

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů PřF UP a AV ČR



TESTOVÁNÍ VLIVU BRASSINOSTEROIDŮ
NA ETIOLOVANÉ ROSTLINY HRACHU

Testing of influence of brassinosteroid on plants pea

Autor: Petra Kořínková

Studijní program, studijní obor: Biologie, Systematická biologie a ekologie (R10060)

Forma studia: prezenční

Vedoucí práce: Ing. Jaromír Mikulík, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím uvedených zdrojů, pramenů a literatury pod odborným dohledem pana Ing. Jaromíra Mikulíka, Ph.D.

V Olomouci 7.5.2013

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto poděkovat panu Ing. Jaromíru Mikulíkovi, Ph.D za vedení bakalářské práce, rady, připomínky a čas, který mi věnoval a také paní Jarmile Balonové za ochotu a pomoc při seznamování se s laboratoří.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Petra Kořínková

Název práce: Testování vlivu brassinosteroidů na etiolované rostliny hrachu

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP & Laboratoř růstových regulátorů PřF UP

Vedoucí práce: Ing. Jaromír Mikulík, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt:

Úkolem bakalářské práce bylo vyzkoušet a optimalizovat metodu testování brassinosteroidů na etiolovaných rostlinách hrachu.

Po sestavení vhodné metody byl testován základní vliv 24-epibrassinolidu, v koncentračním rozmezí 10^{-9} - 10^{-16} M. Biotest se prováděl na etiolovaných rostlinách hrachu setého (*Pisum sativum*) – odrůda Progres 9 a Gloriosa a etiolovaných rostlinách hrachu polního - pelušky (*Pisum arvense*) – odrůda Arvica.

Z naměřených výsledků lze konstatovat, že nejvýraznější vliv na etiolovaný růst rostlin hrachu má 24-epibrassinolid o koncentraci 10^{-9} M. Po aplikaci testovaného brassinosteroidu o koncentraci 10^{-9} M je velmi výrazně inhibován elongační růst a naopak je stimulován růst radiální, u takových rostlin můžeme také pozorovat nápadné zkroucení apikální části.

Klíčová slova: fytohormon, brassinosteroidy, 24-epibrassinolid (24-EP), etiolizace, hrách

Počet stran: 60

Počet příloh: 1

Jazyk: Čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Petra Kořínková

Title: Testing of influence of influence of brassinosteroid on plants pea

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Botany & LRR

Supervisor: Ing. Jaromír Mikulík, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract:

The task of the bacheolar thesis was to test and optimizme the method of testing brassinosteroids on dark-grown plants pea.

After assembling the appropriate method was tested basic effect of 24-epibrassinolide in concentration range 10^{-9} - 10^{-16} M. The bioassay was carried out on etiolated stems of pea *Pisum sativum* L. sort Progres 9 and Gloriosa and etiolated stems of pea *Pisum arvense* L. sort Arvica.

From the measured results it can state that the most significant effect on the growth of etiolated plants pea has 24-epibrassinolid concentration 10^{-9} M. After application of brassinosteroids at concentration of 10^{-9} M there is very remarkable inhibited elongation and on the other hand radial growth is stimulated, we can also observe a noticeable curvature of apical part.

Key words: Phytohormones, brassinosteroids, 24-epobrassinolide (24-EP), etiolation, pea plants

Number of pages: 60

Number of appendices: 1

Language: Czech

OBSAH

1. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	10
2. ÚVOD	11
3. ROSTLINNÉ HORMONY	12
3.1. AUXINY	13
3.1.1. Transport.....	14
3.1.2. Hlavní fyziologické účinky auxinů	14
3.2. GIBERELINY	15
3.2.1. Transport.....	16
3.2.2. Hlavní fyziologické účinky giberelinů	16
3.3. CYTOKININY	18
3.3.1. Transport.....	18
3.3.2. Hlavní fyziologické účinky cytokininů	18
3.4. KYSELINA ABSCISOVÁ.....	19
3.4.1. Transport.....	20
3.4.2 Hlavní fyziologické účinky kyseliny abscisové	20
3.5. ETHYLÉN	21
3.5.1. Hlavní fyziologické účinky ethylénu.....	21
3.6. JASMONÁTY.....	22
3.7. POLYAMINY	22

3.8. OLIGOSACHARINY	22
3.9. FENOLICKÉ SLOUČENINY	22
3.10. EKDYSTEROIDY	23
3.11. BRASSINOSTEROIDY	23
3.11.1 Syntéza brassinosteroidů	24
3.11.2 Hlavní fyziologické účinky brassinosteroidů	25
3.11.3. Transport brassinosteroidů	26
3.11.4. Biotesty na účinky brassinosteroidů	27
<u>4. ETIOLIZACE</u>	<u>28</u>
<u>5. BOBTNÁNÍ</u>	<u>30</u>
<u>6. HRÁCH</u>	<u>31</u>
6.1. HISTORIE	31
6.2. ZAŘAZENÍ.....	31
6.3. BOBOVITÉ (Fabaceae).....	31
6.3.1. HRÁCH SETÝ (<i>Pisum sativum</i> L.)	32
6.3.2. HRÁCH POLNÍ – PELUŠKA (<i>Pisum arvense</i> L.)	32
<u>7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>	<u>33</u>
7.1. POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	33
7.1.1. POMŮCKY	33
7.1.2 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	33

7.1.3. CHEMIKÁLIE	34
7.2. PŘÍPRAVA KONCENTRAČNÍ ŘADY 24-EPIBRASSINOLIDU ..	35
7.3. POSTUP PŘI EXPERIMENTU	36
7.3.1. Vložení semen do exsikátoru.....	36
7.3.2. Vysazení klíčenců do perlitu	36
7.3.3. Aplikace 24-epibrassinolidu v místě extirpovaného prvního lístku	37
7.3.4. Měření a hodnocení rostlin	38
<u>8. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ</u>	<u>39</u>
8.1. STANOVENÍ VHODNÉ DOBY APLIKACE.....	39
8.1.1. Bobtnání	39
8.1.2. Klíčení	39
8.1.3. Aplikace 24-epibrassinolidu	40
8.2. VÝSLEDKY.....	41
8.2.1. Hrách setý odrůda Gloriosa	41
8.2.2. Hrách setý odrůda Progres 9.....	42
8.2.3. Hrách polní – peluška odrůda Arvica	43
<u>9. DISKUSE</u>	<u>44</u>
9.1. Zjištění při sestavování metody:	44
<u>10.ZÁVĚR.....</u>	<u>46</u>
<u>11. PŘÍLOHA</u>	<u>47</u>
<u>12. SEZNAM ZKRATEK</u>	<u>55</u>

<u>13. SEZNAM OBRÁZKŮ, FOTOGRAFIÍ, TABULEK A GRAFŮ</u>	<u>56</u>
13.1. SEZNAM OBRÁZKŮ	56
13.2. SEZNAM FOTOGRAFIÍ.....	56
13.3. SEZNAM TABULEK	57
13.4. SEZNAM GRAFŮ	57
<u>14. ZDROJE OBRÁZKŮ</u>	<u>58</u>
<u>15. BIBLIOGRAFIE</u>	<u>59</u>

1. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Hlavní cíle této bakalářské práce jsou:

1. Shromáždit dostupné literární zdroje a seznámit se se skupinou testovaných látek
2. Zvládnout vhodnou metodiku pro pěstování pokusných rostlin
3. Vytvořit metodiku měření rostlin pro sestavení biotestu
4. Otestovat základní vliv brassinosteroidů na etiolované rostliny hrachu

2. ÚVOD

Hormony steroidní povahy byly dlouhou dobu známy pouze u zvířat. Nedávno však byly objeveny také u rostlin. Jedná se především o brassinosteroidy.^[8] Tato skupina hormonů účinkuje již při velmi nízkých koncentracích (10^{-8} - 10^{-10} M i méně)^[3] a hraje nepostradatelnou roli ve vývoji rostlin.^[8] Mezi nejrozšířenější brassinosteroidy patří brassinolid, castasteron a typhasterol.^[1]

Výzkum brassinosteroidů začal před více než třiceti lety, kdy americký vědec John Mitchell a jeho spolupracovníci z US Department of Agriculture, objevili v pylu nový fytohormon.^[14] Tento nový rostlinný hormon byl pojmenován brassinolid z latinského pojmenování řepky olejky - *Brassica napus*, z jejíhož pylu byl brassinolid poprvé izolován.^[1]

Počáteční studium brassinosteroidů bylo zaměřeno převážně na jejich schopnost stimulovat růst. Byly vyvinuty dvě základní specifické metody biotestů pro brassinosteroidy. Jsou to test druhého internodia fazole (*Phaseolus vulgaris*) (second bean internode test) a test odchylky jazýčku rýže (*Oryza sativa*) (rice lamina inclination test).^[10]

Práce je zaměřena na optimalizaci biotestu 24-epibrassinolidu na etiolované rostliny hrachu (*Pisum sativum* a *Pisum arvense*) a otestování základního vlivu 24-epibrassinolidu o koncentraci 10^{-9} - 10^{-16} M na etiolovaný růst těchto rostlin.

3. ROSTLINNÉ HORMONY

Až do počátku 20. století byl růst rostlin vysvětlován z velké části v souvislosti s procesy výživy. První domněnku o existenci chemických signálů, které umožňují vzájemnou komunikaci jednotlivých orgánů rostlin vyslovil ve druhé polovině 19. století německý botanik Julius von Sachs. Tuto myšlenku pak dále významně rozvíjel brněnský profesor Rudolf Dostál.^[1]

Obecně signální látky, které řídí růstové a vývojové procesy v rostlinách nazýváme růstové regulátory. Jedná se však o obecný název zahrnující jak látky přírodní (nativní), tak látky připravené uměle (syntetické).^[3] Dále se ve své práci budu zabývat jen přirozenými regulátory růstu.

Fytohormony neboli rostlinné hormony jsou nízkomolekulární organické látky syntetizované rostlinami, které regulují různé, zejména růstové a vývojové procesy, při velmi nízkých koncentracích (zpravidla 10^{-6} - 10^{-9} M ale často i nižších).^[2] Jiné fyziologicky účinné látky působí teprve v tisíckrát až milionkrát vyšší koncentraci.^[3]

Produkce fytohormonů není vázána na nějaký specifický orgán, jak tomu bývá u živočichů v případě žláz s vnitřní sekrecí. Fytohormony mohou vznikat v různých pletivech různých orgánů, různě rychle. Jejich produkce nemusí být kontinuální, často teprve nějaký faktor z vnějšího prostředí podnítí buňky určitého pletiva nebo orgánu k syntéze hormonu. Na místa účinku jsou potom transportovány vodivými systémy rostlin nebo přímo z buňky do buňky. Jejich transport je však vždy přísně regulován.^[3]

Ve srovnání s živočišnými hormony jsou rostlinné hormony méně specifické, každý z fytohormonů má vliv na více často odlišných procesů a naopak, jeden proces bývá ovlivněn více látkami.^[1] Stejný hormon může vyvolávat kvalitativně odlišné účinky nejen v různých pletivech, ale dokonce i ve stejném pletivu v závislosti na koncentraci.^[3] Látky označované jako stimulatory (např. auxiny, gibereliny, cytokininy), které běžně růst podporují, mohou ve vyšších koncentracích růst brzdit a naopak inhibitory (např. kyselina abscisová) známé svým vlivem na tlumení růstu, mohou ve velmi nízkých koncentracích růst povzbuzovat.^[4] Rostlinné hormony se často vzájemně ovlivňují nebo působí společně (jako synergisté či antagonisté).^[3]

