

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie a anatomie rostlin



Redukce negativních účinků stresového etylénu u rostlin pomocí bakterií kořenové rhizosféry

Magisterská práce 2007

Vypracoval: Bc. Marek Neuberg
Vedoucí práce: RNDr. Jiří Šebestian, CSc.

Neuberg, M. (2007): Redukce negativních účinků stresového etylénu u rostlin pomocí bakterií kořenové rhizosféry

[Reduction of the stress ethylene negative influence in plants using roots rhizosphere bacteria]

Faculty of Biological Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic

Anotation:

The aim of this study was to influence stress ethylene level of *Dendrathera grandiflorum* cv. Sunny euro by bacterium *Enterobacter cloacae* Cal2, because senescence and abscission are the most common cause of quality loss of cut flowers and lowering of ethylene level can reduce these two processes and provide longer life cut flowers.

Tato práce byla financována z grantu číslo MSM 6007665801.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne 25.12.2007

Prohlašuji, že v souladu s § 47b y8kona 4. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejné přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou c Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

Poděkování:

Rád bych poděkoval školiteli RNDr. Jiřímu Šebestianovi, CSc. za vedení práce a trpělivost. Děkuji všem z katedry fyziologie a anatomie rostlin za zodpovídání četných dotazů. Díky patří také RNDr. Štěpánce B. Šebestianové, Ph.D. za poskytování cenných zkušeností. Dále bych rád poděkoval RNDr. Janu Šímovi, Ph.D. a Ing. Tomášovi Pickovi, Ph.D. za neocenitelnou pomoc v metodické části. Veliké díky patří mým rodičům za finanční a morální podporu. Zvláštní poděkování patří Medvíděti za jazykovou korekci a Pyrrovi za grafickou úpravu.

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Seznam zkratk | 5 |
| 2. Úvod | 6 |
| 3. Cíle práce | 8 |
| 4. Literární přehled | 9 |
| 4.1 Charakteristika chryzantémy (<i>Dendrathera grandiflorum</i>) | 9 |
| 4.2 Etylén | 10 |
| 4.2.1 Syntetické inhibitory tvorby etylénu | 12 |
| 4.3 Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) | 13 |
| 4.3.1 1-aminocyklopropan-1-karboxylát deamináza (ACCD) | 13 |
| 5. Materiál, média a metody | 16 |
| 5.1 Materiál | 16 |
| 5.1.1 Rostlinný materiál | 16 |
| 5.1.2 Bakteriální kultury | 16 |
| 5.2 Média | 16 |
| 5.2.1 Příprava médií a agarových půd | 16 |
| 5.2.2 Médium pro bakteriální kultury | 17 |
| 5.3 Metody | 17 |
| 5.3.1 Příprava bakterií | 17 |
| 5.3.1.1 Kultivace | 17 |
| 5.3.1.2 Příprava kultury | 18 |
| 5.3.3 Příprava rostlin | 18 |
| 5.3.4 Měření produkce etylénu rostlin biomasou chryzantém | 18 |
| 5.3.4.1 Příprava zásobního roztoku indolyl-3-octové kyseliny (IAA) | 18 |
| 5.3.4.2 Příprava a měření vzorků | 21 |
| 5.3.5 Měření rychlosti průběhu vadnutí řezaných květů chryzantém | 21 |
| 5.4. Měření rychlosti translokace značené kultury bakterií <i>Enterobacter cloacae</i> Cal2 | 24 |
| 5.4.1 Příprava značené kultury bakterií <i>Enterobacter cloacae</i> Cal2 | 24 |
| 5.4.2 Příprava vzorků pro měření rychlosti translokace | 24 |
| 6. Výsledky | 25 |
| 6.1 Průběh vadnutí řezaných květů chryzantémy | 25 |
| 6.2 Měření produkce etylénu u řezaných květů chryzantémy | 27 |
| 6.3 Měření rychlosti translokace značené kultury bakterií | 32 |
| 7. Diskuze | 33 |
| 7.1 Průběh vadnutí řezaných květů chryzantémy | 33 |
| 7.2 Měření produkce etylénu u řezaných květů chryzantémy | 34 |
| 8. Závěr | 36 |

1. Seznam zkratek

| | |
|-------|---|
| 1-MCP | 1-methylcyklopropen |
| ACC | 1-aminocyklopropan-1–karboxylová kyselina |
| ACCD | 1-aminocyklopropan-1-karboxylát deamináza |
| ACCO | 1-aminocyklopropan-1-karboxylát oxidáza |
| AVG | L-aminoethoxyvinylglycin |
| IAA | indolyl-3-octová kyselina |
| MTA | methylthioadenosin |
| PGPR | <u>P</u>lant <u>G</u>rowth <u>P</u>romoting <u>R</u>hizobacteria |
| SAM | S-adenosylmetionin |

2. Úvod

Rostliny pěstujeme již dlouhá staletí, nejen jako potravu, ale také pro jejich estetický vzhled. Užívání řezaných květin k dekoraci je spojeno s vadnutím zapříčiněným mnoha vnějšími faktory, jako jsou nevhodná teplota okolního prostředí, nedostatek živin a malá zásoba vody. Velká řada vnějších vlivů podporuje nebo naopak snižuje produkci rostlinných hormonů podílejících se na ztrátě kvality řezaných květin.

Mezi fytohormony patří také etylén, který hraje důležitou roli v zemědělství téměř od antiky. Dle Abeles et. al (1992) pocházejí jedny z nejstarších zmínek o etylénu z Bible, což svědčí o starověkých zahradnických metodách. Etylén byl však objeven až díky práci ruského vědce Dimitrije Neljubova na konci 19. století (Abeles et al., 1992). Určil význam etylénu jako fytohormonu a pomohl nám ho vnímat také jako látku se širokou škálou působení hlavně v oblasti stresu u rostlin.

Etylén je produkován především negativně ovlivněnými rostlinami (Abeles et al., 1992) a zprostředkovává jejich reakce v mnoha ohledech růstu a vývoje. Rostlinná tkáň reaguje na poranění nebo na různé jiné stresy produkcí etylénu, který inhibuje růst, ovlivňuje stárnutí, opadávání listů, plodů a pupenů a vadnutí (Glick and Bashan, 1997). Stárnutí a opadávání jsou nejběžnější příčiny ztráty kvality řezaných květin. Tyto procesy se dějí hlavně při dopravě rostlin, při které jsou stresovány .

Studie etylénových receptorů zaměřené na ovlivnění vnímavosti k tomuto fytohormonu u *Arabidopsis thaliana* naznačují negativní regulaci etylénovou odpovědí (Stepanova and Ecker, 2000). Ztráta jejich funkce mutací tak vytvoří rostlinu s konstitutivní etylénovou odpovědí (Knoester et al., 1998). Mutace v doméně vázající etylén tak může vytvořit rostlinu k němu necitlivou (Stearns and Glick, 2003). Možností jak také zabránit jeho negativním účinkům je ovlivnění jeho biosyntetické dráhy.

Etylén je produkován z L-metioninu přes meziprodukty: S-adenosyl-L-metionin (SAM) a klíčový meziprodukt jeho biosyntetické dráhy 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) (Penrose and Glick, 2001).

ACC může sloužit jako zdroj N, C a energie pro skupinu volně žijících půdních rhizobií (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria). Tyto bakterie jsou vybaveny enzymem ACC deaminázou (Penrose and Glick, 1997). Jde o enzym schopný štěpit

cyklopropanový kruh (Ose et al., 2003) a umožnit tak využití ACC jako zdroj energie pro bakterie, které tím snižují hladinu etylénu u stresovaných rostlin.

3. Cíle práce

- Zavedení a optimalizace metody pro měření produkce etylénu u řezaných květů.
- Stanovení optimálních podmínek pro měření produkce etylénu u květů chryzantém.
- Stanovení průběhu vadnutí řezaných květů v závislosti na koncentraci indolyl-3-octové kyseliny (IAA).
- Porovnání naměřené produkce etylénu řezaných květů v závislosti na koncentraci IAA.
- Ověření možnosti snížení hladiny stresového etylénu u chryzantém pomocí Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).
- Stanovení rychlosti translokace značené bakteriální kultury *Enterobacter cloacae* Cal2 stonkem chryzantémy.

4. Literární přehled

4.1 Charakteristika chryzantémy (*Dendrathera grandiflorum*)

Chryzantéma, *Dendrathera grandiflorum* – Kitam. je člen čeledi *Asteraceae*. Pojmenování pochází z Řečtiny (krus anthemion – zlatý květ). Známe ji také pod názvem *Chrysanthemum morifilium* – Ramat nebo *Anthemis grandiflorum*.

Jedná se o okrasnou květinu původem z Číny a z Japonska, kde byla přes 2000 let pěstována. Japonská odrůda byla vyšlechtěna z *C. indicum* var. *procumbens* x *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* (Fukai et al., 1991; Teixeira da Silva, 2003). Ve druhé polovině 17. století se *C. coronarium* a *C. segetum* začaly šířit do Asie, Středomoří a západní Afriky (Trehane, 1995).

C. coronarium var. *coronatum* je okrasná rostlina, zatímco *C. coronarium* var. *spatiosum* je používána v čínské kuchyni jako zelenina. Konzumovány jsou také stonky a listy *C. segetum*. Sekundární metabolity nachází využití v medicíně a léčitelství. Jedná se například o esenciální oleje (Schwinn et al., 1994; Akihisa et al., 2005). V současné době je známo více než 7000 kultivarů, které se využívají k řezu jako hrnkové, zahradní či skleníkové květiny.

Chryzantéma je aneuploidní hexaploid s počtem chromozomů $2n = 54 \pm 7$ až 9 (Roxas et al., 1995; Boase et al., 1998). Květina má vláknitý kořenový systém, který může za vhodných podmínek pronikat až do hloubky čtyřiceti centimetrů. Lodyha je velmi pevná s charakteristickým aroma. Listy jsou střídavé, rozdělené na jeden terminální a čtyři až šest laterálních laloků. Většina chryzantém má velké pestré květy široké škály barev. Dle počtu a umístění květů na lodyze můžeme chryzantémy rozdělit do dvou kategorií: 1) standardní typ – pouze jeden květ na lodyze a 2) typ pompon – více než jeden květ na lodyze.

Spolu s růží (*Rosa*) a karafiátem (*Dianthus*) je tato krátkodenní trvalka nejvíce ekonomicky významnou řezanou rostlinou na světě a jednou z nejvýznamnějších okrasných rostlin (Robinson and Firoozabady, 1993) V Japonsku, které je největším ročním producentem květů chryzantém (Boase et al., 1997), tvoří 35 % celkové produkce řezaných květin. Následuje Nizozemsko, Kolumbie, Itálie a USA.

