



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

TRANSPORT HUMINOVÝCH LÁTEK SKRZ ROSTLINNOU KUTIKULU

TRANSPORT OF HUMIC SUBSTANCES THROUGH PLANT CUTICLE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Hývnarová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1357/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Lucie Hývnarová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Transport huminových látek skrz rostlinnou kutikulu

Zadání bakalářské práce:

1. Seznámit se s problematikou huminových látek a rostlinných kutikul s důrazem na transport.
2. Seznámit se s možnostmi studia transportu huminových látek skrz kutikuly.
3. Na základě poznatků získaných v předchozích bodech navrhnout metody vhodné ke studiu a provést experimenty.
4. Zhodnotit výsledky experimentů a navrhnout další postup.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Lucie Hývnarová
student(ka)

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

HÝVNAROVÁ, Lucie. *Transport huminových látek skrz rostlinnou kutikulu*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113545>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovávala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce.

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské paní prof. Ing. Martině Klučákové, PhD. za poskytnuté rady, vstřícnost, pomoc a trpělivost při řešení bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Marcela Smilkové za pomoc a rady při přípravě difúzních párů.

ABSTRAKT

Ve své bakalářské práci se zabývám transportem lignohumátu skrz rostlinnou kutikulu. Konkrétně se zabývám transportem skrz listovou kutikulu, která se dělí na horní a spodní. Rozdíl mezi horní a spodní kutikulou je ten, že spodní kutikula obsahuje stomata.

Abych mohla studovat tento transport, bylo nejprve třeba si kutikuly z listu vyseparovat. Použila jsem dvě metody izolace, chemickou, která je agresivnější, ale za to je časově méně náročná (trvá 3 dny) a metodu chemickou, která je sice jemnější, ale trvá déle (cca 6 týdnů). Z vyseparovaných kutikul jsem vytvořila difúzní páry, které se skládají ze zdrojového gelu, kde je agarózový gel s lignohumátem a příjmového gelu, kde je pouze čistý agarózový gel. U těchto difúzních párů byl po dobu 10 - ti dnů monitorován časový vývoj koncentračních profilů pomocí UV-VIS spektrometrie a byla sledována difúze zdrojového gelu do gelu příjmového. Na základě Fickových zákonů a jejich řešení pro tzv. difúzi v páru nekonečných medií byl stanoven difúzní koeficient lignohumátu v hydrogelu a následně posouzen vliv izolovaných kutikul jako bariéry na rozhraní mezi oběma hydrogely. Ze získaných výsledků vyplývá, že nejlépe difunduje lignohumát přes spodní kutikulu, která byla vyseparována pomocí chemické metody izolace. Chemická izolace je mnohem drastičtější než metoda enzymatická, protože se při ní používá chlorid zinečnatý, který je žíravý a poškozuje celulózu. Tudíž při této izolaci pravděpodobně dochází k poškození struktury, což vede ke zvýšení propustnosti membrány. Spodní kutikula navíc obsahuje stomata, kterými mohl lignohumát snadněji procházet.

KLÍČOVÁ SLOVA

huminové látky, hydrigel, penetrace, rostlinná kutikula, transport

KEY WORDS

humic substances, hydrogel, penetration, plant cuticle, transport

ABSTRACT

In my bachelor thesis I deal with the transport of lignohumate through the plant cuticle. Specifically, I deal with transport through the leaf cuticle, which is divided into upper and lower cuticles. The difference between the upper and lower cuticles is that the lower cuticle contains vents.

To study this transport, it was first necessary to separate the cuticles from the leaf. I used two methods of chemical isolation, which is more aggressive, but it is less time consuming (3 days) and a chemical method that is softer but takes longer (about 6 weeks). I created

diffuse vapors from the separated cuticles, which consist of a source gel, where the lignohumate agarose gel and the intake gel are purely agarose gel. In these diffuse pairs, the time profile of the concentration profiles was monitored by UV-VIS spectrometry for 10 days and diffusion of the source gel into the uptake gel was monitored. Based on Fick's laws and their solution for diffusion in a pair of infinite media, the diffusion coefficient of lignohumate in the hydrogel was determined and the effect of isolated cuticles as a barrier at the interface between the two hydrogels was assessed. The results show that lignohumate diffuses best through the lower cuticle, which was separated by a chemical isolation method. Chemical isolation is much more drastic than the enzymatic method because zinc chloride is used, which is corrosive and damages cellulose. Thus, in this isolation, the cuticle structure is damaged and thereby reduced, resulting in increased membrane permeability.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Huminové látky	9
2.1.1	Co to jsou huminové látky	9
2.1.2	Vznik huminových látek	9
2.1.2.1	Teorie kondenzace cukrů s aminy.....	10
2.1.2.2	Waksmanova ligninová teorie.....	11
2.1.2.3	Flaigova polyfenolová teorie	12
2.1.3	Dělení huminových látek	13
2.1.4	Využití huminových látek v zemědělství	15
2.2	Listová kutikula	15
2.3	Metody izolace rostlinných kutikul	17
2.3.1	Enzymatická izolace dle W. H. Orgella	17
2.3.2	Enzymatická metoda izolace dle L. Schreiber a J. Schönherra	17
2.3.3	Chemická metoda izolace.....	18
2.4	Studium transportu kapalin přes rostlinné kutikuly.....	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	19
3.1	Použité chemikálie.....	19
3.2	Enzymatická metoda izolace kutikul	19
3.3	Chemická metoda izolace kutikul.....	19
3.4	Příprava vzorků.....	20
3.4.1	Separace kutikul	20
3.4.2	Příprava gelů	21
3.4.2.1	Čistý agarózový gel (příjmový gel)	21
3.4.2.2	Agarózový gel s lignohumátem (zdrojový gel).....	21
3.4.3	Příprava difúzních párů	21
3.5	Měření vzorků.....	22
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	23
4.1	Fickovy zákony.....	23
4.1.1	Difúzní koeficient.....	25
4.1.2	Koncentrace lignohumátu v příjmových gelech po dobu měření	27
5	ZÁVĚR.....	31

6	POUŽITÉ REFERENCE	32
---	-------------------------	----

1 ÚVOD

V této bakalářské práci se zabývám transportem huminových látek skrze rostlinnou kutikulu. Huminové látky jsou látky, které se přirozeně vyskytují v půdě. Vznikají rozkladem rostlinných a živočišných zbytků za činnosti mikroorganismů. Jejich výskyt v půdě zvyšuje kvalitu, úrodnost půdy, dodává potřebné živiny kořenům rostlin, čímž zvyšuje kvalitu, růst a výnosnost plodů. Huminové látky mohou vznikat několika způsoby, já jsem ve své bakalářské práci popsala tři nejdůležitější a vědci nejvíce přijímané metody. První z nich je vznik kondenzací cukrů s aminy, druhá metoda představuje vznik huminových látek z ligninu podle Waksmana. Třetí a zároveň poslední zde popsaná metoda je polyfenolová metoda dle Flaiga.

Rostlinná kutikula se nachází na povrchu nadzemních částí rostlin. V této bakalářské práci se konkrétně zabývám pouze kutikulou, která se nachází na listech. Existuje kutikula vrchní, a kutikula spodní, na které se nacházejí průduchy. Kutikula je tvořena vosky kutinem a kutanem a dalšími vosky. Hlavní její funkcí je ochrana rostliny před vnějšími vlivy, jako jsou déšť, vítr, prach, mikroorganismy, hmyz a další. Má za úkol ale také regulovat příjem vody. Kutikula je hlavní překážkou pro hnojiva. Ve své bakalářské práci tedy sleduji, jestli a jak hodně hnojiva procházejí skrze rostlinnou kutikulu.

Pro mou praktickou část jsem jako zástupce huminových látek použila lignohumát, který se jako hnojivo používá. Studovala jsem transport lignohumátu z gelu do gelu pomocí soustavy kyvet, kdy v jedné byl agarózový gel s lignohumátem a ve druhé byl čistý agarózový gel. Mezi těmito kyvetami se nacházela kutikula (horní nebo spodní) a po té byla sledována difúze lignohumátu. Připravila jsem si i slepé vzorky, u kterých byla sledována difúze bez kutikul.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Huminové látky

Nejprve si popíšeme, co to huminové látky jsou, poté se podíváme na vznik huminových látek dle různých teorií. Další částí této kapitoly bude dělení huminových látek. V závěru této kapitoly bude popsáno využití huminových látek v zemědělství.

2.1.1 Co to jsou huminové látky

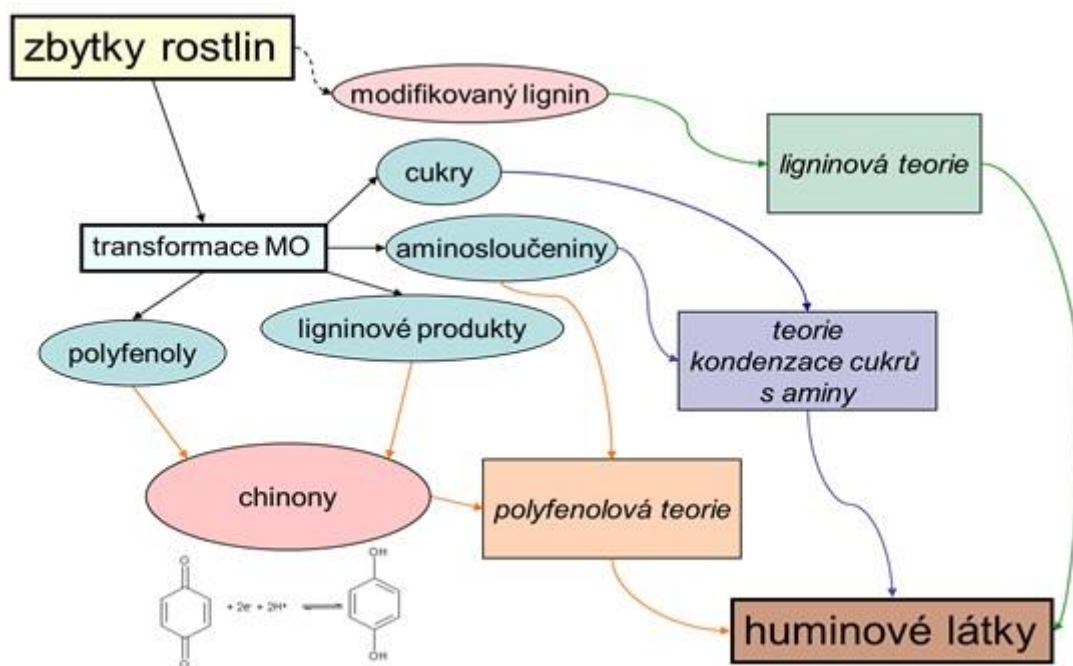
Huminové látky jsou látky organického původu (rostlinného i živočišného). Můžeme je nalézt v půdě a to konkrétně v humusu, což je část půdy, která je nejvýživnější a vzniká rozkladem odumřelých těl rostlin a živočichů.

