÁ, S. 2005. Mikrobiálna biomasa a jej enzymatická aktivita v pôdnom profile lesných ekosystémov a agroekosystémov. In: Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín. Nitra: SPU, 2005, s. 11-16. ISBN 808-06-961-4-4.

LASOTA, J. 2006. Enzymatic activity of soils in forest sites of the western beskid mountains. In: Polish Journal of Soils Science, roč. 39, 2006, s. 43-53.

LOGINOW, W., WIŚNIEWSKI W., GONET, S.S. CIEŚCIŃSKA, B. 1993. The method for determining, susceptibility of soil organic mater to oxidation (in Polish). In: Zsesyty problemowe podstepów nauk rolniczych z. 411. Bydgoszcz: ATR, 1993. s. 207-212.

ORLOV, D.S., GRIŠINA, L.A. 1981. Praktikum po chimiji gumusa. Moskva: Izdateľstvo Moskovskovo universiteta, 1981. 124 s.

PAUL, E.A., CLARK, F.E. 1996. Soil Microbiology and Biochemistry. San Diego: Academic Press, 1996, 340 p.

POLLÁKOVÁ, N., JONCZAK, J., SZLOVÁKOVÁ, T., KOLENČÍK, M. 2016. Soil organic matter quantity and quality land transformed from arable to forest. In: Journal of Central European Agriculture, roč. 17, 2016, s. 661-674.

POLLÁKOVÁ, N., KONÔPKOVÁ, J., MAKOVÁ, J., HOŤKA, P. 2014. Organická hmota a biologická aktivita pôdy pod vybranými drevinami v Arboréte Mlyňany SAV. In: Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2014". Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, 2014, s. 171 – 176. ISBN 978-80-971113-2-8.

POLLÁKOVÁ, N., KONÔPKOVÁ, J. 2012. Vlastnosti pôdy pod vybranými domácimi a introdukovanými druhmi drevín v Arboréte Mlyňany. Nitra: SPU, 88 s. ISBN 978-80-552-0831-2.

PRIHA, O., GRAYSTON, S.J., HIUKKA, R., PENNANEN, SMOLANDER, A. 2001. Microbial community structure and characteristics of the organic mater in soils under *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* at two forest sites. In: Biol Fertil Soils, roč. 33, 2001, s. 17-24.

PRIHA, O., SMOLANDER A. 1997. Microbial biomass and activity in soil and litter *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* at originally similar field afforestation sites. In: Biol Fertil Soils, roč. 24, 1997, s. 45-51.

RITTER, E., VESTERDAL, L., GUNDERSEN, P. 2003. Changes in soil properties after afforestation of former intensively managed soils with oak and Norway spruce. In: Plant Soil. roč. 249, 2003, s. 319–330.

SMAL, H., OLSZEWSKA, M. 2008. The effect of afforestation with Scots pine (*Pinus Silvestris* L.) of sandy post-arable soils on their selected properties. II. Reaction, carbon, nitrogen and phosphorus. In: Plant and Soil, roč. 205, 2008, s. 171-187.

VANCE, E. D., BROOKES, P. C., JENKINSON, D. S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. In: Soil Biology and Biochemistry, roč. 19, 1987, s. 703-707.

VESTERDAL, L., RITTER, E., GUNDERSEN, P. 2002. Change in soil organic following afforestation of former arable soil. In: Forest Ecology and Management roč. 169, 2002, s. 137-147.

ZOLNAY, A. 1996. Dissolved humus in soil waters A. Piccolo (Ed.) Humic Substances in Terrestrial Ecosystems, Elsevier: Amsterdam,1996, s. 171-223.

Adresa autorov

doc. Ing. Jana Maková, PhD. – Slovenská poľnohospodárska univerzita, Katedra mikrobiológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra; 037/6414434; jana.makova@uniag.sk

doc. Ing. Nora Polláková, PhD. - Slovenská poľnohospodárska univerzita, Katedra pedológie a geológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra; 037/6414389; nora.pollakova@uniag.sk

prof. Ing. Soňa Javoreková, PhD. – Slovenská poľnohospodárska univerzita, Katedra mikrobiológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra; 037/6414431; sona.javorekova@uniag.sk

Ing. Juraj Medo, PhD. – Slovenská poľnohospodárska univerzita, Katedra mikrobiológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra; 037/6415810; juraj.medo@uniag.sk

Ing. Silvia Kovácsová, PhD. – Slovenská poľnohospodárska univerzita, Katedra mikrobiológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra; 037/6414432; silvia.kovacsova@post.sk

Ing. Ivana Charousová - Slovenská poľnohospodárska univerzita, Katedra mikrobiológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra; 037/6415814; xcharousova@is.uniag.sk

Ing. Eva Halenárová - Slovenská poľnohospodárska univerzita, Katedra mikrobiológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra; 037/6415814; xhalenarova@is.uniag.sk

PLASTICITA RASTLÍN – ZÁKLAD BIODIVERZITY A STABILITY EKOSYSTÉMOV

PLANT PLASTICITY – BASIS OF BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM STABILITY

ELENA MASAROVIČOVÁ – MÁRIA MÁJEKOVÁ – IVANA VYKOUKOVÁ

MASAROVIČOVÁ, E. – MÁJEKOVÁ, M. – VYKOUKOVÁ, I. 2016. Plasticita rastlín – základ biodiverzity a stability ekosystémov. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 167-173. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
In this article we discuss the plasticity of plants under changing environmental conditions. Plant responses to environmental conditions are specific and are expressed through phenological, morphological, anatomical and physiological characteristics. Here we defined the basic concepts associated with the variability and adaptability of plants, such as developmental, phenotypic, morphological and physiological plasticity. Developmental plasticity allows plants to grow, to reproduce and to successfully survive in contrasting habitats, and thus affects their ecological distribution and natural selection. High plasticity of several physiological characteristics contributes to the competitive ability of plants within the vegetation succession process. We have emphasized that the plastic responses of plants form the basis for their diversity, which in turn is a prerequisite for the stability of ecosystems - the ability to persist in the prevailing conditions during disturbance and/or stress. To a certain degree, plant communities and whole ecosystems are able to withstand and to cope with internal and external influences with no permanent disruption of essential ecosystem functions.

Key words: biodiversity, ecosystem stability, environmental conditions, functional traits, plant ecological strategies, plasticity, succession.

ÚVOD

Pod plasticitou (plastickosťou, angl. plasticity), ako všeobecnejším termínom, sa rozumie schopnosť rastliny v reakcii na premenlivé podmienky prostredia upraviť svoje vlastnosti prostredníctvom meniacich sa morfologických znakov a/alebo fyziologických procesov. Rastliny sú však plastické nielen v morfologických a fyziologických charakteristikách, ale aj v anatomických a reprodukčných vlastnostiach. Preto sa zaviedol špecifickejší termín – fenotypová plasticita. Je to základná vlastnosť rastlín, keď genotyp vytvára v rôznych environmentálnych podmienkach viaceré fenotypy. Fenotypovú plasticitu (angl. phenotypic plasticity) možno potom definovať ako schopnosť rastliny meniť fenotyp v reakcii na environmentálne zmeny. Tento termín sa pôvodne ponímal v kontexte vývinu rastliny, v súčasnosti zahŕňa zmeny, ku ktorým dochádza v štádiu dospelosti rastliny ako jej správanie sa v danom prostredí (prehľadne MASAROVIČOVÁ et al. 2016).

Prostredie indukuje zmeny vlastností rastlín prostredníctvom ich plastických reakcií na rôznych hierarchických úrovniach - od jedincov cez populácie až po spoločenstvá. Tieto zmeny môžu byť rozhodujúce pre prežívanie a reprodukciu rastlín v heterogénnych a meniacich sa environmentálnych podmienkach. Plasticita rastlín sa tak stala predpokladom vzniku ekotypov, genotypov a taxónov, čím sa vytvorili podmienky pre zvyšovanie biodiverzity aj stability fytocenóz a ekosystémov.

PLASTICITA A EKOLOGICKÉ STRATÉGIE RASTLÍN

Rastliny môžu vďaka plasticite meniť svoj rast, vývin a fyziologické procesy v závislosti od podmienok prostredia, a tak si vytvárať svoju ekologickú stratégiu (angl. plant ecological strategy). Odpovede rastlín na dané environmentálne podmienky sú špecifické a predstavujú charakteristiky (črty, znaky, angl. traits), ktoré sa vyvinuli medzi druhmi a populáciami. V poslednom štvrťstoročí sa

prejavil veľký záujem populačných biológov a ekológov nielen o štúdium schopnosti genotypov vytvárať v odlišných environmentálnych podmienkach rôzne fenotypy, ale aj o štúdium toho, ako sa rastlinné druhy v daných podmienkach vyvíjajú, využívajú zdroje prostredia (svetlo, vodu, živiny, CO_2), úspešne prežívajú, a tak zabezpečujú existenciu ďalšieho potomstva (prehľadne GARNIER et al. 2016). Plasticita rastlín sa väčšinou študovala u druhov, ktoré svojim rastom a vývinom citlivo reagovali na premenlivosť prostredia, v porovnaní s inými druhmi sa ľahko klonovali a rozširovali. Spočiatku sa zameriavalo na jednoduchý opis rastu a morfológie (výška rastlín, počet výhonkov, dĺžka internódií, veľkosť a tvar listov a koreňov), neskôr pribudli niektoré funkčné aspekty plasticity, ako je prerozdelenie biomasy do jednotlivých rastlinných pletív a orgánov alebo sledovanie relatívnej rýchlosti rastu, či rýchlosti asimilácie (SULTAN 1987; BRADSHAW a HARDWICK 1989). Neskôr sa začali zdôrazňovať evolučné a ekologické charakteristiky, čím sa pre výskum plasticity otvárali ďalšie nové a dôležité prístupy. Medzi takéto prístupy patrilo funkčné hodnotenie plasticity, ktoré zahŕňalo zvýšenú alokáciu (distribúciu, uloženie) biomasy do koreňa v podmienkach nízkeho zásobenia pôdy vodou a živinami alebo vyššie hodnoty pomeru listovej plochy k biomase rastliny (LAR) v podmienkach nízkej energie žiarenia (GEDROCK et al. 1996). Tieto špecifické prispôsobenia (angl. adjustment) môžu čiastočne kompenzovať nevyhnutnú redukciu rastu rastliny a tvorby jej biomasy v podmienkach limitovania zdrojov (hlavne svetlo, voda, živiny). Takáto vývinová plasticita (angl. developmental plasticity) umožňuje danému druhu úspešne rásť, prežívať a rozmnožovať sa na kontrastných stanovištiach z hľadiska nielen rôznej dostupnosti uvedených zdrojov, ale aj fyzikálnych vlastností pôdy alebo vegetačnej pokrývky. V prípade fyziologickej plasticity (angl. physiological plasticity) sa rastliny prispôsobujú na aktuálne environmentálne podmienky aklimáciou, napr. sklonom a otáčaním sa listov, zmenou otvorenosti prieduchov alebo zmenou rýchlosti fotosyntézy a transpirácie. Potrebné je však zdôrazniť, že v prípade vývinovej plasticity ide o dlhodobý proces, v prípade fyziologickej plasticity ide o krátkodobý proces z hľadiska reakcie rastliny na premenlivé podmienky prostredia. Avšak, obidva typy plasticity prispievajú k schopnosti daného druhu osídľovať a prežívať na odlišných stanovištiach (SULTAN et al. 1998).

Hlavným cieľom rastlinných druhov je rásť, rozmnožovať sa (zabezpečenie ďalšej generácie jedincov) a úspešne prežiť. Ekologická stratégia je spôsob, akým si druhy zabezpečujú získavanie uhlíka (typ metabolizmu uhlíka rastlín) počas svojho rastu a prenos vlastnej genetickej informácie budúcim generáciám (WESTOBY et al. 2002). Ekologické rozdiely medzi cievnatými rastlinami vyplynuli z rôznych spôsobov získavania a využívania rovnakých zdrojov prostredia - svetla, vody, výživy a CO_2. Listy, stonky, korene a semená sa medzi druhmi líšia v ich životnosti aj rozmiestnení v rámci jedincov. WESTOBY et al. (2002) navrhli 4 hlavné veličiny (angl. dimensions), ktoré ovplyvňujú ekologickú stratégiu rastlín, čiže spôsob, akým si druhy zabezpečujú uhlík počas vegetatívneho rastu (metabolizmus uhlíka v zmysle C_3, C_4 a CAM rastlín) a genetickú výbavu druhov do budúcnosti. Podľa uvedených autorov týmito veličinami sú: (i) špecifická listová hmotnosť – životnosť listu (angl. leaf mass per area – leaf lifespan, LMA – LL); vyjadrujú nízku obmenu častí rastliny v prípade vysokých hodnôt LMA a dlhej LL, ako aj dlhé obdobie udržovania živín v rastlinných orgánoch a slabú odpoveď na priaznivé podmienky pre rast. (ii) hmotnosť semien – produkcia semien (angl. seed mass – seed output, SM – SO), tieto veličiny sú dôležitým predikčným faktorom tak z hľadiska rozširovania semien ako aj pre sukcesiu porastu. Každá z týchto veličín sa mení (varíruje) v súvislosti s klimatickou zónou a lokalitou v rámci krajiny (interpretované ako adaptácia na fyzikálne faktory prostredia), ako aj medzi koexistujúcimi druhmi. Tieto varírovania v rámci lokalít najpravdepodobnejšie vznikli preto, lebo súbor druhov na lokalite je stabilnou zmesou ekologických stratégií rastlín (angl. stable mixture of strategies). Pretože všetky rastlinné druhy si konkurujú o tie isté zdroje prostredia – svetlo, vodu, minerálne živiny a CO_2 – je nevyhnutné, aby sa v premenlivých environmentálnych podmienkach líšili nielen v spôsoboch, akými tieto zdroje získavajú, ale aj ako tieto zdroje spracovávajú a využívajú. Napr. životná stratégia rastlín cez rozdielne náklady a zisky (angl. costs and benefits) predstavuje kompromis medzi získavaním a spotrebou zdrojov, ktoré sú viazané na jednotlivé rastlinné orgány alebo kombináciu orgánov (LAUGHLIN 2014). Pred takmer 20 rokmi WESTOBY (1998) navrhol trojrozmerný model, vyjadrený cez základné parametre: listy, výšku rastliny a semená (angl. Leaf-

Height-Seed, LHS ekologická stratégia rastlín), ktorý odráža založenie, rozšírenie a vytrvalosť populácie. Podmienkou tohto metodického prístupu je stanovenie špecifickej listovej plochy (angl. specific leaf area, SLA) u fyziologicky dospelých listov vyvinutých v prostredí plného ožiarenia, výška rastlín odmeraná u dospelých jedincov a hmotnosť vyprodukovaných semien. Neskôr WESTOBY et al (2002) pridali ďalšie potenciálne dôležité parametre ekologických stratégií, a to životnosť listov, a WESTOBY a WRIGHT (2006) hustotu dreva a koreňové znaky. LAUGHLIN (2014) zosumarizoval všetky dovtedy známe parametre (znaky, charakteristiky) ekologických stratégií rastlín a otestoval ich korelácie, aby zistil, ktoré z nich sú potenciálne najdôležitejšie. Tieto znaky sa neskôr pomenovali ako funkčné znaky rastlín, predstavujúce morfologicko-fyziologicko-fenologické znaky, ktoré nepriamo ovplyvňujú celkovú kondíciu (angl. fitness) rastliny cez ich vplyv na tri základné komponenty prejavu jedinca – rast, reprodukciu a prežitie (VIOLLE et al. 2007). Z nich sa potom vychádzalo pri stanovení funkčných typov rastlín (angl. plant functional types) ako skupín rastlín, ktoré majú podobnú funkciu na úrovni organizmu, podobnú odpoveď na environmentálne faktory a/alebo podobný vplyv na ekosystémy a biómy. Tieto podobnosti sú založené na skutočnosti, že rastliny jednej funkčnej skupiny zdieľajú súbor rovnakých kľúčových funkčných znakov (MASAROVIČOVÁ et al. 2016).

PLASTICITA A FUNKČNÉ ZNAKY RASTLÍN, NA PRÍKLADE ŠPECIFICKEJ LISTOVEJ PLOCHY

Jedným z mnohých, ale kľúčový a veľmi plastický funkčný znak je špecifická listová plocha (angl. specific leaf area, SLA), preto sa budeme v texte tomuto parametru venovať podrobnejšie. Poznamenávame, že recipročnou hodnotou, 1/SLA, je špecifická listová hmotnosť (angl. specific leaf mass, SLM, v súčasnosti označovaná aj ako angl. leaf mass per area, LMA). SLA predstavuje pomer medzi plochou a suchou hmotnosťou listu, inak povedané SLA určuje koľko cm^2 listu je potrebné na vytvorenie 1 g suchej hmotnosti listu. Tento parameter tvorí jednu z troch základných osí vo vyššie uvedenej schéme „LHS" ekologickej stratégie rastlín. Vo všeobecnosti druhy žijúce v prostredí bohatom na zdroje (živiny, voda, CO_2) majú väčšinou vyššie hodnoty SLA ako druhy žijúce v prostredí na zdroje chudobnom (CORNELISSEN et al. 2003). Spomedzi faktorov prostredia SLA veľmi citlivo reaguje hlavne na zmeny energie žiarenia a vlhkosti, preto sa úspešne používa pri štúdiu vplyvu vodného stresu a sucha na rastliny a vegetáciu. Zvyčajne rastliny v suchých a slnečných podmienkach majú malú listovú plochu aj nízke hodnoty SLA. Malá listová plocha je jedným z obranných mechanizmov rastlín voči stratám vody transpiráciou. Druhy majúce nízke hodnoty SLA sú prispôsobené na udržanie si schopnosti využívať zdroje prostredia (hlavne vodu a svetlo) vďaka vysokému obsahu sušiny, vysokej hustote bunkových stien, vysokej koncentrácii sekundárnych metabolitov, ako aj dlhej životnosti listov a koreňov. Navyše, SLA významne a pozitívne koreluje s relatívnou rýchlosťou rastu, rýchlosťou fotosyntézy (vyjadrenou na jednotku suchej hmotnosti), obsahom dusíka a životnosťou listov (REICH et al. 1997). Uvedený pozitívny vzťah medzi SLA a relatívnou rýchlosťou rastu sa využil pri koncipovaní ekologickej stratégie rastlín a ich klasifikácie na rýchlo-rastúce a pomaly-rastúce druhy (angl. fast growing species and slow growing species) (detailne LAMBERS et al. 2008). Rozdiely v hodnotách SLA sa zistili aj medzi jednoročnými a trvalými formami rastlín. Jednoročné rastliny majú vyššie hodnoty SLA v porovnaní s trvalými rastlinami. Tento rozdiel súvisí s anatomickými rozdielmi listov, pričom jednoročné rastliny majú vyšší podiel mezofylu a nižší podiel sklerenchymatických a vodivých pletív (GARNIER, LAURENT 1994).

Podľa POORTER-a (1994) vysoké hodnoty SLA poskytujú rastlinám (v priaznivých podmienkach pre rast) kratší čas návratnosti suchej hmotnosti investovanej do listu (kratšia životnosť listov). Druhy s nízkymi hodnotami tohto parametra zase dosahujú väčšiu životnosť listov prostredníctvom extra pevnej štruktúrnej stavby listov a v niektorých prípadoch aj cez alokáciu tanínov, fenolov alebo iných obranných zlúčenín do listov (REICH et al. 1992). POORTER (1994) tiež zistil, že SLA je v silnej pozitívnej korelácii s rýchlosťou fotosyntézy aj s obsahom dusíka vyjadrených na jednotku suchej hmotnosti a v negatívnej korelácii so životnosťou listov. Vyšší obsah vody v listoch a redukovaná hrúbka listovej čepele prispievajú k vyšším hodnotám SLA (GARNIER, LAURENT 1994). Relatívna rýchlosť rastu semenáčikov, v prostredí s hojným zásobením vodou a živinami, sa ukázala ako indikátor citlivosti na

priaznivé podmienky prostredia (CHAPIN et al. 1993). Druhy majúce vysoké hodnoty SLA majú životnú stratégiu spojenú s rýchlou tvorbou nových listov v skorších fázach vegetačného obdobia (kratšia životnosť listov); rýchlejšia obnova rastlinných orgánov umožňuje jedincom tiež flexibilnejšiu reakciu (odpoveď) na heterogenitu svetla a živín na stanovišti (GRIME 1994). Naopak, druhy s nízkymi hodnotami SLA a vysokou životnosťou listov môžu akumulovať viac biomasy do listov, a tak zachytávať a využívať aj viac slnečnej energie aj dusíka (AERTS, VAN DER PEIJL 1993).

PLASTICITA A BIODIVERZITA

Koncepcia biodiverzity (biologickej rozmanitosti, pestrosti, rôznorodosti) je svojou podstatou prístupom pre ponímanie živej prírody cez variabilitu, štruktúru a funkciu, využívajúc aktuálne poznatky ekológie, populačnej biológie, genetiky a molekulárnej biológie. Takýto prístup tiež napomáha nájsť nové stratégie pre prežívanie živých organizmov (vrátane rastlín) v zmenených environmentálnych podmienkach. Aj keď problematika biodiverzity bola etablovaná na platforme OSN už takmer pred štvrťstoročím (Dohovor OSN o biologickej diverzite, Rio de Janeiro, 1992) v súčasnosti získava stále väčší záujem, a to nielen u vedeckej komunity. Cieľom biodiverzity je udržateľný spôsob využívania jej zložiek a racionálne podieľanie sa na ziskoch z využívania genetických zdrojov prírodných ekosystémov aj agroekosystémov (porovnaj ELIÁŠ 2007). Biodiverzita tvarov, štruktúr a funkcií rastlín v ekosystémoch sa vyvinula vplyvom meniacich sa podmienok prostredia práve vďaka plasticite rastlín. V najširšom zmysle slova biodiverzita zahŕňa nielen rozmanitosť v rámci rastlinných druhov, medzi druhmi i medzi ekosystémami, ale aj otázky tvorby biologickej rozmanitosti, premenlivosti a dedičnosti, pričom sa zaujíma o funkcie a význam nižších organizačných úrovní pre úrovne vyššie. Všetky definície biodiverzity zdôrazňujú jedinečnú vlastnosť živých systémov, a to ich premenlivosť v priestore a čase, ktorá sa prejavuje na rôznych hierarchických úrovniach – na úrovni druhov, vnútri druhov aj v naddruhových systémoch. V našom príspevku chápeme diverzitu v zmysle ODUM-a (1977) ako ekologickú charakteristiku a ponímame ju ako druhovú diverzitu spoločenstiev, založenú na počte druhov a ich relatívnej početnosti v spoločenstve. Potrebné je však zdôrazniť, že druhy neexistujú nezávisle, ale sú spojené s rôznymi väzbami s inými druhmi, čím vytvárajú spoločenstvá a ekosystémy. Druhy sa zoskupujú do funkčných skupín, t.j. skupín, ktoré využívajú rovnaké zdroje prostredia rovnakým spôsobom, preto majú podobné funkčné znaky a podobným spôsobom reagujú aj na stresové podmienky (podrobne MASAROVIČOVÁ et al. 2015).

V súčasnosti sa za najzávažnejšie ohrozenie biodiverzity považuje vplyv poľnohospodárstva, urbanizmu a turistiky. Veľkým rizikom pre prežitie pôvodných druhov sú aj inváznе druhy, a s tým spojený proces invázie. Koncepcia „Miléniové posudzovanie ekosystémov“ (MEA 2003, 2005) priniesla pre posudzovanie biodiverzity vo všeobecnosti nové aspekty, ktoré nemožno opomenúť. Potvrdil sa napr. význam biodiverzity pre fungovanie ekosystémov a poskytovanie ekosystémových služieb, ako schopnosti ekosystémov uspokojovať potreby ľudí. Ohrozenie biodiverzity a degradácia ekosystémov v dôsledku narastajúcej hospodárskej a inej aktivity ľudí spôsobuje zníženie schopnosti ekosystémov uspokojovať potreby ľudí. Táto situácia významne podnecuje snahu o zabezpečenie ochrany biodiverzity od úrovne génov až po ekosystémy. Ochrana biodiverzity a prírodných biotopov, riadenie vodných zdrojov a riešenie klímy patria medzi priority, ktoré sa musia v rámci štátov EÚ dodržiavať (materiál EU „Politiky Európskej únie 2014“). Avšak ide o ďalšie, špecifické problematiky, ktoré by si vyžadovali osobitné príspevky. Pripomíname, že viacerým aspektom biodiverzity sa v r. 2007 venovalo osobitné číslo periodika „Životné prostredie“(roč. 61, č.1), kde sa pozornosť zamerala na predstavu o biodiverzite a jej uplatnení (P. Eliáš), na zastavenie poklesu biodiverzity (B. Delbaere a kol.), biodiverzitu poľnohospodárskej krajiny (Ľ. Halada), európsku platformu pre stratégiu výskumu biodiverzity (H. Kalivoda), či hodnotenie kumulatívnych účinkov antropogénnej činnosti na diverzitu bioty (E. Kalivodová a M. Kozová).

BIODIVERZITA A STABILITA EKOSYSTÉMOV

Stabilita ekosystémov je najčastejšie chápaná ako ekologická stabilita ekosystémov, t.j. schopnosť ekosystémov vyrovnávať zmeny spôsobené vonkajšími činiteľmi a zachovávať svoje prirodzené vlastnosti a funkcie. Ekologická stabilita je vo všeobecnosti definovaná ako schopnosť ekologických systémov (t.j. ekosystémov) pretrvávať aj počas pôsobenia rušivého vplyvu, uchovávať a reprodukovať svoje podstatné charakteristiky i v podmienkach narúšania zvonku. Táto schopnosť sa prejavuje minimálnou zmenou počas pôsobenia rušivého vplyvu (rezistencia) alebo spontánnym návratom do východiskového stavu, resp. na pôvodnú vývojovú trajektóriu po prípadnej zmene (resiliencia) (prehľadne napr. MÍCHAL 1992). Rozlišuje sa vnútorná (endogénna) ekologická stabilita, predstavujúca schopnosť ekosystému existovať pri normálnom pôsobení faktorov prostredia, vrátane takých extrémnych situácií, na ktoré sú ekosystémy dlhodobo adaptované. Determinovaná je množstvom a pevnosťou vnútorných väzieb v ekosystéme. Takýto typ stability majú väčšinou sukcesne vyzreté ekosystémy s klimaxovým charakterom. Vonkajšia (exogénna) ekologická stabilita je charakteristická schopnosťou ekosystému odolávať pôsobeniu mimoriadnych vonkajších faktorov, na ktoré nie je ekosystém prirodzeným vývojom adaptovaný (porovnaj PETŘÍČEK, PLESNÍK 2012).

Snahou pre zabezpečenie ekologickej stability krajiny (stability ekosystémov) bolo vytváranie územných systémov ekologickej stability (ÚSES), pričom kritériom pre výber komponentov ÚSES sa stala vnútorná ekologická stabilita. Táto koncepcia sa u nás prijala začiatkom 90-tych rokov a viac-menej úspešne sa využíva až dodnes. ÚSES predstavuje navzájom prepojený súbor prirodzených aj pozmenených, avšak prírodne blízkych ekosystémov, ktoré udržujú prírodnú rovnováhu. V podstate je to vybraná sústava ekologicky stabilnejších častí krajiny, účelne rozmiestnená podľa funkčných a priestorových kritérií, hierarchicky členená od lokálnej na regionálnu až nadregionálnu úroveň. Základnými prvkami ÚSES sú biocentrá a biokoridory. Biocentrum je segment krajiny, ktorý svojou veľkosťou a ekologickými podmienkami umožňuje dlhodobú (trvalú) existenciu a reprodukciu spoločenstiev organizmov (rastlín a živočíchov). Biokoridor je krajinný segment prepájajúci medzi sebou biocentrá, čím sa umožňuje migrácia organizmov aj šírenie genetických informácií (prehľadne IZAKOVIČOVÁ et al. 2000; PAUDITŠOVÁ et al. 2007).

Na vyjadrenie úrovne ekologickej stability určitého územia sa vytvorilo viacero metodických nástrojov, z ktorých väčšina je založená na výpočte koeficientu ekologickej stability. Je to pomerné číslo, ktoré stanovuje pomer plôch tzv. stabilných a nestabilných krajinotvorných prvkov na danom území (MÍCHAL 1982). Ide o numerickú hodnotu, na základe ktorej je krajina zaradená do určitého stupňa ekologickej stability. Najčastejšie je interval ekologickej stability rozdelený na 3 až 5 stupňov.

Problematika hodnotenia zmien diverzity krajiny patrí medzi krajinnoekologické výskumy a súvisí s hodnotením priestorovej organizácie využívania územia. Hodnotenie zmien diverzity krajiny zahŕňa celý rad ďalších postupov, ako napr. stabilitu krajiny, zaťažiteľnosť, únosnosť, zraniteľnosť, významnosť, variabilnosť, náchylnosť, pestrosť, citlivosť na antropogénne vplyvy a pod., ale aj špecifické postupy, ako napr. hodnotenie stavu zložiek krajiny a procesov, ktoré negatívne ovplyvňujú zmenu stanovištných podmienok, určenie šetrnejšieho spôsobu hospodárenia, stanovenie prípustnej miery pôsobenia ľudských aktivít v krajine a pod. (HRNČIAROVÁ 2011).

Už sme zdôraznili, že základným postulátom stability ekosystémov je zachovanie rozmanitosti spoločenstiev rastlín a živočíchov (biodiverzity) od úrovne génov až po ekosystémy. Podľa všeobecne uznávaných ekologických princípov sú druhy a spoločenstvá organizmov ohrozené a ich stabilné fungovanie môže byť narušené alebo znemožnené, ak sú ich životné podmienky nepriaznivé a ak sa prejaví ich priestorová izolácia. Ak sa chce zachovať stabilná existencia a fungovanie živých systémov, musia sa zachovať ich vhodné životné podmienky a tiež sa musí zabezpečiť priestorové prepojenie týchto systémov (napr. MIKLÓS 2010).

POĎAKOVANIE

Tento článok vznikol vďaka finančnej podpore grantovej agentúry VEGA – grant č. 1/0218/14, Agentúry na podporu výskumu a vývoja – grant č. APVV-0866-12 a OP Výskum a vývoj – projekt č. ITMS 26240220019.

LITERATÚRA

AERTS R., VAN DER PEIJL, M.J. 1993. A simple model to explain the dominance of low-productive perennials in nutrient-poor habitats. In: Oikos roč. 66, s. 144-147.

BRADSHAW, A.D., HARDWICK, K., 1989. Evolution and stress: genotypic and phenotypic components. In: Biological Journal of Linnean Society roč. 37, s.137-155.

CORNELISSEN, J.H.C., LAVOREL, S., GARNIER, E., DIAZ, S., BUCHMANN, N., GURVICH, D.E., REICH, P.B., TER STEEGE, H., MORGAN, H. D., VAN DER HEIJDEN, M.G.A., PAUSAS, J.G.,POORTER, H. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. In: Australian Journal of Botany roč. 51, s. 335-380.

ELIÁŠ, P. 2007. Biodiverzita - predstava a jej uplatnenie. In: Životné prostredie, Bratislava roč. 41, s. 5 - 12.

GARNIER, E., LAURENT, G. 1994. Leaf anatomy, specific leaf mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. In: New Phytologist roč. 28, s. 725-736.

GARNIER, E., NAVAS, M.L., GRIGULIS, K. 2016. Plant functional diversity. Organism traits, community structure and ecosystem properties. Oxford: Oxford University, 236 s. ISBN-0-19-875736-8.

GEDROC, J.J., MCCONNAUGHAY, K.D.M., COLEMAN, J.S. 1996. Plasticity in root/shoot partitioning: optimal, ontogenetic, or both? In: Functional Ecology roč.10, s. 44-50.

GRIME, J.P. 1994. The role of plasticity in exploiting environmental heterogeneity. In:. CALDWELL M.M., PEARCY R. (eds) Exploitation of environmental heterogeneity in plant. Academic Press, San Diego, s. 1-18. ISBN 0029-8549.

HRNČIAROVÁ, T. 2011. Hodnotenie diverzity krajiny vybranými účelovými vlastnosťami. In: Životné prostredie roč. 45, s. 206 - 211.

CHAPIN, F.S. III., AUTUMN, K. , PUGNAIRE, F. 1993. Evolution of suites of traits in relation to environmental stress. In: Americal Naturalist roč. 139, s. 1293-1304.

IZAKOVIČOVÁ, et al. 2000. Územný systém ekologickej stability, MŽP SR, Združenie KRAJINA 21, Bratislava, 155 s.

LAMBERS, H., CHAPIN, F.S., PONS, T.L. 2008. Plant physiological ecology. 2nd Ed. Springer Science, Business Media, LLC, 604 s. ISBN 978-0-387-78340-6.

LAUGHLIN, D.C. 2014. The intrinsic dimensionality of plant traits and its relevance to
community assembly. In: Journal of Ecology roč. 102, s. 186-193.

MASAROVIČOVÁ, E., MÁJEKOVÁ, M., VYKOUKOVÁ, I. 2015. Funkčné znaky a plasticita rastlín. Bratislava, Vydavateľstvo Univerzity Komenského. 1. Vydanie. 84 s. ISBN 978-80-223-4033-5.

MASAROVIČOVÁ, E., MÁJEKOVÁ, M., VYKOUKOVÁ, I. 2016. Functional traits and plasticity of the plants. In: PESSARAKLI, M. (ed.) Handbook of photosynthesis. Third Edition. Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group, s. 487-505. ISBN 978-1-4822-3073-4.

MEA, 2003. Millenium Ecosystem Assessment. Ecosystems and human well-being:
A framework for assessment. Washington, DC, Island Press, 245 s.

MEA, 2005. Millennium Ecosystem Assessment : Ecosystems and Human Well-being :
Synthesis. Washington, DC, Island Press, 137 s.

MÍCHAL, I. 1982. Principy krajinářského hodnocení území. Architektúra a urbanizmus,
Vyd. VEDA SAV, Bratislava, roč. 16, s. 65–87.

MÍCHAL, I. 1992. Ekologická stabilita. Brno, Veronica, 244 s. ISBN 978-0-19-875736-8.

MIKLÓS, L. 2010: Siete v krajine – územný systém ekologickej stability. In: Životné prostredie roč. 44, s. 115-120.

ODUM, E.P. 1977. Základy ekológie. Praha, Academia, 376 s. ISBN 509-21-857.

PAUDITŠOVÁ, E., REHÁČKOVÁ, T., RUŽIČKOVÁ, J. 2007. Metodický návod na vypracovanie miestneho územného systému ekologickej stability. In: Acta Environmentalica Univeristatis Comenianae, Bratislava roč. 15, s. 61-82.

PETŘÍČEK, V., PLESNÍK,, J. 2012. Významné krajinné prvky a ekologická stabilita, In: Ochrana přírody roč. 70, zvláštní číslo, s. 41-44.

POLITIKY EU. 2014. http://europa.eu/pol/index_sk.htm; http://europa.eu/!fH34mj;

POORTER, H. 1994. Construction costs and payback time of biomass: a whole plant perspective. In: ROY J., GARNIER E. (eds.) A whole-plant perspective on carbon-nitrogen interactions. SPB Publishing, The Hague, s. 111-127. ISBN 90-5103-086.

REICH, P.B., WALTERS, M.B., ELLSWORTH, D.S. 1992. Leaf life-span in relation to leaf, plant and stand characteristics among diverse ecosystems. In: Ecological Monographs roč.62, s. 365-392.

REICH, P.B., WALTERS, M.B., ELLSWORTH, D.S. 1997. From tropics to tundra: Global convergence in plant functioning. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America roč. 94, s. 13730-13734.

SULTAN, S.E. 1987. Evolutionary implications of phenotypic plasticity in plants. In: Evolutionary Biology roč. 21, s. 127-176.

SULTAN, S.E., WILCZEK, A.M., BELL, D.L., HAND, G. 1998. Physiological response to complex environments in annual *Polygonum* species of contrasting ecological breadth. In: Oecologia roč.115, s. 564-578.

VIOLLE, C., NAVAS, M.L., VILE, D., KAZAKOU, E., FORTUNEL, C., HUMMEL, I., GARNIER, E. 2007. Let the concept of trait be functional! In: Oikos roč. 116, s. 882-892.

WESTOBY, M. 1998. A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. Plant and Soil roč.199, s. 213-227.

WESTOBY, M., FALSTER, D.S., MOLES, A.T., VESK, P.A., WRIGHT, I.J. 2002. Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. In: Annual Review of Ecological Systematic roč. 33, s. 125–159.

WESTOBY, M., WRIGHT, I.J. 2006. Land-plant ecology on the basis of functional traits. In: Trends in Ecology and Evolution roč. 21, s. 261-268.

Adresa autorov

prof. RNDr. Elena Masarovičová, DrSc., E-mail: masarovicova@fns.uniba.sk
Mgr. Mária Májeková, PhD.
Mgr. Ivana Vykouková, PhD.
Prirodovedecka fakulta Univerzity Komenskeho v Bratislave, Katedra pedologie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava

MICROBIAL COMMUNITIES IN LEAVES OF EVERGREEN WOODY PLANTS GROWING IN MLYŇANY ARBORETUM

MIKROBIÁLNE KOMUNITY V LISTOCH VŽDYZELENÝCH DREVÍN ARBORÉTA MLYŇANY

JAROSLAV MICHALKO – JURAJ MEDO – MAREK BARTA – TOMÁŠ BIBEŇ

MICHALKO, J. – MEDO, J. – BARTA, M. – BIBEŇ, T. 2016. Microbial communities in leaves of evergreen woody plants growing in Mlyňany Arboretum. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 174-177. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Plants are colonized by hundreds of endophytic microorganisms that grow asymptomatically within their tissues. It is believed that some of them are functionally important for plants by stimulating their growth or providing tolerance against negative biotic and abiotic factors. The aim of this work was to screen the diversity of endophytic microbial communities within surface-sterilized leaves of evergreen horticultural plants belonging to 10 families. By the PCR method we amplified microbial -specific sequences form the complex genomic DNA extracted from homogenized leaf tissues. The communities of endophytes were visualized using the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). We observed that all analyzed evergreen plants harbor rich spectra of microbial communities consisting of one or a few dominant species and tens or hundreds of minor species. The composition of microbial spectra seems to be species/family specific. Plants belonging to the same family harbor very similar bacterial communities whereas plants from different families differ markedly in their microbial composition even when they are growing next to each other. Our results indicate that plants can specifically control the diversity of microbial communities within their tissues which could have implications for the integrated plant management.

Key words: endophytic bacteria, diversity, DGGE, evergreen plants, 16S rRNA

INTRODUCTION

Each plant in nature forms a close associations with different microorganisms. Many of plant-associated microbes are able to influence plant growth and development, either directly or indirectly. Endophytic bacteria, which are residing asymptomatically within living plant tissues form one part of plant microbiome (VENTURI, KEEL 2016). Heretofore, endophytic bacteria were detected in all plant species examined, thus representing an invaluable genetic resource for biotechnologies. Many of them provide beneficial services to their host plants, including nitrogen fixation, biosynthesis of phytohormones, vitamins, enzyme co-factors and a diverse spectrum of secondary metabolites antagonizing plant pathogens or herbivores (RODRIGUEZ et al. 2008; KHAN et al. 2012; GAGNÉ-BOURQUE et al. 2015), and are therefore of interest both for industrial biotechnologies and agriculture (RYAN et al. 2008). Endophytic communities of woody plants are just poorly studied comparing to their non-woody counterparts (PIRTTILÄ, FRANK 2011). The aim of this work was to provide insights about the diversity of bacterial endophytic communities inhabiting leaves of evergreen woody plants growing in the Mlyňany Arboretum.

MATERIAL AND METHODS

Plant sampling
We examined the endophytic microbial communities of 13 evergreen plant species representing ten plant families (Table 1) growing in Mlyňany Arboretum (Slovakia). Samples were collected on January 12, 2016 from plants growing at different localities. Three fully developed leaves from each plant

were harvested and kept on ice in plastic bags until processing. To wash out mechanical impurities leaves were first washed thoroughly under tap water, then in sterile distilled water and subsequently surface sterilized in 2.5% (v/v) sodium hypochlorite for 5 min. followed by a final wash in sterile distilled water for 1 min. Three leaf discs of 14 mm in diameter (about 0.05 g) were cut off from the middle of the leaf blade (the middle vein and leaf margins were excluded) and transferred into a clean 2 ml microcentrifuge tube. Samples were frozen and kept at -80 °C until further analyses.

Tab. 1 List of analyzed evergreen plant species**.**

	Species (Variety)	**Family**
1.	*Taxus baccata* L.	*Taxaceae*
2.	*Ligustrum delavayanum* Hariot.	*Oleaceae*
3.	*Ilex aquifolium* var. *heterophylla* Aiton	*Aquifoliaceae*
4.	*Euonymus japonicus* Thunb.	*Celastraceae*
5.	*Quercus ilex* L.	*Fagaceae*
6.	*Osmarea* x *burkwoodii*	*Oleaceae*
7.	*Prunus laurocerasus* L. cv. Latifolia	*Rosaceae*
8.	*Prunus laurocerasus* L. cv. Schipkaensis	*Rosaceae*
9.	*Osmanthus decorus* (Boiss. and Bal.) Kasapligil	*Oleaceae*
10.	*Prunus laurocerasus* L.	*Rosaceae*
11.	*Skimmia japonica* Thunb.	*Rutaceae*
12.	*Hedera h*elix L.	*Araliaceae*
13.	*Pieris japonica* (Thunb.) D. Don ex G. Don	*Ericaceae*
14.	*Phillyrea media* L.	*Oleaceae*
15.	*Buxus balearica* Lam.	*Buxaceae*

Molecular analyses

DNA was extracted using the PrepMan Ultra solution (Life technologies) according to manufacturer´s instructions. Plant material was homogenized using a BeadBug microtube homogenizer (Benchmark Scientific) in 2 ml tubes for 3 min. Four steal beads (5 mm in diameter) and 0.5 mg sterilized sand was added to samples prior to homogenization.

Homogenate was centrifuged at 14 000 rpm (10 min., 4°C). Supernatant was transferred to a new 1.5 ml tube, diluted 10 times and used directly as a template for PCR. PCR was carried out in a MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad) according to standard protocols. The reaction mixture of 30 µl contained 2 µl template, 1 × green PCR reaction buffer to DreamTaq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), 200 µM dNTP mix, 2 mM $MgCl_2$, 0.4 $\mu g.\mu l^{-1}$ BSA, 1 U DreamTaq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) and 0.2 µM each primer.

Bacterial 16S rRNA was amplified using specific primers 984f-GC and 1378r (Heuer et al., 1997). Amplification was performed using the following thermal profile: 3 min. of initial denaturation at 95°C, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 56°C and 30 s at 72°C, and a final elongation 2 min. at 72°C.

For DGGE separation gradients ranging from 45% to 65% of denaturing agents were used. Gradients were poured with 6% (v/v) acrylamide in the denaturing solutions; 100% denaturant corresponds to 5.6 M urea and 32 % (v/v) formamide. Electrophoresis was run at a voltage of 90 V in 1 × TAE buffer (Tris-acetate-EDTA) for 16 h at a constant temperature of 60°C using the INGENY Phoru system (Ingeny International). Gels were stained with GelRed stain (Biotium) following instructions of the provider. Band patterns were compared and checked on cluster formation (Pearson correlation coefficient, UPGMA) using the GelJ software (HERAS et al., 2015).

RESULTS AND DISCUSSION

PCR and subsequent DGGE analysis allows a closer look into the diversity and patterns of occurrence of endophytic bacteria inhabiting leaves of 15 evergreen woody plants growing in Mlyňany Arboretum. The complex DGGE patterns of individual plants (Figure 1) indicated that there is a great diversity of endophytic bacteria inhabiting leaves of these plants, even though the samples were collected during the winter period with the average temperature in January reaching -1.8°C according to data from the meteorological station in Mlyňany Arboretum, and the average temperature on the sampling day 3.3°C. The DGGE patterns also indicate that leaves of each plant are colonized by one to three dominant bacterial species and several minor species (Figure 1).

Cluster analysis of the obtained DGGE profiles show that endophytic bacterial communities tend to be more similar in plants from the same plant family than to those from different plant families (Figure 2). For example, the bacterial profiles of all varieties of cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L., *Rosaceae*) clustered together as well as three out of the four representatives of the family *Oleaceae* (*Phillyrea media* L., *Osmanthus decorus* Boiss. and Bal., *Osmarea × burkwoodii*) despite they were growing at different sites. On the other hand, plants from different species growing next to each other harbor very different endophytic bacterial communities, e.g. *Euonymus japonicus* Thunb. (*Celastraceae*) growing next to *Buxus balearica* Lam. (*Buxaceae*), *Quercus ilex* L. (*Fagaceae*) growing next to *Osmanthus decorus* Boiss. and Bal. and *Osmarea × burkwoodii* (*Oleaceae*). In the case of *Ligustrum delavayanum* Hariot. (*Oleaceae*), however, the bacterial community composition differed from that of other analyzed representatives of *Oleaceae* family, and was more similar to the profile of *Skimmia japonica* Thunb. (*Rutaceae*). *Taxus baccata* L. (*Taxaceae*), the only representative of conifers within our sample set differed markedly in its endophyte composition from all other samples and formed outgroup in the cluster analysis.

Altogether, these results point to the species-specific plant-microbe associations that are influenced by plant genotype and not that much by the proximity of the plants.

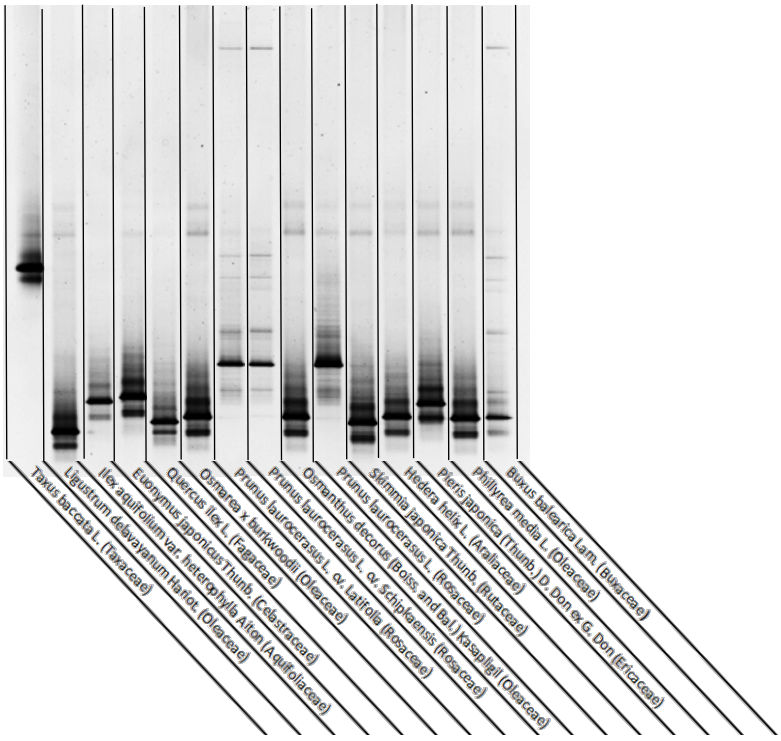
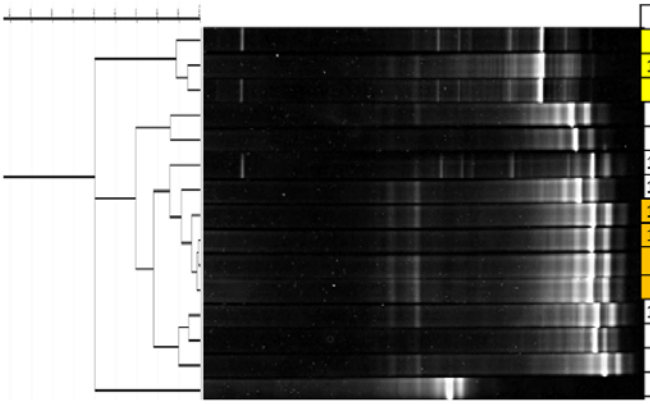


Fig. 1 DGGE profiles of each analyzed plant obtained using amplification of the 16S rRNA region using bacterial primers 984f-GC and 1378r.