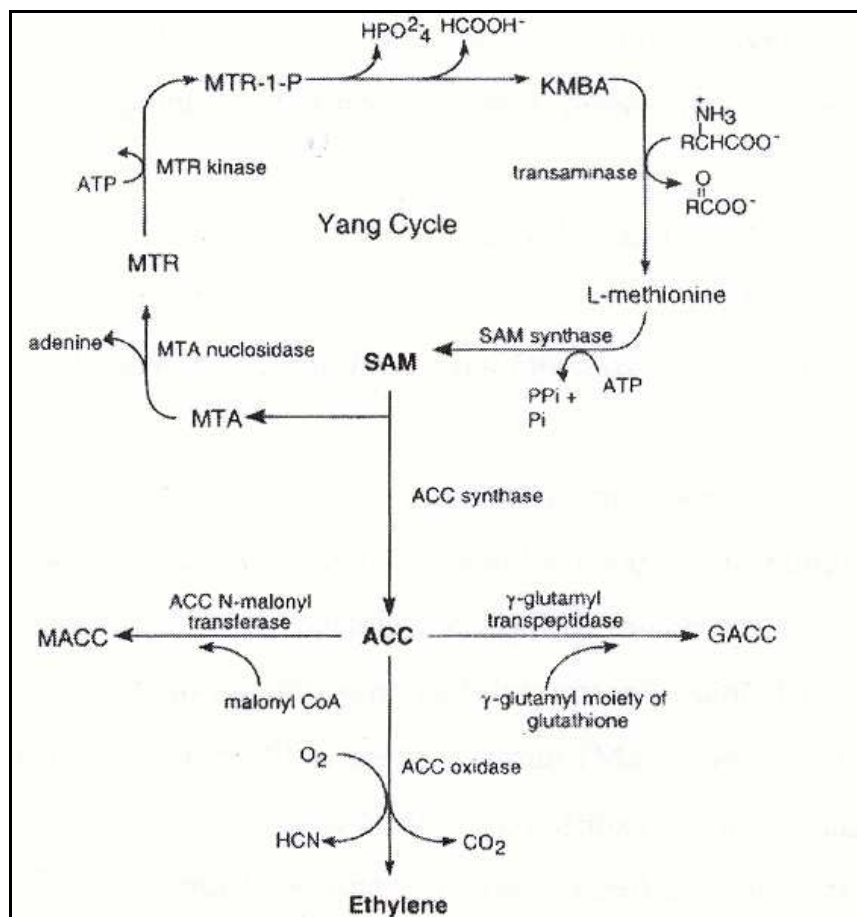
Celosvětová oblíbenost vede k úsilí šlechtitelů produkovat nové barevné a růstové modifikace této rostliny. Cílem šlechtitelství není jen změna barvy či tvaru květu, ale i

zvýšení odolnosti proti škodlivému hmyzu, plísním a v neposlední řadě prodloužení trvanlivosti řezaných květů.

4.2 Etylén

Etylén je nejjednodušší chemická látka s biologickou aktivitou. Dle Chae and Kieber (2005) známe jeho funkci jako regulátoru rostlinného růstu přibližně 100 let. Uznání etylénu jako fytohormonu přišlo až s vývojem analytických metod a s poznáním jeho biosyntézy (Taiz and Zeiger, 1991). Tento plynný fytohormon je důležitý pro normální vývoj rostliny, hraje roli při klíčení semen, při vývoji květů, při zrání plodů a také při růstu kořenů (Stearns and Glick, 2003). Ale vysoká hladina etylénu produkovaná rychle rostoucími kořeny vede obvykle k inhibici elongace kořenů. Etylén je také zodpovědný za modifikaci listů, zrychlenou respiraci a je to také hormon produkovaný jako odpověď na stres (Penrose and Glick, 1997). Produkci etylénu ovlivňují faktory jako teplota, výživa, světlo a další rostlinné hormony auxiny, kyselina abscisová a cytokininy (Glick, 2005). Množství etylénu také podléhá závislosti na cirkadiálních rytmech (Chae and Kieber, 2005).

K tvorbě etylénu dochází ve všech tkáních rostliny, ale jednotlivé tkáně produkují různá množství tohoto fytohormonu. U vyšších rostlin je syntetizován z L-metioninu, přeměněného na S-adenosylmetionin pomocí enzymu SAM syntáza. SAM je ACC syntázou konvertován na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) a 5'-methylthioadenosin (MTA). MTA jde do Yangova cyklu, kde je recyklován na L-metionin. Posledním krokem je reakce, které se zúčastní ACC oxidáza přeměňující ACC na etylén, kyanid a oxid uhličitý (viz. Obrázek 1). "



Obrázek č.1: Yangův cyklus (převzato ze Stearns and Glick, 2003)

Stresová syntéza etylénu probíhá u rostlin jako odpověď na mnoho negativních vlivů. Příkladem je sucho indukující senescenci starších listů rostliny tím, že dojde ke zvýšené syntéze ACC a tudíž konverzi ACC na etylén (Young et al., 2004). Mezi další stresové faktory patří také teplotní extrém, vodní stres, mechanická poškození a napadení různými patogeny. Produkce etylénu může vyvolat odpověď spojenou s usycháním listů, vadnutím a odumíráním buněk v místě infekce. V případě napadení rostliny infekcí je značná část škody na rostlině způsobena spíše zvýšenou hladinou etylénu, než patogenem samotným (Stearns and Glick, 2003).

Při pěstování rostlinných tkání *in vitro* se etylén zúčastní růstu a diferenciace. U některých druhů rostlin podporuje organogenezi, např. vývoj děložních lístků borovice paprscité *Pinus radiata* (Kumar et al., 1987) a somatickou embryogenezi u kávovníku *Coffea canephora* (Hatanaka et al., 1995). Ale u většiny prozkoumaných druhů rostlin etylén růst a diferenciaci inhibuje, např. růst zárodečné kultury smrku bílého *Picea glauca* je inhibován akumulací etylénu a CO_2 (Kumar et al., 1989). Inhibice etylénu pomocí AgNO_3 podporuje regeneraci u pšenice obecné *Triticum aestivum* a tabáku *Nicotiana plumbaginifolia*

(Purnhauser et. al., 1987), u kukuřice *Zea mays* (Songstad et. al., 1988), u některých genotypů hořčice *Brassica* (Chi et. al., 1990), u mrkve obecné *Daucus carota* (Roustan et. al., 1990) a slunečnice roční *Helianthus annuus* (Chraibi et. al., 1991).

Existuje několik způsobů, jak snížit hladinu stresového etylénu v rostlině a zmírnit tak škody. Jedná se buď o aplikaci syntetických inhibitorů etylénu nebo o využití bakterií podporujících růst rostliny. Dalším způsobem je vnesení některého z genů inhibujících syntézu etylénu přímo do rostliny. Výše zmíněné způsoby se dají využít pro studium řady fyziologických procesů, které jsou etylémem ovlivněny.

4.2.1 Syntetické inhibitory tvorby etylénu

Jednou z možností snížení hladiny endogenního etylénu je aplikace syntetických inhibitorů tvorby etylénu. Mezi antagonisty tvorby etylénu patří zejména ionty stříbra, aplikované ve formě AgNO_3 , jež podporuje regeneraci např. u *Daucus carota* (Roustan et al., 1990) a u *Helianthus annuus* (Chraibi et al., 1991), nebo ve formě $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Inhibice pomocí dusičnanu či thiosíranu stříbrného znemožní vazbu etylénu na vazebné místo, ale je velmi specifická a nemůže být indukována jinými kovovými kationty (Taiz and Zeiger, 1991).

Také oxid uhličitý ve vysokých koncentracích (5-10%) inhibuje mnoho účinků etylénu například indukci zrání plodů. Jako další syntetické inhibitory se používají kobaltové ionty, které inhibují ACC syntázu (Chraibi et al., 1991). Mezi inhibitory biosyntézy etylénu také patří α -aminomáselná kyselina a nikelnaté ionty (Zhang and Wu, 2003). K látkám inhibujícím ACC syntázu patří i aminoethoxyvinylglycin (AVG) (Nara and Takeuchi 2002; Pua et al., 1996). Tato látka snižuje hladinu etylénu tím, že inhibuje aktivitu ACC syntázy. Obecně inhibuje enzymy, které používají jako kofaktor pyridoxalfosfát a mezi ně právě ACC syntáza patří (Capitani et al., 2002). Dále sem můžeme zařadit např. aminooxyoctovou kyselinu (AOA) (Taiz and Zeiger, 1991), L-vinylglycin (Sato and Young, 1989), polyaminy (např. putrescin, spermidin a spermin), kyselinu salicylovou (Li et al, 1991). Dalšími inhibitory tvorby etylénu jsou deriváty cyklopropenu, jako například 1-methylcyklopropen, blokuje receptory etylénu a následně jeho aktivitu (Saleh-Lakha et al., 2005). Ovšem, i když je 1-MCP méně nebezpečný, než např. AVG, přesto bylo zjištěno, že jeho deriváty jsou také toxické (Ma et al., 2003) a méně stabilní při UV pod 366 nm (Maier et al., 2000), což limituje jejich použití pouze pro skleníky.

4.3 Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

Pro půdní bakterie a bakterie kolonizující rhizosféru se často používá název **Plant Growth Promoting Rhizobacteria** (Kloepper et al., 1989). Jedná se o skupiny bakterií, které jsou nějakým způsobem prospěšné rostlinám při růstu. Nejvýznamnějšími rody řadícími se mezi tyto bakterie jsou *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Rhizobium* (Glick and Penrose, 1998). Podporují růst rostlin dvěma různými mechanismy a to buď přímým nebo nepřímým způsobem (Penrose and Glick, 2001).

Při přímé podpoře zásobují bakterie rostlinu sloučeninami, které syntetizují nebo usnadňují jejich příjem z prostředí. Mohou fixovat atmosférický dusík a poskytovat ho rostlině v organické formě, syntetizovat siderofory schopné rozpouštět jinak nerozpustné trojmocné železo v půdě a tím ho zpřístupňují rostlině anebo syntetizují rostlinné hormony včetně auxinů (IAA) (Steven et al., 1998).

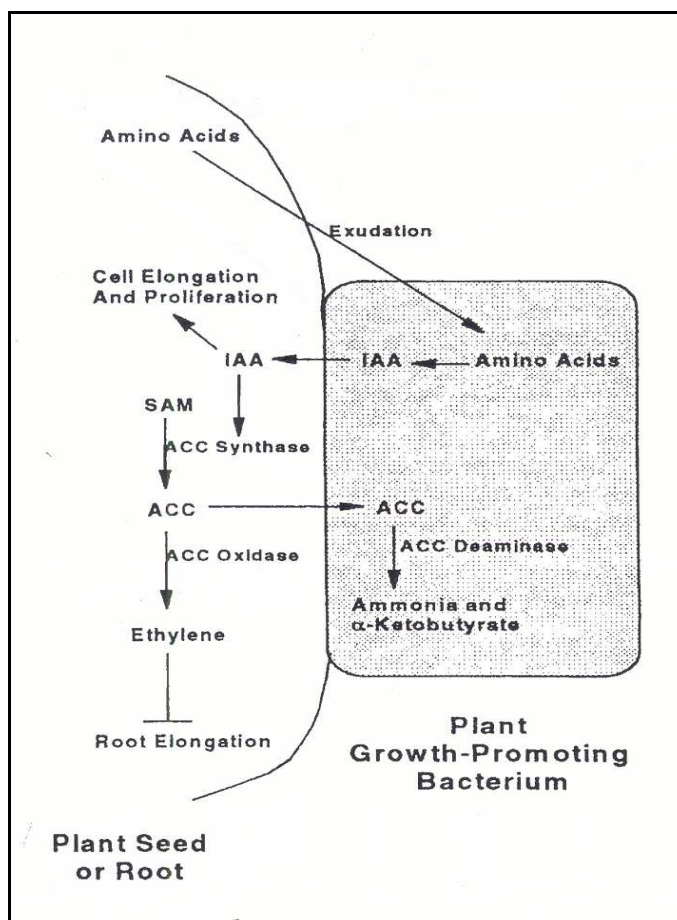
Při nepřímé podpoře syntetizují antibiotika, nebo jinak zabraňují patogenům inhibovat růst rostliny (Nie et al., 2002). Jiné druhy bakterií syntetizují enzymy s lytickým účinkem na buněčné stěny hub patogenních pro rostlinu. Jedná se například o chitinázu, β -1,3-glukanázu, proteázu či lipázu (Chernin et al., 1995).