V dostatečně vlhkém a anaerobním prostředí vznikají z ligninu a hnědého uhlí oxyhumolity, což jsou nejvýznamnější zdroje huminových látek. Lignin představuje vysokomolekulární systém, který je hlavním zdrojem huminových látek. Ty můžeme také nalézt v kompostech, léčivých bahnech, rašelině, ale lze je nalézt také v jílovitých nebo stojatých vodách, ale to pouze ve stopovém množství. [5] [8]

2.1.2 Vznik huminových látek

Huminové látky vznikají procesem, který je podmíněný syntézou dekompozitů hmoty organického původu. Tento proces zapříčiňují mikroorganismy a je nazýván humifikací. Při tomto procesu jsou upevňovány vazby mezi polárními a nepolárními látkami, a tím se zvyšuje schopnost přijímat živiny jako jsou stopové prvky, aminokyseliny, lipidy a tak podobně.

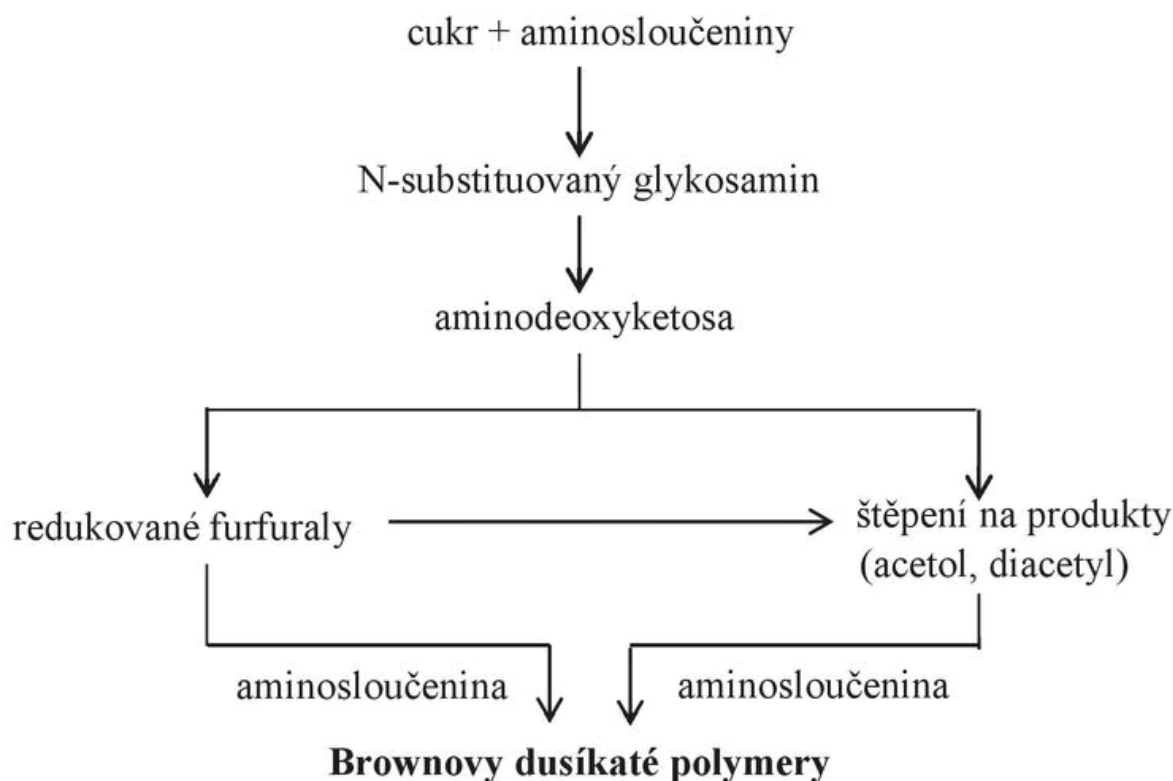
Teorií o vzniku huminových látek existuje celá řada. Já v této práci ovšem zmíním pouze tři nejdůležitější a vědci nejpřijímanější teorie. Schéma těchto tří teorií je uvedeno na Obr. 1. [7]



Obr. 1: Celkový přehled teorií vysvětlujících mechanismus vzniku huminových látek [6]

2.1.2.1 Teorie kondenzace cukrů s aminy

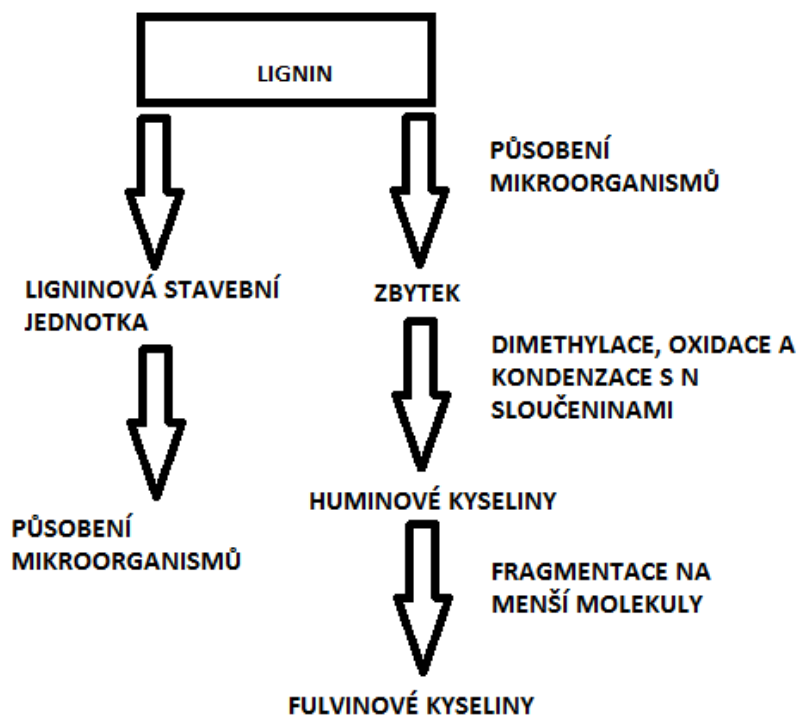
Stěžejním bodem této teorie jsou mikroorganismy, které rozkládají půdní organický materiál, tento rozklad zapříčiní kondenzaci monomerů redukujících cukrů s aminokyselinami. Následuje adice aminoskupin (-NH₂) na karboxylové skupiny (-COOH) monosacharidů a vznikají N-substituované glykosylaminy. Následují reorganizace, cyklizace a dekarboxylace v molekule a vznikají tři uhlíkaté kyslíkaté zbytky (glyceraldehyd, dihydroxyaceton) a ty mohou polymerizovat v přítomnosti aminokyselin za vzniku hnědě zbarvených produktů. Schéma je uvedeno na Obr. 2. [8]



Obr. 2: Teorie kondenzace cukrů a aminy

2.1.2.2 Waksmanova ligninová teorie

Dlouhá léta vědci předpokládali, že huminové látky byly odvozeny z ligninu. Pro mikroorganismy je, na rozdíl od ostatních rostlinných složek, těžce rozložitelný. Zbytek ligninu, který mikroorganismy nevyužijí, tedy zůstane nerozložený a dochází zde k mnoha modifikacím jako například ztráta methoxylových skupin (OCH₃) doprovázená vznikem o-hydroxyfenolů a oxidací alifatických postranních řetězců za vzniku karboxylových skupin (COOH). Materiál, který vznikl touto modifikací, slouží jako předmět pro další přeměny, kdy vzniknou huminové kyseliny a poté fulvinové kyseliny. Schéma je uvedeno na Obr. 3.[9]

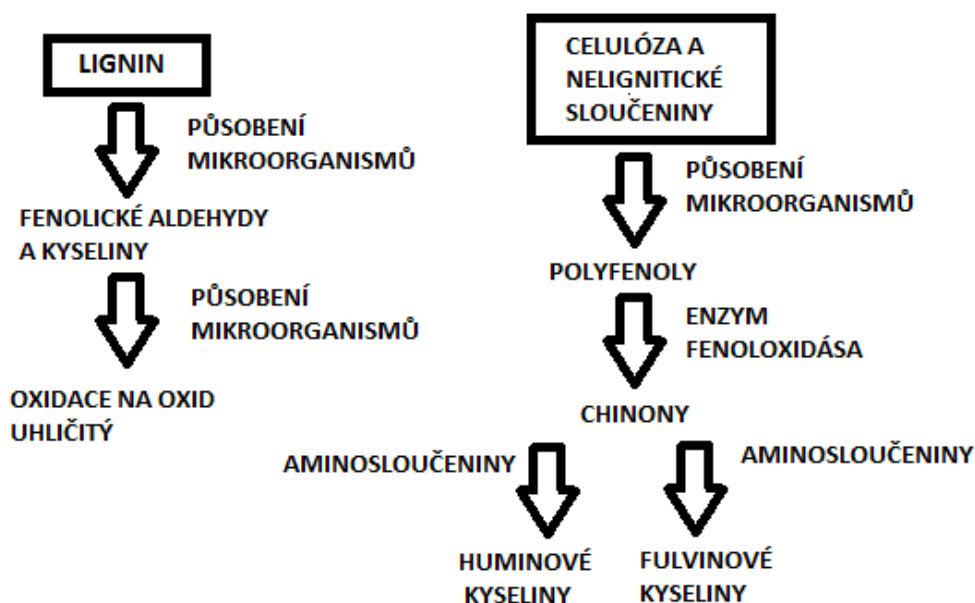


Obr. 3: Waksmanova ligninová teorie

2.1.2.3 Flaigova polyfenolová teorie

Flaigova teorie je vědci nejvíce uznávanou metodou vzniku huminových látek. Na počátku máme nízkomolekulární látky, které tvoří velké molekuly pomocí kondenzace a polymerace. Tato teorie má dvě podoby. Jedna cesta vychází se z toho, že fenolické aldehydy a kyseliny z ligninu jsou mikrobiálně atakovány, a tím dochází k přeměně na chinony. Tyto chinony dále podléhají polymerizaci za vzniku huminových makromolekul.