	Species (Variety)	Family	Locality
8.	Prunus laurocerasus L. cv. Schipkaensis	Rosaceae	G
10.	Prunus laurocerasus L.	Rosaceae	H
7.	Prunus laurocerasus L. cv. Latifolia	Rosaceae	I
4.	Euonymus japonicus Thunb.	Celastraceae	B
3.	Ilex aquifolium var. heterophylla Aiton	Aquifoliaceae	A
15.	Buxus balearica Lam.	Buxaceae	B
13.	Pieris japonica (Thunb.) D. Don ex G. Don	Ericaceae	F
14.	Phillyrea media L.	Oleaceae	D
12.	Hedera helix L.	Araliaceae	E
9.	Osmanthus decorus (Boiss. and Bal.)	Oleaceae	C
6.	Osmarea x burkwoodii	Oleaceae	C
11.	Skimmia japonica Thunb.	Rutaceae	J
5.	Quercus ilex L.	Fagaceae	C
2.	Ligustrum delavayanum Hariot.	Oleaceae	D
1.	Taxus baccata L.	Taxaceae	K

Fig. 2 Clustering of band patterns from analyzed samples using bacterial primers 984f-GC and 1378r. Plants from the same family show more similar bacterial profiles than plants from different families regardless the growth locality. Letters in the locality column indicate plants growing next to each other (same letter) or growing at different localities (differing letters).

CONCLUSIONS

Evergreen plants are inhabited by a diverse spectra of endophytic bacterial communities with a few dominant species and more minor species. The spectrum of endophytic bacteria seems to be influenced predominantly with the plant genotype and not by the proximity of plants.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the grants VEGA 2/0025/15 and COST FA1406.

REFERENCES

GAGNÉ-BOURQUE, F., MAYER, B. F., CHARRON, J. B., et al. 2015. Accelerated growth rate and increased drought stress resilience of the model grass *Brachypodium distachyon* colonized by *Bacillus subtilis* B26. In: PloS One, vol. 10, 2015, no. 6, e0130456.

KHAN, Z., GUELICH, G., PHAN, H., REDMAN, R., and DOTY, S. 2012. Bacterial and Yeast Endophytes from Poplar and Willow Promote Growth in Crop Plants and Grasses. In: ISRN Agronomy, 2012, p. 1–11.

PIRTTILÄ, A. M, FRANK, A. C. 2011. Endophytes of Forest Trees. Biology and Applications. London: Springer, 322 p. ISBN 978-94-007-3748-8.

RODRIGUEZ, R., HENSON, J., VOLKENBURGH, E., et al. 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. In: The ISME Journal, vol. 2, 2008, no. 4, p. 404–416.

RYAN, R., GERMAINE, K., FRANKS, A. et al. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. In: FEMS Microbiology Letters, vol. 278, 2008, no. 1, p. 1–9.

VENTURI, V. and KEEL, C. 2016. Signaling in the Rhizosphere. In: Trends in plant science, vol. 21, 2016, no. 3, p. 187–98.

Authors' Addresses

Ing. Jaroslav Michalko, PhD. E-mail: michalko.jaroslav@savba.sk
Ing. Marek Barta, PhD. E-mail: marek.barta@savba.sk
Ing. Tomáš Bibeň E-mail: tomas.biben@savba.sk
Mlyňany Arboretum, Institue of Forest Ecology, Slovak Academy of Sciences, Vieska nad Žitavou 178, 951 52 Slepcany, Slovakia, Tel.: +42137 633 4211

Ing. Juraj Medo, PhD. E-mail: juraj.medo@uniag.sk
Dept. of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovakia, Tel.: +42137 641 5810

VÝZNAMNEJŠIE STROMY GINKA DVOJLALOČNÉHO (*GINKGO BILOBA* L.) V NITRIANSKOM SAMOSPRÁVNOM KRAJI AKO ZDROJ FYTOGENOFONDU PRE JEHO PESTOVANIE NA SLOVENSKU

ERIKA MŇAHONČÁKOVÁ – PAVEL HRUBÍK

MŇAHONČÁKOVÁ, E. – HRUBÍK, P. 2016. Významnejšie stromy ginka dvojlaločného (Ginkgo biloba L.) v Nitrianskom samosprávnom kraji ako zdroj fytogenofondu pre jeho pestovanie na Slovensku. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 178-181. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Ginkgo is a large tree with fan-shaped leaves. Although Ginkgo is native parts of Asia, including China, Japan, and Korea, it has been grown in Europe since around 1730 and in the United States since around 1784. Ginkgo trees are tolerant of pollution, making them an ideal choice for urban locations. Before planting a ginkgo tree, consider its estimated height and canopy width at maturity.

Key words: tree, ginkgo, location

ÚVOD

Nitriansky samosprávny kraj (Nitriansky kraj) sa rozprestiera na ploche 6 343,7 km2, zaberá 12,9 % celkovej plochy štátu, s počtom obyvateľov 714 tisíc, čo predstavuje 13,23 % z celkového počtu obyvateľov Slovenskej republiky. Tvorí ho sedem okresov: Komárno. Levice, Nitra, Nové Zámky, Šaľa, Topoľčany a Zlaté Moravce. Jeho hranica je zároveň štátnou hranicou s Maďarskou republikou. Na Z susedí s Trnavským krajom, na S s Trenčianskym a V s Banskobystrickým krajom.

Geografia: Nachádza sa na Podunajskej nížine, ktorú tvoria Podunajská rovina a Podunajská pahorkatina. Na S sa tiahne pohorie Tríbeč. Typ panónskej kveteny tu dosahuje najsevernejšie rozšírenie s jedinečnými lesostepami, SV je lemovaný výbežkom Štiavnických vrchov a sčasti Pohronským Inovcom. Najnižšou položenou obcou je Bodza, 109 m n. m. v okrese Komárno a najvyššie položená obec sú Uhliská, 650 m n. m. v okrese Levice. V J časti ležia Kováčovské vrchy, ktoré sú sopečným pohorím medzi riekami Dunaj, Hron, Ipeľ. Charakterizuje ich viacero krajinných typov. Kraj patrí k najteplejším oblastiam Slovenska. Jeho územím pretekajú najväčšie slovenské rieky Dunaj, Nitra, Hron, Váh a Ipeľ. Osou kraja je rieka Nitra a prítokom rieky Žitava. Je tu bohatý výskyt minerálnych a termálnych vôd. Pásy územia pozdĺž riek tvoria rovinaté nivy.

Na základe nášho predchádzajúceho výskumu (RAŽNÁ, HRUBÍK a kol., 2014) sme zaznamenali na území Nitrianskeho kraja niekoľko významnejších lokalít výskytu a pestovania ginka dvojlaločného (*Ginkgo biloba* L.). Preto sme pre účely získania a evidencie fytogenofondu pre jeho ďalšie pestovanie na Slovensku, vybrali nasledujúce lokality: Okres Nitra, mesto Nitra, Vráble, Báb, Nová Ves nad Žitavou, Šurianky; Okres Komárno, mesto Komárno, Kravany nad Dunajom; Okres Levice, Želiezovce, Hokovce, Horné Semerovce, Pohronský Ruskov; Okres Nové Zámky, Komjatice, Palárikovo, Trávnica; okres Topoľčany, mesto Topoľčany, Hajná Nová Ves, Horné Obdokovce, Kovarce, Oponice, Tovarníky; Okres Zlaté Moravce, Beladice, Červený Hrádok, Sľažany, Topoľčianky, Vieska nad Žitavou – Arborétum Mlyňany SAV.

MATERIÁL A METODIKA

Ginko dvojlaločné – *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgoaceae* – ginkovité). Strom dorastajúci do výšky 30-40 m. Koruna je kužeľovitá, ale pomerne premenlivá. Pri samčích jedincoch býva štíhlejšia, pri

samičích košatejšia. Konáre vyrastajú v závitnici, sú pomerne hrubé, šikmo odklonené až vystupujúce. Kôra je hladká, sivá, pomerne rýchlo sa mení na hnedosivú borku, ktorá je rozpukaná v pozdĺžnych nepravidelných platničkách.

Púčiky sú postavené špirálovito, sú 3-5 x 3-4 mm, široko vajcovité (bočné sú menšie), zaoblené, sediace. Púčikové šupiny sú hnedasté, viaceré.

Má dva typy výhonkov. Dlhé výhonky – makroblasty – sú hladké, svetlosivé až hnedasté, skrátené výhonky – brachyblasty – sa vytvárajú z púčikov na dvojročných a starších konároch, majú 30-50 x 6-10 mm, zvráskavený povrch a tmavosivé sfarbenie. Prirastajú pomaly.

Listy sú 30-60 x 40-100 mm, v hornej časti, väčšinou v strede, sú rozdelené rôzne hlbokým výrezom na dva laloky alebo sú aj nepravidelne viaclaločnaté. Sú ploché, pevné, kožovité, svetlozelené, v jeseni pred opadnutím zlatožlté. Žilnatina je vidlicovito rozkonárená, takmer rovnobežná. Stopka je 40-80 mm dlhá. Vyrastajú v závitnici, na dlhých výhonkoch jednotlivo, na skrátených výhonkoch v zdanlivých zväzočkoch po 3-5 kusov. Kvitne v máji. Kvety sú dvojdomé, vyrastajú len na skrátených výhonkoch. Samčie jahňadovité šištice sú 20-30 x 5-7 mm, podlhovasto vajcovité, žlté, stopkaté, visiace, s mnohými tyčinkami. Pri samičích jedincoch vyrastá v pazuchách šupín alebo listov vzpriamená 25-40 mm dlhá stopka, ktorá je na konci rozšírená. Dva zakrpatené plodolisty vytvárajú pohárikovité priehlbeniny, v ktorých sú umiestnené väčšinou dve priame vajíčka. Len výnimočne býva stopka ku koncu rozkonárená a nesie viacero vajíčok. Z nich sa vyvíja len jedno, kým druhé ostáva zakrpatené a vidieť ho na stopke.

Semenná kôstkovica je 18-25 mm, guľovitá, najprv zelená, po dozretí na povrchu žltá, stredná časť osemenia je dužinatá a zapácha, vnútorná časť je zdrevnatená. „Kôstka“ je 10-15 x 8-10 mm, oválna, stlačená, dvojhranná, belavá až svetlosivá. Dozrieva v septembri až októbri, opadáva.

V súčasnom období je jediným žijúcim zástupcom monotypického rodu, čeľade a triedy patriacej do veľkej skupiny nahosemenných, ktorých začiatky až do prvohôr (perm), ich výskyt vrcholí v druhohorách (jura) a v treťohorách začínajú ubúdať. Výskyt tohto druhu možno sledovať už v kriede a v treťohorách bol rozšírený po celej severnej pologuli. Jeho súčasné prirodzené rozšírenie sa dá určiť iba ťažko vzhľadom na kultúru. Prirodzený výskyt sa predpokladá iba na niekoľkých lokalitách v juhovýchodnej Číne. Svetlomilná drevina, nenáročná na pôdu, lepšie sa jej darí na hlbších pôdach, dobre znáša mrazy, údajne aj -35 stupňov Celzia, len v mladosti potrebuje ochranu pred ostrými mrazivými vetrami.

Do Európy bola zavedená roku 1727. Často sa pestuje v parkoch, uprednostňujú sa samčie exempláre (semená zapáchajú). Zaujímavá, esteticky pôsobivá drevina. Z foriem sú známe úzka stĺpovitá a smútočná so širokou dáždnikovitou korunou, ale aj strihanolistá, žltkasto strakatá a zlatožltá listová forma.

V Nitrianskom kraji rastie na 25 lokalitách, väčšinou jednotlivo, ale početnejšie stromy alebo ich skupiny nachádzame v Arboréte Mlyňany SAV, vo Vieske nad Žitavou (20 stromov), v Nitre (12 stromov), Palárikove (5), Novej Vsi nad Žitavou, Topoľčiankach, Hokovciach (po 4 stromoch). Pre účely nášho výskumu, ako významný zdroj fytogenofondu sú zaujímavé plodiace samičie stromy, pričom z hľadiska vyššej klíčivosti uprednostňujeme lokality so zastúpením samčích a samičích stromov.

Problematika hodnotenia biologických, genetických, sadovníckych vlastností a jeho rozšírenia na území Slovenska, je predmetom nášho záujmu už od roku 2007. Viaceré výsledky sme publikovali alebo prezentovali na vedeckých a odborných konferenciách, alebo v súbornej vedeckej monografii (RAŽNÁ, HRUBÍK, a kol., 2014), prípadne ich pripravujeme na publikovanie. Pri výskume sme použili viaceré špecifické metodiky, pričom kultúrne rozšírenie tejto všestranne zaujímavej dreviny na Slovensku sme uzavreli v rokoch 2014 – 2015, v súčasnosti pokračujeme v experimentálnom genetickom výskume.

Pre účely tohto príspevku sme využili známe lokality výskytu v Nitrianskom kraji a v rokoch 2014 a 2015 sme vykonali rozsiahlejší zber plodov ginka dvojlaločného, za účelom podrobnejšej analýzy procesov fruktifikácie, hodnotenia plodov a semien, spôsoby stratifikácie a pestovania semenáčikov z vybraných stromov, v podmienkach Botanickej záhrady Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre. Zber plodov sme uskutočnili v mesiaci októbri, vzorky plodov obsahovali obvykle 100 kusov, ktoré sme mechanicky očistili od mäsitej a zapáchajúcej dužiny, presušili na vzduchu, zistili merateľné hodnoty na semenách (počet semien, ich pohlavie, hmotnosť (vrátane kilogramovej vzorky), zdravotný stav) a pripravili na stratifikáciu . Použili sme pritom dva spôsoby stratifikácie (vo vlhkom piesku alebo uloženie v sklenej nádobe s uzáverom v chladničke); čiastočne sa využili aj spôsoby skarifikácie – porušenie osemenia mechanickým zásahom. Po uplynutí obdobia stratifikácie (október – marec), sa semená vysievali do debničiek alebo kvetináčov a ukladali v skleníkoch alebo priamo na pripravených záhonoch. Semenáčiky sa po prvom roku rastu presádzali v širšom spone na záhony v škôlkach. Počet semenáčikov pri jednotlivých vzorkách dosahoval 50 – 100 kusov. Na výsadbu sa používajú 3 – 5 ročné sadenice, prípadne aj odrastené sadenice, dosahujúce výšku 50 – 70 – 100 cm.

Zber plodov v jesennom období (október) sme urobili na týchto lokalitách: Nitra – Nitriansky mestský park, Topoľčianky – park ŠL. Beladice, historický park, Nová Ves nad Žitavou, historický park, Hajná Nová Ves, historický park, Arborétum Mlyňany SAV vo Vieske nad Žitavou.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V Nitrianskom kraji evidujeme celkove 70 stromov ginka dvojlaločného. Z toho je 20 stromov samčieho (mužského) pohlavia a 22 stromov samičieho (ženského) pohlavia, ktoré pravidelne plodia a prinášajú vhodné semená pre ich reprodukciu; 28 stromov bolo juvenilných (doteraz nekvitnúcich).

Proces prípravy semien na stratifikáciu zahrňuje zber plodov v priebehu mesiaca október, čistenie plodov od zapáchajúcej dužiny, premývanie semien prúdom vody, sušenie až po stratifikáciu vo vlhkom piesku, alebo v sklenených nádobách uložených v chladničke (október – marec), vysievanie semien na jar (marec – apríl), do debničiek, kvetináčov alebo priamo na pripravené záhony v okrasnej škôlke. Pre výsadbu na určené stanovište sú vhodné 3 – 5 – 7 ročné sadenice, prípadne aj odrastené 10–ročné sadenice. Celý tento proces máme v podmienkach Botanickej záhrady SPU v Nitre zvládnutý a osvedčený. Cieľom nášho výskumu je prispieť k väčšiemu rozšíreniu tejto vzácnej a zaujímavej dreviny na Slovensku tak, aby sme súčasný počet stromov (288 kusov), zvýšili na 500, prípadne v budúcnosti až na 1000 kusov stromov.

Záujem o pestovanie ginka dvojlaločného rastie, a výsadby sa rozširujú najmä v podmienkach urbanizovaného prostredia, v mestách a obciach, ako skupinové, alebo radové a alejové výsadby pri chodníkoch alebo cestných komunikáciách. Prejavil sa aj podnikateľský zámer na pestovanie ginka dvojlaločného na plantážach, pre získavanie a odber listovej hmoty na lekárske a medicínske účely (v Prešove). Z hľadiska záhradno-architektonického a sadovníckeho využitia, sa zohľadňujú osobitné estetické a funkčné hľadiská tohto stromu, jeho zvláštnosti listov a premenlivosti počas roka, významnej historickej a farmaceutickej hodnoty. Nedocenená je aj jeho odolnosť proti škodcom a chorobám, odolnosť proti imisiám, soleniu ciest a chodníkov, ako aj tolerancia voči suchu.

Na Slovensku sme pri našom predchádzajúcom výskume zaznamenali celkove 103 lokalít (mestá, mestské časti, obce, ale najmä historické a novodobé parky), kde sa vyskytujú stromy *Ginkgo biloba* L., pričom sa zistilo 189 stromov solitérnych a 99 stromov rastúcich v alejach a stromoradiach, spolu 288 stromov. Z toho bolo 73 stromov samčieho pohlavia (mužské) a 65 stromov samičieho pohlavia (ženské), 154 stromov bolo juvenilných (ešte neplodiacich), resp. nedostali sa do vývojového štádia kvitnutia.

Pre účely reprodukcie evidujeme samičie stromy s pravidelnou plodnosťou na týchto lokalitách: Komárno, Hokovce, Beladice, Nitra (2 ks samičie stromy), Nová Ves nad Žitavou (4 ks), Topoľčianky (3 ks), Arborétum Mlyňany SAV, Vieska nad Žitavou (3 ks), Palárikovo (2 ks), Komjatice,

Trávnica, Hajná Nová Ves, Topoľčany, Tovarníky, nasledujúcich rozmerov a biologických hodnôt: Komárno – obvod kmeňa 76 cm; priemer kmeňa 24,2 cm; výška stromu 12 m; šírka koruny 10 x 12 m; pohlavie – samičí strom; vek 38 rokov. Hokovce – 166 – 52,8 – 16 – 14 x 12 ; samičí strom; 84 rokov; Beladice – 237 – 75,2 – 20 – 16 x 16 – samičí strom – 119 rokov; Nitra – (120; 119; 96) – 38,2; 30,7; 29,3) – 18 – 18 x 18 – samičí strom – 60 rokov; 107 – 34,2 – 15 – 9 x 9 – samičí strom – 54 rokov; Nová Ves nad Žitavou – 277 – 88,3 – 17 – 18 x 18 – samičí strom – 140 rokov; 228 – 72,7 – 16 – 18 x 18 – samičí strom – 116 rokov; 202 – 64,4 – 22 – 16 x 16 – samičí strom – 102 rokov; 172 – 54,8 – 20 – 2 x 9 – samičí strom – 87 rokov; Topoľčianky – 225 – 71,7 – 20 – 16 x 16 – samičí strom – 114 rokov; 261 – 83,2 – 18 – 16 x 16 – samičí strom – 132 rokov; 92 – 29,3 – 12 – 6 x 6 – samičí strom – 47 rokov; Arborétum Mlyňany SAV, Vieska nad Žitavou – 82 – 26,2 – 16 – 6x6 – samičí strom – 55 rokov; 70 – 22,4 – 12 – 8 x 10 – samičí strom – 55 rokov; 18 – 6,0 – 7 – 3 x 3 – samičí strom – 55 rokov; Palárikovo – 62 – 19,7 – 10 – 6 x 7 – samičí strom – 31 rokov; 60 – 19,2 – 12 – 7 x 5 – samičí strom – 31 rokov; Komjatice – 327 – 104,2 – 25 – 22 x 22 – samičí strom – 165 rokov; Trávnica – 239 – 76,2 – 22 – 10 x 8 – samičí strom – 121 rokov; Hajná Nová Ves – 478 – 152,4 – 22 – 30 x 30 – samčí strom – vek 242 rokov – najstarší strom na Slovensku; Topoľčany – 110 – 35,0 – 17 – 6 x 6 – samičí strom – 56 rokov; Tovarníky – 157 – 50,0 – 18 – 3 x 4 – samičí strom – 79 rokov.

Pri zisťovaní pohlavia stromov, sme zaznamenali reálne plodenie (celkove 22 samičích stromov) a predpokladanú klíčivosť semien sme zohľadňovali podľa prítomnosti samch stromov na lokalite (20 x). Okrem toho sme pohlavie stromov determinovali na vzorkách listov aj pomocou DNA markérov.

Počas nášho výskumu sme zisťovali odlišnosti pri určovaní pohlavia stromov ginka dvojlaločného aj na základe morfologických znakov: samičí strom má štíhlejšiu korunu a hlavné bočné konáre v ostrom uhle odstávajúce od kmeňa; samičie semená majú tri rebrá (rýhy) na povrchu osemenia. Dostupná literatúra uvádza uvedenú habituálnu odlišnosť pre samčí strom a tri rebrá na osemení pre samčie pohlavie.

Záverom nášho výskumu komplexného výskumu ginka dvojlaločného (*Ginkgo biloba* L.) na Slovensku (RAŽNÁ, HRUBÍK a kol., 2014), môžeme konštatovať, že Nitriansky kraj poskytuje vhodný fytogenofond plodiacich stromov ginka dvojlaločného (22 stromov každoročne plodiacich), s predpokladanou vysokou klíčivosťou semien na lokalitách Topoľčianky, Nitra, Beladice, Arborétum Mlyňany SAV Vieska nad Žitavou, Hokovce, Palárikovo (6 lokalít), predpokladanú nízku klíčivosť, resp. sterilné semená môžeme očakávať na lokalitách, kde rastie len samičí strom osamotene (v blízkom okolí nerastie samčí strom): Komárno, Trávnica, Hajná Nová Ves, Topoľčany, Tovarníky, Komjatice, Nová Ves nad Žitavou (7 lokalít). Intenzita klíčivosti semien ginka dvojlaločného nebola experimentálne zisťovaná!

LITERATÚRA

PAGAN, J., RANDUŠKA, D.: Atlas drevín 2. OBZOR, Bratislava, 1988, 405 s.

RAŽNÁ, K., HRUBÍK, P. a kol.: Kultúrne rozšírenie ginka dvojlaločného (*Ginkgo biloba* L.) na Slovensku a hodnotenie jeho variability pomocou DNA markérov. Nitra, 2014, 95 s.

Adresa autorov

Ing. Erika Mňahončáková, PhD., Botanická Záhrada SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, E-mail: erika.mnahoncakova@gmail.com

prof. Ing. Pavel Hrubík, DrSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva, emeritný profesor, Dunajská 16, 949 11 Nitra, E-mail: ginkgo.ph@gmail.com.

FOMES FOMENTARIUS ON WOODY PLANTS IN NORWAY

FOMES FOMENTARIUS NA DŘEVINÁCH V NORSKU

KATEŘINA NÁPLAVOVÁ – JÁN GÁPER

NÁPLAVOVÁ, K. – GÁPER, J. 2016. *Fomes fomentarius* on woody plants in Norway. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 182-187. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
The wood-decaying polypore *Fomes fomentarius* (Polyporaceae, Basidiomycota) is distributed throughout the wide range of its hosts in the northern hemisphere. In total, 162 records of this polypore were found in Natural History Museum in Oslo. The greatest number of the fungal records came from birch (108 *Betula* spp.), then alder (13 *Alnus* spp.), poplar (4 *Populus* spp.), beech (3 *Fagus* spp.), oak (2 *Quercus* spp.), hazel (2 *Corylus* spp.) and willow (2 *Salix* spp.). The minority of the records was with no substrate description.

Key words: *Fomes fomentarius*, polypores, trees, white rot

INTRODUCTION

The species *Fomes fomentarius* (L.) Fr. is fungal plant pathogen which almost always infects deciduous trees, rarely coniferous trees and it causes white rot. Some of the common names of this fungus are Hoof Fungus, Tinder Polypore or Tinder Conk and its fruting body has been used for the treatment of various diseases for many centuries in China (CHEN et al. 2008). It is a taxon accepted in the genus *Fomes* in the Polyporaceae family of Polyporales order in subclass Incertae sedis, class Agaricomycetes, subphylum Agaricomycotina and phylum Basidiomycota. It was first described by LINNAEUS (1753) in his *Species Plantarum* as *Boletus fomentarius*. Occurrence of this common fungus was observed in North America, North Africa, Asia and all over Europe (JÚDOVÁ et al. 2012).

MATERIAL AND METHODS

The study was compiled by examination of records gained from Natural History Museum at the University of Oslo.
Nomenclature and authorities are from Index Fungorum (CABI 2016) for fungi and THE PLANT LIST (2013) for woody plants.

RESULTS AND DISCUSSION

Alnus incana (L.) Moench
- Telemark, Hjartdal, Hjartdal: NE side of Bonsvatn, Bondal, lat./long.: 59.8116°'N, 8.62119°'E, Alt.: 770 m, 2004.04-05, leg. J.I.J., det. L.R. 2005 (O-FF-296002)
- Telemark, Tinn, Atrå, lat./long.: 59.9407°'N, 8.73156°'E, 1969.09-17, leg. et det. L.R. (O-FF-146902)
- Nord-Trøndelag, Høylandet, Bjørånes, lat./long.: 64.9131°'N, 12.3891°'E, 1968.09-28, leg. et det. J.S. (O-FF-10220)
- Akershus, Enebakk, Fjell - Rødsjø, 1942.06-20, leg. et det. I.J. (O-FF-146850)
- Oslo, Oslo, Skansebakken in Sørkedalen, lat./long.: 60.0152°'N, 10.6108°'E, 1965.11-20, leg. L.R., det. T.N. 1972 (O-FF-146873)
- Oppland, Gran, Hvalaby, 1933.04-15, leg. et det. I.J. (O-FF-146886)
- Nordland, Saltdal, Bleiknesmo, 1968.08-19, leg. et det. L.R. (O-FF-146957)
- Troms, Målselv, Øverbygd, 1926.08-03, leg. et det. I.J. (O-FF-146967)

- Troms, Nordreisa, Sappen, 1968.08-14, leg. et det. L.R. (O-FF-146969)

Alnus glutinosa (L.) Gaertn.
- Rogaland, Bjerkreim, Bjordal, 1977.07-25, leg. et det. L.R. (O-FF-146911)
- Rogaland, Bjerkreim, Dyrskog, 1978.07-29, leg. et det. L.R. 17166 (O-FF-146915)

Alnus sp.
- Møre og Romsdal, Volda, Volda church, 1967.07, leg. T. Kavli, det. L.R. (O-FF-146938)
- Nord-Trøndelag, Nærøy, Sandvann, next to mountain cabin, lat./long.: 64.8652°'N, 12.2248°'E, on the tree trunk 3 m high, 1971.09-25, leg. et det. J.S. (O-FF-11368)

Betula pubescens Ehrh.
- Oppland, Sør-Aurdal, N-side of Aurdalsfjord in Vassfaret, 1969.07-11, leg. et det. A.B. (O-FF-146889)
- Finnmark, Sør-Varanger, Øvre Pasvik, N-end of Ødevann, lat./long.: 69.0748°'N, 28.9949°'E, 1965.07-04, leg. et det. L.R. (O-FF-146971)

Betula pendula Roth.
- Møre og Romsdal, Norddal, Lingås, 1952.07-02, leg. et det. T. R. - Anon. (O-FF-146940)

Betula sp.
- Aust-Agder, Tvedestrand, Songe, 1977.05-20, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146906)
- Telemark, Drangedal, Skultrevannsåsen, lat./long.: 59.0774°'N, 9.2625°'E, 1977.08-30, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146903)
- Vestfold, Kloppeåsen, 1968.11-23, leg. et det. T.G. (O-FF-146899)
- Vestfold, ca. 400 m S of S. Torp next to the road, 1945, leg. J.S., det. L.R. 1967 (O-FF-146896)
- Vestfold, 300 m NE of Hundsal farm, 1950.07-28, leg. et det. J.S. (O-FF-146897)
- Vestfold, 300 m NE of Hundsal farm, 1950.07-28, leg. J.S., det. L.R. 1968 (O-FF-146895)
- Buskerud, Flesberg, lat./long.: 59.9483°'N, 9.4806°'E, 1998.03-21, leg. et det. E.W.H. (O-FF-170104)
- Buskerud, Sigdal, Klampeli, 1929.08, leg. et det. L.L. (O-FF-146893)
- Rogaland, Sandnes, Høle, dead tree, 1966.08-22, leg. et det. M.J. (O-FF-146910)
- Rogaland, Suldal, Suldal municipality, lat./long.: 59.5650°'N, 6.63730°'E, Alt.: 310 m, 1996.09-17, leg. J.I.J., det. A.M. 2004 (O-FF-66113)
- Rogaland, Sokndal, 1967.06-20, leg. et det. L.R. (O-FF-146914)
- Rogaland, Rennesøy, Førsvoll, 2001.10-07, leg. et det. J.I.J. (O-FF-294625)
- Rogaland, Hjelmeland, Førre in Jøsenfj., 1967.06-29, leg. et det. L.R. (O-FF-146916)
- Rogaland, Sokndal, North end of Eiavannet lake, 1966.06-28, leg. et det. L.R. (O-FF-146917)
- Hordaland, Odda, Espeland, 1973.07-20, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146922)
- Hordaland, Voss, close to Mølster, 1948.03-29, leg. J.S., det. L.R. 1967 (O-FF-146918)
- Hordaland, Granvin, in the woods between Kollanes stop and Nedstås farm, 1948.10-07, leg. J.S., det. L.R. 1967 (O-FF-146919)
- Hordaland, Voss, Tvildemobakken, 1948.05-01, leg. J.S., det. L.R. 1967 (O-FF-146920)
- Hordaland, Ullensvang, Kvandal, 1951.07-01, leg. J.S., det. L.R. 1968 (O-FF-146925)
- Hordaland, Voss, Vinje, 1950.05-26, leg. et det. J.S. (O-FF-146924)
- Hordaland, Ullensvang, Utnedalen, 1952.07-16, leg. et det. Anon. (O-FF-146932)
- Hordaland, Ullensvang, East from Bråvoll, 1950.06-13, leg. J.S., det. L.R. 1967 (O-FF-146933)
- Hordaland, Voss, Ringheims hill, 1949.04-13, leg. J.S., det. S.L. 1949 (O-FF-146934)
- Hordaland, Granvin, on the hillside approximately 200 m NW of Eide st., 1948.05-02, leg. et det. J.S. (O-FF-146926)
- Hordaland, Granvin, Folkedal, rotting branch of tree, 1950.04-04, leg. et det. J.S. (O-FF-146927)
- Hordaland, Ullensvang, Djupevik, 1972.05-21, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146928)
- Hordaland, Ullensvang, Skjelvik, 1974.05-24, leg. A. Wessenlund, det. A.-E.T. 1974 (O-FF-146929)
- Sogn og Fjordane, Vik, Stokkebø, 1932.07-04, leg. et det. I.J. (O-FF-146936)

- Sogn og Fjordane, Vik, Stokkebø, 1932.07-04, leg. et det. I.J. (O-FF-146935)
- Sogn og Fjordane, Sogndal, Ca. 500 m from Sogndal church, lat./long.: 61.2339°'N, 7.09071°'E, 1973.05-25, leg. et det. J.S. (O-FF-11936)
- Møre og Romsdal, Tingvoll, Straumsnes, 1932, leg. et det. A.T. (O-FF-146939)
- Møre og Romsdal, Sunndal, Øksendal, 3 km S from church, 1974.08-02, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146941)
- Sør-Trøndelag, Midtre Gauldal, 2 km N from Gullvåg, 1974.08-06, leg. Et det. A.-E.T. (O-FF-146944)
- Nord-Trøndelag, Namsskogan, Namsskogan, 1928, leg. J.G.J., det. I.J. (O-FF-146945)
- Sør-Trøndelag, Midtre Gauldal, Støren, 1932.08-05, leg. et det. I.J. (O-FF-146943)
- Nord-Trøndelag, Namsskogan, Steinåmoen v/ elva, 1971.08-01, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146947)
- Nord-Trøndelag, Høylandet, Høylandet, 1923.09, leg. et det. J.G.J. (O-FF-146946)
- Nord-Trøndelag, Steinkjer, Steinkjer, lat./long.: 64.0170°'N, 11.5063°'E, 1971.04-19, leg. et det. J.S. (O-FF-11057)
- Nord-Trøndelag, Overhalla, small valley south from Storhaugen, lat./long.: 64.4884°'N, 11.7576°'E, 1967.06-09, leg. K.-D.V., det. J.S. (O-FF-5598)
- Nord-Trøndelag, Overhalla, Skagegårdene, 1968.04-13, leg. Ø.M., det. L.R. (O-FF-146948)
- Nord-Trøndelag, Overhalla, Skagegårdene, 1968.04-13, leg. Ø.M., det. L.R. (O-FF-146949)
- Østfold, Halden, Sponvika, lat./long.: 59.0949°'N, 11.23°'E, 1971.08, leg. et det. I.Ch. (O-FF-146842)
- Østfold, Råde, Tomb gård, lat./long.: 59.3196°'N, 10.815°'E, 1974.07-01, leg. et det. L.R. (O-FF-146841)
- Østfold, Halden, Festningen, lat./long.: 59.1183°'N, 11.401°'E, 1960.06-17, leg. et det. J.S. 11456 (O-FF-146843)
- Akershus, Bærum, Ø. Bærum, Østernvannet, lat./long.: 59.968°'N, 10.5816°'E, 1928.10-25, leg. et det. I.J. (O-FF-146846)
- Akershus, Asker, Nesøen, lat./long.: 59.8666°'N, 10.5303°'E, 1892.10-12, leg. et det. A.G.B. (O-FF-146844)
- Akershus, Ås, Aas, lat./long.: 59.6575°'N, 10.7747°'E, 1918, leg. et det. T.H.S. (O-FF-146845)
- Akershus, Bærum, Tjæregrashøgda, Sørkedalen, 1967.02-19, leg. A.B., det. L.R. (O-FF-146847)
- Akershus, Bærum, Haga, lat./long.: 59.9429°'N, 10.5769°'E, 1954.10-11, leg. et det. Ar.B. (O-FF-146848)
- Akershus, Bærum, Haslum, lat./long.: 59.9192°'N, 10.5641°'E, 1933.05-28, leg. A.H., det. I.J. (O-FF-146849)
- Akershus, Ås, Nygård, Nordby, lat./long.: 59.7193°'N, 10.785°'E, 1947.04-20, leg. J.S., det. L.R. 1967 (O-FF-146851)
- Akershus, Bærum, Haga, lat./long.: 59.9429°'N, 10.5769°'E, 1953.09-17, leg. et det. Ar.B. (O-FF-146852)
- Akershus, Frogn, Håøya, lat./long.: 59.6774°'N, 10.5875°'E, 1933.04-02, leg. P.S., det. I.J. (O-FF-146856)
- Akershus, Ås, Landbrukshøyskolen, in the woods N of Ås station, lat./long.: 59.6656°'N, 10.7662°'E, 1947.06-25, leg. et det. J.S. (O-FF-146859)
- Akershus, Enebakk, Mjærsjøen, lat./long.: 59.709°'N, 11.0556°'E, 1972.06-18, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146861)
- Akershus, Bærum, Haga, lat./long.: 59.9429°'N, 10.5769°'E, 1953.07-25, leg. et det. Ar.B. (O-FF-146858)
- Oslo, Oslo, Østmarka, 1930.06, leg. et det. I.J. (O-FF-146866)
- Oslo, Oslo, Berg, lat./long.: 59.9488°'N, 10.7455°'E, 1954.09-28, leg. et det. Ar.B. (O-FF-146863)
- Oslo, Oslo, Hammeren, Maridalen, 1954.09-19, leg. et det. Ar.B. (O-FF-146864)
- Oslo, Oslo, Østmarka, 1930.06, leg. et det. I.J. (O-FF-146867)
- Oslo, Oslo, Østmarka, 1930.06, leg. et det. I.J. (O-FF-146868)
- Oslo, Oslo, Maridalen, lat./long.: 59.9978°'N, 10.7785°'E, 1956.08-18, leg. et det. Ar.B. (O-FF-146872)
- Oslo, Oslo, Maridalen, 1955.10-11, leg. et det. Ar.B. (O-FF-146869)

- Oslo, Oslo, Berg, lat./long.: 59.9488°'N, 10.7455°'E, 1952.08-27, leg. et det. Ar.B. (O-FF-146870)
- Oslo, Oslo, Berg, lat./long.: 59.9488°'N, 10.7455°'E, 1953.09-29, leg. et det. Ar.B. (O-FF-146871)
- Hedmark, Grue, Grinder, 1929.11-01, leg. et det. I.J. (O-FF-146879)
- Hedmark, Grue, Grinder, 1929.11-02, leg. et det. I.J. (O-FF-146877)
- Hedmark, Hamar, Hamar, 1954, leg. et det. N.A.S. (O-FF-146880)
- Hedmark, Tolga, Klettsetra, lat./long.: 62.2370°'N, 11.0879°'E, Alt.: 900 m, 1975.07-27, leg. et det. J.S. (O-FF-13273)
- Hedmark, Løten, Sjøliskogen, 1964.06-02, leg. et det. F.-E.E. (O-FF-146881)
- Hedmark, Engerdal, Gutulia, 1933.08-25, leg. et det. I.J. (O-FF-146883)
- Hedmark, Hamar, Gitvola, apppr. 3 km west of Glomma River, 1985.09-24, L.R. (O-FF-146884)
- Oppland, Ringebu, Hirkjølen, 1930.10, leg. J.G.J., det. I.J. (O-FF-146885)
- Oppland, Ringebu, Gunstad gård., lat./long.: 61.545°'N, 10.0526°'E, 1980.04-30, leg. et det. J.S. 20498 (O-FF-4133)
- Oppland, Øyer, Rusta farm, lat./long.: 61.2578°'N, 10.4259°'E, 1980.05-02, leg. et det. J.S. (O-FF-4151)
- Oppland, Lunner, cottage north of Roa, lat./long.: 60.2948°'N, 10.6190°'E, 1975.04-24, leg. et det. J.S. (O-FF-13091)
- Oppland, Gran, Haug farm, S from Jaren station, lat./long.: 60.3852°'N, 10.5690°'E, 1975.05-04, leg. et det. J.S. (O-FF-13137)
- Oppland, Sør-Aurdal, 1940.09-30, leg. et det. A.H. (O-FF-146887)
- Buskerud, Hol, Geilo, 1971.07-12, leg. et det. K.K. (O-FF-146890)
- Buskerud, Hole, Vik, lat./long.: 60.0785°'N, 10.2759°'E, 1967.10-02, leg. G.G., det. I.E. (O-FF-146891)
- Buskerud, Ringerike, V. Ådal, Elsrud, 1971.07-22, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146892)
- Nordland, Rana, Hammernes, 1976.09-08, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146951)
- Nordland, Rana, Dunderlandsdalen 3 km east from Bjøllånes, 1971.08-03, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146955)
- Nordland, Bodø, Soløyvannet, 1968.04, leg. et det. H.A. (O-FF-146956)
- Nordland, Saltdal, Junkerdalen, lat./long.: 66.8215°'N, 15.4565°'E, 1971.08-10, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146958)
- Nordland, Steigen, Skranstad, lat./long.: 67.9293°'N, 15.4543°'E, 2006.07-21, leg. et det. O.S.F. (O-FF-281637)
- Nordland, Grane, Holmvassdalen, 1932.08-03, leg. et det . I.J. (O-FF-146959)
- Nordland, Grane, Holmvassdalen, 1932.08-03, leg. et det. I.J. (O-FF-146960)
- Nordland, Rana, Bjellåneset, 1926.07-21, leg. et det. I.J. (O-FF-146961)
- Nordland, Fauske, Straumen road cross, 1971.08-03, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146962)
- Nordland, Fauske, Grønås, Fauske centre, 1971.08-10, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146963)
- Troms, Bardu, Moskusfarmen, 1971.08-05, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146964)
- Troms, Tromsø, Sørbotn in Mellomdalen, 1991.08-07, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146966)
- Nordland, Evenes, Evenesmarka, 1971.08-08, leg. et det. A.-E.T. (O-FF-146965)
- Troms, Bardu, Bardu, [undated], leg. et det. P.M. (O-FF-146968)
- Troms, Harstad, Grunnvannet, lat./long.: 68.8309°'N, 16.4058°'E, 1954.08-19, leg. J.S., det. L.R. 1967 (O-FF-146970)
- Troms, Tranøy, Tranøybotten, 1982.06-17, leg. et det. L.R. (O-FF-103061)
- Finnmark, Sør-Varanger, Øvre Pasvik: Jordanfoss, 1929.07-09, leg. et det. I.J. (O-FF-146973)
- Finnmark, Porsanger, Stabbursdalens, lat./long.: 70.1874°'N, 24.7923°'E, 1967.09-02, leg. et det. L.R. (O-FF-146974)
- Finnmark, Sør-Varanger, Øvre Pasvik, Mensvika, 1929.07-11, leg. et det. I.J. (O-FF-146972)
- Finnmark, Alta, Mattisdalen, lat./long.: 69.8849°'N, 22.9933°'E, 1967.08-27, leg. et det. L.R. (O-FF-146977)
- Finnmark, Alta, Storvannet in Talvik, lat./long.: 70.0112°'N, 22.9267°'E, 1967.09-01, L.R. (O-FF-146978)

- Finnmark, Alta, close to the river, lat./long.: 69.7950°'N, 23.6857°'E, 1967.09-04, leg. et det. L.R. (O-FF-146975)
- Finnmark, Sør-Varanger, close to Jordanfoss, 1929.07-09, leg. I.J., det. T.N. 1972 (O-FF-146976)
Corylus sp.
- Møre og Romsdal, Aure, Ertvågen, lat./long.: 63.2161°'N, 8.5435°'E, Alt.: 30 m, 2002.02-10, leg. F.O., det. E.H. (O-FF-189135)
- Møre og Romsdal, Skodje, W of Rognevika, Skodje, lat./long.: 62.4481°'N, 6.5726°'E, Alt.: 20 m, 1999.05-19, leg. D.H., det. A.M. 2004 (O-FF-66916)

Fagus sylvatica L.
- Rogaland, Vindafjord, Hogganvik, Vindafjord, lat./long.: 59.4778°'N, 5.92376°'E, on the basis of old tree, 2002.04-20, leg. J.I.J., det. L.R. (O-FF-66107)

Fagus grandifolia Ehrh.
- Vest-Agder, Søgne, close to Tjomsevannet lake, lat./long.: 58.102°'N, 7.8471°'E, Alt.: 20 m, standing tree., 1997.03-28, leg. A.S., det. M.N. 1998 (O-FF-90108)

Fagus sp.
- Vestfold, Tønsberg, Gullkornen park, Jarlsberg manor, lat./long.: 59.2864°'N, 10.3779°'E, 1935.03-13, leg. O.H., det. I.J. (O-FF-146898)
Populus tremula L.

- Buskerud, Ål, Tuftelia nature reserve in Torpo, lat./long.: 60.6771°'N, 8.7447°'E, 1999.06-29, leg. et det. E.W.H. (O-FF-63194)
- Østfold, Rakkestad, Stemme, lat./long.: 59.4221°'N, 11.3174°'E, 1945.07-22, leg. Kr.A., det. I.J. (O-FF-82399)
- Østfold, Rakkestad, Stemme, lat./long.: 59.4221°'N, 11.3174°'E, 1945.07-22, leg. et det. Kr.A. (O-FF-82377)

Populus sp.
-Telemark, Bamble, Fosstveit, 1975.09-10, leg. et det. A.He. (O-FF-146901)

Quercus sp.
- Aust-Agder, Grimstad, 1971.08-22, leg. et det. L.R. (O-FF-146905)
- Rogaland, Eigersund, close to Tengs river, 1967.06-21, leg. et det. L.R. (O-FF-146912)

Salix sp.
- Nord-Trøndelag, Steinkjer, Steinkjer, 1971.08-12, leg. A.-E.T., det. L.R. (O-FF-146950)
- Hordaland, Voss, 1948.12-19, leg. J.S., det. L.R. 1967 (O-FF-146921)

O – abbreviation of Natural History Museum in Oslo
Name abbreviations: I.J. - Ivar Jørstad, T.N. - Tuomo Niemelä, L.R. - Leif Ryvarden, P.M. - Per Moe, A.-E.T. - Anna-Elise Torkelsen, O.S.F. - Ove S. Førland, H.A. - Harald Andersen, K.B. - K. Bjørgum, G.G. - Gro Gulden, I.E. - Inger Egeland, K.K. - Kjell Kvavik, A.B. - Anders Bjørnstad, J.S. - Jens Stordal, A.H. - Asbjørn Hagen, O.S. - O. Skybak, F.-E.E. - Finn-Egil Eckblad, N.A.S. - N. A. Sørensen, H.K.H. - H. K. Holm, A.G.T. - A. G. Traaen, P.S. - Per Størmer, T.H.S. - T. H. Schøyen, A.G.B. - Axel Gudbrand Blytt, Kr.A. - Kr. Andreassen, Ar.B. - Arne Bratsberg, I.Ch. - Irene Christensen, Ø .M. - Ø. Michelsen, J.G.J. - J. G. Juul, K.-D.V. - K.-D. Vorren, D.H. - Dag Holtan, A.M. - Anne Molia, F.O. - Finn Oldervik, E.H. - Even Høgholen, A.T. - Arne Tolland, O.B. - Olav Befring, S.L. Seth Lundell, J.I.J. - John Inge Johnsen, R.H. - Ragnar Haglund, A.He. - Aase Hermansen, T.G. - Tore Gjelsås, O.H. - O. Hansen, E.W.H. - Even W. Hanssen, L.L. - L. Larsson, M.N. - Maria Nunez, H.B. - H. Bøe, A.S. - Asbjørn Solås, M.J. - Magnus Jørgensen

In total, 162 records of *Fomes fomentarius* were studied. The greatest number of the fungal records came from birch (1 *Betula pendula*, 2 *Betula pubescens*, 105 *Betula* spp.), then alder (9 *Alnus incana*, 2 *Alnus glutinosa*, 2 *Alnus* spp.), poplar (3 *Populus tremula*, 1 *Populus* spp.), beech (1 *Fagus sylvatica*,

1 *Fagus grandifolia*, 1 *Fagus* sp.), oak (2 *Quercus* spp.), hazel (2 *Corylus* spp.) and willow (2 *Salix* spp). The minority (17 %) of the records was with no substrate description.

CONCLUSION

In this study, records from Natural History Museum in Oslo were examined. *Fomes fomentarius* (Polyporaceae, Basidiomycota) is widely distributed across whole Norway, Europe. In total, 162 records of this polypore were studied on 10 woody plant taxa.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by grants from the Grant Agencies of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic (VEGA No. 1/0622/16 and KEGA No. 033UMB-4/2016), EEA and Norway grants (EHP-CZ07-INS-4-2732015) and the Faculty of Sciences of the University of Ostrava, Czech Republic (SGS No. 16/PřF/2016).

REFERENCES

CABI, 2016. PlantWise Knowledge Bank. Available at www.plantwise.org/KnowledgeBank (accessed 25.06.2016).

CHEN, V., ZHAO, Z., CHEN, S.F., LI, Y.Q. 2008. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect *in vitro*. In: Biores. Technol. Vol. 99, 2008, pp. 3187-3194.

JÚDOVÁ, J., DUBÍKOVÁ, K., GÁPEROVÁ, S., GÁPER, J., PRISTAŠ, P. 2012. The occurrence and rapid discrimination of *Fomes fomentarius* genotypes by ITS-RFLP analysis. In: Fungal Biology UK vol. 116, 2012, pp. 155–160.

LINNAEUS, C. 1758. *Species plantarum.* Stockholm: Impensis Laurentii Salvii. p. 1176

THE PLANT LIST. 2013. Version 1.1 (September 2013). Available at http://www.theplantlist.org. (accessed 22.06.2016).