Některé bakterie jsou schopny produkovat enzym 1-aminocyklopropan-1-karboxylát deaminázu (ACCD) a díky její pomoci snižují hladinu etylénu přímo v rostlině. (Glick, 2005) Tyto bakterie také pomáhají rostlinám rostoucím na slaných půdách překonávat stres (Mayak et al., 2004).

4.3.1 1-aminocyklopropan-1-karboxylát deamináza (ACCD)

Enzym 1-aminocyklopropan-1-karboxylát deamináza (ACCD) snižuje hladinu ethylenu štěpením ACC, prekursoru syntézy etylénu, na amoniak a α -ketobutyrát (Hall et al., 1996). PGPR bakterie produkující ACCD se váží na buněčné stěny semena nebo kořene rostliny. Na místa jsou bakterie lákány chemoatrakanty (látky přitahující půdní bakterie) produkovanými rostlinou. Jako atraktanty působí hlavně aminokyselina tryptofan a jiné malé molekuly (Glick et al., 1998). Přisedlé PGPR bakterie produkují a vylučují indolyl-3-octovou kyselinu (IAA) (Patten and Glick, 1996), která vstupuje do rostliny a

stejně jako endogenní IAA stimuluje nejen růst a proliferaci rostlinných buněk, ale i aktivitu ACC syntázy. To vede ke zvýšené stimulaci biosyntetické dráhy etylénu. Klíčový meziprodukt této dráhy, vyprodukovaná ACC, je odebírán z rostliny a bakterie jej hydrolyzuje pomocí ACC deaminázy na amoniak a α -ketobutyrát (viz. Obrázek 2). Bakterie snižuje koncentraci ACC v okolí rostliny, která je tím nucena v zájmu zachování rovnováhy mezi vnitřní a vnější hladinou ACC vylučovat více ACC. Odebírání endogenní ACC má za následek snížení produkce vlastního etylénu a ten tudíž neinhibuje růst rostliny a kořenů (Glick et al., 1998).



Obrázek č.2: Schopnost PGPR snižovat hladinu rostlinného etylénu (převzato z Penrose and Glick, 2001)

Deamináza 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACCD) je enzym poprvé objevený v bakterii *Pseudomonas* sp. ACP a kvasince *Hansenula saturnus* v roce 1978 Honmou a Shimomurou (Honma and Shimomura, 1978). Následně byl tento enzym nalezen u řady bakterií (rody *Pseudomonas*, *Enterobacter*), hub (*Penicillium citrinum*) a kvasinek (Fujino et al., 2004). ACC deamináza se nachází u řady kmenů půdních bakterií a jakákoli bakterie s ACCD aktivitou by měla být nazývána PGPR (Glick et al., 1998). Tento enzym je

schopen snižovat hladinu ACC v kořenech rostliny sdružených s PGPR a tím tedy snižovat hladinu etylénu. Příkladem je mikroorganismus *Pseudomonas putida* UW4 schopný podporovat růst rostlin při různých stresech včetně záplav, sucha a zvýšeného obsahu těžkých kovů v půdě (Hontzeas et al., 2004).

ACC deamináza má ale k ACC mnohem menší afinitu, než ACC oxidáza, která jej přeměňuje na etylén. ACC deamináza může soutěžit o substrát s ACC oxidázou pouze tehdy, je-li jí 100-1000 krát více. Tato skutečnost je velmi pravděpodobná, protože ACC oxidáza je enzym indukovaný přítomností ACC a ve zdravé, nesenescenční rostlinné tkáni se tudíž vyskytuje jen ve velmi nízkých koncentracích (Glick, 2005), takže tisícinásobek koncentrace ACCD může bakterie snadno dosáhnout.

Geny kódující ACC deaminázu byly izolovány z velkého počtu půdních mikroorganismů. Následně byly některé z těchto genů exprimovány v bakteriích (Holguin and Glick, 2001), mezi které patří například *Enterobacter cloaceae* Cal2, *E. cloaceae* UW4 (Shah et al, 1998). Exprese těchto genů byla vyzkoušena také v rostlinách (Klee et al., 1991). Gen pro ACC deaminázu byl přenesen z *Pseudomonas* sp. SG5 do rostlin rajčete, a tak byly získány plody s oddáleným zráním (Klee et al., 1991). Transgenní rostliny rajčat exprimovaly ACC deaminázu a tím byly chráněny proti stresu vyvolanému těžkými kovy (Grichko et al., 2000) nebo zaplavením vodou (Grichko and Glick, 2001).

5. Materiál, média a metody

5.1 Materiál

5.1.1 Rostlinný materiál

Pro pokusy s měřením produkce etylénu a pro pokusy s vadnutím byly použity řezané květy *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro. Jedná se o standardní typ plnokvěté chryzantémy s jedním terminálním květem žluté barvy. Rostliny byly transportovány a následně uchovávány v chladícím boxu při 12°C.

5.1.2 Bakteriální kultury

Pro pokusy s vadnutím a pro pokusy s měřením produkce etylénu byl použit kmen *Enterobacter cloacae* Cal 2, který byl získán od Prof. Glicka, B.R., University of Waterloo, Canada (Nie et al., 2002).

5.2 Média

5.2.1 Příprava médií a agarových půd

Jednotlivé složky média byly naváženy na analytických vahách Kern 770 a připraveno médium. Následně bylo upraveno pH a přidán agar. Médium s upraveným pH bylo sterilizováno v autoklávu Astell (program Liquid Load). Sterilizované médium bylo ponecháno vychladnout na 70°C a následně plněno do zkumavek po 7 ml a Petriho misek po 20 ml. Zkumavky s médiem byly uzavřeny kovovými uzávěry a opětovně klávovány stejným způsobem. Po klávování byly zkumavky ponechány ztuhnout v šikmé poloze. Petriho misky byly po nalití média uzavřeny a ponechány při laboratorní teplotě vyschnout po dobu 48 hodin. Na komplexní médium byly očkovány bakteriální kultury ze zásobních konzerv, které byly následně přeočkovávány na TY médium.

5.2.2 Médium pro bakteriální kultury

Komplexní médium

| | |
|--------------------------|--|
| Masový extrakt (DUCHEFA) | 10 g/l |
| Pepton (Oxoid) | 10g/l |
| NaCl | 5g/l |
| pH | 7,0 |
| Agar (fa Kulich HK) | 15 g/l (do tekutého média se nepřidával) |

TY médium – universální médium pro kultivaci rhizobakterií

| | |
|--|--|
| Trypton (DUCHEFA) | 5g/l |
| Kvasinkový extrakt (SERVA) | 3g/l |
| CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 0,1 g/l |
| pH | 7,2 |
| Agar (fa Kulich HK) | 15 g/l (do tekutého média se nepřidával) |

5.3 Metody

5.3.1 Příprava bakterií

5.3.1.1 Kultivace

Kultura *Enterobacter cloacae* Cal2 byla skladována v chladničce při 7°C. Kultura byla naočkována na pevné TY médium, kde byla kultivována za laboratorní teploty. Kultivace probíhala po dobu 72 hodin. Následně byla kultura asepticky přeočkována na tekuté TY médium a ponechána 72-96 hodin na třepače GFL 1083. Bakteriální linie byla udržována přeočkováváním na Petriho miskách s komplexním médiem.

5.3.1.2 Příprava kultury

Bakteriální kultura *E. cloacae* Cal2 byla pěstována 72 hodin na tekutém TY médiu na třepačce při teplotě 24°C. Následně byla změřena spektrometrem SPEKOL 11 absorbance při vlnové délce 600 nm. Naměřená čísla byla použita pro výpočet koncentrace bakterií ze vztahu $n = A * 2,4 * 10^9$, kde **n** je počet bakterií na 1 ml bakteriální suspenze a **A** je rozdíl absorbance vzorku a blanku při $\lambda = 600$ nm.

Pro vyloučení vlivu média na vadnutí květů byly bakteriální kultury po změření centrifugovány Sigma 3K30 (19998 RCF; 6°C; 10 minut), resuspendovány ve sterilní destilované vodě a znovu centrifugovány a resuspendovány ve sterilní destilované vodě, a tak zbaveny zbytků média. Do každé baničky bylo přidáno takové množství bakteriální suspenze, aby výsledná koncentrace byla 10^9 bakterií na ml roztoku.

5.3.3 Příprava rostlin

Jednotlivé rostlinky byly po zakoupení umístěny do chladicího boxu SANYO a uchovávány v čerstvém stavu. Před pokusem byly jednotlivé květy umístěny do Erlenmeyerovy baňky s chladnou vodou a ponechány 1-2 hodiny temperovat při laboratorní teplotě.

Pro pokus byly vybrány květy stejné velikosti. Květ byl šikmo uříznut žiletkou 6 cm pod květním lůžkem, byly odstraněny listy z lodyhy, opláchnuty destilovanou vodou. Poté byly květy zváženy na analytických vahách a náhodně rozděleny do připravených baniček s příslušnými roztoky. Lodyhy květů umístěných do baniček o objemu 4,5 ml byly překryty parafilmem, aby nedocházelo k odpařování roztoků, které byly doplňovány dle potřeby ze zásobních roztoků.

5.3.4 Měření produkce etylénu rostlin biomasou chryzantém

5.3.4.1 Příprava zásobního roztoku indolyl-3-octové kyseliny (IAA)

Nejprve byl připraven zásobní roztok rozpuštěním příslušného množství kyseliny indolyl-3-octové (IAA) DUCHEFA v 1M NaOH o výsledné koncentraci 4000 µg/ml, který byl následně rozpipetován dle tabulky č. 1. Množství IAA bylo naváženo na analytických vahách a připravena řada zkumavek o koncentracích IAA (4000 mg/l; 3000 mg/l; 1500 mg/l; 300 mg/l a 60 mg/l) a jako negativní kontrola sloužily baničky s destilovanou vodou. Další sada baniček obsahovala stejnou koncentraci IAA, ovšem tentokrát s bakteriální kulturou *Enterobacter cloacae* Cal2 v koncentraci 10⁹ bakterií/ml roztoku.

