

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra Botaniky



**VLIV RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ NA DEFOLIACI
BAVLNÍKU**

Diplomová práce

LENKA ŠŤASTNÁ

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie pro víceoborové studium – biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala sama a že uvádím veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne

podpis:.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Jaromíru Mikulíkovi, Ph.D. a Mgr. Lukášovi Spíchalovi, Ph.D. za cenné rady a ochotu pomoci během vypracovávání mé diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Lenka Šťastná

Název práce: Vliv růstových regulátorů na defoliaci bavlníku.

Typ práce: diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky

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

Rok obhajoby práce: 2012

Souhrn: Během magisterského studia byla v období od 12.10. 2010 do 5.5. 2012 zpracována tato diplomová práce, jejímž obsahem jsou dvě hlavní části. Teoretická část, která obsahuje literární rešerši na dané téma- Fytohormony. Kromě detailně zpracovaných auxinů, cytokininů, ethylenu a brassinosteroidů také zachycuje téma vlivu brassinosteroidů, auxinů a cytokininů na produkci ethylenu. V závěru této části je popsán bavlník a látky používané na defoliaci bavlníku. V praktické části jsou podrobně zpracovány výsledky z měření. Byly testovány samostatné auxiny, cytokininy, brassinosteroidy, ale také jejich kombinace na defoliaci bavlníku. Defoliace se uplatňuje při mechanickém sběru bavlníkových tobolek na plantážích.

Klíčová slova: auxiny, brassinosteroidy, cytokininy, ethylen, bavlník bylinný (*G. herbaceum*), defoliace, TDZ

Počet stran: 82

Počet příloh: 1

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Lenka Šťastná

Title: The effect of growth regulators on cotton defoliation.

Type of thesis: diploma thesis

Department: Department of botany

Supervisor: Ing. Jaromír Mikulík, Ph.D.

The year of presentation: 2012

Summary: This diploma thesis was elaborated in the period from 12.10.2010 till 5.5.2012 during my master's degree study. The thesis contains two main parts. Theoretical part, which contains literary research about phytohormones. Except for auxins, cytokinins, ethylen and brassinosteroids which were elaborated in detail, there is also description of influence of brassinosteroids, auxins and cytokinins on ethylen production. At the end of this part there is description of cotton-plant and substances used for cotton-plant defoliation. In practical part there are thoroughly elaborated results from measurement. The subject of testing was individual effect of auxins, cytokinins, brasisinosteroids and their combinations on cotton-plant defoliation. The defoliation is used for mechanical gathering of cotton-plant pods at plantations.

Keywords: auxins, brassinosteroids, cytokinins, ethylen, cotton-plant (G.herbaceum), defoliation, TDZ

Number of pages: 82

Number of appendices: 1

Language: Czech

Obsah

1	Seznam použitých zkratek	8
2	Cíle práce	10
3	Úvod	11
4	Teoretická část	12
4.1	Fytohormony	12
4.1.1	Auxiny	13
4.1.1.1	Objev auxinů	13
4.1.1.2	Chemická struktura auxinů	13
4.1.1.3	Výskyt a transport auxinů	14
4.1.1.4	Metabolismus a biosyntéza IAA	15
4.1.1.5	Hlavní fyziologické účinky auxinů	16
4.1.1.6	Využití auxinů	17
4.1.2	Cytokininy	19
4.1.2.1	Objev cytokininů	19
4.1.2.2	Struktura cytokininů	19
4.1.2.3	Výskyt a transport cytokininů	20
4.1.2.4	Metabolismus a biosyntéza cytokininů	21
4.1.2.5	Přenos signálu	22
4.1.2.6	Hlavní fyziologické funkce cytokininů	22
4.1.2.7	Využití cytokininů	24
4.1.3	Ethylen	25
4.1.3.1	Objev ethylenu	25
4.1.3.2	Struktura ethylenu	25
4.1.3.3	Výskyt a transport ethylenu	26
4.1.3.4	Metabolismus a biosyntéza ethylenu	26
4.1.3.5	Přenos signálu	28
4.1.3.6	Hlavní fyziologické funkce ethylenu	28
4.1.3.7	Využití ethylenu	29
4.1.4	Další látky fytohormonální povahy	29
4.1.4.1	Brassinosteroidy	29
4.2	Vliv brassinosteroidů, auxinů a cytokininů na produkci ethylenu	32
4.3	Bavlník (Gossypium)	33

4.3.1	Zařazení do systému	33
4.3.2	Historie	33
4.3.3	Popis rostliny	33
4.3.4	Pěstování bavlny a její zpracování	34
4.3.5	Škůdci	34
4.3.6	Využití	35
4.3.7	Životní cyklus	36
4.4	Látky používané při defoliaci bavlníku	39
5	Experimentální část	41
5.1	Pomůcky a chemikálie	41
5.1.1	Pomůcky	41
5.1.2	Chemikálie	41
5.2	Rostlinný materiál	43
5.3	Metodika	43
5.3.1	Příprava kontroly	43
5.3.2	Příprava roztoků testovaných látek na postřik bavlníku	44
5.3.3	Aplikace látek	45
5.3.4	Optimalizace rozpustnosti látky LGR-951	45
5.4	Výsledky	47
5.4.1	Použité látky cytokininové povahy	47
5.4.2	Samostatně aplikované růstové regulátory	50
5.4.3	Kombinace 2 růstových regulátorů	58
5.4.4	Kombinace 3 růstových regulátorů	69
5.5	Diskuse	72
6	Závěr	74
7	Příloha	75
8	Seznam obrázků	76
9	Seznam tabulek	77
10	Seznam grafů	78
11	Seznam použité literatury	79

1 Seznam použitých zkratek

ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
ADP	adenosindifosfát
AdoMet	S-adenozylmethionin
AOA	aminooxyoctová kyselina
AMP	adenosinmonofosfát
AtIPT	isopentenyltransferáza u <i>Arabidopsis t.</i>
ATP	adenosintrifosfát
AVG	aminoethoxyvinylglycin
BAP	N6-benzylaminopurin
CCC	chlorcholin chlorid
CEPA	kyselina 2-chlorethylfosfonová
cZ	<i>cis</i> -zeatin
cZR	<i>cis</i> -zeatin ribosid
DMAPP	dimethylallyl difosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ETR1	ethylene resistant
EtOH	ethanol
GACC	1-(L-glutamylamino)cyclopropan-1-karboxylová kyselina
His	histidin
HK	histidine kinase
HMBDP	(<i>E</i>)-4-hydroxy-3-metyl-but-2-enyl difosfát
HP	histidin-fosfotransferový protein
IAA	kyselina indol-3-octová
IAAH	nedisociovaná kyselina indol-3-octová
IAN	indolylacetaldoximová dráha
IBA	kyselina indolyl-3-máselná
IPA	indolylpyruvátová dráha
iP	N6-isopentenyldenin
iPR	isopentenyldenin ribosid
iPRDP	isopentenyldenin ribosid 5'-difosfát
iPRDP	isopentenyldenin ribosid 5'- difosfát

iPRMP	isopentenyladenin ribosid 5'-monofosfát
iPRMP	isopentenyribosid 5'-monofosfát
iPRTP	isopentenyladenin ribosid 5'-trifosfát
iPRTP	isopentenyribosid 5'-trifosfát
ITP	isopentetyltransferáza
LOG	lonely guy (enzym: 5'-monofosfát fosforibohydroláza)
MACC	N-malony-ACC
MCPP	2-(2-methyl-4-chlorfenoxo)propionová kyselina
MCPA	2-methyl-4-chlorfenoxyoctová kyselina
MHDAR	monodehydroaskorbát reduktáza
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAA	α -naftyloctová kyselina
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát-redukovaná forma
PAA	kyselina fenylloctová
RR	regulátor odpovědi
TAM	tryptaminová dráha
TDZ	thidiazuron
Tmr	tumor morphology root
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
tZRDP	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-difosfát
tZRMP	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-monofosfát
tZRTP	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-trifosfát
Tzs	<i>trans</i> -zeatin synthesizing
2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
4-Cl-IAA	4-chlorindolyl-3-octová kyselina

2 Cíle práce

Za hlavní cíle diplomové práce bylo stanoveno:

1. Shromáždit dostupné zdroje a vypracovat literární rešerši na dané téma.
2. Otestovat vybrané růstové regulátory a jejich kombinace na defoliaci bavlníku.
3. Shrnout získané výsledky do diplomové práce.

3 Úvod

Hlavním úkolem této diplomové práce je zpracování literární rešerše na dané téma, testování látek *in vivo* a stanovení jejich účinku na defoliaci bavlníku. Diplomová práce je rozdělena na dvě hlavní části.

Teoretická část zahrnuje podrobné zpracování důležitých fytohormonů. Má práce je zaměřena na auxiny, cytokininy a brassinosteroidy, jelikož jsou testovány. Dále je v této části rozpracován ethylen. Je to nejjednodušší, dosud známý fytohormon. Ačkoliv je jeho struktura velice jednoduchá, účastní se u rostlin různých vývojových procesů, ať už jde o stárnutí nebo o opad lisů. Produkci ethylenu mohou stimulovat právě auxiny, cytokininy, brassinosteroidy aj. Ve skutečnosti bylo zjištěno, že celá řada reakcí, které byly kdysi přiřazovány právě auxinům, nastala díky ethylenu. Závěr této části se věnuje samotnému bavlníku a látkám využívaných při jeho defoliaci. Bavlník patří mezi jednu z nejstarších, ale nejvýznamnějších rostlin. Je hojně využíván nejen pro tvorbu přadných vláken, která se využívají v textilním průmyslu, ale i pro jeho semena, která obsahují olej a využívají se v potravinářství. Nejvyšší kvalita bavlny pochází z Číny, jelikož se zde využívá stále ruční sklizeň. Ve většině zemí se ovšem využívá sklizeň mechanická, kde je nutné nejdříve odstranit listy, které ztěžují čištění bavlny. Při defoliaci bavlníku se využívá celá řada látek, které mohou být různě kombinovány. Mezi známé defolianty patří např. Harvade 57, Folex Finish aj. Součástí těchto látek je dimethipin, tribufos, ethephon, thidiazuron aj., řadí se mezi cytokininy.

V praktické části jsou podrobně zpracovány výsledky všech látek aplikovaných na bavlník za účelem jeho defoliaci. Vše je zaznamenáno do grafů a tabulek a dokumentováno fotkami. Byly aplikovány auxiny, cytokininy, brassinosteroidy, ale i jejich kombinace. Úkolem této diplomové práce je tedy testování látek *in vivo* a stanovení jejich účinku na defoliaci bavlníku.

4 Teoretická část

4.1 Fytohormony

Fytohormony, nebo-li rostlinné hormony, patří mezi organické nízkomolekulární sloučeniny. Mnohdy bývají nazývány růstovými látkami nebo-li růstovými regulátory. Jejich působení se netýká jen regulace růstu a vývoje, ale i jiných procesů.

Fytohormony jsou přírodní látky, které působí v místě svého vzniku nebo i v jiných částech rostliny, do kterých jsou transportovány. Transport je uskutečněn 2-ma cestami a to buď vodivými drahami na dlouhé vzdálenosti nebo buněčným transportem na krátké vzdálenosti.

Rostlinné hormony mají funkci regulačních signálů. Nejprve se vážou na receptor umístěný na membráně a signál je dále přenášen do buňky systémem druhých posílů (*second messenger*) nebo dochází k přímému pronikání do buňky, kde se váží na rozpustný receptor v cytoplazmě. Dochází tedy ke vzniku komplexu, který dále proniká do buněčného jádra a zde vyvolá změnu v expresi některých genů nebo změnu transmembránového transportu. Zjednodušeně řečeno působí jako přenašeče signálu z vnějšího prostředí do rostliny.

Známe pět základních typů fytohormonů, které jsou v rostlinách přítomny ve velmi nízkých koncentracích (10^{-6} - 10^{-9} M i nižší) a při kterých také působí. Patří mezi ně auxiny, gibbereliny, cytokininy, kyselina abscisová a ethylen. V posledních letech byly do skupiny fytohormonů zařazeny i další látky s růstově regulačním působením, ale jsou méně známé a méně prozkoumané. Řadíme sem brassinosteroidy, kyselinu jasmonovou, polyaminy, oligosacharidy a fenolické látky (Šťastná, 2010).

4.1.1 Auxiny

4.1.1.1 Objev auxinů

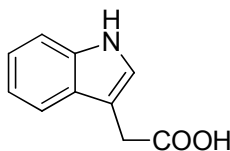
Název auxin pochází z řeckého slova „*auxein*“, což znamená růst. Auxiny patří mezi nejdéle známé rostlinné hormony. Poprvé byly objeveny na konci 19.století Charlesem Darwinem při studiu fototropizmu a gravitropizmu. Studoval reakci koleoptile na světlo (Nováček, 1986). V roce 1926 se holandskému fyziologovi F.W.Wentovi podařilo vysvětlit hlavní podstatu fototropizmu. Prokázal, že špičky koleoptilí ovsu produkují látku, která stimuluje prodlužovací růst. Struktura této látky byla zjištěna ve 30.letech 19.století v lidské moči a byla nazvána heteroauxinem a identifikována jako kyselina indolyl-3-octová (IAA) (Pastýrik, 1979 ; Kincl et al., 2000).

4.1.1.2 Chemická struktura auxinů

Mezi nejznámější přirozeně se vyskytující auxiny patří kyselina indolyl-3-octová (IAA) (obr.č.1). V poslední době byly v rostlinách objeveny další přirozeně vyskytující se auxiny, mezi které patří kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina 4-chlorindolyl-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenyl-octová (PAA).

Podmínkou biologické aktivity auxinů je přítomnost aromatického kruhového systému, v jehož postranním řetězci je umístěna karboxylová skupina nebo skupina, která se velice snadno převádí na karboxylovou skupinu.

Byla nalezena celá řada synteticky připravených derivátů auxinů. Jsou to slabé organické kyseliny. Podmínkou syntetických auxinů je výskyt alespoň jednoho uhlíkového nebo kyslíkového atomu mezi aromatickým kruhem a karboxylovou skupinou. Strukturních analogů je celá řada, ale mezi nejznámější patří např. kyselina α -naftyl-octová (NAA) (Pavlová, 2005).



IAA

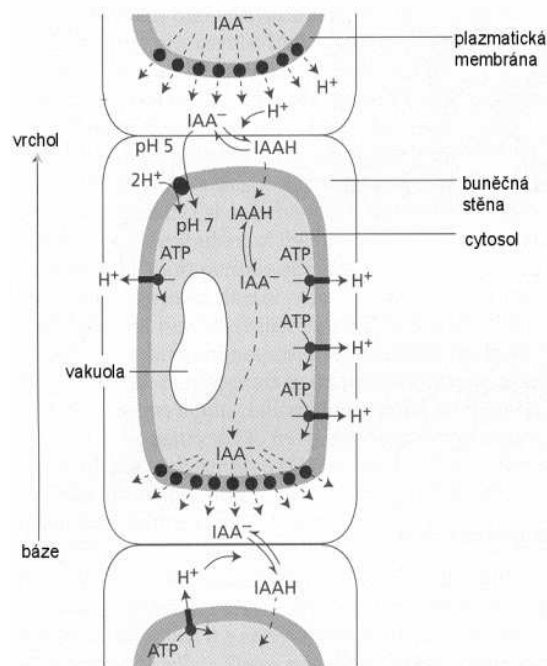
Obrázek 1: Kyselina indolyl-3-octová (IAA) (převzato: <http://en.wikipedia.org>)

4.1.1.3 Výskyt a transport auxinů

IAA je syntetizována ve vrcholu koleoptile a nejčastěji je transportována od apexu k bázi, tedy bazipetálně. Tvoří se také v mladých listech, vyvíjejících se květech i plodech, v semenech, v apikálním meristému stonku, v embryích a v meristémech kořene. IAA je nejvíce obsažena v mladých a především intenzivně rostoucích orgánech. Čím je rostlina a její orgány starší, tím množství IAA výrazně klesá. Obsah IAA je také ovlivňován vnějším prostředím, především zářením.

Transport auxinů je specificky aktivní proces, který vyžaduje energii. Je uskutečňován 2-ma způsoby. Jedním z nich je transport na krátké vzdálenosti a tím druhým je transport na dlouhé vzdálenosti. K transportu na dlouhé vzdálenosti dochází floémem pasivně spolu s asimiláty. Auxiny jsou dále transportovány z vodivých pletiv až do vnějších vrstev kůry a epidermis. Zvláštní význam má polární aktivní transport parenchymem. Auxiny jsou jediné hormony, které jsou transportovány mezi buňkami polárně, ve stonku bazipetálně a v kořeni akropetálně. Rychlost polárního transportu je asi 100x pomalejší než pasivní transport.

Polární transport auxinů vysvětluje nejlépe chemiosmotický model. Závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech auxinů a na komponentech buňky, především na polární struktuře, kterou je auxin transportován. V buněčné stěně je kyselé prostředí a nachází se zde nedisociovaný auxin (IAAH). V této formě velice snadno prochází lipidní cytoplazmatickou membránou do cytoplazmy. Jelikož je cytoplazma alkaličtější, dochází zde k disociaci slabé kyseliny na IAA^- a H^+ . Iony IAA^- jsou hydrofilní, a tak nemohou lipidní membránou procházet ven z buňky. Auxin, který se pohybuje apoplastem ve směru koncentračního spádu by se hromadil v buňce, ale nachází se zde velice důležití přenašeči, kteří vytlačují ionty IAA^- přes membránu v buněčné stěně. Přenašeči patří mezi látky bílkovinné povahy (obr.č.2) (Kováč, 1991 ; Procházka et al., 1998).