Author´s Addresses

Mgr. Kateřina Náplavová
University of Ostrava, Faculty of Sciences, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, Czech Republic, e-mail: naplavova.katerina@gmail.com
CEB-Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal
Prof. RNDr. Ján Gáper, CSc.
Technical University in Zvolen, Faculty of Ecology and Environmental Sciences, T. G. Masaryka 24, 960 63 Zvolen, Slovak Republic, e-mail: jan.gaper@tuzvo.sk
University of Ostrava, Faculty of Sciences, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, Czech Republic, e-mail: jan.gaper@osu.cz

VPLYV JEDNOSMERNÉHO ELEKTRICKÉHO PRÚDU NA RAST HYPOVIRULENTNEJ FORMY HUBY *CRYPHONECTRIA PARASITICA*

INFLUENCE OF DIRECT CURRENT ON GROWT OF HYPOVIRULENT STRAIN OF CHESTNUT BLIGHT FUNGUS - *CRYPHONECTRIA PARASITICA*

RADOVAN OSTROVSKÝ – MAREK KOBZA

OSTROVSKÝ, R. – KOBZA, M. 2016. Vplyv jednosmerného elektrického prúdu na rast hypovirulentnej formy huby *Cryphonectria parasitica*. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 188-193. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
The effect of direct current on growth of hypovirulent strain of *Cryphonectria parasitica* and its potential use in biological control was studied. Decrease of fungal growth was observed due to three interval variants of low-voltage direct current application. We determined slowest hyphal growth in 12/12 hours interval. Effect of increased sporulation should be further studied for its potential use in vertical spreading of *C. parasitica* hypovirulent strains in chestnut orchards.

Key words: *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence, electrostimulation

ÚVOD

Huba *Cryphonectria parasitica* spôsobuje pokračujúcu devastáciu výsadieb gaštana jedlého na celom území Slovenska. Prvý krát bola identifikovaná v roku 1976 na lokalite Prašice - Duchonka. V súčasnosti jedinou efektívnou ochranou proti ďalšiemu šíreniu patogénu je biologická ochrana, založená na inokulácii hypovirulentnej formy huby *Cryphonectria parasitica* do očkovacích otvorov po obvode aktívnej rakovinovej rany. V prípade kompatibility dochádza k prenosu hypovírusu z hypovirulentného do virulentného kmeňa. Táto forma je charakteristická zníženou virulenciou, rovnako zníženou tvorbou spór, čo je zapríčinené infekciou vírusom dsRNA (MOFFIT, LISTER 1975). Hypovírus, (ktorý patrí do čeľade Hypoviridae, HILLMAN ET AL. 1995) prirodzene sa vyskytujúci v Európe bol popísaný ako hypovírus 1 (CHV1) a pozostáva z troch samostatných dsRNA segmentov (HOGAN 2006).

Šírenie hypovirulentnej formy v porastoch gaštana jedlého môže prebiehať vertikálne, prípadne horizontálne. Nanešťastie u hypovirulentných izolátov je tvorba konídií potláčaná. Nezistil sa vertikálny prenos do askospór, ani produkcia peritécií u hypovirulentných kmeňov (ANAGNOSTAKIS 1977, 1988). Horizontálne sa hypovírus prenáša anastomózou hýf. Predpokladá sa, že šíreniu CHV1 hypovírusu bráni aj nízka teplota pod -10°C, ktorá nepriaznivo ovplyvňuje prežívanie hypovírusu v infikovaných kmeňoch rakoviny (FRIESE ET AL. 1992). V súčasnosti najurgentnejšou výzvou z pohľadu biologickej ochrany je stanovenie faktorov, ktoré podporujú inváziu a udomácnenie hypovírusov v populácií huby *C. parasitica* (ADAMČÍKOVÁ ET AL. 2014).

Vláknité huby vytvárajú endogénne elektrické prúdy, ktoré sú asociované s polarizovaným rastom špičiek hýf. Množstvo rozličných húb reaguje galvanotropicky na exogénne elektrické polia (MCGILLIVRAY, GOW 1986). Galvanotropizmus je usmernený rast buniek vplyvom elektrických polí (GOW 1994). Huby rastú priamo v elektrickom poli, v rozsahu 2–5 $V.cm^{-1}$, pričom zoospóry oomycét sa pohybujú ku kladnému (anóda) alebo zápornému (katóda) pólu aj oveľa slabších elektrických polí (VAN WEST ET AL. 2002).

Cieľom našej práce bolo získať informácie u vplyve jednosmerného elektrického prúdu na rast hypovirulentnej formy huby *C. parasitica* v laboratórnych podmienkach s cieľom determinácie možností využitia hypovirulentnej formy v biologickej ochrane.

MATERIÁL A METÓDY

Štvorček mycélia hypovirulentnej formy huby *C. parasitica* (VC typ EU-12 CHV-1 subtyp I) s rozmermi 5x5 mm bol umiestnený do stredu Petriho misky priemeru 90 mm so sladinovým agarom. Ako elektródy boli použité pliešky z nehrdzavejúcej ocele rozmerov 5 x 10 mm, umiestnené na krajoch Petriho misky oproti sebe. Zdrojom jednosmerného prúdu v našich pokusoch bol sieťový adaptér 5 V; 0,4 A. Elektrický prúd spôsoboval vysušenie živného média v tesnej blízkosti elektród, preto boli ku štyrom pokusným miskám zapojeným do elektrického obvodu paralelne pridané dve misky do série. V týchto miskách bol použitý roztok NaCl s koncentráciou, ktorá zabezpečovala prechod prúdu v štyroch pokusných miskách s parametrami cca 1,3 V; 330 µA pre všetky hodnotené varianty napájania. V pokuse sme zvolili 3 varianty časového spínania napájania elektrickým prúdom. V I. variante „12/12hod“ boli pokusné misky napájané 12 hodín (nepretržite 12 hodín, následne 12 hodín bez napájania), v II. variante „6/18hod“ boli napájané 6 hodín (nepretržite 6 hodín, následne 18 hodín bez napájania) a v III. variante „15min/45min“ boli napájané 6 hodín denne s rozloženým intervalom napájania 15 minút s následným 45 minútovým odpojením. Na zabezpečenie intervalov napájania sme použili mechanické časové spínače. Ako kontrolu sme použili rovnakú kultúru hypovirulentnej formy huby *C. parasitica*, naočkovanú v rovnakom termíne ako pokusné varianty. Pokus sa realizoval 18 dní až do úplného prerastenia huby na kontrolných miskách bez napájania pri teplote 22°C a prirodzenom svetelnom režime v období 15. 5. 2015 až 2. 6. 2015. Hodnotené misky boli fotografované denne v rovnakom čase po 15 minútach zapojenia každého intervalu, následne bola vyhodnotená plocha a smer rastu huby v jednotlivých miskách (CARL ZEISS MICROIMAGING GMBH, AxioVs40 V 4.8.2.0). Každodenne boli zaznamenané parametre prúdu a napätia na jednotlivých miskách. Údaje boli spracované v tabuľkovom editore (MICROSOFT CORPORATION, Office Excel 2010), na štatistické vyhodnotenie výsledkov bola použitá metóda ANOVA (STATSOFT, Statistica 8). Výsledky boli čiastočne porovnané s obdobným pokusom, realizovaným na virulentnej forme huby (KOBZA, OSTROVSKÝ 2015).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z výsledkov merania plôch mycélia hypovirulentnej formy huby *C. parasitica* vyplýva, že napájanie jednosmerným prúdom spôsobuje preukázateľné zníženie denných prírastkov mycélia na všetkých troch hodnotených variantoch v porovnaní s kontrolou bez napájania (Obr. 1), čo sa potvrdilo aj pri obdobnom pokuse s virulentnou formou huby (KOBZA, OSTROVSKÝ 2015).

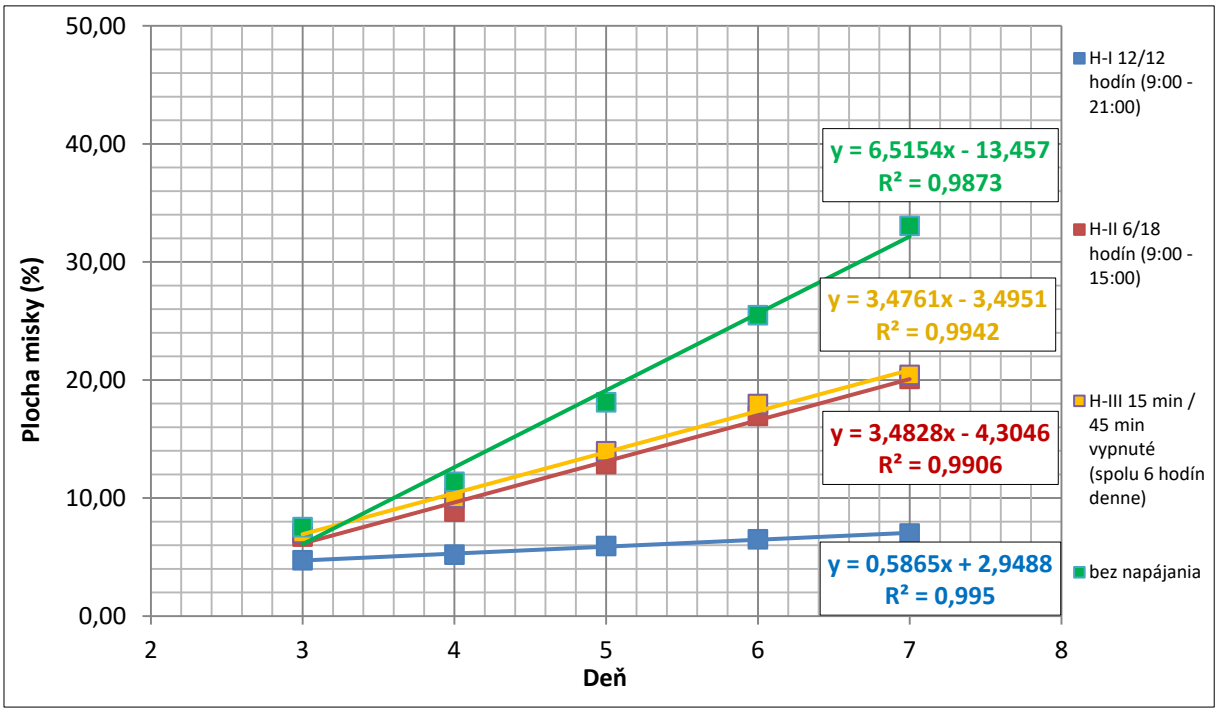
V experimente sme zaznamenali najvýraznejší vplyv na zníženie rýchlosti rastu mycélia huby *C. parasitica* pri I. variante „12/12hod“. V II. variante „6/18hod“ a III. variante „15min/45min“ napájania bol vplyv elektrického prúdu na rýchlosť rastu menší, bez významnejšieho rozdielu medzi variantmi (Tab. 1). Súhrnná doba napájania u oboch variantov bola rovnaká – 6 hodín denne, rozdiel v III. var. bol v rozložení napájania na viacero kratších intervalov. Rýchlosť rastu kontrolného variantu hypovirulentnej formy bez napájania bola v porovnaní s virulentnou formou huby podstatne nižšia (KOBZA, OSTROVSKÝ 2015), čím potvrdzujeme zistenia ANAGNOSTAKIS (1977, 1988).

Obdobne ako virulentná forma (KOBZA, OSTROVSKÝ 2015), hypovirulentná forma vykazovala jav prevažujúceho kolmého rastu mycélia na napájaných variantoch v porovnaní s priamym rastom (v smere ku elektródam, graf 2 a 3).

Prerastenie celej misky hypovirulentnej formy nastalo po 17-20 dňoch pokusu. Pri virulentnej forme sporulácia nastala už po 7 dňoch (KOBZA, OSTROVSKÝ 2015).

ZÁVER

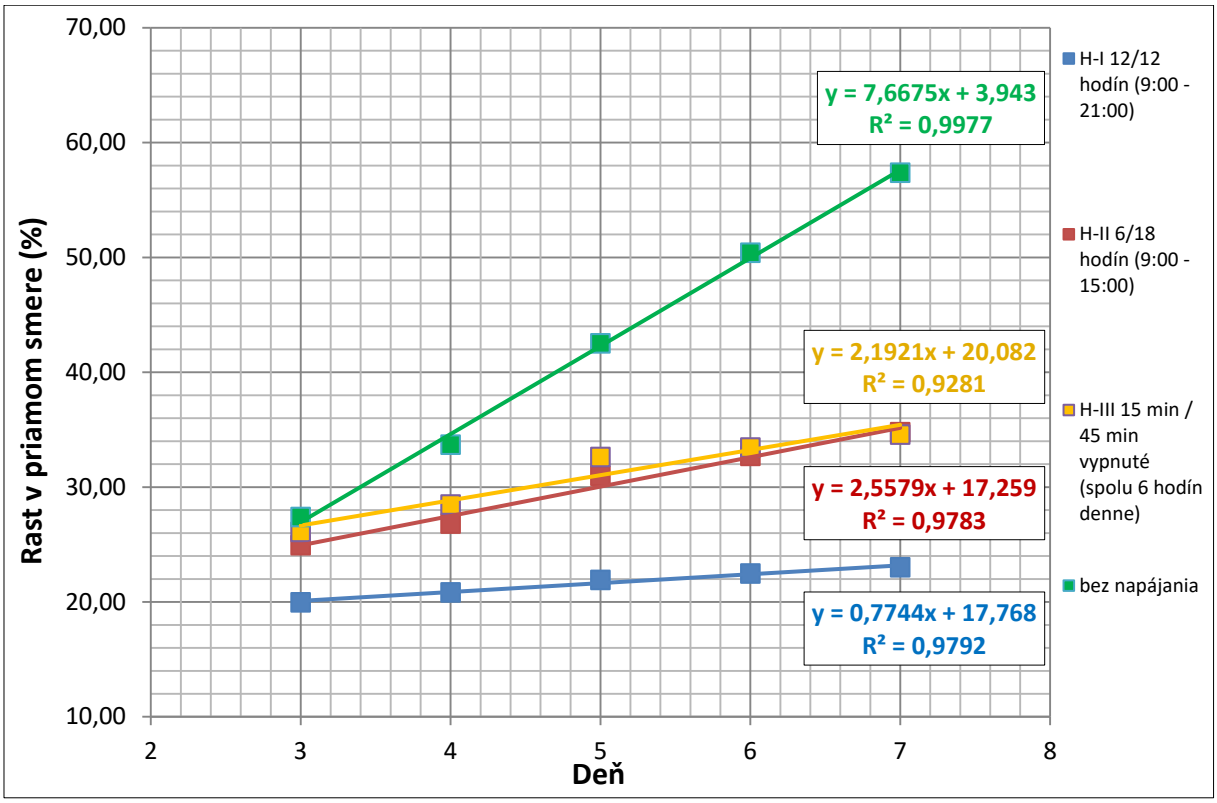
Pri porovnaní účinku jednosmerného elektrického prúdu na virulentnú a hypovirulentnú formu huby sme dospeli k záveru, že virulentná forma je najviac obmedzovaná v raste vplyvom vyššej frekvencie napájania prúdom, kým u hypovirulentnej formy je rozhodujúcim faktorom sumárna dĺžka pôsobenia elektrického prúdu. V priebehu experimentu bola zaznamenaná zvýšená sporulácia hypovirulentnej formy huby *C. parasitica*. Predpokladáme potenciálne využitie javu v biologickej ochrane gaštana jedlého, avšak v ďalšom štúdiu je potrebné zamerať pozornosť na vplyv elektrického prúdu na prenos dsRNA hypovírusu.



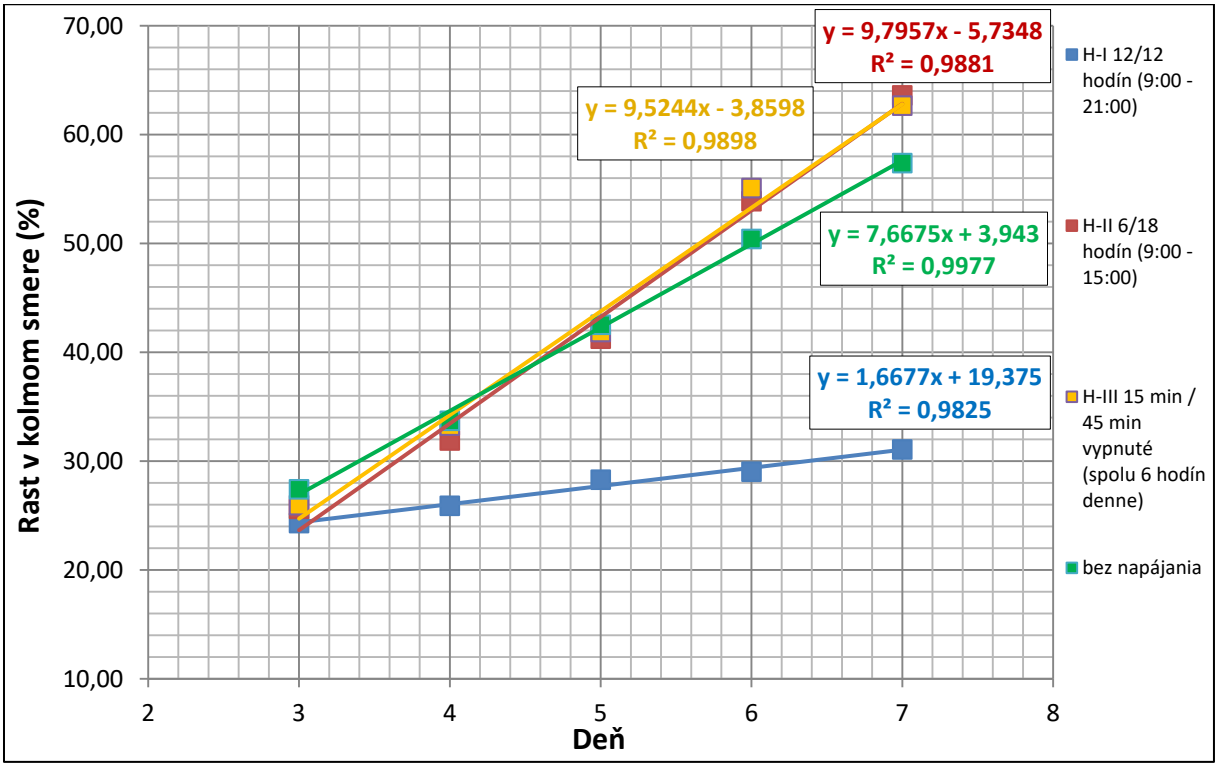
Obr. 1 Graf priebehu rastu mycélia hypovirulentnej formy huby *C. parasitica* na miskách troch sledovaných variantov s napájaním a kontroly bez napájania (trendová spojnica lineárnej regresnej závislosti).

Tab. 1 Zaradenie jednotlivých variantov napájania jednosmerným prúdom do homogénnych skupín, podľa parametra Plocha mycélia na miske (%), ANOVA, Duncanov test (STATSOFT 2007). **Zdroj:** Vlastné údaje; #údaje virulentných izolátov (KOBZA, OSTROVSKÝ 2015).

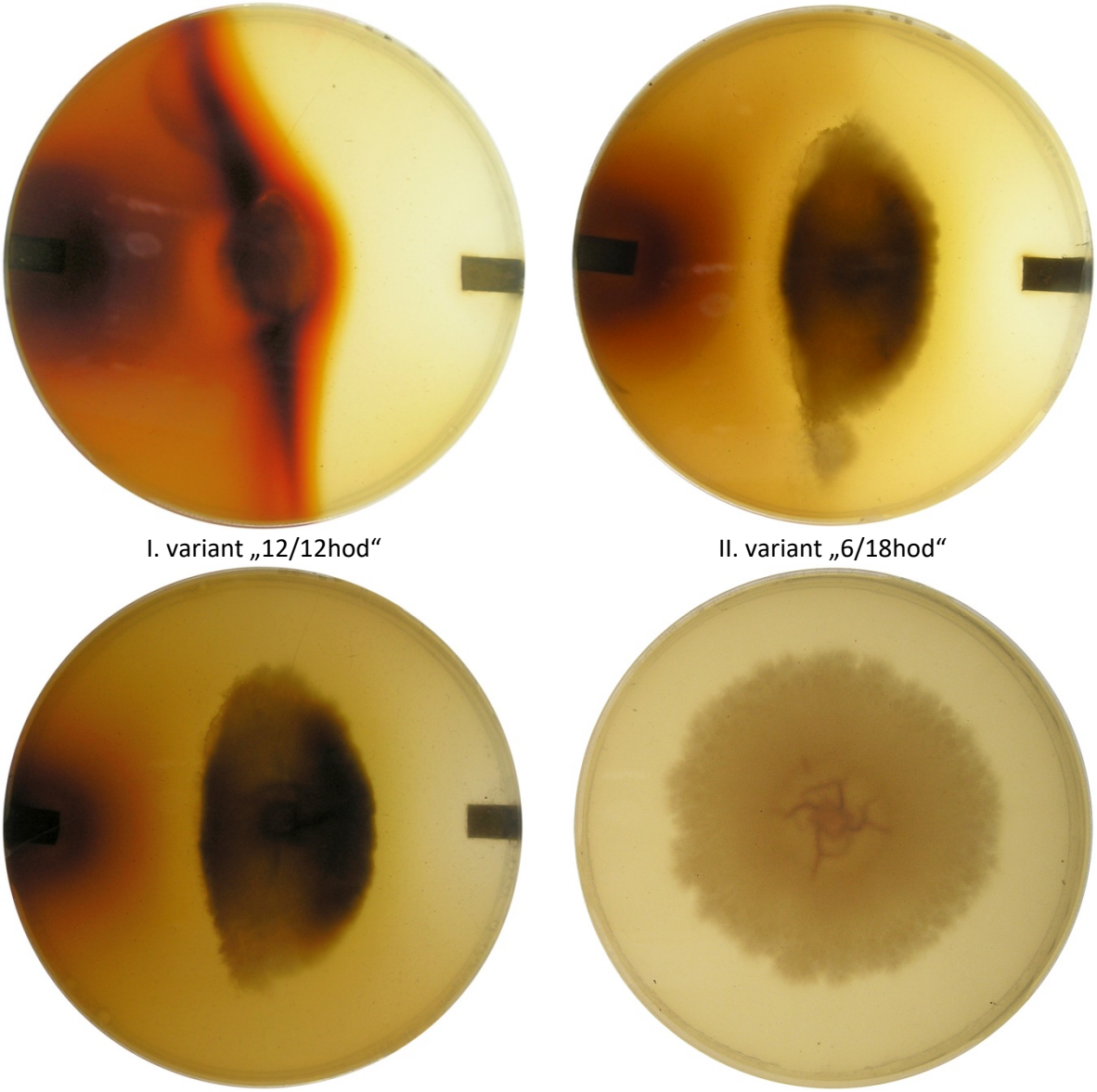
Cell No.	Duncan test; variable Plocha %, Homogenous Groups, alpha = 0,05 Error: Between MSE = 211,93, df = 152,00							
	VARIANT	Vir/Hyp	Plocha % (Mean)	1	2	3	4	5
3	1212HOD	H	5,8800	****				
5	0618HOD	H	13,1095	****	****			
7	1545MIN	H	13,8860	****	****			
1	BEZNAP	H	19,1945		****	****		
#8	1545MIN	V	24,8450			****	****	
#4	1212HOD	V	28,5550			****	****	
#6	0618HOD	V	30,1305				****	
#2	BEZNAP	V	53,9040					****



Obr. 2 Graf prírastku plochy mycélia hypovirulentnej formy huby *C. parasitica* v priamom smere k elektródam s krivkou priebehu lineárnej regresnej závislosti.



Obr. 3 Graf prírastku plochy mycélia hypovirulentnej formy huby *C. parasitica* v kolmom smere k elektródam s krivkou priebehu lineárnej regresnej závislosti.



I. variant „12/12hod“ II. variant „6/18hod“

III. variant „15min/45min“ Kontrola bez napájania

Obr. 4 Fotodokumentácia misiek jednotlivých variantov napájania jednosmerným prúdom v desiaty deň experimentu.

POĎAKOVANIE

Tento príspevok vznikol vďaka finančnej podpore projektu VEGA 2/0071/14 a VEGA 2/0143/15.

LITERATÚRA

ADAMČÍKOVÁ, K., BOLVANSKÝ, M., JUHÁSOVÁ, G., KÁDASI HORÁKOVÁ, M., KOBZA, M., ONDRUŠKOVÁ, E. 2014. Gaštan jedlý na Slovensku a v Európe. Pestovanie, ochrana, variabilita a využitie. Garmond Nitra, 156 p.

ANAGNOSTAKIS, S.L. 1977. Vegetative incompatibility in Endothia parasitica. *Exp*. *Mycol*., 1: 306-316.

ANAGNOSTAKIS, S.L. 1988. Hypovirulence in chestnut blight in Connecticut improves the condition of chestnut trees. *Frontiers Pl*. *Sci*., 41: 2- 3.

CARL ZEISS MICROIMAGING GMBH (2010) AxioVs40, v 4.8.2.0. http://www.zeiss.de

FRIESE, C. F., ALLEN, M.F., MARTIN, R. VAN ALFEN, N.K. 1992. Temperature and structural effects on transfer of double stranded RNA among isolates of the chestnut blight fungus (*Cryphonectria parasitica*). Applied and Environmental Microbiology 58: 2066-2070

GOW N.A.R. 1994. Growth and guidance of the hyphal apex. Microbiology 140: 3193–3205

HILLMAN, B.I.; FULBRIGHT, D. W.; NUSS, D.L.; VANALFEN, N.K. 1995. Hypoviridea. In: Rep. Int. Committee Taxon, Viruses, 6th edn. New York: Spriger-Verlag, pp. 261-264.

HOGAN, E. P. 2006. Population biology of Cryphonectria parasitica infected with Cryphonectria hypovirus 1 on American chestnut trees. Dissertation thesis. Blacksburg, Virginia, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.

KOBZA, M., OSTROVSKÝ, R. 2015. Vplyv jednosmerného elektrického prúdu na rast huby Cryphonectria parasitica - pôvodcu rakoviny kôry gaštana jedlého. In: Význam starostlivosti o dreviny vo verejnej zeleni : zborník príspevkov z konferencie s medzinárodnou účasťou, 28. - 29. 4 2015. Nitra : Ústav ekológie lesa SAV Zvolen, Pobočka biológie drevín Nitra. p. 102-117. ISBN 978-80-89408-19-1

MCGILLIVRAY, A. M., GOW N. A. R. 1986. Applied Electrical Fields Polarize the Growth of Mycelial Fungi. Journal of General Microbiology 25: 15-25.

MICROSOFT CORPORATION (2010) Office Professional Plus Excel 2010. www.microsoft.com

MOFFIT, E.M., LISTER, R.M. 1975. Application of a serological screening test for detecting double-stranded RNA mycoviruses. Phytopathology 65: 851-859.

STATSOFT, INC. (2007) STATISTICA (data analysis software system), version 8. http://www.statsoft.com

VAN WEST P, MORRIS BM, REID B, APPIAH AA, OSBORNE MC, CAMPBELL TA, SHEPHERD SJ, GOW N.A.R. 2002. Plant pathogens use electric fields to target plant roots. Mol Plant Microbe Interact 15:790–798

Adresa autorov

Ing. Radovan Ostrovský, PhD., Ústav ekológie lesa SAV, Pobočka Biológie drevín Nitra, Akademická 2, 949 01 Nitra, +421-37-7336-656, Email: Radovan.Ostrovsky@savzv.sk

Mgr. Marek Kobza, PhD., Ústav ekológie lesa SAV, Pobočka Biológie drevín Nitra, Akademická 2, 949 01 Nitra, +421-37-6943-335, Email: Marek.Kobza@sav.savzv.sk

MEDZIDRUHOVÉ ROZDIELY V RASTE KOREŇOV DREVÍN V PODMIENKACH SUCHA

INTERSPECIFIC DIFFERENCES IN ROOT GROWTH OF TREES UNDER IMPACT OF DROUGHT

VIERA PAGANOVÁ – ZUZANA JUREKOVÁ – HELENA LICHTNEROVÁ – JANA ČERNÁ

PAGANOVÁ, V. – JUREKOVÁ, Z. – LICHTNEROVÁ, H. – ČERNÁ, J. 2016. Medzidruhové rozdiely v raste koreňov drevín v podmienkach sucha. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 194-200. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Among the environmental stressors that limit environmental functions of trees, the first place takes lack of water. Some tree species are well adapted to frequent and prolonged periods of drought. They are able to grow and bear even high degree of dehydration. These properties have to be detected for particular species and taken into account within the recommendations for their planting in the urban environment. In this work we present the differences in volume, length, thickness and surface of the roots of two species of trees (*Pyrus pyraster* and *Sorbus domestica*), which were exposed to prolonged water stress in the juvenile growth stage. The analysis of measured parameters was processed by WinRhizo software application. The results document significant differences in the volume and diameter structure (ratio of diameter fractions) of root system of studied plants.

Key words: woody plants, tree roots, root growth, drought, water regime

ÚVOD

Rastliny sú v prírodnom prostredí neustále vystavené abiotickým a biotickým stresom, ktoré ovplyvňujú ich rast a fyziologické funkcie. Jedným zo stresorov, ktorý má viacnásobné účinky je sucho. Stromy sú vo všeobecnosti považované za organizmy, ktoré sú tolerantné k suchu, keďže vydržia aj extrémne dehydratácie protoplazmy, majú nízky obsah vody a nízky vodný potenciál (KOZLOWSKI, PALLARDY 1997). Adaptácie drevín k suchu a odozvy orgánov na faktor sucha sa často identifikujú na listoch a stonke, menej na koreňoch vzhľadom na obtiažnosť experimentálnej práce v pôdnom prostredí. Korene sú pritom orgánmi, ktoré zodpovedajú za príjem vody a živín, metabolickú aktivitu, majú podiel na ukladaní uhlíka a živín do pôdy najmä prostredníctvom svojich jemných štruktúr (BRENNER, GODBOLD 2007). Pôsobia ako senzory, ktoré vysielajú signály o suchu do nadzemných orgánov (HAMANISHI, CAMBELL 2011).

V našej práci sme sa zamerali na hodnotenie parametrov koreňa v juvenilnej fáze rastu pri dvoch druhoch, ktoré sú súčasťou autochtónnej flóry Slovenska – hrušky planej (*Pyrus pyraster (*L.) Burgsd.) a jarabiny oskorušovej (*Sorbus domestica* L.). Tieto dreviny sa u nás prirodzene vyskytujú aj na xerotermných typoch stanovíšť v podmienkach s negatívnou vodnou bilanciou a predpokladáme u nich dobrú adaptabilitu na sucho. Dlhodobo sa venujeme možnostiam ich použitia pre výsadby v urbanizovanom prostredí a krajine na stanovištiach s nedostatkom vody a obmedzeným priestorom pre rast koreňov.

MATERIÁL A METODIKA

Rastlinný materiál pre experimenty pochádza z pôvodných lokalít (Tab.1) záujmových drevín na Slovensku. Tieto lokality podmienkami prostredia reprezentujú obvyklé stanovištia hodnotených taxónov (*Pyrus pyraster* a *Sorbus domestica*). Početnosť populácie dospelých plodiacich jedincov na obidvoch lokalitách umožnila sústrediť biologicky kvalitnú vzorku reprodukčného materiálu.

Tab. 1 Klimageografická charakteristika lokalít záujmových druhov (LAPIN et al. 2002).

	Lokalita	Nadmorská výška (m)	Expozícia	TI. (ºC)	TVII (ºC)	úhrn zrážok (mm)	Typ	Subtyp
Pyrus pyraster	Tŕnie	540	J	-3	18	750	M	M6
Sorbus domestica	Kosihovce	250	1-JV	-2	19	600	T	T4

TI. – priemerná teploty v januári, TVII. – priemerná teplota v júli, T – teplá oblasť, T4 teplý, mierne suchý s miernou zimou, MT – mierne teplá oblasť M6- mierne teplý, vlhký, vrchovinový

Obr. 1 Semenáčik Sorbus domestica L. po otvorení koreňového boxu s výraznými štruktúrami koreňa v substráte.

Semená sa z plodov extrahovali hneď po zbere. Po vyčistení sa krátko skladovali a upravili v rámci predsejbovej prípravy studenou stratifikáciou pri teplotách -5˚C až +5˚C. Klíčili v nádobách s výsevným substrátom na báze rašeliny. Vo fenologickej rastovej fáze rozvinuté klíčne listy sa semenáčiky umiestnili do koreňových boxov so substrátom na báze viac rozloženého rašelinníka (20% tmavej rašeliny a 80% svetlej rašeliny, frakcia 0 – 5 mm pH – 5,5 - 6,5 obohateným o živiny 1,0 kg/m^{-3} NPK v pomere 14:16:18).

Kovové koreňové boxy sú špeciálne skonštruované tak, aby umožnili analýzu rastu koreňa a štruktúr koreňového systému semenáčikov. Majú výsuvnú prednú stenu, čo uľahčuje vyňatie rastlín pre účely ďalšej analýzy (Obr. 1).

Koreňové boxy so semenáčikmi sa umiestnili pod polyetylénový kryt so 60% tienením a rastliny boli udržiavané v diferencovanom vodnom režime s dvomi variantmi nasýtenia substrátu na 40% a 60% plnej vodnej kapacity. Variant „Stres“ bol zavlažovaný na 40% plnej vodnej kapacity a variant „Kontrola“ na 60% plnej vodnej kapacity. Model diferencovaného vodného režimu bol udržiavaný po dobu 175 dní (apríl až september 2014).

Na konci experimentálnej periódy sa rastliny vybrali z koreňových boxov. Koreňový systém semenáčikov sa zo substrátu extrahoval manuálne, prepieraním vo vodnom kúpeli s cieľom zachovať celistvé štruktúry koreňa. V obidvoch variantoch z rôznou úrovňou nasýtenia substrátu sa pri každom druhu analyzovalo po 10 rastlín.

Pri analytickom spracovaní rastlinného materiálu softvérom WinRhizo sa hodnotil vplyv odlišnej úrovne nasýtenia substrátu na vybrané parametre koreňa (dĺžku, povrch, objem, hrúbku) ako aj podiel rôznych frakcií koreňov podľa hrúbky v rámci koreňového systému jedinca. Systém WinRhizo REG 2009 (Regent Instruments, Kanada, SK0410192) na základe analýzy obrazu koreňového systému umožňuje hodnotenie jeho morfológie, topológie a architektúry. Analyzujú sa umyté korene zbavené substrátu. Údaje z hodnotenia príslušnej vzorky sú zobrazené graficky a pre ďalšie spracovanie aj v dátových súboroch.

Matematicko-štatistická analýza dát bola vykonaná Softvérom Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Technologies, USA, XVII (licenčné číslo:S7B0-D10A-57C0-P00S-20P1)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po vyňatí rastlín z koreňových boxov sa koreňový systém jednoročných semenáčikov analyzoval softvérom Win Rhizo, ktorý umožňuje priame snímanie dĺžky koreňov, hrúbky koreňov a prepočet povrchu a objemu koreňového systému analyzovanej rastliny.

Viacfaktorovou analýzou rozptylu sa vyhodnotila preukaznosť rozdielov v parametroch koreňa pri hruške planej (*Pyrus pyraste*r) a jarabine oskorušovej (*Sorbus domestica*), ako aj vo variantoch s odlišnou úrovňou nasýtenia substrátu (stres a kontrola) s cieľom identifikovať medzidruhové rozdiely v raste koreňov a získať informácie o vplyve sucha na podzemné orgány záujmových drevín. Parametre zisťované priamym meraním boli podrobené testu normality (Shapiro-Wilkov test na hladine významnosti α = 0,001) a testu homogenity odchýlok (Levenov test na hladine významnosti á = 0,05). Všetky hodnotené parametre majú normálne rozdelenie dát a spĺňajú predpoklad homogenity.

Výsledky analýzy rozptylu pre väčšinu snímaných parametrov koreňa umožnili zamietnuť hypotézu rovnosti priemerných hodnôt. Preukazné rozdiely medzi hruškou planou (*Pyrus pyraster*) a jarabinou oskorušovou (*Sorbus domestica*) sa identifikovali v dĺžke koreňa ANOVA(F(1,37)=15,43, p=0,0004), vo veľkosti povrchu koreňa ANOVA (F(1,37)=18,62, p=0,0001), v objeme koreňového systému ANOVA(F(1,37)=5,06, p=0,0305 a v hrúbke koreňa ANOVA(F(1,37)=5,16, p=0,0290 (Tab. 2). Výsledky dokumentujú aj preukazné rozdiely v povrchu koreňa a priemernej hrúbke koreňového systému medzi variantmi s odlišnou úrovňou nasýtenia substrátu. Nulová hypotéza je prijatá len pre parametre dĺžka koreňa a objem koreňa. V komplexnom súbore experimentálnych rastlín sa neprejavil preukazný vplyv zníženého obsahu disponibilnej vody v substráte na predlžovací rast koreňov a objem koreňového systému (Tab.2).

Podrobnejšie výsledky kvantitatívnej analýzy dát dokumentuje viacnásobné porovnanie priemerov, pri ktorom sa použil Tukey test (Tab. 3). Semenáčiky *Sorbus domestica* majú v porovnaní s *Pyrus pyraster* preukazne dlhšie korene (20 096,3 mm), väčší povrch koreňového systému (43 720 mm^2) a väčší objem koreňového systému (43 951,8 mm^3). Rozdiely v hodnotách skúmaných parametrov sú takmer dvojnásobné, pri objeme koreňového systému viac ako dvojnásobné a dokladujú intenzívny rast podzemných orgánov pri *Sorbus domestica*. Medzi hodnotenými druhmi sú preukazné rozdiely aj v hrúbke koreňov (Tab. 3). Priemerná hrúbka koreňov bola vyššia pri *Pyrus pyraster* (2,08 mm) v porovnaní so *Sorbus domestica* (1,19 mm), ktorá formuje viac jemných koreňov. Z výsledkov vyplýva, že pre *Sorbus domestica* je charakteristický intenzívny rast podzemných orgánov, a to vo väčšine hodnotených parametrov (dĺžka, povrch a objem). V porovnaní s *Pyrus pyraster* však formuje tenšie korene.

Kvôli detailnejšej analýze vplyvu diferencovaného vodného režimu na rast koreňovej sústavy záujmových druhov sa získané údaje vyhodnotili aj jednofaktorovou analýzou rozptylu (Tab. 4). Pri *Pyrus pyraster* bola prijatá nulová hypotéza pre parametre dĺžka koreňa, povrch koreňa a objem koreňa. Táto drevina si aj pri nižšej úrovni nasýtenia substrátu vodou udržala vyrovnaný rast koreňovej sústavy, čo dokumentuje viacnásobné porovnanie priemerov a Tukey test (Tab. 5). Nedostatok vody sa preukazne prejavil len pri parametri priemerná hrúbka koreňa ANOVA F(1,18)=12,16 p= 0,0026. *Pyrus pyraster* pod vplyvom nedostatku vody sformovala tenšie korene (priemerná hrúbka 0,985 mm) oproti kontrole (3,176 mm). Avšak dĺžka, povrch a objem koreňovej sústavy neboli týmto faktorom negatívne ovplyvnené.

Pri *Sorbus domestica* sa vplyv zníženého obsahu disponibilnej vody v substráte prejavil preukaznou redukciou dĺžky a povrchu koreňového systému (Tab. 5). V porovnaní s *Pyrus pyraster* však *Sorbus domestica* pri nedostatku vody formuje hrubšie korene (priemerná hrúbka 1,198 mm) oproti kontrole (0,963 mm). Nižšia úroveň nasýtenia substrátu pri *Sorbus domestica* neovplyvnila

objem koreňového systému, čo dokumentujú aj výsledky viacnásobného porovnania priemerov (Tab 5.). Vo variante „Stres“ bola priemerná hodnota objemu koreňového systému 44789,9 mm^3 a v kontrole 43113,8 mm^3. Túto skutočnosť pravdepodobne ovplyvnilo formovanie hrubších koreňov vo variante „Stres“, keď ani napriek preukaznej redukcii dĺžky a povrchu koreňov pri nedostatku vody nebol ovplyvnený objem koreňovej sústavy *Sorbus domestica*.

Tab. 2 Výsledky viacfaktorovej analýzy rozptylu pre vybrané parametre koreňa jednoročných semenáčikov *Pyrus pyraster* a *Sorbus domestica* v diferencovanom vodnom režime pri 40% a 60% nasýtení substrátu vodou.

Parametre	Dĺžka koreňa		Povrch koreňa		Objem koreňa		Priemerná hrúbka koreňa	
Zdroj variancie	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota
Taxón	15,43	0,0004**	18,62	0,0001***	5,06	0,0305*	5,16	0,0290*
Nasýtenie substrátu	3,47	0,0704 n.s.	5,20	0,0285*	0,00	0,9557 n.s.	4,91	0,0330*

Tab. 3 Priemerné hodnoty parametrov koreňa a výsledky Tukey testu na 95% hladine významnosti pre hodnotené taxóny (*Pyrus pyraster*/*Sorbus domestica*) a podľa úrovne nasýtenia substrátu (Kontrola/Stres). Hodnoty s odlišným písmenom sú štatisticky preukazne rozdielne.

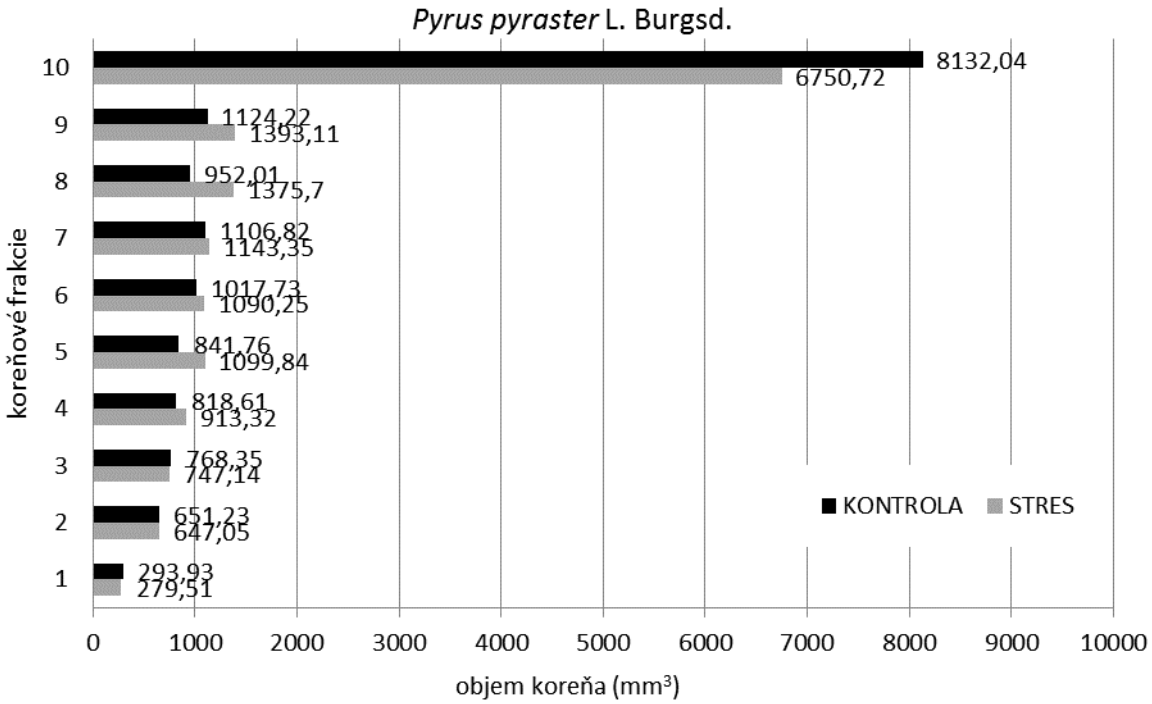
Parametre	N (ks)	Dĺžka koreňa (mm)	Povrch koreňa (mm^2)	Objem koreňa (mm^3)	Hrúbka koreňa (mm)
Pyrus pyraster	20	10852,9 A	23 866,1 A	15 573,3 A	2,0805 A
Sorbus domestica	20	20 096,3 B	43 720,8 B	43 951,8 B	1,1980 B

Tab. 4 Výsledky jednofaktorovej analýzy rozptylu pre vybrané parametre koreňa jednoročných semenáčikov *Pyrus pyraster* a *Sorbus domestica* diferencovanom vodnom režime pri 40% a 60% nasýtení substrátu vodou.

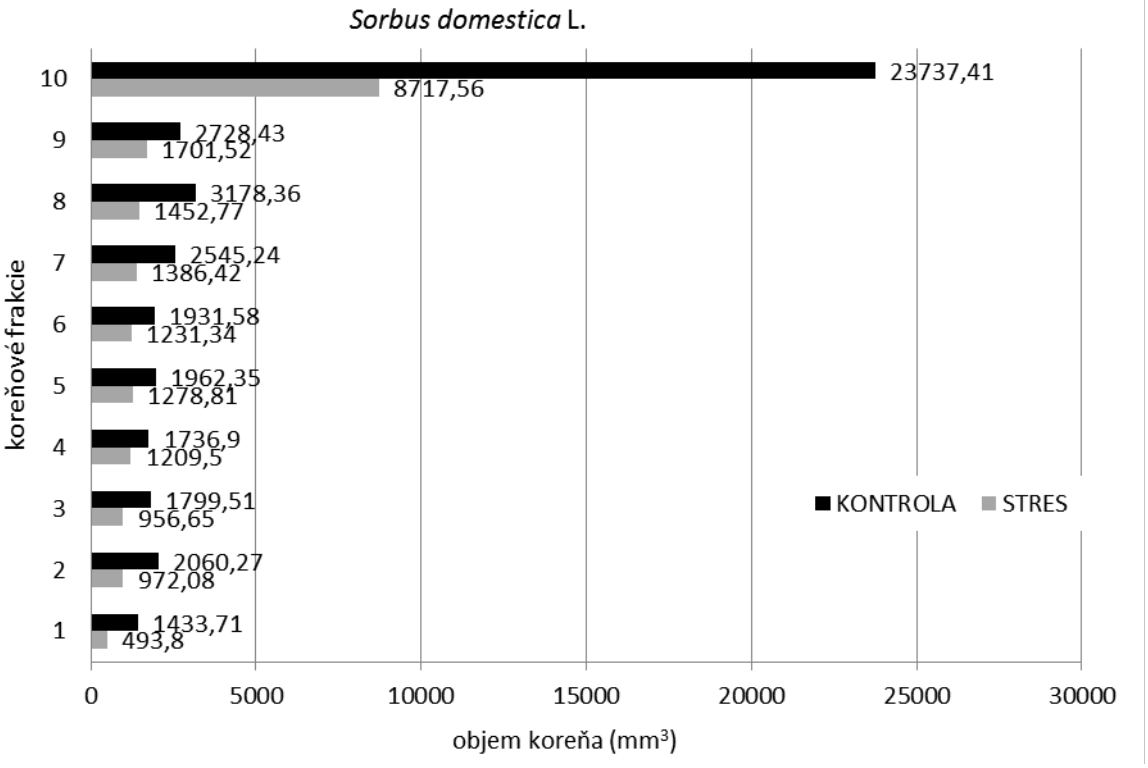
Parametre	Dĺžka koreňa		Povrch koreňa		Objem koreňa		Hrúbka koreňa	
	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota
Pyrus pyraster	0,02	0,8839 n.s.	0,01	0,9112 n.s.	0,01	0,9371 n.s.	12,16	0,0026**
Sorbus domestica	4,84	0,0411*	8,86	0,0081*	0,00	0,9480 n.s.	7,6	0,0026**

Tab. 5 Výsledky Tukey testu na 95% hladine významnosti pre *Pyrus pyraster* a *Sorbus domestica* podľa úrovne nasýtenia substrátu (Kontrola/Stres). Hodnoty s odlišným písmenom sú štatisticky preukazne rozdielne.