Druhá cesta se zabývá tím, že polyfenoly jsou syntetizovány mikroorganismy např. z celulózy a ty jsou enzymaticky oxidovány na chinony, které jsou následně převedeny na huminové látky. Proces je zobrazen na Obr. 4. [22]

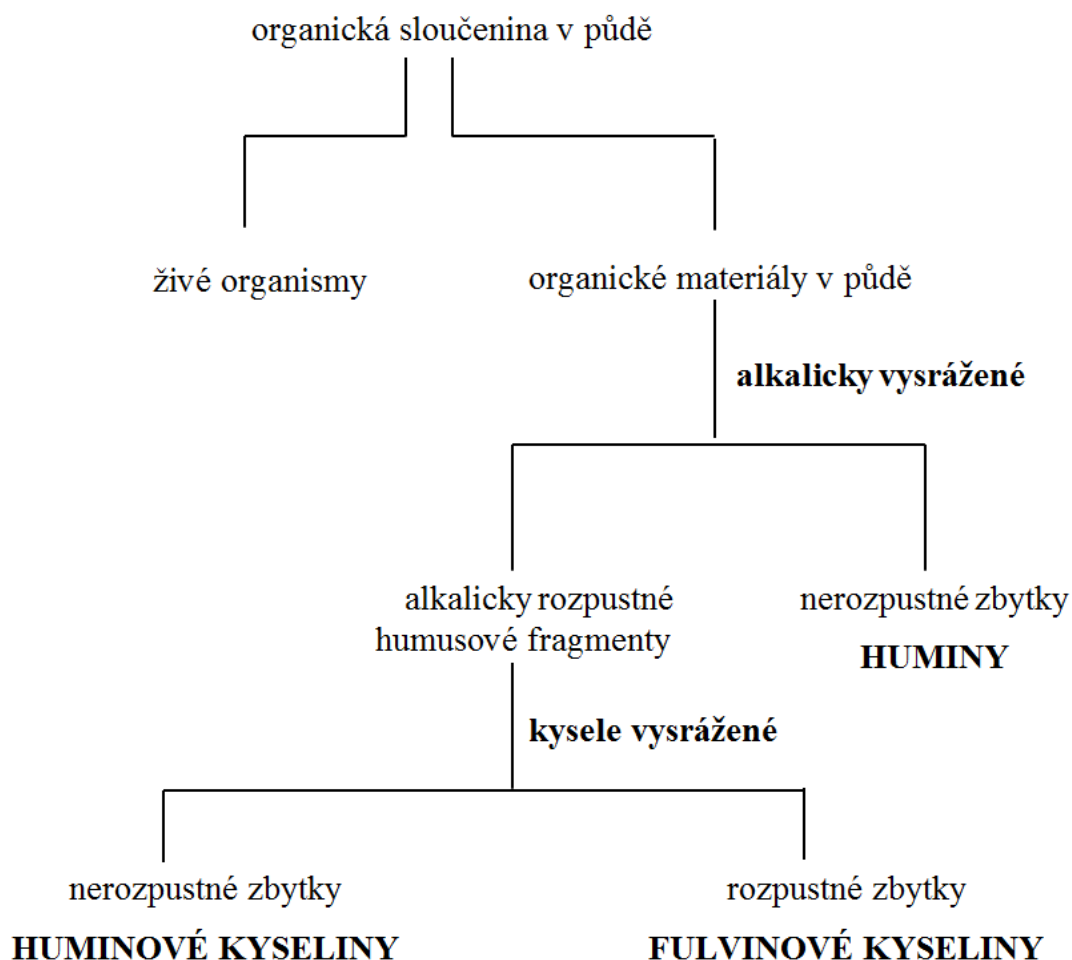


Obr. 4: Flaugova polyfenolová teorie

Huminové kyseliny jsou nejdůležitější huminovou látkou, neboť huminové kyseliny pomáhají zpevňovat půdu a přenášejí živiny z půdy do rostlin. Díky tomu, že jsou huminové látky schopné udržet vodu v půdě, tak urychlují klíčení semen a také rozvíjí půdní mikroflóru. Pro půdu jsou nesmírně důležité i bakterie, protože vylučují enzymy, které katalyzují uvolňování vápníku a fosforu z nerozpustných fosfátů. [1]

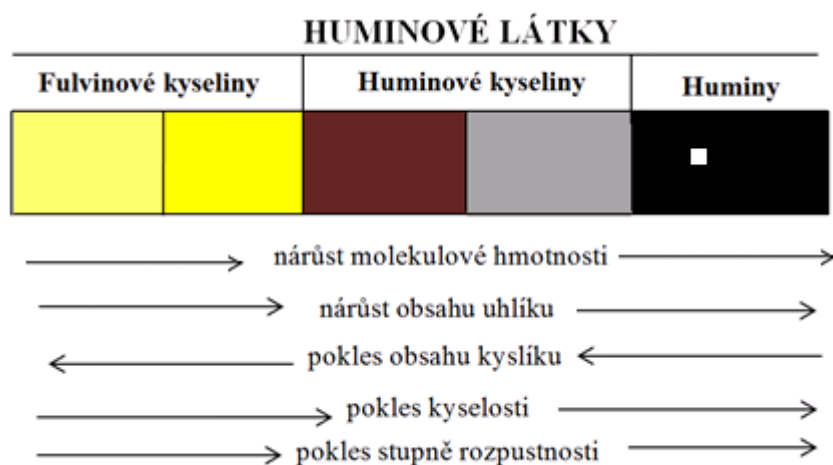
2.1.3 Dělení huminových látek

V dnešní době dělíme huminové látky na tři různé typy. Prvním typem jsem fulvinové kyseliny, ty jsou frakcí huminových látek, tato frakce se rozpouští jak v kyselém, tak i v bazickém prostředí. Fulvinové kyseliny se tak mohou rozpouštět v celém rozsahu pH. Druhým typem huminových látek jsou huminové kyseliny. Tyto látky jsou rozpustné pouze v alkalickém prostředí, v kyselém prostředí se srážejí a vznikají koaguláty, pH ale musí být nižší než 2, protože s rostoucí hodnotou pH dochází k postupné disociaci nejdříve karboxylových a poté i fenolických skupin. Rozpustnost tedy souvisí s nízkou disociací funkčních skupin obsažených v hlavní kostře skeletu. Třetím a posledním typem jsou huminy. Huminy tvoří všechny ostatní nerozpustné látky, které jsou přítomny v půdní organické hmotě, a které nemůžeme převést do roztoku žádnou acidobazickou úpravou. Přehled vzniku všech frakcí je uveden na Obr. 5. [1]



Obr. 5: Klasifikace jednotlivých frakcí huminových látek [1]

Huminové látky nám určují kvalitu půdy a jsou nesmírně důležité pro její úrodnost. Jejich strukturu vždy tvoří uhlík, kyslík, vodík a dusík, bez ohledu na to jakou cestou vznikly. Huminové látky nám tedy ukazují úrodnost a kvalitu půdy a jsou nesmírně důležité pro její úrodnost. Huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a huminy jsou si svou strukturou velmi blízké, ale po fyzikální stránce se odlišují. Typické vlastnosti jsou shrnuty na Obr. 6. [10]



Obr. 6: Přehled vlastností huminových látek [1]

Jedním z hlavních rozdílů jednotlivých frakcí huminových látek je jejich barevná odlišnost, jak jde vidět na Obr. 6. Fulvinové kyseliny jsou zbarveny do žluta, kdežto huminové látky jsou tmavě hnědé, některé tedy šedé. Nejtmavší barvou se vyznačují nerozpustné zbytky huminových sloučenin, neboli huminy, které jsou tmavě šedé až černé.

Z Obr. 6 je taky známo, že jednotlivé frakce huminových látky mají velké rozdíly v molekulové hmotnosti. Nejnižší molekulovou hmotnost mají fulvinové kyseliny, jejich hmotnost se pohybuje okolo 2000 *Da*, díky tomu se označují jako nízkomolekulární frakce. Molekulová hmotnost stoupá přes huminové kyseliny až k huminům, jejichž hmotnost dosahuje až 30000 *Da* a můžeme je označovat jako vysokomolekulární frakce. Kromě odlišného stupně polymerace se huminy odlišují od ostatních frakcí také strukturou, počtem aromatických cyklů, počtem funkčních skupin (karboxylová, hydroxylová, apod.). [1]

2.1.4 Využití huminových látek v zemědělství

Huminové látky významně ovlivňují kvalitu a úrodnost půdy, tudíž jsou hojně využívány při pěstování plodin. Zlepšují její fyzikální vlastnosti, obsah vlhkosti a úrodnost. Huminové látky jsou schopny tvořit cheláty s mikroprvky a to usnadňuje příjem živin rostlinnými buňkami, toho se využívá při klíčení a růstu rostlin. [11]

Huminové látky také zvyšují produkci biomasy především tím, že v místě kořenů udržují ve vodě rozpustná organická hnojiva a snižuje se tak jejich vyluhování. Přispívají k příjmu makroelementů (N, P, K) a mikroelementů (Fe, Zn, a další), vážou toxické látky a tím jim brání v jejich shromažďování se v rostlinách. Katalýza mnohých biologických procesů má vliv na zvýšení obsahu živin (sacharidů a lipidů) a zvýšení vitamínů jako jsou vitamín C a β -karoten v rostlinách. Jejich úkolem je také zvýšit adsorpci fotonů a CO₂ z uhlíčitanů, což má pozitivní vliv na fotosyntézu.

Dalí výhodou huminových látek je ta, že jsou na sebe schopny navázat vodu, což zapříčiní to, že rostlinné kořeny neuhnívají. Zvyšují životaschopnost rostliny, mají pozitivní vliv na rozvoj kořenové soustavy, podporují rozvoj žádoucích mikroorganismů v půdě. Dokáží ale na sebe navázat i pesticidy, těžké kovy, dioxiny a viry, což zabraňuje jejich přechodu dále do potravního řetězce. Zabraňují úniku toxických sloučenin a dusíku do spodních vod.

