

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ekologie lesa



Vliv brassinosteroidů na růst jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) v kultuře *in vitro*

Effects of brassinosteroids on mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) growth planted *in vitro*

Diplomová práce

Autor: Jitka Lovětínská

Vedoucí práce: Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

2015

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Katedra ekologie lesa

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jitka Lovětínská

Lesní inženýrství

Název práce

Vliv brassinosteroidů na růst jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) v kultuře in vitro

Název anglicky

Effects of brassinosteroids on mountai ash (*Sorbus aucuparia* L.) growth planted in vitro

Cíle práce

Vyhodnotit vliv brassinosteroidů na růst explantátů jeřábu ptačího. Zaměřit se na růst kultur ve fázi multiplikace, zakořeňování a přesazení do nesterilních podmínek.

Metodika

Rozmnožení kultury jeřábu ptačího, v prostředí in vitro, do potřebného množství pro založení pokusu s brassinosteroidy.

Založení kultur jeřábu s přísadky brassinosteroidů v médiích pro multiplikaci a zakořeňování.

Převod zakořeněných rostlin do substrátu a sledování jejich odrůstání.

Při sledování vlivu brassinosteroidů na in vitro kultury jeřábu, by měl být zvláště hodnocen vliv látek na růst prýtlů a kořenů a na přežívání rostlinného materiálu (mortalitu) na médiích a v substrátu.

Doporučený rozsah práce

45-55 stran

Klíčová slova

Rostlinné regulátory růstu, stres z přesazení, vegetativní rozmnožování

Doporučené zdroje informací

- Bajguz A., Hayat S., (2009): Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1): 1-8. DOI:10.1016/j.plaphy.2008.10.002
- Bari R., Jones J.D.G., (2009): Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4): 473-488
- Hacham Y., Holland N., Butterfield C., Ubeda-Tomas S., Bennett M., Chory J., Savaldi-Goldstein S., (2011): Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* 138: 839-848. DOI: 10.1242/dev.061804
- Lall S., Mandegar Z., Roberts A.V., (2006): Shoot multiplication and adventitious regeneration in *Sorbus aucuparia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 23-29. DOI: 10.1007/s11240-005-9045-3
- Pereira-Netto A. B., (2012): *Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health*. Bentham Science Publishers. 96 s.
- Sasse J. M., (1997): Recent progress in brassinosteroid research. *Physiologia Plantarum*, 100: 696 701. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb03076.x

Předběžný termín obhajoby

2015/06 (červen)

Vedoucí práce

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 31. 3. 2014

doc. Ing. Miroslav Svoboda, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 3. 8. 2014

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Děkan

V Praze dne 25. 03. 2015

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma vliv brassinosteroidů na růst jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) v kultuře *in vitro* vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jana Vítámváse, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Rakovníku dne 15. 4. 2015

Podpis:

Děkuji mému vedoucímu práce Ing. Janu Vítámvásovi, Ph.D. za vedení a pomoc při vypracování této diplomové práce, dále děkuji doc. Ing. Danielu Zahradníkovi, Ph.D. za pomoc při zpracování výsledků výzkumu a také všem, kteří mi pomáhali získat materiál a poznatky pro sepsání této diplomové práce.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vlivem brassinosteroidů na růst jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) v kultuře *in vitro*. Vzrostlé stromy, z nichž byl odebrán primární explantát pro založení kultury *in vitro*, pocházejí z Ozeleňovacího střediska ŠLP v Kostelci nad Černými lesy. Výzkum byl zaměřen na *in vitro* fáze multiplikace a zakořeňování a vyhodnocuje výsledky dlouhodobých pokusů, které trvaly od března 2014 do března 2015. Při pokusech byl zaznamenáván délkový přírůst prýtů, množení prýtů a tvorba kořenů, jejich počet a délka. Při fázi multiplikace bylo použito MS médium, s přidáním fytohormonů BAP (0,0 a 0,8 mg.l⁻¹), IBA (0,0 a 0,2 mg.l⁻¹) a 4 varianty koncentrací brassinosteroidů (0,0, 0,00004, 0,0004 a 0,004 mg.l⁻¹). Při fázi zakořeňování byly použity dva typy médií (MS a WPM) s různými kombinacemi IBA (0,0-0,5 mg.l⁻¹) a NAA (0,0-0,4 mg.l⁻¹) se 4 variantami koncentrací brassinosteroidů (0,0-0,004 mg.l⁻¹). Po fázi zakořeňování byly prýty přesazeny do substrátu a zalévány různými koncentracemi brassinosteroidů (0-0,004 mg.l⁻¹). Výzkum prokázal závislost koncentrací fytohormonů a brassinosteroidů pro růst, množení prýtů, vznik kořenů a růst rostlin po přesazení.

Klíčová slova: Rostlinné regulátory růstu, stres z přesazení, vegetativní rozmnožování

ABSTRACT

This thesis deals with the effects of brassinosteroids on mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) growth planted *in vitro*. The primary explant for the *in vitro* culture initiation was removed from adult trees located in CULS Forest Establishment at Kostelec nad Černými lesy. The research is focused on the *in vitro* phases of multiplication and rooting, and the research evaluates the results of long-standing experiments that lasted since March 2014 to March 2015. The length increment of shoots, shoot multiplication and root formation, their number and length were being analyzed during these experiments. In the multiplication stage, the MS medium was used with the addition of phytohormones BAP (0.8 mg.l⁻¹), IBA (0.2 mg.l⁻¹) and four different concentrations of brassinosteroids (0,0, 0,00004, 0,0004 and 0,004 mg.l⁻¹). Two kinds of media (MS and WPM) and a combination of IBA (0,0-0,5 mg.l⁻¹) and NAA (0,0-0,4 mg.l⁻¹) with four different concentrations of brassinosteroids (0,0-0,004 mg.l⁻¹) were used in the rooting phase. After the rooting phase the shoots were transplanted into the substrate and watered with various concentrations of brassinosteroids (0-0,004 mg.l⁻¹). The research has demonstrated the dependence of concentrations of phytohormones together with brassinosteroids on the growth and multiplication of shoots, formation of roots and plant growth after transplanting.