Parametre	N	*Pyrus pyraster*		*Sorbus domestica*	
	(ks)	Kontrola	Stres	Kontrola	Stres
dĺžka koreňa mm	20	11040,8 A	10665,0 A	24292,8 C	15899,8 B
povrch koreňa mm2	20	23604,7 A	24127,6 A	54474,2 C	32967,4 B
objem koreňa mm3	20	15706,7 A	15440,0 A	43113,8 B	44789,9 B
hrúbka koreňa mm	20	3,176 B	0,985 A	0,963 A	1,433 B



Obr. 2 Rozdelenie objemu koreňového systému Pyrus pyraster do hrúbkových frakcií koreňov v dvoch variantoch nasýtenia substrátu (Stres – 40% plnej vodne kapacity, Kontrola – 60% plnej vodnej kapacity). Koreňové frakcie podľa hrúbky koreňa (mm) 1 = 0,0-0,5, 2= 0,5-1,0, 3=1,0-1,5, 4=1,5-2,0, 5=2,0-2,5, 6=2,5-3, 7=3,0-3,5, 8=3,5-4,0, 9=4,0-4,5, 10 >4,5.



Obr. 3 Rozdelenie objemu koreňového systému Sorbus domestica do hrúbkových frakcií koreňov v dvoch variantoch nasýtenia substrátu (Stres – 40% plnej vodne kapacity, Kontrola – 60% plnej vodnej kapacity). Koreňové frakcie podľa hrúbky koreňa (mm) 1 = 0,0-0,5, 2= 0,5-1,0, 3=1,0-1,5, 4=1,5-2,0, 5=2,0-2,5, 6=2,5-3, 7=3,0-3,5, 8=3,5-4,0, 9=4,0-4,5, 10 >4,5.

Detailné porovnanie akumulácie objemu v rôznych frakciách hrúbky koreňa pre oba varianty nasýtenia substrátu je spracované na základe dátových súborov softvéru Win Rhizo do samostatných grafov (Obr. 2 a 3) pre *Pyrus pyraster* aj *Sorbus domestica*. Pri nedostatku vody hruška preukazne formovala tenšie korene, čo dokumentuje zvýšenie objemu koreňov v nižších hrúbkových triedach koreňových frakcií oproti kontrole (Obr. 2).

Oskoruša má v porovnaní s hruškou vo všetkých frakciách hrúbkových tried výrazne vyšší objem koreňov. Táto drevina prednostne distribuuje suchú hmotu do koreňov (PAGANOVÁ, JUREKOVÁ 2012.) Znížený obsah disponibilnej vody v substráte sa pri oskoruši prejavil poklesom objemu vo všetkých koreňových frakciách, avšak rozhodujúci podiel majú najhrubšie koreňov v triede 10 (Obr. 3).

Naše výsledky poukazujú na morfologické a rastové rozdiely v koreňov skúmaných druhov, ktoré, považujeme za aklimačné reakcie na diferencované podmienky vodného režimu. Sú v zhode s názorom HARTMAN (2011), podľa ktorého sa rôzne druhy stromov suchu prispôsobujú zmenami v rastových parametroch štruktúr koreňa, ako aj CALLAWAY et al. 2003, ktorí rozdielne reakcie orgánov drevín na sucho pripisujú ich fenotypovej plasticite.

ZÁVER

Získali sa údaje o kvantitatívnych parametroch koreňovej sústavy záujmových druhov v juvenilnej fáze rastu, ako aj informácie o ich reakcii na nedostatok vody v pôde. Medzi hruškou planou (*Pyrus pyraster*) a jarabinou oskorušovou (*Sorbus domestica*) sa identifikovali preukazné rozdiely v dĺžke a veľkosti povrchu koreňa, v objeme koreňového systému a hrúbke koreňa.

Pre *Sorbus domestica* je charakteristický intenzívny rast podzemných orgánov, a to vo väčšine hodnotených parametrov (dĺžka, povrch a objem), v porovnaní s *Pyrus pyraster* však formuje tenšie korene.

Nižší obsah disponibilnej vody v substráte mal výrazný vplyv na koreňový systém *Sorbus domestica* a prejavil sa preukaznou redukciou dĺžky a povrchu koreňového systému. V porovnaní s *Pyrus pyraster* však *Sorbus domestica* pri nedostatku vody formovala hrubšie korene. Preto si aj napriek redukcii dĺžky a povrchu koreňov pri nedostatku vody udržala veľký objem koreňovej sústavy.

Pri *Pyrus pyraster* sa nedostatok vody preukazne prejavil len pri parametri priemerná hrúbka koreňa. Hruška v porovnaní s oskorušou sformovala tenšie korene, avšak dĺžka, povrch a objem koreňovej sústavy neboli zníženým obsahom vody v substráte negatívne ovplyvnené.

POĎAKOVANIE

Prezentované výsledky boli získané s finančnou podporou projektov VEGA 1/0246/13 Stratégie využitia vody xerofytnými drevinami a bylinami v urbanizovanom prostredí a krajine a s podporou Výskumného centra AgroBioTech vybudovaného v rámci projektu Vybudovanie výskumného centra "AgrobioTech" ITMS 26220220180.

LITERATÚRA

BRUNNER, I., GODBOLD, D. L. 2007 Tree roots in a changing world. *J. For. Res.* 12 78–82. 10.1007/s10310-006-0261-4

CALLAWAY, R. M., PENNINGS, S. C., RICHARDS, C. L. 2003 Phenotypic plasticity and interactions among plants. Ecology 84 : 1115-1128

HAMANISHI, E. T., CAMPBELL M. M. 2011 Genome-wide responses to drought in forest trees. *Forestry* 84 273–283. 10.1093/forestry/cpr012

HARTMANN, H. 2011. Will a 385 million year-struggle for light become a struggle for water and for carbon? – how trees may cope with more frequent climate change-type drought events. *Global Change Biol.* 17 642–655. 10.1111/j.1365-2486.2010.02248.x

KOZLOWSKI, T. T., PALLARDY, S. G. 1997 Physiology of woody plants. Ed. 2. Academic Press, San Diego,

LAPIN, M., FAŠKO, P., MELO, M., ŠŤASTNÝ, P, TOMLAIN, J., 2002. Klimatické oblasti. In: Atlas krajiny Slovenskej republiky, 1. vyd. Bratislava: Ministerstvo životného prostredia SR , Banská Bystrica: Slovenská agentúra životného prostredia, 344s., ISBN 80-88833-27-2

PAGANOVÁ, V., JUREKOVÁ, Z. 2012. Woody Plants in Landscape Planning and Landscape Design, Landscape Planning, Dr. Murat Ozyavuz (Ed.), ISBN: 978-953-51-0654-8, InTech, DOI: 10.5772/48065. Available from: http://www.intechopen.com/books/landscape-planning/woody-plants-in-landscape-planning-and-landscape-design

Adresa autorov

prof. Ing. Viera Paganová, PhD., Ing. Helena Lichtnerová, PhD., Ing. Jana Černá, PhD. – Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FZKI, Tulipánová 7, 94976, Nitra, E-mail: viera.paganova@uniag.sk, helena.lichtnerova@uniag.sk, jana.cerna@uniag.sk

prof. RNDr. Zuzana Jureková, CSc. – Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FEŠRR, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, E-mail: zuzana.jurekova@uniag.sk

DIVERZITA MIKROSKOPICKÝCH HÚB NA KONÁROCH RODODENDRONOV V ARBORÉTE MLYŇANY

DIVERSITY OF MICROSCOPIC FUNGI ASSOCIATED WITH RHODODENDRON TWIGS IN MLYŇANY ARBORETUM

MARTIN PASTIRČÁK – MIROSLAVA MAJESKÁ – PETER FERUS – JOZEF GUBIŠ

PASTIRČÁK, M. – MAJESKÁ, M. – FERUS, P. – GUBIŠ, J. 2016. Diverzita mikroskopických húb na konároch rododendronov v Arboréte Mlyňany. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 201-204. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Rhododendrons are affected by dieback in the major part of its natural geographical range in Europe which results in economic and ecological losses. This paper presents data on fungi identified on rhododendron shrubs in Slovakia during 2014-2015. Fungal communities were identified on rhododendrons with symptomatic twigs using the classical method of isolation and morphological analyses. In dead parts of twigs, fungi were identified by microscopic analyses of fruit bodies *in situ*. Nineteen fungal taxa were found in 38 samples of rhododendron twigs with symptoms of necrosis. The most common fungi detected in necrotic lesions were *Cytospora*, *Phomopsis* and *Fusicoccum*. Other frequently isolated fungi included *Camarosporium*, *Didymosphaeria*, *Diplodia*, *Fusarium, Gibberella*, *Hypoderma*, *Chalara*, *Lembosia*, *Macrodiplodia*, *Melanomma*, and *Protoventuria*.

Key words: rhododendron, biodiversity, fungal cankers, *Fusicoccum*, *Diaporthe*, Slovakia

ÚVOD

Huby sú známe tým, že kolonizujú, rozmnožujú sa a prežívajú v rôznorodom prostredí. Sú súčasťou všetkých trofických úrovní a medzi dôležité faktory prispievajúce k ich výskytu a rozšíreniu na svete patrí geografická poloha, klimatické podmienky, mikro-habitat, typ substrátu, rozšírenie fauny a flóry. Dôležitou súčasťou nadhľadu na rímu húb je ich postavenie v systéme dlhodobo udržateľnej urbanistickej krajiny, kde zohrávajú viacero kľúčových faktorov, ktoré sú hybnou silou premeny životného prostredia človeka. Systematický a dlhodobý výskum druhovej diverzity mikroskopických húb v urbánnom ekosystéme má preto svoje opodstatnenie. Výraznou mierou na premene prostredia človeka sa podieľajú najmä parazitické mikroskopické huby, ktoré spôsobujú ochorenia drevín a krov rôznym spôsobom, najmä však odumieraním vegetatívnych častí, čím spôsobujú zníženie funkčných vlastností sídelnej vegetácie. Medzi najčastejšie ochorenia drevín patria rakovinové ochorenia, ktoré sú spôsobované hubami a výsledkom ich činnosti je tvorba nekrotických lézií a následne dochádza k poškodeniu kôry a odumieraniu celého výhonku. Toto ochorenie patrí medzi najničivejšie a ťažko zvládnuteľné vo vzťahu k ochrane drevín. Infekcia spodných častí konárov v blízkosti pôdy často vedie k ich zaškrcovaniu a odumieraniu celého rastového vrcholu s listami, čo nenávratne mení estetický dojem a krásu kultúrnych foriem stromov a krov. Rakovinové ochorenia predstavujú aj vstupnú bránu pre existenciu iných druhov húb, baktérií a hmyzu, ktoré sa rozmnožia a spôsobia úplne odumretie jedinca. Efektívnou stratégiou voči vzniku rakovinových ochorení drevín je predchádzanie ich vzniku.

Cieľom príspevku je celková charakteristika druhovej skladby mikroskopických húb identifikovaných na konároch rododendronov pestovaných v areáli Arboréta Mlyňany. Na základe zisteného spektra a frekvencie výskytu poukázať na potencionálne riziko spojené s ich prítomnosťou.

MATERIÁL A METÓDY

Na štúdium mikroskopických húb nekultivačnými metódami sme použili rastlinný materiál (konáre) z vybraných genotypov rododendronov (*Rhododendron catawbiense*, *R. decorum*, *R. fortunei*, *R.* × *hybridum* 'Cunningham's White', *Rhododendron* × *hybridum* 'Dreamland', *R. smirnowii*, *R.* × *hybridum* 'Tamarindos', *R.* × *hybridum* 'Nova Zembla', *R. catawbiense* 'Purpureum grandiflorum', *R. ponticum*, *R.* × *hybridum*) rastúcich v Arboréte Mlyňany SAV. Mikroskopické huby sme determinovali priamo na kôre konárov uvedených genotypov pomocou štandardnej svetelnej mikroskopie (OLYMPUS BX51, OLYMPUS SZ61) na základe makroskopických a mikroskopických charakteristík. Huby, ktorých fruktifikačné orgány boli už vytvorené na konároch boli identifikované na základe ich morfológie a biometriky s použitím manuálov pre identifikáciu mikroskopických húb – rod *Pestalotiopsis* (GUBA 1961), *Cytospora* (GVRITISHVILI 1982), rod *Phomopsis*, *Diaporthe* (UECKER 1988, WEHMEYER 1933), rody *Fusicoccum*, *Botryosphaeria* (SLIPPERS et al. 2004) a ostatné identifikované huby z rodov *Camarosporium*, *Didymosphaeria*, *Diplodia*, *Fusarium, Gibberella*, *Hypoderma*, *Chalara*, *Lembosia*, *Macrodiplodia*, *Melanomma*, *Protoventuria*, *Sporidesmium*, *Seiridium* (BARR 1989, FARR et al. 1996, HOLM 1968, HONGSANAN et al. 2014, HOU, PIEPENBRING 2006, KIRK 1983). Dokladový materiál mikroskopických húb bol uložený do fytopatologického herbára NPPC VÚRV pre účely ďalšieho mykologického výskumu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Symptómy, ktoré sprevádzajú rakovinové ochorenia sa vo väčšine prípadoch objavujú po poranení alebo odlomení konárov, kde infekcia postupuje všetkými smermi a vytvára charakteristické prejavy. Symptómy rakoviny (praskanie pokožky, tvorba jaziev) závisia od druhu a zdravotného stavu jedinca hostiteľa a od druhu huby, ktorá ju spôsobila. Väčšina parazitických húb nepoškodzuje zdravých, životaschopných jedincov drevín, ale iba jedincov, ktorí sú oslabení alebo ovplyvnení biotickým alebo abiotickým stresom. Medzi časté environmentálne stresy patrí sucho, záplavy, nízke teploty na jeseň alebo na začiatku jari, extrémne kolísanie teplôt, deficit minerálov, chemické poškodenie alebo mechanické poškodenie pri kosení a údržbe verejnej zeleni.

Huby rodu *Cytospora*, *Phomopsis* a *Botryosphaeria* považujeme na základe prieskumu za najvýznamnejších zástupcov parazitických húb spôsobujúcich rakovinové ochorenia na rododendronoch v Arboréte Mlyňany. Podieľajú sa na tvorbe charakteristických rakovinových ochorení v závislosti od pôvodcu:

Cytospora canker - je spôsobovaná hubami rodu *Cytospora* (teleomorfné štádium *Leucostoma*, *Valsa*). Spóry (alantoidný tvar bez priehradok, hyalinnej farby o veľkosti 5-7×1,5µm) vo veľkom množstve sa tvoria v pyknidach umiestnených v pokožke konára. Pri dozretí sú spóry vysúvané vo forme špirály na povrch, odkiaľ sú rozširované najmä dažďovou vodou a vetrom. Na konároch rododendronov boli opísané dva druhy *Cytospora sacculus* a *Cytospora subclypeata* (GVRITISHVILI 1982). Pre určenie nami identifikovaného druhu sú potrebné ešte ďalšie mykologické analýzy.

Phomopsis canker - je spôsobovaná hubami rodu *Phomopsis* (teleomorfné štádium *Diaporthe*). Na rododendronoch sme identifikovali anamorfné štádium *Phomopsis ericaceana*, pre ktoré je charakteristická prítomnosť viacero typov spór: alfa konídie sú vretenovitého tvaru, beta a gamma konídie neboli nami pozorované (SUTTON 1980, UECKER 1988). Teleomorfné štádium *Diaporthe eres* sme zaznamenali vo viacerých prípadoch. Rod *Diaporthe* je charakteristický tvorbou dlhého ostiola, ktoré preráža pokožku 0,5-1mm nad jej úroveň (WEHMEYER 1933). Peritécium je uložené hlboko v lyku a obsahuje vrecká s jednopriehradkovitými, hyalinnými askospórami oválneho tvaru a veľkosti 8,9-12 × 2,9-3,5 µm.

Botryosphaeria canker - je spôsobovaná hubami rodu *Fusicoccum* (teleomorfné štádium *Botryosphaeria*) (SLIPPERS et al. 2004). Na konároch rododendronov sme identifikovali na viacerých vzorkách anamorfné štádium *Fusicoccum aesculi.* Tvorbu pyknid sme pozorovali jednotlivo

umiestnených v pletive pokožky, alebo v zhlukoch za sebou v prasklinách, ktoré vznikajú deštruktívnou činnosťou huby. Spóry sú torpédového tvaru zväčša bezfarebné, neskôr v zrelosti jemne žlto zafarbené o veľkosti 15-21× 5,2-5,9 µm. Zaznamenali sme aj teleomorfné štádium *Botryosphaeria dothidea* vo viacerých vzorkách. Pre rod *Botryosphaeria* je charakteristická tvorba peritécií uložených v pokožke konárov, ktoré obsahujú vrecká s oválnymi nepriehradkovanými bezfarebnými askospórami o veľkosti 20-24 × 8,1-9,6 µm. Symptómy a sporuláciu oboch štádií sme zaznamenali aj na listoch.

Mikroskopické huby existujú na drevinách aj bez toho, aby sme ich pozorovali voľným okom, alebo na základe symptomatických zmien na kôre, prípadne na listoch a púčikoch. Ide o endofytické alebo saprofytické skupiny mikroskopických húb, ktoré využívajú konáre ako miesto pre svoju existenciu, alebo žijú na odumretých častiach kôry. Z tejto skupiny mikroskopických húb sme na konároch rododendronov zaznamenali výskyt húb rodu *Macrodiplodia*, *Camarosporium* a *Diplodia*, ktorých pyknidy sú vnorené v pokožke a na povrch vyúsťuje krátke ostiolum. Vreckaté huby rodu *Hypoderma* (*H. rubi*; HOU, PIEPENBRING 2006), *Lembosia* (*L. aulographoides*; HONGSANAN et al. 2014), *Didymosphaeria* (*D. rhododendri*; FARR et al. 1996), *Protoventuria* (*P. rhododendri*; BARR 1989) a *Melanomma* (*M. rhododendri*; HOLM 1968) vytvárajú peritécia na povrchu kôry konárov. Huby rodu *Chalara* (*Ch. fungorum*; KIRK 1983) a *Sporidesmium* (FARR et al. 1996) na povrchu kôry vytvárajú krátke konidionosiče s charakteristickými konidiospórami. Celkové spektrum identifikovaných mikroskopických húb v nadväznosti na genotyp rododendronu, na ktorom boli identifikované, je uvedené v tab. 1. spolu s celkovou frekvenciou výskytu na konároch rododendronov v Arboréte Mlyňany.

Tab. 1 Prehľad identifikovaných mikroskopických húb na konároch rododendronov v Arboréte Mlyňany SAV.

hostiteľ[1]	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	FV (%) [2]
počet vzoriek	7	5	3	1	1	1	1	1	2	1	15	
huba												
Botryosphaeria dothidea	1								1		1	7,9
Camarosporium sp.	2										1	7,9
Cytospora sp.	2	1	3						2		10	47,4
Diaporthe eres	1				1						4	15,8
Didymosphaeria rhododendri	1		1			1					1	10,5
Diplodia rhododendri	3	2	1				1		1		4	31,6
Fusicoccum aesculi	3	2	1						1	1	5	34,2
Fusarium sp.										1		2,6
Gibberella rhododendricola	1					1					3	13,2
Hypoderma rubi		2										5,3
Chalara fungorum	3	1	1	1					2		5	34,2
Lembosia aulographoides	2	1	2		1	1	1	1	2	1	2	36,8
Macrodiplodia sp.		1										2,6
Melanomma rhododendri		1										2,6
Pestalotia rhododendri	1		1								1	7,9
Phomopsis ericaceana	2	2	3	1			1	1	2		10	57,9
Protoventuria rhododendri					1							2,6
Sporidesmium sp.	1	1	1								2	13,2
Seiridium sp.	1											2,6

[1]hostiteľ: A: *Rhododendron* × *hybridum* 'Cunningham's White'; B: *Rhododendron fortunei*; C: *Rhododendron catawbiense*; D: *Rhododendron decorum*; E: *Rhododendron* × *hybridum* 'Dreamland'; F: *Rhododendron smirnowii*; G: *Rhododendron* × *hybridum* 'Tamarindos'; H: *Rhododendron* × *hybridum* 'Nova Zembla'; I: 136*, Rhododendron catawbiense* 'Purpureum grandiflorum'; J: *Rhododendron ponticum*; K: *Rhododendron* × *hybridum*

[2]sumárne hodnoty % frekvencie výskytu (FV) jednotlivých identifikovaných mikroskopických húb na konároch rododendronov v Arboréte Mlyňany

ZÁVER

Celkovo sme na konároch rododendronov identifikovali viac ako 19 druhov mikroskopických húb zastúpených 8 druhmi askomycét a 11 druhmi deuteromycét (Tab. 1). Mikroskopickými analýzami sme prepojili huby rodu *Cytospora*, *Phomopsis* a *Fusicoccum* s vizuálnymi symptómami odumierania konárov, čo predstavuje hlavné ohrozenie zdravotného stavu infikovaných jedincov v zbierke Arboréta Mlyňany.

Tento príspevok obsahovo nadväzuje na problematiku hubových ochorení listov a kvetných púčikov na rododendronoch v Arboréte Mlyňany (PASTIRČÁK et al. 2014). Niektoré z hubových patogénov identifikovaných na listoch a púčikoch boli nájdené aj na konároch (*Fusicoccum*, *Phomopsis*, *Pestalotia*), čo predstavuje riziko spojené s prenosom počas rozmnožovania rastlín. Je dôležité pre rozmnožovanie rododendronov používať zdravý rastlinný materiál, čím sa zamedzí systematickej distribúcii infikovanej sadby. V konečnom dôsledku iba zdravý jedinec má predpoklad pre dlhodobé udržanie v zbierkach arborét a k zachovaniu každoročnej pestrosti kvitnutia jedincov.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola finančne podporená z projektu VEGA č. 2/0183/14.

LITERATÚRA

BARR, M.E. 1989. The *Venturiaceae* in North America: Revisions and additions. In: Sydowia, roč. 41, s. 25-40.

FARR, D.F., ESTEBAN, H.B., PALM, M.E. 1996. Fungi on *Rhododendron*: A world reference. Parkway Publishers Inc. 192 s.

GUBA, E.F. 1961. Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia*. Harvard University Press, Cambridge. 342 s.

GVRITISHVILI, M. 1982. The fungal genus *Cytospora.* Izdatelstvo Sabchota Sakarstvelo, Tbilici. 214 s.

HOLM, L. 1968. Taxonomic notes on ascomycetes. VI. On the genus *Gibberidea* Fuck., and some alleged relatives. In: Svensk Botanisk Tidskrift, roč. 62, s. 234-242.

HONGSANAN, S., LI, Y.-M., LIU, J.-K., HOFMANN, T., PIEPENBRING, M., BHAT, J. D., BOONMEE S., DOILOM. M., SINGTRIPOP, CH., TIAN, Q., MAPOOK, A,, ZENG, X.-Y., BAHKALI, A. H., XU, J.-CH., MORTIMER, P. E., WU, X.-H., YANG, J.-B., HYDE, K. D. 2014. Revision of genera in *Asterinales.* In: Fungal Diversity, roč. 68, s. 1–68.

HOU, CH.-L., PIEPENBRING, M. 2006. Five new species of *Hypoderma* (*Rhytismatales*, ascomycota) with a key to *Hypoderma* species known from China. In: Nova Hedwigia, roč. 82, s. 91-104.

KIRK, P.M. 1983. New or interesting microfungi. X. Hyphomycetes on *Laurus nobilis* leaf litter. In: Mycotaxon, roč. 18, s. 259-298.

PASTIRČÁK, M., MAJESKÁ, M., FERUS, P., GUBIŠ, J., 2014: Choroby rododendronov spôsobené hubovými patogénmi. In: BARTA, M. - FERUS, P. *Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2014: prostredie a vitalita drevín:* Arborétum Mlyňany SAV*,* Vieska nad Žitavou, s. 145-149.

SLIPPERS, B., CROUS, P.W., DENMAN, S., COUTINHO, T.A., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic charakters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. In: Mycologia, roč. 96, s. 83-101.

SUTTON, B.C. 1980. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 696 s.

UECKER, F.A. 1988. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. In: Mycologia Memoir, roč. 13, s. 1-231.

WEHMEYER, L.E. 1933. The genus *Diaporthe* Nitschke and its segregates. In: University of Michigan Studies, Scientific Series, roč. 9, s.1-349.

Adresa autorov

Mgr. Martin Pastirčák, PhD., RNDr. Miroslava Majeská, PhD., Ing. Jozef Gubiš, PhD., Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Tel.: +421-33-7722311, e-mail: pastircak@vurv.sk, majeska@vurv.sk, gubis@vurv.sk

Ing. Peter Ferus, PhD., Oddelenie dendrobiológie, Arborétum Mlyňany, Ústav ekológie lesa SAV, Vieska nad Žitavou 178, 951 52 Slepčany, e-mail: peter.ferus@savba.sk

DRUHOVÁ DIVERZITA PATOGÉNNYCH HÚB NA GAŠTANE JEDLOM V RÔZNYCH TYPOCH PORASTOV

SPECIES DIVERSITY OF PATHOGENIC FUNGI ON SWEET CHESTNUT IN DIFFERENT TYPES OF STANDS

KATARÍNA PASTIRČÁKOVÁ – KATARÍNA ADAMČÍKOVÁ

PASTIRČÁKOVÁ, K. – ADAMČÍKOVÁ, K. 2016. Druhová diverzita patogénnych húb na gaštane jedlom v rôznych typoch porastov. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 205-207. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Species spectrum of pathogenic fungi which take part in dieback and damages of branches and leaves of *Castanea sativa* was summarised on the basis of voucher material deposited in plant pathology herbarium (NR). In total, 31 fungal taxa, 24 of them on bark and branches, and 7 taxa on *Castanea* leaves are deposited in the collection. Fungal species diversity on *C. sativa* growing in different types of stands was compared. Species richness was greatest in private gardens (23 species) and the lowest species diversity (15 species) in forest stands. The most abundant species were *Cryphonectria parasitica* causing canker of chestnut bark and *Mycosphaerella maculiformis* associated with leaf spot diseases. Herbarium collection of preserved fungal specimens and associated data represent the data source for the study of geographical distributions, and the source of fungal DNA for use in taxonomy and molecular systematics, as well.

Key words: *Castanea sativa*, fungal diseases, dieback, mycobiota

ÚVOD

Výskyt gaštana jedlého (*Castanea sativa* Mill.) je na Slovensku evidovaný na 225 lokalitách (JUHÁSOVÁ et al. 2012). Viaceré stresové faktory (zvýšený obsah chemických zlúčenín v pôde, vyššie teploty prostredia spôsobené činnosťou človeka, prostredie s priemerne nižším množstvom vody počas roka) sa podieľajú na destabilizácii imunitného systému drevín s následkom zvýšenej patogenity húb na hostiteľoch. Zvýšená pozornosť je venovaná hlavne výskytu parazitickej huby *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr, ktorá je pôvodcom rakoviny kôry gaštana jedlého predstavujúcej nebezpečenstvo pre túto drevinu hlavne v pestovateľských oblastiach. K odumieraniu gaštanov dochádza aj v dôsledku infekcie hubami rodu *Phytophthora* de Bary (JUHÁSOVÁ 1999). Najrozšírenejším parazitom asimilačných orgánov gaštana jedlého je huba *Mycosphaerella maculiformis* (Pers.) J. Schröt. Uvedené druhy húb sú najčastejšími patogénmi tejto ekonomicky významnej dreviny. Na poškodzovaní konárov a listov gaštana jedlého sa však podieľa oveľa širšie spektrum húb (AGHAYEVA 2001; STOYKOV, ASSYOV 2006; ADAMČÍKOVÁ et al. 2013; DAR, RAI 2015; PASCHE et al. 2016). Cieľom tejto práce je porovnanie spektra patogénnych húb na konároch a listoch gaštana jedlého rastúceho v rôznych typoch porastov na území Slovenska na základe dokladového materiálu archivovaného vo fytopatologickom herbári Ústavu ekológie lesa SAV Zvolen, Pobočky biológie drevín v Nitre (kód herbára v databáze *Index Herbariorum*: NR).

MATERIÁL A METÓDY

Herbárové položky húb na gaštane jedlom archivované vo fytopatologickom herbári (NR) na ÚEL SAV Zvolen, Pobočka biológie drevín v Nitre boli preskúmané za účelom sumarizovania dokladového materiálu. Na základe údajov o lokalitách odberu vzoriek boli položky roztriedené podľa typu porastu (L – les, P – verejný park a medzibloková zeleň, S – sad, Z – súkromná záhrada) a vypočítaná percentuálna frekvencia výskytu daných druhov húb.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Dokladový materiál patogénnych húb gaštana jedlého zo Slovenska tvorí spolu 570 herbárových položiek zo 129 lokalít Slovenska, z toho je 23 lokalít lesných porastov, 38 lokalít verejných parkov a medziblokovej zelene, 12 sadov a 56 súkromných záhrad. Z lesného typu porastov je dokladovaných 15 druhov húb, vo verejných parkoch a medziblokovej zeleni 16 druhov, v sadoch 22 druhov a v súkromných záhradách 23 druhov húb. Niektoré druhy húb (*Coryneum modonium* (Sacc.) Griffon & Maubl. a teleomorfné štádium *Melanconis modonia* Fuckel, *Cryphonectria parasitica*, *Cylindrosporium castaneae* (Lév.) Krenner a teleomorfné štádium *Mycosphaerella maculiformis*, *Cytospora intermedia* Sacc., *Diplodia castaneae* Sacc., *Marssonina castagnei* (Desm. & Mont.) Magnus, *Phomopsis castaneae* Woron.) sa vyskytovali vo všetkých typoch porastov. Ojedinelý výskyt (len v jednom type porastu) bol zaznamenaný u nasledovných druhov: *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst., *Cytospora ambiens* (Nitschke) Sacc., *C. cincta* Sacc., *C. nivea* Fuckel, *Dothidotthia celtidis* (Ellis & Everh.) M.E. Barr, *Fuscoporia torulosa* (Pers.) T. Wagner & M. Fisch., *Fussicoccum castaneum* Sacc., *Schizophyllum commune* Fr. a *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. Najväčšiu frekvenciu výskytu mali druhy *Cryphonectria parasitica* spôsobujúca rakovinu kôry gaštanov a *Mycosphaerella maculiformis* vyvolávajúca listovú škvrnitosť. V zbierke je archivovaných spolu 31 taxónov húb z toho 24 taxónov na kôre a konároch a 7 taxónov na listovom substráte. V tab. 1 uvádzame taxóny, ktoré predstavujú bohatú druhovú diverzitu húb na gaštane jedlom na Slovensku.

Dokladový materiál publikovaných nálezov niektorých druhov, ako napr. *Diatrype disciformis* (Hoffm.) Fr., *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. (ADAMČÍKOVÁ et al. 2014) a *Gloniopsis praelonga* (Schwein.) Underw. & Earle (ADAMČÍKOVÁ et al. 2013) nebol archivovaný.

STOYKOV a ASSYOV (2006) zaznamenali na *Castanea sativa* v Bulharsku ďalšie druhy húb, ako sú *Apiognomonia errabunda* (Roberge ex Desm.) Höhn., *Gnomonia setacea* (Pers.) Ces. & De Not. a *Hypospilina pustula* (Pers.) M. Monod. Patogén *Gnomoniopsis smithogilvyi* L.A. Shuttlew., E.C.Y. Liew & D.I. Guest poškodzujúci plody gaštanov bol označený aj ako pôvodca rakoviny vo Švajčiarsku (PASCHE et al. 2016) a v Indii (DAR, RAI 2015).

Zbierky zachovaných exemplárov patogénnych húb a súvisiacich dát predstavujú zdroj údajov pre štúdium geografického rozšírenia húb, ako aj zdroj DNA daných húb využiteľnej v taxonómii a molekulárnej systematike.

ZÁVER

V príspevku je uvedená druhová diverzita patogénnych húb gaštana jedlého na základe dokladového materiálu fytopatologického herbára ÚEL SAV Zvolen, Pobočka biológie drevín v Nitre. Najväčšia druhová diverzita húb bola zaznamenaná v súkromných záhradách (23 druhov) a najnižšia diverzita (15 druhov) v lesných porastoch. Najčastejšími patogénmi gaštanov sú huby *Cryphonectria parasitica* spôsobujúca rakovinu kôry a *Mycosphaerella maculiformis* vyvolávajúca listovú škvrnitosť.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s finančnou podporou projektu VEGA č. 2/0071/14.

LITERATÚRA

ADAMČÍKOVÁ, K., JUHÁSOVÁ, G., KOBZA, M., ONDRUŠKOVÁ, E. 2013. Diversity of microfungi on branches of *Castanea sativa* in Slovakia. In: Polish Botanical Journal, roč. 58, č. 2, 2013, s. 741-746.

ADAMČÍKOVÁ, K., KOBZA, M., JUHÁSOVÁ, G., ONDRUŠKOVÁ, E., BOLVANSKÝ, M., KÁDASI HORÁKOVÁ, M. 2014. Gaštan jedlý na Slovensku a v Európe: Pestovanie, ochrana, variabilita a využitie. Nitra: Garmond, 156 s. ISBN 978-80-89408-18-4.

AGHAYEVA, D.N. 2001. Mycobiota of *Castanea sativa* Mill. in Azerbaijan. In: Forest Snow and Landscape Research, roč. 76, č. 3, 2001, s. 405-406.

DAR, M.A., RAI, M.K. 2015. *Gnomoniopsis smithogilvyi* a canker causing pathogen on *Castanea sativa*: First report. In: Mycosphere, roč. 6, č. 3, 2015, s. 327-336.

JUHÁSOVÁ, G. 1999. Hubové choroby gaštana jedlého (*Castanea sativa* Mill.). Bratislava: Veda, 191 s. ISBN 978-80-224-0591-4.

JUHÁSOVÁ, G., ADAMČÍKOVÁ, K., KOBZA, M., ONDRUŠKOVÁ, E. 2012. Gaštan jedlý na Slovensku: Perspektívy jeho ochrany a pestovania. Nitra: Garmond, 160 s. ISBN 978-80-89408-14-6.

PASCHE, S., CALMIN, G., AUDERSET, G., CROVADORE, J., PELLETERET, P., MAUCH-MANI, B., BARJA, F., PAUL, B., JERMINI, M., LEFORT, F. 2016. *Gnomoniopsis smithogilvyi* causes chestnut canker symptoms in *Castanea sativa* shoots in Switzerland. In: Fungal Genetics and Biology, roč. 87, 2016, s. 9-21.

STOYKOV, D., ASSYOV, B. 2006. New data on Diaporthales from Southwest Bulgaria. In: Trakia Journal of Sciences, roč. 4, č. 3, 2006, s. 1-6.

Tab. 1 Vyhodnotenie skúmaných taxónov húb zaznamenaných na gaštane jedlom v rôznych typoch porastu na Slovensku.

Huba	Počet lokalít	Počet vzoriek	Frekvencia výskytu (%)	Typ porastu
konár/kmeň				
Armillaria mellea	2	5	0,9	S, Z
Bjerkandera adusta	1	1	0,2	S
Ceratocystis castaneae	3	3	0,5	P, S, Z
Coryneum modonium	11	13	2,3	L, P, S, Z
Cryphonectria parasitica	18	205	36,0	L, P, S, Z
Cryptodiaporthe castanea	4	5	0,9	L, P, S
Cytospora ambiens	1	1	0,2	Z
Cytospora cincta	1	2	0,4	Z
Cytospora intermedia	17	25	4,4	L, P, S, Z
Cytospora nivea	1	2	0,4	S
Diatrype stigma	4	4	0,7	L, S, Z
Diatrypella quercina (A: *Libertella quercina*)	4	5	0,9	S, Z
Diplodia castaneae	7	8	1,4	L, P, S, Z
Diplodina castaneae	2	2	0,4	S, Z
Dothidotthia celtidis	1	1	0,2	Z
Fuscoporia torulosa (=*Phellinus torulosus*)	1	2	0,4	S
Libertella quercina	2	3	0,5	P, S
Melanconis modonia (A: *Coryneum modonium*)	32	56	9,8	L, P, S, Z
Phomopsis castaneae	10	22	3,9	L, P, S, Z
Phytophthora cambivora	2	2	0,4	P, S
Schizophyllum commune	1	1	0,2	P
Stereum hirsutum	1	1	0,2	Z
Stereum rugosum	2	2	0,4	L, Z
Vuilleminia comedens	4	4	0,7	P, S, Z
listy				
Cylindrosporium castaneae	10	10	1,8	L, P, S, Z
Erysiphe alphitoides	2	3	0,5	L, Z
Fusicoccum castaneum	1	1	0,2	L
Gnomonia pascoe	2	5	0,9	P, Z
Marssonina castagnei	7	8	1,4	L, P, S, Z
Mycosphaerella maculiformis (A: *Cylindrosporium castaneae*)	77	164	28,8	L, P, S, Z
Phyllosticta castaneae	4	4	0,7	L, S, Z

Vysvetlivky: L – les, P – verejný park a medzibloková zeleň, S – sad, Z – súkromná záhrada, A – anamorfné štádium

Adresa autorov

Mgr. Katarína Pastirčáková, PhD., Mgr. Katarína Adamčíková, PhD., Ústav ekológie lesa SAV Zvolen, Pobočka biológie drevín Nitra, Akademická 2, 94901 Nitra; tel.: 037/6943358, 6943339;
e-mail: katarina.pastircakova@savzv.sk, katarina.adamcikova@savzv.sk

PÔDNE SUBTYPY V ARBORÉTE MLYŇANY

SOIL SUBTYPES IN ARBORETUM MLYŇANY

NORA POLLÁKOVÁ – VLADIMÍR ŠIMANSKÝ – JANA KONÔPKOVÁ

POLLÁKOVÁ, N. – ŠIMANSKÝ, V. – KONÔPKOVÁ, J. 2016. Pôdne subtypy v Arboréte Mlyňany. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 208. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstrakt
Dôkladné poznanie miestnych pôdno-ekologických podmienok je mimoriadne dôležité pre úspešnú introdukciu cudzokrajných drevín. Preto cieľom tejto práce bol pôdoznalecký prieskum a zatriedenie pôd Arboréta Mlyňany. V lokalite Arboréta bolo vykopaných sedemnásť sond, v ktorých boli podrobne charakterizované morfologické, fyzikálne a chemické vlastnosti pôdy. V blízkosti každej sondy boli urobené tri pôdne vrty, v ktorých boli analyzované vybrané chemické vlastnosti. Bolo zistené, že pôda bola prevažne zrnitostne stredná. Na väčšine plochy Arboréta boli substrátom odvápnené spraše a hliny, miestami skeletnaté. Boli určené nasledovné subtypy: luvizeme podzolové v najvyššej, východnej časti pod porastom borovíc čiernych, v centrálnej časti luvizeme pseudoglejové pod tujami riasnatými a hnedozeme luvizemné pseudoglejové pod vavrínovcami. Najrozšírenejšou je hnedozem pseudoglejová (na severoamerickej a východoázijskej ploche kultizemná pseudoglejová) a zaberá väčšinu plochy východne od kaštieľa. Západne od kaštieľa sa vyvinula černozem hnedozemná, ktorej kultizemný subtyp bol na severoamerickej ploche pod cypruštekmi a na východoázijskej ploche pod borovicami Himalájskymi a tujami východnými.

Kľúčové slová: cudzokrajné stromy, morfologické znaky pôdy, zrnitosť, pôdne subtypy

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s podporou projektu KEGA 014SPU-4/2016.

Adresa autorov

doc. Ing. Nora Polláková, PhD. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Katedra pedológie a geológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra; 037 641 4389; E-mail: Nora.Pollakova@uniag.sk
doc. Ing. Vladimír Šimanský, PhD. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Katedra pedológie a geológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra; 037 641 4398; E-mail: Vladimir.Simansky@uniag.sk
Ing. Jana Konôpková, PhD., Arborétum Mlyňany, SAV**,** Vieska nad Žitavou, č.178, 951 52 pošta Slepčany, 037/6334211 kl. 127, E-mail: Jana.Konopkova@savba.sk

VYBRANÉ POPULÁCIE JEDLE A ICH ODOZVA NA AKTUÁLNE PODMIENKY PROSTREDIA POČAS VRCHOLU VEGETAČNEJ SEZÓNY 2015

SELECTED POPULATIONS OF FIR AND THEIR RESPONSE TO ACTUAL ENVIRONMENTAL CONDITION DURING PEAK OF GROWING SEASON 2015

EVA PŠIDOVÁ – JANA MAJEROVÁ – MAREK JEŽÍK – KRISTÍNA SLUGEŇOVÁ – ĽUBICA DITMAROVÁ

PŠIDOVÁ, E. – MAJEROVÁ, J. – JEŽÍK, M. – SLUGEŇOVÁ, K. – DITMAROVÁ, Ľ. 2016. Vybrané populácie jedle a ich odozva na aktuálne podmienky prostredia počas vrcholu vegetačnej sezóny 2015. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 209-215. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
During peak of growing season 2015 were studied five different population of silver fir (*Abies alba* Mill.). We selected five climatically contrasting fir populations (altitude, annual precipitation). The aim of study was to find differences in ability of adaptation to conditions of provenance plot based on physiological observations. Parameters of osmotic potential (Ψ_s), chlorophyll *a* fluorescence (F_v/F_m, PI), accumulation of proline and state of assimilation pigments were recorded. We found different rate of adaptation in studied populations. Significantly, positive adaptation was confirmed in population from the higher altitude conditions and conditions with the higher annual precipitations.

Key words: population, silver fir, physiological measurements, adaptation, environmental condition

ÚVOD

Z pomedzi ihličnatých drevín dôležitú pozíciu v európskych lesoch hospodárskeho významu zastáva hneď po smreku obyčajnom (*Picea abies* (L.) Karst.) práve jedľa biela (*Abies alba* Mill.). Rovnako ako ostatné dreviny aj jedľa je v nemalej miere ovplyvňovaná prebiehajúcimi zmenami klímy. Ako uvádzajú autori SARVAŠ et al. (2010) jedľu bielu nepovažujeme za ohrozenú drevinu, ale drevinu, ktorá v poslednom období zaznamenala skutočne značný ústup a to práve z dôvodov náhlych klimatických zmien a nasledujúcich udalostí a tiež z dôvodu nedostatočnej genetickej variability. Identifikácia fyziologického stavu vybraných populácií jedle počas vrcholu vegetačnej sezóny bola realizovaná so zámerom doplniť poznatky o schopnosti jedle adaptovať sa daným podmienkam prostredia. Práca je zameraná na zhodnotenie fyziologickej odozvy piatich populácií jedle bielej na podmienky prostredia provenienčnej plochy na úrovni asimilačných orgánov (fluorescencia chlorofylu *a*, asimilačné pigmenty, akumulácia prolínu a vodný potenciál ihlíc).

MATERIÁL A METÓDY

Počas vegetačnej sezóny 2015 prebehol ekofyziologický výskum jedle bielej (*Abies alba* Mill.) na provenienčnej ploche Hertník v okrese Bardejov na východe Slovenska. Provenienčná plocha Hertník (NLC Zvolen) bola založená v roku 2005 pod záštitou Medzinárodného zväzu lesníckych výskumných organizácií IUFRO. Geografické a klimatické charakteristiky provenienčnej plochy sú uvedené v Tab. 1. Pri zakladaní plochy boli použité 5-ročné sadenice. V rámci nášho výskumu bolo sledovaných päť populácií jedle bielej, ktoré boli vytypované ako populácie jedle pochádzajúce z kontrastných klimatických regiónov Európy (výškový gradient). V príspevku približujeme prostredníctvom fyziologických parametrov mieru adaptácie sledovaných proveniencií jedle bielej na podmienky provenienčnej plochy Hertník. Podrobné charakteristiky jednotlivých populácií sú uvedené v tabuľke 1. Z dôvodu zdokumentovania podmienok prostredia provenienčnej plochy

Hertník boli počas vegetačnej sezóny 2015 (v období od polovice apríla 2015 do konca septembra 2015) zaznamenávané základné klimatické charakteristiky (teplota vzduchu, relatívna vlhkosť vzduchu, celková slnečná radiácia, zrážkové úhrny a vodný potenciál pôdy). Teplotu vzduchu [°C], relatívnu vlhkosť vzduchu [%], celkovú slnečnú radiáciu [$W.m^{-2}$] vo výške 2 m sme merali s použitím 2 senzorov Minikin RTHi (EMS Brno, CZ). Výsledné hodnoty predstavujú priemer z obidvoch senzorov. Zrážkové úhrny [mm] boli merané prostredníctvom MetOne 370 (Oregon, USA). Merania vodného potenciálu pôdy prebiehali v hĺbkach 15, 30 a 50 cm a taktiež na 2 bodoch pri meteo senzoroch (kontinuálne do -1.1 MPa, s použitím sádrových bločkov (Delmhorst Inc., USA) a dátovej zbernice MicroLog SP3 (EMS Brno, CZ)). Celkove bolo použitých 36 bločkov (12 v každej hĺbke). Za účelom určenia potencionálne rozdielnej reakcie vybraných populácií jedle bielej na aktuálne vlhkostné pomery proveniencnej plochy boli odobraté vzorky pre stanovenie osmotického potencionálu ihlíc (Ψ_s). Osmotický potenciál ihlíc (Ψ_s) bol meraný psychrometricky prístrojom PSYPRO (Wescor, USA) pomocou komôr C-52. Na stanovenie osmotického potenciálu bolo z každej populácie odobratých 5 vzoriek zo 6 vybraných stromov, celkovo 30 vzoriek za populáciu. Z každej vzorky boli vykonané 3 merania, 90 opakovaní v rámci populácie. Fluorescenciu chlorofylu *a* sme zaznamenávali pomocou fluorimetra Handy PEA (Hansatech Tld., Kings Lynn, Veľká Británia). Samotné meranie začína umiestnením svoriek na reprezentatívne asimilačné orgány jedincov. Svorky sú uzatvorené, čím plnia úlohu zatienenia a po dobu 30 minút je vzorka adaptovaná na tmu – tmavá adaptácia. Po adaptácii na tmu je vzorka ožiarená saturačným impulzom s intenzitou 3500 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. V mieste uzáveru svorky je v priebehu merania držaná senzorová jednotka PEA, ktorá emituje červené svetlo vďaka diódam, ktoré obsahuje (LEDs). Pre stanovenie koncentrácie asimilačných pigmentov boli odobraté vzorky zo 6 stromov pre každú populáciu, pričom pre každý strom bolo analyzovaných 5 vzoriek. Koncentrácie chlorofylov *a*, *b* a karotenoidov (xantofyly a karotény) boli stanovené spektrofotometricky, tj. meraním absorbancie zmesi pigmentov pri rôznych vlnových dĺžkach, volených tak, aby zodpovedali absorpčným maximám jednotlivých zložiek. Analýzy prebehli prostredníctvom UV VIS spektrofotometra Cintra 6.5 GBS Austrália. Na výpočet koncentrácie fotosyntetických pigmentov boli použité upravené vzťahy podľa LICHTENTHALERA (1987). Koncentrácie chlorofylu *a, b*, *a+b* a karotenoidov (*x+c*) sú udávané na hmotnostnú jednotku sušiny ($mg.g^{-1}$). Rovnako ako pre stanovenie koncentrácie asimilačných pigmentov tak aj pre stanovenie koncentrácie prolínu boli odobraté vzorky zo 6 stromov pre každú populáciu, pričom pre každý strom bolo analyzovaných 5 vzoriek. Meranie voľného prolínu bolo uskutočnené spektrofotometricky podľa BATESA et al. (1973). Zaznamenané parametre boli následne štatisticky spracované. Sledovali sme rozdiely medzi vybranými populáciami, kde pre vyhodnotenie bola použitá jednofaktorová analýza (faktor populácia). Signifikantnosť rozdielov medzi populáciami sme testovali post-hoc Tukey testom.

Tab. 1 Geografické charakteristiky testovaných populácií jedle bielej.