Huminové látky tedy mají významnou roli v systému půda – rostlina – zvíře – produkt – člověk a mohou působit jako intezifikační faktor i jako prostředek, který snižuje zdravotní rizika. [12]

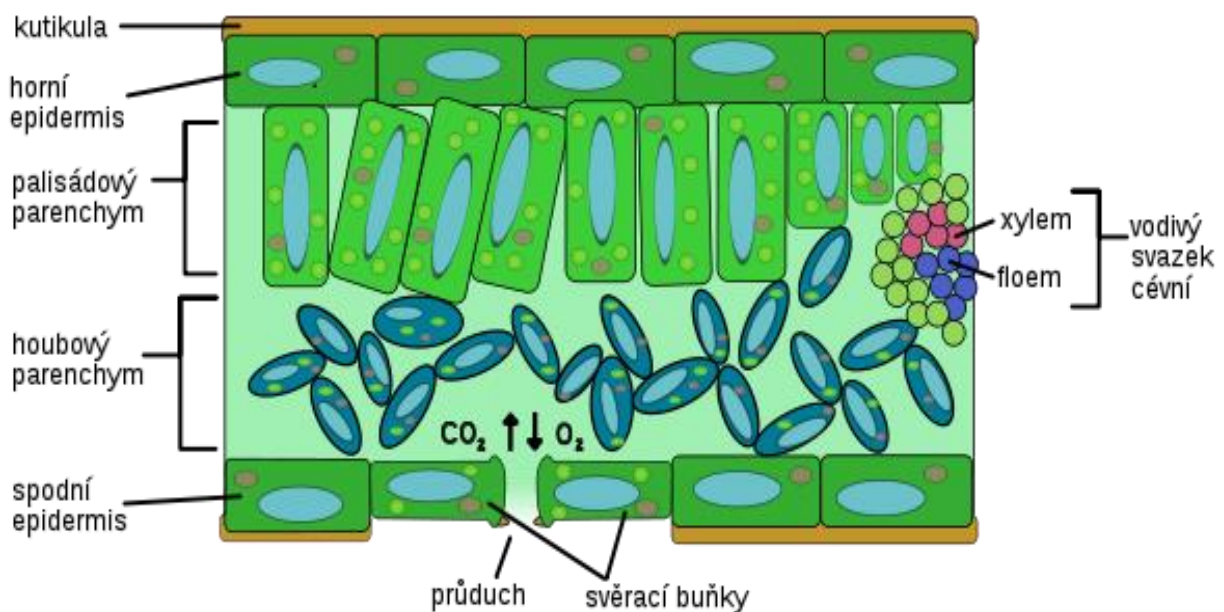
2.2 Listová kutikula

Kutikula je nebuněčná vrstva na povrchu nadzemních částí rostlin, tato vrstva rostlinám poskytuje ochranu hlavně proti slunečnímu záření, výparům a různým patogenům. Je to povrchová vrstva vosku, která působí hydrofobně, omezuje únik metabolitů z vnitřních pletiv a zabraňuje vniku znečišťujících látek z prostředí. Hlavní složkou rostlinné kutikuly jsou degradovatelné biopolymery kutin, nedegradovatelný polymer kutan a asociované rozpustné kutikulární vosky. Jako kutin označujeme skupinu vysokomolekulárních sloučenin složených z polyhydroxymastných kyselin. Kutin impregnuje vnější celulózní vrstvy stěny, a dále tvoří v kombinaci s vosky samostatnou vrstvu na vnějším povrchu pokožky – kutikula.

Na vnějším povrchu se ještě mohou ukládat samostatné vrstvy vosků, které snižují propustnost pro vodu a dávají povrchu listu ojíněný vzhled. Rozvoj těchto hydrofobních vrstev má úzký vztah k prostředí, kde se rostlina nachází. Vrstva kutikuly je nepatrná (nebo chybí úplně) u vodních rostlin nebo rostlin v blízkosti vlhkých míst. Na rozdíl od rostlin, které žijí ve velmi suchém prostředí, tam je vrstva kutikuly velmi silná. [13]

I když je kutikula převážně lipofilní povahy, jsou zde přítomny i hydrofilní struktury. Kutin obsahuje hydroxylové a karboxylové skupiny a v kutikulární membráně se nacházejí i polysacharidy jako pektin a celulóza, které mají vysokou hydratační kapacitu. Voda díky kutikule nezvlhčuje pokožku a v kapkách stéká a odnáší s sebou prach a znečištění. Některé rostliny, zejména ty, které jsou přizpůsobené k životu ve vlhkém nebo vodném prostředí, mají zvýšenou odolnost proti namočení. Tato úprava není pouze fyzikálním nebo chemickým účinkem voskového povlaku do značné míry závisí na mikroskopickém tvaru povrchu. [14]

Rostlinná kutikula představuje hlavní překážku pro agrochemikálie, které jsou aplikovány na povrch listu. Iontové sloučeniny (většina aplikovaných živin) využívají pro svůj vstup přes kutikulu polární póry, které jsou vyplněné vodou a procházejí kutikulární membránou. V kutikule je těchto hydrofilních pórů velké množství (1010/cm²), většinou o průměru do 1 nm. Předpokládá se, že v bezprostředním okolí svěracích buněk průduchů a trichomů je jejich hustota vyšší a liší se i průměrem a propustností. Zároveň bylo zjištěno, že velikost pórů se liší mezi jednotlivými rostlinnými druhy. Umístění kutikuly na listu je zobrazeno na Obr. 7. [2]



Obr. 7: Anatomie listu [23]

2.3 Metody izolace rostlinných kutikul

2.3.1 Enzymatická izolace dle W. H. Orgella

Tato metoda je velice šetrná, jelikož k rozkladu mezofylu používá pouze biologicky aktivní látku a to enzym pektinázu.

Tato metoda spočívá v tom, že se pomocí korkového řezáku vyřezou z čerstvě natrhaných listů disky o průměru 1,8 cm a umístí se do kádinky. Izolační roztok obsahuje přibližně 2 ml pufrovaného pektinového enzymového roztoku na disk, tento roztok obsahuje 100 ppm merthiolátu, který zde působí jako konzervační prostředek, tudíž zabraňuje růstu mikroorganismů.

Aby listy nemohly stoupat ke hladině, zatíží se kovovým sítkem. Listy tak jsou celé ponořené v roztoku a nedochází k plesnivění. K rychlejšímu rozkladu mezofylu můžeme použít přerušované vakuum, nebo dát kádinku na třepačku (100 ot/min; poloměr otáčení 2,5 cm) při teplotě 35°C.

Po uplynutí doby, po které se rozložil veškerý mezofyl, přeneseme listy i se sítkem do vody, kdy po několika promytích nám na sítu zůstanou kutikuly a zbytek rozložených pletiv se odplaví. Listové kutikuly poté uložíme v destilované vodě, která obsahuje 100 ppm Mertiolátu, který zase zabraňuje zplesnivění.

Orgell pro tento typ experimentu použil dva druhy enzymu a to enzym 19 a pektinázu, která se ukázala jako vhodnější volba, protože lépe rozkládá mezofyl, ale také ho rozkládá mnohem rychleji. [15]

2.3.2 Enzymatická metoda izolace dle L. Schreiber a J Schönherra

Při této metodě si nejprve musíme připravit mladé a zdravé listy, ze kterých nejprve musíme vyříznout disky o průměru 1,5 cm a připravit si izolační roztok. Ten se skládá z 0,1 M pufru, který obsahuje kyselinu citrónovou a citrát sodný a jeho výsledné pH se musí pohybovat v rozmezí 3-4, při tomto pH se enzymům nejvíce daří. K izolačnímu roztoku musí být přidáno i konzervační činidlo, v tomto případě byl použit azid sodný a to tak, aby konečná koncentrace byla 0,001 mol/l. K takto připravenému roztoku poté přidáme pektinázu v 1 - 2 hm. %.

Pomocí experimentů se zjistilo, že stačí použít pektinázu, která se využívá na ovoce a ve vinařském průmyslu. Tyto enzymy jsou méně nákladné, ale dosáhne se s nimi stejných výsledků. S dalšími experimenty vědci dokonce zjistili, že je možné použít kombinaci pektinázy a celulózy, což vyjde ještě o něco výhodněji.

Pro urychlení experimentu, můžeme zase použít přerušované vakuum, nebo opět vzorek temperovat na teplotu mezi 30-40 °C. Pokud tak neučiníme, experiment se může prodloužit až o několik týdnů.

Tyto experimenty probíhaly po dobu 20 dní a výsledkem byl tmavě hnědý roztok, ve kterém byly odseparované kutikuly, tyto kutikuly přemístíme do nádoby s deionizovanou vodou, která pomůže k úplnému odstranění buněčných zbytků. [16]

2.3.3 Chemická metoda izolace

Touto metodou se zabýval Edgington a je zaměřena na transkutikulární permeabilitu fungicidů. Postup přípravy u chemické metody je velmi podobný postupu u enzymatické metody izolace, ovšem tato metoda je drastičtější. Nejprve si připravíme z mladých a zdravých listů kotouče o průměru 1,3 cm a izolační roztok. Ten se v tomto případě skládá z 60 hm. % roztoku chloridu zinečnatého rozpuštěného v koncentrované kyselině chlorovodíkové. Izolační roztok infiltrujeme do listů za pomoci přerušovaného vakua a izolace probíhá po dobu 2-3 dnů. Poté přeneseme směs do nádoby s vodou, kde dojde k odstranění kutikul pomocí špachtle, která je namočená do roztoku streptomycinu (30 µm), který byl temperován na hodnotu 4 °C.

U této metody musíme po separaci kutikul zjistit jejich stav pod mikroskopem, protože i sebemenší poškození má obrovský vliv na experimenty. A zároveň tím rozdělíme kutikuly na horní a spodní. Musíme postupovat velmi rychle, protože hrozí dehydratace kutikul. [21]

2.4 Studium transportu kapalin přes rostlinné kutikuly

Vědci si uvědomují, jak důležitý je transport aktivních látek skrz listovou kutikulu, protože tato schopnost příjmu nutričních látek hraje velmi důležitou roli v systémových aktivitách rostlin. Efekt povrchových a kapalných hnojiv na transport fungicidů, byl studován na kutikulách, které pocházely z rostliny *Bryolhyllum clycinum*. Roztoky fungicidů se tak rovnou pipetovaly na kutikulu, která byla umístěná na agarózovém hydrogelu, jehož součástí byly i výtrusy typu *Claudosporium claudosporioides*. Poté co uběhla doba potřebná k penetraci, bylo provedeno měření průměru inhibičních zón. Velikost těchto zón byla měřena na základě toho, že fungicidy byly pipetovány zvlášť na kutikulu, a zvlášť na agarózový gel. Na základě tohoto měření bylo zjištěno, že kutikulární efekt penetrace aktivních látek má minoritní podíl, ve srovnání s penetrací přímo na gel. Dále bylo prokázáno, že prostupnost látek skrz kutikuly vede ke snížení průměrů inhibičních zón.

Pro tuto metodu studia transportu, musel být připraven gel o pH 6,5, který byl nalit do čistých a suchých petriho misek, kde byl ponechán do zchladnutí. Na takto připravený gel, byla rozprostřena kutikula, na kterou byl pomocí mikropipety aplikován fungicidní přípravek, petriho miska byla uzavřena víkem a celá směs byla ponechána penetraci. Tento systém byl průběžně měřen po dobu tří dnů, kdy byly zaznamenávány inhibiční zóny vzniklé při průniku. [17]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Enzymatická metoda izolace:

- kyselina citronová;
- citrát sodný;
- pektináza;
- celulóza;
- azid sodný;

Chemická metoda izolace:

- chlorid zinečnatý;
- kyselina chlorovodíková;

Hydrogely:

- agaróza;
- lignohumát (Amagro s.r.o.).