Key words: Plant growth regulators, the stress of transplanting, vegetative reproduction

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Růžovité (<i>Rosaceae</i>).....	11
3. Jeřáb ptačí (<i>Sorbus aucuparia</i> L.).....	12
4. Použité fytohormony.....	13
4. 1. Auxiny.....	13
4. 2. Cytokininy.....	14
5. Brassinosteroidy.....	16
5. 1. Struktura brassinosteroidů.....	17
5. 2. Využití brassinosteroidů v praxi.....	18
6. Stres rostlin.....	20
6. 1. Stres z přesazení.....	20
7. Metodika.....	22
7. 1. Multiplikace jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.).....	22
7. 2. Zakořeňování jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.).....	23
7. 3. Převod jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.) do nesterilního prostředí.....	25
7. 4. Statistické hodnocení.....	26
8. Výsledky.....	28
8. 1. Výsledky multiplikace jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.).....	28
8. 1. 1. Vliv brassinosteroidů a IBA na jeřáb ptačí (<i>Sorbus aucuparia</i> L.).....	28
8. 1. 2. Vliv brassinosteroidů na jeřáb ptačí (<i>Sorbus aucuparia</i> L.) bez přidání BAP a IBA.....	29
8. 1. 3. Srovnání výsledků multiplikace jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.).....	30
8. 2. Výsledky zakořeňování jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.).....	32
8. 2. 1. Zakořeňování ½ WPM médium.....	32
8. 2. 2. Zakořeňování ½ MS médium s brassinosteroidy.....	33
8. 2. 3. Zakořeňování ½ MS médium bez brassinosteroidů.....	34
8. 3. Výsledky převodu jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.) do nesterilního prostředí.....	37
9. Diskuze.....	38
10. Závěr.....	42
11. Použitá literatura.....	43
12. Seznam příloh.....	47
13. Přílohy.....	48

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obr. č. 1 Jeřáb ptačí (<i>Sorbus aucuparia</i> L.)	12
Obr. č. 2 Strukturní vzorec kyseliny indolyl-3-octové (IAA)	14
Obr. č. 3 Strukturní vzorec benzylaminopurinu	14
Obr. č. 4 Strukturní vzorec molekuly brassinolidu	18
Obr. č. 5 Multiplikace jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.)	23
Obr. č. 6 Prýt <i>Sorbus aucuparia</i> s kořenem	24
Obr. č. 7 Převedené prýty jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.) do nesterilního prostředí.....	26
Tab. č. 1 Druhy rostlin a jejich části obsahující brassinosteroidy	17
Tab. č. 2 Varianty použitých koncentrací brassinosteroidů a fytohormonů	22
Tab. č. 3 Pokus zakořeňování <i>Sorbus aucuparia</i> , ½ WPM médium	24
Tab. č. 4 Pokus zakořeňování <i>Sorbus aucuparia</i> , ½ MS médium	25
Tab. č. 5 Koncentrace brassinosteroidů v zálivce	26
Tab. č. 6 Výsledky multiplikace s brassinosteroidy a IBA	28
Tab. č. 7 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání pokusu s brass. a IBA.....	28
Tab. č. 8 Namnožení prýtů pokusu s brassinosteroidy a IBA	29
Tab. č. 9 Výsledky multiplikace s brassinosteroidy bez BAP a IBA	29
Tab. č. 10 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání pokusu s brass. bez IBA	30
Tab. č. 11 Namnožení prýtů pokusu s brassinosteroidy bez IBA	30
Tab. č. 12 Výsledky multiplikace jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.)	31
Tab. č. 13 Namnožení při multiplikaci jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.)	31
Tab. č. 14 Dlouhivý růst prýtů ve fázi zakořeňování ½ WPM	32
Tab. č. 15 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání v délce prýtů pokusu ½ WPM	32
Tab. č. 16 Výsledky zakořeňování ½ WPM	33
Tab. č. 17 Dlouhivý růst prýtů ve fázi zakořeňování ½ MS + brassinosteroidy	33
Tab. č. 18 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání ½ MS s brass.	34
Tab. č. 19 Výsledky zakořeňování ½ MS s brassinosteroidy	34
Tab. č. 20 Dlouhivý růst prýtů ve fázi zakořeňování ½ MS bez brassinosteroidů	35
Tab. č. 21 Výsledky zakořeňování ½ MS bez brassinosteroidů	36
Tab. č. 22 Výsledky převodu prýtů do nesterilního prostředí	37
Graf. č. 1 Závislost průměrného přírůstu rhizoidů a zakořenělých prýtů	36

1. Úvod

Jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia* L.) je dřevina z čeledi růžovitých (*Rosaceae*) a pochází z Evropy, Asie a západní Sibiře. Jeřáb patří mezi pionýrské, krátkověké dřeviny, dožívající se maximálně 150 let, zpočátku rychle rostoucí. Kvete dle nadmořské výšky od května do června. Plodem jeřábu je červená, až 1 cm velká kulovitá malvice, obsahující 2-4 semena. Plody dozrávají v září, během zimy opadávají. Jeřáb začíná plodit mezi 10. a 20. rokem života a plodnost bývá každoroční.