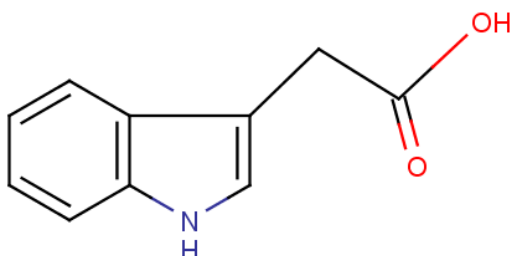
Obecně působí fytohormony jako regulační signály. Buď se nejdříve navážou na receptor v cytoplasmě a následně je jejich signál přenášen systémem druhých posílů (*second messenger*) do jádra (kde vyvolá změnu v expresi určitých genů) nebo hormon proniká přímo do buňky, kde se váže na rozpustný receptor v cytoplasmě a teprve celý tento komplex proniká do jádra. Signál může být vyslán mimo jádro i do buněčných membrán (kde vyvolá změnu transmembránového transportu). Schopnost dané buňky signál rozeznat a následně na něj zareagovat je ovlivněn i tím, v jakém stavu se buňka momentálně nachází.^[1]

Fytohormony klasifikujeme do 5 základních typů a několika skupin látek s regulační aktivitou. Tyto látky jsou fytohormonům podobné, ale jejich působení se projeví až při vyšších koncentracích nebo dostatečně neznáme obecnost jejich působení. Za základní fytohormony považujeme: auxiny, gibereliny, cytokininy, kyselinu abscisovou a etylen. Za látky s regulační aktivitou podobné fytohormonům řadíme například: jasmonáty, polyaminy, oligosachariny, některé fenolické sloučeniny a steroidní hormony.^[3] Hormony steroidní povahy byly dlouhou dobu známy pouze u zvířat. Nedávno však byly objeveny také u rostlin.^[8] Jedná se o brassinosteroidy a ekdysteroidy. Tyto látky mají jako chemický základ steranový skelet.^[9]

3.1. AUXINY

Auxiny, jakožto první objevená skupina rostlinných hormonů, byly prokázány již ve dvacátých letech minulého století a to díky studiu fototropizmu a gravitropizmu. V letech 1926-28 F. W. Went objevil v koleptiliích ovsa látku, která difunduje do agaru a stimuluje prodlužovací růst. Odtud potom jméno auxin (z řeckého *auxien*, což znamená růst/zvětšovat se).^[1] Mezi přirozené auxiny řadíme malou skupinu strukturně podobných látek: kyselina indolyl-3-octová – IAA, kyselina indolyl-3-máselná – IBA, kyselina 4-chlorindolyl-3-octová – 4-Cl-IAA a kyselina fenyloctová – PAA. Dále existuje celá řada strukturních analogů, například kyselina 2,4-D - 2,4-di-chlorfenoxyoctová a kyselina α -naftyloctová – NAA.^[2]

Nejdůležitějším auxinem je kyselina indolyl-3-octová (IAA), která se tvoří v mladých rychle se dělících buňkách (v meristému kořene, v embryích, mladých listech, vyvíjejících se květech a plodech a v apikálním meristému stonku).^[2]



Obrázek č. 1 Kyselina indolyl-3-octová^[26]

3.1.1. Transport

- Na krátké vzdálenosti (mezi buňkami)

Mezibuněčný transport auxinů je především membránový a polární (auxin je jediný polárně přenášeným fytohormonem). Ve stonku probíhá transport bazipetálně (od vrcholu k bázi), v kořeni pak akropetálně (od báze k vrcholu). Ve stonku a listech je auxin takto transportován parenchymem vodivých pletiv.

- Na dlouhé vzdálenosti

Na dlouhé vzdálenosti je auxin transportován nepolárně floémem.^[2]

3.1.2. Hlavní fyziologické účinky auxinů

- Stimulace prodlužovacího (elongačního) růstu

Z tohoto hlediska jsou na auxin schopny reagovat jen buňky dloužení schopné, které ještě nenabýly konečné velikosti (tzn. buňky ve fázi dlouživého růstu nebo buňky s primární buněčnou stěnou). Auxin v těchto buňkách stimuluje aktivitu H^+ ATPáz, které snižují pH v buněčné stěně. Následně jsou aktivovány mechanismy, které způsobí rozvolnění buněčné stěny (tzv. kyselý růst).^[2]

Se stimulací růstu souvisí i úloha auxinu v regulaci gravitropizmu a fototropizmu. Vlivem gravitace či jednostranného osvětlení dochází k nerovnoměrné distribuci IAA a důsledkem toho dochází k nerovnoměrnému růstu a ohybu. Účinné koncentrace auxinů pro stimulaci růstu nadzemních částí se pohybují v rozmezí 10^{-7} - 10^{-5} M.

U kořenů by tato koncentrace měla inhibiční účinky. Pro stimulaci růstu podzemních částí je potřeba koncentrace auxinů o 1-2 řády nižší.^[1]

- Stimulace zakořeňování

Dalším významným růstovým účinkem auxinů je stimulace tvorby kořenů. Auxiny indukují dělení buněk v pericyklu, tyto buňky pak tvoří meristém a základ postranního kořene. Přítomnost auxinů je nezbytná i pro další růst kořene. Auxiny se používají běžně v zahradnické praxi pro zakořeňování řízků při vegetativním množení rostlin.^[2]

- Apikální dominance

Vrcholová (apikální) část hlavního stonku produkuje látky inhibující vývoj postranních pupenů (a z nich vyvinutých větví). IAA se udává jako jedním z faktorů této apikální dominance. Jedná se však o nepřímý účinek, kdy IAA indukuje tvorbu etylénu v postranních výhonech a ten skutečně inhibuje růst těchto postranních výhonů.^[4]

- Oddálení opadu (abscise) listů

Auxin, tvořící se hojně v čepeli mladých listů, inhibuje proces oddělování listů, který probíhá tzv. abscisní zóně, která se nachází v abscisní vrstvě. Stěny buněk této vrstvy jsou enzymaticky narušeny a následně ztrácejí pevnost. S procesem stárnutí klesá produkce auxinu a až v senescenci zcela ustává a dochází k opadu listů.^[2]

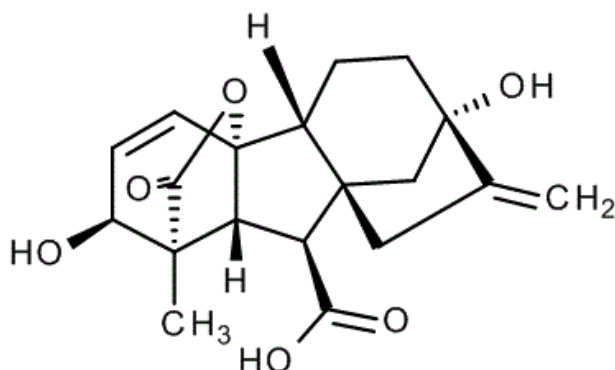
- Ovlivnění růstu plodů

Při růstu plodů zastupuje auxin velmi komplexní úlohu. Tvoří se již ve velmi časných vývojových stádiích embryí, kde je nezbytný pro jejich polarizaci. Zároveň auxiny stimulují dělení a prodlužování buněk vznikajícího oplodí. V neposlední řadě se uplatňuje při diferenciaci vodivých pletiv transportujících asimiláty.^[2]

3.2. GIBERELINY

První gibereliny byly izolovány v druhé polovině 20. let minulého století v Japonsku z rýže seté (*Oryza sativa*), která byla napadena nemocí *bakanae*. *Bakanae* je nemoc způsobená houbou *Gibberella fujikuroi*, která napadá rýži a způsobuje její abnormální růst a sníženou produkci semen.^[2] Dnes je známo přes 100 giberelinů, z nichž ale jen část je fyziologicky aktivní, ostatní jsou pak metabolickými produkty.^[3]

Mezi nejvýznamnější gibereliny patří giberelin A₁ - GA₁ a kyselina giberelová (označovaná jako giberelin A₃) - GA₃.^[2]



Obrázek č. 2 Kyselina giberelová^[27]

Gibereliny jsou látky odvozené z cyklických diterpenů. Základní struktura tvořená čtyřmi izoprenoidními jednotkami bývá označována jako gibanový skelet. Většina giberelinů obsahuje 20 atomů uhlíku, některé mohou mít jen 19 atomů uhlíku. Gibereliny mohou tvořit konjugáty se sacharidy, především s glukózou, které však nejsou biologicky aktivní.^[2]

Syntéza giberelinů probíhá v mladých semenech, vyvíjejících se plodech a v dalších aktivně rostoucích orgánech (mladých listech, pupenech a internodiích). Určité množství giberelinů je syntetizováno i v kořenech. Jejich biosyntéza a degradace je ovlivňována teplotou, světelnými podmínkami, auxinem a zpětně také samotnou hladinou giberelinů.^[2]

3.2.1. Transport

Floémem jsou transportovány gibereliny tvořené v nadzemní části rostliny. Naopak xylém transportuje gibereliny tvořené v kořenech do nadzemní části rostliny.^[2]

3.2.2. Hlavní fyziologické účinky giberelinů

- Stimulace prodlužovacího (elongačního) růstu

Gibereliny podobně jako auxiny významně stimulují prodlužovací růst. Mezi působením auxinů a giberelinů však existuje několik zásadních rozdílů. Zatímco auxiny působí elongačně na celou rostlinu, gibereliny působí pouze na nadzemní části. Auxiny stimulují růst i u segmentů rostlin, kdežto gibereliny aktivují prodlužovací růst stonku pouze u intaktních rostlin.^[1] Prodlužování buněk je podmíněno rozvolňováním buněčné stěny.

Toto rozvolnění však probíhá jiným mechanismem než tomu je u auxinů. Z hlediska růstu fungují auxiny a gibereliny jako synergisté.^[2]

- Stimulace klíčení

V embryu vyvíjejícího semene se hromadí gibereliny. Po nabobtnání semen jsou gibereliny uvolňovány z vázané formy a v embryu se začínají syntetizovat gibereliny *de novo*. Volné pak difundují do aleuronové vrstvy, kde indukují tvorbu α -amylázy a dalších hydrolytických enzymů, které přecházejí do endospermu, kde odbourávají zásobní sacharidy a peptidy, čímž vytvářejí substráty bohaté na energii a stavební kameny pro rostoucí embryo. Tím se gibereliny stávají významným endogenním regulátorem klíčení.^[1]

- Jarovizace

Existují rostliny, které musí projít určitým obdobím nízkých teplot, aby se staly citlivé k fotoperiodě a začaly kvést (tento jev bývá označován jako jarovizace). Reakce rostliny na jarovizaci je vždy provázena zvýšeným prodlužovacím růstem. V mnoha případech můžeme jarovizační požadavek eliminovat aplikací giberelinů. Proto předpokládáme, že nízká teplota ovlivňuje syntézu nebo metabolismus giberelinů.^[1]

- Přechod do generativní fáze

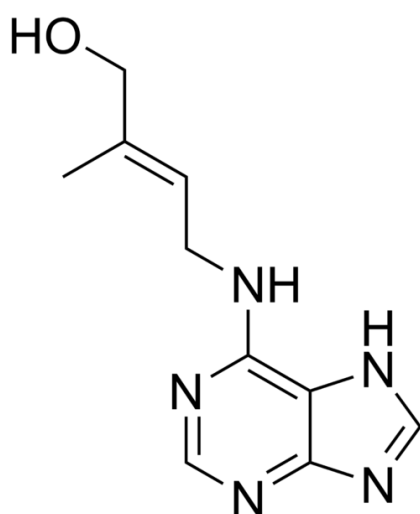
Gibereliny ovlivňují ukončení fáze juvenilní a přechod do fáze generativní.^[2]

- Druhově specifický vliv na pohlaví květů

Po aplikaci giberelinů se zvyšuje produkce buď samčích nebo samičích květů např. u kukuřice, která má květy jednopohlavné, ale květenství obou typů se vyskytují na jedné rostlině, gibereliny podporují vznik samičích květů v samčích květenstvích. V tomto případě tento jev pravděpodobně nastává díky negativnímu vlivu giberelinů na vývoj tyčinek. Opačný efekt však mají gibereliny např. u špenátu, okurky nebo konopí, kde gibereliny indukují vznik květů samčích na úkor samičích.^[2]

3.3. CYTOKININY

V laboratoři F. Skooga v USA byl izolován první cytokinin (kinetin) z DNA sledího spermatu. V rostlinách se však tento cytokinin nevyskytuje a je vyráběn synteticky. První přirozený rostlinný cytokinin (zeatin) byl izolován později z nezralého endospermu kukuřice (*Zea mays*). Dnes známe přes 30 přirozených cytokininů. Jedná se o látky odvozené od adeninu (aminopurinu), který je substituován na aminoskupině v poloze 6. V případě zeatinu je substituentem isopentyl nebo hydroxyisopentyl.^[3] Mezi další přirozené cytokininy patří topolin (3-hydroxybenzyladenin), dihydrozeatin (DZ) a izopentenyladenin (iP).^[2]



Obrázek č. 3 Zeatin^[28]

Cytokininy se tvoří především v kořenech (v kořenovém apikálním meristému), dále mohou vznikat ve všech místech, kde dochází k intenzivnímu dělení buněk (embrya, mladé listy, plody). Nevratné odbourávání cytokininů způsobuje enzym cytokininoxidáza, který odštěpuje jejich postranní řetězce.^[2]

3.3.1. Transport

Cytokininy jsou z kořene do nadzemních částí transportovány xylémem ve formě inaktivních sacharidových konjugátů. Předpokládá se, že transport cytokininů na krátké vzdálenosti mezi buňkami neprobíhá.^[2]

3.3.2. Hlavní fyziologické účinky cytokininů

- Buněčné dělení

Jako hlavní účinek cytokininů se udává stimulace buněčného dělení. Podstata tohoto účinku pravděpodobně spočívá v stimulaci některé z kináz.