Obrázek 2: Schéma polárního transportu auxinů (převzato: <http://kfr.pf.jcu.cz>)

4.1.1.4 Metabolismus a biosyntéza IAA

Biosyntéza IAA probíhá několika cestami, které vycházejí z aminokyseliny L-tryptofanu. Syntéza tryptofanu existuje u rostlin ve třech verzích a u bakterií v jedné verzi. U rostlin se nejčastěji setkáváme s indolylpyruvátovou dráhou (IPA), dále s tryptaminovou dráhou (TAM) a indolylacetaldoximovou dráhou (IAN).

U patogenních bakterií byla nalezena bakteriální cesta. Průběh cesty zahrnuje dva enzymy. Jedním z nich je tryptofanmonoxygenasa a druhým je indol-3-acetamidhydrolasa. Vyskytuje se u *Agrobacterium tumefaciens* a u *Pseudomonas savastanoi*.

TAM dráha začíná dekarboxylací tryptofanu na tryptamin. Tryptamin je příslušnou aminooxidázou převeden na indolylacetaldehyd, který je oxidován na IAA. Tryptaminová dráha se nejčastěji vyskytuje u čeledi *Poaceae*.

IPA dráha se nachází u rostlin, které postrádají TAM dráhu. Výjimkou je *Solanum*. Zde fungují obě cesty zároveň. Tryptofan je transaminován na indolylpyrohroznovou kyselinu, která je poté dekarboxylována na indolylacetaldehyd, který je oxidován na IAA.

IAN dráha (glukobrassicinová) je známa u čeledí *Brassicaceae*, *Tovariaceae* a *Resedaceae*. U těchto čeledí se vyskytuje glukobrassicin, který je štěpen na indolylacetaldoxim, dále přechází na indolylacetonitril, který je oxidován na IAA. IAN

dráha byla nalezena i u *Fabaceae*, *Cucurbitaceae* a *Rosaceae*, což naznačuje možný výskyt i u dalších čeledí (Normanly, 1995 ; Procházka *et al.*, 1998).

4.1.1.5 Hlavní fyziologické účinky auxinů

Prodlužovací růst

Stimulace dlouhivého růstu patří mezi nejlépe prostudované účinky auxinů. Auxiny indukují dlouhivý růst v nadzemních částech (stonek) v rozmezí koncentrací 10^{-7} – 10^{-5} mol l⁻¹, kdežto u kořenů je to o 1-2 řády nižší. Koncentrace, která stimuluje růst stonku, naopak inhibuje dlouhivý růst kořenů, jelikož dochází ke zvýšení tvorby ethylenu. S růstovou stimulací také souvisí úloha auxinů v regulaci tropizmů (gravitropismus, fototropismus). Tropizmy, nebo-li ohyby rostlin, vyvolává nerovnoměrná distribuce auxinů, která je způsobena špatnou gravitací nebo jednostranným osvětlením (Procházka *et al.*, 1998).

Apikální dominance

Polární transport auxinů je velice důležitý pro regulaci apikální dominance. Apikální dominancí rozumíme potlačení růstu úžlabních pupenů rostoucím vrcholovým pupenem. Z vrcholové části hlavního stonku vystupují účinky inhibující vývoj postranních pupenů a z nich rostoucích větví. Při odstranění vrcholu dochází k růstu postranních pupenů. Pokud naneseme na řeznou plochu některý z auxinů, postranní pupeny zůstanou dále inhibovány. Podle posledních výzkumů mají auxiny jen nepřímý účinek. Předpokládá se, že auxiny indukují tvorbu ethylenu v postranních pupenech a ethylen se tak stává skutečným inhibátorem růstu.

Buněčné dělení v kambiu

Auxiny patří mezi látky, které stimulují aktivitu kambia. Tento účinek je velice důležitý v jarním období u opadavých stromů. Dochází ke vzniku deuterofloému a deuterofloému. Látky, které podporují dělení kambia včetně auxinů, jsou vedeny k rašícím pupenům, do větví, kmene a na konec do kořene (Nováček, 1990).

Buněčné dělení a tvorba kořenů

Auxiny stimulují tvorbu adventivních a postranních kořenů vycházející z určitých „center“ buněčného dělení, které jsou umístěny v pericyklu. Auxiny se tedy používají k zakořeňování řízků.

Opad listů a plodů

Auxiny inhibují proces opadu listů a plodů, který nastává na konci vegetačního období. Buňky vyskytující se v opadavé zóně jsou živé do té doby, dokud probíhá aktivní transport auxinů. Pokud dojde k jeho přerušení, nastává proces rozkladu a list či plod opadá. V praxi se uměle vytvořené auxiny využívají k řízenému opadu přebytečných plodů a k defoliaci listů.

Partenokarpie

Partenokarpie znamená vývoj plodů bez oplození. Právě auxiny tento proces podporují a nejčastěji se tohoto jevu využívá u rajčat, jablek a okurek (Hess *et al.*, 1983).

4.1.1.6 Využití auxinů

Jelikož je IAA pro praktické účely velice nestálá, používají se především syntetické auxiny. Zahrádkáři a zemědělci využívají auxiny již přes 50 let. V zahradnictví se uplatňují při zakořeňování řízků, množení rostlin, lze je také použít jako prevenci a indukci opadu listů, plodů i partenokarpních plodů. Společně s cytokininy jsou základní složkou médií pro tkáňové kultury.

Syntetické auxiny se používají jako herbicidy. Dochází k narušení fytohormonální hladiny v důsledku aplikace růstových herbicidů. Tyto účinné látky indukují syntézu 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACC), což vyvolá hromadění kyseliny abscisové a tvorbu velkého množství ethylenu. Rostliny na vzniklou situaci reagují uzavřením průduchů, čímž dojde k snížení transpirace a příjmu CO₂. Růstové herbicidy jsou velice rychle přijímány listy a dále jsou rozváděny floémem do pletiv s vysokou růstovou aktivitou. Vliv herbicidů na rostlinu se projevuje růstovými a reprodukčními anomáliemi (kroucení listů a lodyh, deformace listů, prodlužování listů a jejich abnormální růst, zakrňování růstu kořene aj.). Nakonec se objevují chlorózy vegetačního vrcholu, vadnutí a různé nekrózy. U stromů může dojít k praskání kůry. Mezi nejčastěji používané látky auxinoidní povahy patří MCPA (2-methyl-4-chlorfenoxyoctová kyselina),

MCPP (2-(2-methyl-4-chlorfenoxy)propionová kyselina), 2,4-D (2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina), dicamba, fluroxypyr, aminopyralid a clopyralid (tab.1) (Jursík, 2011).

Tabulka 1: Členění růstových herbicidů do chemických skupin (převzato: (Jursík, 2011)).

Chemická skupina	Účinná látka	Obchodní název přípravku
Fenoxykyseliny	2,4-D MCPA MCPB MCP-P 2,4-D-P	Dicopur D, Mustang Agritox, Aminex, Bofix Butoxone, Tropotox Duplosan KV, Optica Duplosan DP
Benzoové kyseliny	Dicamba	Banvel, Cambio, Arrat
Pyridin-karboxylové kyseliny	Picloram clopyralid aminopyralid fluroxypyr triclopyr	Galera Lontrel, Galera, Cliophar Hurricane, Galera Podzim Starane, Tomigan Garlon
Chinolin-karboxylové kyseliny	quinmerac	Flirt, Butisan Star

4.1.2 Cytokininy

4.1.2.1 Objev cytokininů

První cytokininy byly objeveny v 50. letech 19. století díky jejich schopnosti vyvolávat buněčné dělení.

V roce 1941 bylo zjištěno, že tekutý endosperm z kokosového ořechu je schopen vyvolat buněčné dělení v embryích pěstovaných na umělých půdách. Tento jev objevil Johannes van Overbeek. Pokusy s kokosovým mlékem (*Cocos nucifera*) prováděl i Steward a jeho spolupracovníci. Zjistili, že kokosové mléko podporuje buněčné dělení i v tkáňových kulturách. Ve většině případů bylo nutné kombinovat mléko s jinou růstovou látkou, jako je např. IAA nebo 2,4-D (Šťastná, 2010).

Skutečný pokrok v objevu cytokininů vzešel z explantace dřeně stonků tabáku (*Nicotina tabacum*). Skoog a jeho spolupracovníci testovali na tkáňové kultuře z tabáku staré nebo autoklávováním narušené vzorky DNA z kvasinek a sperma sledů. Na základě těchto pokusů bylo stanoveno, že autoklávovaná DNA sledě a kvasinek mají vliv na buněčné dělení. Byl tedy identifikován první cytokinin, jehož chemická struktura byla 6-furfurylaminopurin a v roce 1955 byl navrhnout triviální název kinetin (Amasino, R., 2005).

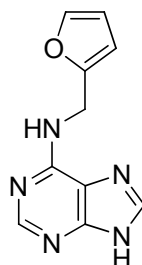
První přirozený cytokinin byl izolován z nezralých obilok kukuřice (*Zea mays*), odtud tedy název zeatin. Byl objeven v roce 1964 D.S. Lethamem a o 9 let později byl izolován také z kokosového mléka. Později byly objeveny další přirozené cytokininy, např. dihydrozeatin a isopentenyladenosin (Šťastná, 2010).

4.1.2.2 Struktura cytokininů

V současné době je známo více jak 30 přirozeně vyskytujících se cytokininů. Podle chemické struktury je můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou deriváty adeninu a tou druhou jsou deriváty močoviny a thiomčoviny. Přirozené cytokininy vychází z adeninu substituovaného na aminoskupině v poloze N-6, tato konfigurace je podmínkou biologické aktivity. Do této skupiny řadíme 2 základní podskupiny, které jsou podle charakteru postranního řetězce označovány jako isoprenoidní a aromatické. Uvnitř těchto podskupin můžeme najít různé deriváty volných bází, ribosidů a nukleotidů, až po N-glukosidy, popřípadě O-glukosidy a konjugáty s aminoskupinami. Strukturní rozdílnost má za následek jejich různou biologickou aktivitu. Látky, které mají jako substituent v poloze N-6 isoprenoidní řetězec s dvojnou vazbou, vykazují nejvyšší

biologickou aktivitu. Patří mezi ně např. zeatin, dihydrozeatin aj. Snížení aktivity nastává navázáním ribózy v poloze N-9, tyto látky nazýváme ribosidy. Pokud navážeme kyselinu fosforečnou v poloze 5 na ribózu, vzniknou nám ribotidy a zároveň dojde k dalšímu snížení aktivity. Modifikace adeninového skeletu nebo změna počtu atomů uhlíku v postraním řetězci způsobí velké snížení až ztrátu biologické aktivity. Velice nízká aktivita se vyskytuje také u látek, které mají v poloze N-6 aromatické jádro (benzyladenin) nebo mají v poloze orto či meta navázané hydroxylové skupiny (Tarkowski et al., 2004 ; Procházka et al., 1998).

Mezi nejčastěji experimentálně využívané cytokininy patří 6-furfurylaminopurin (kinetin) (obr.č.3) a 6-benzylaminopurin (BAP) (Pavlová, 2005).



kinetin

Obrázek 3: Kinetin (převzato: <http://www.mbio.au.dk>)

4.1.2.3 Výskyt a transport cytokininů

Nejvyšší hladiny cytokininů se nachází v intenzivně rostoucích a dělících se pletivech (kořeny, embrya, mladé listy a plody).

Hlavním místem biosyntézy cytokininů jsou vzrostlé vrcholy kořenů, odtud jsou transportovány xylémem do nadzemních částí rostliny, především do listů. V listech cytokininy přecházejí do floému a odtud mohou být transportovány do jiných orgánů. Transport cytokininů v xylému a floému je za účasti fytochromu fotoperiodicky regulován. Některé části rostliny se mohou stát autonomní a cytokininy jsou schopny produkovat samy. Koncentrace cytokininů je ovlivňována i dalšími hormony, jelikož vyšší hladiny auxinů a ethylenu potlačují hromadění cytokininů. Jsou součástí některých molekul tRNA (Šťastná, 2010).

4.1.2.4 Metabolismus a biosyntéza cytokininů

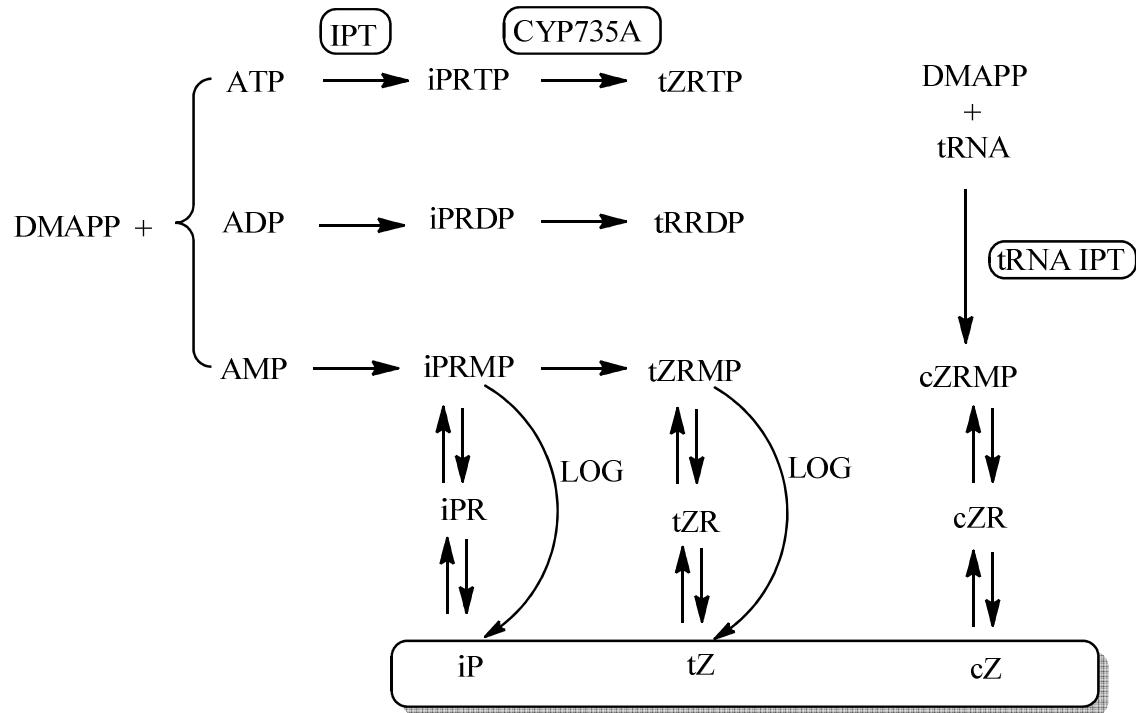
Cytokinininy se v rostlinách nevyskytují pouze jako volné sloučeniny, ale jsou součástí i některých tRNA molekul, a to vždy vedle 3'-konce antikodonu. Tyto tRNA vznikají přenesením isopentenylového řetězce a následnou hydroxylací za vzniku *cis*-zeatinu (cZ) a to vše na úrovni polynukleotidu. Pro tuto změnu se tRNA nepokládají za významný zdroj aktivních cytokininů. Nesmíme však biosyntézu tRNA cytokininů opomenout, jelikož kukuřice a rýže obsahuje značné množství cZ (Sakakibara *et al.*, 2006 ; Procházka *et al.*, 1998).

Biosyntézy volných cytokininů se účastní IPT geny. První charakteristika IPT genů byla provedena v půdní bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Tato bakterie má 2 IPT geny- Tmr a Tzs. IPT geny byly později identifikovány také u vyšších rostlin, např. u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), petunie a chmelu. V genomu *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno 9 genů kódujících IPT, které jsou velice podobné IPT genům *Agrobacterium tumefaciens*. Značíme je AtIPT1 až AtIPT9. Z fyziologického hlediska je dělíme na dvě základní skupiny. Do první skupiny řadíme AtIPT2 a AtIPT9 a do druhé skupiny patří AtIPT1 a AtIPT3 až AtIPT8 (Sakakibara *et al.*, 2004). V posledních letech bylo identifikována 7 IPT genů v rýži a 9 IPT genů v kukuřici seté (*Zea mays*) (Zalabák *et al.*, 2011).

Biosyntéza volných cytokininů u mikroorganismů (*Agrobacterium tumefaciens*) vychází z adeninmonofosfátu (AMP) a u vyšších rostlin z adenindifosfátu (ADP) nebo adenintrifosfátu (ATP). Jako katalyzátor v biosyntéze volných cytokininů působí isopentenyltransferáza (IPT). Prvním krokem biosyntézy cytokininů je N-prenylace adenosin-5'-fosfátu (AMP, ADP, ATP) na N6 konci s dimethyldifosfátem (DMAPP) nebo s hydroxymethylbutenyl-difosfátem (HMBDP). Tyto reakce jsou katalyzovány enzymem IPT za vzniku iP nukleotidů (iPRMT, iPRDP, iPRTP), které lze převést na odpovídající *trans*-zeatin (tZ) nukleotidy pomocí enzymu CYP735A. Rostlinné IPT geny preferují při biosyntéze spíše ADP a ATP, jakožto příjemce prenylové skupiny, kterou poskytuje preferenčně využívaná molekula DMAPP (obr.č.4) (Sakakibara *et al.*, 2006 ; Werner *et al.*, 2009).