Květy byly umístěny do nádob dle následujícího schématu:

| Číslo sady | Počet baniček v sadě | Výsledná koncentrace IAA (µg/ml) | Přítomnost bakterií * | Popis |
|------------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 1 | 3 | 4000 | - | |
| 2 | 3 | 4000 | + | |
| 3 | 3 | 3000 | - | |
| 4 | 3 | 3000 | + | |
| 5 | 3 | 1500 | - | |
| 6 | 3 | 1500 | + | |
| 7 | 3 | 300 | - | |
| 8 | 3 | 300 | + | |
| 9 | 3 | 60 | - | |
| 10 | 3 | 60 | + | |
| 11 | 3 | 0 | - | Negativní kontrola (destilovaná voda) |
| 12 | 3 | 0 | + | |

Tabulka č. 1 – Schéma uspořádání pokusu, * ve výsledné koncentraci 10⁹ bakterií/ml

Jednotlivé květy byly umístěny do příslušných sklenic dále nazývaných „etylénky“ (viz Obrázek č. 3) o objemu 270 ml. Vzorky byly ponechány otevřené (viz Obrázek č. 4). Před měřením produkce etylénu byly zavírány přesně na 60 minut (viz Obrázek č. 5). Mezi uzavřením jednotlivých vzorků byl interval 130 vteřin, což je doba odpovídající změření vzorku plynovým chromatografem.



Obrázek č. 3: Jednotlivé díly „etylénky“



Obrázek č. 4: Otevřená „etylénka“



Obrázek č. 5: Uzavřená „etylénka“

5.3.4.2 Příprava a měření vzorků

Z uzavřených „etylének“ byl po 60 minutách odebrán vzorek plynu 200 μ l, který byl vpíchnut do inletu plynového chromatografu Agilent 6890 s FID detektorem. Naměřené hodnoty v ppm byly řádně opsány a dále statisticky zpracovány. Plynový chromatograf byl kalibrován na vzdušný methan, který není schopna kolona od etylénu oddělit a kalibračním plynem 10 ppm etylénu v syntetickém vzduchu.

5.3.5 Měření rychlosti průběhu vadnutí řezaných květů chryzantém

Jednotlivé květy byly měřeny a fotografovány v pořadí podle tabulky č. 1. Fotografie byly pořizovány po 12ti hodinách fotoaparátem značky Olympus E-500. Rostliny byly uchovávány v kultivačním boxu při teplotě 23°C a fotoperiodou 16 hodin světla/ 8 hodin tma. Jednotlivé exempláře byly od sebe odděleny, aby se vzájemně neovlivňovaly produkcí etylénu.

Ze získaných fotografií byl zpětně zjištěn stav květů po určitých časových intervalech a vyhodnocen podle sestavené stupnice vadnutí.

Stupeň č. 1 – čerstvý květ (viz Obrázek č.6)

Stupeň č. 2 – náznak sklopení spodních okvětních plátků (viz Obrázek č.7)

Stupeň č. 3 – sklopení spodních okvětních plátků, náznak ohýbání stonku (viz Obrázek č.8)

Stupeň č. 4 – ohnutí stonku (viz Obrázek č.9)

Stupeň č. 5 – ohnutí všech okvětních lístků, začátek hnědnutí stonku (viz Obrázek č.10)

Stupeň č. 6 – zlomení stonku, jeho hnědnutí stonku a hnědnutí středové části květu (viz Obrázek č.11)



Obrázek č. 6: 1. stupeň vadnutí



Obrázek č. 7: 2. stupeň vadnutí



Obrázek č. 8: 3. stupeň vadnutí



Obrázek č. 9: 4. stupeň vadnutí



Obrázek č. 10: 5. stupeň vadnutí



Obrázek č. 11: 6. stupeň vadnutí

5.4 Měření rychlosti translokace značené kultury bakterií *Enterobacter cloaceae* Cal2

5.4.1 Příprava značené kultury bakterií *Enterobacter cloaceae* Cal2

Z narostlé kultury *Enterobacter cloaceae* Cal2 bylo odebráno 0,5 ml inokula a přeočkováno na tekuté TY médium, které bylo ponecháno kultivovat přes noc. Následně bylo přidáno 50 μ l L-[4,5-³H] Leucinu Amersham značeného tritiem a ponecháno přes noc kultivovat na třepačce. Následně byla kultura zcentrifugována, resuspendována ve sterilní destilované vodě a znovu centrifugována a resuspendována ve sterilní destilované vodě, a tak zbaveny zbytků média. Do baňky se značenou kulturou bakterií byly umístěny řezané květy chryzantém.

5.4.2 Příprava vzorků pro měření rychlosti translokace

Řezané květy chryzantémy byly ošetřeny značenou kulturou *Enterobacter cloaceae* Cal2. Dle časového schématu byly odebírány a stonek (6 cm) byl rozřezán po 0,5 cm. Jednotlivé vzorky byly vloženy do eppendorfky a zality scintilačním roztokem EcolumeTM ICN. Značení bylo změřeno na přístroji Packard Counter (Tri-carb 2900 TR).

6. Výsledky

6.1 Průběh vadnutí řezaných květů chryzantémy

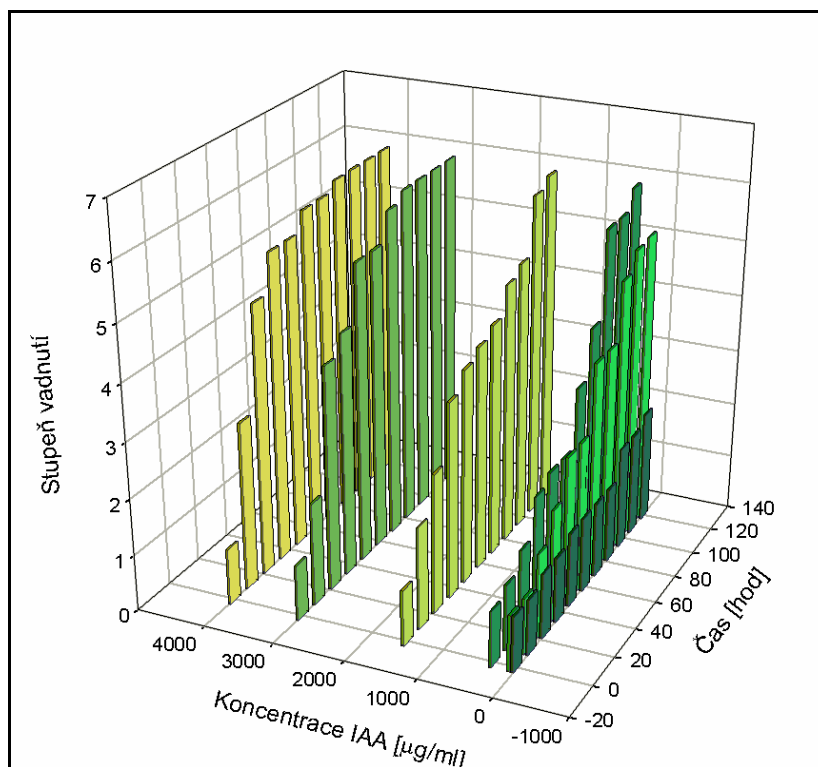
Ze získaných průměrných hodnot vynesných do grafu číslo 1 vyplívá, že květy umístěné v roztocích o různých koncentracích IAA ($c = 60, 300, 1500, 3000$ a $4000 \mu\text{g/ml}$) vadly rychleji než negativní kontrola (květy umístěné v destilované vodě) a to ve všech případech, čímž byl potvrzen předpoklad závislosti míry senescence na koncentraci použité IAA.

U všech koncentrací IAA se rozdíly v rychlosti vadnutí měnily v závislosti na čase. Na začátku pokusu byly rozdíly mezi jednotlivými skupinami nepatrné nebo žádné, ale v závislosti na koncentraci IAA začaly být po několika časových úsecích patrné rozdíly, které se postupem času ještě zvětšovaly.

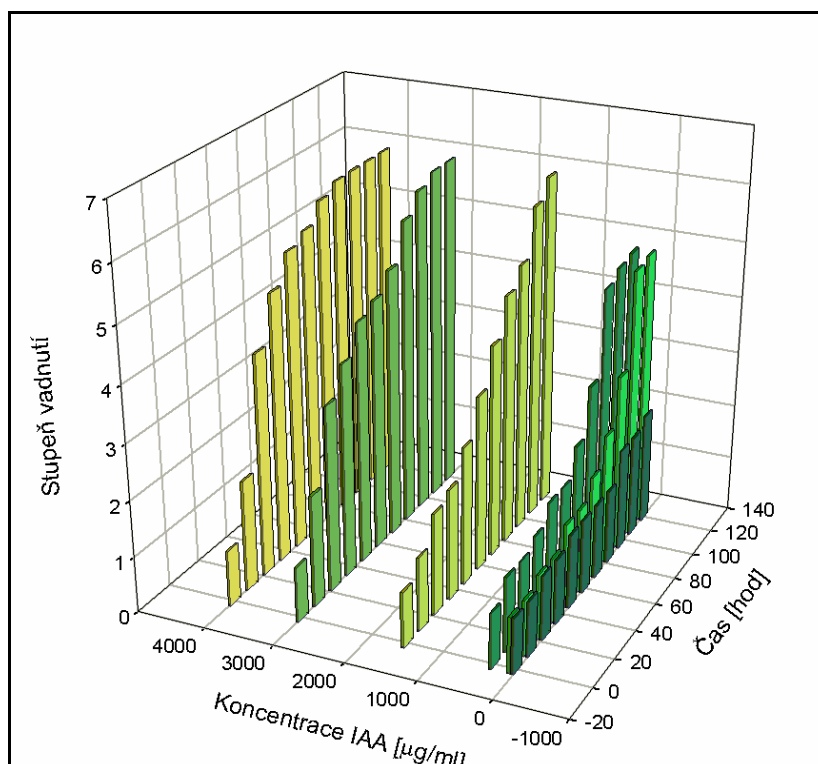
Z grafu číslo 2 je zřejmé, že v roztocích IAA s bakteriálním kmenem *Enterobacter cloacae* Cal2 byl také udržován trend rychlosti vadnutí odpovídající koncentraci IAA, ale přidaná bakteriální kultura zpomalovala vadnutí ve všech koncentracích. Nejvíce je tento rozdíl patrný u koncentrací IAA 60, 300 a $1500 \mu\text{g/ml}$.

Květy stimulované k vadnutí roztoky IAA o koncentracích 4000 a $3000 \mu\text{g/ml}$ dosáhly konečného stádia vadnutí v časech 78 a 83 hodin od počátku ošetření. Květ ošetřený IAA v koncentraci $1500 \mu\text{g/ml}$ vadl v čase 108 hodin a květ ošetřený koncentrací IAA $300 \mu\text{g/ml}$ dosáhl 6 stupně vadnutí také v čase 114 hodin. U koncentrací IAA 60 a $0 \mu\text{g/ml}$ nebylo v daném časovém intervalu dosaženo konečného stupně vadnutí, ale po 120 hodinách bylo dosaženo pátého a druhého stupně vadnutí (viz. graf č. 1).