V mládí je jeřáb polostinný druh, ve stáří slunný. Je zcela mrazuvzdorný a roste na různých typech stanovišť, s odlišným obsahem vody v půdě. Lesnický významný je převážně ve vyšších polohách, kde tvoří jedinou příměs ve smrčinách. Jedná se o dřevinu s červenohnědým jádrem a narůžovělou bělí. Dřevo je poměrně tvrdé, využívá se v nábytkářství, kolářství, pro výrobu holí a hudebních nástrojů. Pro svoji ozdobnost se jeřáb často vysazuje v zahradách, sadech a alejích.

Brassinosteroidy (BRS) jsou chemické látky podporující růst, nacházejí se v nízkých koncentracích v pylu, semenech a mladých vegetativních tkáních v rámci celé rostlinné říše. Spolu s auxiny se jedná o dva důležité fytohormony, které regulují růst a vývoj rostlin, včetně buněčného dělení, cévní diferenciace, růst kořenů a stárnutí. Několik studií prokázalo, že některé reakce auxinu jsou zvyšovány spolupůsobením brassinosteroidů (Clouse et Sasse, 1998).

Extrakce brassinosteroidů z rostlin je velmi nákladná, proto jsou vyráběny synteticky. Jsou snadno mísitelné s jinými látkami a využívají se převážně v zemědělství ke zlepšování výnosovosti pěstovaných plodin. (Bečka et al., 2007).

Problematiku rozmnožování jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) *in vitro* popsal Chalupa (2002), který k multiplikaci využil MS médium s přidáním nízkých koncentrací BAP a IBA, při fázi zakořeňování bylo použito modifikované WPM médium s nízkými koncentracemi IBA a NAA. Z důvodu již existujících protokolů o návrhu metodiky mikropropagace jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) byla pro tuto diplomovou práci vybrána právě tato dřevina.

Tato diplomová práce má za cíl popsat, jakým způsobem ovlivňují brassinosteroidy růst jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) v kultuře *in vitro*. Výzkum byl prováděn v *In vitro* laboratoři v areálu Arboreta FLD Truba v Kostelci nad Černými lesy. Použity byly již založené kultury jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.). Byl zkoumán vliv

rostlinných hormonů na růst rostlinného materiálu v různých fázích multiplikace. Kromě brassinosteroidů byly použity fytohormony benzyalaminopurinu (BAP), kyseliny indolyl-3-máselné (IBA) a kyseliny naftyloctové (NAA). Hlavním cílem práce bylo na základě dlouhotrvajícího výzkumu vyhodnotit, jaké koncentrace brassinosteroidů mají vliv na multiplikaci, zakořeňování a převod rostlin jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) v explantátových kulturách.

2. Růžovité (*Rosaceae*)

Mezi čeled' růžovité patří stromy, keře, polokeře a byliny. Areál rozšíření se nachází hlavně v mírných a subtropických oblastech severní polokoule. Listy jsou střídavé, jednoduché nebo složené, s převážně pětičetnými pravidelnými květy. Květní lůžko vzniká srůstem okvětních lístků s dolní částí tyčinek, tvar má miskovitý nebo baňkovitý. Opylení je obstaráváno hmyzem (Mergl et al., 1984).

Plody čeledi růžovité jsou měchýřky, nažky, peckovice nebo malvice. Pletiva často obsahují éterické oleje, jako jsou například silice, které podmiňují vůni květů, např. u růží. Čeled' zahrnuje hospodářsky významné druhy, které slouží jako ovocné nebo okrasné dřeviny a rostliny, léčivé rostliny (Kincl et al., 2000).

Mezi nejznámější druhy patří *Fragaria vesca* L., *Geum rivale*, *Rubus fruticosus* L., *Rubus idaeus* L., *Rosa canina*, *Rosa rugosa*, *Sorbus aucuparia*, *Sorbus torminalis*, *Sorbus aria*.

3. Jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia* L.)

Jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia* L.) je listnatá dřevina, patřící do čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Původem patří jak do Evropy, tak do Asie a západní Sibiře. Dorůstá výše až 10 m, často vytváří více kmenů. Listy jsou opadavé, lichozpeřené, mají 11-15 lístků, na koncích jsou lehce pilovité. Kvete v květnu, květy jsou bílé, v chocholících. Plody jeřábu jsou oranžové, až červené kulaté malvičky, které jsou často vyhledávanou ptačí potravou (Bürki, Tommasini et Jakob, 2002).

Pro svoji ozdobnost je jeřáb oblíbeným zahradním stromem, a proto se také vysazuje do alejí a stromořadí. Jeřábu ptačímu vyhovují sušší, propustné půdy, ve vyšších oblastech hraje důležitou roli při zpevňování suťovisk a lavinových svahů. Kořeny dobře zpevňují půdu a opadané listy vytváří výživnou vrstvu humusu (Lohmann, 2005).

Plody jeřábu měří v průměru 6-9 mm, dozrávají v srpnu a v září, jsou velmi výživné, obsahují vitamín C, karoten, organické kyseliny, sorbit, který se využívá jako náhražka cukru pro diabetiky a dále kyselinu parasorbinovou, která se využívá jako konzervační látka. Dřevo jeřábu je lehké a tvrdé, využívá se v soustružnictví a kolářství, ale i pro výrobu nábytku, holí a hudebních nástrojů (Lohmann, 2005).



Obr. č. 1 Jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia* L.) (zdroj fotografie www.nabla.cz)

4. Použité fytohormony

Fytohormony jsou organické látky syntetizované v rostlinách. Již při nízkých koncentracích regulují růstové a vývojové procesy, aniž by se při tom chemicky měnily. Působí v místě vzniku nebo v částech rostlin, kam jsou transportovány. Základními fytohormony jsou auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová a ethylen (Luštinec et Žárský, 2005).