Zároveň mají cytokininy významný vliv na replikaci DNA v S fázi mitózy - vlivem cytokininů dochází k zvýšení množství replikačních počátků, čímž se urychluje přepis DNA).^[1]

- Regenerace orgánů

Cytokininy společně s auxiny zásadně ovlivňují regenerační procesy rostlin *in vitro*. O tom, jak bude regenerace probíhat, rozhoduje poměr koncentrací auxinů a cytokininů. Vyrovnaný poměr obou látek vede k tvorbě nediferencovaného pletiva (kalusu), nadbytek cytokininů vyvolává regeneraci prýtu a nadbytek auxinů regeneraci kořene.^[1]

- Zpomalení stárnutí (senescence) listů

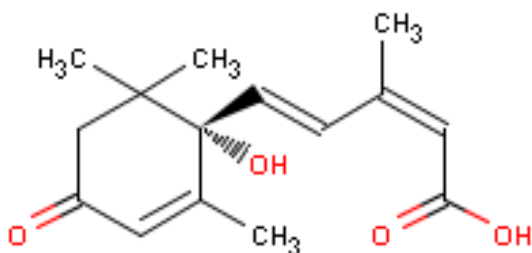
Cytokininy brání poklesu obsahu DNA, RNA a bílkovin v listech a současně brání degradaci chlorofylu, čímž mohou výrazně zpomalovat proces stárnutí listů.^[4]

- Vliv na celkový habitus rostliny

Vliv cytokininů na celkový habitus rostliny spočívá především v potlačování apikální dominance, dále stimulují vývoj axilárních pupenů, zvětšují plochu listu a inhibují prodlužování buněk v kořenech a internodiích.^[2]

3.4. KYSELINA ABSCISOVÁ

V 60. letech byla poprvé v rostlinách identifikována látka, která má inhibiční účinky na růst a vývoj rostliny. Řeč je o kyselině abscisové, dříve označované jako dormin (díky schopnosti navodit dormanci) či abscisin (díky účinku na abscisi (opad)). Jedná se tedy o růstový inhibitor.^[2] Kyselina abscisová (ABA) je z chemického hlediska seskviterpen s patnácti uhlíkovými atomy a cyklickou částí v molekule.^[1] Nejvíce této kyseliny vzniká v dormantních orgánech (pupenech, semenech, hlízách), ale i v mladých, rychle rostoucích pletivech (listech) Tvorba kyseliny abscisové silně stoupá při nedostatku vláhy.^[1]



Obrázek č. 4 Kyselina abscisová^[29]

3.4.1. Transport

Směrem z listů do kořenů i apikální části stonku probíhá transport floémem, z kořenů je pak kyselina abscisová transportována xylémem ve volné i konjugované formě.^[2]

3.4.2 Hlavní fyziologické účinky kyseliny abscisové

- **Regulace vodního režimu**

Mezi nejdůležitější funkce kyseliny abscisové bezesporu patří regulace vodního režimu. Při nedostatku vody dochází vlivem ABA k uzavření průduchů a zvýšení hydraulické vodivosti kořenů. Tím je považována za významný faktor obrany rostlin vůči stresu.

- **Regulace dormance**

Vysoký obsah kyseliny abscisové nacházíme především v dormantních pupenech, semenech a hlízách. U semen zabraňuje předčasnému vyklíčení embrya, klíčení může nastat až v okamžiku, kdy obsah kyseliny klesne pod určitou hodnotu. Dále kyselina abscisová indukuje tvorbu specifických zásobních proteinů ve zrajících semenech.

- **Inhibice prodlužovacího (elongačního) růstu**

Kyselina abscisová funguje jako antagonist auxinů a giberelinů, čímž výrazně ovlivňuje rychlost růstu.^[1]

- **Stimulace opadu**

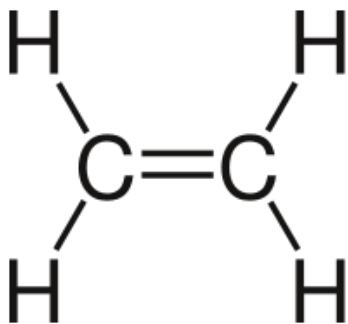
Naopak stimulační účinek má kyselina abscisová na buňky opadové zóny (tj. vrstva buněk na rozhraní řapíku a čepele, řapíku a stonku, plodu a stopky atd.). Zvětšením buněk této zóny je urychlen opad.

- **Urychlení stárnutí**

Kyselina abscisová brzdí metabolickou aktivitu a stimuluje degradační procesy ve zralých pletivech, čímž urychluje proces stárnutí.^[1]

3.5. ETHYLÉN

Ethylén je nejjednodušší dosud známý rostlinný hormon.^[14] Jedná se o jediný plyný fytohormon, z chemického hlediska uhlovodík obsahující dvojnou vazbu. V roce 1901 popsal některé účinky etylenu (jakožto aktivní složky svítiplynu) na rostliny ruský fyziolog D. N. Neljubov.^[3] Důkaz tvorby etylenu v rostlinách byl však podán až ve třicátých letech.^[1]



Obrázek č. 5 Ethylén^[30]

Nejvyšší produkce ethylénu je v meristematických oblastech, hladina ethylénu se zvyšuje během senescence, opadu listů, zrání plodů, při stresu a poranění.^[2]

Třebaže je jeho struktura velmi jednoduchá, podílí se na regulaci řady vývojových procesů.^[14]

3.5.1. Hlavní fyziologické účinky ethylénu

- „trojná odezva“

Trojná odezva (triple response) se projevuje inhibicí dlouhivého růstu, stimulací růstu radiálního a ztrátou gravitropické reakce.^[3]

- Urychlení dozrávání plodů

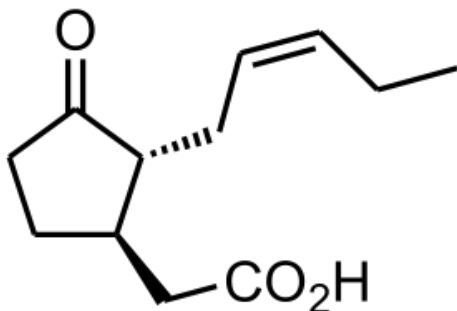
Ve zrajících plodech dochází k silnému zvýšení tvorby ethylénu, který je následně uvolňován do vzduchu a působí zpětně na plody, ze kterých byl uvolněn i na plody v okolí. Urychlení spočívá v tom, že etylen indukuje rozklad celulosy, pektinů a škrobu.^[3]

- Stárnutí pletiv a opad

Ethylén urychluje stárnutí pletiv a vyvolává opadávání listů, květů i plodů. K oddělení těchto orgánů dochází působením enzymů, které štěpí polysacharidové složky buněčných stěn. Tvorba těchto enzymů je stimulována právě ethylénem.^[3]

3.6. JASMONÁTY

Za jasmonáty označujeme kyselinu jasmonovou a její metylester. Hladina jasmonátů výrazně stoupá při stresových reakcích (po poranění, napadení patogenem atp.). Kyselina jasmonová stimuluje expresi genů, kódující inhibitory proteáz, které mohou být například do buňky vylučovány patogenem či škůdcem.^[2]



Obrázek č. 6 Kyselina jasmonová^[31]

3.7. POLYAMINY

V rostlinách se nejčastěji vyskytují polyaminy putrescin, spermin a spermidin. Jedná se o jednoduché organické látky, které ve své molekule obsahují několik aminoskupin. Pravděpodobně jde o látky regulující buněčný cyklus.^[3] Jejich hladina stoupá ve stresových situacích.^[2]

3.8. OLIGOSACHARINY

Oligosachariny jsou oligosacharidy, které se uvolnily z buněčné stěny rostliny při napadení patogenem či patogenní houbou, při obranné reakci rostlin. Hlavní funkcí oligosacharinů je inhibice dlouhivého růstu, což lze považovat za součást obranné strategie.^[2]

3.9. FENOLICKÉ SLOUČENINY

Fenolické látky jsou rozšířeny v celé rostlinné říši, často se vyskytují ve značných koncentracích a to především ve vakuolách. Jedná se o sekundární metabolity patří sem celá skupina látek – deriváty benzeny, kyseliny benzoové a kyseliny skořicové, flavonoidy, antokyany, kumariny, třísloviny, lignin. Některé tyto látky (např. deriváty kyseliny skořicové nebo benzoové) mají schopnost inhibice dlouhivého růstu a to i indukovaného tzn. způsobeného IAA.^[1]

3.10. EKDYSTEROIDY

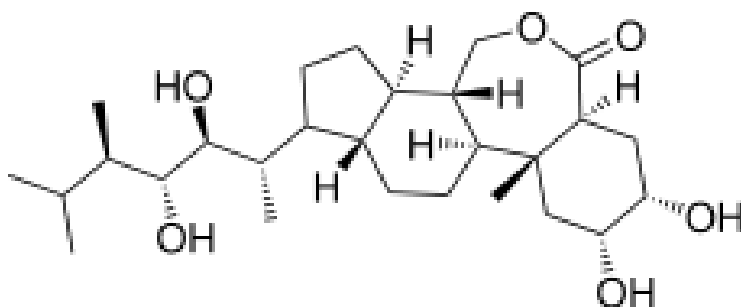
Ekdysteroidy jsou látky, vyskytující se jak u živočichů (převážně u členovců - především hmyzu), tak u rostlin. Díky svému vlivu na ekdysi hmyzu bývají ES často označovány také jako svlékáci hormony. Zatímco u živočichů je význam ekdysteroidů znám u rostlin není zcela objasněn. Známa je pouze hypotéza o funkci těchto hormonů jako přírodních pesticidů fungujících jako obrana rostliny proti býložravým škůdcům.^[9]

3.11. BRASSINOSTEROIDY

Brassinosteroidy jsou skupina zhruba třiceti fyziologicky aktivních látek, které se vyskytují v nadzemních částech rostliny (v kořeni nebyly zatím zjištěny).^[2] Tato skupina hormonů účinkuje již při velmi nízkých koncentracích (10^{-8} - 10^{-10} M i méně)^[3] a hraje nepostradatelnou roli ve vývoji rostlin včetně buněčného dělení, fotomorfogeneze, senescence listů či v odpovědích na stres.^[8]

Před více než třiceti lety začal výzkum brassinosteroidů, když John Mitchell a jeho spolupracovníci z US Department of Agriculture, objevili v pylu nový fytohormon.^[14] Brassinosteroidy jsou pojmenovány po brassinolidu - prvním izolovaném brassinosteroidu, který byl nalezen v extraktu pylu řepky olejky - latinsky *Brassica napus*.^[1] Navazující výzkum prokázal, že se jedná o ojedinělý hormon, ale o celou skupinu látek steroidní povahy.