Za přítomnosti bakterií *Enterobacter cloacae* Cal2 v odpovídajících koncentracích IAA byl konečný stupeň vadnutí dosažen u koncentrací 4000, 3000 a $1500 \mu\text{g/ml}$ v časech: 76, 108 a 116 hodin. U koncentrací IAA 300, 60 a $0 \mu\text{g/ml}$ nebylo dosaženo konečného stupně vadnutí v daném časovém intervalu (viz. graf č. 2), ale bylo dosaženo pátého stupně u koncentrací IAA 300 a $60 \mu\text{g/ml}$ a druhého stupně vadnutí u koncentrace IAA $0 \mu\text{g/ml}$.



Graf č. 1 : Průběh vadnutí květů *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro při ošetření vodou a IAA ($c = 0, 60, 300, 1500, 3000, 4000 \mu\text{g/ml}$).



Graf č. 2 : Průběh vadnutí květů *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro při ošetření bakteriálním kmenem *Enterobacter cloacae* Cal2 a IAA ($c = 0, 60, 300, 1500, 3000, 4000 \mu\text{g/ml}$).

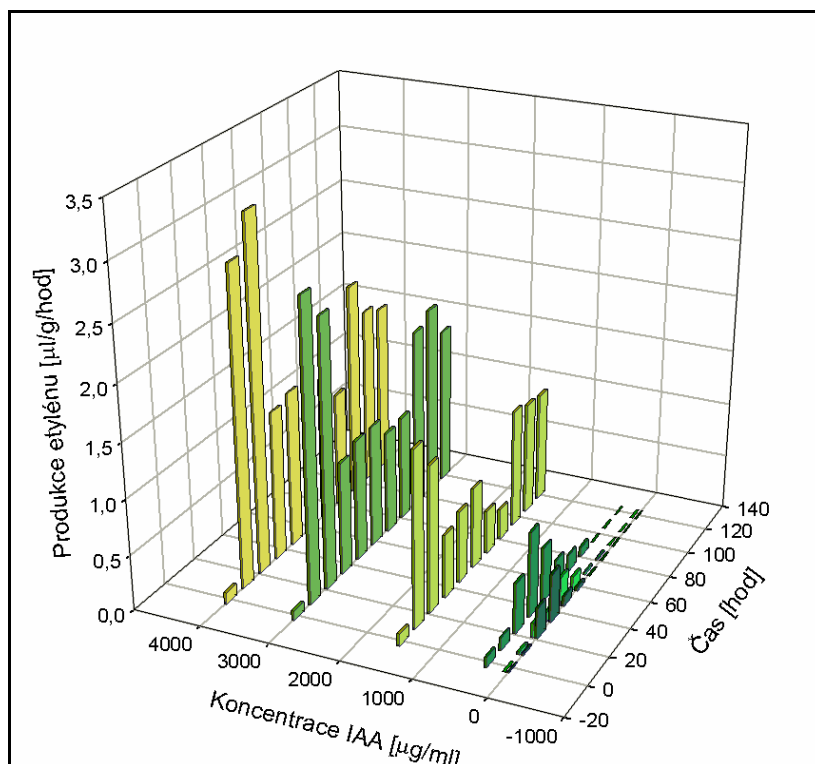
6.2 Měření produkce etylénu u řezaných květů chryzantémy

V grafech číslo 3 a 4 jsou prezentovány zjištěné průměrné hodnoty produkce etylénu (viz také grafy 4-10, kde jednotlivé body znázorňují průměrné hodnoty (ze tří měření) s vnesenými směrodatnými odchylkami.), z kterých je zřejmý nárůst produkce etylénu u jednotlivých sad se stoupající koncentrací IAA ($c = 60, 300, 1500, 3000, 4000 \mu\text{g/ml}$) v porovnání s negativní kontrolou (květy v destilované vodě). Tento trend je patrný i za přítomnosti bakterií *Enterobacter cloacae* Cal2 u stejných koncentrací IAA, ale dosažené hodnoty produkce etylénu jsou přibližně poloviční.

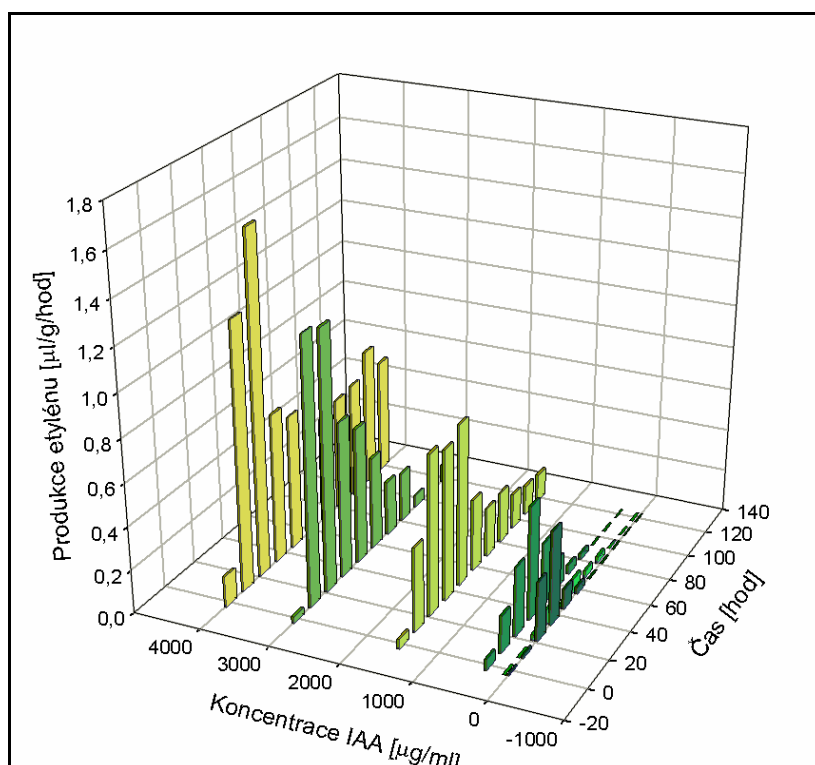
U koncentrace IAA $4000 \mu\text{g/ml}$ bylo maximum produkce zaznamenáno ve 22. hodině od počátku ošetření. U téže koncentrace za přítomnosti bakteriálního kmene byl zjištěn stejný čas maxima produkce. (viz graf č.5). U koncentrace IAA $3000 \mu\text{g/ml}$ bylo maximum produkce zaznamenáno ve 18. hodině. U téže koncentrace za přítomnosti bakteriálního kmene byl zjištěn stejný čas maxima produkce (viz graf č.6). U koncentrace IAA $1500 \mu\text{g/ml}$ bylo maximum produkce zaznamenáno v 18. hodině. U téže koncentrace za přítomnosti bakteriálního kmene byl zjištěn čas maxima ve 24. hodině (viz graf č.7). U koncentrace IAA $300 \mu\text{g/ml}$ bylo maximum produkce zaznamenáno ve 38. hodině. U téže koncentrace za přítomnosti bakteriálního kmene byl zjištěn stejný čas maxima produkce (viz graf č. 8). U koncentrace IAA $60 \mu\text{g/ml}$ bylo maximum zaznamenáno v 50. hodině. U téže koncentrace za přítomnosti bakteriálního kmene byl zjištěn stejný čas maxima produkce (viz graf č.9).

Účinnost redukce hladiny etylénu je nejmarkantnější při porovnání vzorků bez IAA, kdy u květů ve vodě bylo maximum zjištěno ve 38. hodině a za přítomnosti bakterií ve vodě (bez IAA), kde nebyla hladina etylénu vůbec měřitelná (viz graf č.10).

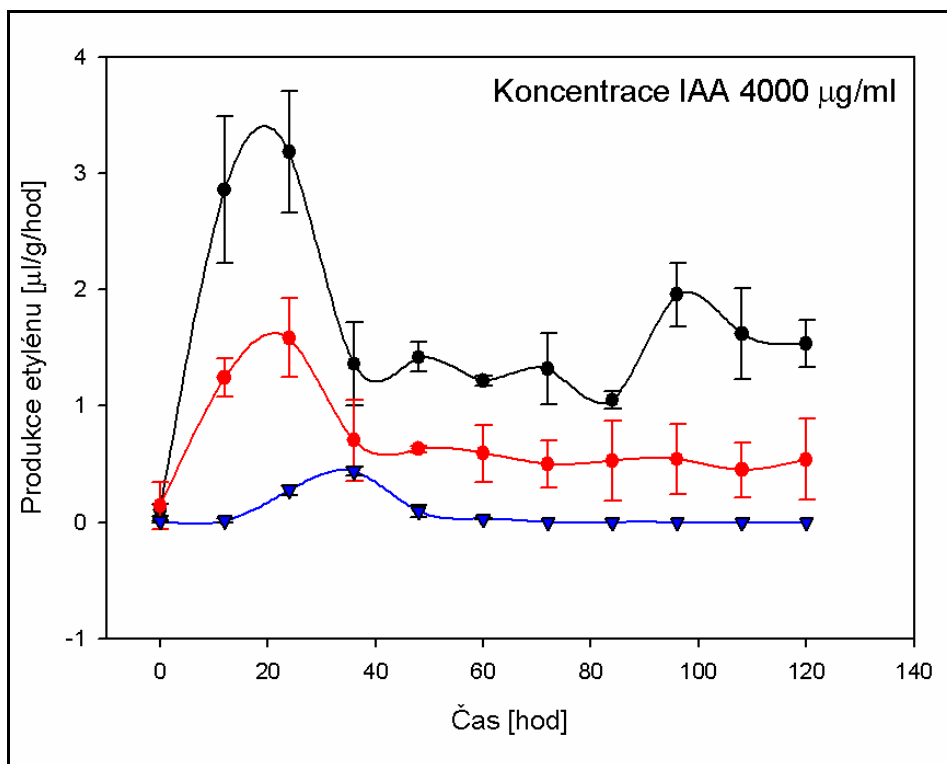
Z naměřených dat lze obecně říci, že produkce etylénu vykazuje u vysokých koncentrací IAA ($c = 4000, 3000$ a $1500 \mu\text{g/ml}$) počátečný strmý nárůst během 18. – 24. hodiny od počátku ošetření. U koncentrací IAA ($c = 300$ a $60 \mu\text{g/ml}$) a u kontrolních sad s přidaným bakteriálním kmenem dochází k posunutí maximální produkce etylénu ke vzdálenějším časům.