Rostlinné regulátory dělíme na nativní (přirozené) a syntetické. Nativní regulátory si rostlina sama vytváří a nazývají se fytohormony, syntetické regulátory nejsou součástí metabolismu rostlin, při aplikaci mají na rostliny a jejich růst buď pozitivní vliv, nazýváme je stimulanty nebo mají naopak inhibující vliv, to jsou tzv. retardanty. Fytohormony indukují chemické signály, které vznikají v nepatrném množství v různých částech rostlin a působí na různé procesy, především vývojové, růstové a pohybové. Rozlišujeme tři skupiny fytohormonů, které působí převážně stimulačně, což jsou auxiny, cytokininy a gibereliny a dvě skupiny fytohormonů působících inhibičně, abscisiny a ethylen (Procházka et al., 1994).

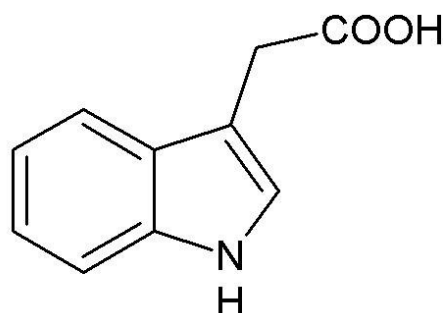
Auxiny, kyselina abscisová, cytokininy, ethylen a gibereliny jsou obecně označovány jako pět hlavních skupin přirozeně se vyskytujících rostlinných hormonů. Auxiny a cytokininy jsou obvykle považovány za nejdůležitější pro regulaci růstu a vývoje rostlinné tkáně, nicméně kyselina abscisová, ethylen a gibereliny hrají také důležitou roli v růstu a vývoji rostlin. Kromě klasických rostlinných hormonů byly objeveny nové přirozeně se vyskytující látky s regulačním účinkem v tkáňových kulturách, jsou to např. polyaminy, jasmonáty, brassinosteroidy, steroly a kyselina salicylová (Gaspar et al., 1996).

4. 1. Auxiny

Auxiny regulují mnoho růstových a vývojových procesů. V interakci s cytokininy stimulují dlouhivý růst, buněčné dělení a buněčnou diferenciaci. Dále stimulují tvorbu adventivních kořenů, opadávání listů, květů a plodů. Odlišné růstové orgány mají různou citlivost vůči auxinům. Např. auxin stimuluje růst kořenů při koncentraci 10.000x nižší než růst stonků. Syntetické auxiny mají širší oblast použití z důvodu jejich chemické stálosti, patří sem kyselina α -naftyloctová (NAA) a kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D). Auxiny IBA, NAA a 2,4-D se často přidávají do živných médií v kulturách *in vitro* pro iniciaci zakořeňování (Luštinec et Žárský, 2005).

Všechny auxiny tvoří karboxylovou skupinu v postranním řetězci. Kyselina indolyl-3-octová (IAA) patří k nejdůležitějším zástupcům přirozených auxinů. Mezi další auxiny

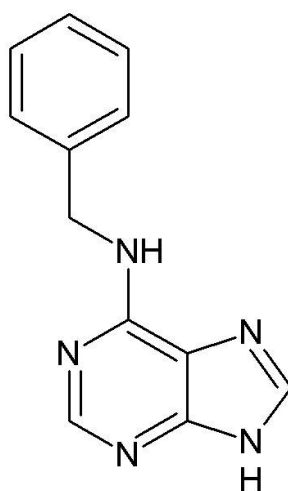
řadíme kyselinu 4-chlor-indolyloctovou (4-Cl-IAA), k. indolyl-3-máselnou (IBA), k. fenylloctovou (PAA), ty se vyskytují v rostlinách v menším množství (Podlešáková et al., 2012).



Obr. č. 2: Strukturní vzorec kyseliny indolyl-3-octové (IAA)

4. 2. Cytokininy

K dnešnímu dni známe přes třicet přirozených cytokininů. První izolovaný cytokinin byl kinetin (furfurylaminopurin), v rostlinách se volně nevyskytuje, je vyráběn synteticky. První přirozený cytokinin byl izolován z kukuřice (*Zea mays*) a nazývá se zeatin. Cytokininy jsou látky odvozené od aminopurinu (adeninu) substituovaného na aminoskupině v poloze 6. Jsou syntetizovány v částech rostlin s intenzivním růstem, obzvláště v meristémeh rostoucích kořenů. Mezi fyziologické účinky cytokininů patří zejména syntéza bílkovin, škrobu, chlorofylu, stimulace buněčného dělení, tvorby pupenů, zabránění stárnutí pletiv. Z cytokininů, které se nejčastěji používají pro kultivaci rostlin *in vitro*, patří cytokininy kinetin a BAP (benzylaminopurin) (Luštinec et Žárský, 2005).



Obr. č. 3: Strukturní vzorec benzylaminopurinu

Cytokininy jsou v rostlině syntetizovány v kořenech, odkud jsou pomocí transpiračního proudu transportovány do lodyhy. Stimulují dělení buněk, zpomalují odbourávání RNA, bílkovin a chlorofylu, podporují vznik pupenů a větvení lodyh (Procházka et al., 1994).

5. Brassinosteroidy

Brassinosteroidy jsou hormony, které podporují růst rostlin a nacházejí se ve velice nízkých koncentracích ve všech rostlinách. Byly objeveny v roce 1970 a po řadě provedených experimentů bylo zjištěno, že ovlivňují elongaci buněk, listovou morfogenezi, stárnutí, plodnost a zrání (Pereira-Netto, 2012).

V roce 1979 byly ze 40 kg brukve řepky (*Brassica napus*) odebrány 4 mg steroidu, tento steroid byl pojmenován brassinolid, byla popsána jeho struktura a podobnost se steroidy u zvířat (Grove et al., 1979).