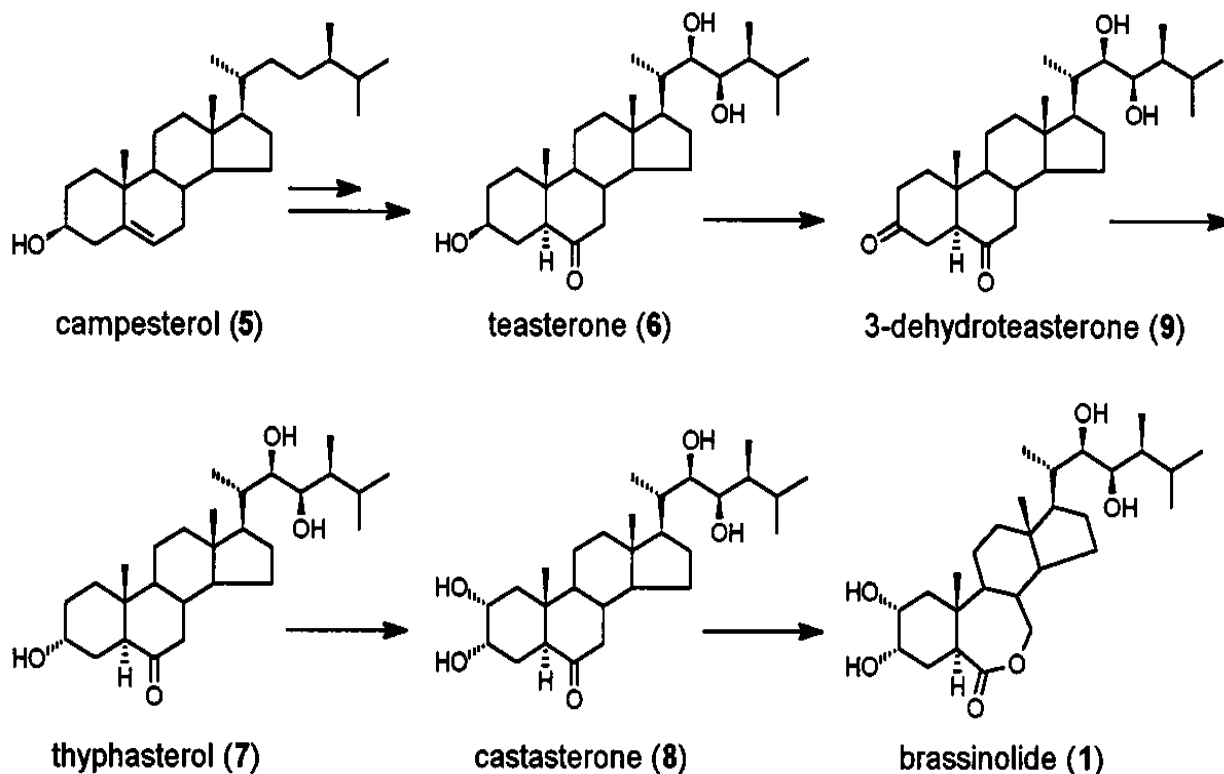
Mezi nejrozšířenější brassinosteroidy patří mimo již zmíněného brassinolidu také castasteron a typhasterol.^[1] Přírodní brassinolid se získává z velkého množství pylu (1 g látky lze získat z 40 kg pylu), takový produkt je pro praxi příliš drahý. Proto se řada laboratoří zabývá přípravou syntetických brassinosteroidů.^[16] Například 24-epibrassinolid je ekonomicky vhodná alternativa brassinolidu.^[20]



Obrázek č. 7 Brassinolid^[32]

3.11.1 Syntéza brassinosteroidů

Hypotetická biosyntetická dráha pro brassinolid (BL) (1) navržená T. Yokotou začíná campesterolem (5) (nebo jeho analogy). Několika oxidacemi campesterolu (5) vzniká teasteron (TE) (6), který se izomerizací C₃ uhlíku mění na thyphasterol (TY) (7) další hydroxylací na C₂ uhlíku a oxidací Baeyer-Villigerova typu vzniká přes castasteron (CS) (8) brassinolid (1). Jelikož je pravděpodobné, že přeměna TE na TY probíhá přes 3-dehydroteasterone (9) je tato sloučenina zahrnuta do biosyntetické dráhy brassinolidu. Tato dráha byla částečně prokázána v nediferenciovaných buňkách barvínku růžového (*Catharanthus roseus*), kde se CS (8) i BL (1) přirozeně vyskytují.^[10]



Obrázek č. 8 Syntéza brassinosteroidů^[33]

3.11.2 Hlavní fyziologické účinky brassinosteroidů

V renomovaném časopise The Plant Journal němečtí vědci uvádějí, že při vývoji rostlin mají brassinosteroidy majoritní úlohu a že jsou nezbytné pro správný vývoj rostlin.^[15]

- **Vliv na růst a dělení buněk ve výhoncích**

Brassinosteroidy podporují růst buněk při jejich prodlužování či dělení. V genetických studiích mutantních rostlin obsahujících nedostatečné množství brassinosteroidů lze dokázat nutnost těchto hormonů pro normální růst rostliny. Mikroskopickým pozorováním listů těchto mutantních rostlin bylo zjištěno, že velikost buněk je menší než velikost buněk u listů běžné rostliny a také že se v listové čepeli nachází menší počet buněk.

Vliv BR na podporu růstu je nejvíce patrný v mladých rychle rostoucích pletivech.^[8]

- **Vliv na růst kořene**

Na základě vnějších znaků BR-deficitních mutantů, kteří mají redukováný kořen, lze předpokládat, že brassinosteroidy jsou nutné k normálnímu růstu kořene. Stejně jako auxiny mohou mít brassinosteroidy podávané z vnějšku pozitivní i negativní vliv na růst kořene v závislosti na koncentraci (Nižší koncentrace růst kořene podporuje, vyšší naopak inhibuje). V nízkých koncentracích brassinosteroidy také podporují vznik postranních kořenů v tomto případě pracují BR a auxiny jako synergisté.^[8]

- **Vliv na vývoj cévního systému**

Brassinosteroidy hrají důležitou roli ve vývoji cévního systému a to především svým vlivem na podporu diferenciaci xylému a potlačování diferenciaci floému. Tento vliv je opět patrný u BR-deficitních mutantů, které mají vyšší poměr floému než xylému. U těchto mutantů také nalezneme menší počet nepravidelně rozmístěných cévních svazků.^[8]

- **Vliv na růst pylové láčky**

Pyl je bohatý zdroj brassinosteroidů, proto není překvapivé, že BR mají významný vliv na samčí plodnost. Bylo prokázáno, že brassinosteroidy podporují růst pylové láčky od blizny přes čnělku až po semeník.^[8]

- Vliv na klíčení semen

Brassinosteroidy podporují klíčení semen interakcí s jinými rostlinnými hormony na molekulární úrovni, která není zatím přesně objasněna. Jisté je, že brassinosteroidy mají na klíčení pozitivní vliv a jsou potřebné k překonání inhibičního účinku kyseliny abscisové. Jak již bylo zmíněno výše, brassinosteroidy podporují růst a dělení buňky, předpokládá se tedy, že brassinosteroidy usnadňují klíčení právě stimulací růstu embrya.^[8]

- Vliv na produkci etylenu

Existuje mnoho faktorů (z nichž nejznámější je hladina auxinů), které stimulují signální dráhy etylenu. Kromě auxinů však bylo prokázáno, že i brassinosteroidy vyvolávají produkci etylenu a to samy o sobě nebo působí s auxiny jako synergisté.^[14]

- Možné budoucí využití brassinosteroidů v zemědělství

Brassinosteroidy by mohly řešit některé z globálních problémů. Například by mohly zvýšit množství produkovaných potravin a zároveň by se díky jejich použití dalo snížit vysoké množství používaných umělých hnojiv.^[15] Ukazuje se, že by brassinosteroidy mohly zlepšit i dietetické vlastnosti potravin – například optimalizovat minerální složení mouky, obsah vápníku, hořčíku, draslíku atp.^[16]

3.11.3. Transport brassinosteroidů

Z důkazů, které jsou doposud k dispozici jasně vyplývá, že brassinosteroidy v rostlině nejsou transportovány na dlouhé vzdálenosti. Na druhou stranu transport brassinosteroidů na krátkou vzdálenost, konkrétně z místa syntézy (uvnitř buňky) na povrch buňky, zcela jistě existuje. Lze předpokládat, že brassinosteroidy transportované na povrch buňky neovlivňují pouze tuto buňku, ale i buňky sousední. Tím je zajištěna stejná koncentrace brassinosteroidů pro relativně velké množství buněk v pletivu. Kdyby byly brassinosteroidy produkovány i vnímány jen jedinou buňkou (bez jakéhokoliv intracelulárního pohybu) bylo by velmi obtížné koordinovat růstové reakce v celém takovém pletivu.^[17]

3.11.4. Biotesty na účinky brassinosteroidů

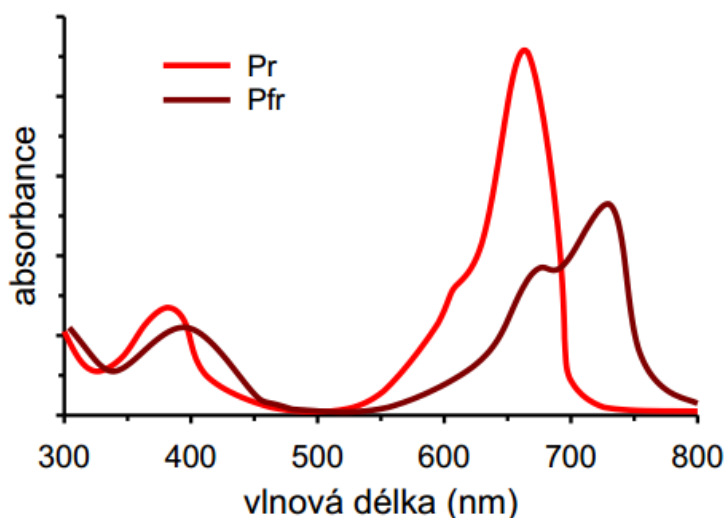
Vhodný výběr a sestavení biotestu hraje důležitou roli při studiu rostlinných hormonů. Některé testy vytvořené pro auxiny, gibereliny a cytokininy byly použity k detekci brassinosteroidů v rostlinných tkáních, k vyhodnocení aktivity přírodních i syntetických brassinosteroidů a ke sledování interakce brassinosteroidů a ostatními fytohormony. Jiné testy byly sestaveny přímo pro brassinosteroidy a díky nim bylo zjištěno, že brassinosteroidy mají široké spektrum biologických aktivit. Mezi nejpoužívanější biotesty používané k testování aktivity brassinosteroidů patří testy na prvním nebo druhém internodiu fazole (*Phaseolus vulgaris*) (first/second bean internode test) a test odchylky jazýčku rýže (*Oryza sativa*) (rice lamina inclination test).^[10]

4. ETIOLIZACE

Etiolizace je růst rostlin ve tmě, kdy rostlina investuje svůj rezervní materiál uložený v hlízách do elongačního (prodlužovacího) růstu internodií při potlačení tvorby fotosyntetického aparátu (netvoří se chlorofyl).^[1] Růst rostlin je tedy umožněn i za nepřítomnosti světla. Jestliže však růstové procesy probíhají v plné tmě, mění se charakter růstu. Tma urychluje elongační růst nadzemních orgánů a současně brzdí vytváření listů. Etiolované rostliny se vyznačují bílou (nažloutlou) barvou, křehkou tkání s málo vyvinutými mechanickými elementy a dlouhými, protaženými buňkami s velkými intercelulárami.^[18]

Růst rostlin je ovlivněn nejen intenzitou světla, ale také jeho kvalitou. Krátkovlnná část spektra (modré a fialové paprsky) stimulují dělení buněk, ale brzdí jejich prodlužování. Naopak osvětlení červenými paprsky podporuje prodlužovací růst orgánů a mírně brzdí buněčné dělení.^[18] Na rostliny nejvíce působí právě modré a červené světlo, protože listová barviva rostlin (především chlorofyl *a*, chlorofyl *b*) pohlcují hlavně tyto barvy. Existuje ovšem ještě tzv. dlouhovlnné červené záření o vlnové délce 700 - 800 nm, které zelené rostliny propouštějí.