Metabolismus cytokininů je založen na vzájemné přeměně cytokininů. Probíhá ve čtyřech základních typech reakcí. Patří mezi ně vratná přeměna bází na ribozidy a ribotidy, vratná O-glykosylace nebo acetylace postranního řetězce, N-glykosylace

purinu a konjugace alaninem v poloze N9 a nakonec vratná redukce postranního řetězce (Šťastná, 2010).



Obrázek 4: Biosyntéza cytokininů (převzato: (Werner, 2009)).

4.1.2.5 Přenos signálu cytokininů

Přenos signálu cytokininů je zajištěn vazebnými místy, kterými jsou receptory. Jedním prokázaným receptorem je CRE1 protein. Má funkci dvousložkové histidinové kinázy a je i integrálním proteinem plazmatické membrány (Šťastná, 2010).

Přenos signálu je způsoben dvoukomponentní signální drahou. Signál předávají receptorové kinázy na fosfotransferové proteiny (HP), které dále fosforylují konečné regulátory (RR), které následně ovlivňují expresi příslušných genů. Jedním z nejčastějších modelových příkladů je *Arabidopsis thaliana*, která má tři HK (histidinové kinázy), pět HP a 23 RR (Higuchi *et al.*, 2004).

4.1.2.6 Hlavní fyziologické funkce cytokininů

Cytokininy se vyznačují širokým spektrem účinků. Mezi hlavní funkce patří stimulace buněčného dělení, regenerace orgánů, zpomalování stárnutí listů, dormance semen, apikální dominance a aktivace enzymů aj. (Šťastná, 2010).

Buněčné dělení

Aktivace cytogeneze nebo-li buněčného dělení patří mezi nejvýznamnější účinky cytokininů. Odtud získaly také pojmenování (Kincl *a kol.*, 2000). Nejvyšší koncentrace cytokininů nacházíme v intenzivně dělicích se pletivech. V těchto místech nastává urychlení tvorby DNA (Šťastná, 2010).

Regenerace orgánů

Interakce cytokininů s auxiny je základem regeneračních procesů *in vitro* a samozřejmě i *in vivo* při poranění rostlin. Poměr auxinů a cytokininů je velice důležitý, jelikož rozhoduje o průběhu regenerace. Pokud je poměr vyrovnaný, tvoří se kalus. Převažují-li cytokininy, tvoří se kalus a regeneruje se prýt. Nadbytek auxinů vede ke vzniku kalusu a zároveň dochází k regeneraci kořenů. Správnými změnami média můžeme docílit regenerace celé rostliny (Šťastná, 2010).

Habituace buněk vůči cytokininům

Většina rostlinných pletiv po explantaci potřebuje k dalšímu dělení a růstu přítomnost cytokininů v médiu. Existují však výjimky. Některé typy kultur jsou schopny dále růst bez přidaných cytokininů. Tomuto jevu říkáme habituace. Podstatou habituace je autoindukivní působení cytokininů, které je způsobeno přítomností cytokininů v médiu. Habituace nejspíš probíhá i v intaktních rostlinách (Šťastná, 2010).

Apikální dominance

V tomto případě cytokininy působí jako antagonisté auxinů a potlačují apikální dominanci. Vlivem cytokininů dochází ke stimulaci větvení stonku a důsledkem je zrušení apikální dominance.

Cytokininy nestimulují jen růst, ale také zakládání pupenů, např. u okrajových pupenů na listech *Bryophyllum daigremontianum*, u segmentů hypokotylů lnu (*Linum usitatissimum*) nebo u mechu *Funaria hygrometrica* (Šťastná, 2010).

Dormance semen

Cytokininy mohou narušovat dormanci, nebo-li odpočinek semen. Klíčení semen lociky salátové (*Lactuca sativa*) neprobíhá ve tmě, jelikož je stimulováno zářením červeného světla. Tento světelný účinek může být nahrazen působením cytokininů

a klíčení semen salátu probíhá i ve tmě. Při kombinaci červeného světla s cytokininy dochází k synergickému zvýšení účinku (Šťastná, 2010).

Zpomalení stárnutí

Cytokininy zpomalují stárnutí listů (*senescenci*). Listy vyskytující se na světle velmi rychle ztrácejí chlorofyl, žloutnou a dochází k poklesu obsahu DNA, RNA a bílkovin. Aplikací cytokininů může být proces stárnutí výrazně zpomalen.

Byla prováděna celá řada pokusů, na kterých byl tento jev pozorován. Uříznutý list tabáku (*Nicotina tabacum*) byl umístěn ve vlhké komoře. Dochází k pomalému žloutnutí listů, které lze zpomalit aplikací cytokininů. Naneseme-li na část listu kinetin, zjistíme, že neošetřená část zežloutne rychleji. Aplikujeme-li zároveň na jinou část listu radioaktivně značenou aminokyselinu, dochází k pohybu aminokyseliny ke kinetinu. Tímto pozorováním bylo dokázáno, že vlivem cytokininů jsou v zelené části listu syntetizovány bílkoviny (Šťastná, 2010).

Aktivace enzymů

Bylo zjištěno, že cytokininy zvyšují aktivitu některých enzymů. Např. u koukolu (*Agrostemma githago*) nelze prokázat nitrátreduktasu v klidových semenech, ošetříme-li ho nitrátem, dojde k syntéze právě tohoto enzymu. Syntézu nitrátreduktázy prokazatelně aktivují i cytokininy. Za reprodukci nitrátového iontu na amonný je zodpovědný právě enzym nitrátreduktáza (Šťastná, 2010).

4.1.2.7 Využití cytokininů

V praxi se cytokininy nejčastěji využívají ke stimulaci růstu v kultivačních médiích a při morfogenezi tkáňových kultur. Společně s auxiny se používají v kulturách *in vitro* k regeneračním procesům. Přidáváním různého množství auxinů a cytokininů do médií můžeme regenerovat celou rostlinu.

V zahrádkářství a zemědělství se exogenně aplikované cytokininy využívají k stimulaci větvení okrasných rostlin a v ranných fázích růstu obilovin lze zvýšit odnožování a počet zrn v klasech. V kombinaci s gibereliny je lze využít k tvarování plodů některých druhů jablek. Cytokininy mají také svůj význam v květinářství při skladování řezaných květin, jelikož zpomalují stárnutí pletiv (Šťastná, 2010).

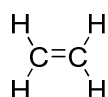
4.1.3 Ethylen

4.1.3.1 Objev ethylenu

Ethylen byl vzhledem ke své jednoduché chemické struktuře zařazen mezi rostlinné hormony jako jeden z posledních. Již na počátku 19.století bylo známo, že svítiplyn má vliv na některé procesy rostlin, především na opad listů. D.N. Neljubov v roce 1961 zjistil, že aktivní složkou svítiplynu je ethylen. Samotný důkaz tvorby ethylenu rostlinami byl prokázán až ve 30.letech 19.století. Nejvýznamnějším rokem ve studiu ethylenu byl rok 1959, kdy byla poprvé použita plynová chromatografie k jeho detekci (Šťastná, 2010).

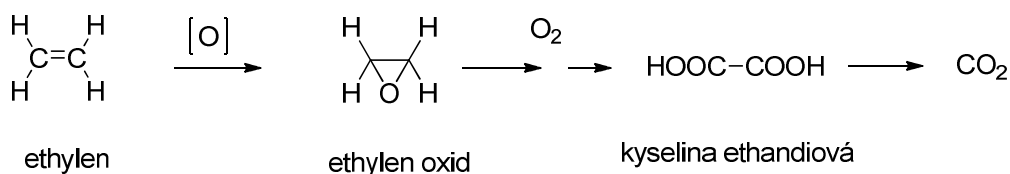
4.1.3.2 Struktura ethylenu

Ethylen je za normálních podmínek bezbarvý plyn, je hořlavý a lehčí než vzduch (obr.č.5). Díky své chemické struktuře patří mezi nejjednodušší růstové regulátory. Nositelem chemické aktivity je nepolární, dvojná vazba. Velice snadno podléhá oxidaci. Ethylen bývá oxidován na ethylenoxid, který může být dále hydrolyzován na ethylenglykol. Ve většině rostlinných pletiv ethylen zcela oxiduje na CO₂ (obr.č.6). Účinnost ethylenu může být způsobena právě oxidem uhličitým. Ethylen má v cytoplasmě určitá specifická vazebná místa a dochází zde k jeho rozpuštění. Ag⁺ ionty působí na ethylen antagonisticky. Ethylen má vliv na expresi genů, brzdí proteosyntézu a tvorbu mRNA, ale naopak indukuje tvorbu některých mRNA a bílkovin (Šťastná, 2010 ; Tainz *et al.*, 2006).



ethylen

Obrázek 5: Ethylen (převzato: Tainz *et al.*, 2006).



Obrázek 6: Kompletní oxidace ethylenu (převzato: Tainz *et al.*, 2006).

4.1.3.3 Výskyt a transport ethylenu

Ethylen produkují bakterie, houby a všechny rostlinné orgány vyšších rostlin. Rychlost tvorby závisí na typu tkáně a na stádiu vývoje rostliny. Je tvořen fotochemicky nebo enzymaticky pomocí rostlin a mikroorganismů. Nejvyšší množství ethylenu je v období zrání ovoce, stárnutí květin nebo při abscisi listů (Tainz *et al.*, 2006).

Jelikož je ethylen plyn, nemůže se vyskytovat v konjugované formě, ale nachází se zde jako konjugát prekurzoru. Konjugát tvoří kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová s kyselinou malonovou. Konjugátem tedy je N-malonyl-ACC (MACC), který se vyskytuje v rostlinných pletivech. Koncentrace ethylenu v buňce je velmi nízká, závisí na rozpustnosti v cytoplazmě. Velké množství ethylenu difunduje do mezibuněčných prostorů a dále přes průduchy do atmosféry. Uvolněný ethylen ovlivňuje i rostliny ve svém okolí (Šťastná, 2010).

4.1.3.4 Biosyntéza a metabolismus ethylenu

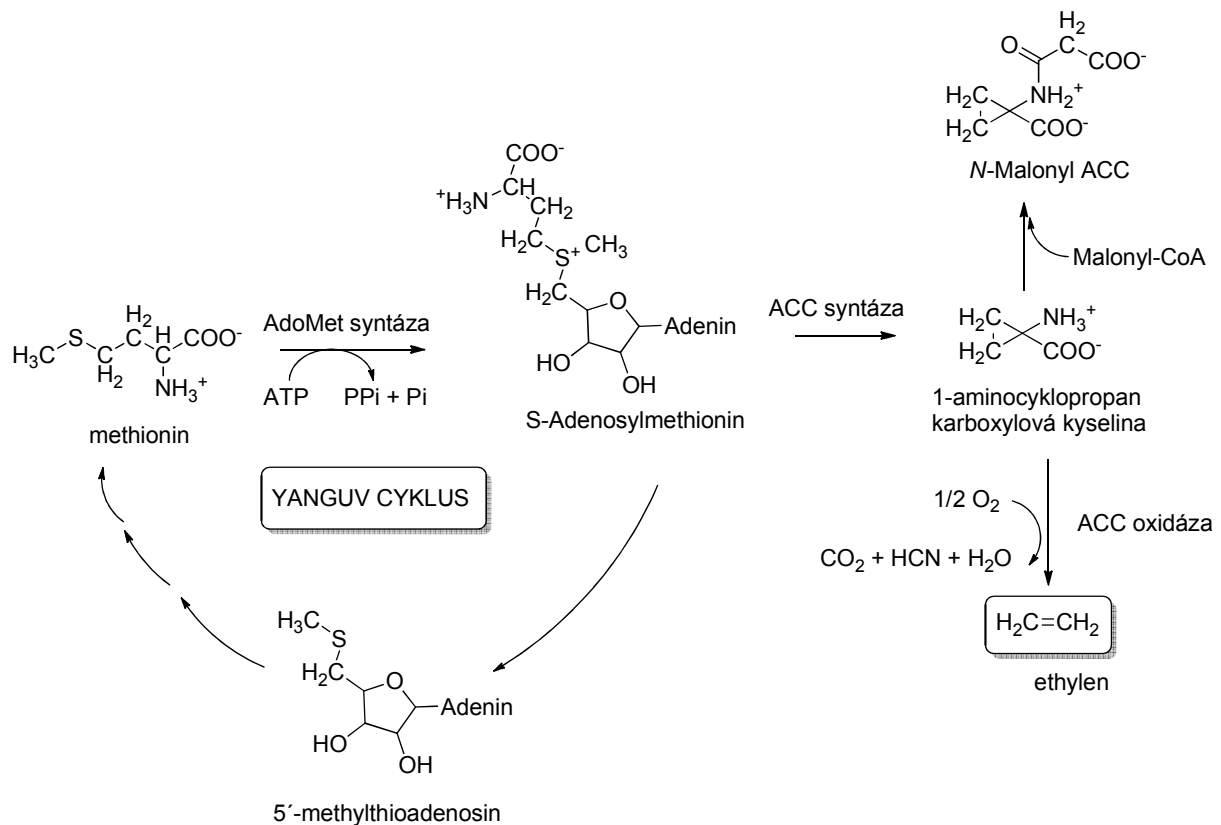
Předchůdcem ethylenu je aminokyselina methioninu. Rychlost přeměny je určena změnou prvního meziproductu S-adenozylmethioninu (AdoMet) na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC). Tato reakce je katalyzována ACC-syntázou a dále je ACC katalyzováno ACC-oxidázou za přítomnosti kyslíku na ethylen. Při přeměně AdoMet na ACC vzniká zároveň metylthioadenozin, který má CH₃-S skupinu. CH₃-S skupina methylthioadenozinu je zapojena do Yangova cyklu. Zde se methylthioadenozin několika kroky přemění zpět na aminokyselinu methioninu. Zapojení methylthioadenozinu do Yangova cyklu je velice důležité, jelikož je potřeba dostatečné množství aminokyseliny methioniny na syntézu ethylenu (obr.č.7).

Enzym ACC-syntáza katalyzuje přeměnu Adomet na ACC. Vyskytuje se ve všech rostlinných tkáních, ale značnou nevýhodou je jeho nestálost. ACC-syntáza je ovlivněna řadou vnějších a vnitřních faktorů. Patří mezi ně zrání ovoce, opad listů, poranění, stres, sucho, IAA aj. Naopak lze tento enzym inhibovat aminoxyoctovou kyselinou (AOA) nebo aminoetoxyvinylglycinem (AVG). Všechna ACC se nepřevádí na ethylen. Jak už jsme se zmínili, malá část ACC lze převést na konjugovanou formu N-malonyl ACC, který se hromadí ve tkáních. Existuje ještě jedna konjugovaná forma ACC, jedná se o 1-(L-glutamylamino)cyclopropan-1-karboxylovou kyselinu (GACC) vyskytující se v mnohem menším množství. U rajčete bylo nalezeno 9 genů pro ACC-syntázu a u *Arabidopsis* 8 genů.

ACC-oxidáza je poslední krok biosyntézy ethylenu. Katalyzuje přeměnu ACC na ethylen. Tato reakce probíhá u dozrávajícího ovoce. Mezi hlavní inhibitory této reakce patří ionty Co^{2+} , anaerobní prostředí a teplota nižší než $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za anaerobních podmínek tedy nedojde k přeměně ACC na ethylen, nýbrž dochází k hromadění ACC v tkáních. Podmínkou ACC-oxidázy je přítomnost kyslíku. Mezi další inhibitory syntézy ethylenu patří ionty Ag^{+} , které působí na expresi genů, brzdí proteosyntézu i tvorbu mRNA a naopak indukují tvorbu některých mRNA a bílkovin (Tainz *et al.*, 2006).

Biosyntéza ethylenu je ovlivněna širokou škálou ekologických podmínek, suchem, ozónem, chemickými a fyzikálními parametry a také rostlinnými hormony. Množství ethylenu se mění v průběhu dne. V noci se sníží na minimum. Maximální účinnost biosyntézy nastává při teplotě v rozmezí $25\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fišerová *et al.*, 2008).

Ethylen napodobuje vysoké množství auxinů a signalizuje stres rostliny. Studie dokázaly, že ethylen je primárním efektozem epinastie. Auxiny působí nepřímo, způsobují pouze výrazné zvýšení tvorby ethylenu (Tainz *et al.*, 2006).



Obrázek 7: Biosyntéza ethylenu (převzato: Tainz *et al.*, 2006).

4.1.3.5 Přenos signálu

Vlivem nízké rozpustnosti ethylenu v cytoplazmě dochází ke ztížení vazby ethylenu na specifické bílkoviny. I přes tyto potíže byly nalezeny vazebné bílkoviny, které vážou ethylen velice pevně. Vazebné bílkoviny se vyskytují v endoplazmatickém retikulu a v membránách proteinových tělísek. Vazby ethylenu na specifickou bílkovinu se nejčastěji účastní iont Cu^+ . Receptorem ethylenu je integrální protein membrány endoplazmatického retikula, který je značen ETR1 (*ethylene resistant*). K navázání ethylenu je potřeba specifický kofaktor a iont Cu^+ . Pokud nedojde k navázání ethylenu na receptor, dochází k aktivaci cesty, která blokuje odpověď na ethylen. Pokud dojde k navázání ethylenu, dochází k odstranění blokady (Šťastná, 2010).