Brassinosteroidy jsou označovány jako nová skupina rostlinných hormonů, které výrazně podporují růstovou aktivitu. Poprvé byly izolovány z pylu brukve řepky, následně byl zaznamenán jejich obsah v dalších 44 rostlinách a pravděpodobně jsou přítomné v celé říši rostlin. Brassinosteroidy jsou považovány za hormony s pleiotropními účinky, jelikož ovlivňují různé vývojové procesy, jako je růst, kvetení, stárnutí, klíčení semen a rhizogeneze, dále zajišťují rezistenci rostlin proti různým abiotickým stresům (Rao et al., 2002).

Dosud byly brassinosteroidy objeveny ve 44 druzích rostlin, z toho je 37 krytosemenných (devět druhů jednoděložných a 28 dvouděložných), pět nahosemenných, jeden kaprad'orost a jedna řasa. Protože dosud všechny rostliny, které byly testovány, obsahovaly brassinosteroidy, vznikla hypotéza, že brassinosteroidy jsou pravděpodobně přítomné ve všech druzích rostlin. Tabulka č. 1 uvádí, které rostliny brassinosteroidy obsahovaly a v jakých jejich částech se nacházely (Rao et al., 2002).

K výrazné interakci brassinosteroidů dochází s IAA, kde mění citlivost pletiv k auxinu, ovšem pouze pokud jsou aplikovány dříve, v opačném případě dochází spíše k inhibičním účinkům. Zvyšují odolnost vůči stresům, oddalují opad listů a v některých případech inhibují vznik adventivních kořenů. Jsou aktivní pouze na světle a nevyskytují se v kořenech (Cutler, Yokota et Adam, 1991).

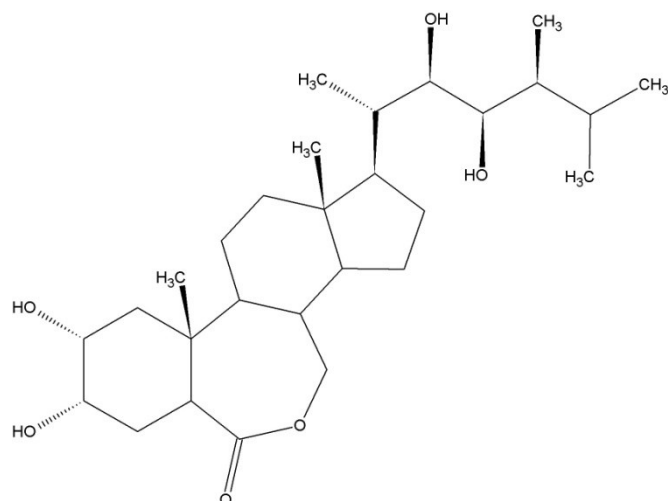
Tab. č. 1: Druhy rostlin a jejich části obsahující brassinosteroidy

Část rostliny	Druh rostliny
pyl	<i>Helianthus annuus</i> , <i>Alnus glutinosa</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Robinia pseudo-acacia</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Citrus unshiu</i> , <i>Citrus sinensis</i> , <i>Cupresus arizonica</i> , <i>Pinus thunbergii</i> , <i>Cryptomeria japonica</i>
semeno	<i>Gypsophili perfoliata</i> , <i>Beta vulgaris</i> , <i>Pharbitis purpurea</i> , <i>Brassica campestris</i> , <i>Raphanus sativus</i> , <i>Cassia tora</i> , <i>Lablab purpureus</i> , <i>Ornithopus sativus</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Cannabinus sativa</i> , <i>Apium graveolens</i>
prýt	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Ornithopus sativus</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i>
list	<i>Castanea crenata</i> , <i>Distylium recemosus</i> , <i>Thea sinensis</i>
ostatní:	
lata	<i>Rheum rhabarum</i>
část kambia	<i>Cryptomeria japonica</i>
stélka	<i>Hydrodictyon reticulatum</i>

Brassinosteroidy jsou přítomny v rostlinách v extrémně nízkých koncentracích (v jednotkách nano-gramů). Množství endogenních brassinosteroidů se liší u rostlinných pletiv. Mladé rostoucí tkáně obsahují větší množství brassinosteroidů než tkáně zralé. Pyl a nezralá semena obsahují největší množství 1-100 ng.g⁻¹ čerstvé hmotnosti, zatímco výhonky a listy obsahují obvykle menší množství, tj. 0,01-0,1 ng.g⁻¹ čerstvé hmotnosti (Rao et al., 2002).

5. 1. Struktura brassinosteroidů

Brassinosteroidy jsou esenciální přírodní fytohormony podobné živočišným steroidním hormonům. Složitá struktura brassinosteroidů je tvořena cholestanovým skeletem a oxalaktonovým B-kruhem s 2 hydroxyly a dlouhými postranními řetězci (Bečka et al., 2007).



Obr. č. 4: Strukturní vzorec molekuly brassinolidu

5. 2. Využití brassinosteroidů v praxi

Objevem brassinosteroidů před více než dvaceti lety vznikla nová éra ve studiích hormonů, dříve byly známé steroidní hormony pouze u zvířat a hub. Pokrok ve výzkumu brassinosteroidů byl rychlý a brzy začaly být aplikovány v zemědělství. Nové studie považují brassinosteroidy za velmi perspektivní přírodní látky, šetrné k životnímu prostředí, které jsou proto vhodné pro širokou aplikaci na ochranu rostlin a zvýšení výnosů v zemědělství (Khripach, Zhabinskii et Groot, 2000).