Zastínění vnímají rostliny pomocí fotoreceptoru - fytochromu, který existuje ve dvou formách. Forma (Pr) pohlcuje červené světlo a druhá forma (Pfr) pohlcuje dlouhovlnné červené záření. Každá z forem se po ozáření přeměňuje na druhou. Jejich poměr tedy závisí na poměru červeného a dlouhovlnného červeného světla.^[19]



Obrázek č. 9 Absorbční spektra dvou forem fytochromu ^[34]

Jestliže budeme etiolované rostliny vystavovat denně po dobu pěti minut červenému světlu, proces etiolizace bude ukončen zhruba čtvrtý den. Jestliže ovšem budeme etiolované rostliny denně vystavovat pěti minutám záření červeného světla a pěti minutám záření dlouhovlnného červeného světla, nebudeme pozorovat, žádné změny etiolizace.^[21]

5. BOBTNÁNÍ

Složité proces klíčení rostlin začíná příjmem vody – bobtnáním, při kterém nejdříve dochází k nasávání hydratační vody.^[22] Voda aktivuje enzymy a je nezbytná pro růst buněk.^[25] Později při stupňující se aktivitě enzymů dochází k hydrolýze polysacharidů, proteinů a dalších složitých zásobních látek na látky jednoduché – osmoticky účinné. Celkové množství vody, které je třeba k nabobtnání semen se liší u jednotlivých druhů rostlin.^[22] Za příčinu bobtnání můžeme v podstatě považovat rozdíl difúzního tlaku vně a uvnitř semene. Nasávání (absorpce) vody semenem probíhá až do vyrovnání těchto tlaků.^[23]

Doba bobtnání semen je proměnlivá, tvá většinou od 6 do 15 hod, závisí na velikosti a typu semene.^[24]

6. HRÁCH

6.1. HISTORIE

Hrách se řadí mezi nejstarší pěstované rostliny, počátky jeho pěstování sahají až do mladší doby kamenné a to především na území Malé Asie. ^[5] V dnešní době hrách na našem území přechodně zplaňuje a vyskytuje se tak (mimo polí a zahrádek) na ruměništích a skládkách. ^[7]

6.2. ZAŘAZENÍ

Taxonomické zařazení [5]

Říše (<i>Regnum</i>)	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše (<i>Subregnum</i>)	Cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení (<i>Divisio</i>)	Krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída (<i>Clasis</i>)	Vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád (<i>Ordo</i>)	Bobotvaré (<i>Fabales</i>)
Čeleď (<i>Familia</i>)	Bobovité (<i>Fabaceae</i>)
Rod (<i>Genus</i>)	Hrách setý (<i>Pisum sativum</i>)
Varieta	Hrách polní – peluška (<i>Pisum arvense</i>)

Tabulka 1 Taxonomické zařazení

6.3. BOBOVITÉ (*Fabaceae*)

Bobovité, někdy označované také jako motýlokvěté nebo luštinaté, je čeleď vyšších dvouděložných rostlin, která zahrnuje 480 – 500 rodů (12 000 druhů) vyskytujících se téměř po celém světě. Jedná se o byliny i dřeviny, které nikdy nerostou ve vodním prostředí. Na kořenech těchto rostlin se často vyskytují hlízky indikující symbiózu s nitrogenními bakteriemi rodu *Rhizobium*). Listy bývají nejčastěji složené a na lodyze postavené střídavě. Pro čeleď bobovitých jsou typická hroznovitá květenství, květy bývají oboupohlavné a souměrné. Kalich srostlý z 5 lístků a koruna z 5 volných lístků (rozlišených v pavézu, dvě křídla a člunek). Semena jsou nejčastěji bez endospermu nebo je endosperm jen nepatrně vyvinutý, embryo s typicky tlustými dělohami bohatými na škrob a bílkoviny. Klíčení těchto rostlin bývá epigeické i hypogeické. ^[6]

6.3.1. HRÁCH SETÝ (*Pisum sativum* L.)

Hrách setý je jednoletá bylina s přímou, popínavou (15 -)30 – 120(- 200) cm dlouhou, dutou, žlutozelenou lodyhou. Listy bývají s 1 – 3 páry lístků zakončené větvenou úponkou. Květy jsou nevonné, bílé, namodralé, narůžovělé nebo vícebarevné. Typickým plodem je lusk s 3 – 10 semeny. Hrách setý bývá obecně pěstován na polích a v zahradách od nížin do submontánního stupně. Nezralé lusky se používají jako zelenina, zralá semena potom jako luštěnina, nať je hojně využívaná píceň a vyhledávané zelené hnojení.^[6]

6.3.2. HRÁCH POLNÍ – PELUŠKA (*Pisum arvense* L.)

Peluška je jednou z kulturních forem *Pisum sativum*, vyznačuje se dvoubarevnými fialovo-bílými květy, menšími lusky a natrpkými nezralými semeny. Pěstuje se jako píceň či na zelené hnojení.^[6]

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1. POMŮCKY A CHEMIKÁLIE

7.1.1. POMŮCKY

- plastové zkumavky a stojan na zkumavky
- odměrná baňka (100 ml)
- mikropipeta
- kádinka (2000 ml)
- skleněné pipety (10 ml, 5 ml, 1ml), nástavec na skleněné pipety
- buničitá vata
- fotografický táč
- skalpel a pinzeta
- měřítko na milimetrovém papíře
- nůžky
- perlit (perlit je amorfní křemičitan hlinitý sopečného původu. Při expandaci (pražení při teplotách 950-1150°C) vzniká produkt ve formě drobných kuliček různých velikostí - tzv. expandovaný perlit. Tento expandovaný nachází své uplatnění ve stavebnictví či zahradnictví.)^[11]

7.1.2 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

- semena hrachu setého (*pisum Sativum*) (odrůda Gloriosa a Progres 9)
- semena hrachu polního tzv. pelušky (*pisum arvense*) (odrůda Arvica)
- skleněný exsikátor
- vortex
- termostat
- magnetické míchadlo
- pH metr
- ohřívač zkumavek
- lampa se zeleným světlem

7.1.3. CHEMIKÁLIE

- 24-epibrassinolid
- isopropanol
- methylen chlorid
- lanolin
- živný roztok Hoagland (Hoagland je živný roztok anorganických solí, který je koncipován tak, aby svým složením poskytoval rostlinám nejdůležitější esenciální prvky.^[12])
- chlorid vápenatý
- Fe EDTA (Roztok Fe EDTA ve výsledném živném roztoku dodává rostlinám důležitý mikroprvek pro zdravý růst – železo. EDTA znamená, že je železo vázáno v chelátové vazbě na kyselinu ethylendiamintetraoctovou a tak je lépe přístupné rostlinám.^[13])
- etanol a destilovaná voda

7.2. PŘÍPRAVA KONCENTRAČNÍ ŘADY 24-EPIBRASSINOLIDU

Před zahájením samotného experimentu je potřeba vytvořit koncentrační řadu 24-epibrassinolidu v rozmezí 10^{-9} - 10^{-16} M.

Nejdříve jsem si připravila roztok 24-EP o koncentraci 10^{-7} M. Na analytických vahách jsem navážila 5 mg 24-epibrassinolidu, který jsem rozpustila v 100 μ l rozpouštědla (isopropanol x methylen chlorid v poměru 1:1) a výsledný roztok jsem smíchala s 520 μ l lanolinu. Objem lanolinu jsem vypočítala ze vztahu:

$$M_m \text{ (molární hmotnost 24-EP)} * 10^{-4} \dots\dots\dots V \text{ (objem nanášený na rostlinu)}$$

$$M \text{ (navážka – hmotnost 24-EP)} \dots\dots\dots V \text{ (objem potřebného lanolinu)}$$

Příklad výpočtu:

$$0,048076 \text{ mg} \dots\dots\dots 5 \mu\text{l}$$

$$5 \text{ mg} \dots\dots\dots x \mu\text{l}$$

$$\text{Z toho } x = 5 \times 5 / 0,048076 = \underline{520 \mu\text{l}}$$

Z této směsi (lanolinu, 24-EP a rozpouštědla) jsem odebrala 100 μ l a smíchala s 900 μ l lanolinu a důkladně promíchala na vortexu, tím jsem získala základní koncentraci 24-epibrassinolidu 10^{-7} M. Smícháním 100 μ l 24-EP o koncentraci 10^{-7} M a 900 μ l lanolinu jsem získala koncentraci 10^{-8} M. Takto jsem roztok postupně ředila až jsem získala koncentrační řadu v rozmezí 10^{-7} až 10^{-16} M. Takto připravenou koncentrační řadu 24-epibrassinolidu jsem uchovávala v lednici.

7.3. POSTUP PŘI EXPERIMENTU

Samotný experiment se skládá ze čtyř základních částí:

1. Vložení nabobtnaných semen do exsikátoru
2. Vysazení klíčenců hrachu do perlitu
3. Aplikace 24-epibrassinolidu v místě extirpovaného prvního lístku
4. Měření délky výhonů a vyhodnocení výsledků

7.3.1. Vložení semen do exsikátoru

Před vložení do exsikátoru jsem nechala semena nabobtnat ve vodě. Na porcelánové proděravělé kotouče (patra) exsikátoru jsem naskládala kruhy vystříhané z buničité vaty, které jsem následně namočila destilovanou vodou a pinzetou jsem do těchto buničitých kruhů vytvořila otvory odpovídající otvorům v kotoučích.

Dostatečně nabobtnaná, relativně stejně velká, semena hrachu jsem skládala na takto připravené kotouče vždy tzv. pupkem (pólem, kterým prorůstá kořen) dolů, aby připraveným otvorem mohl prorůst kořínek.

Spodní část skleněného exsikátoru jsem naplnila destilovanou vodou a tímto způsobem připravená semena jsem na kotoučích vložila dovnitř exsikátoru (foto č. 1).

Celý takto nachystaný exsikátor jsem umístila do termostatu (foto č. 2), aby fáze prorůstání kořene probíhala ve tmě a nakonec jsem zapojila vzduchovací motorek (foto č. 3), jehož hadičku jsem prostrčila otvorem navrchu exsikátoru až do spodní části s destilovanou vodou.

7.3.2. Vysazení klíčenců do perlitu

Semena jsem v exsikátoru ponechala do fáze, kdy vyklíčené kořínky dosahovali velikosti cca 30mm (foto č. 4). Vysazení klíčenců do perlitu jsem prováděla v temné komoře při zeleném osvětlení, aby světelný impulz (zejména červeným světlem) na semenáčky byl, co nejnižší a nenarušil se tak proces etiolizace.

Klíčence jsem vysévala na fotografický táč. Jako inertní podklad k upevnění klíčenců jsem použila expandovaný perlit. K zajištění správné výživy jsem perlit zalila živným roztokem.

- Příprava živného roztoku:

Živný roztok jsem připravila zředěním tří látek - roztoku Hoaglandu, 10^{-3}M CaCl a Fe EDTA v destilované vodě. (foto č. 5)

10^{-3}M roztok CaCl₂ jsem si musela nejdříve připravit rozpuštěním 1,11 g CaCl₂ ve 100 ml destilované vody. Takto připravený zásobní roztok 10^{-3}M CaCl lze uchovávat v lednici nejdéle 1 měsíc.