3.2 Enzymatická metoda izolace kutikul

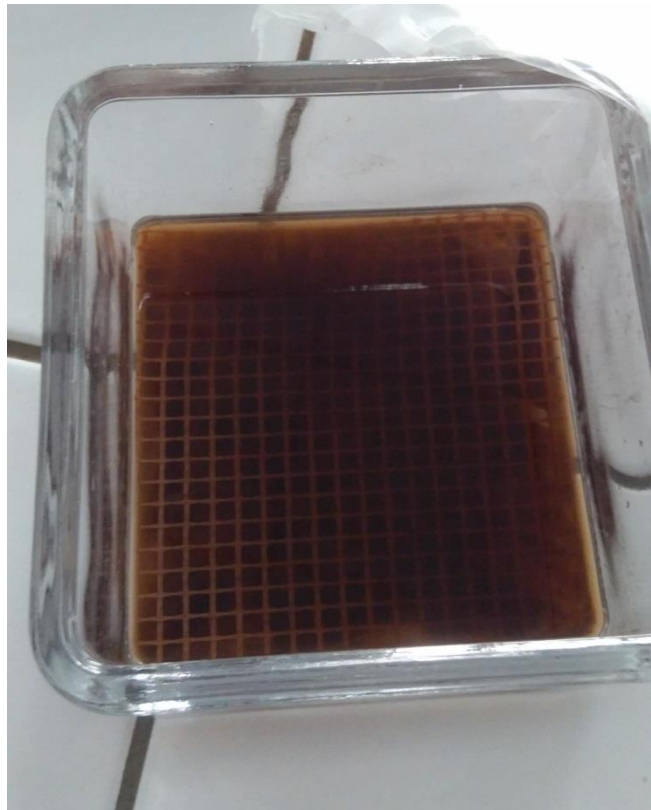
Abychom mohli studovat transport lignohumátu skrz rostlinnou kutikulu, je potřeba nejdříve odseparovat kutikulu z listu. Pro šetrnější separaci kutikul jsme zvolili enzymatickou izolaci dle Schreiber a Schönherra, kterou jsme ale upravili. Prvním krokem bylo sesbírání zdravých a mladých listů rostliny bobkovišně lékařské. Tyto listy byly očištěny v nádobce s destilovanou vodou, kde došlo k odstranění nečistot a prachu na listu. Poté byl z listu odstraněn řapík a okrajové části listu, čímž jsme z listu vyřezali obdélníky. Takto připravené listy byly vloženy do misky a zakryty plastovou mřížkou, aby nedocházelo k jejich vzlínání k povrchu.

Izolační roztok se skládá z pufru, který vznikl rozpuštěním 3,11 gramů kyseliny citronové a 1,5 gramu citrátu sodného v 1 dm³ destilované vody. Pro svou izolaci jsem použila 90 ml tohoto pufru, po 5 gramech enzymů (celulózy, pektinázy) a 10 ml azidu sodného, který zde zastává funkci konzervačního prostředku. Tímto roztokem byly zality očištěné a vyřezané listy. Miska byla zakryta pomocí parafilmu, aby nedocházelo k odpařování roztoku. Tato izolace probíhala po dobu 6 - ti týdnů.

3.3 Chemická metoda izolace kutikul

Tato metoda je sice drastičtější než metoda enzymatická, ale zato je mnohem rychlejší. Prvním krokem pro uskutečnění této izolace je sesbírání mladých a zdravých listů, postup očištění a přípravy je stejný jako v případě enzymatické izolace. Na přípravu izolačního roztoku bylo použito 70,8 gramů chloridu zinečnatého, který byl rozpuštěn ve 40 cm³ koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Jelikož je reakce silně exotermická, byl chlorid zinečnatý přisypáván postupně a pracovalo se v digestoři. Obdobně jako v případě

enzymatické metody byly listy v misce s izolačním roztokem zaizolovány pomocí parafilmu. Izolace probíhala po dobu tří dnů.

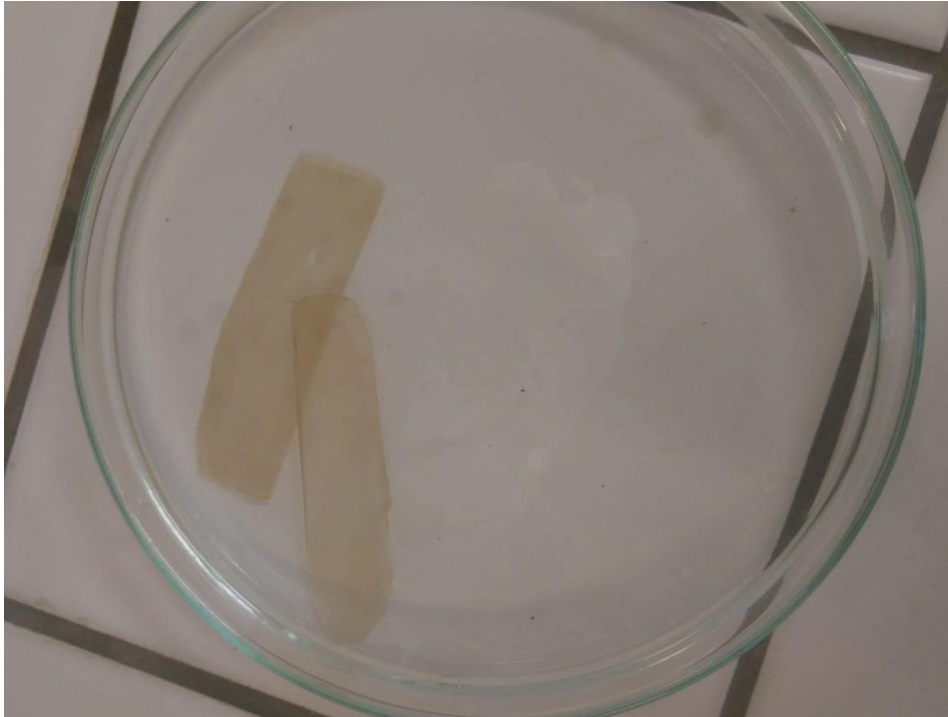


Obr. 8: Izolační roztok s listy po chemickou izolaci

3.4 Příprava vzorků

3.4.1 Separace kutikul

Po uplynutí doby potřebné k izolaci, byly kutikuly promyty destilovanou vodou, aby se zbavily izolačního roztoku. Pomocí štětečků byly z kutikul odstraněny zbytky mezofylu. Očištěné kutikuly byly přemístěny do destilované vody, aby nevyschly. Po očištění všech kutikul byly rozděleny pomocí mikroskopu na horní a spodní. Rozdělené kutikuly byly uchovávány v destilované vodě s azidem sodným, aby nezplesnivěly.



Obr. 9: Očištěné kutikuly z chemické izolace

3.4.2 Příprava gelů

3.4.2.1 Čistý agarózový gel (příjmový gel)

Na přípravu agarózového gelu bylo použito 300 cm³ destilované vody, která byla zahřátá na 85°C a v ní byly rozpuštěny 3 gramy agarózy. Takto připravený gel byl nalit do 33 kyvet, kde nad kyvetou byla z gelu vytvořena jakási „čepička“. 30 kyvet je pro difúzní páry a 3 kyvety jsou určeny na blanky. Blanky jsou kyvety, které na rozhraní příjmový a zdrojový gel nemají kutikulu a slouží pouze pro srovnání.

3.4.2.2 Agarózový gel s lignohumátem (zdrojový gel)

Nejprve byl připraven roztok lignohumátu tak, že bylo 0,3 gramů lignohumátu rozpuštěno v 300 cm³ destilované vody a tento roztok byl poté zahřátý na 85°C a stejně jako v případě čistého agarózového gelu, byly v tomto roztoku rozpuštěny 3 gramy agarózy a tento gel byl nalit do 33 kyvet.

3.4.3 Příprava difúzních párů

Po vychladnutí gelů v kyvetách byly pomocí štětečku na kyvetu s příjmovým gelem přichyceny kutikuly, které se pomocí malého kousku parafilmu zafixovaly. Na takto připravenou kyvetu se nasadila kyveta se zdrojovým gelem a opět pomocí parafilmu byly tyto dvě kyvety zafixovány. Takovým to způsobem bylo připraveno 30 vzorků (3 vzorky na den, měření probíhalo po dobu 10 - ti dnů). Obdobně byly připraveny srovnávací páry (blanky), jen s tím rozdílem, že mezi zdrojovým a příjmovým gelem nebyla kutikula.



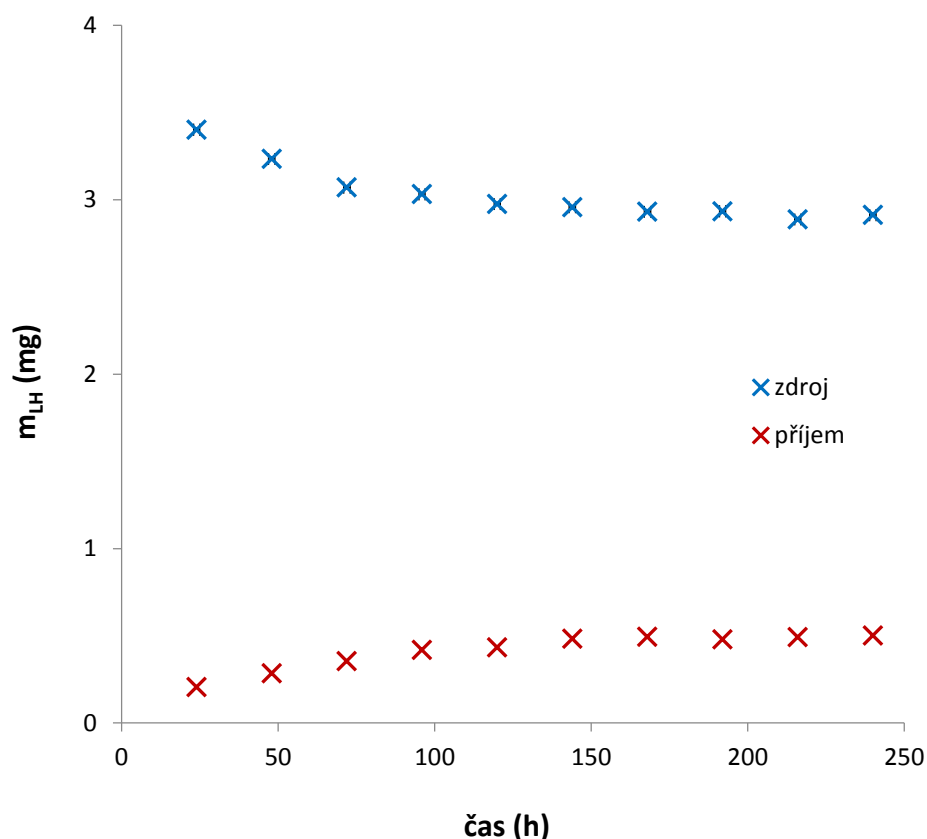
Obr. 10: připravený difúzní pár

3.5 Měření vzorků

Difúzní páry, které byly připraveny, byly měřeny na UV – VIS spektrofotometru po dobu 10 – 14 dnů v rozmezí vlnových délek 200 – 900 nm. K tomu, abychom mohli proměřit jednotlivé gely, bylo potřeba difúzní pár rozpojit a měřit zvlášť příjmový gel a zvlášť zdrojový gel. Gely byly měřeny od rozhraní směrem ke dnu kyvety pomocí posuvného měřítka, které umožňovalo měření po milimetrech.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Na Obr. 11 můžeme vidět změny lignohumátu v průběhu měření. Modrou barvou je v Obr. 11 označen zdrojový gel, a z těchto hodnot vidíme, že lignohumátu ve zdrojovém gelu v průběhu měření ubývá. Příjmový gel je označen červenou barvou, a zde naopak můžeme vidět, že v příjmovém gelu lignohumátu přibývá. Což je pozitivní výsledek, jelikož naším cílem bylo zjistit kolik lignohumátu projde ze zdrojového gelu přes kutikulu do gelu příjmového.