4.1.3.6 Hlavní fyziologické funkce ethylenu

Mezi hlavní fyziologické funkce ethylenu patří urychlení zrání plodů, obranné reakce proti působení stresorů, inhibice prodlužovacího růstu, stimulace radiálního růstu a porucha gravitropické reakce.

Urychlení zrání plodů

Jedním z nejvýznamnějších účinků ethylenu je stimulace zrání plodů. Při dozrávání plodů dochází k mnohonásobnému zvýšení tvorby ethylenu. Ethylen urychluje nejen zrání, ale také stimuluje stárnutí, opad listů, květů a plodů. Ethylen zde stimuluje tvorbu enzymů, které způsobí štěpení buněčných stěn. Ethylen uvolňuje především dozrávající plody (Šťastná, 2010).

Obranné reakce

Ethylen signalizuje fyziologický stres a zároveň vyvolává obranné reakce proti stresorům. Pokud se rostlina vyskytne v nepříznivých podmínkách (nadbytek vody, výkyvy teploty, nedostatek kyslíku, zasolení, poranění, napadení patogeny, infekce), dojde k rychlému nárůstu množství ethylenu (Šťastná, 2010).

Trojná odezva

Typickou vlastností ethylenu je tzv. trojná odezva (*triple response*), řadíme sem inhibici prodlužovacího růstu, stimulaci radiálního růstu a poruchu gravitropické reakce. Ethylen inhibuje dlouhivý růst a zároveň stimuluje růst radiální. Dochází ke změně směru

růstu ze směru podélného do směru příčného, což má za následek změnu uspořádání mikrotubulů a mikrofibril celulózy. U vodních rostlin ethylen stimuluje dlouhivý růst pod vodou, jelikož ethylen je hydrofobní a hromadí se v rostlině. Prodlužovací růst stonku je ukončen až když stonek vynese listy nad vodu a ethylen tak může pronikat do ovzduší (Šťastná, 2010).

4.1.3.7 Využití ethylenu

Účinky ethylenu se nejčastěji využívají v potravinářství při zrání skladovaných banánů, jablek, hrušek, rajčat, fíků, manga, broskví a avokáda. Naopak pokud chceme zpomalit zrání plodů, musíme odstranit ethylen z ovzduší pomocí roztoku manganistanu draselného. Nejčastěji se tohoto jevu využívá při skladu jablek. Vlivem ethylenotvorné látky lze na jaře oddálit kvetení o téměř 14 dní a lze tak snížit škody způsobené jarními mrazíky. Nejčastěji používanou ethylenotvornou látkou je kyselina 2-chlorethylfosfonová (CEPA). V obilnářství se využívá synteticky připravená ethylenotvorná látka etrel. Využívá se jako retardant, brzdí tedy růst stébel. Etrele se nejčastěji kombinoval s CCC (chlorcholin chlorid), dnes už tomu tak není (Šťastná, 2010 ; Čížková, 2008).

4.1.4 DALŠÍ LÁTKY FYTOHORMONÁLNÍ POVAHY

Rostliny obsahují další skupiny látek s růstově regulačním působením. Tyto látky jsou méně známé a méně prozkoumané. Řadíme sem brassinosteroidy, kyselinu jasmonovou, polyaminy, oligosacharidy a některé typy fenolických látek (Kincl *et al.*, 2000). Dříve byly považovány pouze za růstové regulátory. Díky objevení brassinosteroidových mutantů huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) a hrachu (*Pisum sativum*) byly v roce 1998 zařazeny mezi fytohormony (Yokota, 1999).

4.1.4.1 Brassinosteroidy

Do nedávné doby byly steroidní hormony známy pouze u savců, hmyzu, korýšů a vodních plísňů. První zmínky o rostlinných steroidech s regulačními účinky jsou ze 70.let 19.století. (Khripach, V. *et al.*, 2000). Samotnému objevu předcházelo zjištění, že pylové extrakty stimulují růst rostlin. První rostlinný steroid byl izolován v roce 1979 z pylu řepky (*Brassica napus*). Z latinského jazyka byl odvozen název této látky brassinolid. O tři roky později byl vyizolován další brassinosteroid z kaštanovníku

(*Castanea crenata*) - odtud tedy název castasteron (Yokota, 1999). Do roku 2005 bylo objeveno více jak 50 přirozených brassinosteroidů a dnes jich už známe více jak 70 (Asami, T. *et al.*, 2005, Havel, J., 2006).

Výskyt brassinosteroidů

Brassinosteroidy se vyskytují ve vyšších i nižších rostlinách v extrémně nízkých koncentracích. Jejich přítomnost byla zjištěna ve všech rostlinných orgánech, včetně kořenů. Zde byl jejich výskyt potvrzen teprve nedávno. Množství brassinosteroidů v rostlinách závisí na typu orgánu, stáří tkáně a na druhu rostliny. Bylo zjištěno, že mladé tkáně, tedy pyl a semena jsou nejbohatšími zdroji, na rozdíl od listů a výhonků. Nejvyšší koncentrace brassinosteroidů byla zaznamenána v pylu cypřiše (*Cupressus arizonica*). (Bajguz a Trety, 2003).

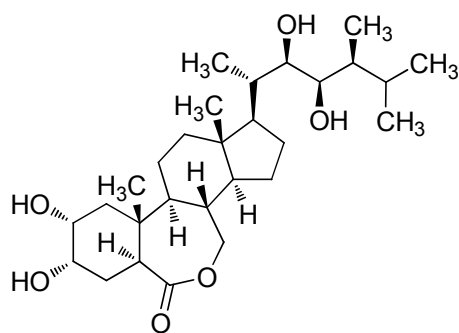
Struktura, aktivita a syntéza brassinosteroidů

Brassinosteroidy mají strukturu podobnou některým hmyzím hormonům (obr.č.8). Ovšem není známo, zda se vyskytují i v živočišné říši.

Podmínkou pro biologicky aktivní brassinosteroidy je přítomnost 7-oxolaktonového či 6-keetonového kruhu a sousední hydroxylové skupiny jak na kruhu, tak v postranním řetězci (Procházka *et al.*, 1998).

Aktivita především závisí na typu a orientaci funkčních skupin na postranním řetězci a kruhu A a B. Nejvyšší biologickou aktivitu vykazuje brassinolid. Na C-6/C-7 má laktonovou funkční skupinu, na C-2 a C-3 cis hydroxyly, na C-22/C-23 R-konfiguraci hydroxylů a na C-24 methyl jako substituent (Clouse, 2002). Na postranním uhlíkatém řetězci, přesněji na C-23, C-24 a C-25 se mohou vyskytovat různé substituenty. Nejaktivnější brassinosteroidy jsou se substituenty methylu nebo ethylu na C-24 a methylu na C-25 (Bajguz a Trety, 2003).

Syntéza brassinosteroidů byla poprvé objasněna u buněk barvínku růžového (*Catharanthus roseus*). Biosyntetickou dráhu můžeme rozdělit na syntézu základních sterolů (např. campesterol) a na specifickou dráhu biologicky aktivního campesterolu, který dále přechází na teasteron, typhasteron, castasteron a brassinolid (Procházka *et al.*, 1998).



brassinolid

Obrázek 8: Brassinolid (převzato: <http://chemicke-listy.cz>)

Vliv brassinosteroidů na rostliny

Brassinosteroidy ovlivňují růstové i regulační procesy, stimulují dlouhivý růst i dělení buněk, růst mladých vegetačních pletiv, indukují kvetení, zrání plodů, klíčení semen, tvorbu a růst kořenů, růst pylových láček, oddalují opad listů a plodů, podporují diferenciaci xylémových elementů a zvyšují odolnost rostlin k různým abiotickým a biotickým stresorům (sucho, nízká teplota, vysoká teplota, zasolení půdy, působení herbicidů a patogenů) (Procházka *et al.*, 1998). Jelikož podporují klíčení semen, působí tak proti kyselině abscisové (Seidlová, 2008).

Využití brassinosteroidů

Brassinosteroidy se využívají v zemědělství. V některých zemích jako je např. Rusko, Bělorusko, Japonsko, Čína aj. byly brassinosteroidy schváleny k polnímu použití. Jsou schopny zvýšit výnos, ale také kvalitu plodin. Nejčastěji se používá 28-homobrassinolid a 24-epibrassinolid. Tyto dva brassinosteroidy se používají jako růstové regulátory pro tabák, cukrovou třtinu, čajovník, brambory, rajčata, okurky aj. (Khripach, V.*et al.*, 2000)

Jednou z největších překážek používání brassinosteroidů v zemědělství je jejich vysoká cena, jelikož jejich izolace a příprava je velice pracná a nákladná (Khripach, V. *a kol.*, 2000). Proto se snaží vědci vymyslet, jak získat stejně účinné, ale zároveň dostupnější sloučeniny. Všechny brassinosteroidy nejsou biologicky aktivní, a proto se nejčastěji používá již zmíněný 24-epibrassinolid a 28-homobrassinolid. 24-epibrassinolid se připravuje z ergosterolu a jeho účinnost je totožná s přírodním brassinolidem, který je ovšem velice drahý (5 mg stojí více než 9 US dolarů) a to znemožňuje jeho praktické využití (Havel, J., 2006).

4.2 Vliv brassinosteroidů, auxinů a cytokininů na produkci ethylenu

Ethylen patří mezi nejjednodušší, dodnes známé rostlinné hormony. Ačkoliv je jeho struktura velmi jednoduchá, účastní se různých vývojových procesů v rostlině. Množství ethylenu se odvíjí od genetické struktury rostliny, vývoje a stárnutí rostliny, typu orgánu, teploty, osvětlení, kyslíku, oxidu uhličitého, výživy, gravitaci aj. Stimulace ethylenu je ovlivněna cytokininy, auxiny, brassinosteroidy, cukry, kyselinou jasmonovou, gibbereliny, kyselinou abscisovou a vnějšími a vnitřními stresovými podmínkami. Nejvyšší produkci ethylenu vykazují mladé části rostliny, zejména listy (Stepanova *and* Alonso, 2005).

U rostlin *Arabidopsis thaliana* a *Vigna radiata* L. bylo zjištěno, že brassinosteroidy, auxiny a cytokininy mají vliv na produkci ethylenu. Na rostlinu *Arabidopsis thaliana* byly aplikovány tři typy auxinů (IAA, NAA, 2,4-D). 2,4-D a NAA vyvolaly v rostlině ve všech testovaných koncentracích větší produkci ethylenu, než IAA. Ošetřené listy a stonky vykazaly dramatický nárůst produkce ethylenu hned 2 hodiny po aplikaci. Další nárůst byl zaznamenán 4 hodiny po aplikaci, ovšem po 6. hodině nebyl zpozorován nárůst žádný. Naopak mezi 6. až 24. hodinou došlo k výraznému poklesu (Arteca *and* Arteca, 2008). Na rostlinu byly aplikovány i samotné brassinosteroidy a BAP, ale žádný efekt na produkci ethylenu nebyl zaznamenán. Nicméně, když byly brassinosteroidy použity v kombinaci s IAA, nastal dramatický nárůst produkce ethylenu. Tento nárůst byl dokonce vyšší, než vyvolala samotná IAA (Arteca *and* Arteca, 2001 ; Yi *et al.*, 1999).

Ono *et al.* v roce 2000 publikovali, že brassinosteroidy jsou závislé na množství auxinů a cytokininů v rostlinných tkáních. Pokud jsou na rostlinu aplikovány brassinosteroidy, dochází k následnému zvýšení auxinů a zároveň ke snížení koncentrace cytokininů (Ono *et al.*, 2000),

Je známo, že brassinosteroidy interagují s auxiny a cytokininy. Pokud jsou auxiny aplikovány jako první, působí synergicky ke stimulaci dlouhivého růstu a produkci ethylenu. Je-li tomu naopak, působí spíše inhibičně (Procházka *et al.*, 1998).

4.3 Bavlník (*Gossypium*)

4.3.1 Zařazení do systému

Bavlník je rod zahrnující přibližně 40 druhů (*species*). Patří do říše rostliny (*Plantae*), podříše cévnaté rostliny (*Tracheobionta*), oddělení krytosemenné rostliny (*Magnaliophyta*), třída vyšší dvouděložné rostliny (*Rosopsida*), řád slézotvaré (*Malves*), čeleď slézovité (*Malvaceae*) a rod bavlník (*Gossypium*). Pro získání bavlny se pěstují především 3 základní druhy. Patří mezi ně bavlník barbadoský (*G.barbadense*), bavlník bylinný (*G.herbaceum*) a bavlník chlupatý (*G.hirsutum*) (Šťastná, 2010 ; Novák *et al.*, 2007).

4.3.2 Historie

Bavlník patří mezi jednu z nejvýznamnějších textilních rostlin. Je velice stará. Ve střední Americe již byla známa už 5 800 př.n.l. a v Číně a Indii před 3 000 lety př.n.l. Do Evropy se bavlněné výrobky dostaly až po roce 800 n.l. a teprve až ve 14.století se bavlna začala zpracovávat v jihoněmeckém regionu (<http://www.bavlna.info>).

4.3.3 Popis rostliny

Bavlník pochází z aridních oblastí tropů Afriky, Ameriky, Austrálie a vzácně i z Asie. V současné době se pěstují přibližně v 50-ti zemích a mezi nejznámější producenty patří Čína, USA a Indie (Valíček *et al.*, 1989).

Bavlník je rostlina, která potřebuje hodně slunečního svitu a přibližně 200 dní bez mrazu až do uzrání plodů. Kvůli dobrému růstu je důležité dostatečné množství srážek (500 mm/rok). Patří mezi jednoleté i víceleté rostliny. Víceleté druhy se pěstují v tropických oblastech, kdežto v chladnějších oblastech se jedná o rostliny jednoleté. Klíčení semen nastává teprve kolem 14°C. Při této teplotě dochází k ukončení vegetace. Neoptimálnější teplota pro růst a vývoj je v rozmezí 20-30°C. Teplota nesmí nikdy klesnout pod bod mrazu (Kuhn, 1957). Některé druhy řadíme k polokeřům, jiné ke keřům. Jejich velikost je tedy velice rozmanitá (1,5-3,5m). Lodyha je rozvětvená s 3-7 laločnatými listy s velkými úžlabními 5-tičetnými květy. Květ má žlutou, bílou nebo fialovou barvu, připomínající květ ibišku (*Hibisum*) či slézu (*Malva*). Plodem je tobolka, která má 5-10 semen. K uvolnění semen dochází pučením 3-5-ti chlupů. Semena jsou nejčastěji černá a hustě porostlá bílými, hnědými nebo žlutými chlupy (Jirásek, 1955).

4.3.4 Pěstování bavlny a její zpracování

Bavlníku se nejlépe daří v humózních, hlubokých, písčitohlinitých a hlinitých půdách. Půdy nesmí být příliš kyselé ani zamokřené. Je velice náročná na dostatečné množství živin, které jdou dodávány v podobě organických a minerálních hnojiv (Naučný slovník zemědělský).

Semena se zasévají do půdy pomocí secích strojů. Před zasetím je velice důležitá orba a důkladné odplevelení půdy. Při dostatečném zavlažování semínka vyklíčí a prorazí vrstvu zeminy, přes kterou se dostanou na denní světlo. Po období kvetení jsou již rozeznatelné tobolky, které přibližně po 8-ti týdnech prasknou a uvolní bílý chomáček. V této době je nutné začít sklízet. Obrovské množství bavlny se sklízí pomocí česacích strojů. Před sběrem je nutné provést postřik podporující opad listů. Sklizená bavlna se pomocí lisů zpracuje do obrovského balíku a poté se oddělí bavlněná vlákna od zbytku tobolek. Přečištěná bavlna se opět zpracuje do balíku a je převezena do prádelny, kde se čištění několikrát opakuje. V prádelně se jednotlivá vlákna rovnají a shrnují do svazků. Ve spřádacím stroji se z bavlněných vláken souká nit. Nit se poté obarví a na tkalcovském stroji se zpracovává do hotových látek .

Mezi nejdůležitější vlastnosti bavlny patří dobrá spřádatelnost, barvitelnost, absorpce vlhkosti, odolnost, mačkovost, příjemnost na dotek a hlavně dobrý poměr mezi cenou a kvalitou (<http://www.bavlna.info>).

4.3.5 Škůdci

Bavlník je jednou z chemicky nejošetřovanějších rostlin. V boji proti škůdcům se používají pesticidy, které však škodí životnímu prostředí. Při pěstování bavlny se použije 10-20 % z celosvětové spotřeby pesticidů. Přitom bavlníkové plantáže zabírají „jen“ necelé 4 % světového půdního fondu využívaného v zemědělství. Mezi nejhorší škůdce patří makadlovka bavlníková. Její housenky se zavrtávají do plodu bavlníku a ničí jeho nitro. Škoda se projevuje v období otevření tobolek. Makadlovka bavlníková úrodu spolehlivě zničí (<http://www.rozhlas.cz>). Proto byly vyšlechtěny dva druhy genově modifikovaného bavlníku. Bavlník Bt, který je odolný vůči housenkám makadlovky bavlníkové a druhým je bavlník odolný vůči herbicidům. Pěstování geneticky modifikovaných bavlníků se v roce 2003 zvýšilo přibližně o šest procent. Evropská unie zakazuje dovoz těchto geneticky modifikovaných bavlníků, avšak dovoz této bavlny je povolen (<http://oko.yin.cz>).