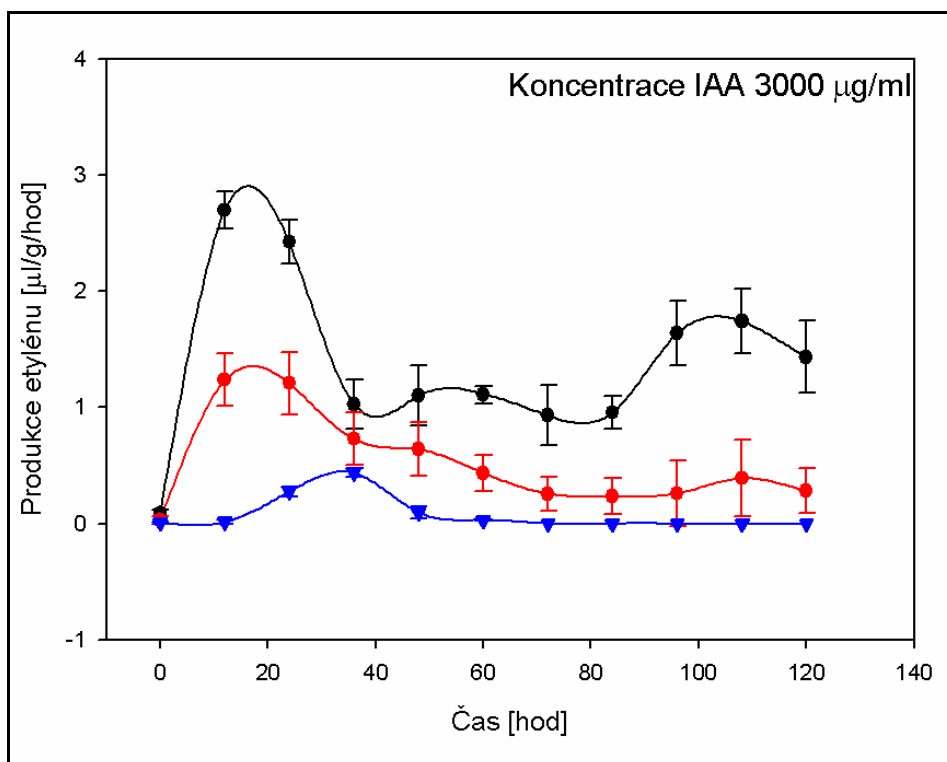
Graf č. 3: Průběh produkce etylénu květy *Dendratherma grandiflorum* var. Sunny euro při ošetření vodou (negativní kontrola) a IAA ($c = 0, 60, 300, 1500, 3000, 4000 \mu\text{g/ml}$).



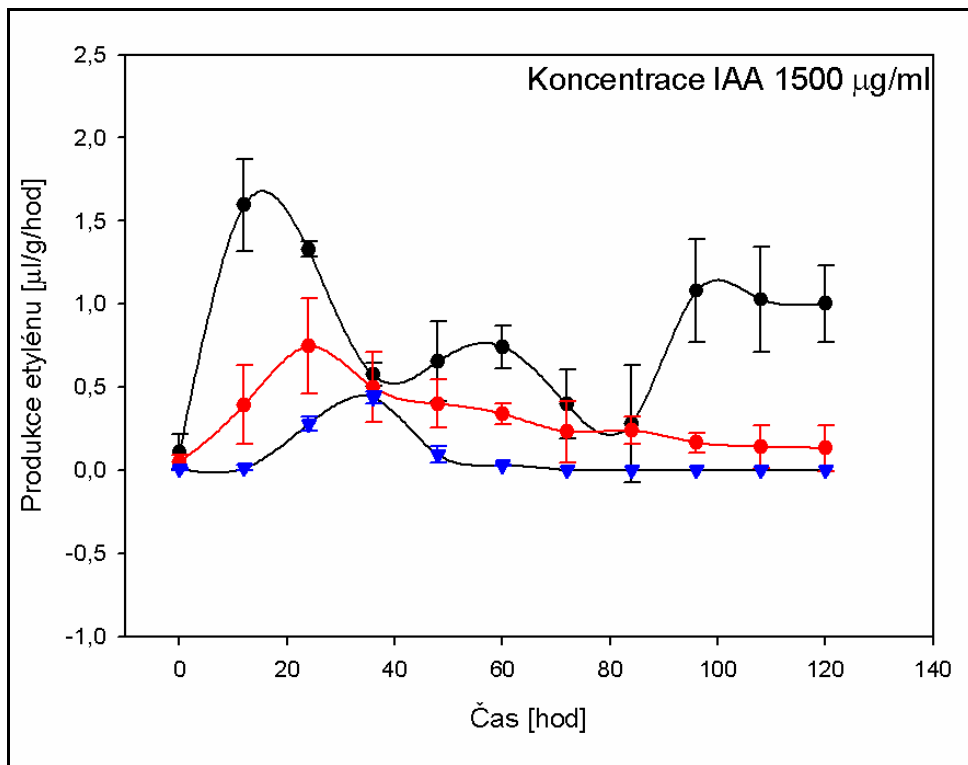
Graf č. 4 : Průběh produkce etylénu květy *Dendratherma grandiflorum* var. Sunny euro při ošetření bakteriálním kmenem *Enterobacter cloaceae* Cal2 a IAA ($c = 0, 60, 300, 1500, 3000, 4000 \mu\text{g/ml}$).



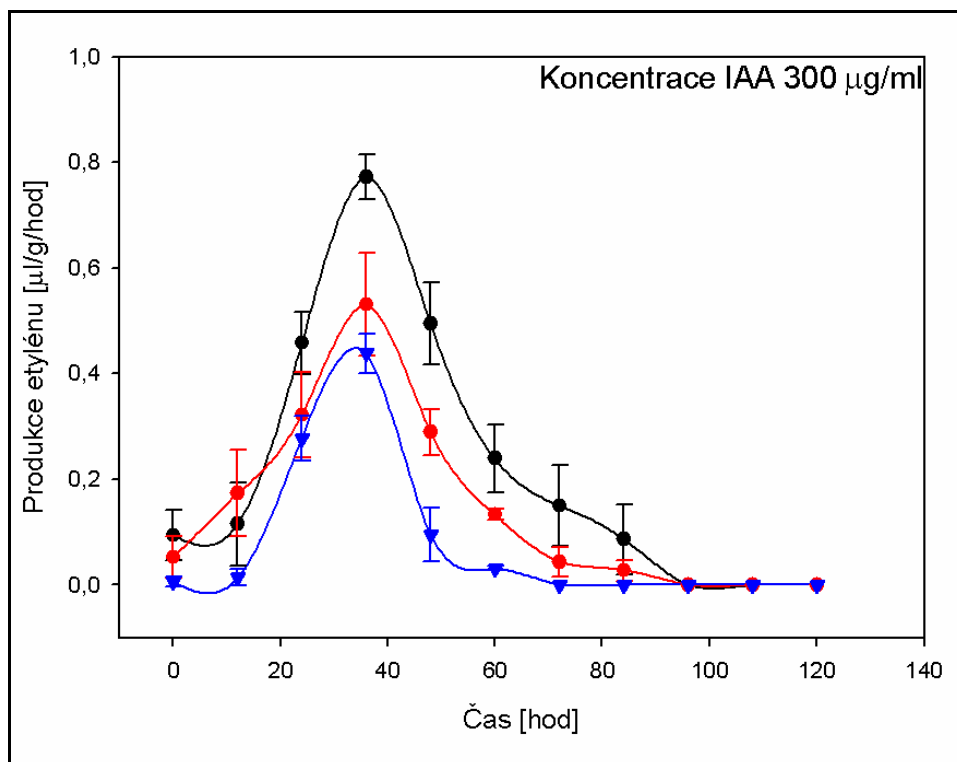
Graf č. 5: Průběh produkce etylénu u *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro při ošetření voda + IAA (černá), *E. Cloaceae* Cal2 + IAA (červená) a negativní kontroly (modrá).



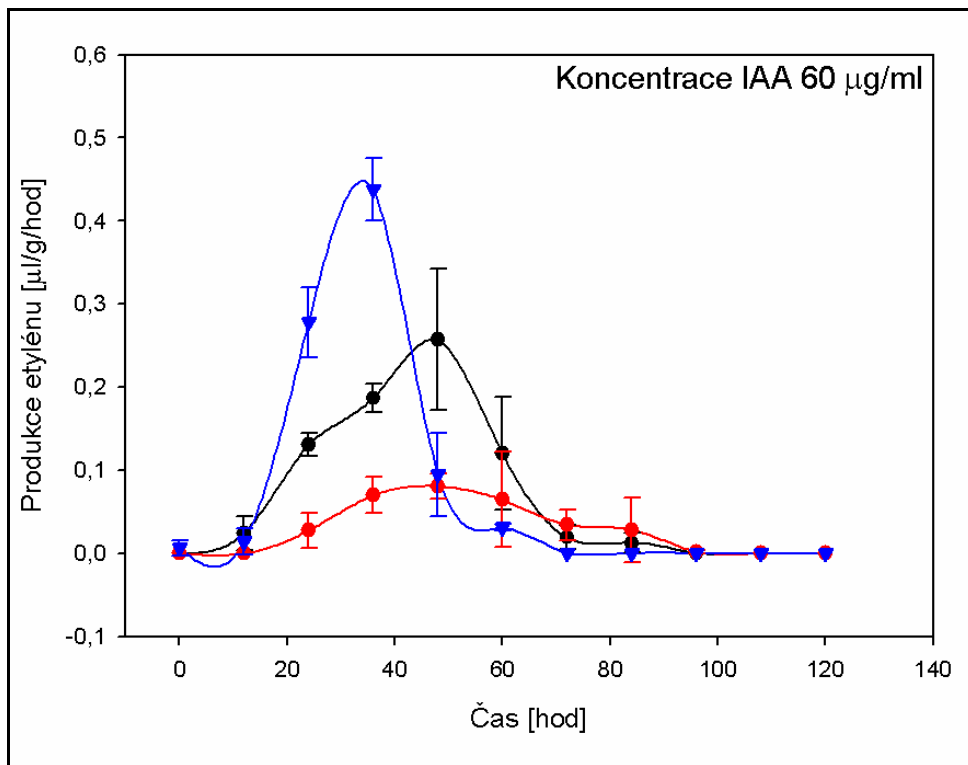
Graf č. 6: Průběh produkce etylénu u *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro při ošetření voda + IAA (černá), *E. Cloaceae* Cal2 + IAA (červená) a negativní kontroly (modrá).