Označenie	Štát	Názov proveniencie	Geografické charakteristiky			Klimatické charakteristiky	
			Zem. dĺžka	Zem. šírka	Nadm. výška (m n.m.)	Priemerná ročná teplota (°C)	Priemerný ročný úhrn zrážok (mm)
SK_H	**Slovensko**	**Hertník - výskumná plocha**	**21°16´**	**49°13´**	**390**	**9,54**	**652,70**
AT	Rakúsko	Koetschach Valley	13°11'	47°06'	1300	6,83	949,70
PL21	Poľsko	Berest-1	20°33'	49°33'	690	9,17	722,40
PL41	Poľsko	Kadłubiska	22°19'	50°21'	250	8,04	779,00
SK01	Slovensko	Staré Hory	19°06'	48°50'	500	8,92	708,40
SK02	Slovensko	Bardejov	21°10'	49°14'	900	9,54	652,70

***** klimatické charakteristiky za obdobie rokov 1950- 2000 získané z databázy www.wordclim.org s rozlíšením 30 arc-s

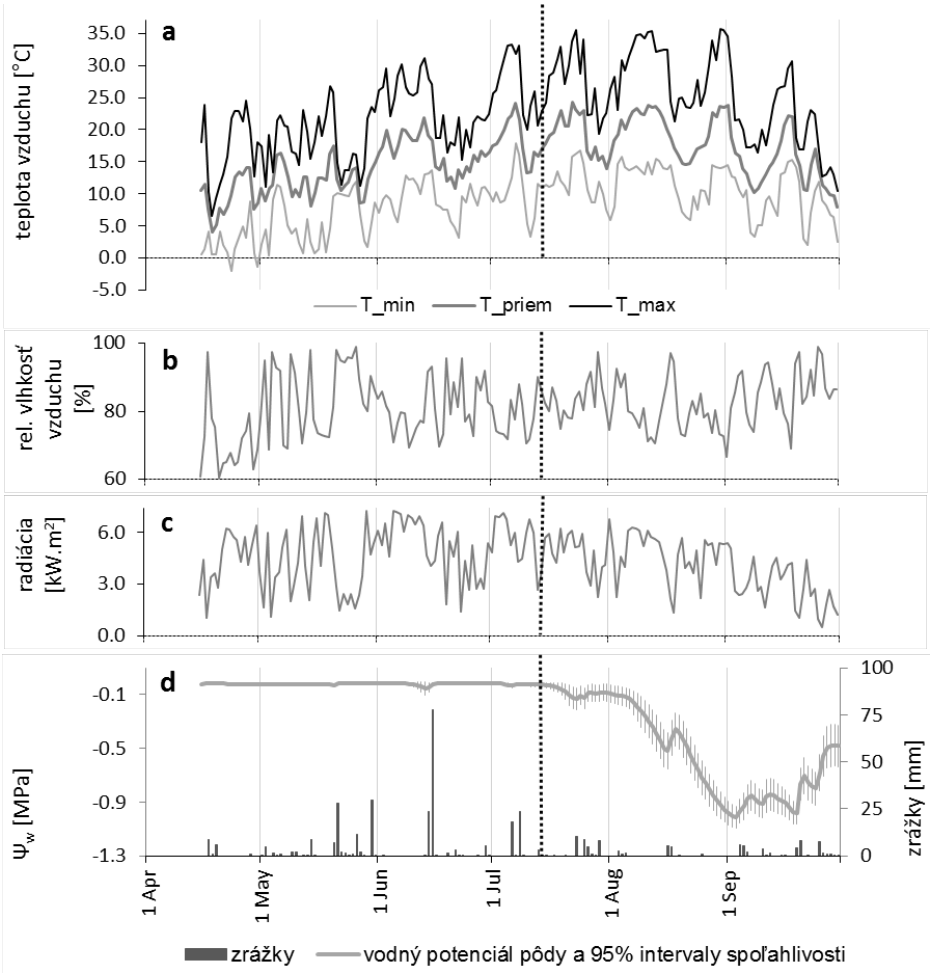
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Jedľa biela (*Abies alba* Mill.) patrí medzi dreviny skutočne náročné na vlhkostné charakteristiky ako sú pôdna, ale aj vzdušná vlhkosť. Práve z tohto dôvodu nie je možné určiť rastové optimum pre túto drevinu z pohľadu nadmorskej výšky. Základnou a kľúčovou podmienkou vymedzujúcou optimum ako je už z ekologických nárokov zrejmé je prístupnosť vody a teda skôr vieme optimum vymedziť ročným úhrnom zrážok. Jedľa biela je najrozšírenejšou práve v 5. (jedľovo-bukovom) lvs, s požiadavkou ročného úhrnu zrážok v rozmedzí od 900 do 1050 mm pri výškovom rozpätí od 500 m n.m. až do nadmorskej výšky 1000 m n.m.. O náročnosti jedle bielej na vlahu hovorí viacej prác, ktoré tiež poukazujú aj na posun areálu jedle bielej vplyvom častejších období sucha nie len v podmienkach Slovenska ale aj v Európe (FICKO et al. 2011; GAZOL et al. 2015; HLÁSNY et al. 2014; KOBAL et al. 2015; SARVAŠ et al. 2010). Napriek tomu, že sme predpokladali, že vrcholu vegetačnej sezóny budú predchádzať horúce letné dni s nízkou zásobou pôdnej vlhkosti meteorologické dáta nám ilustrujú opačnú situáciu (Obr. 1). V období pred meracou kampaňou (14. júl 2015) boli zaznamenávané pomerne pravidelné zrážky do 15 mm a vyskytlo sa aj niekoľko udalostí s výrazne vyšším úhrnom (25 – 75 mm), ktoré boli sprevádzane s priaznivým počasím aj z pohľadu teploty vzduchu. Na základe tohto skutočne nemožno hovoriť o výrazne suchom období, ktoré by predchádzalo meraniu, čo dokumentujú nie len meteorologické parametre ale aj osmotický potenciál ihlíc (Ψ_s) (Obr. 2). Hodnoty Ψ_s zaznamenané u vybraných populácií jedle klesli na uroveň -1,0 MPa až -1,2 MPa. Podobne aj MATÍAS et al. (2016) zaznamenali citlivú reakciu jedle na sucho kedy hodnoty vodného potenciálu ihlíc poklesli pod úroveň Ψ_w -2,25 MPa, pričom však nepozorovali štatistický významné rozdiely medzi sledovanými populáciami jedle bielej. Rovnako v našom prípade nedošlo k potvrdeniu štatisticky významných rozdielov medzi monitorovanými populáciami ani ku kritickému zníženiu hodnôt osmotického potenciálu z pohľadu fyziologických procesov. Súčasne boli analyzované aj biochemické charakteristiky ako akumulácia prolínu - osmoticky aktívnej látky. Napriek tomu, že opäť neboli zaznamenané signifikantné rozdiely medzi provenienciami z grafov je zrejmé, že u populácie AT pochádzajúcej z najvyššej nadmorskej výšky a z oblasti s najvyšším úhrnom zrážok sme sledovali najvýraznejšie zníženie hodnôt Ψ_s pri súčasnej najvyššej akumulácii prolínu v ihliciach (Obr. 3). Aj keď výsledky Ψ_s a výsledky akumulácie prolínu nepotvrdzujú jednoznačne osmotickú adjustáciu OA, na základe výsledkov predpokladáme, že v prehlbujúcich sa podmienkach vodného deficitu by podľa zaznamenaného trendu k OA pravdepodobne došlo. V prípade parametrov fluorescencie chlorofylu *a* (F_v/F_m a PI) sme zaznamenali signifikantné rozdiely medzi populáciami. Pri pohľade na výsledky (Obr. 4 a 5) je zrejmé, že sa nám potvrdila závislosť sledovaných parametrov od výškového gradientu. Vyššiu schopnosť adaptácie na dané podmienky sme pozorovali u populácie AT, ktorá má pôvod v oblasti s ročným úhrnom zrážok 949,70 mm, čo predstavuje teda optimálne vlhkostné charakteristiky pre jedľu a zároveň má pôvod v nadmorskej výške 1300 m n.m.. Aj napriek tomu, že spomedzi populácií prekonala najväčší posun v rámci výškového gradientu vyznačuje sa najvyššou schopnosťou adaptácie. PEGUERO-PINA et al. (2007) vo svojej práci porovnával dve blízke, ale klimaticky kontrastné populácie jedle bielej na základe fyziologických parametrov. Výsledky parametrov fluorescencie chlorofylu *a* (F_v/F_m) potvrdili naše pozorovania. V ich práci sa ako výrazne vitálnejšia prezentovala populácia pôvodom z oblasti z vyššej nadmorskej výšky (1350 m n.m.) a vyšším úhrnom zrážok (2353 mm). Počas meraní boli odobraté aj ihlice pre analýzu a stanovenie koncentrácií chlorofylu a, chlorofylu b, chlorofylu a+b, xantofylov a karotenoidov (Obr. 6). Výsledky analýz zaznamenali rozdiely medzi populáciami, a opäť populácia označovaná ako AT sa významne líšila od zvyšných populácií. Aj v prípade asimilačných pigmentov naše výsledky korešpondujú s pozorovaniami PEGUERO-PINA et al. (2007).

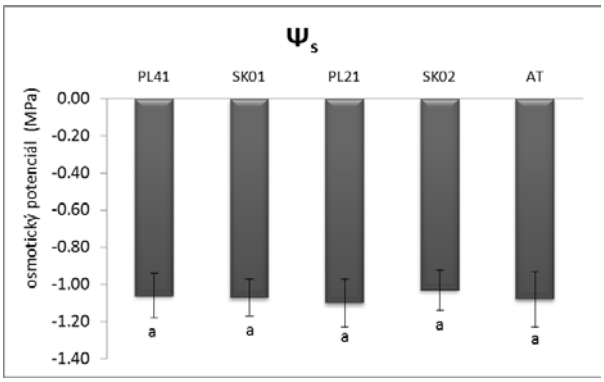
ZÁVER

Výsledky našej práce v prípade viacerých parametrov (F_v/F_m; PI; analýzy obsahu asimilačných pigmentov) potvrdili, že populácia jedle pôvodom z najvyššej nadmorskej výšky (1300 m n. m.) a najvyšším úhrnom zrážok (949,70 mm) spomedzi vybraných populácii sa dokázala najlepšie

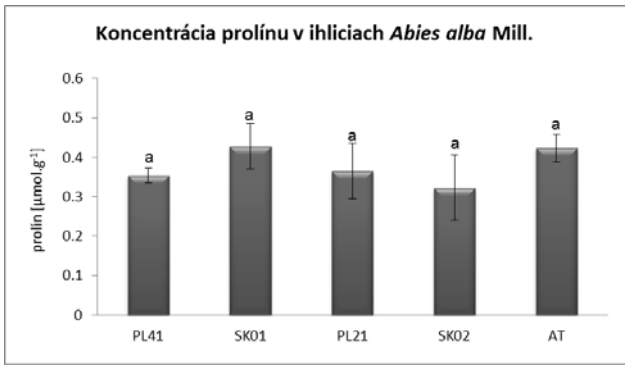
adaptovať na podmienky provenienčnej plochy, kde sú vystavené výrazne odlišným klimatickým charakteristikám z pohľadu priemerného ročného úhrnu zrážok a priemernej ročnej teploty.



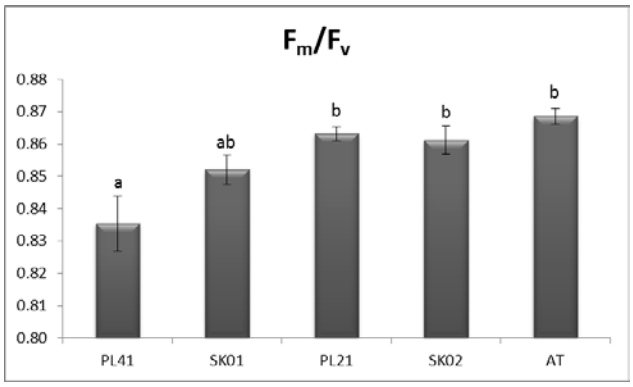
Obr. 1 Sezónna dynamika denných hodnôt minimálnej, maximálnej a priemernej teploty vzduchu (**a**), relatívnej vlhkosti vzduchu (**b**), slnečnej radiácie (**c**), vodného potenciálu pôdy a úhrnov zrážok (**d**). Čierna vertikálna bodkovaná čiara označuje 14. júl 2015 (označený v našom príspevku ako vrchol vegetačnej sezóny 2015).



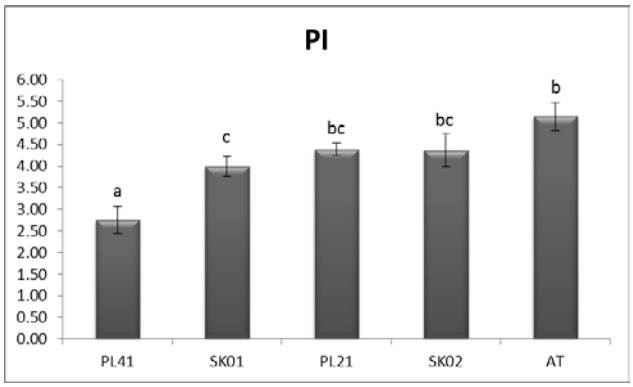
Obr. 2 Hodnoty osmotického potenciálu ihlíc (Ψ_s) u sledovaných proveniencií jedle bielej (*Abies alba* Mill.) v podmienkach prostredia provenienčnej plochy „Hertník" počas vrcholu vegetačnej sezóny 2015 (chybové úsečky znázorňujú smerodajnú odchýlku, odlišné písmená indikujú štatistickú významnosť rozdielov ($p<0,05$ Tukey test)).



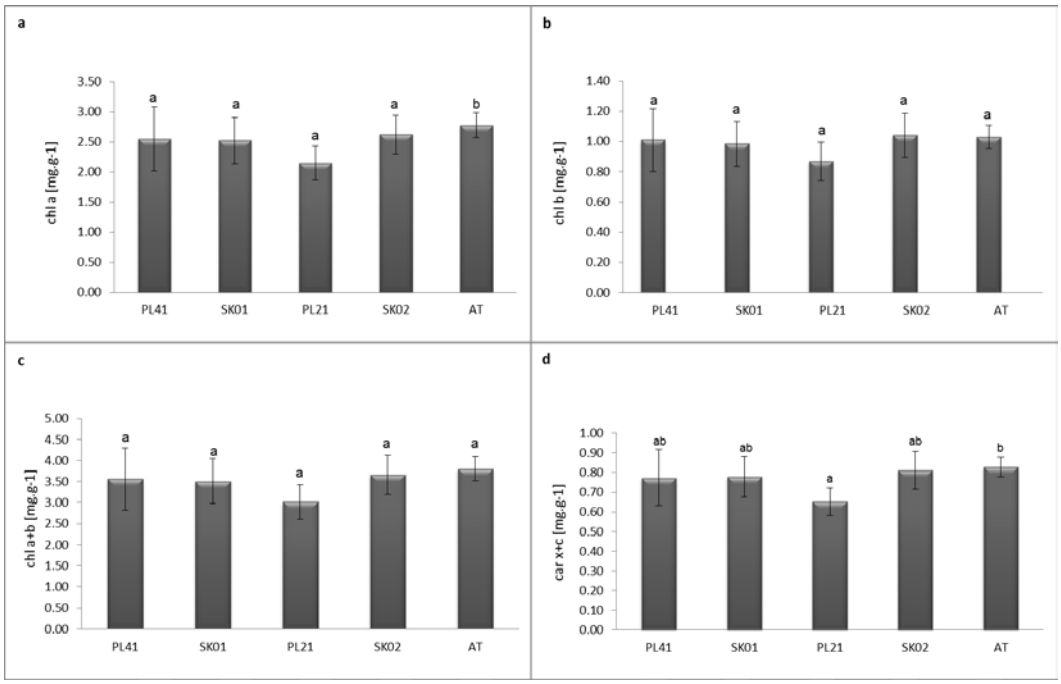
Obr. 3 Hodnoty koncentrácie prolínu v ihliciach u sledovaných proveniencií jedle bielej (*Abies alba* Mill.) v podmienkach prostredia provenienčnej plochy „Hertník" počas vrcholu vegetačnej sezóny 2015 (chybové úsečky znázorňujú strednú chybu, odlišné písmená indikujú štatistickú významnosť rozdielov ($p<0,05$ Tukey test)).



Obr. 4 Hodnoty maximálnej fotochemickej účinnosti (F_v/F_m) u sledovaných proveniencií jedle bielej (*Abies alba* Mill.) v podmienkach prostredia provenienčnej plochy „Hertník" počas vrcholu vegetačnej sezóny 2015 (chybové úsečky znázorňujú strednú chybu, odlišné písmená indikujú štatistickú významnosť rozdielov ($p<0,05$ Tukey test)).



Obr. 5 Hodnoty indexu výkonnosti – Performance Index (PI) u sledovaných proveniencií jedle bielej (*Abies alba* Mill.) v podmienkach prostredia provenienčnej plochy „Hertník" počas vrcholu vegetačnej sezóny 2015 (chybové úsečky znázorňujú strednú chybu, odlišné písmená indikujú štatistickú významnosť rozdielov ($p<0,05$ Tukey test)).



Obr. 6 Hodnoty koncentrácií chlorofylu a (a), chlorofylu b (b), chlorofylu a+b (c), xantofylov a karotenoidov (d) u sledovaných proveniencií jedle bielej (*Abies alba* Mill.) v podmienkach prostredia provenienčnej plochy „Hertník" počas vrcholu vegetačnej sezóny 2015 (chybové úsečky znázorňujú strednú chybu, odlišné písmená indikujú štatistickú významnosť rozdielov (p<0,05 Tukey test)).

POĎAKOVANIE

Uvedená práca vznikla za finančnej podpory projektov APVV-0436-10; APVV-0135-12; APVV-0480-12; VEGA-0034-14.

LITERATÚRA

BATES, L.S.,WALDREN, R.P., TEARE, I.D. 1973 Rapid determination of free proline for water-stress studies. In *Plant and Soil*, 1973, vol. 39, pp. 205-207.

FICKO, A., POLJANEC, A., BONCINA, A. 2011 Do changes in spatial distribution, structure and abundance of silver fir (*Abies alba* Mill.) indicate itrs decline? *Forest Ecology and Management*, 261, pp 844-854. Doi:10.1016/j.foreco.2010.12.014.

GAZOL, A., CAMARERO, J.J., GUTIÉRREZ, E., POPA, I., ANDREU-HAYLES, L., MOTTA, R., NOLA, P., RIBAS, M., SANGÜESA-BARREDA, G., URBINATI, C., CARRER, M. 2015 Distinct effect of climate warming on populations of silver fir (*Abies alba* Mill.) across Europe. *Journal of Biogeography*, pp 1-12. Doi:10.1111/jbi.12512.

HLÁSNY, T., MÁTYÁS, C., SEIDL, R., KULLA, L., MERGANIČOVÁ, K., TROMBÍK, J., DOBOR, L., BARCZA, Z., KONÔPKA, B. 2014 Climate change increases the drought rist in Central European forests: what are the options for adaptation? *Lesn. Cas. For. J.*, 60, pp 5-18.

KOBAL, M., GRČMAN, H., ZUPAN, M., LEVANIČ, T., SIMONČIČ, P., KADUNC, A., HLADNIK, D. 2015 Influence of soil properties on silver fir (*Abies alba* Mill.) growth in the Dinaric Mountains. Forest Ecology and Management, 337, pp 77-87. Doi:10.1016/j.foreco.2014.10.017.

LICHTENTHALER, H.K. 1987 Chlorophylls and carotenoids: Pigments of Photosythetic Biomembranes. *Methods in enzymology* 148: pp. 350-382.

MATÍAS, L., GONZALEZ-DÍAZ, P., QUERO, J.L., CAMARERO, J.J., LLORET, F., JUMP, A.S. 2016 Role of geographical provenance in the response of silver fir seedlings to experimental warming and drought. *Tree Physioklogy*, 00, pp 1-11. Doi:1093/treephys/twp049.

PEGUERO-PINA, J.J., CAMARERO, J.J., ABADÍA, A., MARTÍN, E., GONZÁLEZ-CASCÓN, R., MORALES, F., GIL-PELGRÍN, E. 2007 Physiological performance of silver-fir (*Abies alba* Mill.) populations under contrasting climates near the south-western distribution limit of the spacies. *Flora*, 202, pp 226-236. Doi:10.1016/j.flora.2006.06.004.

SARVAŠ, M., BRUCHÁNIK, R., HOFFMANN, J., CHVÁLOVÁ, K.,JEŽOVIČ, V. 2010 ZÁKLADNÉ CHARAKTERISTIKY LESNÝCH DREVÍN - ekologické nároky, morfológia, lesné semenárstvo a škôlkárstvo, obhospodarovanie génových základní. Zvolen: NLC, 82 s. ISBN: 978-80-8093-112-4.

Adresa autorov

Ing. Eva Pšidová, PhD. – E-mail: psidova@savzv.sk
Ing. Jana Majerová, PhD. – E-mail: majerova@savzv.sk
Ing. Marek Ježík, PhD. – E-mail: jezik@savzv.sk
Ing. Kristína Slugeňová, PhD. – E-mail: slugenova@savzv.sk
RNDr. Ľubica Ditmarová, PhD. – E-mail: ditmarova@savzv.sk
Ústav ekológie lesa SAV, Slovenská akadémia vied, Štúrova 2, 960 53 Zvolen, Slovenská republika, 045/5241105 kl. 212

EKOLOGICKÉ POŽIADAVKY DRUHOV *ROSA* L. A ZHODNOTENIE ICH VÝSKYTU V JUHOVÝCHODNEJ ČASTI KRUPINSKEJ PLANINY

ECOLOGICAL REQUIREMENTS OF *ROSA* L. AND EVALUATION OF THEIR OCCURRENCE IN THE SOUTHEASTERN PART OF THE KRUPINA PLATEAU

KATARÍNA ROVNÁ – LADISLAV BAKAY

ROVNÁ, K. – BAKAY, L. 2016. Ekologické požiadavky druhov *Rosa* L. a zhodnotenie ich výskytu v juhovýchodnej časti Krupinskej planiny. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 216-219. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
This paper deals with list of Rosa taxons found in the South-Eastern area of Krupina plateau. Rosa taxons are published with their primary description. The aim of our work was revision of species which were described by rhodologists as: Kmeť (1841-1906), Klášterský (1901 – 1979), and others who carried out the botanical evidence in Krupina plateau. Our research was done in locality Čebovce and Kosihovce Data used in the study were obtained from Flora of Slovakia IV/3.We described and confirmed geographical distribution of 12 taxons which grow in this area naturally and 4 taxons with cultural origin.

Key words: *Rosa* L., *Rosaceae*, ecological requirements, Krupina plateau

ÚVOD

Ruže vzbudzujú obdiv a záujem. Patria medzi prvé rastliny, ktoré človek začal kultúrne pestovať (KUBA, 2003) a to nielen z okrasných dôvodov, ale predovšetkým pre vysoký obsah vitamínov a liečivé účinky (VĚTVIČKA, BERTOVÁ 1992). Rod *Rosa* L. sa prirodzene vyskytuje výhradne na severnej pologuli v miernom a subtropiskom pásme (MAREČEK et al. 2001). Jeho rozšírenie, ako uvádzajú viacerí autori (MOODY et al. 1999; VĚTVIČKA, BERTOVÁ 1992) sa viaže na štyri hlavné oblasti - Európa, Amerika, Ázia a Stredný Východ. K najrozšírenejším a najpočetnejším patrí podrod *Rosa*.

Z hľadiska ekologických požiadaviek ruže osídľujú predovšetkým slnečné, otvorené stráne s dostatkom vlahy, nie však priame slnko. Uprednostňujú priepustné, hlboké pôdy, kypré a vzdušné, s pH 5,5-6,5 (MAREČEK et al., 2001). Niektoré druhy, variety, tolerujú aj polotieň, ale na takýchto stanovištiach musia prekonávať boj o živiny a vlahu, čo sa môže odraziť na ich celkovom vzhľade a zdravotnej kondícii (MOODY et al. 1999). Nevhodné sú aj málo vzdušné stanovištia. Ruže spravidla nerastú pod vysokými drevinami, ani na stanovištiach odvrátených od slnka.

Ruže síce nepatria k dlhovekým drevinám, ale nepochybne majú krajinársky a záhradnícky význam. Botanické druhy, na ktoré sme sa zamerali aj na hodnotených lokalitách v katastri obce Čebovce a Kosihovce majú veľký krajinársky potenciál.

MATERIÁL A METÓDY

Skúmané lokality sa nachádzajú v južnej časti Slovenska, v okrese Veľký Krtíš, v katastri obcí Čebovce a Kosihovce v nadmorských výškach od 235-430 m n. m.. Obe lokality patria do kotlinovej klímy (viď Tab. 1), suchej až vlhkej (KK/T), s priemernou ročnou teplotou 8,5ºC s ročným úhrnom zrážok 620 mm (TARÁBEK 1980).

Na základe literárnych prameňov (VĚTVIČKA, BERTOVÁ 1992; KERÉNYI-NAGY et al. 2011) sme sa zamerali na výskyt pôvodných i kultúrne zavedených druhov *Rosa* L. na skúmaných lokalitách. Determinácia jednotlivých taxónov *Rosa* L. bola vykonaná prostredníctvom kľúča uvedeného

v publikácii Flóra Slovenska IV/3 (VĚTVIČKA, BERTOVÁ 1992) a kľúča na určovanie ruží (KLÁŠTERSKÝ 1969; KERÉNYI-NAGY 2010) priamo v teréne, ale aj prostredníctvom fotodokumentácie.

Tab. 1 Klimatická charakteristika lokalít Kosihovce a Čebovce, (PAGANOVÁ, BAKAY 2008).

Lokalita	Geomorfologická jednotka	Expozícia	Nadmorská výška (*m*)	Priemerná teplota (°*C*)	Ročný úhrn zrážok (*mm*)	Klima-geografický typ/subtyp
Kosihovce	Juhoslovenská kotlina	J-JV	250	8,5	620	KK/T
Čebovce	Krupinská planina	J-JV	310	8,5	620	KK/T

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Terénnym prieskumom na skúmaných lokalitách a na základe kľúčov na určovanie (KLÁŠTERSKÝ 1969; VĚTVIČKA, BERTOVÁ 1992; KERÉNYI-NAGY 2010) spomenutých vyššie boli na skúmaných lokalitách determinované botanické druhy, ktoré sú popísané v Tab. 2.

Skúmaná lokalita Čebovce:
Rosa agrestis SAVI
Rosa bohemica H. BRAUN
Rosa canina L.
Rosa canina L. var. *squarrosa* (RAU) BORBÁS
Rosa dumetorum THUILL.
Rosa gallica L.
Rosa jundzilli BESSER
Rosa marginata WALLR.
Rosa micrantha BORRER EX SM. IN SOWERBY
Rosa rubiginosa L.
Rosa zalana WIESB.

Skúmaná lokalita Kosihovce:
Rosa agrestis SAVI
Rosa canina L.
Rosa canina L. var. *squarrosa* RAU
Rosa dumetorum THUILL.
Rosa gallica L.
Rosa jundzilli BESSER
Rosa jundzilli BESSER var. *livescens* (BESSER EX CELAK.) SOÓ
Rosa rubiginosa L.

Kultúrny výskyt ruží bol na oboch skúmaných lokalitách potvrdený nasledovne:
Rosa centifolia L. cv.
Rosa gallica L. var. *officinalis* (G)
Rosa rugosa THUNB.
Rosa villosa L.

ZÁVER

Ruže majú viacero cenných vlastností, pre ktoré sa využívajú v rôznych typoch úprav. Ich rôznorodosť umožňuje dosiahnutie rôznych efektov, ako aj voľbu rôznych typov stanovíšť. najširšie využitie môžu botanické druhy *Rosa* L. nájsť práve v krajinárskej tvorbe. Je to hlavne pre ich

mohutnejší vzrast, ako aj pre často expanzívny spôsob rastu. Sú ozdobou nielen pôvodných stanovíšť, ale vhodne dopĺňajú aj človekom vytvorené prvky, napríklad cyklotrasy, turistické chodníky, valy, umelo vytvorené stráne a podobne. Rovnako netreba zabudnúť na potenciál botanických druhov ruží pri obnove líniových, ale aj plošných prvkov nelesnej vegetácie v krajine.

Tab. 2 Údaje o taxónoch *Rosa* zo skúmaných lokalít Čebovce a Kosihovce.

Rosa agrestis SAVI Fl. Pis. 1, p. 475, 1798; husto rozkonárený habitus, konáre oblúkovito ohnuté alebo priame, alebo opieravá liana. Locus classicus: rovnomerné rozšírenie v panónskej i karpatskej oblasti.
Rosa bohemica H. BRAUN Verh. K. K. Zool. – Bot. Ges. Wien 35 (1) : 79. 1886 Locus classicus: Nemce
Rosa canina L. Sp. Pl. ed. 1, p. 491, 1753; lesy a lesné okraje - typická opieravá liana, otvorené priestranstvá - ker s krátkovekými konármi, vyhľadáva oporu Locus classicus: planárny až montánny stupeň SR – svetlé lesy, lesné svetliny a plášte; sekundárne osídlila medze, násypy , pasienky, neobrábané pôdy, opustené polia a vinice.
Rosa canina L. var. *squarrosa* (RAU) BORBÁS Fl. Centre France, ed. 3, 2: 222 (1857); lesy a lesné okraje - typická opieravá liana, otvorené priestranstvá - ker s krátkovekými konármi, vyhľadáva oporu Locus classicus: Eurázia
Rosa dumetorum THUILL. *Fl. Env. Paris (ed. 2) 250 250 1799.* mohutne rastúci ker Locus classicus: panónska oblasť
Rosa gallica L. Sp. Pl. ed. 1, p. 492, 1753; prútnatý, riedky ker, veľmi chudobne rozkonárený Locus classicus: suché výslnné stráne, prirodzené i umelo vytvorené (násypy, cesty, železnice), pasienky a antropicky ovplyvnená krajina, skalné štrbiny skalnaté stráne, v panónskej oblasti častá a hojná, maximum výskytu do 1000 m n. m.
Rosa jundzilli BESSER Cat. Horto Pl.Cremen. p. 117, 1816; prútnatý ker vytvárajúci riedke polykormóny, konáre oblúkovito ohnuté Locus classicus: výslnné medze pozdĺž ciest, suché stráne, pasienky, opustené vinice a polia, stredná Európa, maximálne do 1000 m n. m.
Rosa jundzilli BESSER var. *livescens* (BESSER EX CELAK.) SOÓ riedky, prútnatý ker Locus classicus: stredná Európa
Rosa marginata WALLR. *Annus botanicus Annus botanicus; 1815, 68. 1815.*vzpriamený, mohutný ker. Locus classicus: výslnné medze pozdĺž ciest, suché stráne, pasienky, opustené vinice a polia, stredná Európa
Rosa micrantha BORRER EX SM. IN SOWERBY ENGL. BOT. 35: t. 2490, 1812; nepravidelný, zväčša riedko rozkonárený ker, výnimočne ostnatá oporná liana Locus classicus: výslnné miesta, nelesné plochy, pasienky, opustené vinice, zriedka lesný plášť; severozápadná a stredná Európa
Rosa rubiginosa L. Mantissa Alt. p. 564, 1771; kompaktný ker so vzpriamenými alebo oblúkovito ohnutými konármi Locus classicus: suché, výslnné stráne, prevažne na vápencovom, ale aj na silikátovom podklade, výnimočne v lesných lemoch a pobrežných krovinách, max. výskyt cca. do 1050 m n. m.
Rosa zalana WIESB. Oesterr. Bot. Z. 29: 142, 1879. mohutný ker s oblúkovito ohnutými konármi Locus classicus: medze, výslnné stráne a pasienky, opustené vinice, lesné plášte; roztrúsene a vzácne sa vyskytuje v panónskej oblasti a v nižších polohách karpatskej oblasti
Kultúrny výskyt
Rosa centifolia L. cv. Sp. Pl. ed. 1, p. 491, 1753, prútnatý ker s hrubšími konármi a plnokvetými kvetmi Locus classicus: Kaukaz
Rosa gallica L. var. *officinalis The Garden, 1993, 118* p, 505; výbežkatý až plazivý ker; Locus classicus: centrálna a južná Európa
Rosa rugosa THUNB. F1. Jap. P. 213, 1784; nízky, prútnatý ker, tvorí husté, nepriepustné polykormóny Locus classicus: prevažne prímorské, pobrežné pásmo (Sachalin, Kamčatka, Kórea, Japonsko)
Rosa villosa L. Sp. Pl. ed 1, p. 491, 1753, prútnatý, rozkonárený ker s oblúkovitými konármi Locus classicus: lesné lemy, medze, pasienky, odlesnené plochy; severozápadná Európa, západná a južná Škandinávia

LITERATÚRA

APPLETON, G., BARRETT, S., HEALEY, K., MCAFFER, S., MCLOEOD, J., **MOODY, M.**, ROLLINS, J. 1999. The illustrated encyclopedia of Roses. Portland Oregon : Timber Press, Inc. 304 s. ISBN 0-88192-271-4

KERÉNYI-NAGY, V., 2010. Kľúč na určovanie botanických druhov ruží na Európskom kontinente. Nepublikovaný rukopis 2010.

KERÉNYI-NAGY, V., BAKAY L., ELIÁŠ, P. JUN. 2011. Adatok Hont vármegye rózsaflórájához. In: VII. Kárpát-medencei Biológiai Szimpozium, 13.-14. Október 2011. Budapest: Fővárosi Állat- és Növénykert, 2011, s. 133-138. ISBN 978-963-87343-4-1

KLÁŠTERSKÝ, I. 1969. Komplex *Rosa canina* v Československu. Zpravodaj Československé botanické společnosti č. 6/1969. Praha : ČSBS, 1969. S. 174-179

KUBA, J. 2003. 140. výročie narodenia grófky Márie Henriety Chotekovej (1863-1946). In: Krása ruží a tvarov: Časopis pestovateľov a milovníkov ruží, vol. 5/2003, s. 4-7

MAREČEK ET AL. 2001. Zahradnický slovník náučný. Most : Severografia a.s. s. 91-101. ISBN 80-7271-075-3

PAGANOVÁ, V. ET BAKAY, L., 2008. Perspektívy pestovania jarabiny oskorušovej (*Sorbus domestica* L.) na Slovensku. In: Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2008: Zborník abstraktov z medzinárodnej vedeckej konferencie, 15.-16. Október 2008. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV. s.71-72. ISBN 978-80-970028-8-6.

TARÁBEK, K., 1980. Klimageografické typy. In: Atlas Slovenskej socialistickej republiky. Bratislava : Slovenská akadémia vied, Slovenský úrad geodézie a kartografie, s.64

VĚTVIČKA, V. ET BERTOVÁ, L. 1992. *Rosa* L. Ruža. In: BARANEC, T., BERTOVÁ, L., GOLIAŠOVÁ, K., MARHOLD, K., PENIAŠTEKOVÁ, M., PLOCEK, A., SKALICKÝ, V., ŠÍPOŠOVÁ, H., ŠOURKOVÁ, M., VĚTVIČKA, V., WÓJCICKI, J. J., ZAHRADNÍKOVÁ, K. Flóra Slovenska IV/3. Bratislava : VEDA, s. 42-90. ISBN 80-224-0077-7

Adresa autorov

Ing. Katarína Rovná, PhD., E- mail: katarina.rovna@uniag.sk; Ing. Ladislav Bakay, PhD., E-mail: ladislav.bakay@uniag.sk – Katedra biotechniky zelene, FZKI SPU v Nitre, Tulipánová 7, 949 01 Nitra, 037/6415434,

BIOLOGICAL CHARACTERISATION OF *PINUS NIGRA* ARN. EMBRYOGENIC TISSUES IN LIQUID CULTURE SYSTEM

BIOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA EMBRYOGÉNNYCH PLETÍV *PINUS NIGRA* ARN. V TEKUTOM KULTIVAČNOM MÉDIU

TERÉZIA SALAJ – TERESA HAZUBSKA-PRZYBYL – RADOSLAVA MATÚŠOVÁ – KATARÍNA KLUBICOVÁ – JÁN SALAJ

SALAJ, T. – HAZUBSKA-PRZYBYL, T. – MATÚŠOVÁ, R. – KLUBICOVÁ, K. – SALAJ, J. 2016. Biological characterisation of *Pinus nigra* Arn. embryogenic tissues in liquid culture system. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 220-223. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Suspension cultures have been established from selected embryogenic cell lines of *Pinus nigra* Arn. The establishment and growth of tissues in liquid culture system were affected by inoculum weight and cell line/genotype. The growth of suspension cultures has been evaluated by non-destructive method as sedimented cell volume (SCV). The maturation of somatic embryos in liquid media was very limited without plantlet regeneration. Successful maturation and plantlet regeneration occurred on solid maturation medium.

Key words: conifers, sedimented cell volume, somatic embryos, suspension cultures

INTRODUCTION

Somatic embryogenesis is an *in vitro* developmental process of embryo differentiation from somatic cells of a plant body without fusion of gametes. During differentiation somatic embryos proceeds through morphological stages resembling development of their counterparts in seeds (zygotic embryos). In appropriate conditions the somatic embryos regenerate whole plants. Successful initiation of somatic embryogenesis for a conifer tree was first reported in Norway spruce (HAKMAN et al. 1985, CHALUPA 1985). The somatic process of somatic embryogenesis involves several steps as initiation of embryogenic tissues and their maintenance, maturation of somatic embryos, plantlet regeneration. The regenerated plantlets (somatic seedlings) can be transferred to *ex vitro* conditions and later to soil. Juvenile explants as immature or mature zygotic embryos as well as segments of seedlings (KRAJŇÁKOVÁ et al. 2008, SALAJOVÁ and SALAJ 2001) have been used for the initiation of embryogenic tissues. In recent years the „initiation window“ has been extended to explants taken from mature trees (KLIMASZEWSKA et al. 2011). The embryogenic tissues contain early somatic embryos – bipolar structures capable of maturation and somatic seedling regeneration. The process of somatic embryogenesis can be tool for theoretical studies as well as represents an efficient *in vitro* regeneration system for conifer micropropagation (SALAJ et al. 2015).

The embryogenic tissues are maintained on solid media by regular transfer in 2-3 weeks intervals and can be cultivated in liquid media as suspension cultures. PREIL (2005) defined suspension cultures „as single cells or small cell aggregates in agitated liquid media“. For conifer embryogenic tissues suspension cultures have been established for several species as *Abies nordmanniana* (NORGAARD et al. 1992), *Araucaria angustifolia* (JO et al. 2013), *Picea abies* (FIND et al. 1998, GORBATENKO and HAKMAN 2001), *Picea sitchensis* (KROGSTRUP 1990), *Pinus pinaster* (MIGUEL et al. 2001). Suspension cultures allow the study of different physiological parameters as growth, maturation capacity, cellular metabolism. The aim of the present work was to establish suspension cultures from *Pinus nigra* embryogenic tissues maintained on solid media as well as to study their growth, maturation capacity and structural characteristics.

MATERIAL AND METHODS

Initiation of embryogenic tissues: the green cones have been collected in early June from trees of *Pinus nigra* Arn. growing on natural stand (Drazovce). The immature seeds were excised from cones, surface sterilised in 10% H2O2, rinsed four times in sterile distilled water. The megagametophytes (containing immature zygotic embryos) isolated from surface sterilised seeds were used as explants. The megagametophytes have been placed on the surface of nutrient medium DCR (GUPTA and DURZAN, 1985) supplemented with 9 µM 2,4 D and 2.2 µM BA (details in SALAJ et al. 2014).

Establishment of suspension cultures: cell lines E138, E140, E141, E142, E144, E146, E153, E156, E157, E160, E167, E184, E193, E196) have been included in experiments. Well growing embryogenic tissues (0.5, 1.0, 2.5 g) in the exponential growth phase were resuspended in 25 ml of liquid DCR proliferation medium (the same composition as used for initiation). The suspension was cultivated in 100 ml Erlenmeyer flask on rotary shaker (100-110 rpm) in dark at 25°C. After one week of cultivation the first medium change occurred and during following cultivation the medium was changed in two-week´s intervals.

For growth analysis the non-destructive sedimented cell volume (SCV) was used. The content of Erlenmeyer flask was poured into measuring cylinders (volume 25 ml). The suspension was allowed to sediment for 30 min. and the sedimented cell volume was recorded. The structure of somatic embryos was followed using inverted microscope NIKON TMS-F.

Maturation of somatic embryos: for maturation cell lines containing well formed early somatic embryos have been selected. The DCR maturation medium was supplemented with 95 M abscisic acid (ABA), maltose (9%), 500 $mg.L^{-1}$ enzymatic casein hydrolysate, 50 $mg.L^{-1}$ L-glutamine. 3 ml of SCV was pipetted into maturation medium and the suspension was cultivated on rotary shaker at 100-110 rpm in dark at 25 °C. The structure of developing somatic embryos was followed on inverted microscope NIKON TMS-F.

RESULTS AND DISCUSSION

Initiation and maintenance of embryogenic tissues: initiation of tissues started around the second week of cultivation on nutrient medium. White mucilaginous tissue was protruded from micropylar end of megagametophyte. The tissue was rapidly growing and reaching 0.5 mm in size was separated from megagametophyte and cultured separately. Long-term maintenance of tissues occurred by transfer to fresh media in two-week´s intervals to fresh solid medium.

Suspension cultures: the establishment of suspension cultures and their growth was influenced by original inoculum. Unsuccessful establishment was observed using inoculum 0.5 g. The majority of cell lines failed to growth in liquid medium and minimum SCV increase was recorded. Using inoculum 1 or 2.5 g tissue resulted in establishment of well growing suspension reaching SCV up to 22 ml. The growth of suspension cultures was cell line dependent. The cultures were maintained by medium change in two-week´s intervals. The initial cell density used for transfer also influenced the growth of cultures. The slowly growing cell lines characterised by 3 - 4 ml of SCV showed better proliferation using 5 ml of SCV by transfers.

Structural aspects: the early somatic embryos are bipolar structures consisted of meristematic embryonal part („head“) subtended by long vacuolised suspensor cells. In conifer embryogenic tissues the early somatic embryos shared similar features (bipolar organisation), although their exact organisation is cell line dependent. This characteristic was also maintained during cultivation in liquid media.

Somatic embryo maturation: somatic embryo maturation in liquid medium has not been completed and no plantlets (somatic seedling) regeneration has been achieved. The embryonal

meristematic part enlarged as a result of mitotic activity of cells but no further development was observed. The maturation was more successful using solid media although this process was cell line dependent. Cell lines E140, E157, E184, E193, E196 produced cotyledonary somatic embryos capable of development and plantlet regeneration.

In *Pinus nigra* embryogenic suspension cultures have been established using tissues cultured on solid media. For successful establishment the initial weight of inoculum was important and affected the growth in liquid media. In conifer embryogenic tissues inoculum weight reached from 100 mg to 2 g (KROGSTRUP 1990, MIGUEL et al. 2001). On solid media the embryogenic tissues are rapidly growing and this characteristic is typical for suspension cultures, too. In suspension cultures of Norway spruce FIND et al. (1998) observed dry mass increase from 300 mg to 550 mg during the first 9-day period. No structural changes have been observed in relation to the culture medium or the culture period. Similarly, in *Pinus nigra* liquid media system the early somatic embryos retain their original structure. For several conifer species successful establishment and growth in liquid media has been referred, the maturation in most of species was limited (GÖSSLOVA 2000). Somatic embryo maturation from suspension cultures occurred when the proliferation took place in liquid medium and the maturation on solid medium (GORBATENKO and HAKMAN 2001, KROGSTRUP 1990).

In conclusion the *Pinus nigra* embryogenic tissues can be successfully cultivated in liquid media without undesirable changes of their structural organisation. The somatic embryo maturation in suspension was very limited and plantlet regeneration occurred only on solid media.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Slovak Grant Agency VEGA, proj. No. 2/0136/14.

REFERENCES

CHALUPA, V. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. In: Comm. Inst. For. Czechoslov. 14, 57-63.

FIND, J.I., NÖRGAARD, J.V., KROGSTRUP, P. 1998. Growth parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture. In: Journal of Plant Physiology 152, 510-571.

HAKMAN, I., FOWKE, L.C., VON ARNOLD S., ERIKSSON T. 1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). In: Plant Science 38, 53-59.

GORBATENKO, O., HAKMAN, I. 2001. Desiccation-tolerant somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets. In: International Journal of Plant Sciences 162, 1211-1218.

GÖSSLOVA, M. 2000. Norway spruce (*Picea abies* L. Karst): Somatic embryogenesis performed in liquid media and zygotic embryogenesis [in Czech]. Master Thesis, Faculty of Science, Charles University, Prague, 138 pp..

GUPTA, P.K., DURZAN, D. J. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). In: Plant Cell Reports 4, 177-179.

JO, L., DOS SANTOS, A.L.W., BUENO, C.A., BARBOSA, H.R., FLOH, E.I.S. 2013. Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. In: Tree Physiology 34, 94-104.

KLIMASZEWSKA, K., OVERTON, C., STEWARD, D., RUTLEDGE, R.G. 2011. Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. In: Planta 233, 635-647.

KRAJŇÁKOVÁ, J., GÖMÖRY, D., HÄGGMAN, H. 2008. Somatic embryogenesis in Greek fir. In: Canadian Journal of Forest Research 38, 760-769.

KROGSTRUP, P. 1990. Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embryogenic cell suspensions of *Picea sitchensis*. In: Plant Science 72, 115-123.

MIGUEL, C., TERESO, S., MARUM, L., GONCALVES, S., OLIVEIRA, M. 2001. Embryogenic liquid cultures of maritime pine. In: COST 843-WG2 Meeting, 22-25 September 2001, Thessaloniki, pp. 25-25.

NÖRGAARD, J.V., BALDURSSON, S., KROGSTRUP, P. 1992. Establishment of embryogenic suspension cultures from embryogenic cultures of *Abies nordmanniana*, osmotic effects. In: COST 87 Meeting-regeneration from suspension cultures. September 24-27, 1992, Drobak, Norway, pp. 67-69.

PREIL, W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. In: HVOSLEF-EIDE, A.K., PREIL, W. (eds) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Springer 2005, pp. 1-18. ISBN 978-1-4020-3200-4.

SALAJOVA T., SALAJ J. 2001. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon explants isolated from emblings and seedlings of hybrid firs. In: Journal of Plant Physiology 158, 747-755.

SALAJ, T., FRÁTEROVÁ, L., CÁRACH, M., SALAJ, J. 2014. The effect of culture medium formulation on *Pinus nigra* somatic embryogenesis. In: Dendrobiology 71, 119-128.

SALAJ, T., MATUSOVA, R., SALAJ, J. 2015. Conifer somatic embryogenesis - an efficient plant regeneration system for theoretical studies and micropropagation. In: Dendrobiology 74, 69-76.

Authors' addresses

RNDr. Terézia Salaj, DrSc., E-mail: terezia.salaj@savba.sk
RNDr. Radoslava Matúšová, PhD., E-mail: Radka.Matusova@savba.sk
Mgr. Katarína Klubicová, PhD., E-mail: katarina.klubicova@savba.sk
doc. RNDr. Ján Salaj, DrSc., E-mail: jan.salaj@savba.sk
Institute of Plant Genetics and Biotechnology, SAS, Akademická 2, 95007 Nitra, Slovak Republic;

Dr. Teresa Hazubska-Przybyl, E-mail: hazubska@o2.pl
Institute of Dendrology PAS, Laboratory of Reproduction Biology and Population Genetics, Parkowa 5, 62-035 Kornik, Poland

DRUHOVÁ DIVERZITA DREVÍN VO VIDIECKEJ KRAJINE

SPECIES DIVERSITY OF WOODY PLANTS IN THE RURAL LANDSCAPE

ATTILA TÓTH

TÓTH, A. 2016. Druhová diverzita drevín vo vidieckej krajine. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 224-228. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Woodlands and woody vegetation are important green infrastructure components in rural landscapes, especially in intensive agricultural landscapes, where natural and semi-natural forest cover has only a low land use proportion. This paper provides an analysis of linear woodlands along field roads in the municipality of Tvrdošovce (Slovakia), where species composition, diversity and spatial distribution were evaluated. The study area has been divided into sectors based on visual landscape features, which are easily identifiable in the field, such as intersections and curves in roads and intersections of roads with other features, such as administrative or land-use boundaries, watercourses, etc. Based on the species abundance, woody plants present in the sectors were categorised into 1) predominant, 2) complementary and 3) mixed-in species. The main finding is that among trees, mainly allochthonous species dominate and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) is the predominant tree species. It is up to 4 times more frequent than other predominant tree species. Introduced tree species prevail also among complementary and mixed-in species. Among shrubs, mainly native species dominate, while non-native species have a significantly lower proportion and spatial distribution.