4.3.6 Využití

Využití bavlníku je tak rozsáhlé, že málokterá rostlina se mu vyrovná. Bavlněná vlákna se zpracovávají na přízi, tkaninu a lana. Tkanina je velice lehká a příjemná na dotyk. Proto se využívá k výrobě nejrůznějších látek, spodního prádla, ložního prádla, ubrusů, oblečení pro kojence, košilí atd. Bavlna je velice odolná, vyrábějí se z ní také plachty. Ve zdravotnictví slouží k výrobě sterilních materiálů (nitě, obvazy, tampony). Dále se používá k výrobě papíru, celulózy, linolea, celofánu, umělého hedvábí, fotografických filmů, laků na nehty a také se uplatňuje v kosmetice a jako zahušťovací látka v potravinářství. Patří mezi medonosnou a léčivou rostlinu (<http://www.baabio.cz>).

Semena bavlníku obsahují přibližně 15-18% oleje. Po úpravě byl používán ke kuchyňským účelům a výrobě tvrdých mýdel. Po odstranění zbude obrovský odpad, který obsahuje velké množství bílkovin (až 22%) a tak se přemýšlelo, jak ho efektivně využít. Bavlníkové plantáže by mohly pokrýt produkci semen spotřebu bílkovin u půl miliardy lidí. Bohužel, semena tradičních odrůd bavlníku nejsou jedlá, jelikož obsahují toxický terpenoid gossypol. Je to žlutá toxická látka, vyskytující se v celé rostlině. Po požití dochází u savců ke snížení koncentrace draslíkových iontů v krvi, což vyvolává slabost až ochrnutí. Gossypol je pro rostlinu velice důležitý, jelikož slouží jako ochranný faktor proti škůdcům. Prováděla se celá řada výzkumů, jak snížit obsah gossypolu ze semen, ale zároveň došlo ke snížení látky v celé rostlině, která pak ztratila obrannou funkci proti škůdcům. Naopak semena geneticky modifikovaného bavlníku lze použít k přímé konzumaci nebo získat rozemletím mouku, která se přidává do jiných potravin jako zdroj bílkovin. Dají se uplatnit i jako výživa pro zvířata (<http://www.osel.cz>).

4.3.7 Životní cyklus (obr.č.9,10,11,12,13,14,15,16,17)



Obrázek 9: Léto na bavlníkové plantáži. Rostliny začínají kvést.



Obrázek 10: První kvítky. Uzářené bílé květy se zabarvují do růžova. Některé druhy bavlníku však zůstávají bílé, či přecházejí do světle žluté.



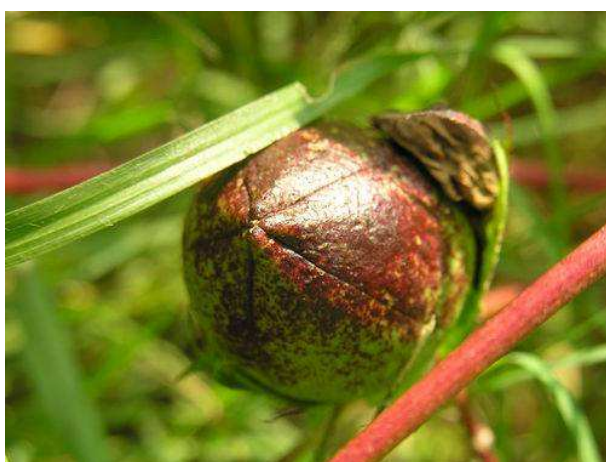
Obrázek 11: Bavlníkový květ (plně rozvinut).



Obrázek 12: Květy již odkvetly a začíná se vyvíjet tobolka.



Obrázek 13: V tobolce postupně zrají bavlníková semena chráněná chomáčky vláken.



Obrázek 14: Během zrání tobolka mění barvu přes hnědou až do černé.



Obrázek 15: Jakmile tobolka dozraje, pukne, aby se mohla rozevřít a odhalit, co dosud chránila.



Obrázek 16: Plně rozevřená tobolka. Bavlníkové chomáčky jsou připravené ke sběru, jakmile zmizí i poslední tvrdší místa mezi vlákny.



Obrázek 17: Dozrálý, měkký a načechraný bavlníkový chomáček (<http://www.amwa.cz>).

4.4 Látky používané při defoliaci bavlníku

Defoliace bavlníku patří mezi velice citlivé procesy. Pro úspěšnou sklizeň je důležité důkladné odlistění. Špatně použité defolianty mohou způsobit snížení kvality vláken. Je důležité i správné časové naplánování postřiků. Pokud jsou defolianty použity příliš pozdě, může dojít k hnilobě, a tak k poškození chuchvalců bavlny.

Defolianty dělíme na dva základní typy: defolianty s herbicidní aktivitou a defolianty s hormonální aktivitou. Mezi defolianty s herbicidní aktivitou patří např. Def 6 nebo Folex. Mezi defolianty s hormonální aktivitou patří Thidiazuron (Dropp) nebo Ethephon. Oba druhy defoliantů stimulují další produkci ethylenu v rostlině. Zvýšené množství ethylenu způsobuje opad listů (*abscisi*). Látky mohou být aplikovány v různých kombinacích. Vede to k zvýšení jejich účinnosti, která závisí i na počasí, koncentraci a rostlinných podmínkách. Pokud je aplikováno příliš velké množství, může dojít k seschnutí listů a tak k opadu nedojde (Burmester, 2009).

Cotton Quik. Při vhodných podmínkách dochází k defoliaci do 7 dnů. Za nevhodných podmínek to trvá až 14 dní. Po chemickém ošetření je omezená kontrola opětovného růstu.

Def 6 a Folex. Jsou to nejdéle používané látky. Nejčastěji se používají za vhodných teplotních a rostlinných podmínek. Pokud nastane méně vhodná situace, musí se použít vyšší koncentrace. Tyto dvě látky se nejčastěji kombinují s látkami Dropp 50 WP a ethephonem. Patří mezi látky fosfátového typu a také jsou špatnými inhibitory opětovného růstu.

Finish. Tato látka slouží jako defoliant a zároveň i jako otvírač tobolek. Za vhodných podmínek se užívají koncentrace uvedené na lahvích. Pokud je rostlina napadena hmyzem, musí se použít v kombinaci s jinými látkami. Finish obsahuje ethephon a cyklanilid.

Harvade 5F. Tato látka je bez zápachu a předchází vysychání. Její nejvyšší účinnost nastává při nižší teplotě, než je 21,1 °C. Při jejím použití musí být přítomen obilný olej.

Dropp 50 WP. Za vhodných teplotních podmínek je látka účinná i při velice nízkých koncentracích. V chladnějším období musí dojít ke zvýšení aktivity pomocí methylparathioninu, fosfátových defoliantů nebo pomocí obilného oleje. Koncentrace nesmí být příliš vysoká, neboť může nastat vyschnutí listů. Látka výrazně opoždí opětovný růst, který závisí na počasí, koncentraci a rostlinných podmínkách.

Ginstar. Tato látka patří mezi slabé defolianty. Rostlina reaguje na tuto látku až po několika dnech a v chladném počasí trvá reakce velice dlouho. Po defoliaci zabraňuje opětovnému růstu.

Ethephon. Tato látka se nejčastěji používá v kombinaci s Def, Folex, Dropp a Arvade. Aktivní součástí je Prep/Super Boll. Nesmí se míchat s chlornanem sodným.

Dropp Ultra. Tato látka opět patří mezi látky s nižší účinností. K defoliaci dochází až po několika dnech. Za nevhodných podmínek se musí použít mnohem vyšší koncentrace, ale defoliace je i tak delší. Účinnost látky se snižuje při teplotách nižších jak 15,6 °C (Tab 2) (Šťastná, 2010).

Tabulka 2: Přehled některých používaných defoliantů (<http://www.pubs.ext.vt.edu>, <http://msucares.com/pubs>).

Obchodní název látky	Chemikálie	Operace		
		Defoliace	Otevírání tobolek	Zabránění opětovného růstu
Harvade 5 F	dimethipin	Ano		
Folex/Def 6 EC	tribufos	Ano		
Finish 6 Pro	Cyclanilide+ethephon	Ano	Ano	
Cotton Quick	AMADS+ethephon	Ano	Ano	
Dropp 4 SC	thidiazuron	Ano		Ano
Free Fall 50 WP	thidiazuron	Ano		Ano
Leafless 4 F	Thidiazuron+dimethipin	Ano		Ano
Ginstar 1.5 EC	Thidiazuron+diuron	Ano		Ano
Aim 2 EC	carfentrazone	Ano		
ET 0.208 EC	pyraflufen	Ano		
Prep 6 L	ethephon		Ano	
Super Boll 6 L	ethephon		Ano	
Ethephon 6 L	ethephon		Ano	
Boll'd 6 L	ethephon		Ano	

5 Experimentální část

5.1 Pomůcky a chemikálie

5.1.1 Pomůcky

Při pěstování rostlinného materiálu, přípravě a aplikaci roztoků byly použity tyto pomůcky:

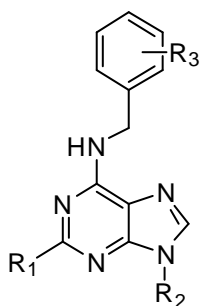
- Eppendorfký (objem 1,5 ml a 2 ml)
- Falkony (objem 15 ml a 50 ml)
- Sada automatických pipet (objem 1-1000 μ l)
- Špičky
- Kádinky
- Rozprašovače
- Špachtle
- Elektromagnetická míchačka, míchadélko
- Analytické váhy
- Fytotron
- Květináče
- Zahradnický substrát
- Bavlníková semena
- Teploměr
- Modré a žluté pásy proti škůdcům
- Nůžky
- Lepící pásy na označení

5.1.2 Chemikálie

Z chemikálií byly použity tyto látky:

- Silwet 806 (detergent ; získán z Chemtury)
- DMSO (dimethylsulfoxid ; získán ze Sigmy)
- Cytokininy
 - **TDZ** (thidiazuron ; $M_r= 220,25$ g/mol ; získán z Olchemim s.r.o)
 - **BAP** (6-benzylaminopury ; $M_r= 225,30$ g/mol ; získán ze Sigmy)
 - **LGR-909** ($M_r= 237,00$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
 - **LGR-912** ($M_r= 417,00$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)

- **LGR-915** ($M_r = 237,15$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-916** ($M_r = 253,30$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-950** ($M_r = 277,65$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-951** ($M_r = 289,68$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-994** ($M_r = 261,71$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-996** ($M_r = 227,27$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-998** ($M_r = 261,71$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-999** ($M_r = 227,27$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-1000** ($M_r = 261,71$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-1002** ($M_r = 271,33$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-1042** ($M_r = 260,40$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-2210** ($M_r = 421,81$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-2212** ($M_r = 357,00$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-2213** ($M_r = 341,00$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-2541** ($M_r = 289,73$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)
- **LGR-2634** ($M_r = 317,80$ g/mol ; vyrobeno LRR v Olomouci)



Obrázek 18: Obecný vzorec modifikovaných benzylaminopurynů

Tabulka 3: Přehled modifikovaných benzylaminopurynů testovaných v bakalářské práci.

Cytokininy	M_r (g/mol)	R_1	R_2	R_3
BAP	225,25	-H	-H	-H
LGR-950	277,65	-Cl	-H	-F
LGR-951	289,68	-Cl	-H	-OCH ₃
LGR-1042	260,40	-Cl	-H	-H
LGR-2210	421,81	-Cl	-ribosyl	-OCH ₃

- Auxiny
 - NAA (kyselina α -naftyloctová ; $M_r= 186,20$ g/mol ; získána z Olchemim s.r.o)
- Brassinosteroidy
 - **24-Epibrassinolid** ($M_r= 480,69$ g/mol ; získán z získán z Olchemim s.r.o)
- Etanol
 - **70%** etanol (na oplachování laboratorního skla a promývání rozprašovače)
 - **96%** etanol (použit jako rozpouštědlo)
- Destilovaná voda (na oplachování laboratorního skla a promývání rozprašovače)

5.2 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byl použit bavlník bylinný (*Gossypium herbaceum*). Bavlník byl vypěstován ze semen zakoupených v obchodě Sempra. K pěstování byl použit zahradnický substrát a plastické květináče o průměru 10 cm a 20 cm (2 rostliny na 1 květináč). Pro růst bavlníku je důležité zajistit vhodné podmínky pro růst. Bavlník byl pěstován ve fytotronu. Fytotron je zařízení pro biologické experimenty. V jeho kultivačním prostoru lze regulovat, udržovat a programovat vnější podmínky, zejména teplotu (25°), světelný režim 16 hod. světlo / 8 hod. tma (zářivka Osram, Fluora 16 W) a vlhkost ovzduší (80%). Rostliny byly pravidelně zalévány destilovanou vodou a nebyly ničím přihnojovány. Přestože bývá bavlník napadán různými škůdci (mandlovka bavlníková, molice skleníková, mšice bavlníková, svilušky, třásněnky), nebyly použity žádné pesticidy z důvodu snížení stresu rostliny. Bavlník byl ve fytotronu napaden sviluškami, a proto jsme proti nim vyvěsili lepící pásy žluté (viz.foto 6) a modré barvy, které svou barvou lákají hmyz. Škůdců jsme se však úplně nezbavili a napadali bavlník. Jakmile rostliny dosahovaly dostatečné velikosti, byly použity k experimentu.

5.3 Metodika

5.3.1 Příprava kontroly

- 6 μ l Silwet 806 + 150 μ l 100% DMSO + destilovaná voda
- Do 29 ml destilované vody bylo postupně a za stálého míchání přidáno 150 μ l 100 % DMSO a poté 6 μ l Silwetu 806. Na závěr byl připravený roztok doplněn destilovanou vodou na objem 30 ml.

5.3.2 Příprava roztoků testovaných látek na postřik bavlníku

- Na 1 květináč (2 rostliny) bylo připraveno 15 ml různě koncentrovaného roztoku, který obsahuje navíc 0,5% DMSO a 0,02% Silwetu 806. V případě NAA a 24-epibrassinolidu byl místo 100% DMSO použit jako rozpouštědlo 96% ethanol.
- Byly testovány samotné auxiny, cytokininy, brassinosteroidy, ale také jejich kombinace.

- **Např. Příprava 250 μ M roztoku TDZ (pro 2 květináče, tzn. celkem 30 ml roztoku) :**

1. Příprava 50 mM roztoku ve 100% DMSO (minimálně 150 μ l 100% DMSO):

- Nejmenší navážené množství TDZ na 150 μ l 100% DMSO je 1,65 mg

$$m = M \cdot c \cdot V$$

$$m = 220,25 \cdot 0,05 \cdot 0,15$$

$$m = 1,65 \text{ mg TDZ}$$

- Bylo naváženo 1,70 mg TDZ

- Přepočet:

$$V (\text{DMSO}) = m (\text{cytokinin}) / c (\text{roztok}) \cdot M (\text{cytokinin})$$

$$V (\text{DMSO}) = 1,70 \text{ mg} / 0,05 \text{ mmol/ml} \cdot 220,25 \text{ mg/mmol}$$

$$V (\text{DMSO}) = 0,155 \text{ ml} = 155 \mu\text{l}$$

- Pro přípravu 50 mM roztoku TDZ bylo třeba na rozpuštění 1,70 mg TDZ 155 μ l 100% DMSO.

2. Příprava 30 ml 250 μ M roztoku látky:

- 150 μ l 50 mM roztoku TDZ (ve 100% DMSO) bylo postupně a za stálého míchání a zahřívání přidáno do 29 ml destilované vody.
- Na závěr bylo přidáno 6 μ l Silwetu 806.

- Připravené roztoky byly přelity do falkony (objem 50 ml) a doplněny destilovanou vodou na objem 30 ml.

5.3.3 Aplikace látek

Připravené roztoky byly z falkon (objem 50 ml) přelity do 2 menších falkonek (objem 15 ml) (viz.foto 1,2). Aplikace látek byla uskutečněna pomocí rozprašovače (viz.foto 3,4). Na 1 květináč byla použita 1 malá falkona (na jednu rostlinu připadá přibližně 7,5 ml látky). Látky byly aplikovány rovnoměrně na každý list. Bavlník byl ihned po oschnutí vrácen do fytotronu (viz.foto 5). Bylo nutno dbát na dostatečnou vzdálenost bavlníků postříkaných odlišnými látkami. Bavlníky se nesměly vzájemně dotýkat a byly od sebe v určitém rozmezí. Jedno měření probíhalo 10 dní. Kontrola byla prováděna každý druhý den. Všechny výsledky byly pečlivě zaznamenány do tabulek, z kterých byly sestaveny grafy.

Postup diplomové práce vychází ze 2 článků „*Induction of Leaf Abscission in Cotton is a Common Effect of Urea-and Adenin-Type Cytokinin*“ (Grossmann, 1990) , *Effect of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in Arabidopsis thaliana plants* (Arteca and Arteca, 2008) a zároveň navazuje na mou bakalářskou práci.

5.3.4 Optimalizace rozpustnosti látky LGR-951

Při přípravě roztoků se vyskytl problém s rozpustností 1 látky připravené v LRR v Olomouci. Jedná se o LGR-951. Tato chemikálie byla použita i v mé bakalářské práci. Zde se žádný problém s rozpustností nevyskytl. Používaná látka byla již spotřebována a při přípravě roztoku v diplomové práci byla použita nově navařená chemikálie. Látka byla velice dobře rozpustná ve 100% DMSO, problém nastal až při přidávání rozpuštěné látky ve 100% DMSO do destilované vody. Došlo ke vzniku sraženiny.