Aplikace brassinosteroidů na plodiny jako jsou obiloviny, brambory, zelenina, ovoce, houby a dále na okrasné rostliny, zvyšuje jejich výnos. Přípravky s brassinosteroidy pro máčení semen a ošetřování nejsou využívány ve velké míře, ale jsou komerčně dostupné ve většině zemí (Rao et al., 2002).

Ke zvýšení výnosu obilovin v rozsahu 5-20 % dochází při uplatňování brassinosteroidů. Bylo popsáno, že aplikace brassinosteroidů na semena jarního ječmene má za následek zvýšení obsahu vápníku potřebného k zesílení klasu a pružnosti buněčných stěn v kořenech a v nadzemních částech (Ageeva, Prusakova et Chizhova, 2001).

Brassinosteroidy se ukázaly být užitečné při zvýšení výnosu zemědělských plodin. Pomocí brassinolidu byl zvýšen výtěžek fazolí o 41-51 % ve vztahu k hmotnosti semen na rostlině. Dále byla zvýšena hmotnost listů dvou druhů salátů o 25 % (Meudt et Thompson, 1983).

Bylo zjištěno, že brassinolid podporuje vývoj bramborových hlíz, inhibuje jejich klíčení během skladování a zvyšuje odolnost proti infekcím, konkrétně u *Phytophthora infestans*, *Fusarium solphureum* (Kazakova, Karsunkina et Sukhova, 1991).

Při ošetřování rostlin proti chorobám byl zkoumán i vliv brassinosteroidů. Bylo zjištěno, že na rostlinách ošetřených brassinosteroidy byl výrazně nižší rozvoj houbové infekce. Brassinosteroidy tak dodávají rostlinám ochranný účinek proti houbovým patogenům. Při ošetřování rostlin bylo nejefektivnějšího účinku dosaženo při postřiku roztokem s brassinosteroidy v dávkách 10-20 mg.ha⁻¹. V některých případech byl účinek brassinosteroidů proti napadení rostlin houbami vyšší než u rostlin ošetřených standardním fungicidem (Khripach, Zhabinskii et Malevannaya, 1997).

Byla testována aktivita brassinosteroidů proti řadě virů jak zvířecích, tak lidských. 27 derivátů brassinosteroidů bylo testováno proti viru spalniček a bylo prokázáno, že mají protivirový účinek. Hodnoty indexu selektivity (SI) brassinosteroidů byly dokonce vyšší než hodnoty SI získané u referenčního léčiva ribavirinu (Wachsman et al., 2002).

Studie *in vitro* dokázaly, že 24-epibrassinolid je schopen snižovat nebo dokonce zastavit růst HIV v kultivovaných infikovaných buňkách. Proto tento druh brassinosteroidu může být použit při prevenci a léčení infekce HIV a souvisejících potíží (Khripach et al., 2005).

6. Stres rostlin

Rostliny reagují na různé abiotické a biotické složky prostředí. Patří mezi ně přítomnost těžkých kovů, sucho, poškození, vysoký obsah soli, změny teploty a záření, napadení patogeny a škůdci. Abiotický stres vede k morfologickým a biochemickým molekulárním změnám. Sucho, zasolení, extrémní teploty a oxidační stres působí často společně a mohou vyvolat podobná poškození. Například sucho a zasolení vyvolají především osmotický stres, který vede k narušení homeostázy a k redistribuci iontů v buňkách. Oxidační stres, který je často doprovázen vysokými teplotami nebo suchem, může způsobit denaturaci bílkovin. Vyvolané stresy z prostředí často aktivují podobné buněčné signální dráhy a buněčné odezvy jako jsou produkce stresových proteinů a zvýšení tvorby antioxidantů. Biochemické adaptace u rostlin zahrnují různé změny v metabolických reakcích. Tyto změny zahrnují vývoj nových metabolických pochodů, syntézu speciálních bílkovin a změny hladin fytohormonů. Adaptace představuje schopnost živého organismu přizpůsobit se měnícímu životnímu prostředí a zároveň zvýšit jeho šance na přežití a schopnost reprodukce (Bajguz et Hayat, 2009).

Stres u rostlin nastává v případě působení stresových faktorů, tzv. stresorů. Rostliny jsou vystavovány mnoha vnějším vlivům během svého života. Stres vyvolává u rostlin zpomalování životních funkcí, poškození orgánů nebo dokonce uhynutí (Procházka et al., 1998).

6. 1. Stres z přesazení

Po přesazení musí rostlina rychle vytvořit nebo obnovit šíření kořenového systému v novém prostředí, aby minimalizovala stres z přesazení a zajistila si tak přežití. Stres z přesazení je často způsobem nedostatkem vody. Rostlina má kvůli nedostatečně vyvinutému kořenovému systému potíže absorbovat potřebné množství vody. Rostliny, které jsou přesazené z balu nebo v případě *in vitro* metod z nádob, nemají stres nejen z nedostatku vody kvůli malému kořenovému systému, ale i z důvodu rychlé absorpce vody půdou. Po přesazení nastává určitá doba, než rostlina vytvoří dostatečný kořenový systém a v tomto období je nejvíce náchylná na extrémní stresové faktory jako jsou mezní teploty a světelné záření, nedostatek živin a vody (Watson, 1996).