Sloučeniny jsem ředila v poměru 10:3:1 (10 ml Hoaglandu, 3 ml 10^{-3}M CaCl₂ a 1 ml Fe EDTA na 1 l destilované vody). Po smíchání sloučenin jsem upravila pH roztoku na hodnotu 5,8 (foto č. 6). Roztok jsem míchala pomocí magnetického míchadla a ponořením pH metru jsem kontrolovala pH. Hodnotu pH jsem případně upravovala přidáním roztoků 0,1M HCl (k snížení pH) a 0,1M NaCl (k zvýšení pH).

Na jeden tác experlitu jsem potřebovala 2 l takto připraveného živného roztoku. Výsledný živný roztok jsem rovnoměrně nalila na perlit. Pomocí pinzety jsem na fotografický tác sázela semenáčky víceméně ve stejné fázi klíčení tak, že kořínek byl celý v perlitu a semeno leželo na povrchu. Na jeden fotografický tác jsem vysela 10 řad po 8 semenech v sloupci, celkem tedy 80 semen (foto č. 7). Takto vysetá semena jsem opět uzavřela do termostatu. (foto č. 8).

7.3.3. Aplikace 24-epibrassinolidu v místě extirpovaného prvního lístku

Klíčenci jsou připraveni na aplikaci 24-epibrassinolidu, když jejich epikotyl dosahuje velikosti 1-2 cm (foto č. 10). Aplikaci jsem prováděla vždy v temné komoře za zeleného světla, aby nedošlo k osvětlení rostlinek a tím k narušení procesu etiolizace. 24-epibrassinolid připravený k aplikaci je rozpuštěn v lanolinu. Lanolin za normální teploty rychle tuhne, tím je zajištěno, že po nanesení hormon nestече z místa aplikace. Zkumavky s koncentrační řadou brassinosteroidu jsem před aplikací nechávala ohřát na teplotu 80°C, aby látka šla mikropipetou dobře aplikovat.

Těsně před samotnou aplikací jsem z každé rostlinky skalpelem odštípla (extirpovala) první klíčící list a na toto místo aplikovala 24-EP dané koncentrace rozpuštěného v lanolinu (foto č. 11).

Na jednom tácu jsem měla vždy 2 řady po 8 rostlinkách jako kontrolu (na které jsem aplikovala pouze čistý lanolin bez rozpuštěného brassinosteroidu) a 8 řad po 8 rostlinkách s různou koncentrací hormonu (od koncentrace 10^{-9} do koncentrace 10^{-16}).

Po aplikaci jsem táč vrátila do termostatu. Při manipulaci s tácem mimo temnou komoru jsem měla táč vždy zakrytý, aby nedošlo k osvětlení rostlin.

7.3.4. Měření a hodnocení rostlin

Po čtyřech dnech od aplikace jsem celý pokus vyhodnotila (foto č. 12). Na milimetrovém papíře jsem si vyrobila měřítko a rostlinky jednu po druhé odstříhla těsně pod semenem, změřila její délku od semene po poslední lístek a výslednou hodnotu v milimetrech zapsala do připraveného formuláře.

Hodnoty jsem přepsala do Excelu, vypočítala průměrnou hodnotu (pomocí funkce PRŮMĚR) a směrodatnou odchylku (pomocí funkce SMODCH) pro každou koncentraci a vytvořila graf s chybovými úsečkami.

8. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

K optimalizaci biotestu a následnému testování vlivu 24-epibrassinolidu na etiolované rostliny jsem jako rostlinný materiál použila hrách setý (odrůdy Gloriosa a Progres 9) a hrách polní tzv. pelušku (odrůdu Arvica). Pro sestavení optimální metody biotestu jsem musela pokus (nebo jeho části) provádět opakovaně. Klíčové bylo stanovit vhodnou dobu aplikace 24-epibrassinolidu.

8.1. STANOVENÍ VHODNÉ DOBY APLIKACE

8.1.1. Bobtnání

Pro zahájení klíčení a růstu je nutné, aby suchá semena nabrala dostatečné množství vody. Proto jsem semena před vložením do exsikátoru nechávala nabobtnat ve vodě. Při prvních pokusech jsem semena nechávala namočená 1,5 hod. Takto nabobtnaná semena pak pomalu a nerovnoměrně klíčila. Po prodloužení doby bobtnání na 6 hodin, semena klíčila rychleji, ale stále nevyrovnaně. Prodloužila jsem tedy dobu bobtnání na 20 hodin, semena tak nabrala dostatečné množství vody, klíčila rovnoměrně a nebylo nutné semena v exsikátoru rosit.

Rozdíly v klíčení byly patrné i při použití různých semen. Semena hrachu setého odrůda Progres 9, klíčila nejrychleji, ale zároveň nejméně vyrovnaně. I po prodloužení doby bobtnání na 20 hodin se po 48 hodinách v exsikátoru vyskytovala semena s naklíčeným kořínkem a klíčenci mající už i výraznou nadzemní část (plumulu). Hrách setý odrůda Gloriosa klíčila pomaleji a rovnoměrně, v sáčcích od výrobce semen, bylo hodně tzv. mrtvých semen, která vůbec nenaklíčila. Peluška (odrůda Arvica) se v tomto ohledu osvědčila nejlépe – semena po dostatečném nabobtnání rostla rychle, rovnoměrně a neobsahovala mrtvá semena.

8.1.2. Klíčení

Semenáčky jsem na táč vysévala, když měly naklíčený kořínek (cca 30 mm) a plumula začínala rašit. V této fázi se při dostatečném nabobtnání klíčenci nacházeli u hrachu setého (odrůd Gloriosa a Progres 9) po zhruba 72 hodinách u pelušky (odrůdy Arvica), která klíčila rychleji už po 48 hodinách v exsikátoru.

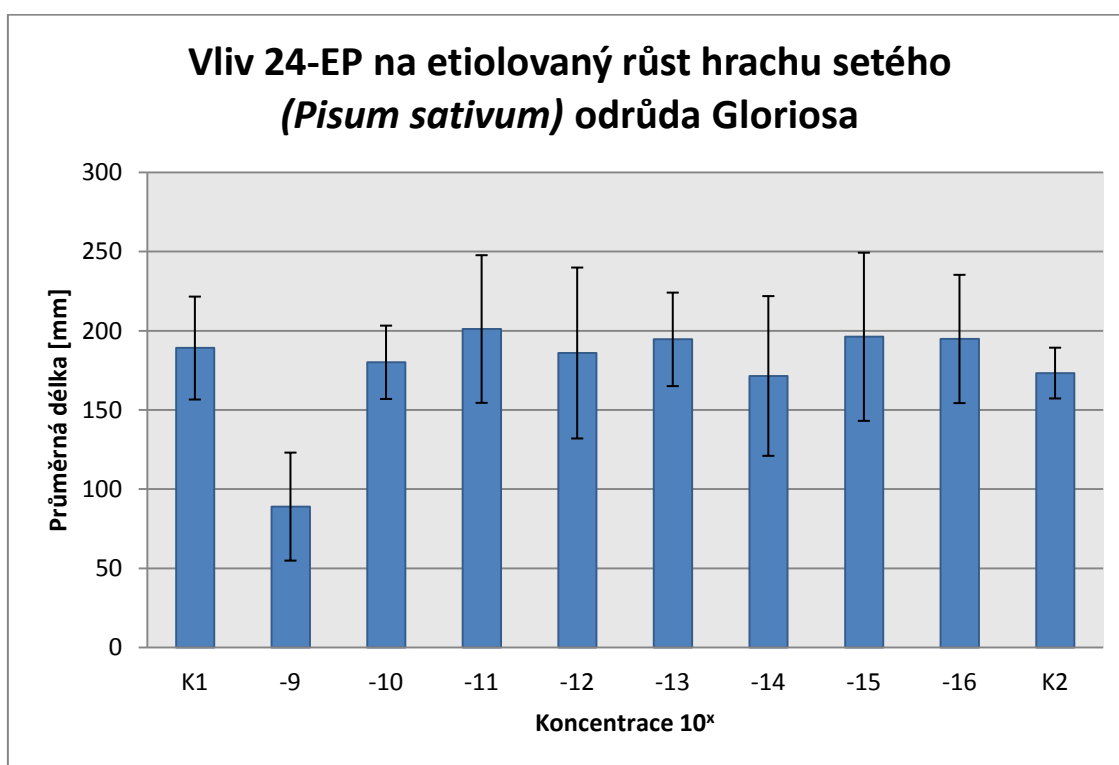
8.1.3. Aplikace 24-epibrassinolidu

Rostlinky jsou v optimální fázi pro aplikaci 24-epibrassinolidu, dosahuje-li jejich epikotyl 10-20 mm, v této fázi první klíčící list zakrývá vzrostný vrchol (apex) a skalpelem lze lehce odstranit. Při prvním pokusu jsem nechala vyseté rostliny ve tmě kultivovat 4 dny (96 hodin). Po této době epikotyl rostlin dosahoval až 70 mm (peluška odrůda Arvica a hrách setý odrůda Gloriosa), až 100 mm (hrách setý odrůda Progres 9). Dobu kultivace jsem postupně snižovala, až k pouhým 24 hodinám u hrachu setého (odrůda Gloriosa) a pelušky (odrůda Arvica). Hrách setý (odrůda Progres 9) potřebuje díky nevyrovnanému růstu epikotylu delší dobu kultivace a to až 70 hodin.

8.2. VÝSLEDKY

Po optimalizaci metody jsem otestovala základní vliv brassinosteroidů na etiolované rostliny hrachu. Biotest jsem prováděla na 2 odrůdách hrachu setého (Gloriosa a Progres 9) a na hrachu polním - pelušce (odrůda Arvica). U každé odrůdy jsem provedla dvě opakování testu. Vyhodnocení výsledků jsem prováděla čtyři dny po aplikaci 24-epibrassinolidu a výsledky zpracovala do grafů s chybovými úsečkami, které znázorňují konfidenční intervaly měření.

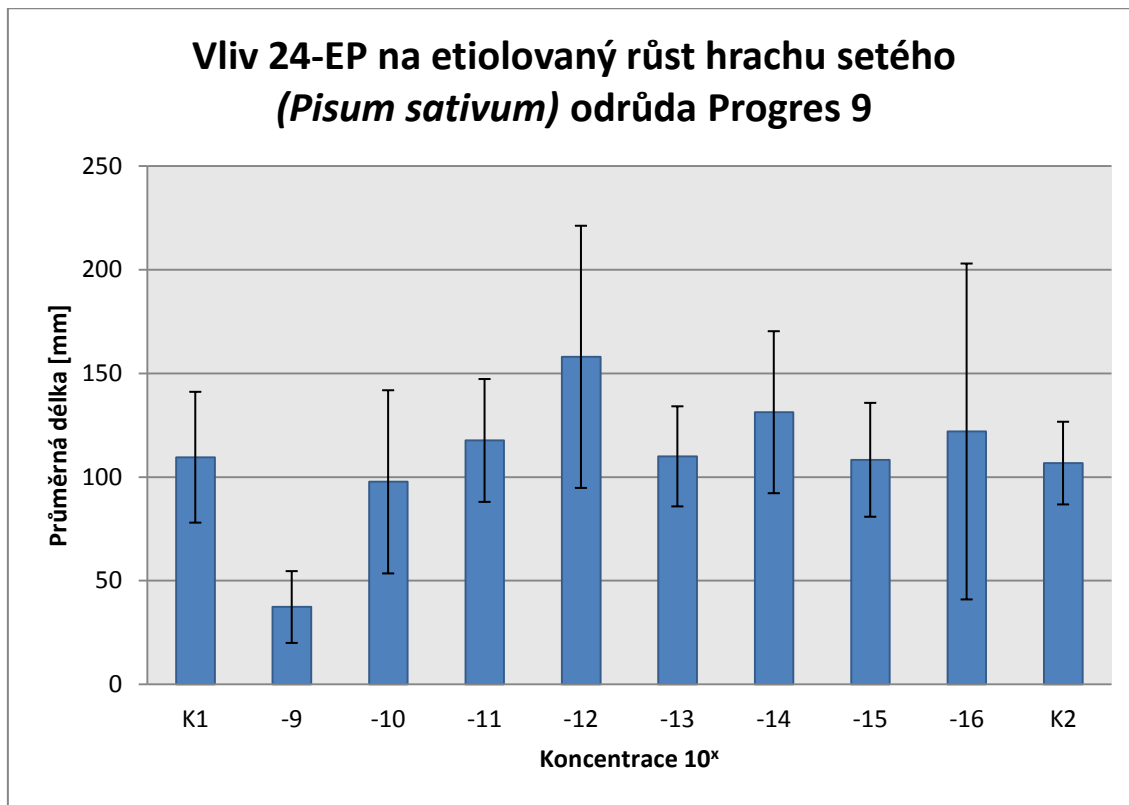
8.2.1. Hrách setý odrůda Gloriosa



Graf č. 1 Vliv 24-epibrassinolidu na etiolovaný růst hrachu setého (*Pisum sativum*) odrůda Gloriosa

Z grafu je patrné, že nejvýraznější vliv na růst etiolovaných rostlin hrachu setého (odrůda Gloriosa) má 24-epibrassinolid v koncentraci 10^{-9} M. Při této koncentraci testované rostliny dosahovaly zhruba polovičního vzrůstu oproti kontrolním rostlinám. Při aplikaci 24-epibrassinolidu v koncentraci 10^{-10} - 10^{-16} M se velikost testovaných rostlinek výrazně nelišila od velikosti kontrolních rostlin.