Pokusila jsem se optimalizovat metodu rozpustnosti. Poprvé jsem k zásobnímu roztoku nepřidala Silwet 806, podruhé jsem vyzkoušela místo Silwetu 806 Tween nebo jar. Posledním pokusem, který měl vést k optimalizaci rozpustnosti, bylo snížení koncentrace zásobního roztoku. Bylo tedy použito větší množství 100% DMSO. Opět došlo ke vzniku sraženiny. Žádná z těchto metod nevedla ke 100% rozpustnosti této látky.

Např. 250 µM roztok LGR-951

1. 2 µl 50 mM roztoku / 400 µl H₂O
2 µl 100% DMSO / 400 µl H₂O
2 µl 50 mM roztoku / 400 µl H₂O + Silwet (Tween, jar)
2 µl 50 mM roztoku / 400 µl H₂O+ Silwet (Tween, jar)

2. 4 µl 50 mM roztoku / 400 µl H₂O
4 µl 100% DMSO / 400 µl H₂O

4 µl 50 mM roztoku / 400 µl H₂O + Silwet (Tween, jar)
4 µl 50 mM roztoku / 400 µl H₂O+ Silwet (Tween, jar)

3. 10 µl 50 mM roztoku / 400 µl H₂O
10 µl 100% DMSO / 400 µl H₂O

10 µl 50 mM roztoku / 400 µl H₂O + Silwet (Tween, jar)
10 µl 50 mM roztoku / 400 µl H₂O+ Silwet (Tween, jar)

Při měření rozpustnosti byl použit spektrofotometr. Spektrofotometr UV-1601, UV VISIBLE, SPECTROPHOTOMETER, SHAMADZU.

5.4 Výsledky

5.4.1 Použité látky cytokininové povahy

Tabulka 4: Přehled testovaných látek cytokininové povahy.

V této tabulce je zaznamenáno 12 testovaných látek cytokininové povahy ve dvou koncentracích (300 μM a 500 μM). Při těchto koncentracích byla neúčinnější látka LGR-2541 (obr.19, 20 ; graf.č.1). Zbytek látek zaznamenaných v tabulce nijak výrazně nezpůsobil defoliaci listů u bavlníku. Jako kontrola byla použita destilovaná voda obsahující 0,5% DMSO a 0,02% Silwetu 806.

Cytokininy (300 μM ; 500 μM)	
LGR-909	LGR-999
LGR-912	LGR-1000
LGR-915	LGR-1002
LGR-916	LGR-2212
LGR-994	LGR-2213
LGR-996	LGR-2541
LGR-998	LGR-2634

Tabulka 5: Počet listů bavlníku před aplikací látek

V této tabulce je zaznamenán počáteční počet listů bavlníku před aplikací látky LGR-2541.

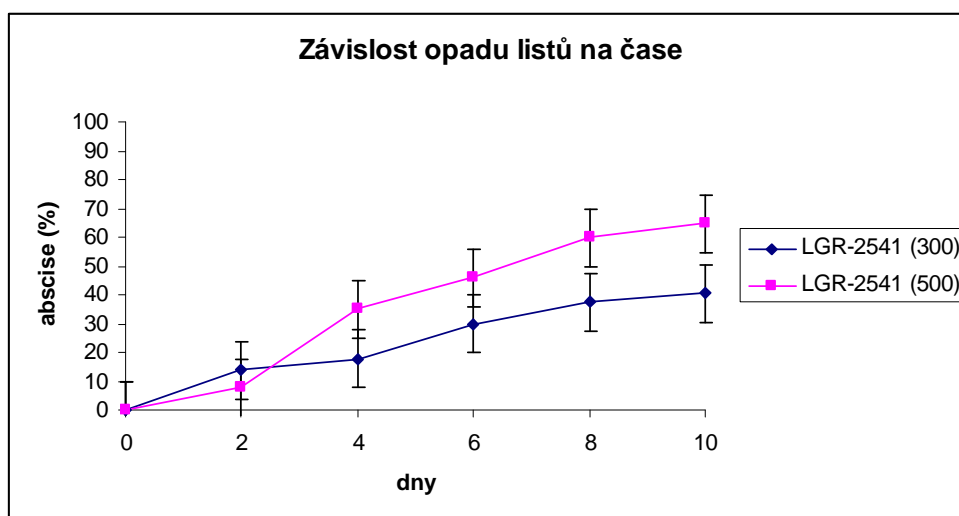
Látky	Květináč číslo 1 (počet listů na začátku měření)		Květináč číslo 2 (počet listů na začátku měření)	
	LGR-2541(300 μM)	10	6	19
LGR-2541(500 μM)	3	16	16	4

Tabulka 6: Průběh opadávání listů v závislosti na čase u LGR-2541 v 300 μM koncentraci

Dny	Květináč číslo 1 (opadané listy)		Květináč číslo 2 (opadané listy)	
0	0	0	0	0
2	1	2	1	1
4	2	2	2	1
6	3	3	5	2
8	5	3	7	2
10	5	3	8	3

Tabulka 7: Průběh opadávání listů v závislosti na čase u LGR-2541 v 500 μM koncentraci

Dny	Květináč číslo 1 (opadané listy)		Květináč číslo 2 (opadané listy)	
0	0	0	0	0
2	0	3	2	0
4	1	6	7	1
6	1	8	8	2
8	1	11	10	3
10	1	13	11	3



Graf 1: Závislost opadu listů na čase

V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem aplikace látky LGR-2541 ve dvou různých koncentracích. Látka LGR-2541 způsobila při 300 μM koncentraci defoliaci 40,5% (obr.č.19) a při 500 μM koncentraci 64,6% (obr.č.19). Křivka kontroly není zaznamenána, jelikož by se shodovala s osou x.



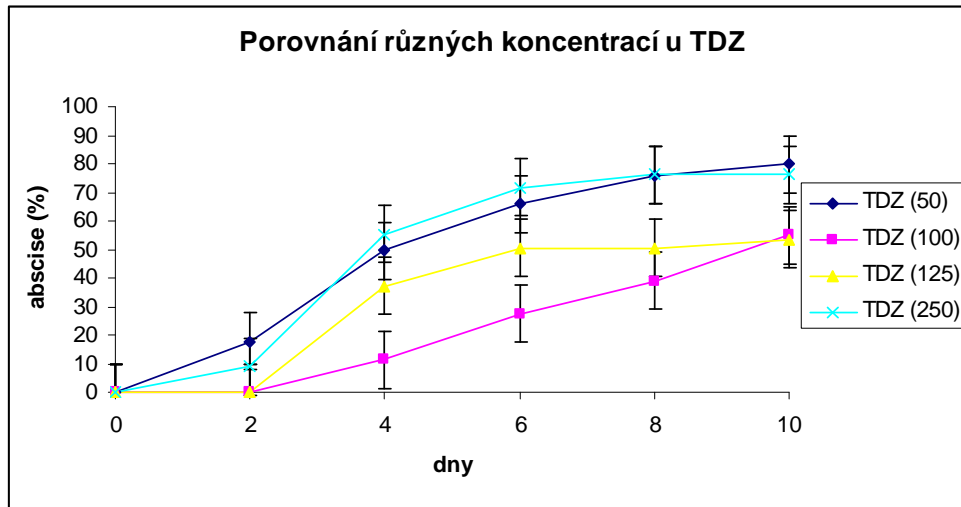
Obrázek 19: Aplikace LGR-2541 (300 μ M)



Obrázek 20: Aplikace LGR-2541 (500 μ M)

5.4.2 Samostatně aplikované růstové regulátory

TDZ (50 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 250 μ M)



Graf 2: Závislost opadu listů na čase po aplikaci látky TDZ ve čtyřech různých koncentracích

V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem aplikace látky TDZ ve čtyřech různých koncentracích. TDZ způsobil při 50 μ M koncentraci defoliaci 80% (obr.č.21), při 100 μ M koncentraci 55 % (obr.č.22), při 125 μ M koncentraci 53,4% (obr.č.23) a při 250 μ M koncentraci 76,1 % (obr.č.24). Jak můžeme vidět, průběh abscise listů při 50 μ M koncentraci je plynulý a listy nesesychají. Při 100 μ M a 125 μ M koncentraci je průběh abscise listů podobný. Jediným rozdílem je sesychání a zůstávání listů na rostlině po šestém dnu. Velice rychlá abscise listů nastala u 250 μ M koncentrace, ovšem seschlé listy zůstávaly na rostlině již po čtvrtém dnu. Křivka kontroly není zaznamenána, jelikož by se shodovala s osou x.



Obrázek 21: Aplikace TDZ (50 μ M)



Obrázek 22: Aplikace TDZ ($100 \mu\text{M}$)

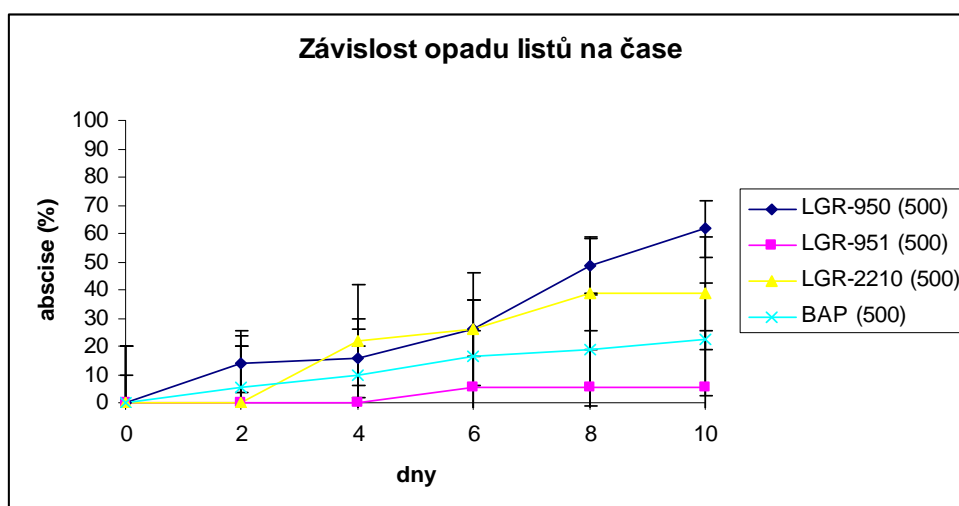


Obrázek 23: Aplikace TDZ ($125 \mu\text{M}$)



Obrázek 24: Aplikace TDZ (250 μ M)

Látky LGR-950, LGR-951, LGR-2210 a BAP v 500 μ M koncentraci



Graf 3: Závislost opadu listů na čase

V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem 500 μ M roztoků LGR-950, LGR-951, LGR-2210 a BAP. Látka LGR-950 způsobila defoliaci 61,8 % (obr.č.25), látka LGR-951 5,4 % (obr.č.26), látka LGR-2210 38,7 % (obr.č.27) a BAP 22,2 % (obr.č.28). Tyto 4 látky byly testovány na základě předchozího měření v mé bakalářské práci, kde vyvolaly nejvyšší účinek na defoliaci bavlníku. Látka LGR-951 způsobila abscisi 89,2 %, látka LGR-950 85,4 % , látka BAP 84% , látka LGR-2210 79,7% a látka LGR-1042 66,3% . Z těchto výsledků můžeme říci, že v 500 μ M koncentraci byla v mé bakalářské práci nejúčinnější látka LGR-951, LGR-950 a BAP. Zde tomu tak není, defoliace byla mnohonásobně menší.



Obrázek 25: Aplikace LGR-950 (500 μ M)



Obrázek 26: Aplikace LGR-951 (500 μ M)

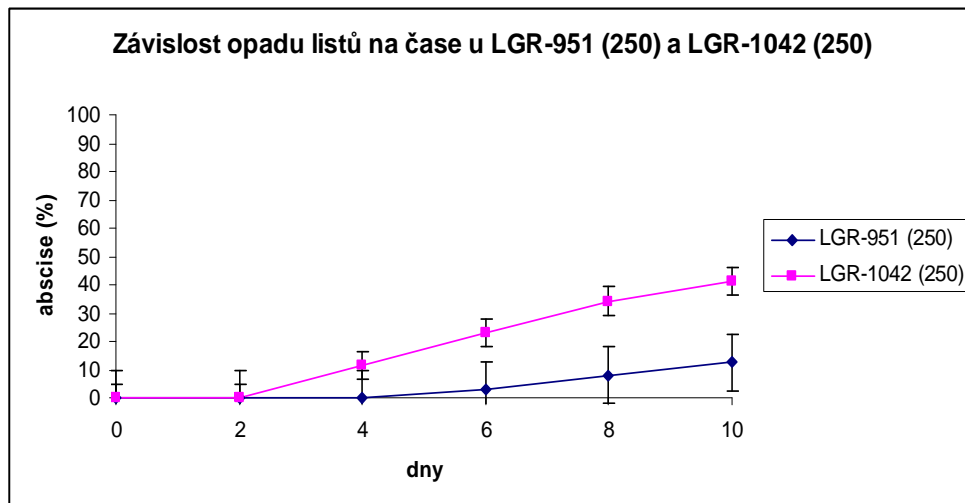


Obrázek 27: Aplikace LGR-2210 (500 μ M)



Obrázek 28: Aplikace BAP (500 μ M)

Látky LGR-951 a LGR-1042 v 250 μ M koncentraci



Graf 4: Závislost opadu listů na čase

V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem 250 μ M roztoků LGR-951 a LGR-1042. Látka LGR-951 způsobila defoliaci 12,7 % (obr.č.29) a látka LGR-1042 41,2 % (obr.č.30). Tyto 2 látky byly použity i v mé bakalářské práci a ve vyšších koncentracích se zařadily mezi nejúčinnější na defoliaci bavlníku. LGR-951 způsobila při 300 μ M koncentraci defoliaci 23,7 % a LGR-1042 8,2%, tyto výsledky se opět neshodují s novými.



Obrázek 29: Aplikace LGR-951 (250 μ M)



Obrázek 30: Aplikace LGR-1042 (250 µM)

NAA v 10 µM koncentraci



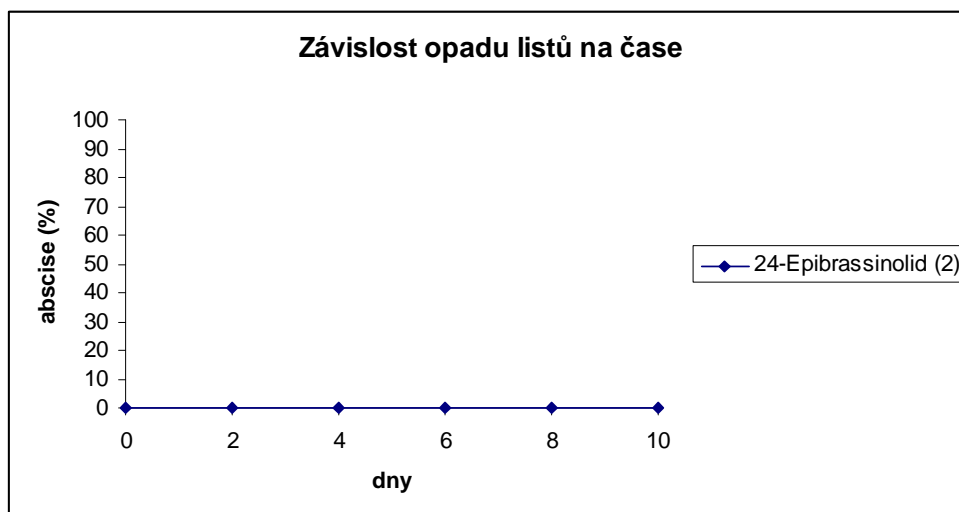
Graf 5: Závislost opadu listů na čase

V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem 10 µM roztoků NAA. Látka NAA nezpůsobila žádnou defoliaci (obr.31).



Obrázek 31: Aplikace NAA (10 μ M)

24-Epibrassinolid v 2 μ M koncentraci



Graf 6: Závislost opadu listů na čase

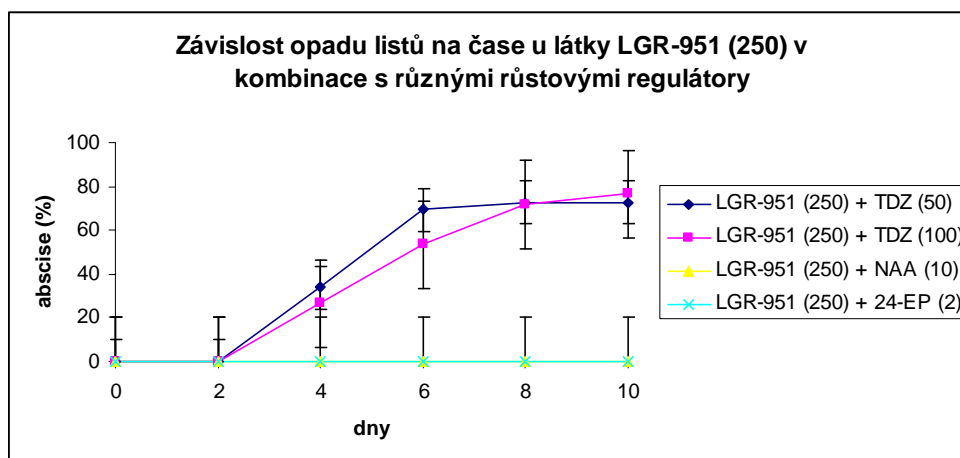
V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem 2 μ M roztoků 24-Epibrassinolidu. Samotný 24-Epibrassinolid nezpůsobil žádnou defoliaci (obr.32).