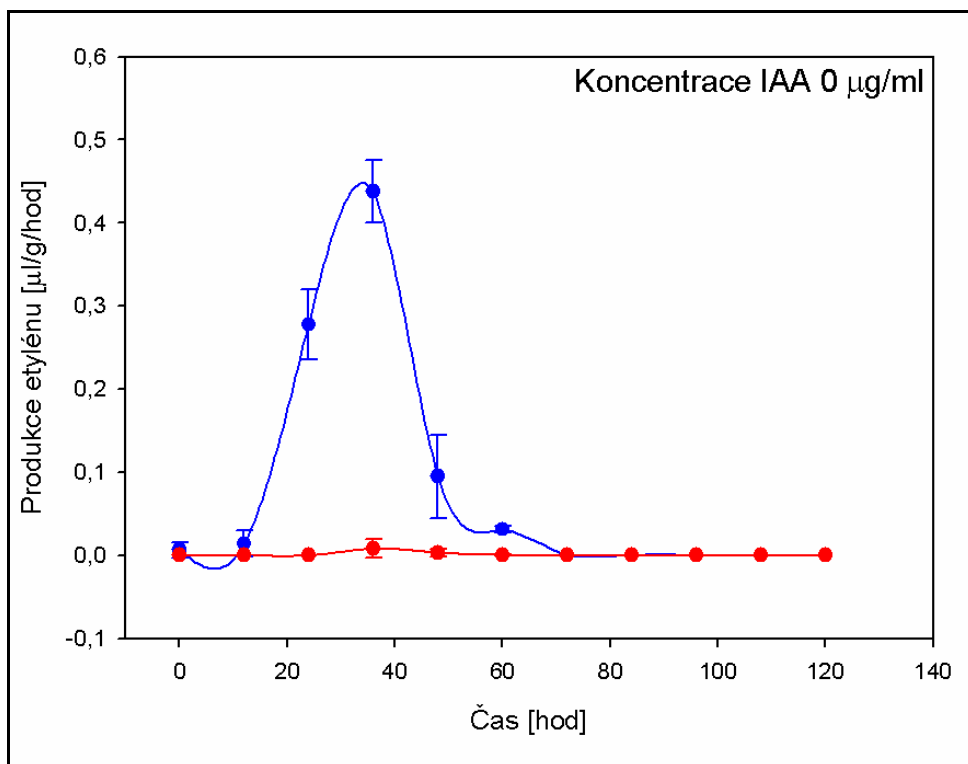
Graf č. 7: Průběh produkce etylénu u *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro při ošetření voda + IAA (černá), *E. Cloaceae* Cal2 + IAA (červená) a negativní kontroly (modrá).



Graf č. 8: Průběh produkce etylénu u *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro při ošetření voda + IAA (černá), *E. Cloaceae* Cal2 + IAA (červená) a negativní kontroly (modrá).



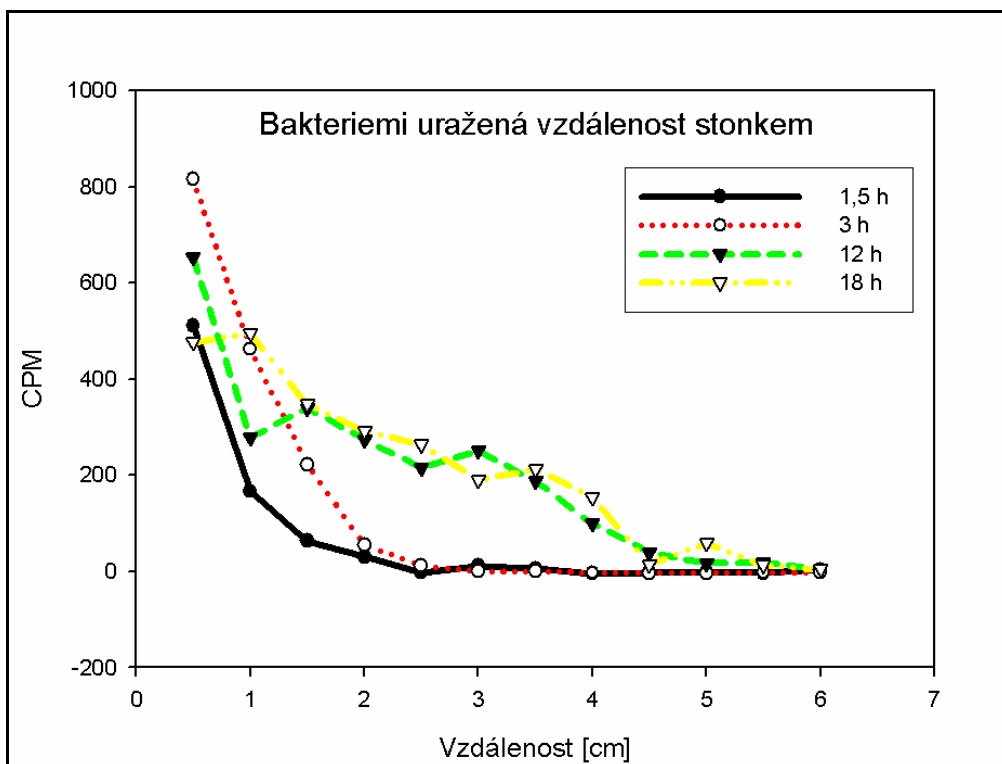
Graf č. 9: Průběh produkce etylénu u *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro při ošetření voda + IAA (černá), *E. Cloaceae* Cal2 + IAA (červená) a negativní kontroly (modrá).



Graf č. 10: Průběh produkce etylénu u *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro při ošetření negativní kontrola (modrá) a *E. Cloaceae* Cal2 (červená).

6.3 Měření rychlosti translokace značené kultury bakterií *Enterobacter cloacae* Cal2

Do grafu číslo 11 byly vyneseny naměřené hodnoty (body představují jednotlivá měření) translokace značené bakteriální kultury *Enterobacter cloacae* Cal2. Z naměřených hodnot je patrný vzrůstající počet značených bakterií ve vzdálenějších částech stonku (blíže květu) s časem.



Graf č. 11: Translokace značených bakterií *Enterobacter cloacae* Cal2 stonkem chryzantémy *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro.

7. Diskuze

7.1 Průběh vadnutí řezaných květů chryzantémy

Hlavním cílem této diplomové práce bylo určení průběhu vadnutí řezaných květů chryzantémy *Dendrathera grandiflorum* var. Sunny euro ošetřených roztoky o různé koncentraci kyseliny indolyl-3-octové (IAA) a zjištění, zda bakterie *Enterobacter cloacae* Cal2 může svým působením snižovat hladinu stresového etylénu v těchto řezaných květech. Domníváme se, že aplikace roztoku těchto bakterií může u řezaných rostlin oddálit dobu vadnutí.

Vyhodnocením fotografií květin ošetřených vodou a IAA dle určené stupnice vadnutí byl potvrzen předpoklad závislosti rychlosti senescence na použité koncentraci IAA (Malloch and Osborne, 1976). Tento závěr koresponduje s výsledky uvedené Novákovou (2003), která ve své práci použila kultivar Delistar Yellow. Oba kultivary však vykazují řadu odlišností.

Varieta Sunny euro má rychlejší průběh vadnutí a také morfologické projevy senescence se liší. Dle Novákové (2003) dochází u kultivaru Delistar Yellow k postupnému sklápění okvětních plátků. Podobný trend lze pozorovat i u variety Sunny euro, která však brzy reaguje i ohýbáním stonku. Při srovnání obou kultivarů je patrný rozdílný poměr velikosti květů a průměru stonku. Nicméně i Nováková ve své práci pozorovala stejně, jako v této práci rozdíl mezi chryzantémami stimulovanými k vadnutí různými koncentracemi IAA a sadami stejných koncentrací IAA za přítomnosti bakterií.

Vadnutí chryzantém ošetřených indolyl-3-octovou kyselinou (IAA) a bakteriálním kmenem *E. cloacae* Cal2 vykazovalo stejné morfologické projevy senescence jako při ošetření vodou a IAA, avšak přidané bakterie vadnutí oddalovaly. Trend je patrný zejména v nižších koncentracích IAA. 1-aminocyklopan-1-karboxylová kyselina je klíčovým meziproduktem biosyntetické dráhy etylénu, která je stimulována IAA, a proto existuje vztah mezi koncentrací endogenní IAA a následnou produkcí etylénu. Pokud je ovšem v roztoku přítomna i bakterie schopná štěpit ACC, snižuje se hladina vyvíjeného etylénu a vadnutí se oddaluje. Při velmi vysokých koncentracích IAA již ale bakterie nejsou schopny ACC

odebírat a květy vadnou úplně, však s určitým časovým zpožděním. Uvedené závěry jsou v souladu i s prací Janečkové (2004) na kultivaru Benny Jolink.

7.2 Měření produkce etylénu u řezaných květů chryzantémy

U všech dosud zkoumaných druhů rostlin je nárůst produkce etylénu první známkou biochemických pochodů spojených se stárnutím nebo se stresem rostlinného organismu (Woodson and Jones, 2003), a proto byla tato část práce zaměřena na detekci produkovaného etylénu a jeho následné možné snížení pomocí mikroorganismu *Enterobacter cloaceae* Cal2, který nese gen pro ACC deaminázu a je schopen využít 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu jako zdroj energie a tím snižovat hladinu tohoto plynného fytohormonu.

Hladina měřeného etylénu vykazovala plynulý nárůst v závislosti na použité koncentraci IAA u jednotlivých sad, což potvrzuje předpoklad, že IAA stimuluje ACC syntázu ke zvýšené tvorbě ACC (Glick et al., 1998). Dle očekávání byly nejvyšší hodnoty produkce etylénu zjištěny při největších koncentracích IAA v porovnání s negativní kontrolou (květy v destilované vodě), což je ve shodě s měřením produkce etylénu karafiátu *Dianthus* sp. Také byl prokázán rozdíl mezi karafiátem umístěným v destilované vodě a karafiátem stimulovaným IAA (Serano and Romojaro, 1991). Ovšem maximum produkce etylénu u chryzantémy bylo ve 2. dnu, kdežto u karafiátu byla maximální produkce posunuta do 5. dne.

Kinetika produkce etylénu vykazovala počátečný strmý nárůst, shodný u vyšších koncentrací IAA, který byl následován poklesem produkce. Tento trend je patrný u všech koncentrací, avšak jeho strmost a dosažené maximální hodnoty produkce jsou závislé na použité koncentraci IAA. Maximum produkce měřeného etylénu koresponduje s dosažením konečného stupně vadnutí. Ve vysokých koncentracích IAA bylo detekováno ještě i sekundární maximum, které je patrně způsobeno změnami pigmentového složení a změnami na buněčné úrovni díky působení stresu (Fukai et al, 2007). Tento jev nastává u karafiátu při zvýšené hladině etylénu během 3. až 4. dne po utržení a má za následek vzrůst viskozity lipidových membrán (John et al, 1982) a uvolnění karotenoidů, obsažených v květních plátcích, které jsou následně oxidovány a vzniká řada těkavých složek skreslujících samotné měření hladiny etylénu, protože mají stejný retenční čas jako etylén.

Při aplikaci bakteriálního kmene *Enterobacter cloaceae* Cal2 se podařilo prokázat účinnost jeho ACC deaminázy u všech koncentrací, a tím snížení hladiny etylénu, což znamenalo snížení stresu a oddálení senescence. Také se podařilo prokázat jeho translokaci od báze (tedy řezu) stonkem ke květu.

Při porovnání květu umístěného jen ve vodě (negativní kontroly) a květu umístěného ve vodě s bakteriální kulturou nebyla u sady s mikroorganismem naměřena produkce etylénu, což svědčí o mimořádné účinnosti ACC deaminázy přítomné bakterie. Naměřené hodnoty korelují se stanovenými stupni vadnutí.

Snížení hladiny etylénu pomocí ACCD u chryzantémy je důležité nejenom z hlediska fyziologického, ale především z hlediska jejího globálně-ekonomického významu na trhu s okrasnými květinami. Domníváme se, že PGPR by mohly nahradit užívání toxických inhibitorů vadnutí.