Ke stresu stromů a keřů dochází při jejich přesazení na jiné stanoviště. Pokud je vynaložena dostatečná péče při jejich přesazování, jsou rostliny schopné rychle se přizpůsobit novému prostředí. V druhém případě rostliny trpí tzv. šokem z přesazení, který jejich přivyknutí novému prostředí brání. Při působení stresových faktorů není

rostlina schopna regenerace, vývoje a často dochází k odumření. Obzvláště dřevinám může trvat tři až pět let než se adaptují na nové prostředí a přestane na ně působit stres z přesazení. Listy a přírůsty prýtů nejsou znaky určující přizpůsobení rostliny, těmi jsou větvení kořenů a jejich rozšíření do okolní půdy. Pokud se rostlině nepodaří vytvořit nový kořenový systém, nastává šok z přesazení. Mezi příznaky stresu z přesazení patří odumírání, spálené nebo neobvykle zbarvené listy, nepřirůstající stonek, předčasná defoliace, nevytváření květů. Příčinami vzniku stresu z přesazení bývá poškození rostlinného materiálu během přesazení, napadení chorobami, nedostatečně vyvinutý kořenový systém v poměru s nadzemní částí rostliny, vyschnutí kořenů mezi přesazením (Gauthier, Kaiser et Klahr, 2014).

7. Metodika

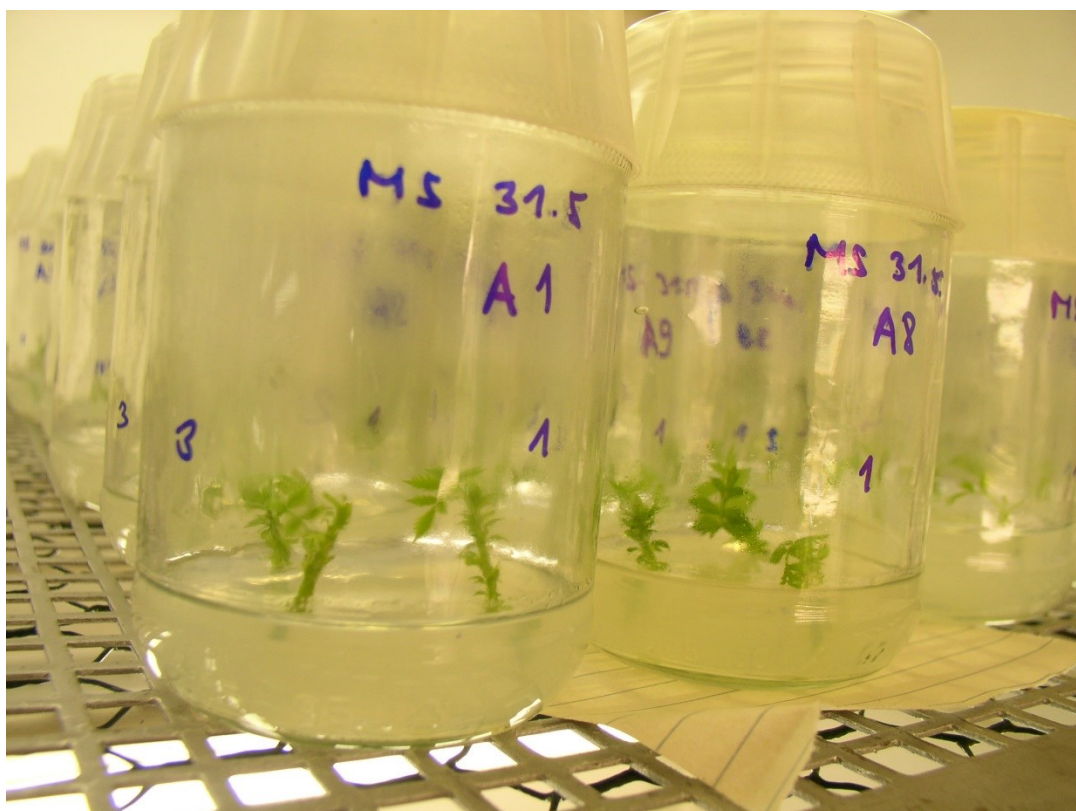
7. 1. Multiplikace jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.)

Výzkum multiplikace *Sorbus aucuparia* probíhal na již založených a iniciovaných kulturách. Bylo připraveno MS médium s růstovými regulátory BAP ($0,8 \text{ mg.l}^{-1}$) a IBA ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}$), dále byly přidány brassinosteroidy o 4 různých koncentracích. Médium obsahovalo sacharózu (30 g.l^{-1}), myo-inositol (100 mg.l^{-1}) a agar (7 g.l^{-1}), pH média činilo 5,7. Varianty s různými koncentracemi brassinosteroidů byly označeny písmeny A, B, C a D. Brassinosteroidy byly aplikovány v koncentracích $0,00 - 0,004 \text{ mg.l}^{-1}$ (viz tab. č. 1). Byly použity sklenice o objemu 200 ml s 30-35 ml živného média a uzavřeny plastovým víčkem s mikroventilací. Sterilizace živných médií probíhala v uzavřených sklenicích v autoklávu při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$ a tlaku 105 kPa po dobu 20 minut. Pro dodržení sterility byly prýty přesazovány ve flow boxu (laminární box s horizontálním prouděním vzduchu) za použití sterilních nástrojů pravidelně máčených v lihu (96% ethanol) a opalovaných nad lihovým kahanem. Prýty byly vkládány do média po 2-3 prýtech na sklenici. Prýty byly pěstovány v klimatizované místnosti při teplotě $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ s dobou svícení 16/8 hodin (den/noc).

Tab. č. 2 Varianty použitých koncentrací brassinosteroidů a fytohormonů

Označení varianty	Koncentrace BAP mg.l^{-1}	Koncentrace IBA mg.l^{-1}	Koncentrace brassinosteroidů mg.l^{-1}
A	0,8	0,2	0
B	0,8	0,2	0,00004
C	0,8	0,2	0,0004
D	0,8	0,2	0,004
A'	0	0	0
B'	0	0	0,00004
C'	0	0	0,0004
D'	0	0	0,004

Pokus multiplikace *Sorbus aucuparia* (L.) byl založen s opakováním, při kterém nebyly použity fytohormony IBA a BAP. Celkem bylo použito 14 sklenic na 1 variantu při jednom pokusu. Při multiplikaci bylo dohromady použito 274 prýtů *Sorbus aucuparia* (L.).