Obrázek 32: Aplikace 24-Epibrassinolidu ($2 \mu\text{M}$)

5.4.3 Kombinace 2 růstových regulátorů

Kombinace látky LGR-951 v $250 \mu\text{M}$ koncentraci s TDZ, NAA nebo 24-Epibrassinolidem



Graf 7: Závislost opadu listů na čase

V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem $250 \mu\text{M}$ roztoku LGR-951 v kombinaci s TDZ, NAA nebo 24-EP. Jak můžeme vidět, nejúčinnější kombinací je látka LGR-951 s TDZ. Bohužel zde nastal problém se špatnou rozpustností látky LGR-951, a proto mohou být výsledky zkresleny. Defoliaci mohl způsobit samostatně TDZ. Látka LGR-951 s TDZ v $50 \mu\text{M}$ koncentraci způsobila defoliaci 72,8 % (obr.33). Listy nebyly seschlé a opadávaly plynule (obr.35). LGR-951 s TDZ v $100 \mu\text{M}$ koncentraci způsobila defoliaci 76,7 % (obr.34). Listy na rostlině začaly sesychat až na konci měření (obr.36). Ovšem s NAA a 24-EP nedošlo k žádné defoliaci (obr.37, 38). Pravděpodobně neúčinnost látky LGR-951 způsobila její špatná rozpustnost.



Obrázek 33: Aplikace LGR-951 (250 μM) + TDZ (50 μM)



Obrázek 34: Aplikace LGR-951 (250 μM) + TDZ (100 μM)



Obrázek 35: Detail listu po aplikace LGR-951 (250 μM) + TDZ (50 μM)



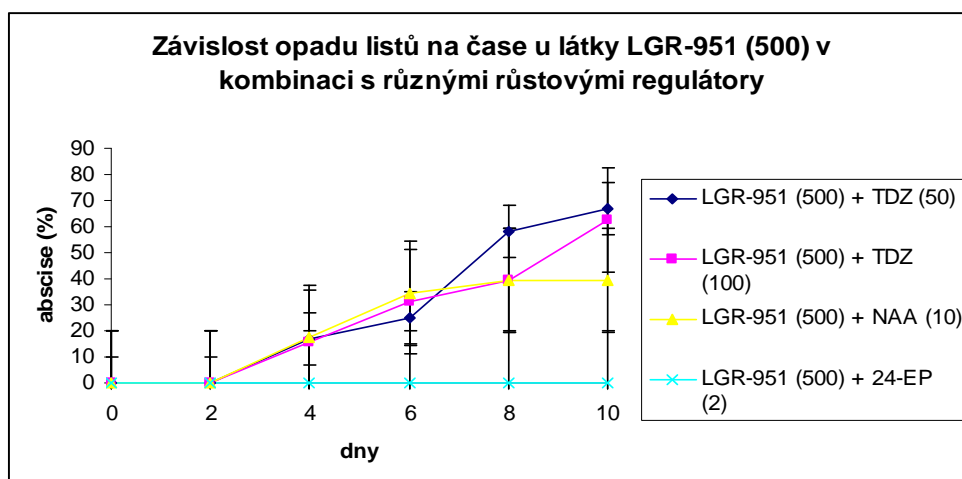
Obrázek 36: Detail listu po aplikace LGR-951 (250 μM) + TDZ (100 μM)



Obrázek 37: Aplikace LGR-951 (250 μ M) + NAA(10 μ M)



Obrázek 38: Aplikace LGR-951 (250 μ M) + 24-EP (2 μ M)



Graf 8: Závislost opadu listů na čase

V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem 500 μ M roztoku LGR-951 v kombinaci s TDZ, NAA nebo 24-EP. Vývoj je velice podobný předcházejícímu měření, kde byla použita nižší koncentrace LGR-951. Jak můžeme vidět, nejúčinnější kombinací je látka LGR-951 s TDZ. Defoliace vystoupala u LGR-951 s TDZ v 50 μ M koncentraci k 66,7 % (obr.39) a u LGR-951 s TDZ v 100 μ M koncentraci 62,8 % (obr.40). LGR-951 v kombinaci s NAA dosáhla defoliaci 39,3 %. (Obr.41), což je rozdílné od předcházejícího měření. I přestože jsme se snažili optimalizovat metodu rozpustnosti, nedošlo ke 100 % rozpustnosti látky.



Obrázek 39: Aplikace LGR-951 (500 μ M) + TDZ (50 μ M)



Obrázek 40: Aplikace LGR-951 (500 μM) + TDZ (100 μM)



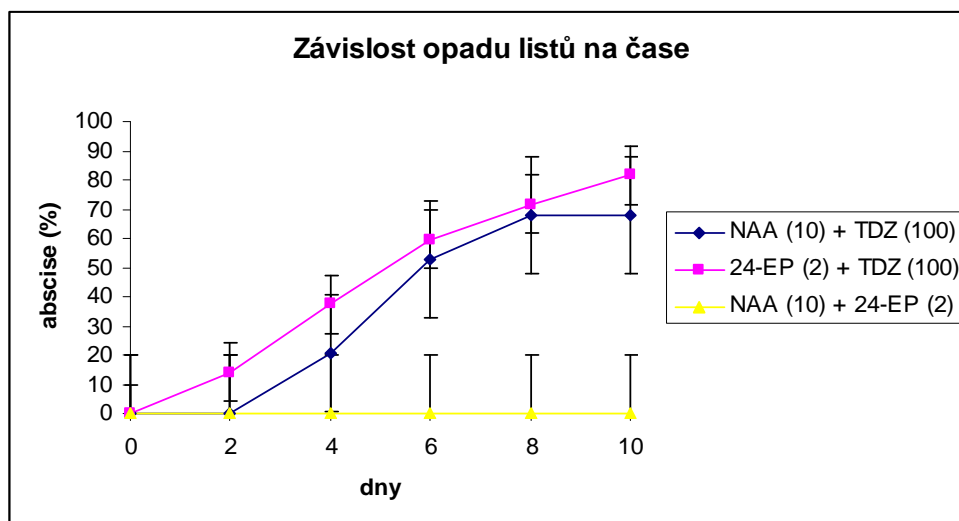
Obrázek 41: Aplikace LGR-951 (500 μM) + NAA (10 μM)



Obrázek 42: Aplikace LGR-951 (500 μM) + 24-EP (2 μM)

Kombinace látek TDZ (100 μM), NAA (10 μM) a 24-Epibrassinolide (2 μM)

Jelikož byl v předcházejícím měření problém s rozpustností látky LGR-951, na místo této látky byl použit komerčně využívaný defoliant. Jedná se o TDZ. Byl kombinován s NAA a 24-Epibrassinolidem. V tomto měření byla navíc vyzkoušena kombinace NAA s 24-Epibrassinolidem.



Graf 9: Závislost opadu listů na čase

V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem kombinací TDZ, NAA a 24-EP. Jak je vidět, největší abscisi způsobila kombinace TDZ s 24-EP (Obr.44). Byla zaznamenána až 81,8 % defoliace. O něco menší defoliaci způsobilo TDZ a NAA, bylo to 67,7 % (Obr.43). Kombinace látek NAA s 24-EP nezpůsobila žádnou defoliaci (Obr.45).



Obrázek 43: Aplikace NAA (10 μ M) + TDZ (100 μ M)



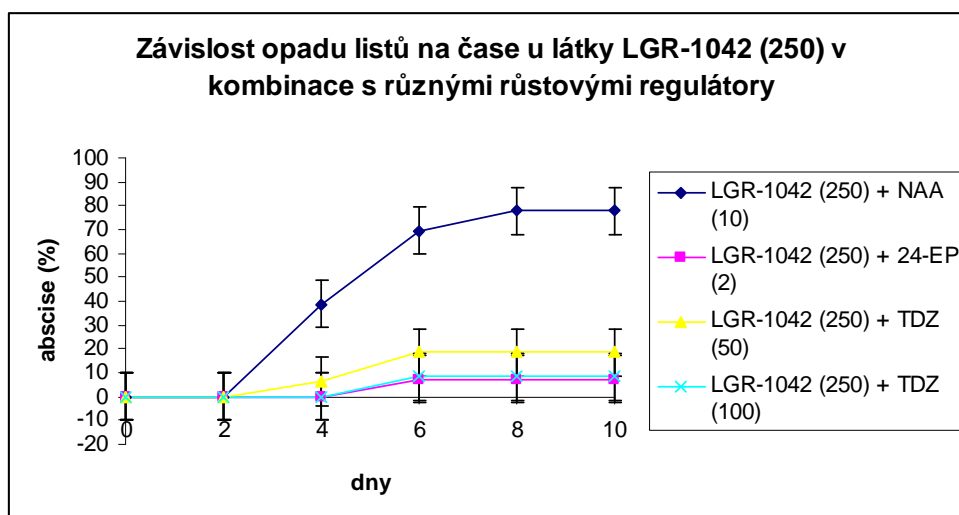
Obrázek 44: Aplikace 24-EP (2 μ M) + TDZ (100 μ M)



Obrázek 45: Aplikace NAA(10 μ M) + 24-EP(2 μ M)

Kombinace látky LGR-1042 v 250 μ M koncentraci s TDZ, NAA nebo 24-Epibrassinolidem

Jak už jsem se zmínila, byl problém s rozpustností látky LGR-951, namísto této látky jsem použila TDZ, kde byla zaznamenána defoliace. Proto byla vyzkoušena další látka cytokininové povahy LGR-1042. Byla kombinována s NAA a 24-Epibrassinolidem a TDZ.



Graf 10: Závislost opadu listů na čase

V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem kombinací látek LGR-1042 v 250 μ M koncentraci s TDZ, NAA a 24-EP. Jak je vidět, největší abscisi způsobila kombinace LGR-1042 s NAA (Obr.46). Byla zaznamenána až 77,7 % defoliace. LGR-1042 v kombinaci s TDZ způsobila malou defoliaci. Listy seschly a zůstaly viset na rostlině (Obr.48, 49). V kombinaci s 24-EP nedošlo téměř k žádné změně, defoliace byla pouhých 7,2 % (Obr.47).



Obrázek 46: Aplikace LGR-1042 (250 μ M) + NAA(10 μ M)



Obrázek 47: Aplikace LGR-1042 (250 μ M) + 24-EP (2 μ M)



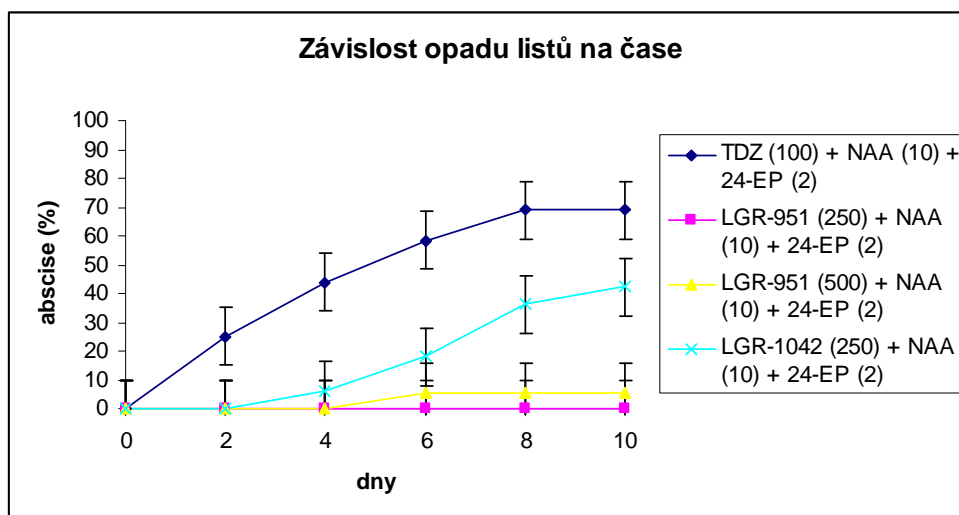
Obrázek 48: Aplikace LGR-1042 (250 μ M) + TDZ (50 μ M)



Obrázek 49: Aplikace LGR-1042 (250 μ M) + TDZ (100 μ M)

5.4.4 Kombinace 3 růstových regulátorů (cytokininy, auxiny, brassinosteroidy)

Při testování účinnosti látek na defoliaci bavlníku byly vyzkoušeny i kombinace tří růstových regulátorů. Kombinovala jsem cytokininy s auxiny a brassinosteroidy. Z auxinů jsem použila NAA, z brassinosteroidů 24-EP a z cytokininů TDZ, LGR-1041 nebo LGR.951. Výsledky jsou zaznamenány v grafu 11.



Graf 11: Závislost opadu listů na čase

V tomto grafu je zaznamenán průběh defoliace listů bavlníku vlivem kombinací cytokininů, auxinů a brassinosteroidů. Jak je vidět, největší abscise způsobila kombinace TDZ s NAA a 24-EP (Obr.50). Byla zaznamenána 68,8 % defoliace a nedošlo k žádnému seschnutí listů. LGR-1042 v kombinaci s NAA a 24-EP způsobila defoliaci 42,4% (Obr.53). LGR-951 a NAA a 24-EP způsobila jen nepatrnou defoliaci (Obr.51, 52). Příčinou může být špatná rozpustnost látky LGR-951.



Obrázek 50: Aplikace TDZ (100 μM) + NAA (10 μM) + 24-EP (2 μM)



Obrázek 51: Aplikace LGR-951 (250 μM) + NAA (10 μM) + 24-EP (2 μM)



Obrázek 52: Aplikace LGR-951 (500 μM) + NAA (10 μM) + 24-EP (2 μM)



Obrázek 53: Aplikace LGR-1041 (250 μM) + NAA (10 μM) + 24-EP (2 μM)

5.5 Diskuse

Hlavním cílem této diplomové práce bylo ověřit a optimalizovat metodu testování látek na defoliaci bavlníku (*Gossipium herbaceum*). Byly testovány 3 druhy fytohormonů. Látky cytokininové povahy, auxiny, brassinosteroidy a jejich kombinace. Tyto látky mohou mít vliv na defoliaci bavlníku, která je nejspíše způsobena produkcí ethylenu. Součástí chemických přípravků na defoliaci bavlníku je nejčastěji komerčně využívaný thidiazuron. Jedná se o látku cytokininové povahy. Úkolem práce bylo nalézt látky, které mají podobný či větší účinek na defoliaci bavlníku.

Tato diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci. Byly vybrány další látky cytokininové povahy, které byly testovány. Aplikovala jsem celkem 14 nových látek cytokininové povahy, ale nezpůsobily téměř žádnou defoliaci. Měření bylo u každé látky opakováno dvakrát ve dvou různých koncentracích (300 μM a 500 μM). Za zmínku stojí pouze látka LGR-2541, která způsobila při 300 μM koncentraci defoliaci 40,5 % a při 500 μM koncentraci dokonce 64,6 %.

V předchozí práci byly za nejúčinnější považovány v 500 μM koncentraci tyto látky v následujícím pořadí. LGR-951 > LGR-950 > BAP > LGR-2210 > TDZ > LGR-1042. Jejich aktivita je ovlivněna přítomností různých substituentů v poloze R_1 , R_2 a R_3 . Bylo prokázáno, že přítomnost halogenů v poloze R_1 má dobrý vliv na aktivitu cytokininů. Pokud se v poloze R_2 vyskytuje ribozil, dochází ke zvýšení účinku cytokininů a zároveň zlepšuje jeho rozpustnost. Tyto látky byly testovány i v mé diplomové práci, ale jejich účinnost se bohužel nepotvrdila. Látka LGR-951 byla velice špatně rozpustná, což mohlo mít vliv na výsledky. Bohužel se nám nepodařilo optimalizovat metodu rozpustnosti. Látka LGR-950 již dříve způsobila defoliaci 85,4 %, nyní 61,8 %. LGR-2210 způsobila defoliaci 79,7 %, ale nyní pouze 38,7 %. BAP již dříve způsobil defoliaci 84 %, a nyní pouhých 22 %. Nově zjištěné hodnoty neodpovídaly výsledkům, a proto ověření účinnosti těchto látek bude předmětem dalších studií.

Dalším úkolem bylo zjistit, která koncentrace TDZ bude nejvhodnější pro aplikaci růstových regulátorů v různých kombinacích. Již v bakalářské práci se ukázalo, že použití 500 μM roztoku TDZ by nejspíš nemělo význam na mechanickou sklizeň, jelikož listy zůstávaly na rostlině seschlé a samotná rostlina uhynula. Vzhledem k tomu, že bavlník je rostlina, která se využívá i v druhém roce, je třeba nalézt vhodnější koncentraci. TDZ bylo testováno ve čtyřech různých koncentracích, v 50 μM , 100 μM , 125 μM a 250 μM . Ukázalo se, že nejvhodnější koncentrací pro defoliaci bavlníku by mohla být 50 μM a 100 μM koncentrace. Listy opadávaly během deseti dnů postupně a nesesychaly. Zatímco 125 μM a 250 μM koncentrace způsobila rychlý nástup defoliace, ale v průběhu měření (přibližně 6.den) došlo k sesychání listů a jejich zůstávání na rostlině. Rostlina po aplikaci těchto dvou koncentrací zůstává živá.