Obr. 11: graf závislosti hmotnosti na čase

4.1 Fickovy zákony

Mezi zdrojovým a příjmovým gelem probíhá difúze, která se řadí mezi tzv. transportní jevy. Dalšími transportními jevy je sdílení hybnosti, energie a hmoty. Podobnost těchto dějů lze vyjádřit pomocí jejich základních definic:

- koeficient viskozity, je úměrnost mezi hustotou toku hybnosti a gradientem rychlosti, je to konstanta;
- koeficient tepelné vodivosti, je úměrnost mezi hustotou tepelného toku a gradientem teploty, je to konstanta;
- difúzní koeficient, je úměrnost mezi hustotou difúzního toku a gradientem koncentrace, je to konstanta.

Difúzní koeficient 1 nám definuje první Fickův zákon, ten má pro jednorozměrnou difúzi v binárním systému AB tvar:

$$J_A = -D \left(\frac{\partial c_A}{\partial x} \right) \quad 1$$

- J_A – hustota difúzního toku látky A;
- D – difúzní koeficient [cm^2s^{-1}];
- ∂_{c_A} – koncentrační gradient;
- ∂_x – difúzní rozhraní;
- záporné znaménko značí, že tok nastává ve směru klesající koncentrace.

Difúzní koeficient ve smyslu prvního Fickova zákona není závislý na velikosti koncentračního gradientu. U velmi zředěných roztoků je tento předpoklad splněn. Pokud máme větší koncentrace, je třeba uvažovat také koncentrační závislost D následkem vzájemného působení difundujících částic, pokud tato skutečnost ale není uvedena, považujeme D za konstantu.

S prvním Fickovým zákonem se setkáváme také při výpočtu celkového množství látky, jež prošlo jednotkovou plochou za dobu t . K tomuto výpočtu byla použita rovnice 2.

$$m = \int_0^t D \left(\frac{\partial c_A}{\partial x} \right) dt \quad 2$$

Druhý Fickův zákon nám umožňuje vyjádřit rozdělení koncentrace v závislosti na čase a na vzdálenosti při neustálené difúzi. Jeho tvar pro jednorozměrnou difúzi je uveden v rovnici 3.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad 3$$

Celkové množství látky, jež prošlo rozhraním o jednotkové ploše za čas t je uvedený v rovnici 4.

$$m_t = 2c_R \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad 4$$

Případ difúze v páru nekonečných medií je realizován například sloupcem vody, který spočívá na sloupci v roztoku, nebo dvěma ztavenými tyčemi skla o rozdílném složení. Počáteční podmínky jsou:

$$c = c_R, \quad x < 0, \quad t = 0$$

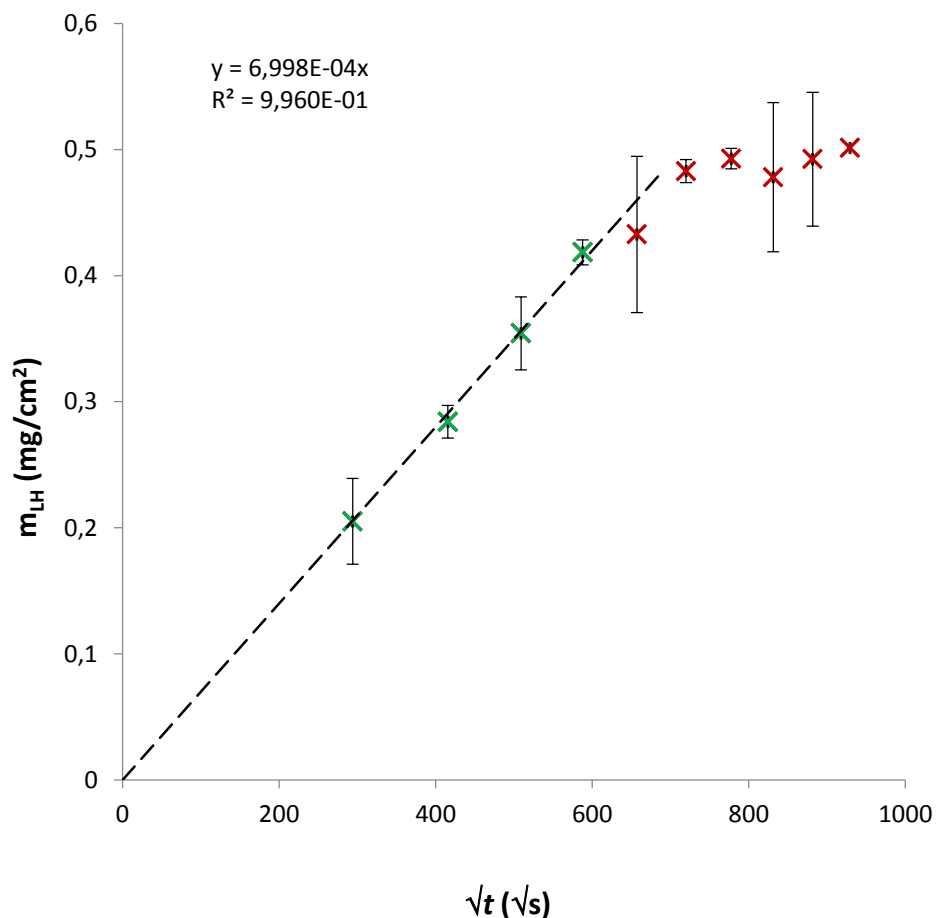
$$c = 0, \quad x > 0, \quad t = 0$$

a příslušným řešením je vztah uvedený v rovnici 5. [18][19][20]

$$c(x, t) = c_R \operatorname{erfc} \frac{x}{2\sqrt{Dt}} \quad 5$$

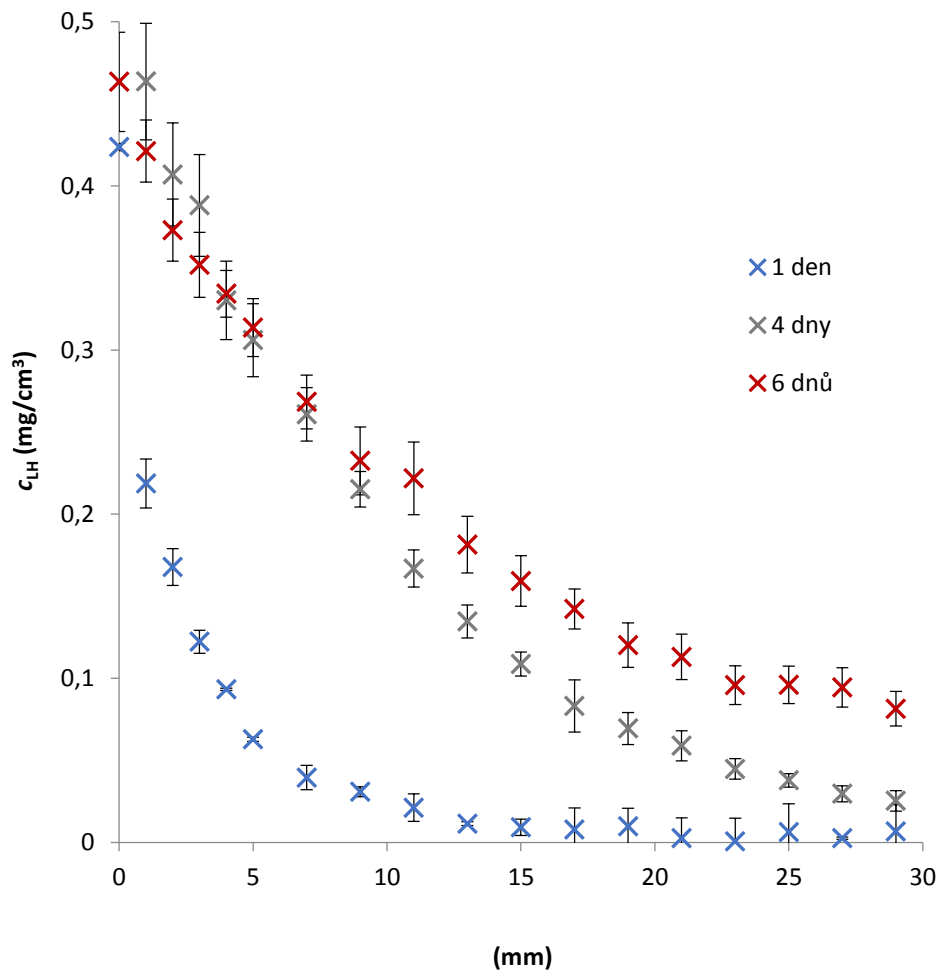
4.1.1 Difúzní koeficient

Difúzní koeficient byl vypočítán použitím rovnice číslo 4. Hodnota koncentrace na rozhraní byla zvolena 0,5 mg/ml, protože je to přesně půlka mezi 1 a 0 (koncentrace 1 mg/ml odpovídá zdrojovému gelu a koncentrace 0 mg/ml odpovídá přijmovému gelu). Pro výpočet difúzního koeficientu byly z Obr. 12 použity pouze počáteční časy (zelené body), které tvoří přímku. S přibývajícím časem se již závislost ohýbá, to znamená, že nejsou splněny okrajové podmínky a tyto hodnoty proto nemůžeme použít. Hodnota difúzního koeficientu byla tedy určena na $D = 1,539 \cdot 10^{-10}$ m²/s a chyba měření u toho koeficientu byla stanovena na $\pm 9,130 \cdot 10^{-12}$ m²/s.