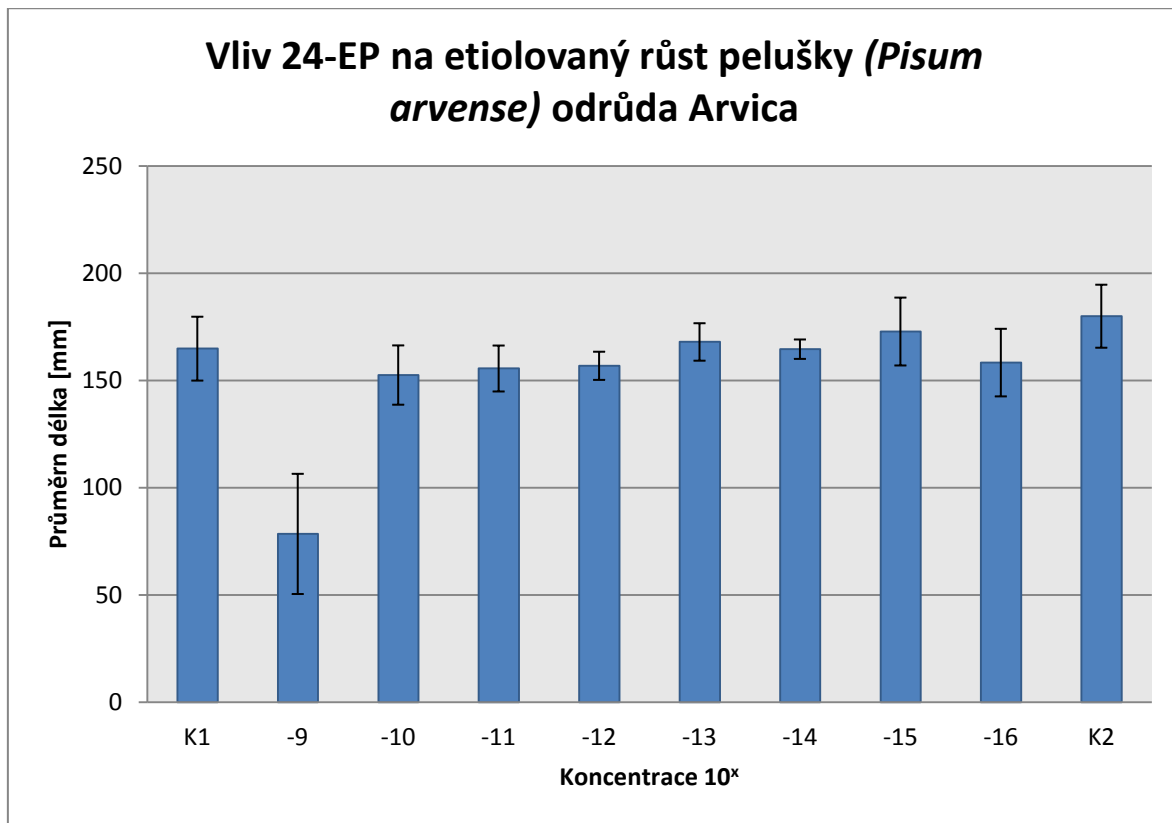
8.2.2. Hrách setý odrůda Progres 9



Graf č. 2 Vliv 24-epibrassinolidu na etiolovaný růst hrachu setého (*Pisum sativum*) odrůda Progres 9

Nejvýraznější vliv 24-epibrassinolidu na etiolovaný růst rostlin hrachu setého (odrůda Progres 9) byl opět při aplikaci 24-epibrassinolidu o koncentraci 10^{-9} M, kdy velikost testovaných rostlin dosahovala jen 34,5 % velikosti kontrol. Z velikostí konfidenčních intervalů jednotlivých měření je patrné, že odrůda Progres 9 roste velmi nevyrovnaně a není proto vhodná k testování.

8.2.3. Hrách polní – peluška odrůda Arvica



Graf č. 3 Vliv 24-epibrassinolidu na etiolovaný růst pelušky (*Pisum arvense*) odrůda Arvica (foto č.13-22).

Z tohoto grafu je patrné, že rostlinky hrachu polního – pelušky (odrůda Arvica) rostou rovnoměrně a vykazují malé směrodatné odchylky. Vliv brassinosteroidů je opět nejvíce patrný v koncentraci 10^{-9} M, kdy velikost testovaných rostlin dosahuje jen 45,5 % velikosti kontrol.

9. DISKUSE

Hlavní úkol a zároveň přínos mé práce spočívá v optimalizaci biotestu pro testování biologické aktivity brassinosteroidů na etiolovaných rostlinách hrachu.

K testování vlivu 24-epibrassinolidu jsem použila tzv. inhibiční test na rostlinách hrachu setého (*Pisum sativum*) – odrůdy Progres 9 a Gloriosa a pelušky (*Pisum arvense*) - odrůdy Arvica. Tento test spočívá v inhibici dlouhivého růstu etiolovaných rostlin, díky vlivu brassinosteroidů na produkci etylenu.^[10]

Základní postup při měření rostlin v biotestu na vliv brassinosteroidů na etiolované rostliny hrachu se skládá ze čtyř zásadních kroků:

1. Vložení nabobtnaných semen do exsikátoru
2. Vysázení klíčenců hrachu do perlitu s živným roztokem
3. Aplikace 24-epibrassinolidu
4. Měření a hodnocení výsledků

9.1. Zjištění při sestavování metody:

Před vložení semen do exsikátoru je vhodné nechat semena nabobtnat ve vodě. Příjem vody semeny je nezbytný pro aktivaci enzymů, které štěpí zásobní látky na látky jednoduché, které jsou esenciální pro klíčení rostliny. Celkové množství vody, které je třeba k nabobtnání semen se liší u jednotlivých druhů rostlin.^[22] Doba bobtnání semen je proměnlivá, tvá většinou od 6 do 15 hod, závisí na velikosti a typu semene.^[24] Pro semena hrachu setého (*Pisum sativum*) – odrůda Progres 9 a Gloriosa i semena pelušky (*Pisum arvense*) – odrůda Arvica jsem ideální dobu bobtnání experimentálně stanovila na 20 hodin.

Jelikož se jedná o biotest na etiolovaných rostlinách hrachu je nutné, aby celý pokus probíhal ve tmě, či za použití zeleného světla, které rostliny neabsorbují ale odrážejí.^[19] Nedojde tak k absorpci světla rostlinou, což by narušilo či dokonce ukončilo proces etiolizace. Například jestliže budeme etiolované rostliny vystavovat denně po dobu pěti minut červenému světlu, proces etiolizace bude ukončen zhruba čtvrtý den.^[21] Zároveň je dokázáno, že se v etiolovaných rostlinách už po 1 minutě osvětlení protochlorofyl mění z 90 % na chlorofyl *a*.^[18] Proto je nezbytné chránit rostliny ve všech fázích pokusu před světelným impulzem - například překrytím tácu při přenosu do temné komory.

Jako podklad k výsevu semen bylo postačující použít perlit navlhčený zředěným roztokem Hoaglandu, 10^{-3}M CaCl_2 a Fe EDTA v poměru 10:3:1 ml na 1 l destilované vody.

Za nejvhodnější dobu k aplikaci hormonu byla stanovena fáze, kdy mají rostliny dobře viditelný první vrchní lístek (který se následně skalpelem odstraní), tzn. nadzemní část rostlin dorůstá do 10-20 mm. Opakování pokusu prokázalo, že tato fáze, kdy jsou rostlinky připravené na aplikaci hormonu, trvá krátce a nastává jeden den (24 hodin) po vysetí semen na táč. Hormon rozpuštěný v lanolinu se aplikuje na místo po uštípnutém prvním klíčícím listu.

Měření a vyhodnocení biotestu je ideální 4 dny po aplikaci hormonu. Na základě těchto poznatků jsem sestavila ideální schéma biotestu na stanovení vlivu brassinosteroidů na etiolované rostliny hrachu:

- 1.den (15:00) – namočení hrachů do vody (nechat semena bobtnat přes noc)
- 2.den (9:00) – vložení rovnoměrně nabobtnaných semen do exsikátoru
- 4.den (8:00) – vysazení semenáčků do perlitu
- 5.den (8:00) – aplikace hormonu na místě prvního extirpovaného lístku
- 9.den (10:00) – hodnocení (měření délky výhonů)

Druhým úkolem bylo otestovat základní vliv brassinosteroidů na etiolované rostliny hrachu. Testovala jsem vliv 24-epibrassinolidu na růst etiolovaných rostlin hrachu setého (*Pisum sativum*) a to dvou odrůd (Progres 9 a Gloriosa) a hrachu polního – pelušky (*Pisum arvense*) – odrůdy Arvica.

Aplikace brassinosteroidů podporuje biosyntézu ethylénu. Ethylén je zřejmě zodpovědný za fyziologické účinky brassinosteroidů na růst a vývoj etiolovaných rostlin. Brassinosteroidy u etiolovaných rostlin způsobují inhibici dlouhivého růstu, stimulaci růstu radiálního a výrazné zakřivení vrcholové části.^[20] Tyto změny byly v mé práci experimentálně prokázány. Ze všech grafů (graf č. 1, 2, 3) je na první pohled patrné, že nejvýraznější vliv na růst etiolovaných rostlin a jejich morfologii má 24-epibrassinolid v koncentraci 10^{-9} M. Rostliny, na které byl aplikován 24-epibrassinolid právě o koncentraci 10^{-9} M byly o 50 – 65,5 % nižší, byly více pokroucené a na průřezu silnější, než kontrolní rostliny, na které byl aplikován pouze lanolin. V ostatních koncentracích nebyl inhibující vliv hormonu na růst a morfologii tak výrazný.

10.ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zaměřuje na optimalizaci biotestu 24-epibrassinolidu na etiolované rostliny hrachu s vyhodnocením jeho vlivu na elongační růst.

K testování byla použita semena 2 odrůd hrachu setého (*Pisum sativum*) – Gloriosa a Progres 9 a 1 odrůda hrachu polního tzv. pelušky (*Pisum arvense*) – Arvica.

Metodiku biotestu jsem stanovila jako devítidenní cyklus. Z provedených experimentů vyplývá, že nejvhodnější testovanou odrůdou pro takto sestavený biotest je odrůda hrachu polního tzv. pelušky (*Pisum arvense*) Arvica. Další dvě testované odrůdy hrachu setého (*Pisum sativum*) Progres 9 a Gloriosa se díky celkovému nerovnoměrnému růstu ukázaly jako méně vhodné.