Na defoliaci bavlníku nebyly testovány pouze cytokininy, ale také samostatné auxiny a brassinosteroidy. Z auxinů jsme aplikovali v 10 μM koncentraci IAA a z brassinosteroidů v 2 μM koncentraci 24-Epibrassinolid. Samostatně aplikované látky nezpůsobily žádnou defoliaci listů bavlníku. Proto byly dále zkoušeny různé kombinace těchto růstových regulátorů. Při zpracování výsledků jsem nebrala až tak velký zřetel na výsledky s látkou LGR-951, jelikož látka byla velice špatně rozpustná, což mohlo mít vliv na nynější dosažené výsledky. Kombinace s touto látkou byly účinné pouze s TDZ.

Jelikož byla látka LGR-951 velice špatně rozpustná, použili jsme místo ni jiné cytokininy, čili TDZ a LGR-1042. Tyto cytokininy byly kombinovány s IAA a 24-EP. Nejvyšší účinnost na defoliaci bavlníku byla projevna kombinací TDZ s 24-EP. Bylo dosaženo 81,8 % defoliace. Při aplikaci TDZ s NAA došlo k defoliaci 67,7 %. Byla vyzkoušena také kombinace NAA a 24-EP, ovšem žádný efekt na defoliaci nenastal. V dalším měření byla místo TDZ vyzkoušena látka z LRR, čili LGR-1042. Nejvyšší účinek nastal kombinací LGR-1042 a NAA. Došlo k 77,7 % defoliaci. Další kombinace této látky na vliv defoliace byly zanedbatelné. Aplikace těchto kombinací vycházela z článku *Effect of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in Arabidopsis thaliana plants* (Arteca and Arteca, 2008). Mé naměřené hodnoty se neshodují s výsledky tohoto článku na produkci ethylenu. V článku byla nejvyšší produkce ethylenu prokázána aplikací auxinů 2,4-D, NAA a IAA. Pokud byla rostlina ošetřena samostatným brasinnolidem, neměla žádný efekt na produkci ethylenu. Nicméně když byl brassinolid použit v kombinaci s IAA, nastal dramatický nárůst v produkci ethylenu nad produkci, kterou vyvolala samostatně aplikovaná látka IAA. Nemůžeme tedy 100 % tvrdit, že defoliace listů je prokazatelně způsobena produkcí ethylenu. Nicméně ověření účinnosti těchto látek bude předmětem dalších studií.

Na závěr byly vyzkoušeny i trojkombinace těchto látek. Kombinace TDZ s NAA a 24-EP způsobila defoliaci 68,8 % a kombinace LGR-1042 s NAA a 24-EP pouhých 42,4%.

6 Závěr

Práce měla za úkol shromáždit dostupné zdroje a vypracovat literární rešerší na dané téma. Dále měla za úkol otestovat vybrané růstové regulátory a jejich kombinace na defoliaci bavlníku. Aplikací těchto látek jsme chtěli nalézt látky, které mají stejný nebo vyšší účinek, než komerčně využívaný thidiazuron. Všechny výsledky jsou zpracovány v experimentální části a shrnuty v diskusi.

7 Příloha

Foto 1 Falkony



Foto 2 Falkony



Foto 3 Aplikace



Foto 4 Aplikace



Foto 5 Fytotron



Foto 6 Fytotron



8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Kyselina indolyl-3-octová (IAA).....	13
Obrázek 2: Schema polárního transportu auxinů	15
Obrázek 3: Kinetin	20
Obrázek 4: Biosyntéza cytokininů	22
Obrázek 5: Ethylen.....	25
Obrázek 6: Kompletní oxidace ethylenu	25
Obrázek 7: Biosyntéza ethylenu.....	27
Obrázek 8: Brassinoli	31
Obrázek 9: Léto na bavlníkové plantáži. Rostliny začínají kvést.	36
Obrázek 10: První kvítky. Uzářené bílé květy se zabarvují do růžova.....	36
Obrázek 11: Bavlníkový květ (plně rozvinut).....	36
Obrázek 12: Květy již odkvetly a začíná se vyvíjet tobolek.	37
Obrázek 13: V tobolece postupně zrají bavlníková semena chráněná chomáčky vláken....	37
Obrázek 14: Během zrání tobolek mění barvu přes hnědou až do černé.	37
Obrázek 15: Jakmile tobolek dozraje, pukne.	38
Obrázek 16: Plně rozevřená tobolek.	38
Obrázek 17: Dozrálý, měkký a načechraný bavlníkový chomáček.	38
Obrázek 18: Obecný vzorec modifikovaných benzylaminopurynů.....	42
Obrázek 19: Aplikace LGR-2541 (300 μM).....	49
Obrázek 20: Aplikace LGR-2541 (500 μM).....	49
Obrázek 21: Aplikace TDZ (50 μM)	50
Obrázek 22: Aplikace TDZ (100 μM)	51
Obrázek 23: Aplikace TDZ (125 μM)	51
Obrázek 24: Aplikace TDZ (250 μM)	52
Obrázek 25: Aplikace LGR-950 (500 μM).....	53
Obrázek 26: Aplikace LGR-951 (500 μM).....	53
Obrázek 27: Aplikace LGR-2210 (500 μM).....	54
Obrázek 28: Aplikace BAP (500 μM)	54
Obrázek 29: Aplikace LGR-951 (250 μM).....	55
Obrázek 30: Aplikace LGR-1042 (250 μM).....	56
Obrázek 31: Aplikace NAA (10 μM).....	57
Obrázek 32: Aplikace 24-Epibrassinolidu (2 μM).....	58

Obrázek 33: Aplikace LGR-951 (250 μ M) + TDZ (50 μ M)	59
Obrázek 34: Aplikace LGR-951 (250 μ M) + TDZ (100 μ M)	59
Obrázek 35: Detail listu po aplikace LGR-951 (250 μ M) + TDZ (50 μ M).....	60
Obrázek 36: Detail listu po aplikace LGR-951 (250 μ M) + TDZ (100 μ M).....	60
Obrázek 37: Aplikace LGR-951 (250 μ M) + NAA(10 μ M)	61
Obrázek 38: Aplikace LGR-951 (250 μ M) + 24-EP (2 μ M)	61
Obrázek 39: Aplikace LGR-951 (500 μ M) + TDZ (50 μ M)	62
Obrázek 40: Aplikace LGR-951 (500 μ M) + TDZ (100 μ M)	63
Obrázek 41: Aplikace LGR-951 (500 μ M) + NAA (10 μ M)	63
Obrázek 42: Aplikace LGR-951 (500 μ M) + 24-EP (2 μ M)	64
Obrázek 43: Aplikace NAA (10 μ M) + TDZ (100 μ M)	65
Obrázek 44: Aplikace 24-EP (2 μ M) + TDZ (100 μ M).....	65
Obrázek 45: Aplikace NAA(10 μ M) + 24-EP(2 μ M).....	66
Obrázek 46: Aplikace LGR-1042 (250 μ M) + NAA(10 μ M)	67
Obrázek 47: Aplikace LGR-1042 (250 μ M) + 24-EP (2 μ M)	67
Obrázek 48: Aplikace LGR-1042 (250 μ M) + TDZ (50 μ M)	68
Obrázek 49: Aplikace LGR-1042 (250 μ M) + TDZ (100 μ M)	68
Obrázek 50: Aplikace TDZ (100 μ M) + NAA (10 μ M) + 24-EP (2 μ M)	70
Obrázek 51: Aplikace LGR-951 (250 μ M) + NAA (10 μ M) + 24-EP (2 μ M).....	70
Obrázek 52: Aplikace LGR-951 (500 μ M) + NAA (10 μ M) + 24-EP (2 μ M).....	71
Obrázek 53: Aplikace LGR-1041 (250 μ M) + NAA (10 μ M) + 24-EP (2 μ M).....	71

9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Členění růstových herbicidů do chemických skupin.	18
Tabulka 2: Přehled některých používaných defoliantů.	40
Tabulka 3: Přehled modifikovaných benzylaminopurynů testovaných v bakalářské práci.	42
Tabulka 4: Přehled testovaných látek cytokininové povahy.	47
Tabulka 5: Počet listů bavlníku před aplikací látek	47
Tabulka 6: Průběh opadávání listů v závislosti na čase u LGR-2541 v 300 μ M kon.	47
Tabulka 7: Průběh opadávání listů v závislosti na čase u LGR-2541 v 500 μ M kon.	48

10 Seznam grafů

Graf 1: Závislost opadu listů na čase	48
Graf 2: Závislost opadu listů na čase po aplikaci látky TDZ ve čtyřech různých kon.....	50
Graf 3: Závislost opadu listů na čase	52
Graf 4: Závislost opadu listů na čase	55
Graf 5: Závislost opadu listů na čase	56
Graf 6: Závislost opadu listů na čase	57
Graf 7: Závislost opadu listů na čase	58
Graf 8: Závislost opadu listů na čase	62
Graf 9: Závislost opadu listů na čase	64
Graf 10: Závislost opadu listů na čase	66
Graf 11: Závislost opadu listů na čase	69

11 Seznam použité literatury

1. Amasino, R. 1995: Kinetin Arrives. The 50th Anniversary of a New Plant Hormone. *Plant Physiology* **138**, 2005. 1177-1184.
2. Asami, T., Nakano, T., Fujiok, S. Plant brassinosteroid hormones. *Vitam Horm* **72**, 2005. 479-504.
3. Arteca, J. and Arteca, R. Brassinosteroid-induced exaggerated growth in hydroponically grown Arabidopsis plants. *Physiologia Plantarum* **112**, 2001. 104-112.
4. Arteca, J. and Arteca, R. Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in Arabidopsis thaliana plants. *Journal of Experimental Botany*, 2008. 3019-3026.
5. Bajguz, A. and Tretyn, A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* **62**, 2003. 1027-1046.
6. Burmester, Ch., Moks, C.D., Patterson, G.M. Cotton defoliation. Alabama Cooperative Extension System. Alabama University and Auburn University, 2009.
7. Clouse, S.D. Brassinosteroid signal Transduction: Clarifying the Pathway from Ligand Perception to Gene Expression. *Molecular Cell* **10**, 2002. 973-982.
8. Fišerová, H., Mikušová, Z., Klemš, M. Estimation of ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in plants by means of gas chromatography. *Plant soil environ* **54**, 2008. 55-60.
9. Grossmann, K. Induction of Leaf Abscission in Cotton Is a Common Effect of Urea- and Adenine-Type Cytokinins. *Plant Physiol.*, 1990. 234-237.
10. Havel, J. Aplikace brassinosteroidů na mák. Sborník z konference prosperující olejnin, 2006. 96-98.
11. Hess, D. Fyziologie rostlin. 1.vyd. Praha: Academisa, 1983. 341 s.
12. Higuchi, M. In planta function of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Plant. Nat. USA: Academia*, 2004. 821-886.
13. Jirásek, F. Pěstujeme teplomilné rostliny. 1.vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství 1955.
14. Jursík, M., Soukup, J., Holec, J., Andr, J. Růstové herbicidy (syntetické auxiny). Listy cukrovarnické a řepařské. Česká zemědělská univerzita v Praze 3, 2011. 127 s.
15. Khripach, V., Zhabinskii, V., Groot, A. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI century. *Annals of Botany* **86**, 2000. 441-447.

16. Kincl, M., Krpeš, V. Základy fyziologie rostlin. 2.doplň. vyd. Ostrava: montanex, 2000. 221 s. ISBN 80-7225-041-8.
17. Kováč, J. Kapitoly z rostlinné fyziologie. Ústí nad Labem: pedagogická fakulta, 1991.
18. Kuhn, V. Pestovanie rastlin specialne pestovanie. 2.vyd. Bratislava: Slovenské nakladateľství podohospodárskej literatúry, 1957.
19. Luštinec, J., Žárský, V. Úvod do fyziologie vyšších rostlin. 1.vyd. Praha: Karolinium, 2005. 261 s. ISBN 80-246-0563-5.
20. Normlanly, J. rethinking Auxin Biosynthesis and Metabolism. *Plant Physiol.*, 1995. 323-329.
21. Novák, J., Skalinsky, M. Botani II. Systém rostlin. 1.vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2007. ISBN 978-80-213-1688-1.
22. Nováček, F. Fytochemické základy botaniky, 1.vyd. Olomouc: UP, 1986.
23. Nováček, F. Fytochemické základy botaniky, 1.vyd. Olomouc: UP, 1990.
24. Ono, E.O., Nakamura, T., Machado, R.S., Rodrigues, J.D. Application of brassinosteroid to *Tabebuia alba* (bignoniaceae) plants. *Department of Botany* **12**, 2000. 187-194.
25. Pastýrik, L. Fyziologia rastlin. 1.vyd. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľství, 1979. 310 s.
26. Pavlová, L., Krpeš, V. Fyziologie rostlin. 1.vyd. Praha : Karolinium. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze, 2005. 253 s. ISBN 80-246-0985-1.
27. Procházka, S., Krpeš, V. Fyziologie rostlin. 1.vyd. Praha: Academia, 1998. 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
28. Sakakibara, H. AtIPt3 is a key Determinant of Nitrate-Dependent cytokinin Biosynthesis in Arabidopsis. *Kluwer Academic Publishers*, 2004. 95-112.
29. Sakakibara, H. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation, *Annu.rev. Plant. Biol.* **57**, 2006. 431-439.
30. Seidlová, F., Pavlová, L., Lažímalová, E. Fytohormony- Jak s rostlinami cvičí hormony. *Vesmír* **532**, 2008.
31. Šťastná, L. Vliv cytokininových analog na defoliaci bavlníku. Olomouc. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, 2010.
32. Stepanová, A. Alonso, J. Ethylene signaling and response pathway: unique signaling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiologia Plantarum* **123**, 2005. 195-206.
33. Švihra, J. Fyziológia rastlin. 1.vyd. Bratislava: Příroda, 1981. 383 s.

34. Taiz, L., Zeiger, E. *Plant Physiology*. 4.vyd. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 2006. 543-632.
35. Tarkowski, P., Doležal, K., Strnad, m. Analytické metody studia cytokininů. *Chem. Listy* 98, 2004. 834-841.
36. Ústav vědeckých informací pro zemědělství. *Naučný slovník zemědělský*, 1.vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1966. 64 s.
37. Valíček, P. *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. 2.vyd. Praha: Academia, 2002. 486 S.
38. Werner, T., Schmulling, T., Cytokinin action in plant development. *Current opinion in Plant Biology*. Berlin. *Institute of Biology Applied Genetics*, 2009. 1-12.
39. Yokota, T. The history of brassinosteroids: Discovery to isolation of biosynthesis and signaling mutants. *Department of Biosciences. Teikyo University*, 1999.
40. Yi, H.Ch., Joo, J., Nam, K.U., Lee, J.S., Kang, B.G., Kim, W.T. Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Molecular Biology* **41**, 1999. 443-454.
41. Zalabák, D., Pospíšilová, H., Šmehilová, M., Mřízová, K., Frébort, I., Galuzska, P. Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural fruits of crop plants. *Biotechnol. Adv. Article in press*, 2011.

INTERNETOVÝ ZDROJ:

1. AUXINY [online] [cit.2012-2.21.] Dostupný z < URL:
<http://cs.wikipedia.org/wiki/auxiny>
2. BAVLNA [online] [cit.2012-3.15.] Dostupný z < URL:
http://www.osel.cz/index.php/clanek_2250
3. BRASSINOLID [online] [cit.2012-2.18.] Dostupný z < URL:
<http://chemickelisty.cz/Bulletin/bulletin261/brasi.htm>
4. COTTON DEFOLIATION [online] [cit.2012-2.23.] Dostupný z < URL:
<http://msucares.com/pubs/infosheets/is0529.pdf>
5. Čížková. Růst a vývoj : Fytohormony.5c_fytohormon.pdf, 2008 [online] Dostupný z < URL:
http://home.zf.jcu.cz/public/department/kbd/fyzroaek/fyzro_1_zen/5c_fytohormony.pdf

6. DEFOLIATING COTTON UNDER AD VERSE CONDITIONS: Drought stress, Cool temperatures and Rank Growth_Virginia Cooperative Extension [online] [cit.2012-2.23.] Dostupný z < URL: <http://pubs.ext.vt.edu/427/427-208/427-208.html>.
7. HISTORIE BAVLNY [online] [cit.2012-2.23.] Dostupný z < URL: http://www.bavlna.info/historie/historie_bavlny.html.
8. KINETIN [online] [cit.2012-2.23.] Dostupný z < URL: <http://www.mbio.au.dk/reslabs/kinetin.jpg>.
9. ŠKŮDCI [online] [cit.2012-3.15.] Dostupný z < URL: http://www.rozhlas.cz/leonardo/priroda/_zprava/199493
10. ŠKŮDCI [online] [cit.2012-3.15.] Dostupný z < URL: <http://oko.yin.cz>
11. VYUŽITÍ BAVLNY [online] [cit.2012-3.15.] Dostupný z < URL: www.baabio.cz/news/vyuziti_bavlny
12. ŽIVOTNÍ CYKLUS BAVLNÍKU [online] [cit.2012-3.15.] Dostupný z < URL: http://www.amwa.cz/clanky/zivotni_cyklus_bavlniku