Key words: Biodiversity; black locust; countryside; landscape architecture; woodland; woody vegetation

ÚVOD

Drevinová vegetácia je jedným zo základných nástrojov tvorby krajiny. Charakterizujú ju jej vlastnosti, schopnosti a výrazové znaky v rôznych štrukturálno-priestorových formách (SUPUKA et al. 2013). Vetrolamy a iné cieľavedome a zmysluplne zakladané prvky nelesnej drevinovej vegetácie v kultúrnej krajine boli vytvárané za účelom podpory efektívneho využitia krajiny. V súčasnosti ich možno považovať za stelesnenie ekologicky a esteticky hodnotných prvkov krajiny (KURZ, MACHATSCHEK, IGLHAUSER 2011). Ich hodnotenie v rámci vegetačných štruktúr krajinného priestoru je dôležitou súčasťou hodnotenia krajinného rázu (SALAŠOVÁ 2012). Druhová kompozícia a diverzita drevín v štruktúrach nelesnej drevinovej vegetácie je variabilná. Ich výskumu sa na rôznych územiach venovali viacerí autori (SUPUKA 1992; KURZ, MACHATSCHEK, IGLHAUSER 2011; SUPUKA et al. 2013; KUCZMAN 2014; TÓTH, KUCZMAN, FERIANCOVÁ 2016).

SUPUKA (1992) vyhodnotil dendrologickú štruktúru 19 vetrolamov v období od 1955 do 1960 a eviduje 28 druhov drevín, z nich 17 domácich a 11 introdukovaných. Pričom ako najpočetnejšie autochtónne druhy drevín eviduje *Rosa canina* L., *Sambucus nigra* L. a *Populus x canadensis* Moench a najpočetnejšie alochtónne druhy drevín *Robinia pseudoacacia* L., *Negundo aceroides* Moench, *Syringa vulgaris* L. a *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle.

SUPUKA et al. (2013) hodnotili taktiež vývoj a zmeny krajinnej štruktúry a biodiverzitu drevín v poľnohospodárskej krajine na 9 modelových katastrálnych územiach v Nitrianskom kraji, pričom najčastejšími druhmi drevín (zastúpenie vyššie ako 50 % v jednotlivých hodnotených sektoroch) boli napr. *Acer campestre* L., *Carpinus betulus* L., *Cerasus avium* (L.) Moench., *Fraxinus excelsior* L., *Juglans regia* L., *Malus domestica* Borkh., *Populus nigra* L., *Prunus cerasifera* Ehrh., *Prunus domestica* L., *Quercus robur* L., *Robinia pseudoacacia* L., *Salix alba* L., *Tilia cordata* Mill., *Lycium barbarum* L.,

Prunus spinosa L., *Rosa canina* L., *Sambucus nigra* L. a iné. Z nich najčastejšie (v najväčšom počte sektorov) dominoval strom *Robinia pseudoacacia* L. a ker *Rosa canina* L.

MATERIÁL A METÓDY

Územným objektom skúmania bolo vidiecke sídlo Tvrdošovce a jeho priľahlé krajinné priestory, ktoré okrem katastrálneho územia Tvrdošovce (okres Nové Zámky) čiastočne zasahujú aj do katastrálnych území okolitých obcí - Palárikovo, Jatov, Rastislavice, Šurany (okres Nové Zámky), Selice a Vlčany (okres Šaľa). Tvrdošovce predstavujú svojou rozlohou (5556 ha) a počtom obyvateľov (5301, stav k roku 2013) jednu z najväčších obcí Slovenska. Z geografického a geomorfologického hľadiska sa objekt skúmania nachádza v Podunajskej nížine (juhozápadné Slovensko), v celku Podunajská rovina. Z administratívneho hľadiska sa objekt skúmania nachádza v okrese Nové Zámky, v Nitrianskom kraji. Z regionálnopolitického hľadiska je významná integrovanosť obce v miestnej akčnej skupine Dolné Považie.

Objekt skúmania je charakteristickým nížinným poľnohospodárskym sídlom vidieckeho typu s vysokou bonitou pôdy prameniacou vo vodohospodárskej osobitosti lokality, ktorej história a súčasnosť sú späté s vodou - jazerami, vodnými tokmi, mokraďami a močiarmi. Poľnohospodársky využívaná pôda zaberá 82 % celkového územia katastra (orná pôda 79 %; ovocné sady 2 %; vinice 1 %); zastavané plochy a záhrady zaberajú 8 % katastrálneho územia (zastavané plochy 6 %; záhrady 2 %); trvalé trávne porasty a lesy zaberajú 6 % územia (trvalé porasty 5 %; lesný pôdny fond 1 %); vodné toky a plochy predstavujú 3 % územia. Nadmorská výška územia sa pohybuje medzi 112 a 125 m n. m. Sídlom vedie štátna cesta I. triedy 75 (ŠARAFÍN 2006).

Objekt skúmania sa nachádza v najteplejšej oblasti Slovenska, patrí do nížinnej podzóny slovenskej klímy, je súčasťou teplej klimatickej oblasti a patrí do teplého a suchého okrsku s miernou zimou. Priemerná ročná teplota vzduchu sa pohybuje medzi 9 a 10 °C. Priemerný ročný úhrn zrážok je 541 mm – najviac v mesiacoch jún a júl (58 mm). Prevládajúce prúdenie vetra je severozápadné, celková veternosť je mierna, priemerná rýchlosť vetra sa pohybuje v rozmedzí od 2,6 do 4,6 m/s (MINISTERSTVO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA SR 2002). Na celom riešenom území sa nachádzajú najúrodnejšie pôdne typy Slovenska, čiernice a černozeme s vysokým obsahom humusu, lokálne sa vyskytujú slaniská a slance. Pôdy sú mierne suché až mierne vlhké, majú neutrálnu až slabo-alkalickú pôdnu reakciu, sú neskeletnaté, hlinito-piesčité, piesčito-hlinité a hlinité. Geologickým podkladom sú neogénne sedimentárne panvy tvorené sivými a pestrými ílmi, prachmi, pieskami, štrkmi, slojkami lignitu, sladkovodnými vápencami a polohami tufitov. Základným geochemickým typom hornín sú pieskovce a ílovce. Riešené územie patrí do rajónu údolných riečnych náplavov. Kvartérny pokryv je tvorený prevažne nivnými humóznymi hlinami alebo hlinito-piesčitými až štrkovito-piesčitými hlinami dolinných nív. Základným typom reliéfu sú roviny a nivy, ktoré postupne prechádzajú do zvlnených rovín. Riešené územie leží na prelome Podunajskej roviny a Nitrianskej pahorkatiny (MINISTERSTVO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA SR 2002).

Celé riešené územie patrí do povodia Váhu. Územím obce pretekajú potoky a kanály melioračného charakteru s nízkym prietokom a nízkou kvalitou vody, na ktorých boli realizované rozsiahle vodohospodárske úpravy. Územím preteká Dlhý kanál (Cergát). Vodné toky na riešenom území vykazujú silný kyslíkový deficit a vysokú mieru eutrofizácie. Severne od obce, vo vzdialenosti 750 m, sa nachádza závlahová vodná nádrž o rozlohe 1 ha, využívaná ako rybník. Horizont podzemnej vody je v hĺbke 4,9 – 5,4 m pod povrchom, hladina podzemných vôd sa ustálila v hĺbke 2,9 – 3,5 m pod terénom. (MINISTERSTVO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA SR 2002; ŠARAFÍN 2006).

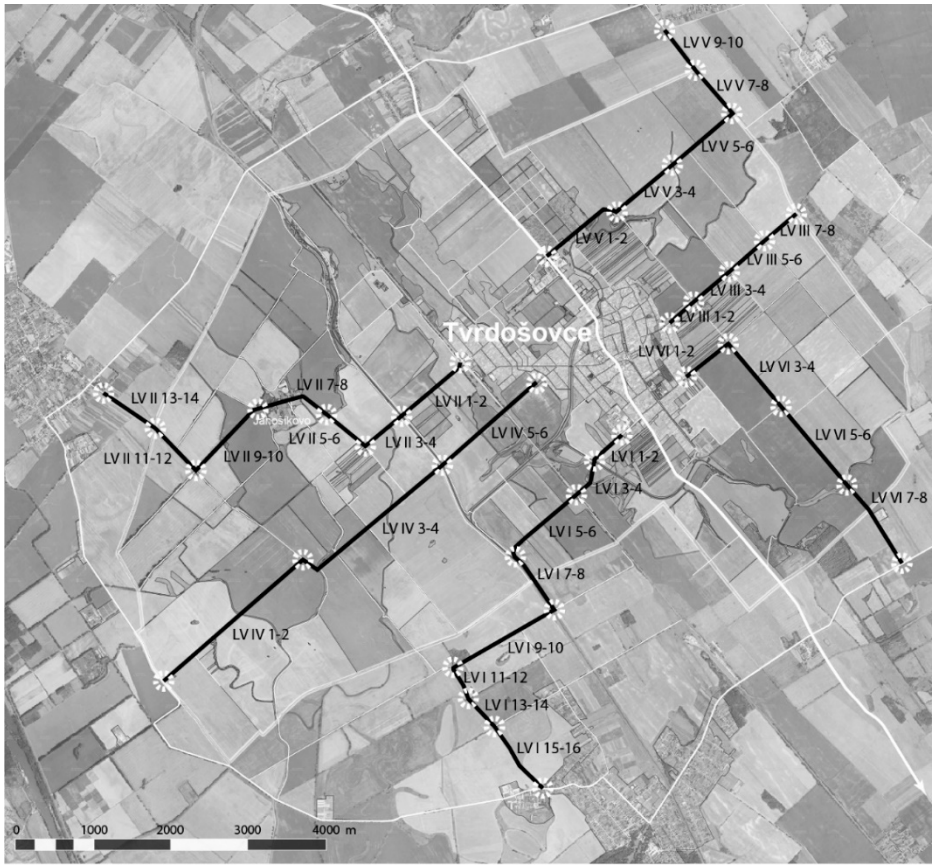
Potenciálnu prirodzenú vegetáciu predstavujú jaseňovo-brestovo-dubové lesy v povodiach veľkých riek (tvrdé lužné lesy) v druhovom zastúpení Ulmenion (*Ulmus minor, Ulmus laevis, Quercus robur, Sambucus nigra, Allium ursinum, Anemone ranunculoides*) (MINISTERSTVO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA SR 2002).

Na analýzu územia boli využité nasledovné mapové podklady: Letecké snímkovanie (ortografické fotomapy) z obdobia 2006-2013. © EUROSENSE, GEODIS Slovakia.; Súčasná katastrálna mapa obce Tvrdošovce; Základná báza GIS (ZB GIS) © Národný geoportál Slovenskej republiky, Slovenská agentúra životného prostredia

Výskum v teréne bol zameraný na analýzu plôch, priestorov, objektov a prvkov krajinnej zelene. Terénny výskum spočíval v priestorovo-štrukturálnej identifikácií a následnom mapovaní prvkov zelenej infraštruktúry v krajinnom priestore objektu výskumu. Pri vegetačných komponentoch krajinnej zelenej infraštruktúry bola určená druhová kompozícia a diverzita, resp. funkcia vegetačného prvku. V rámci dokumentácie a mapovania štruktúr drevinovej vegetácie boli sledované a zaznamenané nasledovné parametre: 1) poradové číslo objektu alebo úseku; 2) dĺžka mapovaného úseku; 3) názov lokality; 4) kód lokality; 5) dominantné druhy stromov; 6) doplňujúce druhy stromov; 7) individuálna alebo skupinová prímes stromových druhov; 8) dominantné druhy krov; 9) doplňujúce druhy krov; 10) individuálna alebo skupinová prímes krovitých druhov. Výsledky terénneho výskumu boli vyhodnotené podľa početnosti druhov v jednotlivých kategóriách (dominantné druhy / doplňujúce druhy / individuálna a skupinová prímes), čím sa dosiahla reprezentatívna a výpovedná vzorka druhovej kompozície a diverzity drevinovej vegetácie v sídle a krajine.

Na meranie dendrometrických parametrov boli použité nasledovné činidlá: pásmo (meranie vzdialeností a obvodov kmeňa) a optický výškomer SUUNTO PM-5/1520 na meranie výšky drevín. Šírky korún boli určené vyhodnotením vizuálnej proporcie medzi výškou dreviny a šírkou koruny, následne overené premeraním vo vektorovom grafickom programe Adobe Illustrator, s prepočtom šírky a výšky dreviny podľa známych veľkostných veličín meracích pomôcok.

Na skúmanom území bolo celkovo zdokumentovaných a zmapovaných 30 103 metrov poľných ciest, ktoré boli rozdelené na 31 sektorov, resp. úsekov poľných ciest. V rámci týchto boli vyhodnotené dominantné, doplňujúce a primiešané druhy stromov a krov.



Obr. 1 Rozdelenie mapovaných štruktúr nelesnej drevinovej vegetácie na sektory.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z kompozičného hľadiska tvorí nelesná drevinová vegetácia sprevádzajúca poľné cesty v krajinnom priestore obce Tvrdošovce obojstranné alebo jednostranné, priestorovo súvislé líniové porasty. Zriedkavejšie ide o lineárne usporiadanie jednotlivých stromov. Z hľadiska priestorovej kompozície a percepcie vznikajú vnútorné priestory poľných komunikácií a vonkajšie priestory, ktoré sú vnímané väčšinou vo forme priehľadov z vnútorného priestoru cez formácie drevinovej vegetácie.
Absolútne dominujúcim stromovým druhom vo formáciách sprievodnej vegetácie poľných ciest sú agáty biele (*Robinia pseudoacacia* L.) a krovitým druhom baza čierna (*Sambucus nigra* L). Najčastejšími doplňujúcimi stromami sú slivky čerešňoplodé (tzv. myrobalán, ľudovo nazývané aj ringloty) - *Prunus cerasifera* Ehrh. a orechy vlašské - *Juglans regia* L. a z krovitých druhov šípkové ruže - *Rosa canina* L. Častou prímesou sprievodnej drevinovej vegetácie poľných ciest sú dreviny invazívneho charakteru ako pajasene (*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle). Z krovitých druhov tvoria najčastejšiu prímes svíby (*Swida sanguinea* (L.) Opiz.), trnky (*Prunus spinosa* L.) či bršleny (*Euonymus europaeus* L.). Na základe zistení odporúčame postupné zvyšovanie podielu domácich druhov drevín, s výrazným zastúpením dlhovekých taxónov, ktorých súčasné zastúpenie v krajinnom priestore je nízke. Z hľadiska krajinného obrazu a scenérie, ako aj z hľadiska dietetického režimu voľne žijúcej fauny je žiaduce zvýšenie podielu ovocných stromov.

Tab. 1. Najčastejšie sa vyskytujúce druhy drevín v štruktúrach nelesnej drevinovej vegetácie pozdĺž poľných ciest v krajinnom priestore obce Tvrdošovce.
Tabuľka zaznamenáva druhy, ktoré sa vyskytujú aspoň v štyroch hodnotených sektoroch, pričom hodnoty v zátvorkách predstavujú počet sektorov, v ktorých sa daný taxón vyskytuje ako dominantný druh, doplňujúci druh alebo prímes.

Rastová charakter.	Dominantné druhy	Doplňujúce druhy	Prímes
Stromovité druhy	*Robinia pseudoacacia* L. (16); *Populus nigra* L. (4); *Prunus cerasifera* Ehrh. (4)	*Prunus cerasifera* Ehrh. (10); *Juglans regia* L. (8); *Fraxinus angustifolia* Vahl (5); *Robinia pseudoacacia* L. (5); *Fraxinus ornus* L. (4); *Populus x canadensis* Moench (4)	*Prunus cerasifera* Ehrh. (13); *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle (9); *Juglans regia* L. (7); *Cerasus avium* (L.) Moench (6); *Populus nigra* L. (6); *Malus domestica* Borkh. (5); *Salix alba* L. (5); *Morus alba* L. (4); *Negundo aceroides* Moench (4); *Populus alba* L. (4)
Krovité druhy	*Sambucus nigra* L. (20); *Rosa canina* L. (9); *Prunus spinosa* L. (7)	*Rosa canina* L. (12); *Sambucus nigra* L. (6); *Euonymus europaeus* L. (4); *Swida sanguinea* (L.) Opiz (4); *Prunus spinosa* L. (4)	*Swida sanguinea* (L.) Opiz (6); *Prunus spinosa* L. (5); Euonymus europaeus L. (4); *Rosa canina* L. (4); *Sambucus nigra* L. (4)

Robinia pseudoacacia L. je jednoznačne prevládajúcim taxónom, čo zodpovedá zisteniam aj iných autorov, ktorí skúmali druhové zloženie drevín v biokoridoroch západného Slovenska (SUPUKA et al. 2013; BARANEC et al. 2015). Toto zistenie je možné považovať za jednoznačnú evidenciu výraznej distribúcie tohto cudzokrajného taxónu v poľnohospodárskej krajine Slovenska, čo je jednak výsledkom nevhodných výsadieb drevín, najmä v minulom storočí, ako aj vitálnej a v niektorých prípadoch až invazívnej distribúcie tohto taxónu (GOJDIČOVÁ et al. 2002). Zo zistení vyplýva potreba zvýšenia podielu domácich druhov drevín, ktoré viacerí autori považujú za jeden zo základných nástrojov obnovy a tvorby krajinného rázu a identity prostredia (INSLEY et al. 1988; THOMPSON et al. 2009; REY BENAYAS, BULLOCK 2015), ako aj za základnú stratégiu manažmentu prírodných zdrojov v poľnohospodárskej krajine (BARRETT et al. 2008).

ZÁVER

Na základe analýz, syntéz, interpretácií a evalvácií vegetačných prvkov zelenej infraštruktúry v krajinnom priestore sme získali podrobný a výpovedný prehľad o súčasnej vegetačnej štruktúre, jej druhovej kompozícií, diverzite a genofondovom bohatstve. Prezentované výsledky rozširujú súčasný stav poznania druhovej kompozície, diverzity a priestorovej distribúcie nelesnej drevinovej vegetácie v poľnohospodárskej krajine. Zo zistení vyplýva, že medzi stromami dominujú introdukované druhy, kým medzi krami prevládajú domáce druhy. Zaznamenaný bol taktiež nízky podiel a distribúcia dlhovekých stromov v krajinnom priestore.

POĎAKOVANIE

Výskum bol finančne podporený Ministerstvom školstva, vedy, výskumu a športu SR v rámci grantov KEGA 001SPU-4/2014 a KEGA 008SPU-4/2016.

LITERATÚRA

BARANEC, T., IKRÉNYI, I., GALUŠČÁKOVÁ Ľ. 2015. Vegetácia biokoridorov na JZ Slovensku. In: *Dedroflóra strednej Európy*. Zvolen: TU Zvolen, Arborétum Borová Hora, 2015, s. 111-119.

BARETT, G.W., FREUDENBERGER, D., DREW, A., STOL, J., NICHOLLS, A.O., CAWSEY, E.M. 2008. Colonisation of native tree and shrub plantings by woodland birds in an agricultural landscape. In: *Wildlife Research,* roč. 35, č. 1, 2008, s. 19-32.

GOJDIČOVÁ, E., CVACHOVÁ, A., KARASOVÁ, E., 2002: *Zoznam nepôvodných, inváznych a expanzívnych cievnatých rastlín Slovenska 2.* Ochrana prírody, Banská Bystrica, 21: 59–79.

INSLEY, H., DAVIES, H.L., CRAVEN, D.R.J., MACKENZIE, R.F., JONES, G.B., MARSHALL, B.A. et al., 1988: *Farm Woodland Planning.* London: Her Majesty's Stationery Office, 142 p.

KUCZMAN, G. 2014. Landscape Structure and Biodiversity of Woody Plants in the Cadastral Territory of Kolíňany. In: *Journal of Environmental Protection, Safety and Management,* roč. 4, č. 2, 2014, s. 25-32.

KURZ, P., MACHATSCHEK, M., IGLHAUSER, B. 2011. *Hecken: Geschichte und Ökologie; Anlage, Erhaltung & Nutzung*. 2. Auflage. Graz; Stuttgart: Leopold Stocker Verlag. 440 s. ISBN 978-3-7020-1315-8.

MINISTERSTVO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA SR. 2002. *Atlas krajiny Slovenskej republiky.* Bratislava; Banská Bystrica : Slovenská agentúra životného prostredia. 1. vyd. 344 s. ISBN 80-88833-27-2.

REY BENAYAS, J.M., BULLOCK, J.M. 2015. Vegetation restoration and other actions to enhance wildlife in European agricultural landscapes. In: *Rewilding European Landscapes*, Springer International Publishing, s. 127-142.

SALAŠOVÁ, A. 2012. Ochrana krajinného rázu a rozvoj valašské dědiny. In: *Životné prostredie - Revue pre teóriu a starostlivosť o životné prostredie*, roč. 46, č. 4, 2012, s. 186-192.

SUPUKA, J. 1992. Dendrologické otázky tvorby poľnohospodárskej krajiny južného Slovenska. In: *Introdukované dreviny v prírodnom prostredí južného Slovenska*. Zvolen: LVÚ, s. 30-43

SUPUKA, J., ŠINKA, K., PUCHEROVÁ, Z., VEREŠOVÁ, M., FERIANCOVÁ, Ľ., BIHUŇOVÁ, M., KUCZMAN, G. 2013. *Landscape Structure and Biodiversity of Woody Plants in the Agricultural Landscape*. Brno: Mendel University in Brno. 187 s. ISBN 978-80-7375-905-6.

ŠARAFÍN, M. et al. 2006. *Územný plán obce Tvrdošovce.* Bratislava: Ateliér Domova. 2006. 152 s.

THOMPSON, J.R., MOILANEN, A., VESK, P.A., BENNETT, A.F., MAC NALLY, R. 2009. Where and when to revegetate?: A quantitative method for scheduling landscape reconstruction. In: *Ecological Applications*, roč. 19, 2009, s.817-827.

TÓTH, A. 2015. *Zelená infraštruktúra vidieckeho sídla a priľahlej krajiny*: doktorandská dizertačná práca. Nitra: Slovenská poľnohospodárske univerzita. 120 A3 s.

TÓTH, A., KUCZMAN, G., FERIANCOVÁ, Ľ. 2016. Species Composition and Diversity of Non-Forest Woody Vegetation along Roads in the Agricultural Landscape. In: *Lesnícky časopis - Forestry Journal*, roč. 62, č. 1, 2016, s. 56-66.

Adresa autora

Ing. Attila Tóth, PhD., Katedra záhradnej a krajinnej architektúry FZKI SPU v Nitre, Tulipánová 7, 949 76 Nitra, 037 641 5423, attila.toth@uniag.sk

PLANT EXTRACTS: ALTERNATIVE *IN VITRO* SUPPLEMENTS TO PRESERVE MALE FERTILITY

RASTLINNÉ EXTRAKTY: ALTERNATÍVNE *IN VITRO* SUPLEMENTY PRE PREZERVÁCIU SAMČEJ FERTILITY

EVA TVRDÁ – JAROSLAV MICHALKO – ILDIKÓ MATUŠÍKOVÁ – NORBERT LUKÁČ

TVRDÁ, E. – MICHALKO, J. – MATUŠÍKOVÁ, I. – LUKÁČ, N. 2016. Plant extracts: alternative *in vitro* supplements to preserve male fertility. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 228-238. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
A variety plant extracts have the potential to exhibit protective or antioxidant properties on the spermatozoon, thus they may extend the lifespan of stored semen. This study compared the ability of *Drosera* and *Chlamydomonas* extracts on the motility, viability and superoxide production of bovine spermatozoa during different time periods (0, 2, and 24h) of *in vitro* culture. Spermatozoa motility was assessed using the SpermVision™ CASA (Computer aided sperm analysis) system. Cell viability was examined using the metabolic activity MTT assay and the nitroblue-tetrazolium (NBT) test was applied to quantify the intracellular superoxide formation. Both extracts were able to prevent a rapid decline of spermatozoa motility, especially in the case of concentrations ranging between 1 and 5 mg/mL ($P<0.001$ with respect to 24h). At the same time, concentrations ranging between 1 and 10 mg/mL of the extracts led to a significant preservation of the cell viability particularly throughout long-term periods of the experiment ($P<0.001$ in case of Time 24h). 5 and 10 mg/mL of the extracts exhibited antioxidant characteristics, translated into a significant reduction of the intracellular superoxide production, particularly notable at Time 24h ($P<0.001$). The results indicate that both extracts are capable of delaying the damage inflicted to spermatozoa by the *in vitro* environment.

Key words: *Drosera*, *Chlamydomonas*, spermatozoa, motility, viability, superoxide production

INTRODUCTION

Over the past years, numerous studies have emphasized on the beneficial effects of oral supplementation of energetic or antioxidant substances on semen quality and male fertility in animals and humans (DONNELY et al. 1999; AGARWAL and SEKHON 2010). Nevertheless, knowledge concerned with the *in vitro* effects of bioactive molecules exhibiting potentially stimulating or protective effects on the spermatozoon is still widely limited, contradictory or controversial. At the same time, *in vitro* data are elementary for further progress in practical andrology, as it has been systematically shown that a variety of biologically active compounds may protect male reproductive cells against the loss of motility or viability. Subsequently, this information may be highly applicable for spermatozoa handling protocols in medical and veterinary laboratories for long-term semen preservation, artificial insemination and *in vitro* techniques.

Recently, a wast number of biologically active secondary metabolites of plant origin have been found to have promising commercial applications as drugs (SIVANATHAN and SCHERKENBECK 2014), flavors (WALCH et al. 2011), dietary supplements (ESWARAN and BHAGRAVA 2014), or other types of speciality chemicals. Natural compounds obtained as isolates may be useful directly or may serve as lead compounds for the subsequent design of related molecules that could be more active or less toxic (HONDA 2012). It is not a coincidence that natural products have played, and will continue to play a seminal role in the discovery and development of pharmaceutically and agrochemically important agents. Molecules such as flavonoids, polyphenols, stilbenes or carotenes isolated from natural sources show great promise as therapeutic agents in human and veterinary medicine (HUCZYŃSKI 2012), protective molecules against microbial or environmental toxicity (JASZEK et al. 2013)

or as effective additives enhancing animal and human health (GIL-CHÁVEZ et al. 2013). In spite of a great promise of bioactive molecules in biomedical and veterinary research, it is necessary to conduct further investigations to understand their complex intra- and intercellular mechanism of action as well as to establish specific doses for their *in vivo* or *in vitro* implementation.

As such, this study was focused to assess the *in vitro* effects of plant exctracts isolated from two species showing a promising potential as a source of valuable bioactive molecules - *Drosera rotundifolia* L. and *Chlamydomonas reinhardtii* on the functional activity of bovine spermatozoa.

MATERIAL AND METHODS

Drosera rotundifolia L. and *Chlamydomonas reinhardtii* were grown aseptically on an agar medium (1/2 Murashige- Skoog, 10 % sucrose, 0.6 % plant agar, pH 5.2) in 225 mL plastic boxes and growth chamber under a 16/8 day/night period at 22°C. After collection and drying, the tissues were crushed, weighed and soaked in ethanol p.a. (96 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) during two weeks at room temperature in the dark. Exposure to sunlight was avoided to prevent the degradation of active components. The ethanolic extracts were subjected to evaporation under reduced pressure at 40 °C in order to remove ethanol (Stuart RE300DB rotary evaporator, Bibby Scientific Limited, UK, and vaccum pump KNF N838.1.2KT.45.18, KNF, Germany). Crude extracts were dissolved in DMSO (Dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to equal 1000 mg/mL as a stock solution (MICHALKO and MATUŠÍKOVÁ 2012).

Bovine semen samples were obtained from 10 adult breeding bulls (Slovak Biological Services, Nitra, Slovak Republic) on a regular collection schedule using an artificial vagina. The ejaculates had to accomplish the basic criteria given for the corresponding breed. After collecting the samples were stored in the laboratory at room temperature (22–25°C). Each sample was diluted in physiological saline solution (PS; sodium chloride 0.9 % w/v; Bieffe Medital, Italia) containing various concentrations of the *Drosera* or *Chlamydomonas* extact (A – 50; B – 10; C – 5; D – 1; E – 0.5 mg/mL) using a dilution ratio of 1:40. The samples were cultured at room temperature (22-25°C). The control (Ctrl) group (medium without extract supplementation, containing 0.5% DMSO) was compared to the experimental groups at culture times of 0, 2 and 24 h.

Spermatozoa motility (percentage of spermatozoa with a motility >5 µm/s; %; MOT) was examined with the help of the Computer-aided sperm analysis (CASA) system using the SpermVision™ program (Minitube, Tiefenbach, Germany) and Olympus BX 51 phase contrast microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The samples were placed into the Makler Counting Chamber (depth 10 µm, 37°C; Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) and immediately assessed. At least 1000 cells were evaluated in each sample.

Viability of the cells exposed to the extracts was evaluated by the metabolic activity (MTT) assay. This colorimetric assay measures the conversion of 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) to purple formazan particles by mitochondrial succinate dehydrogenase of intact mitochondria of living cells. Formazan can then be measured spectrophotometrically at a measuring wavelength of 570 nm against 620 nm as reference by a microplate ELISA reader (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific, Finland). The data are expressed in percentage of control (KNAZICKA et al. 2012).

The nitroblue-tetrazolium (NBT) test was used to assess the intracellular formation of superoxide radical. This assay is conducted by counting the cells containing blue NBT formazan deposits, which are formed by reduction of the membrane permeable, water-soluble, yellow-colored, nitroblue tetrazolium chloride (2,2'-bis(4-nitrophenyl)-5,5'-diphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'- diphenylene)ditetrazolium chloride; Sigma-Aldrich) and superoxide radical. Formazan can be measured spectrophotometrically at a measuring wavelength of 620 nm against 570 nm as reference by a microplate ELISA reader (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific). The data were expressed in percentage of control (TVRDÁ et al. 2013).

Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism program (version 3.02 for Windows; GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Descriptive statistical characteristics (mean, standard error) were evaluated at first. One-way ANOVA with Dunnett's post test was used for statistical evaluations. The level of significance was set at *** (P<0.001); ** (P<0.01); * (P<0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

Drosera rotundifolia L.

Over the past years, *Drosera* has emerged as a plant exhibiting a complex biological activity. Due to its remarkably broad range of effects, especially with respect to antibacterial, anticancer, antiinflamatory protection and longevity, the *Drosera* genus has attracted a widespread scientific and consumer interest (ASIRVATHAM et al. 2013; FUKUSHIMA et al. 2009; KAČÁNIOVÁ et al. 2014). Different studies have reported that Drosera extracts are well absorbed and rapidly metabolized, at the same time they seem to be well tolerated and no distinct toxicity was reported (ASIRVATHAM et al. 2012; KRYCHOWIAK et al. 2014). However, *in vitro* experiments show that *Drosera* extracts may have a dose-dependent activity on the cultured cells, displaying an interesting dichotomy: low doses may improve cell survival, yet high doses may lead to cell death (ASIRVATHAM et al. 2013).

The CASA assessment showed a continuous decrease of spermatozoa motion in all groups over the course of the 24h *in vitro* culture (Table 1). The initial (Time 0h) MOT was higher in the experimental groups B-E (0.5-10 mg/mL extract) when compared to the control group (0 mg/mL extract), although without any statistical significance (P>0.05). A statistically significant motion-promoting effect of the *Drosera* extract became visible after 2h, specifically in the group C (P<0.05). Furthermore, 50 mg/mL extract (group A) caused a non-significant decrease of the spermatozoa MOT (P<0.05). At the end of the experiment (24h), the MOT observed in the experimental groups supplemented with 0.5-10 mg/mL *Drosera* extract (groups B – E) was significantly higher in comparison with the control (P<0.05 in case of group B; P<0.001 with respect to groups C-E). Meanwhile, MOT was significantly decreased in the group A (P<0.001), supplemented with the highest concentration of the *Drosera* extract (50 mg/mL) after a comparison with the Ctrl group (Table 1).

Tab. 1 Spermatozoa motility (%) in the absence (Ctrl) or presence (A-E) of *Drosera* extract during different time periods (Mean±SEM; n=10).

Groups	Ctrl	A	B	C	D	E
Time 0h	86.22±3.33	81.51±1.44	85.25±1.75	91.44±1.83	92.02±2.41	88.99±1.26
Time 2h	80.99±3.10	72.91±2.58	79.88±2.48	88.85±4.02**	86.55±1.71	84.55±2.14
Time 24h	40.11±3.11	8.09±1.24***	47.65±1.51*	69.12±1.88***	67.09±2.32***	56.19±1.48***

***(P<0.001); **(P<0.01); *(P<0.05). Ctrl – 0; A – 50; B – 10; C – 5; D – 1; E – 0.5 mg/mL *Drosera* extract.

According to the MTT assay, instant *Drosera* administration (Time 0h and 2h) had no significant effects on the sperm cell viability in any of the experimental groups (P>0.05; Figure 1). At 24h it was revealed that 1-10 mg/mL extract (groups B-D) had a stimulating and vitality- promoting effect on the bovine gametes, alongside with statistically significant results when compared to the control group (Figure 1; P<0.05 in case of group E; P<0.001 with respect to groups B-D). Similar to the CASA analysis, the MTT test revealed an inhibition in the cell viability followed by the administration of 50 mg/mL *Drosera* extract (group A), particularly during the long-term timeframe of the *in vitro* culture (P<0.001).

It has been previously stated that *Drosera* species contain a grant variety of biologically active compounds including flavonoids, quercetin, plumbagin or elagic acid (ASIRVATHAM et al. 2013), all of which have been extensively studied for their potential roles on spermatozoa generation or *in vitro* survival. Improved spermatozoa motility and mitochondrial activity after quercetin

administration was recorded in different studies on fresh as well as frozen mammalian semen samples (TAEPONGSORAT et al. 2008; TVRDÁ et al. 2014). Moreover quercetin has been reported to act as a possible specific inhibitor of plasma membrane calcium-ATPase, inducing an increase of intracellular calcium, thus exhibiting modulatory effects on sperm capacitation (CÓRDOBA et al. 2005). Meanwhile, ellagic acid has been shown to possess protective effect on chemically-induced testicular and spermatozoal toxicity in male rats. Administration of this substance re-established testosterone production, decreased testicular apoptosis and led to improvements in the histopathological assessment of the testicular tissue (ÇERIBAŞ et al. 2012). In a different study, ellagic acid supplementation markedly decreased abnormal sperm rates, and increased epidiymal sperm concentration as compared to the spermatogenesis in rats with chemically-induced testicular toxicity. Additionally, the induced histopathological damages were totally or partially recovered by ellagic acid (ATEŞŞAHIN et al. 2010). On the other hand, plumbagin (2-methyl-5-hydroxy,1:4naphthoquinone) supplementation exerted negative effects on the sperm count and motility in mice (SUKARDI et al. 2009), being presumably at least partially responsible for the antifertility effects of *Drosera burmannii* extracts on *in vivo* reproductive performance (MADHAVAN et al. 2009).

Although *Drosera* extract had no instant effects on the oxidative balance within the *in vitro* spermatozoa culture ($P>0.05$; Time 0h and 2h; Figure 2), experiments following a 24h cultivation revealed that the administration of 5 and 10 mg/mL extract led to a significant decline of the escalating intracellular superoxide production, considered to be the first step in the creation of oxidative stress ($P<0.001$ in terms of 5- 10 mg/mL, $P<0.01$ with respect to concentrations of 0.5-1 mg/mL; Figure 2). On the other hand, high (group A) concentrations of *Drosera* exhibited pro-oxidant properties reflected in a significant superoxide overproduction and deepening the detrimental effects in a time-dependent manner ($P<0.01$; Time 24h; Figure 2).

Numerous studies have emphasized on the fact that *Drosera* species possess significant antioxidant and anticancer activities when tested in different *in vitro* models (ASIRVATHAM et al. 2013; FUKUSHIMA et al. 2009; KAČÁNIOVÁ et al. 2014). The antioxidant ability could be attributed to the exceptionally high content of phenolic compounds, particularly flavonoids with potent ROS-scavenging activities. Thus, *Drosera* extracts could be promising natural sources of antioxidants, possibly used in nutritional or pharmaceutical industry for the prevention of ROS-mediated diseases. The *in vitro* antioxidant activity of *Drosera indica* L extracts were extensively studied using several routinely available laboratory methods (ASIRVATHAM et al. 2013). All assessments have provided evidence on a significant antioxidant potential of the extracts in comparison with the reference antioxidant, ascorbic acid. Ethanol as well as aqueous *Drosera* extracts exhibited significant scavenging effects on the hydroxyl radical (•OH), which results in the suppression of •OH generation and inhibition of lipid peroxidation (KLEIN et al. 1991; THAMBIRAJ et al. 2012). At the same time, the extracts behaved as chelating agents forming sigma bonds with different metals reducing the redox potential (GULCIN et al. 2009; ASIRVATHAM et al. 2013). Our NBT results complement the report by ASIRVATHAM et al. (2013) who studied the potential of *Drosera* extracts to consume superoxide. Overproduction of superoxide radical may contribute to redox imbalance and is associated with harmful physiological consequences (GULCIN et al. 2009). From their results, it was found that the Drosera extracts showed potent superoxide scavenging activity compared to ascorbic acid. Phenolic compounds have been repeatedly shown to have beneficial effects of the oxidative balance in male reproductive tissues and cells. As shown by ATEŞŞAHIN et al. (2010) biologically active compounds frequently found in Drosera plants were able to significantly decrease lipid peroxidation, restore glutathione synthesis and catalase activity, associated with normal spermatogenesis and sperm viability. In a different study (ÇERIBAŞ et al. 2012), polyphenol administration led to markedly decreased testicular lipid peroxidation, and increased the glutathione level, glutathione peroxidase and catalase activities leading to an overall restoration of the antioxidant balance in the male reproductive system.

Chlamydomonas reinhardtii

Due to their broad range of effects, particularly with respect to antibacterial, anti-inflamatory protection and antioxidant mechanisms, algae such as *Chlamydomonas*, *Chlorella* or *Gelidiella* have significantly attracted the attention from the scientific community (ANNAMALAI and NALLAMUTH 2014; KIGHTLINGER et al. 2014).

The CASA assessment showed a continuous decrease of spermatozoa motility in all groups over the course of a 24h *in vitro* culture (Table 2). The initial (Time 0h) MOT was insignificantly higher in the experimental groups B-D (0.5-5 mg/mL extract) when compared to the control group (0 mg/mL *Chlamydomonas*; P>0.05). A statistically significant motion-promoting effect of the *Chlamydomonas* extract became visible after 2h, specifically in the group C (P<0.05). Moreover, 50 mg/mL extract (group A) caused a non-significant decrease of the spermatozoa MOT (P>0.05). At the end of the experiment (24h), the MOT observed in groups supplemented with 0.5-10 mg/mL *Chlamydomonas* extract (experimental groups B-F) was significantly higher in comparison with the control (P<0.05 in case of group B; P<0.001 with respect to groups C-E; P<0.01 in relation to the group F). Meanwhile, MOT was significantly decreased in the group A (P<0.001), supplemented with the highest concentration of the extract after a comparison with the Ctrl group (Table 1).

Tab. 2 Spermatozoa motility (%) in the absence (Ctrl) or presence (A-E) of *Chlamydomonas* extract during different time periods (Mean±SEM; n=10).

Groups	Ctrl	A	B	C	D	E
Time 0h	90.11±2.17	83.02±1.19	90.90±1.17	90.20±1.44	91.06±1.29	88.25±1.98
Time 2h	82.48±3.15	75.40±1.46	86.64±1.58	90.00±1.79*	87.23±1.41	84.15±1.14
Time 24h	41.15±1.81	9.45±1.67***	49.82±2.61*	66.91±3.24***	65.34±2.23***	56.03±2.27***

***(P<0.001); **(P<0.01); *(P<0.05). Ctrl – 0; A – 50; B – 10; C – 5; D – 1; E – 0.5 mg/mL *Chlamydomonas* extract.

According to the MTT assay, instant *Chlamydomonas* supplementation (Time 0h and 2h) had no significant effects on the sperm cell viability in any of the experimental groups (P>0.05; Figure 1). At 24h it was revealed that 1-10 mg/mL extract (groups B-D) had a viability promoting effect on the cell, alongside with statistically significant results (P<0.05 in case of group D; P<0.001 with respect to groups B and C). Correspondingly to the CASA analysis, the MTT test revealed an inhibition of the cell viability followed by the administration of 50 mg/mL Chlamydomonas (group A), particularly during long-term timeframe of the *in vitro* culture (P<0.01; Time 24h; Figure 1).

It has been previously stated that *Chlamydomonas* contains a variety of flavonoids, such as isoflavones, flavanones, flavonols and dihydrochalcon, all of which have been extensively studied for their potential roles on spermatogenesis or *in vitro* sperm survival. Improved spermatozoa motility and mitochondrial activity after flavonoid administration was recorded in different studies on fresh as well as frozen goat, mouse and human semen (PURDY et al. 2004; MAZZI et al. 2011; TUNG et al. 2014). Furthermore, IBRAHIM et al. (2014) have shown that flavonoids isolated from diverse natural sources possess a protective effect against DNA damage in murine sperm. At the same time, a sulfono glycolipid (S-ACT-1) isolated from *Gelidiella acerosa* has shown to possess a potent human sperm motility stimulating activity *in vitro* with the potential to be developed into a sperm stimulant (PREMAKUMARA et al. 2001). The analysis of sperm parameters in the study of FARDMANESH et al. (2015) demonstrated that the general and advanced motility of frozen-thawn human spermatozoa significantly increased following incubation with the extract of the *Sargassum* brown algae. On the other hand, twelve seaweeds were screened for in vitro spermicidal activity in the report by PRAKASH et al. (2014). Among these twelve seaweeds, *Halimeda gracilis* showed 100% inhibition of human spermatozoa at 10 mg/ml in 20 s. Further, dose- and time- dependent spermicidal assay revealed that the sperm was completely immobilised for 20 s. Plasma membrane of sperm was damaged due to the exposure of *H. gracilis* extract. MTT assay with *H. gracilis* extract showed 88.5% of cytotoxic incidence.

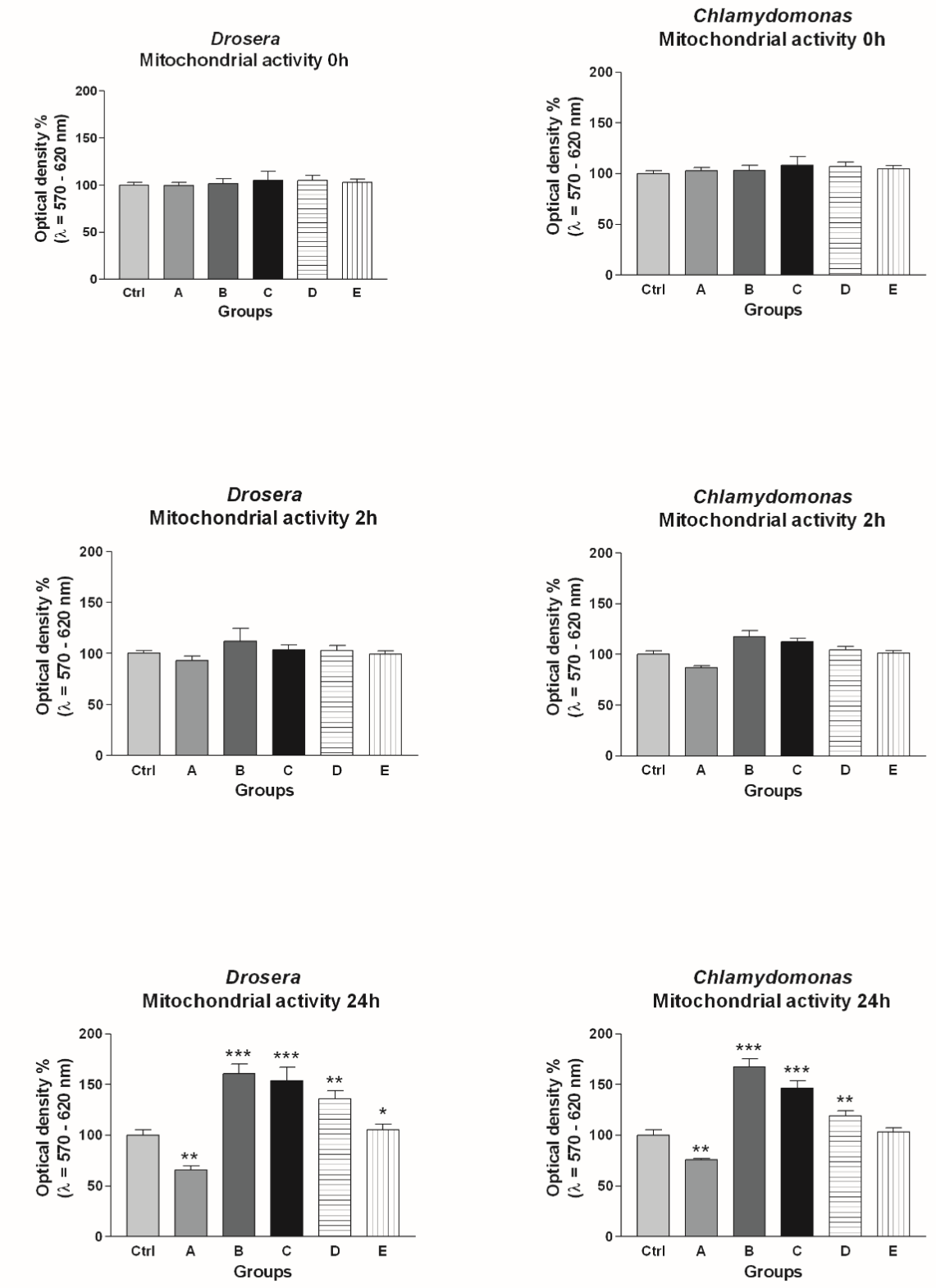


Fig. 1 The effect of various concentrations of the *Drosera rotundifolia* and *Chlamydomonas reinhardtii* extracts on the viability of bovine spermatozoa (n=10) at 0h, 2h and 24h. Each bar represents mean (±SEM) optical density as the percentage of controls, which symbolize 100%. The data were obtained from five independent experiments. The level of significance was set at *** P<0.001; ** P<0.01;* P<0.05.Ctrl–0;A–50;B–10;C–5;D–1;E–0.5 mg/mL *Drosera rotundifolia* or *Chlamydomonas reinhardtii* extract.