Co se týče testování měřeného vlivu brassinosteroidů lze konstatovat, že nejvýraznější vliv na etiolovaný růst rostlin hrachu má 24-epibrassinolid o koncentraci 10^{-9} M, a to u všech odrůd. V této koncentraci je etiolovaný růst velmi výrazně inhibován a to o 50 - 65,5 % oproti kontrolám. Naopak, v souladu s údaji zjištěnými v literatuře, je podporován růst radiální – testované rostliny jsou na průřezu silnější a celkově jsou rostliny více zakřivené.

Vzhledem k naměřeným výsledkům by bylo vhodné pokus opakovat s 24-epibrassinolidem ve vyšších koncentracích (10^{-8} M, 10^{-7} M). Dále pak by mohlo být zajímavé proměřit produkci ethylénu u jednotlivých koncentrací. Dále pak zachytit při vyhodnocování i růst radiální, případně zakřivení etiolovaných rostlin a otestovat větší počet odrůd.

11. PŘÍLOHA



Foto č. 1 Semena vložená do exsikátoru



Foto č. 2 Exsikátor v termostatu se zapojeným vzduchovacím motorkem



Foto č. 3 Termostat se vzduchovacím motorkem



Foto č. 4 Naklíčená semena



Foto č. 5 Příprava živného roztoku



Foto č. 6 Upravování pH pomocí pH metru



Foto č. 7 Klíčenci vysázení na táč



Foto č. 8 Táč s vysázenými klíčenci v termostatu



Foto č. 9 Semenáče s klíčící nadzemní částí



Foto č. 10 Rostlinky v zeleném světle připravené k aplikaci 24-EP

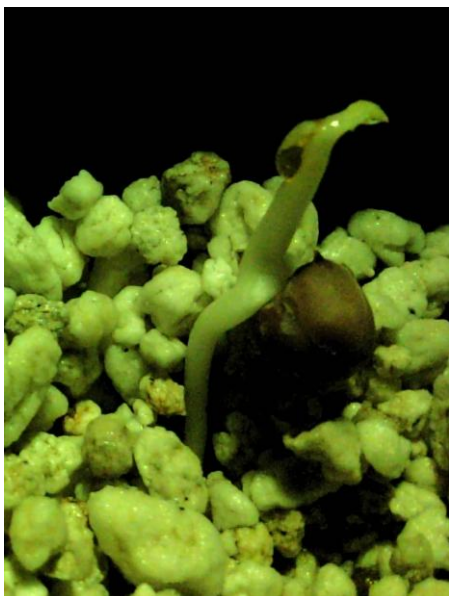


Foto č. 11 Rostlinka v zeleném světle po aplikaci 24-EP

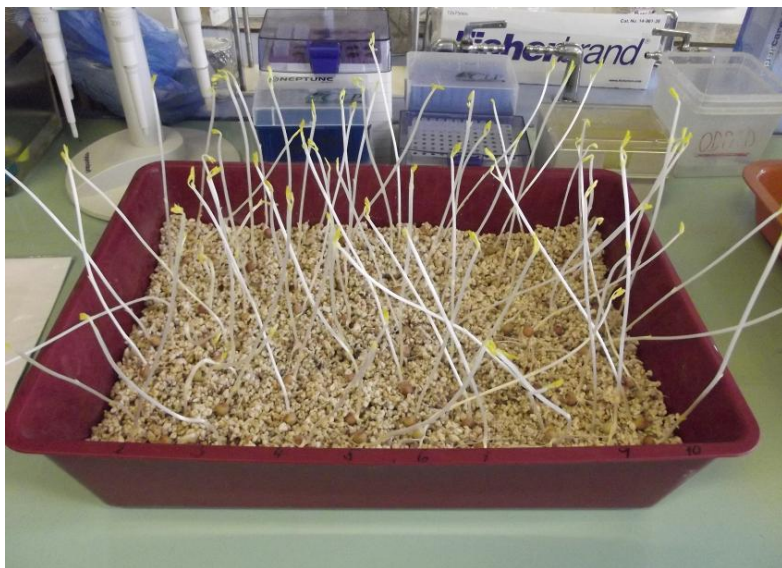


Foto č. 12 Vyhodnocení po 4 dnech kultivace



Foto č. 13 Vyhodnocení kontrola 1



Foto č. 14 Vyhodnocení kontrola 2



Foto č. 15 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-9} M



Foto č. 16 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-10} M



Foto č. 17 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-11} M



Foto č. 18 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-12} M



Foto č. 19 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-13} M



Foto č. 20 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-14} M



Foto č. 21 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-15} M



Foto č. 22 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-16} M

12. SEZNAM ZKRATEK

24-EP	24-epibrassinolid
BR	brassinosteriody
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IBA	kyselina indolyl-3-máselná
4-Cl-IAA	kyselina 4-chlorindolyl-3-octová
PAA	kyselina fenylloctová
2,4-D	2,4-di-chlorfenoxyoctová
NAA	α -naftylloctová
GA ₁	giberelin 1
GA ₃	kyselina giberelová
DZ	dihydrozeatin
iP	izopentenyladenin
DNA	kyselina deoxyribonukleová
RNA	kyselina ribonukleová
ABA	kyselina abscisová
ES	ekdysteroidy
BL	brassinolid
TE	teasteron
TY	thyphasterol
CS	castasteron
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová

13. SEZNAM OBRÁZKŮ, FOTOGRAFIÍ , TABULEK

A GRAFŮ

13.1. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Kyselina indolyl-3-octová ^[26]	14
Obrázek č. 2 Kyselina gibberelová ^[27]	16
Obrázek č. 3 Zeatin ^[28]	18
Obrázek č. 4 Kyselina abscisová ^[29]	19
Obrázek č. 5 Ethylén ^[30]	21
Obrázek č. 6 Kyselina jasmonová ^[31]	22
Obrázek č. 7 Brassinolid ^[32]	23
Obrázek č. 8 Syntéza brassinosteroidů ^[33]	24
Obrázek č. 9 Absorbční spektra dvou forem fytochromu ^[34]	28

13.2. SEZNAM FOTOGRAFIÍ

Foto č. 1 Semena vložená do exsikátoru	47
Foto č. 2 Exsikátor v termostatu se zapojeným vzduchovacím motorkem	47
Foto č. 3 Termostat se vzduchovacím motorkem.....	47
Foto č. 4 Naklíčená semena.....	48
Foto č. 5 Příprava živného roztoku.....	48
Foto č. 6 Upravování pH pomocí pH metru	48
Foto č. 7 Klíčenci vysázení na táč	49
Foto č. 8 Táč s vysázenými klíčenci v termostatu.....	49
Foto č. 9 Semenáče s klíčící nadzemní částí	49
Foto č. 10 Rostlinky v zeleném světle připravené k aplikaci 24-EP	50

Foto č. 11 Rostlinka v zeleném světle po aplikaci 24-EP	50
Foto č. 12 Vyhodnocení po 4 dnech kultivace	50
Foto č. 13 Vyhodnocení kontrola 1	51
Foto č. 14 Vyhodnocení kontrola 2	51
Foto č. 15 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-9} M.....	51
Foto č. 16 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-10} M	52
Foto č. 17 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-11} M	52
Foto č. 18 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-12} M	52
Foto č. 19 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-13} M	53
Foto č. 20 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-14} M	53
Foto č. 21 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-15} M	53
Foto č. 22 Vyhodnocení koncentrace 24-EP 10^{-16} M	54

13.3. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Taxonomické zařazení.....	31
-------------------------------------	----

13.4. SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1 Vliv 24-EP na etiolovaný růst hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>) odrůda Gloriosa .	41
Graf č. 2 Vliv 24-EP na etiolovaný růst hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>) odrůda Progres 9	422
Graf č. 3 Vliv 24-EP na etiolovaný růst pelušky (<i>Pisum arvense</i>) odrůda Arvica.....	433

14. ZDROJE OBRÁZKŮ

- [26] <http://akademon.cz/source/obr/iaa.png>
- [27] http://www.merckmillipore.com/slovakia/chemicals/kyselina-giberelova/MDA_CHEM-814464/p_YZSb.s1LNv0AAAEWioEfVhTl
- [28] <http://content.answcdn.com/main/content/img/oxford/oxfordBiochemistry/0198529171.zeatin.1.jpg>
- [29] TAIZ, Lincoln. *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer Associates, 2006.
- [30] LUŠTINEC, J., ŽDÁRSKÝ V.: *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. Praha: Karolinum, 2003.
- [31] http://www.osel.cz/_popisky/122_/s_1222759063.jpg
- [32] <http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin261/24-epibr.gif>
- [33] BROSA, C.: Biological effects of brassinosteroids. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1999, č. 5, s. 339-358.
- [34] http://www.ueb.cas.cz/cs/system/files/users/public/kolar_27/PDF_soubory/postery_rostliny_svetlo.pdf

15. BIBLIOGRAFIE

- [1] PROCHÁZKA, S.: *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia Praha, 2003.
- [2] PAVLOVÁ, L.: *Fyziologie rostlin*. Praha: Karolinum, 2005.
- [3] LUŠTINEC, J., ŽDÁRSKÝ V.: *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. Praha: Karolinum, 2003.
- [4] NOVÁČEK, F.: *Fytochemické základy botaniky*. Olomouc: Fontána, 2008.
- [5] Profil taxonu hrách setý. [online]. [cit. 2013-04-09].
Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id40003/>
- [6] SLAVÍK, B.: *Květena České republiky 4*. Praha: Academia, 1995.
- [7] *Pisum sativum* L. – hrách setý / hrach siaty. [online]. [cit. 2013-04-09].
Dostupné z: <http://botany.cz/cs/pisum-sativum/>
- [8] TAIZ, Lincoln. *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer Associates, 2006.
- [9] KAMLAR, M.: Steroidní fytohormony: funkce, mechanismus účinku a význam. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, č. 104, s. 93-99.
- [10] BROSA, C.: Biological effects of brassinosteroids. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1999, č. 5, s. 339-358.
- [11] O perlitu. [online]. [cit. 2013-04-09].
Dostupné z: <http://www.perlit.cz/?re=1&sk=2&me=2&ka=2&pk=3>
- [12] Minerální výživa. [online]. [cit. 2013-04-09]. Dostupné z:
http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130c14/navody/7_vyziva.pdf
- [13] FE EDTA -ŽELEZO (25G). [online]. [cit. 2013-04-09].
Dostupné z: <http://www.aquascape.cz/eshop/pmdd/1057-fe-edta-zelezo-25g.html>

- [14] ARTECA, R.: Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany*. 2008, roč. 59, č. 11, s. 3019-3026.
- [15] Zpráva pro tisk. [online]. [cit. 2013-04-09].
Dostupné z: <http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/Tisk/brasino.html>
- [16] Brassinosteroidy, látky s perspektivou. [online]. [cit. 2013-04-09]. Dostupné z: http://www.agroweb.cz/Brassinosteroidy-latky-s-perspektivou__s1304x47181.html
- [17] SYMONS, G.: Brassinosteroid transport. *Journal of Experimental Botany*. 2008, roč. 59, č. 1, s. 17-24.
- [18] RUBIN B.A.: *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 1966.
- [19] Není světlo jako světlo aneb Jak to vidí rostliny. [online]. [cit. 2013-04-09].
Dostupné z: http://www.ueb.cas.cz/cs/system/files/users/public/kolar_27/PDF_soubory/postery_rostliny_svetlo.pdf
- [20] HANSEN, M.: Regulation of ACS protein stability by cytokinin and brassinosteroid. *Plant J*. 2009, roč. 57, č. 4, s. 606-614.
- [21] RAVEN P.: *Biology of plants*. New York: Worth publishers, 1986.
- [22] ŠEBÁNEK J.: *Fyziologie rostlin*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1983.
- [23] MEYER B.: *Introduction to plant physiology*. London: D. Van Nostrand Company, Ltd, 1963.
- [24] Rostlinné klíčky. [online]. [cit. 2013-04-09].
Dostupné z: <http://www.countrylife.cz/rostlinne-klicky>
- [25] KINCL M., FAUSTUS L.: *Základy fyziologie rostlin*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1977.