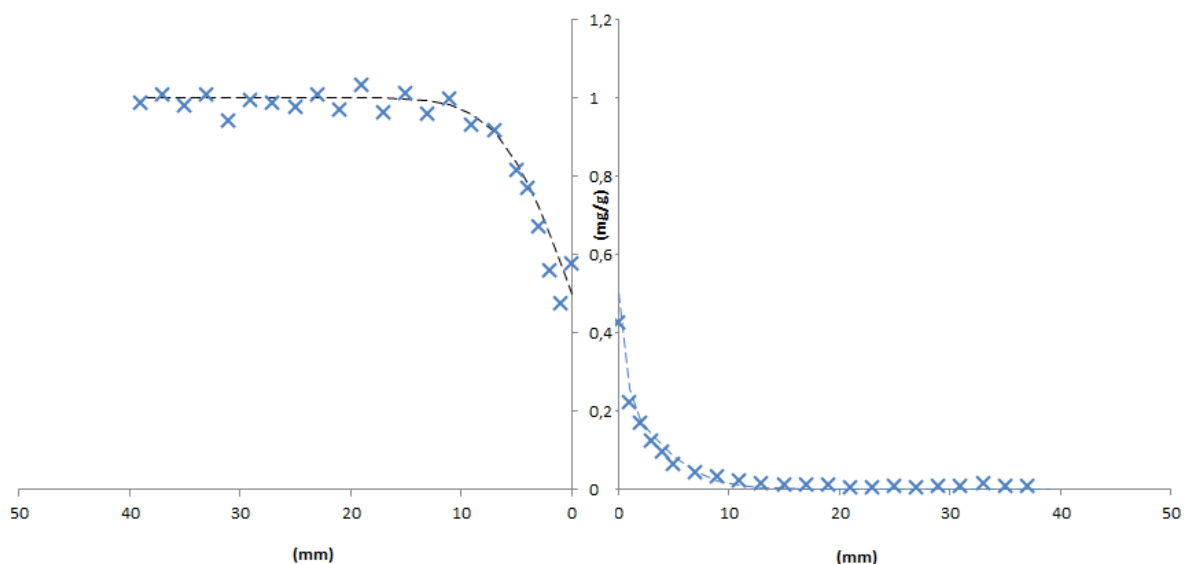
Obr. 12: graf závislosti koncentrace lignohumátu na odmocnině z času

Na Obr. 13 můžeme vidět závislost koncentrace na vzdálenosti od rozhraní. Vidíme, že v blízkosti rozhraní je koncentrace lignohumátu vyšší a na konci kyvety nižší nebo nulová, jelikož tam lignohumát ještě nedodifundoval. Při kratších časových úsecích, nám lignohumát neoddifunduje až na dno kyvety, kdežto při delších časových intervalech nám oddifunduje až na dno. Proto se také pro výpočet difúzního koeficientu použily pouze počáteční hodnoty z Obr. 12.



Obr. 13: graf závislosti koncentrace lignohumátu na vzdálenosti od rozhraní

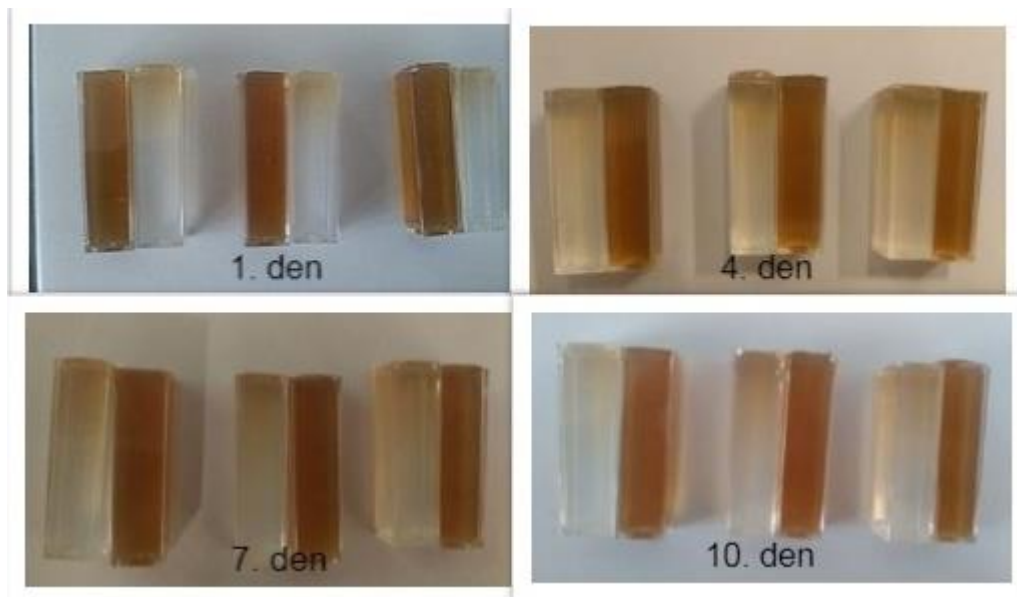
Na Obr. 14 (vlevo), můžeme vidět, jak již první den část lignohumátu oddifundovala ze zdrojového gelu do gelu příjmového. Z toho grafu je patrné, že lignohumát difunduje nejprve od rozhraní, protože u dna kyvety se koncentrace nezměnila. Na Obr. 14 (vpravo), můžeme naopak vidět přidifundovanou část lignohumátu. A na rozdíl od zdrojového gelu, můžeme u příjmového gelu u dna kyvety vidět nulovou koncentraci lignohumátu.



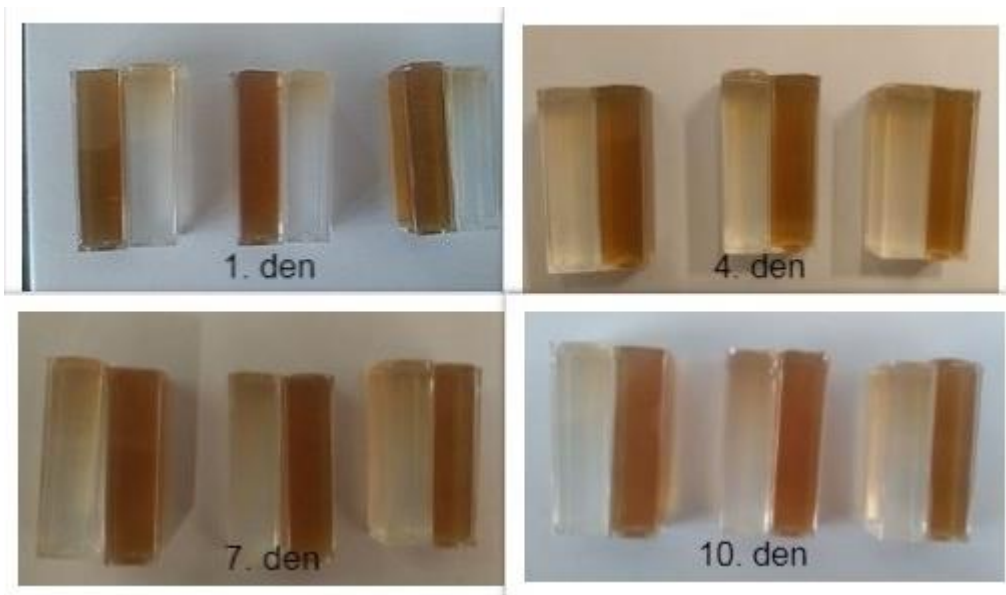
Obr. 14: graf závislosti hmotnosti lignohumátu na vzdálenosti od rozhraní pro zdrojový gel (vlevo) a pro příjmový gel (vlevo) srovnávacího vzorku pro 1. den

4.1.2 Koncentrace lignohumátu v příjmových gelech po dobu měření

Na Obr. 15 je fotkami znázorněn postupný vstup lignohumátu ze zdrojového gelu do příjmového pro kutikulu, která byla vyseparována chemickou izolací. Na Obr. 16 je tento vstup vyobrazen pro spodní kutikulu vyseparovanou enzymatickou izolací.



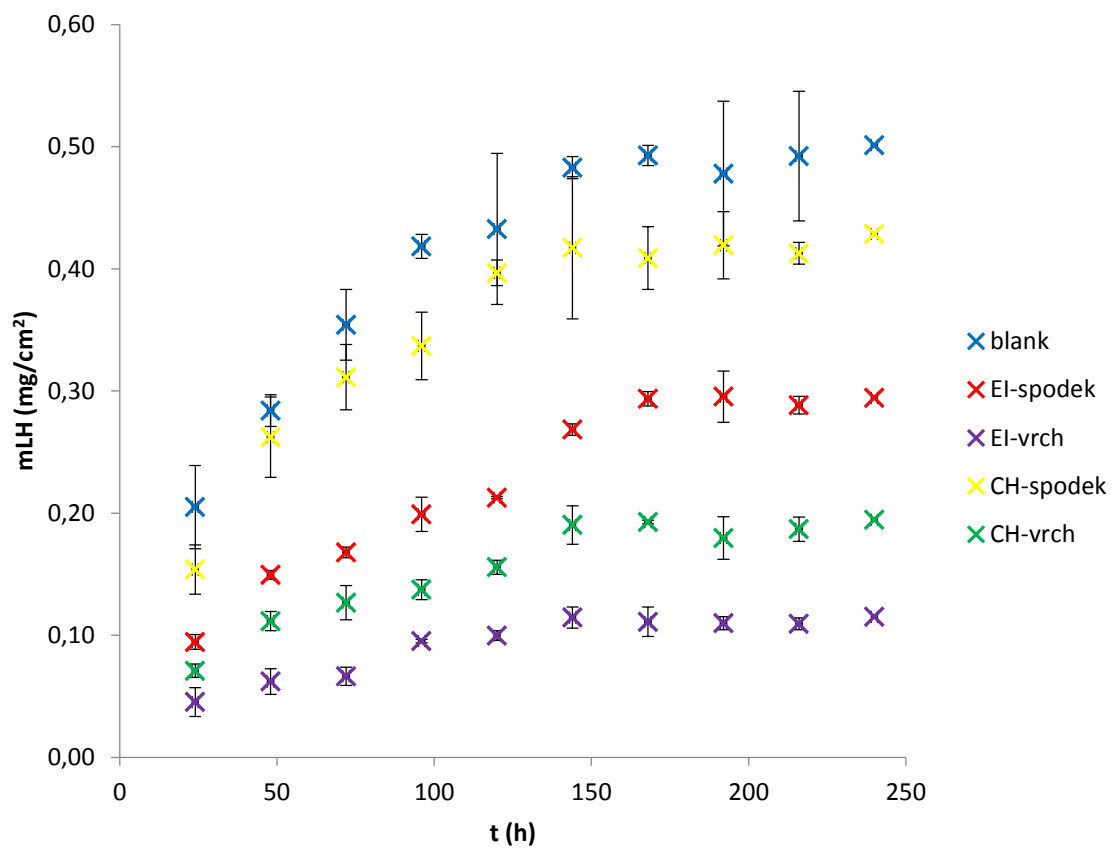
Obr. 15: vizuální prostup lignohumátu skrz spodní kutikulu separovanou chemickou izolací