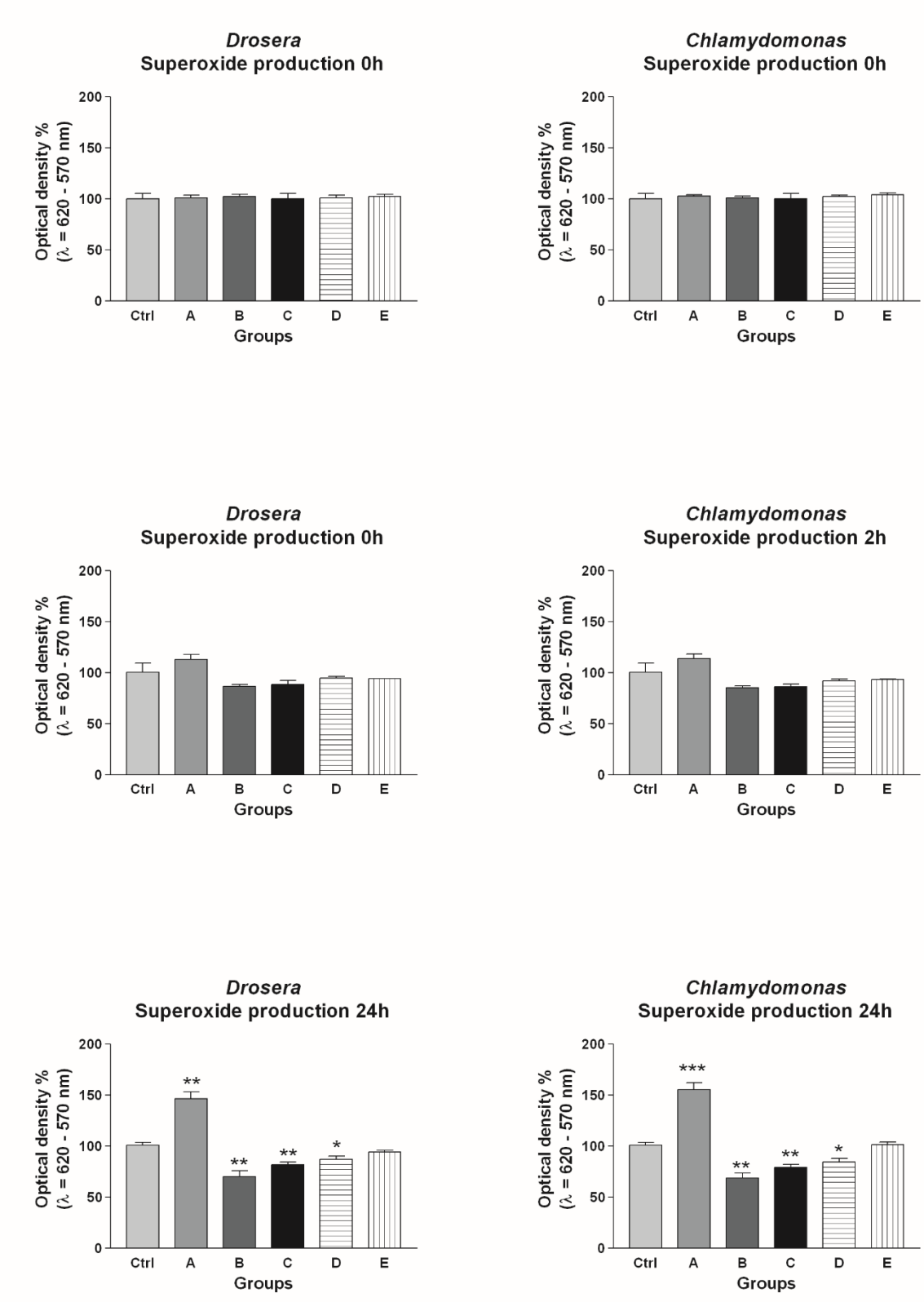


Fig. 2 The effect of various concentrations of the *Drosera rotundifolia* and *Chlamydomonas reinhardtii* extracts on the on the spermatozoa superoxide production (n=10) at 0h, 2h and 24h. Each bar represents mean (±SEM) optical density as the percentage of controls, which symbolize 100%. The data were obtained from five independent experiments. The level of significance was set at *** P<0.001; ** P<0.01;* P<0.05.Ctrl–0;A–50;B–10;C–5;D–1;E–0.5 mg/mL *Drosera rotundifolia* or *Chlamydomonas reinhardtii* extract.

Although the *Chlamydomonas* extract had no instant effects on the oxidative balance within the *in vitro* spermatozoa culture (P>0.05; Time 0h and 2h; Figure 2), experiments following a 24h cultivation revealed that the administration of 5 and 10 mg/mL extract led to a significant decline of the superoxide formation in comparison to the control (P<0.01 in terms of 5-10 mg/mL, P<0.05 with respect to 1 mg/mL; Figure 2). On the other hand, high (group A) concentrations of *Chlamydomonas* exhibited pro- oxidant properties reflected in a significant superoxide overgeneration (P<0.01 with respect to Time 24h; Figure 2).

Numerous studies have highlighted that algae possess significant antioxidant activities (ANNAMALAI and NALLAMUTH 2014; KIGHTLINGER et al. 2014). The antioxidant ability could be attributed to the exceptionally high content of phenolic compounds, particularly flavonoids with potent ROS-scavenging activities (ANANDAKUMAR et al. 2009). Thus, *Chlamydomonas* extracts could be a promising natural source of antioxidants, possibly used in nutritional or pharmaceutical industry for the prevention of ROS- mediated diseases. Our NBT results complement the report by FARDMANESH et al. (2015) showing that following *in vitro* administration of 250 or 500 pg/ml of *Sargassum* extract the level of ROS notably declined in frozen-thawn human semen. Phenolic compounds have been repeatedly shown to have beneficial effects of the oxidative balance in male reproductive tissues and cells. As shown by ATEŞŞAHIN et al. (2010) biologically active compounds frequently found in *Chlamydomonas* were able to significantly decrease lipid peroxidation, restore glutathione synthesis and catalase activity, associated with normal spermatogenesis and sperm viability. In a different study (ÇERIBAŞ et al. 2012), polyphenol administration led to significantly increased total antioxidant capacity, superoxide dismutase levels, as well as sperm percentage, viability, motility, accompanied by a decrease of malondialdehyde in rats, hence suggesting that flavonoids could be effective in enhancing healthy semen parameters.

CONCLUSIONS

Our results, although preliminary, support the evidence for the dose- dependent *in vitro* biological activity and scavenger potential of the *Drosera rotundifolia* L. and *Chlamydomonas reinhardtii* extracts against oxidative stress induced in bovine spermatozoa. The development of new culture media offering a better protection to spermatozoa from the oxidative damage and improve their energy requirements is absolutely necessary. Both plant extracts, in small amounts, could be used as a ROS scavenging and a metabolic promoting supplements, especially in routine andrology including *in vitro* fertilization, artificial insemination or spermatozoa cryopreservation. Nevertheless these results cannot foresee a definitive *in vivo* outcome as a direct impact of both extracts on male subfertility needs to be explored further. To translate our findings into practice, studies on the toxicity, pharmacokinetics and bioavailability of *Drosera* and *Chlamydomonas* extracts in male reproduction are critical.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Research Center AgroBioTech built in accordance with the project Building Research Centre “AgroBioTech” ITMS 26220220180, by the VEGA Project of the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and of the Slovak Academy of Sciences no. 1/0857/14 and by the the Slovak Research and Development Agency Grant no. APVV-15-0544.

REFERENCES

AGARWAL, A., SEKHON, L. 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. In: Human Fertility, vol. 13, 2010, p. 217–225.

ANANDAKUMAR, A.M., PAULSAMY, S., SATHISHKUMAR, P., SENTHILKUMAR, P. 2009. Preliminary phytochemical studies for the quantification of secondary metabolites of medicinal importance in the plant *Acalypha fruticose* Forssk.

In: Journal of Applied & Natural Science, vol. 1, 2009, p. 41-43.

ANNAMALAI, J., NALLAMUTH, T. 2014. Antioxidant potential phytochemicals from methanol extract of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardti*. In: Journal of Algal Biomass Utilization, vol. 5, 2014, p. 60-67.

ASIRVATHAM, R., AROCKIASAM, J.M.C., MURALI, A. 2012. Antitumor activity of ethanol and aqueous extracts of *Drosera burmannii* vahl. in EAC bearing mice. In: Spatula, vol. 2, 2012, p. 83-88.

ASIRVATHAM, R., AROCKIASAM, J.M.C., MURALI, A. 2013. *In vitro* antioxidant and anticancer activity studies on *Drosera indica* L. (*Droseraceae*). In: Advanced Pharmaceutical Bulletin, vol. 3, 2013, p. 115-120.

ATEŞŞAHIN, A., TÜRK, G., YILMAZ, S., SÖNMEZ, M., SAKIN, F., CERIBASI, A.O. 2010. Modulatory effects of lycopene and ellagic acid on reproductive dysfunction induced by polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) in male rats. In: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, vol. 106, 2010, p. 479-489.

ÇERIBAŞ, A.O., SAKIN, F., TÜRK, G., SÖNMEZ, M., ATEŞŞAHIN, A. 2012. Impact of ellagic acid on adriamycin- induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. In: Experimental and Toxicologic Pathology, vol. 64, 2012, p. 717-724.

CÓRDOBA, M., PINTOS, L., BECONI, M. T. 2005. Differential activities of malate and isocitrate NAD(P)-dependent dehydrogenases are involved in the induction of capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. In: Andrologia, vol. 37, 2005, p. 40-46.

DONNELLY, E.T., MCCLURE, N., LEWIS, S.E.M. 1999. The effect of ascorbate and α-tocopherol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. In: Mutagenesis, vol. 14, 1999, p. 505-512.

ESWARAN, V.U., BHARGAVA, H.R. 2014. Chemical analysis and anti-microbial activity of Karnataka bee bread of *Apis* species. In: World Applied Sciences Journal, vol. 32, 2014, p. 379-385.

FARDMANESH, H., FALLAHI, S., SHAKERIZADEH, S., MASOUDI, M., FADAEI-ARSANJAN, M. 2015. The effect of brown algae *Sargassum* extract on freezing of sperm. In: Iranian Journal of Reproductive Medicine, vol. 13, 2015, p. 58.

FUKUSHIMA, K., NAGAI, K., HOSHI, Y., MASUMOTO, S., MIKAMI, J., TAKAHASHI, Y., OIKE, H., KOBORI, M. 2009. *Drosera rotundifolia* and *Drosera tokaiensis* suppress the activation of HMC-1 human mast cells. In: Journal of Ethnopharmacology, vol. 125, 2009, p. 90-96.

GIL-CHÁVEZ, G.J., VILLA, J.A., AYALA-ZAVALA, J.F., BASILIO HEREDIA, J., SEPULVEDA, D., YAHIA, E.M., GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. 2013. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. In: Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol. 12, 2013, p. 5-23.

GULCIN, I., BEYDEMIR, S., ALICI, H.A., ELMASTAS, M., BUYUKOKUROGLU, M.E. 2004. *In vitro* antioxidant properties of morphine. In: Pharmacological Research, vol. 49, 2004, p. 59- 66.

HONDA, T. 2012. Investigation of innovative synthesis of biologically active compounds on the basis of newly developed reactions. In: Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), vol. 60, 2012, p. 687-705.

HUCZYŃSKI, A. 2012. Polyether ionophores-promising bioactive molecules for cancer therapy. In: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 22, 2012, p. 7002-7010.

JASZEK, M., OSIŃSKA-JAROSZUK, M., JANUSZ, G., MATUSZEWSKA, A., STEFANIUK, D., SULEJ, J., POLAK, J., RUMINOWICZ, M., GRZYWNOWICZ, K., JAROSZ-WILKOŁAZKA, A. 2013. New bioactive fungal molecules with high antioxidant and antimicrobial capacity isolated from *Cerrena unicolor* idiophasic cultures. In: BioMed Research International, vol. 2013, 2013, p. 497492.

KAČÁNIOVÁ, M., ĎURECHOVÁ, D., VUKOVIĆ, N., KÁNTOR, A., PETROVÁ, J., HLEBA, L., VAŤĽÁK, A. 2014. Antimicrobial activity of *Drosera rotundifolia* L. In: Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, vol. 47, 2014, p. 366-369.

KIGHTLINGER, W., CHEN, K., POURMIR, A., CRUNKLETON, D.W., PRICE, G.L., JOHANNES, T.W. 2014. Production and characterization of algae extract from *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Electronic Journal of Biotechnology, vol. 17, 2014, p. 14-18.

KLEIN, S.M., COHEN, G., CEDERAUM, A.I. 1991. Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulphoxide by hydroxyl radical generating system. In: Biochemistry, vol. 20, 1991, p. 6006-6012.

KNAZICKA, Z., TVRDA, E., BARDOS, L., LUKAC, N. 2012. Dose- and time-dependent effect of copper ions on the viability of bull spermatozoa in different media. In: Journal of Environmental Science and Health Part A, vol. 47, 2012, p. 1294-1300.

KRYCHOWIAK, M., GRINHOLC, M., BANASIUK, R., KRAUZE-BARANOWSKA, M., GŁÓD, D., KAWIAK, A., KRÓLICKA, A. 2014. Combination of silver nanoparticles and *Drosera binata* extract as a possible alternative for antibiotic treatment of burn wound infections caused by resistant *Staphylococcus aureus*. In: PLoS One, vol. 9, 2014, p. e115727.

IBRAHIM, N.A., ARABI, O., KAHIL, M.A. 2014. The role of some medicinal plants in reducing sperm DNA damage of male mice. In: The Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences, vol. 3, 2014, p. 7-11.

MADHAVAN, V., KUMAR, B.H.P., MURALI, A., YOGANARASIMHAN, S.N. 2009. Antifertility activity of *Drosera burmannii*. In: Pharmaceutical Biology, vol. 47, 2009, p. 128-131.

MAZZI, L., GEMINIANI, M., COLLODEL, G., IACOPONI, F., MARTINI, S., BONECHI, C., ROSSI, C., MORETTI, E. 2011. Quercetin and rutin: effects of two flavonoids on induced oxidative stress in human ejaculated sperm. In: Journal of the Siena Academy of Sciences, vol. 3, 2011, p. 22-26.

MICHALKO, J., MATUŠÍKOVÁ, I. 2012. The role of glucanases in digestion of carnivorous plant *Drosera rotundifolia* L. In: Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, vol. 1, 2012, p. 671-678.

PRAKASH, S., RAVIKUMAR, S., REDDY, K.V., KANNAPIRAN, E. 2014. Spermicidal activity of Indian seaweeds: an *in vitro* study. In: Andrologia, vol. 46, 2014, p. 408-416.

PREMAKUMARA, G.A., RATNASOORIYA, W.D., TILLEKERATNE, L.M., AMARASEKARE, A.S., UR-RAHMAN, A. 2001 Human sperm motility stimulating activity of a sulfono glycolipid isolated from Sri Lankan marine red alga *Gelidiella acerosa*. In: Asian Journal of Andrology, vol. 3, 2001, p. 27-31.

PURDY, PH., ERICSSON, S.A., DODSON, R.E., STERNES, K.L., GARNER, D.L. 2004. Effects of flavonoids, silibinin and catechin on the motility of extended cooled caprine sperm. In: Small Ruminant Research, vol. 55, 2004, p. 239-243.

SIVANATHAN, S., SCHERKENBECK, J. 2014. Cyclodepsipeptides: a rich source of biologically active compounds for drug research. In Molecules, vol. 19, 2014, p. 12368-12420.

SUKARDI, S., YAAKUB, H., GANABADI, S., AHMAD, Z., ABDUL HAMID, R. 2009. Impaired sperm parameters of Balb/c mice fed plumbagin. In: Planta Medica, vol. 75, 2009, p. PJI123.

TAEPONGSORAT, L., TANGPRAPRUTGUL, P., KITANA, N., MALAIVIJITNOND, S. 2008. Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in adult male rats. In: Asian Journal of Andrology, vol. 10, 2008, p. 249-258.

THAMBIRAJ, J., PAULSAMY, S., SEVUKAPERUMAL, R. 2012. Evaluation of *in vitro* antioxidant activity in the traditional medicinal shrub of western districts of Tamilnadu, India, *Acalypha fruticosa* Forssk. (*Euphorbiaceae*). In: Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, vol. 2, 2012, p. S127-130.

TUNG, N.H., SHOYAMA, Y., WADA, M., TANAKA, H. 2014. Improved in vitro fertilization ability of mouse sperm caused by the addition of Licorice extract to the preincubation medium. In: The Open Reproductive Science Journal, vol. 6, 2014, p. 1-7.

TVRDÁ, E., LUKÁČ, N., LUKÁČOVÁ, J., KŇAŽICKÁ, Z., MASSÁNYI, P. 2013. Stimulating and protective effects of vitamin E on bovine spermatozoa. In: Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, vol. 2, 2013, p. 1386-1395.

TVRDÁ, E., LUKÁČ, N., LUKÁČOVÁ, J., JAMBOR, T., HASHIM, F., MASSÁNYI, P. 2014. Dose- and time-dependent *in vitro* effects of quercetin on bovine spermatozoa activity and superoxide production. In: Folia Veterinaria, vol. 58, 2014, p. 224-231.

WALCH, S.G., KUBALLA, T., STÜHLINGER, W., LACHENMEIER, D.W. 2011. Determination of the biologically active flavour substances thujone and camphor in foods and medicines containing sage (*Salvia officinalis* L.). In: Chemistry Central Journal, vol. 5, 2011, p. 44.

Authors' Addresses

Ing. Eva Tvrdá, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. Tel: +421-37-641-4918. Email: evina.tvrda@gmail.com

Ing. Jaroslav Michalko, PhD., Slovak Academy of Sciences, Detached Branch of the Institute of Forest Ecology - Arboretum Mlynany, Vieska nad Žitavou 178, 951 52 Slepčany, Slovakia. Tel: +421-37-633-4571. Email: jaroslav.michalko@gmail.com

Ing. Ildikó Matušíková, PhD., Slovak Academy of Sciences, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Akademická 2, 950 07 Nitra, Slovakia. Tel: +421-37-694-3110. Email: ildiko.matusikova@savba.sk

Prof. Ing. Norbert Lukáč, PhD., Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Animal Physiology, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. Tel: +421-37-641-4349. Email: norolukac@gmail.com

HODNOTENIE MIERY POŠKODENIA TISU OBYČAJNÉHO (*TAXUS BACCATA* L.) V MESTSKOM PROSTREDÍ

ASSESSING THE EXTENT OF DAMAGE COMMON YEW (*TAXUS BACCATA* L.) IN URBAN ENVIRONMENT

PETER UHRIN – JÁN SUPUKA

UHRIN, P. – SUPUKA, J. 2016. Hodnotenie miery poškodenia tisu obyčajného (*Taxus baccata* L.) v mestskom prostredí. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 239-246. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
This article deals with the qualitative assessments of Common Yew (*Taxus baccata* L.) adaptability to urban conditions. There were six individuals evaluated. Out of them, three individuals were selected in environmentally polluted area in Štúrova street in Nitra and three individuals in environmental unloaded area in the workplace of Slovak Academy of Sciences in Arboretum Mlyňany in Vieska nad Žitavou. Evaluation in the form of fluorescence leaf chlorophyll-a measurements and visual assessment of assimilation tissue quality and crown destruction took place in the three times during the growing season from June to October. The results of the visual evaluation point to a worse quality of assimilation organs and a higher rate of crown destruction had individual in an urban environment, as demonstrated by the higher quality index (Q1 = 1.33, Q2 = 1.66, Q3 = 3.00) compared to those with no loaded environment (Q1 = 1.00, Q2 = 1.33, Q3 = 1.33). Statistical evaluation of measured parameters Fv/Fm (maximum fluorescence yield) and ETR (relative rate of electron transport) values indicate a lower adaptability degree and negative environmental impact to evaluated individuals in the urban environment.

Key words: urban environment, chlorophyll fluorescence, visual assessment, *Taxus baccata* L.

ÚVOD

Zmenené podmienky v súčasnej dobe vo forme stresových faktorov neustále ovplyvňujú rast a vývoj drevín v mestskom prostredí. Rastliny na tieto podnety reagujú množstvom ochranných a adaptačných procesov. Tieto obranné mechanizmy hrajú dôležitú úlohu pri zlepšovaní antioxidačnej kapacity, odbúravajú voľné kyslíkové radikály a tým zmierňujú účinky oxidačného stresu (WANG et al., 2010). Bolo preukázané, že zvýšená UV-B žiarenie, vysoký vodný deficit ako aj obsah solí v pôde majú škodlivé účinky na rýchlosť fotosyntézy u veľa druhov rastlín (URBAN et al. 2006). Účinnosť a stabilita PSII fotosyntetických systémov je dôležitá pre fungovanie celého fotosyntetického aparátu. UV-B žiarenie môže poškodiť PSII systémy a tým aj znížiť efektivitu fotosyntézy. Znížená výnosnosť fotosyntézy predchádza zníženiu účinnosti základného fotochemického reťazca PSII (HAAPALA et al., 2010). Fungovanie PSII systémov môže byť hodnotená aj meraním fluorescencie chlorofylu. Pre správnu starostlivosť o zelenú infraštruktúru miest a ich udržateľný rozvoj, je potrebné zaoberať sa hodnotením adaptability drevín na zmenené podmienky prostredia.

MATERIÁL A METODIKA

V tejto práci bolo hodnotených 6 jedincov z druhu *Taxus baccata L.* vo dvoch úrovniach environmentálneho zaťaženia prostredia. Tri dreviny z tohto druhu boli vybrané v zaťaženom mestskom prostredí na Štúrovej ulici v meste Nitra a tri jedince v prostredí bez emisného tlaku na pracovisku UEL-SAV Arborétum Mlyňany vo Vieske nad Žitavou. Jednotlivé dreviny boli hodnotené metódou použitia vizuálnych znakov a metódou hodnotenia kvality asimilačných orgánov

prostredníctvom parametrov fluorescencie chlorofylu- *a.* Podrobné postupy hodnotenia obidvoch znakov sú spracované a publikované v inej práci (UHRIN, SUPUKA, 2016).

Rámcová charakteristika modelových území

Environmentálne zaťažené prostredie na Štúrovej ulici v meste Nitra: Patrí k jednej z najviac zaťažených mestských komunikácií v meste Nitra. K vyťaženiu prispieva aj okrem individuálnej osobnej automobilovej aj mestská hromadná doprava spolu s tranzitnou dopravou. Hodnotené jedince sa nachádzajú v strede trávnej plochy vo vzdialenosti do 2m od dopravnej komunikácii.

Environmentálne nezaťažené prostredie Arborétum v Mlyňanoch: Územie Arboréta ako pracovisko UEL-SAV patrí do katastrálnych území susediacich obcí Viesky nad Žitavou a Tesárskych Mlynian. Je charakteristické výraznými terénnymi prevýšeniami (www. arboretum. sav. sk). Hodnotené jedince sa na tejto lokalite nachádzali na okraji porastu a mali dostatočne veľkú časť koruny oslnenú slnečným žiarením.

Klimatologické podmienky počas výskumu

Počas vizuálneho hodnotenia a taktiež počas merania parametrov fluorescencie chlorofylu- *a* prevládali na oboch lokalitách pomerne vysoké maximálne denné teploty, suché obdobie a vysoký deficit zrážok. Počas sledovaného obdobia v meste Nitra bola najvyššia denná teplota zaznamenaná v mesiaci august a v Arboréte Mlyňany v mesiaci júl. Podrobnejší prehľad stavu počasia za merané obdobie možno vidieť v tabuľke 1 a tabuľke 2.

Tab. 1 Klimatické charakteristiky – Nitra, 2015.

mesiac	teplota vzduchu			zrážky
	Max	Min	Avg	Sum
jún	30,7	7,9	19,9	10,2
júl	36,8	7,9	23,6	17,2
august	37,5	10	23,5	57,7
september	33,7	3,9	17,5	33,2
október	22,4	-1,6	10,5	54,8

Vysvetlivky: Max- maximálna teplota, Min- minimálna teplota, Avg- priemerná teplota, Sum- sumár

Pre toto obdobie bolo tiež charakteristické minimálne mesačné úhrny zrážok. V meste Nitra nepresiahli mesačné úhrny viac ako 57,7 mm naproti čomu bol maximálny úhrn v nezaťaženom prostredí 165,8 mm avšak len vďaka niekoľkým daždivým dňom. Celkový prehľad môžeme vidieť opäť v Tabuľke 1 a Tabuľke 2.

Tab. 2 Klimatické charakteristiky – Arborétum Mlyňany, Vieska nad Žitavou, 2015.

mesiac	teplota vzduchu			zrážky
	Max	Min	Avg	Sum
jún	30,4	6,0	15,09	64,7
júl	37,3	6,2	23,2	18,4
august	36,9	10,9	22,7	165,8
september	35,8	9,3	22,3	61,2
október	20,9	-0,3	10,13	44,4

Vysvetlivky**:** Max- maximálna teplota, Min- minimálna teplota, Avg- priemerná teplota, Sum- sumár

Toto obdobie bolo podľa projektu SHMU v Bratislave „monitoringu sucha v Podunajskej a Východoslovenskej nížine“ charakterizované ako dlhodobo suché s vysokými zápornými odchýlkami zrážkového indexu (SPI a SPEI) od dlhodobého normálu (SHMU 2015).

Metódy vizuálneho hodnotenia

Pre potreby hodnotenia boli zaznamenávané základné dendrometrické charakteristiky ako výška dreviny, šírka koruny a obvod kmeňa vo výške 1,3 m nad povrchom zeme.

Prostredníctvom známych vizuálnych metód a pomocou markérov ako defoliácia, presychanie koruny a stupňa nekrózy listov boli hodnotené deštrukčné prejavy koruny a kvalita asimilačných orgánov. Percentuálny výskyt konkrétneho markéru (INNES, 1990) na drevine sme transformovali do stupňa prejavu (PEJCHAL 1995; SUPUKA et al. 1991) v rozmedzí hodnôt od 0 (najnižší stupeň poškodenia) až 4 (najvyšší stupeň poškodenia).

Do druhej skupiny hodnotených markérov boli zaradené mechanické poškodenie, výskyt dutín a húb a kalusovanie rán. Stupnica prejavu daného znaku bola rovnaká ako u predošlej skupiny. Pri mechanickom poškodení sme zaznamenávali aj typ, pôvod poškodenia a druh škodca (HRUBÍK, TKÁČOVÁ 2004). Registrovali sme poranenie kmeňa, konárov ale aj mrazové trhliny (BERNATZKY 1987). Výskyt dutín a húb, sme považovali za jeden z druhov biotických škodcov podľa (HRUBÍK, TKÁČOVÁ 2004) a bol hodnotený nielen vizuálnym spôsobom (meraním pásmom), ale aj mechanicky a teda zasunutím pevného drôtu do dutiny v kmeni alebo v konári (GÁPER 1998; GÁPER, GÁPEROVÁ 2009). Kalusovanie rán bolo hodnotené meraním rozsahu kalusu a porovnávaním s celkovým plošným rozsahom rany v pomerových vzťahoch.

Hodnoty boli zaznamenávané do tabuľky a z hodnôt bol vypočítaný kvalitatívny index pre konkrétnu drevinu na základe nasledujúceho vzorca (SUPUKA a kol., 1991):

Vzorec 1 Vzorec na výpočet kvalitatívneho indexu (SUPUKA, a kol., 1991)

$$Qn = \frac{\Sigma Ai.xi + \Sigma Bi.xi + \Sigma Ci.xi}{\Sigma xi}$$

Vysvetlivky: A_i - N_i – druh a charakter hodnotenia znaku *i*-tej kvality, Q_n – index kvality *n*-tej dreviny, x_i - počet drevín hodnotených na danej lokalite

Skúmané jedince boli hodnotené v troch termínoch počas vegetačného obdobia. Prvý termín merania a vizuálneho hodnotenia bol na prelome mesiacov jún, druhý termín v mesiaci august 2015 a tretí termín v mesiaci september.

Meranie hodnôt fluorescencie chlorofylu

Meranie fluorescencie chlorofylu- *a* prebiehalo výlučne počas anticyklonálneho počasia teda počas tlakovej výši na oslnenej časti koruny v čase od 08:30 hod. maximálne do 15:30 hod.. Meranie prebiehalo in vivo metódou pulzným fluorymetrom od firmy Hansatech, modelom FMS-2 po 30 minútovej adaptácie listovej plochy. Listy sme zatieňovali pomocou listových svoriek od firmy Hansatech, s kruhovým otvorom v priereze 7mm priemerom. Hodnoty boli merané na plne vyvinutých listoch v oslnenej časti koruny, v mestskom prostredí zo strany reálneho zdroja emisného zaťaženia, t.j. od cestnej komunikácie. Výsledné hodnoty boli zaznamenávané v numerickej forme do pamäťovej jednotky prístroja. Zaznamenávali sme parametre vyplývajúce z fluorescenčnej krivky ako maximálny fluorescenčný výťažok (Fv/Fm) a relatívnu rýchlosť transportu elektrónov (ETR).

Štatistické spracovanie

Všetky namerané dáta boli vecne a časovo triedené na základe kvantitatívnych a kvalitatívnych znakov do štatistických súborov. Vo fáze štatistického spracovania boli porovnávané medzi lokalitami pomocou analýzy rozptylu hodnôt (ANOVA test). Pre zisťovanie rozdielu mediánov bol použitý Kruskal- Wallis test. Preukaznosť bola hodnotená na základe P- hodnoty kedy $P \leq 0,05$ predstavuje štatisticky preukazný rozdiel a keď je $P \leq 0,01$ predstavuje štatisticky vysoko preukazný rozdiel. Vo finálnej časti štatistického skúmania teda tzv. štatistického rozboru sme hodnotili vývoj

hodnôt sledovaných parametrov a snažili sa zhrnúť výsledky štatistického spracovávania a formulovať z nich vyplývajúce závery.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky vizuálneho hodnotenia

Počas sledovaného obdobia sa skúmané jedince vyznačovali iba miernym zhoršením defoliácie a nekrózy listov. Iba u prvého jedinca sa prejavilo mierne presychanie koruny. Mechanické poškodenie vo forme odlupovania kôry bolo pozorované u druhého jedinca no i to v slabej miere. Celkový kvalitatívny index sa síce zhoršoval ale iba menej výrazne, ako môžeme vidieť v tabuľke 3.

Tab. 3 Vizuálne hodnotenie drevín v meste Nitre, 2015.

meranie	jedinec	latinský názov	*D*	*Ok*	*Ni*	*Mp*	*Vd*	*K*	Q_1
1.	1	*Taxus bacata* L.	0	0	0	0	0	0	
1.	2	*Taxus bacata* L.	1	0	1	1	0	0	1, 33
1.	3	*Taxus bacata* L.	1	0	0	0	0	0	
2.	1	*Taxus bacata* L.	0	0	0	0	0	0	
2.	2	*Taxus bacata* L.	1	0	2	1	0	0	1, 66
2.	3	*Taxus bacata* L.	1	0	1	0	0	0	
3.	1	*Taxus bacata* L.	0	0	0	0	0	0	
3.	2	*Taxus bacata* L.	1	0	2	1	0	0	3, 00
3.	3	*Taxus bacata* L.	1	0	2	0	0	0	

Vysvetlivky: *D- defoliácia koruny, Ok- odumieranie koruny, Ni- nekréoza listov, Mp- mechanické poškodenie, Vd- výskyt dutín v kmeni alebo konári, K- lasusovanie rán*

U jedincoch rastúcich v nezaťaženom prostredí sa zhoršil iba o pol hodnoty jedného stupňa. Tomu nasvedčovali iba mierny rozsah defoliácie prvého stupňa u druhého skúmaného jedinca a takmer žiadne ale vizuálne pozorovateľné presychanie korunyu prvého jedinca. Najvýraznejšie zhoršenie kvality asimilačných orgánov aj keď iba o jeden stupeň bolo zaznamenané pri treťom jedincovi. Výsledky hodnotenia jedincov v nezaťaženom prostredí sú uvedené v tabuľke 4.

Tab. 4 Vizuálne hodnotenie drevín v meste Arborétum Mlyňany, Vieska nad Žitavou, 2015.

meranie	jedinec	latinský názov	*D*	*Ok*	*Ni*	*Mp*	*Vd*	*K*	Q_1
1.	1	*Taxus bacata* L.	0	1	0	0	0	0	
1.	2	*Taxus bacata* L.	1	0	0	0	0	0	1, 00
1.	3	*Taxus bacata* L.	0	0	1	0	0	0	
2.	1	*Taxus bacata* L.	0	1	0	0	0	0	
2.	2	*Taxus bacata* L.	1	0	0	0	0	0	1,33
2.	3	*Taxus bacata* L.	0	0	2	0	0	0	
3.	1	*Taxus bacata* L.	0	1	0	0	0	0	
3.	2	*Taxus bacata* L.	1	0	0	0	0	0	1, 33
3.	3	*Taxus bacata* L.	0	0	2	0	0	0	

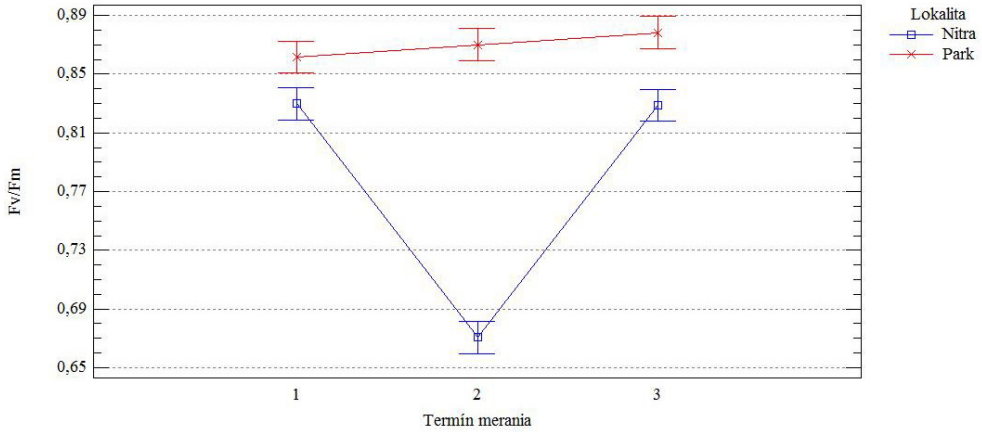
Vysvetlivky: *D- defoliácia koruny, Ok- odumieranie koruny, Ni- nekréoza listov, Mp- mechanické poškodenie, Vd- výskyt dutín v kmeni alebo konári, K- lasusovanie rán*

Výsledky vizuálneho hodnotenia skúmaných jedincov preukázali iba mierne zhoršenie kvality asimilačných orgánov a iba mierne mechanické poškodenie kmeňa či konárov. V porovnaní s jedincami rastúcimi v nezaťaženom prostredí sa preukázali rozdiely len s miernymi odchýlkami. Celkové zhrnutie výsledkov poukazuje na mierne horšiu kvalitu asimilačných orgánov, vyššiu mieru deštrukciu koruny a mierne mechanické poškodenie u jedincoch v zaťaženom mestskom prostredí. Na toto poukazuje aj výsledný kvalitatívny index, ktorý v priebehu vegetačného obdobia v meste Nitra zhoršoval počas všetkých troch termínoch (Q1=1,33, Q2=1,66, Q3=3,00) naproti čomu sa v nezaťaženom prostredí zhoršil len v druhom termíne hodnotenia (Q1=1,00, Q2=1,33, Q3=1,33).

Štatistické porovnanie hodnôt parametrov fluorescencie chlorofylu- *a*

Pre potreby hodnotenia výkonnosti fotochemických systémov sme porovnávali parametre maximálnej výkonnosti PS systémov (Fv/Fm) a relatívnu rýchlosť transportu elektrónov (ETR). Pomocou analýzy rozptylu (ANOVA test) a porovnania mediánov (Kruskall- Wallis testu) sme zisťovali významnosť štatistických rozdielov a váhu testov. Pre parameter Fv/Fm je na obrázku1 viditeľná mierne stúpajúca tendencia hodnôt a výrazne vyššie hodnoty u jedincov v nezaťaženom prostredí. V meste Nitra je tento vývoj hodnôt narušený v druhom termíne merania v mesiaci august. V tomto termíne nastalo výrazné až extrémne zníženie hodnôt parametra Fv/Fm. V treťom termíne sa hodnoty vrátili do predpokladaného vývoja.

Obr. 1 Rozdiel mediánov parametra Fv/Fm nameraných na lokalitách vzhľadom termín merania za rok 2015.



V Tabuľke 5 možno vidieť výsledky ANOVA testu a porovnanie. V prvom termíne nebol preukazný štatisticky významný rozdiel. V druhom termíne merania kvôli poklesu hodnôt vyšiel štatisticky vysoko preukazný takisto ako aj v treťom termíne. Hodnoty jednotlivých charakteristík štatistických súborov môžeme vidieť v tabuľke 6.

Tab. 5 Štatistické zhodnotenie parametra Fv/Fm pre jedince na oboch lokalitách, 2015.

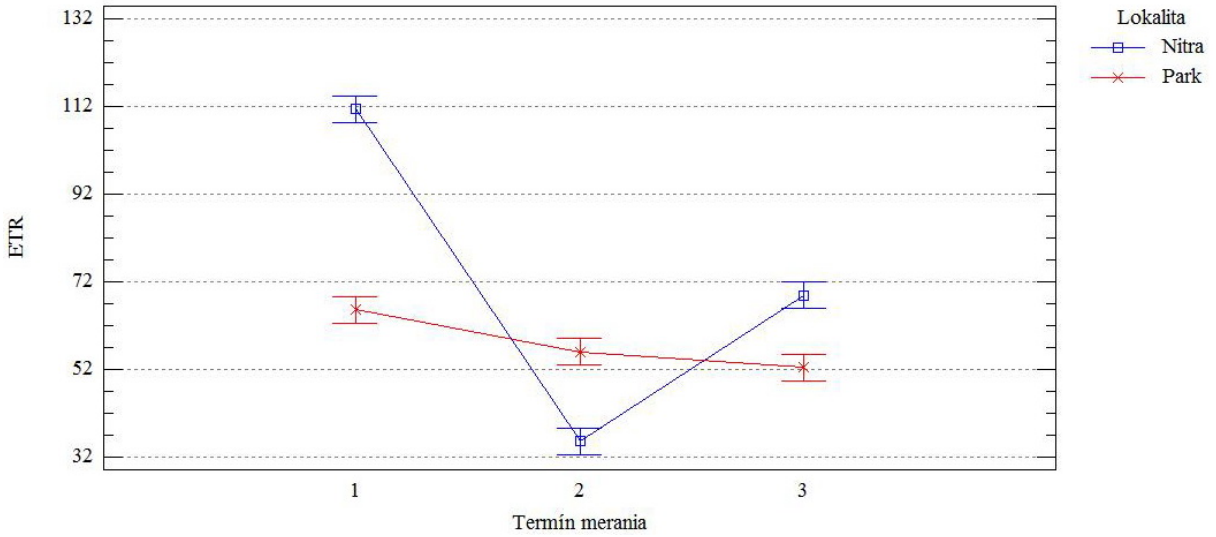
Štatistické limty	**Termín merania**			
	1	**2**	**3**	**1+2+3**
ANOVA test				
P – hotnota	<0.05*	<0.0001***	<0.001***	<0.0001***
F – ratio	44,47	120,17	154,06	84,56
Kruskal- Wallis test				
P - hodnota	4,5704	2,8360	4,0533	1,2065
T – test	25,4371	92,3401	43,5879	36,063

Vysvetlivky: *P ≤ 0.5-štatisticky nepreukazný rozdiel; **- P ≤ 0.01-štatisticky preukazný rozdiel;
***P ≤ 0.001- štatisticky vysoko preukazný rozdiel

Tab. 6 Štatistické charakteristiky analýzy rozptylu parametra Fv/Fm pre jedince na oboch lokalitách, 2015.

Termín merania	**Lokalita**	**Medián**	**Štandardná odchýlka**	**Variačný koeficient**	**Minimum**	**Maximum**	**Rozsah**
1	Nitra	0,829	0,0193	2,33%	0,788	0,860	0,072
	Park	0,861	0,0174	2,02%	0,832	0,884	0,052
2	Nitra	0,670	0,0991	14,78%	0,488	0,818	0,330
	Park	0,870	0,0103	2,43%	0,846	0,885	0,039
3	Nitra	0,828	0,0212	2,56%	0,790	0,871	0,081
	Park	0,878	0,0048	0,55%	0,869	0,885	0,016
1+2+3	Nitra	0,776	0,0955	12,39%	0,768	0,871	0,383
	Park	0,869	0,0137	1,57%	0,832	0,885	0,053

Pri porovnaní hodnôt parametra relatívnej rýchlosti elektrónov (ETR) ktorý môžeme vidieť na obrázku 2, sa taktiež preukázal výrazný pokles hodnôt v druhom termíne merania. Výsledky štatistického porovnania hodnôt preukázali štatisticky preukazný rozdiel v prvom termíne merania, štatisticky vysoko významný rozdiel v druhom termíne merania a štatisticky vysoko preukazný rozdiel v treťom termíne merania.



Obr. 2 Rozdiel mediánov parametra ETR nameraných na lokalitách vzhľadom termín merania za rok 2015.

Je možné skonštatovať vyššie namerané hodnoty a nepravidelný priebeh u jedincov v mestskom prostredí na Štúrovej ulici v Nitre oproti plynulému priebehu u jedincoch v nezaťaženom priestore.

Tab. 7 Štatistické zhodnotenie parametra ETR pre jedince na oboch lokalitách, 2015.

Štatistické limty	Termín merania			
	1	2	3	1+2+3
ANOVA test				
P – hotnota	<0.001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***
F – ratio	327,63	34,25	154,06	13,71
Kruskal- Wallis test				
P - hodnota	2,8539	<0.0001***	<0.0001***	<0.001***
T – test	44,2746	22,2441	18,6499	6,9885

Vysvetlivky: *P ≤ 0.5-štatisticky nepreukazný rozdiel; **- P ≤ 0.01-štatisticky preukazný rozdiel;
***P ≤ 0.001- štatisticky vysoko preukazný rozdiel

Z výsledkov možno vidieť vysoký variačný koeficient hlavne pri jedincoch v mestskom prostredí. Tiež sa vyznačujú vyššou štandardnou odchýlkou a aj minimálnymi a maximálnymi hodnotami.

Štatistické zhodnotenie parametra Fv/Fm preukázal nižšie hodnoty a výrazné zníženie hodnôt u jedincoch v mestskom prostredí. Hodnoty ETR boli v mestskom prostredí vyššie a v druhom termíne bol taktiež ako u predošlého parametra zaznamenaný výrazný pokles hodnôt.

Zníženie hodnôt parametrov pod hranicu preukaznosti pôsobenia stresových faktorov (vodný deficit, vysoké teploty, zasolenie pôdy, vysoké dávky slnečného žiarenia) na dreviny poukazuje na zníženie výkonnosti fotosyntetických procesov v období s extrémnymi teplotami. S najväčšou pravdepodobnosťou dreviny obmedzili transport vody do asimilačných orgánov aby zabránili jej evapotranspiračným stratám. Rastlina aktivuje mechanizmus pre fotoprotekciu a opravy

fotosyntetického aparátu počas fotoinhibície (MELIS 1999; DEMMIG, ADAMS et. al 1998; ADIR et. al 2003).

Tab. 8 Štatistické charakteristiky analýzy rozptylu parametra ETR pre jedince na oboch lokalitách, 2015.

Termín merania	Lokalita	Medián	Štandardná odchýlka	Variačný koeficient	Minimum	Maximum	Rozsah
1	Nitra	111,46	10,7633	9,65%	93,03	129,57	36,54
	Park	65,59	8,76437	13,36%	41,63	79,85	38,22
2	Nitra	35,574	15,0848	42,40%	9,24	73,71	64,47
	Park	55,966	11,6909	20,88%	38,27	78,59	40,32
3	Nitra	68,866	14,7628	21,43%	38,43	34,50	56,07
	Park	52,456	8,0445	15,35%	34,41	64,65	29,24
1+2+3	Nitra	71,967	34,0347	47,29%	9,24	129,57	120,33
	Park	58,004	19,0289	19,02%	35,41	79,85	44,44

ZÁVER

Výsledky hodnotenia pomocou vizuálnych metodík hodnotenia nepreukázali výrazné rozdiely medzi jedincami na rôznych lokalitách, napriek čomu výsledky štatistického hodnotenia a klimatologické charakteristiky poukazujú na možné fotoinhibičné procesy a znížené fotochemické procesy hlavne v druhom termíne meraní u drevín v mestskom environmentálne zaťaženom prostredí. Takéto odozvy drevín rastúcich na územiach s vysokou mierou zaťaženia spolu s rastúcim trendom otepľovania, poukazujú na nutnosť výskumu reakcií drevín v takýchto podmienkach. Hodnotenie ekofyziologických markérov stromov ako nástroj na selekciu vhodných a adaptabilných druhov nám môže poskytnúť východisko pre druhovú a fenotypovú diferenciáciu z hľadiska vhodnosti pre tvorbu mestskej zelene, zadefinovanie metód revitalizácie zelene, pre ich tvorbu a správny manažment.

POĎAKOVANIE

Príspevok bol spracovaný vďaka finančnej podpore grantového projektu KEGA č. 003SPU-4/2014a KEGA č. 001SPU-4/2014.

LITERATÚRA

ADIR, N. - ZER, H. - SHOKHAT, S. - OHAD, I. 2003: Photoinhibition - a historical perspective. In: Photosynth Research 76: 343–370.

BERNATZKY, A. 1978. Tree Ecology and Preservation. Amsterdam, Oxford, New York: Elsevier.

DEMMIG-ADAMS, B. – MOELLER, D. L. – LOGAN, B.A. – ADAMS, W.W. 1998: Positive correlation between levels of retained zeaxanthin anthrexanthin and degree of photoinhibition in shade leaves of Schefflera arboricola. In: Planta, 205: 367–374.

GÁPER, J. 1998: Trúdniky na území Slovenska a ich šírenie v ekosystémoch bazídiospórami. Zvolen: Technická univerzita vo Zvolene, 1998. s. 5, 75 s. ISBN 80-228-0750-8.

GÁPER, J. - GÁPEROVÁ, S. 2009: Dutiny ako dôležitá súčasť hodnotenia vitality drevín v sídlach. In: BERNADOVIČOVÁ, S. - JUHÁSOVÁ, G. (eds.): Dreviny vo verejnej zeleni. Nitra : Ústav ekológie lesa SAV, 2009. s.193 - 198.

HAAPALA, J. K. - M€ORSKY, S. K. - SAARNIO, S. - SUOKANERVA, H. - KYREO, E. - SILVOLA, J. - HOLOPAINEN, T. 2010: Long-term effects of elevated UV-B radiation on photosynthesis and ultrastructure of Eriophorum russeolum and Warnstorfia exannulata. In: Sci. Total Environ, 409: 370-377.

HRUBÍK, P. - TKÁČOVÁ, S. 2004: Inventarizácia a klasifikácia drevín vzáhradnej a krajinnej tvorbe. In: Zborník z konferencie s medzinárodno účasťou Sídlo-park-krajina. Nitra: SPU, 2004. s. 87 - 89.

INNES, J. L. 1990 : Assesment of Tree condition. London: HMSO.1990, 96 s.

MELIS, A. 1999: Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? In: Trends Plant Science, 4: 130–135.

PEJCHAL, M. 1995: Hodnocení vitality stromu v městkých ulicích. In: : KOLEKTIV (eds): Stromy v ulicích. Olomouc - Mělník: Sekce péče o dřeviny pri Spoločnosti pro záhradní a krajinářskou tvorbu, 1994. s. 32 – 40.

SUPUKA, J. a kol. 1991: Ekologické princípy tvorby a ochrany zelene. Bratislava: Vydavateľstvo SAV, 1991, s. 307, ISBN 80-224-0128-5.

URBAN, O. – TUMA, I. – HOLUB, P. – MAREK, M. V. 2006: Photosynthesis and growth response of Calamagrostis arundinacea and C. villosa to enhanced UV-B radiation. In: Photosynthetica. č. 44, s. 215-220.

UHRIN, P. – SUPUKA, J. 2016: Quality assessment of urban trees using growth visual and chlorophyll fluorescence indicators. Ekologia (Bratislava), 35 (2): 160–172.