8. Závěr

- Byla zavedena a optimalizována metoda pro měření produkce etylénu u řezaných květů.
- Byly stanoveny optimální podmínky pro měření produkce etylénu u květů chryzantém.
- Byl stanoven průběh vadnutí řezaných květů v závislosti na koncentraci indoly-3-octové kyseliny (IAA).
- Byly porovnány naměřené produkce etylénu řezaných květů v závislosti na koncentraci IAA.
- Byla ověřena možnost snížení hladiny stresového etylénu u chryzantém pomocí Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).
- Byla stanovena rychlost translokace značené bakteriální kultury *Enterobacter cloacae* Cal2 stonkem chryzantémy.

9. Seznam citované literatury

- Abeles, F.B. Morgan, P.W. and Saltveit Jr., M.E. (1992): Ethylene in Plant Biology, 2nd ed. Academic Press, New York
- Akihisa, T. Franzblau, S.G. Ukiya, M. Okuda, H. Zhang, F. Yakusawa, K. Suzuki, T. Kimura, Y. (2005): Antitubercular activity of triterpenoids from *Asteraceae* flowers. Biol. Pharm. Bull. 28(1) 158-160
- Boase, M.R. Miller, R. and Delores, S.C. (1997): Chrysanthemum systematic, genetics and breeding. In: Plant breeding reviews. Edit. J Janick. Wiley, New York, 14: 321 – 361p.
- Boase, M. R. Bradley, J. M. Borst, N. K. (1998): Genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* of florists chrysanthemum (*Dendrathera grandiflorum*) cultivar “Peach Margaret.” In Vitro Cell. Dev Biol. 34: 46-51
- Capitani, G. McCarthy, D.L. Gut, H. Grütter, M.G. Kirsch, J.F. (2002): Apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in complex with the inhibitor L-aminoethoxyvinylglycin. J Biol Chem. 277 (51): 49735-49742
- Fujino, A. Ose, T. Yao, M. Tokiwano, T. Honma, M. Watanabe, N. Tanaka I. (2004): Structural and enzymatic properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase homologue from *Pyrococcus horikoshii*. J Mol Biol. 341(4): 999-1013
- Fukai, S. Goi, M. and Tanaka, M. (1991): Cryopreservation of shoot tips of *Chrysanthemum morifolium* and related species native to Japan. Euphytica 54:201-2004

- Fukai, S. Manabe, Y. Yangkhamman, P. and Takamura, T. (2007): Changes in pigment content and surface micro-morphology of in cut carnation flower petals under high-temperature conditions. *J Hort Sci Biotechnol.* 82(5): 769-775
- Glick B.R. (2005) Mini Review. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* 251: 1-7
- Glick, B.R. and Bashan, Y. (1997): Genetic manipulation of plant-growth promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopatogens. *Biotechnol Adv.* 15(2): 353-378
- Glick, B.R. Penrose, D.M. and Li, J. (1998): A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor. Biol.* 190(1):63-68
- Grichko V.P. and Glick B.R. (2001): Flooding tolerance of transgenic tomato plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase controlled by the 35S, *rolD* or *PRB-1b* promoter. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 19-25
- Grichko, V.P. Filby, B. and Glick, B.R. (2000): Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, P and Zn. *J Biotechnol.* 81(1): 45-53
- Hall, J.A. Peirson, D. Ghosh, S. and Glick, B.R. (1996): Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Izrael Journal of Plant Science*, 44: 37-42
- Hatanaka, T. Sawabe, E. Azuma, T. Naotsugu, U. and Yasuda, T. (1995): The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. *Plant. Sci.* 107: 199-204
- Holguin, G and Glick, B.R. (2001): Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb Ecol.* 41:281-288

- Honma, M. and Shimomura, T. (1978): Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1825-1831
- Hontzeas, N. Zoidakis, J. Glick, B.R., Abu-Omar, M.M. (2004): Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochim Biophys Acta.* 1703(1): 11-19
- Chae, H.S. and Kieber, J.J. (2005): Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 10(6): 291-296
- Chi, G.L. Barfield, D.G. Sim, G.E. and Pua, E.C. (1990): Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on in vitro shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Rep.* 9: 195-198
- Chraïbi, B.K.M. Latche, A. Roustan, J.P. and Fallot, J. (1991): Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by ethylene inhibitors, silver and kobalt. *Plant Cell Rep.* 10: 204-207
- Chernin, L. Ismailov, Z. Haran, S. and Chet, I. (1995): Chitinolytic enterobacter-agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 61(5): 1720-1726
- Janečková L. (2004): Sledování senescence u *Dendrathera grandiflora* produkty rhizobiálního genu ACCD a následná transformace; srovnání s ošetřením syntetickými inhibitory hladiny etylénu, bakalářská práce Biologická fakulta, Jihočeská univerzita
- John, E.T. Mayak, S. Shinitzky, M. and Halevy, A.H. (1982): Acceleration of membrane senescence in cut carnation flowers by treatment with ethylene. *Plant Physiol.* 69: 859-863

- Klee, H.J. Hayford, M.B. Kretzmer, K.A. Barry, G.F. and Kishore, G.M. (1991): Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell*. 3(11):1187-1193
- Kloepper, J.W. Lifshitz, R. Zablutowicz R.M. (1989): Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-43
- Knoester, M. van Loon, L.C. van den Heuvel, J. Bol, J.F. and Linthorst, H.J. (1998): Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(4): 1933-7
- Kumar, P.P. Reid, D.M. and Thorpe, T.A. (1987): The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pinus radiata* in vitro. *Physiol Plant*. 69: 244-252
- Kumar, P.P. Joy, R.W. and Thorpe, T.A. (1989): Ethylene and carbon dioxide accumulation, and growth of cell suspension cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J Plant Physiol*. 135: 592-596
- Li, N. Parsson, B.L. Liu, D. and Mattoo, A.K. (1991): Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant Mol Biol*. 18: 477-487
- Ma, Z. Baskin, T.I. Brown, K.M. and Lynch, J P. (2003b): Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. *Plant Physiol*. 131: 1381-1390
- Maier, G. Lautz, C. and Senger, S. (2000): Ring opening of 1-methylcyclopropene and cyclopropene: matrix infrared spectroscopic identification of 2-butene-1,3-diyl and propene-1,3-diyl. *Chemistry*. 6(8): 1467-1473
- Malloch, K.R. and Osborne, D.J. (1976): Auxin and ethylene control of growth in seedlings of *Zea mays* L. and *Avena sativa* L. *J Exp Bot*. 27(5): 992-1003

- Mayak, S. Tirosh, T. and Glick, B.R. (2004): Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Biochem.* 42(6): 565-572
- Nara, A. and Takeuchi, Y. (2002): Ethylene evolution from tobacco leaves irradiated with UV-B. *J Plant Res.* 115(4): 247-253
- Nie, L. Shah, S. Rashid, A. Burg, G.I. Dixon, D.G. and Glick B.R. (2002): Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 355-361
- Nováková, M. (2003): Ovlivnění hladiny etylénu transformací antisense ACCO a syntetickými inhibitory AVG a AgNO₃ u chryzantémy (*Dendrathera grandiflora* (Ramat.) Kitamura), bakalářská práce Biologická fakulta, Jihočeská univerzita
- Ose, T. Fujino, A. Yao, M. Watanabe, N. Honma, M. and Tanaka, I. (2003): Reaction intermediate structures of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: insight into PLP-dependent cyclopropane ring-opening reaction. *J Biol Chem.* 278(42): 41069-41076
- Patten, C.L. and Glick, B.R. (1996): Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol.* 42(3): 207-220
- Penrose, D.M. and Glick, B.R. (1997): Enzymes that regulate ethylene levels 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase, ACC synthase and ACC oxidase. *Indian J Exp Biol.* 35(1): 1-17
- Penrose, D.M. and Glick, B.R. (2001): Biochemical and genetic characteristics of ACC deaminases. *Ind J Microbiol.* 41:61-74
- Pua, E.C. Sim, G.E. Chi, G.L. and Kong, L.F. (1996): Synergistic effect of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese

radish (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* Bailey) in vitro. Plant Cell Rep 15(9): 685-690

- Purnhauser, L. Meclgyesi, P. Czako, M. Dix, P.J. & Marton L. (1987): Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. Tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. Plant Cell Rep. 6: 1-4
- Robinson, K.E.P. Firoozabady, E. (1993): Transformation of floriculture crops. Sci. Hortic. 55: 83-99
- Roustan, J.P. Latché, A. and Fallot, J. (1990): Control of carrot somatic embryogenesis by AgNO₃, an inhibitor of ethylene action: effect of arginine decarboxylase activity. Plant Sci, 67: 89-95
- Roxas, N.J.L. Tashiro, Y. Miyazaki, S. Isshiki, S. and Takeshita, A. (1995): Meiosis and pollen fertility in Higo chrysanthemum (*Dendratherma grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). J Jpn Soc Hortic Sci. 64:161-168
- Saleh-Lakha, S. Grichko, V.P. Sisler, E.C. and Glick, B. R. (2005): The effect of the 1-cyklopropenylmethyl butyl ether on early plant growth. J. Plant Growth Regulat. 23: 307-312
- Satoh, S and Young, S.F. (1989): Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by L-vinylglycin as related to the mechanism-based inactivation of the enzyme by S-adenosyl-L-methionine. Plant Physiol. 91(3): 1036-1039
- Serrano, M. and Romojaro, F. (1991): Ethylene and polyamine metabolism in climacteric and nonclimacteric carnation flowers. Hort Science 26(7): 894-896
- Shah, S. Li, J. Moffatt, B. A. and Glick, B.R. (1998): Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. Can J Microbiol. 44(9): 833-843

- Schwinn, K.E. Markham, K.R. and Given, N. K. (1994): Floral flavonoids and potential for pelargonidin biosynthesis in commercial chrysanthemum cultivars. *Phytochemistry* 35: 145-150
- Songstad, D.D. Duncan, D.R. and Wildholm, J.M. (1988): Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate and norbornadiene on plant regeneration from maize callus. *Plant Cell Rep.* 7: 262-265
- Stearns, J.C. and Glick, B.R. (2003): Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnol Adv.* 21(3): 193–210
- Steven, E.L. Desurmont, C. Elkins, R. McGourthy, G. Clark. E. and Brandl, M.T. (1998): Occurrence of indole-3-acetic acid-producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet *Amer Phytopathol Soc.* 88(11): 1149-1157
- Stepanova, A.N. and Ecker, J.E. (2000): Ethylene signalling: from mutants to molecules. *Curr Opin Plant Biol.* 3(5): 353-360
- Taiz, L and Zeiger, E. (1991): *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Comp., Inc., Redwood City
- Teixeira da Silva, J. A. (2003): *Chrysanthemum*: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 21: 715-766
- Trehane, P. (1995): Proposal to conserve *Chrysanthemum* L with conserved type (Compositae). *Taxon*, 44: 439-441
- Woodson, W.R. and Jones, M.L. (2003): In search of eternal youth: The delay of postharvest senescence in flowers. *Acta Hort.* 624
- Young, T.E. Meeley, R.B. Galie, D.R. (2004): ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. *Plant J.* 40(5): 813-825

- Zhang, Ch. and Wu, J. (2003): Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus* spp. *Cells. Enzyme Microb. Technik.* 32: 71-77