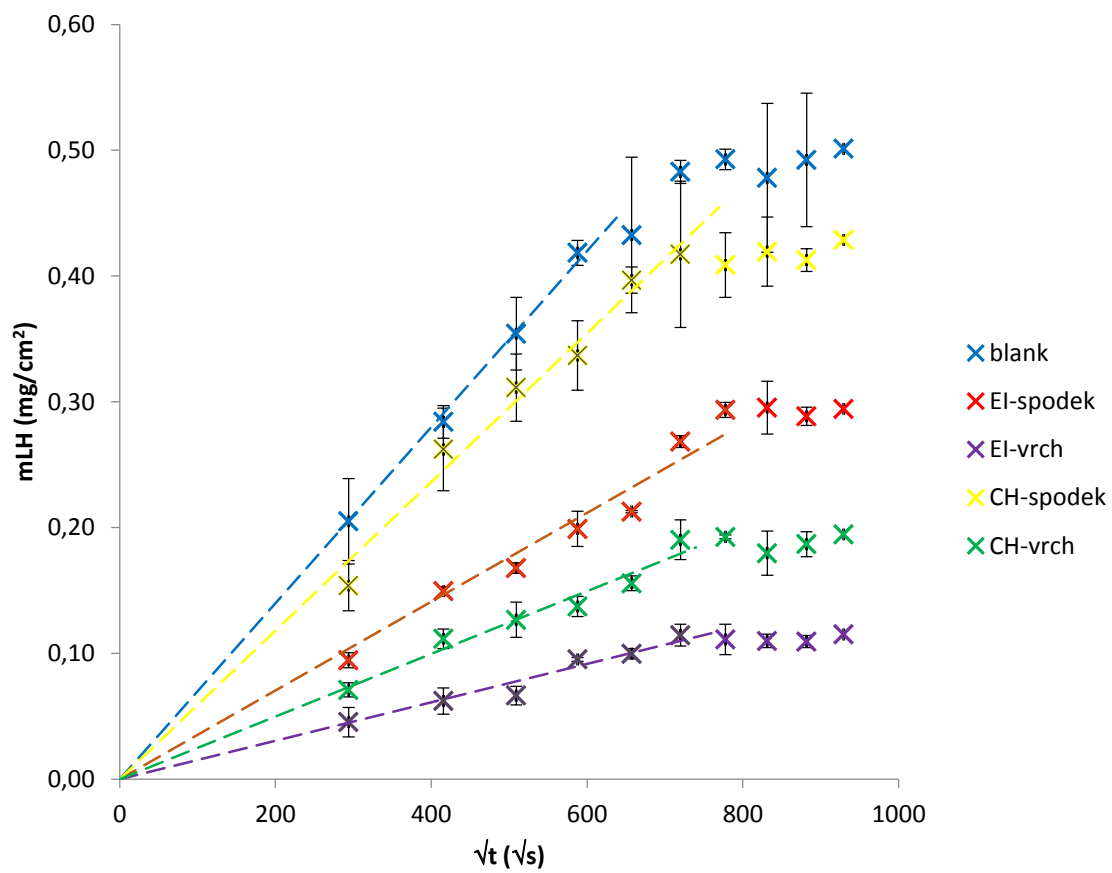
Obr. 16: vizuální prostup lignohumátu skrz spodní kutikulu separovanou enzymatickou izolací

Hodnoty koncentrací lignohumátu v závislosti na čase jsou pro přehlednost uvedeny na Obr. 17 a závislost koncentrace lignohumátu na odmocnině z času je uvedena na Obr. 18. Z grafu je patrné, že nejvíce difundoval lignohumát ze zdrojového gelu do přijímacího u srovnávacího vzorku, což je logické, jelikož tyto vzorky neměly mezi sebou kutikulu, tudíž tam nebyla žádná membrána, která by kladla lignohumátu odpor, a která by zpomalovala difúzi. Druhým lignohumátem, který nejvíce difundoval ze zdrojového do přijímacího gelu (žluté body), byl gel se spodní kutikulou, která byla vyseparována pomocí chemické izolace. Pravděpodobně je to z toho důvodu, že chemická metoda izolace je mnohem drastičtější než enzymatická, tudíž mohlo během separace dojít k odstranění nějaké vrstvy. Spodní kutikula má v sobě navíc, oproti kutikule horní, stomata, což lignohumátu usnadnilo difúzi. Třetím nejlépe difundujícím lignohumátem, který difundoval ze zdrojového gelu (červené body), byla rovněž spodní

kutikula, ale tentokrát od izolace enzymatické. To potvrzuje můj předpoklad, že stomata usnadňují lignohumátu penetraci skrz kutikulu. Nejhůře difundoval lignohumát ze zdrojového gelu do přijímacího přes vrchní kutikulu od enzymatické izolace (zelené body).



Obr. 17: graf závislost koncentrace lignohumátu na čase



Obr. 18: graf závislosti koncentrace lignohumátu na odmocnině z času

5 ZÁVĚR

Po vykonání všech potřebných experimentů jsem dospěla k závěru, že nejlépe tedy difunduje lignohumát u srovnávacích vzorků bez kutikuly. Absence kutikuly totiž zdrojovému gelu dává dostatečný prostor k difúzi do přijímacího gelu a na lignohumát tedy není kladen dostatečný odpor, kromě toho, který vykazuje samotný hydrogel, respektive jeho pórovitá struktura, který by difúzi zpomaloval. Pokud ale opominu srovnávací vzorky, tak nejlépe difundujícím zdrojovým gelem, jsou vzorky se spodní kutikulou vyseparovanou pomocí chemické izolace. Tato metoda izolace je totiž mnohem drastičtější než metoda enzymatická. Tudíž při této izolaci mohla dojít k poškození struktury kutikuly a ta poté kladla menší odpor při difúzi lignohumátu do přijímacího gelu. Jak již bylo řečeno, spodní kutikula obsahuje průduchy, kterými lignohumát mohl mnohem lépe difundovat, proto také dalším nejlépe difundujícím systémem je ten, kde byla jako membrána použita spodní kutikula vyseparována pomocí enzymatické izolace.

Jelikož je chemická metoda izolace drastičtější, proto jako další v pořadí nejlépe difundoval lignohumát přes vrchní kutikulu od již zmíněné chemické izolace. Nejhůře tedy difunduje lignohumát přes vrchní kutikulu od enzymatické izolace.

Pokud bychom chtěli simulovat prostup hnojiva přes listovou kutikulu, je lepší použít k separaci kutikul izolaci enzymatickou, protože není tak agresivní jako chemická a nepoškodí nám strukturu kutikuly. Kutikula vyseparovaná enzymatickou metodou tedy bude klást hnojivu větší odpor než chemická, ale bude to lépe simulovat prostup hnojiva v přírodě.

6 POUŽITÉ REFERENCE

- [1] O huminových látkách. International humic substances society (IHSS) [online]. AG TOP TIP [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.ihss-cz.cz/o-huminovych-latkach.html>
- [2] Anatomická stavba listu. In: Katedra botanika [online]. Olomouc: IZON, 2011 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.botanika.upol.cz/atlas/atlas/anatomie/anatomieCR28.pdf>
- [3] Mimokořenová výživa rostlin. In: Mendelova univerzita v Brně [online]. Brno: helpdesk, 2014 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/images/prijem_zivin/list.jpg
- [4] Mikroorganismy jako indikátory stavu půdního prostředí. In: Mendelova univerzita v Brně [online]. Brno: helpdesk, 2014 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=3422&typ=html
- [5] PICCOLO, Alessandro. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy* [online]. Elsevier, 2002, s. 57 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7
- [6] MIKULÁŠKOVÁ, Barbora, Lubomír LAPČÍK a Ivan MAŠEK. Lignite: Structure, properties and applications. *Chemické listy* [online]. 1997, 91(3), 160-168 [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2787/2774>
- [7] GHABBOUR, Elham A a Geoffrey DAVIES. *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999, 286 s. ISBN 0-85404-799-9.
- [8] STEINBERG, C. E. W., T. MEINELT, M. A. TIMOFEYEV, M. BITTNER a R. MENZEL. Humic substances. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2008(15), 128-135.
- [9] Soil humic substances. *Jerzy Weber* [online]. Wrocław: Agricultural University of Wrocław [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: <http://karnet.up.wroc.pl/~weber/powstaw2.htm>
- [10] WEBER, Jerzy, Yona CHEN, Elzbieta JAMROZ a Teodoro MIANO. Humic substances in the environment. *Journal of soils and sediments* [online]. 2018, 18(8), 2665-2667 [cit. 2019-05-03]. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2052-x>. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11368-018-2052-x>
- [11] *Huminové látky* [online]. Praha: Agropress, 2016 [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: <http://www.agropress.cz/huminove-latky/>
- [12] *Huminové látky* [online]. Praha: Enviproduct, 2019 [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: <http://www.enviproduct.cz/huminove-latky>
- [13] NOVÁK, Jan a Milan SKALICKÝ. *Botanika*. 4. Praha: Powerprint, 2017. ISBN 978-80-7568-036-5.

- [14] PROCHÁZKA, Stanislav a . *Botanika: Morfologie a fyziologie rostlin*. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. ISBN 80-7157-313-2.
- [15] ORGELL, Wallace H. The isolation of plant cuticle with pectic enzymes. *Plant physiol* [online]. 1955, **30**(1), 78-80 [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC540601/?page=2>
- [16] SCHREIBER, Lukas a Jörg SCHÖNHERR. Water and solute permeability of plant cuticles: measurement and data analysis. New York: Springer, c2009. ISBN 978-3540689447.
- [17] ZELENA, V, K VEVERKA a V ZELENA. Effect of Surfactants and Liquid Fertilisers on Transcuticular Penetration of Fungicides. *Plant Protection Science* [online]. 2007, 43(4), 151-156 [cit. 2019-05-13]. ISSN 1212-2580. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/20474316/>
- [18] CRANK, J. *The Mathematics of Diffusion*. 1. Oxford: Clarendon Press, 1956. ISBN 0198534116.
- [19] CUSSLER, E.L. *Diffusion Mass: Transfer in Fluid Systems*. 3. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. ISBN 9780521871211.
- [20] KLUČÁKOVÁ, Martina a Miloslav PEKAŘ. Transport of copper(II) ions in humic gel - new results from diffusion couple. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2009, (349), 96-101 [cit. 2019-05-18]. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0927775709004786>
- [21] EDGINGTON, L., H. BUCHENAUER a F. GROSSMANN. Bioassay and transcuticular movement of systemic fungicides. *Pesticide Science*. 1973, 4(5), 747-752.
- [22] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions*. 2. New York: Wiley, 1994. ISBN 9780471594741.
- [23] Leaf anatomy. In: *New world encyclopedia* [online]. MediaWiki, 2006 [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: http://www.newworldencyclopedia.org/entry/File:Leaf_anatomy.svg