WANG, S. W. - XIE, B. T. - YIN, L. N. - DUAN, L. S. - LI, Z. H. - ENEJI, A. E. - TSUJI, W. - TSUNEKAWA, A. 2010: Increased UV-B radiation affects the viability, reactive oxygen species accumulation and antioxidant enzyme activities in Maize (Zea mays L.) pollen. In: Photochem. Photobiol, 86: 110-116.

webové stránky:

http://www.arboretum.sav.sk/

http://www.shmu.sk/sk/?page=2049&id=595

Adresa autorov

Ing. Peter Uhrin, E-mail: petuhrin@hotmail.com

prof. Ing. Ján Supuka, DrSc., E-mail: jan.supuka@uniag.sk

Katedra záhradnej a krajinnej architektúry, Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva, Slovenská Poľnohospodárska Univerzita v Nitre, Tulipánová 7, 949076 Nitra,

MINORITNÍ EVROPSKÉ LESNÍ DŘEVINY JAKO POTENCIÁLNÍ ZDROJ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

EUROPEAN NON-TIMBER WOODY PLANTS AS A POTENTIAL SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

ONDŘEJ VESELÝ – PETR MARŠÍK – LENKA LANGHANSOVÁ – KATEŘINA MOŤKOVÁ – MATĚJ BOŽIK – TOMÁŠ VANĚK

VESELÝ, O. – MARŠÍK, P. – LANGHANSOVÁ, L. – MOŤKOVÁ, K. – BOŽIK, M. – VANĚK, T. 2016. Minoritní evropské lesní dřeviny jako potenciální zdroj biologicky aktivních látek. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 247-252. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
Extracts from bark and leaves of minor non-timber forest trees included in this study were investigated for their anti-inflammatory activity and the content of total phenolic compounds. Phenolic compounds that are often important antioxidants are also known for their anti-cancer, anti-bacterial and many other biological effects. In this study, the amount of total phenolic compounds in plant material was determined using the Folin-Ciocalteau method. Anti-inflammatory activity of the extracts was tested for their *in vitro* ability to inhibit the production of prostaglandins by cyclooxygenase-1 and -2. Cyclooxygenases are the key enzymes regulating inflammation. The highest concentration of total phenolics was detected in extracts of the whitebeam (*Sorbus aria* (L.) Crantz) and dogwood (*Cornus sanguinea* L.) bark. Among the leaf extracts the highest inhibitory activity against COX-1 showed hackberry (*Prunus padus* L.) extract, that was more potent inhibitor (more than 89% enzyme activity) than commercial drug indomethacine (86%). The bark extracts with the highest effect against COX-1 were alder buckthorn (*Frangula alnus* Mill.) (80%) and hackberry (almost 80%). COX-2 was the most strongly inhibited by bark extracts of alder buckthorn (77%), whitebeam and dogwood (both 74%). The inhibitory effects of leaf extracts against COX-2 were not significant.

Key words: anti-inflammatory activity, cyclooxygenase, phenolic compounds, woody plants

ÚVOD

V průběhu evoluce se rostliny coby přisedlé organismy musely vyrovnávat s řadou nepříznivých biotických i abiotických vlivů okolí jako jsou klimatické podmínky, infekce, napadení škůdci či poškození herbivory, což vedlo k tomu, že si vyvinuly množství jedinečných vlastností zajišťujících jejich přežití. Tyto vlastnosti jsou výsledkem kombinací mnoha faktorů, mezi něž patří i produkce sekundárních metabolitů - chemických sloučenin, které nejsou přímou součástí primárního metabolismu, ale hrají klíčovou úlohu v interakci rostlin s jejich okolím (HARBORNE 1996). Tyto látky tvoří strukturně i funkčně velice různorodou skupinu zahrnující alkaloidy, fenoly, terpenoidy a další. Mnoho sekundárních metabolitů vykazuje silnou biologickou aktivitu ovlivňující procesy v řadě organismů včetně člověka a jsou proto odpradávna využívány v lidové medicíně (PASSERO et al. 2014). Z tohoto důvodu jsou rostlinné metabolity intenzivně zkoumány z hlediska jejich potenciálu a případného využití pro lékařské, potravinářské a další průmyslové odvětví (BOURGAUD et al. 2001). Na rozdíl od syntetických léčiv složených zpravidla pouze z několika málo účinných látek v definovaném množství, jsou v rostlinách biologicky aktivní metabolity přítomny v komplexních směsích, kde mohou být účinky dané látky potencovány vlivem synergického působení dalších přítomných metabolitů a výsledný efekt tak může násobně převyšovat efekt jednotlivých izolovaných sloučenin (SINGH et al. 2003). V současné době jsou proto rostliny analyzovány nejen jako téměř nevyčerpatelný zdroj jednotlivých biologicky aktivních sloučenin, ale jsou zkoumány i z hlediska vzájemného ovlivňování účinků jejich jednotlivých složek.

Jednou skupinou látek s výše zmíněným širokým spektrem účinku jsou fenolové sloučeniny. Jedná se o látky složené z jednoho či více aromatických kruhů, a mající jednu nebo více hydroxylových skupin. Zahrnují velký počet podtříd, do kterých řadíme flavonoidy, fenolové kyseliny, stillbeny, lignany, tanniny a oxidované fenoly (PALACIOS et al. 2011). Tyto látky mají řadu biologických účinků zahrnujících antioxidační, protizánětlivé, antialergické, protinádorové, protiartritické či antimikrobiální působení (DECKER 1997; VAQUERO et al. 2007). Významnou zdravotní komplikací doprovázející řadu onemocnění jsou chronické záněty, které jsou regulovány množstvím faktorů, zejména však působením oxylipinů, látek produkovaných v místě zánětu enzymatickou oxidací některých mastných kyselin. Mezi klíčové enzymy biosyntézy oxylipinů patří cyklooxygenázy (COX), které se v živočišných tkáních vyskytují ve dvou izoformách jako COX-1 a COX-2. COX-1 je převážně konstitutivní isoformou enzymu, která je aktivní v i ve zdravém organismu a svou funkcí zabezpečuje řadu fyziologických procesů jako je obnovování povrchu střevní stěny nebo vylučování žaludeční mukózy (SOSTRES et al. 2013). Naproti tomu COX-2 je exprimována pouze v místě zánětu a její funkcí je ovlivňovat procesy se zánětem spojené (bolest, změny prokrvení spojené s otoky atp.). Cyklooxygenázy patří do enzymatické třídy oxidoreduktáz, které biochemickými reakcemi metabolizují kyselinu arachidonovou na eikosanoidy, mezi které patří tromboxany ovlivňující srážlivost krve a prostaglandiny. Ty ovlivňují funkci hladkého svalstva, mají i regulační vliv na žlázovou sekreci (především v trávicím traktu) a jsou signálními molekulami spouštějícími zánětlivou reakci. (KASPER, BURGHARDT 2015).

V naší studii jsme se zaměřili na minoritní evropské lesní dřeviny. Celkem jsme zpracovali vzorky kůry a listů dvanácti keřů a stromů, které jsou nevýznamné z hlediska produkce řeziva a nejsou proto v lesním hospodářství intenzivně využívány. Soustředili jsme se na monitorování jejich potenciální biologické aktivity pomocí *in vitro* metod, kterými jsme zjišťovali celkový obsah fenolických látek a protizánětlivou aktivitu. Protizánětlivá aktivita byla zjišťována na základě enzymatického *in vitro* testu stanovujícího schopnost testovaných extraktů inhibovat obě izoformy cyklooxygenázy. Ačkoliv enzymy COX jsou efektivně blokovány nesteroidními protizánětlivými léčivy (NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs), mezi které patří aspirin, ibuprofen či indometacin, mají tato syntetická léčiva řadu vedlejších účinků, a proto je výzkum potenciálních protizánětlivých látek z přírodních zdrojů stále velmi aktuální (REN et al. 2013). V rámci této studie se pokoušíme ověřit, zda kůra a listy sledovaných divoce rostoucích dřevin mohou být jedním z možných zdrojů biologicky aktivních fenolických látek s antioxidačním a protizánětlivým účinkem.

MATERIÁL A METODY

Použité chemikálie:

Chemikálie: metanol, Folin-Ciocalteu činidlo, uhličitan sodný, dimethylsulfoxid (DMSO), L-epinefrine, porcine hematine, indomethacin, Tris, ethylendiamin tetraacetát (Na_2EDTA), uhličitan sodný (Na_2CO_3), kyselina chlorovodíková pro úpravu pH, kyselina arachidonová, kyselina mravenčí, kyselina gallová, Trolox a enzym cyklooxygenáza-2 byly získány od dodavatele Sigma-Aldrich. Enzym cyklooxygenáza-1 byl získán od dodavatele Cayman Chemical a PGE_2EIA ELISA kit od Assay Designs Inc.

Příprava vzorků:

Vzorky kůry (3 roky staré větve) a listů vybraných lesních dřevin byly získány ze tří jedinců na třech různých lokalitách během letních měsíců stejného roku. Vzorky byly po sběru lyofilizovány, rozdrceny na jemný prach pomocí ručního mlýnku a extrahovány v 80% methanolu v poměru 1 mL MeOH na 10 mg sušiny. Před měřením byly vzorky uchovávány při teplotě -20 °C.

Celkový obsah fenolů - Folin-Ciocalteuův test:

Folin-Ciocalteauův test (FC) je kolorimetrická *in vitro* metoda využívající reakci přenosu elektronu (FOLIN, CIOCALTEU 1927). Je založený na reakci Folin-Ciocalteauova činidla (směs fosfomolybdátu a fosfotungstátu) s fenolickými látkami za vzniku barevných produktů. Za určitých podmínek dojde disociací fenolického protonu, přítomného ve vzorku, k vytvoření fenolátového

anionu, který je schopný redukovat FCR na modře zabarvený komplex. Testované extrakty byly naneseny do mikrotitračních destiček s FCR a po 10 min. inkubaci byla spuštěna reakce přidáním 20% Na_2CO_3. Po 1 hod. inkubace byla měřena absorbance při 760 nm pomocí čtečky absorbance Tecan Infinite M200 (Tecan Group). Celková redukční kapacita vzorku je pak vyjádřená jako množství ekvivalentu kyseliny gallové ve vzorku na gram sušiny (mg GAE/g DW).

Inhibice cyklooxygenáz:

Inhibice cyklooxygenázy-1 (COX – 1) a cyklooxygenázy-2 (COX–2) byla stanovena enzymatickým *in vitro* testem. Extrakty byly testovány při koncentraci 10 µg/mL. Enzymy COX–1 nebo COX–2 byly inkubovány v 100 mM Tris pufru (pH 8,0) spolu s kofaktory (L-epinefrin, hematin, Na_2EDTA) a vzorky rozpuštěnými v čistém dimethylsulfoxidu (DMSO) v 96-ti jamkové mikrotitrační destičce. Reakce byla nastartována přidáním substrátu – 10 µM kyseliny arachidonové. Při reakci vzniká prostaglandin E_2 (PGE_2). Po ukončení reakce (přidáním 10% kyseliny mravenčí) je množství PGE_2 stanoveno pomocí EIA PGE_2 kitu (Assay Designs, USA) dle návodu výrobce ve vzorcích ředěných 1:15 v Assay pufru. Změna absorbance byla měřena při 405 nm pomocí čtečky absorbance Tecan Infinite M200 (Tecan Group). Inhibice tvorby PGE_2 byla vyjádřena jako procento vyprodukovaného PGE_2 v reakci s přidaným testovaným extraktem jeho maximální produkce v reakci bez inhibitoru (blank - DMSO). Inhibice COX–1 a COX–2 byla porovnána se standardním neselektivním inhibitorem indomethacinem testovaném v koncentraci 10 µg/mL.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Přestože léčiva NSAID jsou silnými spojenci v boji se zánětlivými onemocněními, z důvodu častého toxického působení na játra, ledviny a trávicí trakt je třeba hledat další podobně účinné látky, které tyto negativní vlastností postrádají (CHAKRABORTI et al. 2010). V této práci jsme se soustředili na inhibici enzymů COX–1 a COX–2 a na porovnání závislosti na množství fenolických látek ve vzorcích kůry a listů některých dřevin s protizánětlivou aktivitou.

Kvantitativní stanovení množství celkových fenolů ve vzorcích kůry a listů dřevin je uvedeno na obr. 1. Fenolické látky byly detekovány ve všech zkoumaných vzorcích kůry a listů. Množství fenolů v methanolových extraktech kůry se pohybovalo v rozmezí od 7.95 do 66.05 mg GAE/g sušiny; v listech byl jejich obsah 8.26 až 42.97 mg GAE/g sušiny. Mezi vzorky listů a kůry sice existují množstevní rozdíly, nicméně nebyla prokázána jednoznačná souvislost mezi celkovým obsahem fenolů v kůře a listech (obr. 1). Nejvíce fenolů bylo naměřeno v extraktu z kůry jeřábu muku *Sorbus aria* (L.) Crantz (66.05 mg GAE/g sušiny). Tento extrakt zároveň vykazoval výraznou inhibici obou cyklooxygenáz – 1 (68,3%) a – 2 (74,0%), což by mohlo naznačovat souvislost mezi obsahem fenolů a protizánětlivou aktivitou (Tab. 2). Stejný vztah mezi množstvím fenolických látek a potenciální protizánětlivou aktivitou byl patrný i u extraktů kůry svídy krvavé *Cornus sanguinea* L., ve kterých byl obsah celkových fenolů více než 50 mg GAE/g sušiny a zároveň významně inhibovaly i oba enzymy s vyšší účinností vůči COX–2 oproti COX–1 (selektivita 0,85) (Tab. 2). Naproti tomu extrakty z jejích listů měly selektivitu naopak vyšší vůči COX-1 (1,31) a inhibiční potenciál vůči oběma enzymům relativně nízký (COX-1: 53,5% a COX-2:40,9%) při množství přibližně 35 mg GAE/g sušiny. Podobnou selektivitu a výraznější inhibici COX-1 při podobném obsahu celkových fenolických látek překvapivě vykazovaly i extrakty kůry dubu šípáku (*Quercus robur* L. *v. pendula*), zatímco extrakty z jeho listů neměly jakékoliv signifikantní účinky. Vzorky kůry střemchy (*Prunus padus* L.), přestože nepřesáhly hranici obsahu fenolů 35 mg GAE/g sušiny, významně inhibovaly obě COX izoformy s vyšší selektivitou vůči COX–1 (Tab. 2). Protizánětlivá aktivita této dřeviny je tedy vzhledem k relativně nízkému obsahu fenolických látek nejspíše ovlivněna i obsahem jiných biologicky aktivních látek (kyanogenní glykosidy, lignanové glykosidy), které byly dříve u tohoto druhu popsány (YOSHINARI et al. 1989). Vzorky listů byly výrazně lepšími inhibitory COX-1 (vůbec nejvyšší dosažená inhibice COX-1) než COX-2, kde byl jejich účinek podprůměrný (Tab.1). U vzorků kůry i listů *Crataegus oxyacantha* L. se naměřily nevýrazné hodnoty, a přestože se lišily v zapojení do houštiny, rozdíly mezi nimi nebyly velké. Extrakty listů dřínu (*Cornus mas* L.) neměly signifikantní efekt ani na jeden z enzymů, naproti

tomu vzorky kůry dosáhly nízké inhibice COX–2 a významné COX–1 i přes poměrně nízký obsah fenolů (Tab. 2). Vzorky kůry krušiny olšové (*Frangula alnus* Mill.) i přes nízké množství fenolů silně inhibovaly obě izoformy COX (pro COX-1 nejvyšší inhibice mezi všemi extrakty kůry). Tento keř nebo malý strom rostoucí na vlhkých půdách v otevřených lesích (BLAMEY, GREY-WILSON 1989) je známou léčivou rostlinou využívanou v lidovém léčitelství především pro její projímavé účinky, za které jsou zodpovědné hlavní účinné látky 1,8-dihydroxyantrachinonové deriváty glukofrangulin A a B (SADOWSKA et al. 2014). Kromě nich jsou v kůře obsaženy i fenolické látky, zejména hydroxybenzoové kyseliny, flavanoly a tanniny. Extrakty z listů tohoto druhu neměly výraznější inhibiční aktivitu vůči žádnému z testovaných enzymů. Obecně lze shrnout, že extrakty z kůry testovaných dřevin byly zpravidla účinnějšími inhibitory ve srovnání s extrakty z listů.

Tab. 1 Inhibiční aktivita extraktů z listů vybraných lesních dřevin vůči cyklooxygenáze-1 a -2.

Vzorek	Extrakt z listů						COX-1 /COX-2
	COX-1 (%)			COX-2 (%)			
Sambucus nigra L.	31,17	±	14,54	36,27	±	12,18	0,86
Crataegus oxyacantha L.	22,50	±	10,03	17,97	±	5,50	1,25
Sambucus racemosa L.	NA			NA			
Acer campestre L.	47,20	±	5,90	19,39	±	9,37	2,43
Acer pseudoplatanus L.	20,53	±	3,76	NA			
Cornus mas L.	37,10	±	6,12	35,75	±	5,9	1,04
Quercus robur (L.)*v. pendula*	31,86	±	13,68	22,00	±	19,25	1,45
Corylus avellana L.	32,45	±	11,60	20,22	±	8,59	1,60
Frangula alnus Mill.	45,78	±	6,12	36,02	±	5,29	1,27
Prunus padus L.	89,43	±	1,29	33,71	±	6,92	2,65
Cornus sanguinea L.	53,46	±	4,85	40,92	±	5,57	1,31
Sorbus aria (L.) Crantz	76,97	±	4,64	49,51	±	2,22	1,55
IDM	86,30	±	8,84	85,51	±	4,68	1,01

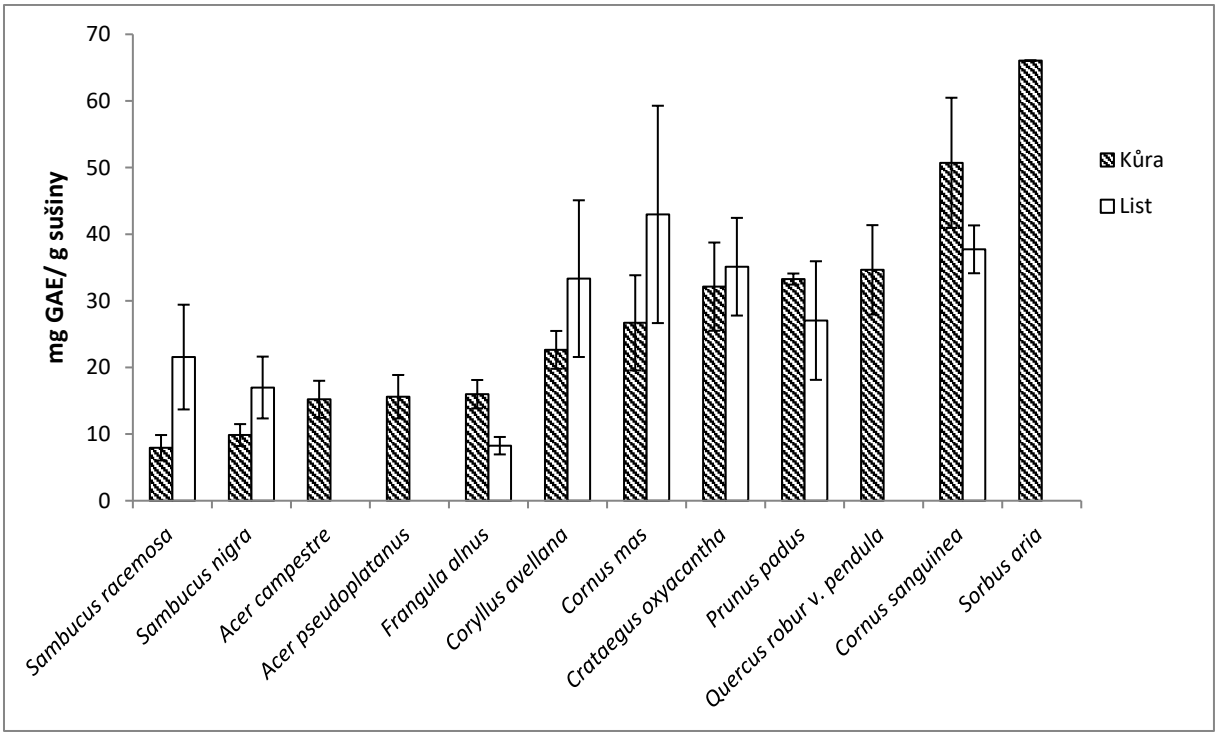
COX-cyklooxygenáza, IDM - indomethacin, NA - neaktivní

Tab. 2 Inhibiční aktivita extraktů z kůry vybraných lesních dřevin vůči cyklooxygenáze-1 a -2.

Vzorek	Extrakt z kůry						COX-1 /COX-2
	COX-1 (%)			COX-2 (%)			
Sambucus nigra L.	56,26	±	3,07	56,12	±	13,84	1,00
Crataegus oxyacantha L.	53,49	±	2,85	59,88	±	6,01	0,89
Sambucus racemosa L.	74,81	±	3,37	48,23	±	11,87	1,55
Acer campestre L.	66,72	±	5,21	26,05	±	9,99	2,56
Acer pseudoplatanus L.	33,75	±	9,21	16,40	±	11,73	2,06
Cornus mas L.	61,24	±	7,37	44,29	±	7,08	1,38
Quercus robur (L.) *v. pendula*	66,28	±	3,60	38,71	±	8,86	1,71
Corylus avellana L.	53,84	±	5,92	45,19	±	10,98	1,19
Frangula alnus Mill.	80,15	±	6,49	76,92	±	5,81	1,04
Prunus padus L.	78,86	±	3,27	69,18	±	5,97	1,14
Cornus sanguinea L.	62,50	±	3,81	74,02	±	2,26	0,85
Sorbus aria (L.) Crantz	68,28	±	5,26	74,02	±	2,26	0,92
IDM	86,30	±	8,84	85,51	±	4,68	1,01

COX-cyklooxygenáza, IDM - indomethacin

Ve většině případů byla selektivita stejná vůči oběma typům cyklooxygenáz nebo vyšší vůči konstitutivní COX-1. Pouze v jednom případě listového extraktu (bez černý *Sambucus nigra* L.) byla silněji inhibována COX-2, nicméně celková inhibice obou enzymů byla prakticky bezvýznamná (Tab. 1). V případě extraktů z kůry byla selektivita vůči indukované COX-2 nejvyšší u svídy (*Cornus sanguinea* L.), hlohu (*Crataegus oxyacantha* L.) a jeřábu muku (*Sorbus aria* (L.) Crantz) (mezi 0,85 a 0,92).



Obr. 1 Obsah celkových fenolů v kůře a listech dřevin vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové na gram sušiny), GAE - kys. Gallová.

ZÁVĚR

Z výsledků studie vyplývá, že minoritní lesní dřeviny mohou být potenciálním zdrojem biologicky aktivních látek. Řada testovaných extraktů, a to zejména z kůry, inhibovala v *in vitro* podmínkách klíčové enzymy regulace zánětlivých procesů cyklooxygenázy 1 a 2 a aktivita některých z nich byla srovnatelná s účinky standardního protizánětlivého léčiva indomethacinu. Ačkoli je zřejmě tato inhibiční aktivita často úměrná obsahu fenolických látek, některé výsledky naznačují, že se na potlačení aktivity cyklooxygenáz některými extrakty (např. extrakty krušiny olšové, střemchy obecné) mohou podílet i další látky či jejich kombinace. Na základě této studie je zřejmé, že výzkum obsahových látek a jejich biologických účinků minoritních lesních dřevin zasluhuje další pozornost.

PODĚKOVÁNÍ

Tento projekt byl uskutečněn za podpory programu OPPK CZ.2.16/3.1.00/24014 financovaného z Evropského fondu pro regionální rozvoj a programu LD14079 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

LITERATURA

BLAMEY, M., GREY-WILSON, C. (1989). Illustrated flora of Britain and Northern Europe. Hodder and Stroughton.

BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., GONTIER, E. 2001 Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. In: Plant Science roč. 161, s. 839–851.

DECKER, A. 1997. Phenolics: prooxidants or antioxidants? In: Nutrition Reviews roč. 55(11), s. 396-398.
Exhibiting Antileishmanial Activity
Exhibiting Antileishmanial Activity
FOLIN, O., CIOCALTEU, V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. In: J. biol. Chem roč. 73(2), s. 627-650.
HARBORNE, J. B. 1996. Plant Secondary Metabolism, in Plant Ecology, Second Edition (ed M. J. Crawley), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. doi: 10.1002/9781444313642.ch5
CHAKRABORTI, A. K., GARG, S. K., KUMAR, R., MOTIWALA, H. F., JADHAVAR, P. S. 2010. Progress in COX-2 Inhibitors: A Journey So Far. In: Current Medicinal Chemistry roč. 17(15), s. 1563-1593.
KASPER, H., BURGHARDT, W. 2015. Výživa v medicíně a dietetika (11. ed.). Grada. Praha. 592 s. ISBN: 978-8024745336
PALACIOS, I., LOZANO, M., MORO, C., D'ARRIGO, M., ROSTAGNO, M., MARTÍNEZ, J., GARCÍA-LAFUENTE, A., GUILLAMÓN, E., VILLARES, A. 2011. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. In: Food Chemistry roč. 128(3), s. 674-678.
PASSERO, L.F.D., LAURENTI, M.D., SANTOS-GOMEZ, G., CAMPOS, B.L.S., SARTORELLI, P., LAGO, J.H.G. 2014. Plants Used in Traditional Medicine: Metabolites Exhibiting Antileishmanial activity. In: Current Clinical Pharmacology roč. 9(3), s. 187-204.
Plants Used in Traditional Medicine: Extracts and Secondary Metabolites
Plants Used in Traditional Medicine: Extracts and Secondary Metabolites
REN, H., LI, D., MOU, Z., DONG P. 2013. The Adverse Effect of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor on Random Skin Flap Survival in Rats. In: PlosOne roč. 8(12), s. e82802.
SADOWSKA, B., PASZKIEWICZ, M., PODSEDEK, A., REDZYNIA, M., ROZALSKA, B. 2014. *Vaccinium myrtillus* leaves and *Frangula alnus* bark derived extracts as potential antistaphylococcal agents. In: Acta Biochim Pol roč. 61(1), s. 163-169.
SINGH, B., BHAT, T.K., SINGH, B. 2003. Potential Therapeutic Applications of Some Antinutritional Plant Secondary Metabolites. In: J. Agric. Food Chem. roč. 51 (19), s. 5579–5597.
SOSTRES, C., GARGALLO, C.J., LANAS, A. 2013. Nonsteroidal anti-infl ammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. In: Arthritis Research & Therapy roč. 2013, 15(Suppl 3):S3
VAQUERO, M. J. R., ALBERTO, M. R., DE NADRA, M. C. M. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. In: Food Control roč. 18(2), s. 93-101.
YOSHINARI, K., SASHIDA, Y., SHIMOMURA, H. 1989. Two new lignan xylosides from the barks of *Prunus ssiori* and *Prunus padus*. In: Chemical and Pharmaceutical Bulletin roč. 37(12), s. 3301-3303.

Adresa autorů

Bc. Ondřej Veselý[1,2] E-mail: czeveselyo@gmail.com
Mgr. Petr Maršík, Ph.D.[1] E-mail: marsik@ueb.cas.cz
Ing. Lenka Langhansová, Ph.D.[1] E-mail: langhansova@ueb.cas.cz
Ing. Moťková Kateřina[1] E-mail: katerina.motkova@gmail.com
Ing. Matěj Božik[2] E-mail: bozik@af.czu.cz
RNDr. Tomáš Vaněk, CSc.[1] E-mail: vanek@ueb.cas.cz

[1]Laboratoř rostlinných biotechnologií, Ústav experimentální botaniky, AV ČR v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 - Lysolaje, Česká republika, Tel.: +420 225 106 803
[2]Katedra kvality zemědělských produktů, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6 – Suchdol, Česká republika, Tel.: +420 224 382 967

ZMENA OBSAHU LABILNÝCH FORIEM UHLÍKA V PÔDE SO ZMENENÝM VYUŽÍVANÍM

THE CHANGE OF LABILE CARBON FORMS IN SOIL WITH MODIFIED USE

TÍMEA SZLOVÁKOVÁ - NORA POLLÁKOVÁ

SZLOVÁKOVÁ, T. – POLLÁKOVÁ, N. 2016. Zmena obsahu labilných foriem uhlíka v pôde so zmeneným využívaním. In Zborník referátov z vedeckej konferencie: „Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV“, 05.10.2016. Vieska nad Žitavou: Arborétum Mlyňany SAV, s. 253-256. ISBN 978-80-89408-26-9

Abstract
In the study were compared total organic carbon content and its labile forms between cropland which was used as a control and soil which was changed from cropland to forest in 1960. This forest has been planted with introduced trees (*Juniperus chinensis* L. and *Thuja orientalis* L.). Samples were taken from A horizons under dense growth of trees and from cropland in quadruplicate. After 55 years of trees action Akp horizon remaind unchaged. Total organic carbon content was 2.3 times (juniperus) and 2 times (thuja) higher than in arable. Labile carbon content was higher under introduced trees – 2.5 times (Juniperus) and 1.9 times (Thuja). Also hot water-soluble carbon content had been increased in forest soil – 4.5 times (Juniperus) and 3 times (Thuja) in compared with control.

Key words: cropland, introduced trees, total carbon, labile carbon

ÚVOD

Vlastnosti pôdy patria k najdôležitejším charakteristikám stanovišťa, pričom výskum pôdno-ekologických podmienok má veľký význam pri úspešnej introdukcii cudzokrajných drevín (Polláková et al., 2015). Pôda predstavuje najväčšie zásoby uhlíka na Zemi. Tieto sú neustále ovplyvňované využívaním pôdy a technologickými zásahmi (TOBIAŠOVÁ, 2010). Keďže stabilnejšie frakcie organickej hmoty sa menia v priebehu dlhšieho časového obdobia, citlivejšími ukazovateľmi zmien v zásobe uhlíka sú labilné formy pôdnej organickej hmoty. Tie umožňujú sledovať zmeny už počas jedného roka. Obsahy jednotlivých foriem uhlíka sú spôsobom využívania pôdy a typom vegetácie výraznejšie ovplyvňované v humusových horizontoch (TOBIAŠOVÁ, 2014), preto cieľom práce bolo zistiť rozdiely v zásobách labilných foriem uhlíka na pôde, ktorá bola v roku 1960 premenená z ornej pôdy na lesnú pôdu Arboréta Mlyňany, SAV, a na ktorej boli vysedené introdukované dreviny (borievky čínske, tuje východné). Kontrolným variantom bol zvyšok pôdy, ktorá sa aj v súčasnosti využíva ako orná.

MATERIÁL A METÓDY

Arborétum Mlyňany, SAV bolo založené v roku 1892 Dr. Štefanom Ambrózy-Migazzim. Nachádza sa na severnom okraji Podunajskej nížiny v údolí rieky Žitava (48°19´s.š.; 18°21´v.d.). Zvlnený terén arboréta je južným výbežkom Hronského Inovca a Tríbeča s nadmorskou výškou 165-217 m n. m. (STEINHÜBEL, 1957). Priemerná ročná teplota v arboréte je 10,6°C a ročný úhrn zrážok 541 mm (Hoťka, 2011). Na skúmanej lokalite boli klasifikované pôdne typy hnedozem kultizemná pod porastom tují východných a hnedozem kultizemná pseudoglejová pod porastom borievok čínskych a na ornej pôde. V roku 1960 bola časť ornej pôdy odkúpená. Na tejto pôde sa vytvorila 14 ha plocha východoázijskej dendroflóry. Jej základ tvoria dreviny privezené z Číny (BENČAŤ 1963; TÁBOR A PAVLAČKA, 1992; HOŤKA ET AL., 2010). Po premene ornej pôdy na lesný ekosystém došlo súčasne k zmene využívania pôdy aj k zmene vegetácie pestovanej na tejto ploche.

Pôdne vzorky boli odobraté z humusových horizontov pod zhustenou monokultúrou porastu introdukovaných drevín - borievok čínskych (*Juniperus chinensis* L.*)*, tují východných *(Thuja orientalis* L.) a na ornej pôde v štyroch opakovaniach. Vzorky boli vysušené, zomleté a preosiate cez sito

s veľkosťou pórov 0,25 mm. V takto pripravených vzorkách bol stanovený obsah celkového uhlíka (C_T) - metódou Ťurina (ORLOV A GRIŠINA, 1981), labilného uhlíka (C_L) – 5 mmol.dm^{-3} $KMnO_4$ v kyslom prostredí 2,5 mmol.dm^{-3} H_2SO_4 (LOGINOW ET AL., 1993), obsah uhlíka rozpusteného v horúcej vode (C_{hws}) - metódou KÖRCHENSA A SCHULZA (1999), obsah uhlíka odolného oxidácii (C_{NL}) a labilnosť organického uhlíka (L). Rovnako bolo stanovené zastúpenie labilných foriem uhlíka z celkového uhlíka, vyjadrené v percentách.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pôsobenie drevín na pôdu, ktorá bola do roku 1960 využívaná ako orná spôsobilo v humusovom horizonte (0-20 cm) výrazné zvýšenie obsahu celkového uhlíka (C_T). Pod tujami východnými 2 násobne a 2,3 násobne pod borievkami čínskymi v porovnaní s kontrolou (tab.). Je známe, že po zalesnení, dreviny svojím opadom a odumretými koreňovými zvyškami priaznivo vplývajú na zvyšovanie obsahu uhlíka v pôde (HU ET AL., 2016). Rozklad odumretého koreňového systému zlepšuje tvorbu agregátov, fyzikálno-chemickú ochranu pôdneho organického uhlíka (POC) a zvyšuje priemernú dobu zadržania uhlíka v hlbších vrstvách pôdneho profilu (CONANT ET AL., 2011). HU ET AL. (2016) uvádzajú, že zásoby uhlíka v pôdach lesných ekosystémov sú asi štvornásobne vyššie v porovnaní so zásobami uhlíka v pôde, na ktorej je vysadená nižšia vegetácia. Okrem toho, že opad stromov a koreňové zvyšky sú zdrojom uhlíka v pôde, pomáhajú tiež zlepšovať mikroklímu, fyzikálne a chemické vlastnosti pôdy a znižujú vyplavovanie makroživín (MAKITA A FUJII, 2015; LEWANDOWSKI ET AL., 2016). V porovnaní s obsahom celkového uhlíka sú citlivejším ukazovateľom zmien v zásobách uhlíka jeho labilné formy (labilný a v horúcej vode rozpustný uhlík), ktorých kolobeh trvá len niekoľko dní až mesiacov (POLLÁKOVÁ A KONÔPKOVÁ, 2012). V pôde pod porastom tují východných sa obsah labilného uhlíka zvýšil 1,9 násobne a pod borievkami 2,5 násobne v porovnaní s ornou pôdou (tab.). SILVERIA ET AL. (2008) uvádzajú, že pôdny labilný uhlík je najaktívnejšou frakciou POC s najrýchlejším kolobehom. Aj hodnoty obsahu uhlíka odolného oxidácii (C_{NL}) sa zvýšili z pôvodných 10,79 g.kg^{-1} (orná pôda) až na 24,28 g.kg^{-1} (borievky) a 21,60 g.kg^{-1} (tuje). V humusových horizontoch pod introdukovanými drevinami boli výrazne vyššie aj hodnoty obsahu uhlíka rozpusteného v horúcej vode (C_{hws}). Pri borievkach čínskych bola hodnota až 4,5 násobne vyššia a pri tujách východných 3 násobne vyššia v porovnaní s ornou pôdou, kde C_{hws} bolo 0,47 g.kg^{-1} (tab.). Labilnosť uhlíka (L) ako aj percentuálne zastúpenie jednotlivých labilných foriem uhlíka z obsahu celkového uhlíka sa významne nezmenili. Poznať množstvo a zastúpenie jednotlivých foriem uhlíka v pôde je veľmi dôležité, keďže pôdny organický uhlík je súčasťou pôdnej organickej hmoty, ktorá sa podieľa na udržiavaní vhodných fyzikálnych, chemických a biologických pôdnych vlastností (JOHNSEN ET AL., 2013).

Tab. 1 Obsah celkového uhlíka a jeho labilných foriem v Akp horizontoch (0-20 cm) hnedozemí pod porastom borievok čínskych, tují východných a na ornej pôde.

Lokalita	C_T	C_{NL}	C_L	C_{hws}	L	C_{NL}	C_L	C_{hws}
	g.kg^{-1}					% z C_T		
Orná pôda	12,5	10,70	1,75	0,47	0,17	86,1	14,0	3,8
Borievky čínske	28,7	24,28	4,45	2,12	0,16	86,8	6,5	3,6
Tuje východné	24,9	21,6	3,31	1,39	0,14	87,8	5,1	5,2

Vysvetlivky: C_T – obsah celkového uhlíka, C_{NL} – organický uhlík odolný oxidácii z $KMnO_4$, C_L – labilný organický uhlík oxidovaný 5 mmol.dm^{-3}, C_{hws} – organický uhlík rozpustný v horúcej vode, L – labilnosť organického uhlíka

ZÁVER

Aj po 55 ročnom pôsobení drevín na pôdu zostal zachovaný kultizemný ornicový horizont (Akp). V humusových horizontoch pod porastom borievok a tují sa oproti kontrole výrazne zvýšil obsah organickej hmoty udávaný celkovým uhlíkom a jeho labilnými formami nasledovne:

- C_T sa zvýšil 2 násobne pod porastom tují a 2,3 násobne pod porastom borievok,
- C_{NL} sa zvýšil z pôvodných 10,79 $g.kg^{-1}$ zistených na ornej pôde na 24,28 $g.kg^{-1}$ (borievky) a 21,60 $g.kg^{-1}$ (tuje),
- Aj obsah C_L sa v pôde pod porastom introdukovaných drevín zvýšil, a to 2,5 násobne pod porastom borievok a 1,9 násobne pod tujami východnými,
- C_{hws} sa v humusových horizontoch pod drevinami zvýšil 3 násobne (tuje) až 4,5 násobne (borievky).

Zmena využívania pôdy z ornej na lesnú a zmena pestovaného druhu porastu ovplyvnili pôdne vlastnosti.

POĎAKOVANIE

Výskum bol vypracovaný s podporou projektu KEGA 014 SPU – 4/2016.

LITERATÚRA

BENČAŤ, F. 1963. Kurze ökologisch-dendrologische Charakteristik der Vegetationstonen Chinas. In *Deutche Baumschule*. Vol. 15, No. 9-10, s. 255-269 (No. 9), s.283-291 (No. 10).

CONANT, R. T., et al. 2011. Temperature and soil organic matter decomposition rates–synthesis of current knowledge and a way forward. In *Global Change Biology*, 2011, roč.17, s. 3392-3404.

HOŤKA, P. – BIBEŇ, T. – BARTA, M. 2010. *Sprievodca po zbierkach Arboréta Mlyňany SAV*. Bratislava : Veda. s. 73. ISBN 978-80-224-1129-5.

HOŤKA, P. 2011. *Arborétum Mlyňany Slovenskej akadémie vied*. Bratislava : JAGA GROUP. s. 34.

HU, Y-L. – ZENG, D-H. – MA, X-Q. – CHANG, S. X. 2016. Root rather than leaf litter input drives soil carbon sequestration after afforstation on a marginal cropland. In *Forest Ecology and Manag.*, roč. 362, 2016, s. 38-45.

JOHNSEN, K. H. – SAMUELSON, L. J. – SANCHEZ, F. G. – EATON, R. J. 2013. Soil carbon and nitrogen content and stabilization in mid-rotation, intensively managed sweetgum and loblolly pine stands. In *Forest Ecol. and Manag*., roč. 302, 2013, s. 144-153.

KÖRCHENS, M. – SCHULZ, E. 1999. *Die organische bodensubstanz – dynamik – reproduction – ökonomisch und ökologisch begründete richtwerte* UFZ-Bericht 13, Uweltforschfungszenctrum Liepizg-Halle. p. 85-95.

LEWANDOWSKI, T. E. – FORRESTER, J. A. – MLADENOFF, D. J. – D´AMATO, A. W. 2016. Response of the soil microbial community and soil nutrient bioavailability to biomass harvesting and reserve tree retention in northern Minnesota aspen-dominated forests. In *Applied Soil Ecology*, roč. 99, 2016, s. 110-117.

LOGINOW, W. – WIŚNIEWSKI, W. – GONET, S. S. – CIEŚCIŃSKA, B. 1993. The method for determining susceptibility of soil organic matter to oxidation. In *Zsesyty problemowe podtepów nauk rolnicznych* z. 411. Bydgoszcz : ATR, p. 207-212.

MAKITA, N. – FUJII, S. 2015. Tree species effects on microbial respiration from decomposing leaf and fine root litter. In *Soil Biology and Biochemistry*, roč. 88, 2015, s. 39-47.

ORLOV, D. S. – GRIŠINA, L.A. 1981. *Praktikum po chimiji gumusa*. Moskva : Izdateľstvo Moskovskovo universiteta. 272 s.

POLLÁKOVÁ N. – MAKOVÁ, J. – HOŤKA, P. – FERUS, P. 2015. Vybrané chemické vlastnosti pôdy pod introdukovanými drevinami v Arboréte Mlyňany, SAV. In *Zborník Environmentálne indexy, oblasti ekologického záujmu a ekosystémové služby v krajine*. Bratislava: NPCC, VÚPOP, 2015. ISBN 978-80-8163-009-5.

SILVERIA, M. L. – COMERFORD, N. M. – REDDY, K. R. – COOPER, W. T. – EL-RIFAI, H. 2008. Characterization of soil organic carbon pools by acid hydrolysis. In *Geoderma*, roč. 144, 2008, s. 405-414.

STEINHÜBEL, G. 1957. *Arborétum Mlyňany v minulosti a dnes*. Bratislava : Vydavateľstvo SAV. 171 s.

TÁBOR, I. - PAVLAČKA, R. 1992. *Arborétum Mlyňany. Sprievodca po arboréte*. Bratislava : VEDA SAV, 1992. 64 s. ISBN 80-224-0355-5.

TOBIAŠOVÁ, E. 2010. *Pôdna organická hmota ako indikátor kvality ekosystémov*. Vedecká monografia. Nitra: SPU, 107 s. ISBN 978-80-552-0459-8.

TOBIAŠOVÁ, E. 2014. *Stabilita pôdnej organickej hmoty*. Vedecká monografia. Nitra: SPU, 92 s. ISBN 978-80-552-1178-7.

Adresa autorov

Ing. Tímea Szlováková a doc. Ing. Nora Polláková, PhD., Katedra pedológie a geológie, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel.: 037/641 4389, e-mail: nora.pollakova@uniag.sk

Zoznam autorov

ADAMČÍKOVÁ, Katarína, Mgr. PhD.	**205**
BAKAY, Ladislav, Ing., PhD.	**216**
BARANEC, Tibor, prof. RNDr. CSc.	**5, 47, 65**
BARTA, Marek, Ing. PhD.	**14, 25, 121, 174**
BIBEŇ, Tomáš, Ing.	**174**
BOŠEĽOVÁ, Danka, Ing.	**35**
BOŠIAKOVÁ, Dominika, RNDr.	**141**
BOŽIK, Matěj, Ing.	**247**
ČERNÁ, Jana, Ing. PhD.	**194**
DITMAROVÁ, Ľubica, RNDr. PhD.	**209**
DOROFTEI, Mihai, Dr.	**113**
DUMITRAŞCU, Monica, Dr.	**113**
ĎURAČKA, Michal, Bc.	**41,**
ĎURIŠOVÁ, Ľuba, Ing. PhD.	**47, 65**
ELIÁŠ, Pavol, prof. RNDr. CSc.	**54, 59**
ELIÁŠ, Pavol ml., doc. Ing. PhD.	**65**
FERIANCOVÁ, Ľubica, prof. Ing. PhD.	**71**
FERUS, Peter, Ing. PhD.	**76, 121, 141, 201**
FILOVÁ, Angelika, Ing. PhD.	**82**
GAJDOŠOVÁ, Alena, RNDr. CSc.	**90**
GALGÓCI, Martin, RNDr. PhD.	**94**
GALUŠČÁKOVÁ, Ľudmila, Ing. PhD.	**5**
GÁPER, Ján, prof. RNDr. CSc.	**100, 106, 182**
GÁPEROVÁ, Svetlana, doc. RNDr. PhD.	**106**
GAŠPARCOVÁ, Terézia, Mgr.	**106**
GRIGORESCU, Ines, Dr.	**113**
GÖMÖRY, Dušan, prof. Ing. DrSc.	**94**
GUBIŠ, Jozef, Ing. PhD.	**76, 201**
HALENÁROVÁ, Eva, Ing.	**161**
HAZUBSKA-PRZYBYL, Teresa, Dr.	**220**
HOLEČKOVÁ, Daniela, Ing.	**129**
HOŤKA, Peter, Ing. PhD.	**76, 141**
HRICÁKOVÁ, Nikola, Bc.	**121**
HRUBÍK, Pavel, prof. Ing. DrSc.	**129, 178**
HUNKOVÁ, Júlia, Mgr.	**90**
CHAROUSOVÁ, Ivana, Ing.	**161**
IKRÉNYI, Ivan, RNDr. PhD.	**5**
IVANOVÁ, Helena, RNDr. CSc.	**137**
JANKOVSKÁ, Petra, Ing.	**155**
JAVOREKOVÁ, Soňa, prof. Ing. PhD.	**161**
JEŽÍK, Marek, Ing. PhD.	**209**
JUREKOVÁ, Zuzana, prof. Ing. PhD.	**194**
KLUBICOVÁ, Katarína, Mgr. PhD.	**220**
KOBZA, Marek, Mgr. PhD.	**188**
KONÔPKOVÁ, Jana, Ing. PhD.	**76, 141, 208**
KORMUŤÁK, Andrej, RNDr. DrSc.	**94**
KOVÁCSOVÁ, Silvia, Ing. PhD.	**161**
KRUŽLÍKOVÁ, Michaela, Bc.	**106**

KUCSICSA, Gheorghe, Dr. **113**
KUCZMAN, Gabriel, Ing. PhD. **71**
LANGHANSOVÁ, Lenka, Ing. PhD. **146, 247**
LIBIAKOVÁ, Gabriela, RNDr. CSc. **90**
LICHTNEROVÁ, Helena, Ing. PhD. **194**
LUKÁČ, Norbert, prof. Ing. PhD. **229**
LUKÁČIK, Ivan, doc. Ing. CSc. **155**
MAJEROVÁ, Jana, Ing. PhD. **209**
MAJESKÁ, Miroslava, RNDr. PhD. **76, 201**
MATUŠÍKOVÁ, Ildikó, Ing. PhD. **41, 229**
MATÚŠOVÁ, Radoslava, RNDr. PhD. **220**
MAKOVÁ, Jana, doc. Ing. PhD. **161**
MARŠÍK, Petr, Mgr. PhD. **146, 247**
MASAROVIČOVÁ, Elena, prof. RNDr. DrSc. **167**
MÁJEKOVÁ, Mária, Mgr. PhD. **167**
MEDO, Juraj, Ing. PhD. **25, 121, 161, 174**
MICHALKO, Jaroslav, Ing. PhD. **41, 174, 229**
MŇAHONČÁKOVÁ, Erika, Ing. PhD. **178**
MOŤKOVÁ, Kateřina, Ing. **247**
NÁPLAVOVÁ, Kateřina, Mgr. **100, 182**
OSTROVSKÝ, Radovan, Ing. PhD. **188**
PAGANOVÁ,Viera, prof. Ing. PhD. **194**
PASTIRČÁK, Martin, Mgr. PhD. **76, 201**
PASTIRČÁKOVÁ, Katarína, Mgr. PhD. **205**
POLLÁKOVÁ, Nora, doc. Ing. PhD. **161, 208, 253**
PŠIDOVÁ, Eva, Ing. PhD. **209**
ROVNÁ, Katarína, Ing. PhD. **216**
SALAJ, Ján, doc. RNDr. DrSc. **220**
SALAJ, Terézia, RNDr, DrSc. **220**
SARVAŠOVÁ, Ivana, Ing. PhD. **155**
SLUGEŇOVÁ, Kristína, Ing. PhD. **209**
SUPUKA, Ján, prof. Ing. DrSc. **239**
SÚKENÍKOVÁ, Denisa, Mgr. **94**
SZLOVÁKOVÁ, Tímea, Ing. **253**
ŠIMANSKÝ, Vladimír, doc. Ing. PhD. **208**
TOKOŠOVÁ, Eva, Mgr. **94**
TÓTH, Attila, Ing. PhD. **224**
TVRDÁ, Eva, Ing. PhD. **41, 229**
UHRIN, Peter, Ing. **239**
VANĚK, Tomáš, RNDr. CSc. **247**
VESELÝ, Ondřej, Bc. **247**
VYKOUKOVÁ, Ivana, Mgr. PhD. **167**
ZACH, Peter, Ing. PhD. **25**
ŽABKA, Michal, Ing. PhD. **47**
ŽIAROVSKÁ, Jana, doc. Ing. PeadDr. PhD. **35, 121**

Zostavili: **Marek Barta, Peter Ferus**
Názov: **Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2016**
Recenzovaný zborník príspevkov z vedeckej konferencie
Vydavateľ: **Arborétum Mlyňany SAV**
Vydanie: **Prvé**
Náklad: **70 ks**
Počet strán: **259**
Obálka a grafická úprava: **Marek Barta**

Materiál neprešiel jazykovou úpravou.

ISBN 978-80-89408-26-9