Obr. č. 5 Multiplikace jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) (foto autora)

7. 2. Zakořeňování jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.)

Při iniciaci zakořeňování byly použity prýty jeřábu namnožené ve fázi multiplikace. Pro indukci zakořeňování prýtů bylo použito $\frac{1}{2}$ WPM a $\frac{1}{2}$ MS médium s různými koncentracemi IBA a NAA, brassinosteroidů, sacharózy, caseinu a glutaminu (viz tab. 4). U $\frac{1}{2}$ WPM média byla přidána sacharóza (10 g.l^{-1}), myo-inositol (100 mg.l^{-1}), agar (7 g.l^{-1}), při pH 5,7. U MS média s polovičním obsahem makro a mikro prvků, byly přidány myo-inositol (100 mg.l^{-1}), agar (7 g.l^{-1}), pH 5,7 a pomocné složky uvedené v tabulce č. 3.

Sklenice byly označeny symbolem R a písmeny A – P. Pro zajištění sterility byla média autoklávována v uzavřených sklenicích o objemu 200 ml. Při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$, tlaku 105 kPa byla ponechána v autoklávu po dobu 20 minut. Jednotlivé prýty byly přesazovány ve flow boxu sterilními nástroji do sklenic s živnými médii (30-35 ml) uzavřených plastovým víčkem. Jedna sklenice obsahovala 2-3 prýty. Sklenice s prýty byly uloženy v klimatizované místnosti při teplotě $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ s dobou svícení 16 hodin. Pokusy zakořeňování byly prováděny v objemu 14 sklenic na variantu, kromě variant C-P, které byly připraveny po 7 sklenicích na variantu. Při zakořeňování bylo celkem použito 444 prýtů *Sorbus aucuparia* (L.).



Obr. č. 6 Prýt *Sorbus aucuparia* s kořenem (foto autora)

Tab. č. 3 Pokus zakořeňování *Sorbus aucuparia*, ½ WPM médium

Označení varianty	Koncentrace IBA mg.l ⁻¹	Koncentrace NAA mg.l ⁻¹	Koncentrace brassinosteroidů mg.l ⁻¹
A	0,5	0,3	0
B	0,5	0,3	0,00004
C	0,5	0,3	0,0004
D	0,5	0,3	0,004

Tab. č. 4 Pokus zakořeňování *Sorbus aucuparia*, ½ MS médium

Označení varianty	Koncentrace IBA mg.l ⁻¹	Koncentrace NAA mg.l ⁻¹	Koncentrace brassinosteroidů mg.l ⁻¹	Koncentrace sacharózy g.l ⁻¹	Koncentrace caseinu mg.l ⁻¹	Koncentrace glutaminu mg.l ⁻¹
AA	0,3		0	20	200	200
BB	0,3		0,00004	20	200	200
CC	0,3		0,0004	20	200	200
DD	0,3		0,004	20	200	200
C	0,8		0	10	0	0
D	1,6		0	10	0	0
E		0,05	0	10	0	0
F		0,1	0	10	0	0
G		0,2	0	10	0	0
H		0,4	0	10	0	0
I	0,05	0,05	0	10	0	0
J	0,1	0,1	0	10	0	0
K	0,2	0,2	0	10	0	0
L	0,4	0,4	0	10	0	0
M	0,05		0	10	0	0
N	0,1		0	10	0	0
O	0,2		0	10	0	0
P	0,4		0	10	0	0

7. 3. Převod jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) do nesterilního prostředí

Po fázi zakořeňování byly prýty jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) převedeny do nesterilního prostředí. Na prýty které nevytvořily kořeny, byl nejprve aplikován kořenící stimulant Stimulax I (HŮ-BEN), prýty byly očištěny, ponechány s dvěma až třemi listy a zasazeny do substrátu, který obsahoval rašelinu a perlit v poměru 3:1. Každé čtyři dny byla na sazenice aplikována zálivka s třemi variantami koncentrací brassinosteroidů (tab. č. 5) spolu s fungicidem Previcur 607 SL (Bayer CropScience AG). Sazenice byly pěstovány v miniskleníku v klimatizované místnosti při teplotě 22 ± 1 °C s dobou svícení 16 hodin. Celkem bylo do substrátu přesazeno 94 prýtů *Sorbus aucuparia* (L.).

Tab. č. 5 Koncentrace brassinosteroidů v zálivce

Označení varianty koncentrace	Koncentrace brassinosteroidů mg.l ⁻¹
A	0
B	0,0004
C	0,004



Obr. č. 7 Převedené prýty jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) do nesterilního prostředí (foto autora)

7. 4. Statistické hodnocení

Při statistickém hodnocení měření bylo použito základních statistických metod jako aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Analýza rozptylu a Tukeyova metoda mnohonásobného porovnání byly použity při vyhodnocení přírůstu mezi jednotlivými koncentracemi fytohormonů a brassinosteroidů, jak při fázi multiplikace, tak při fázi zakořeňování. Při použití analýzy rozptylu byla vždy určena základní hypotéza H_0 , která tvrdila, že není rozdíl v délkovém přírůstu prýtů nebo kořenů mezi jednotlivými variantami koncentrací. V případě, že tato hypotéza byla zamítnuta a výsledek potvrdil

statisticky významný rozdíl v délkovém přírůstu prýtů nebo kořenů, byla provedena Tukeyova metoda mnohonásobného porovnání. Tato metoda porovnávala rozdíly variant koncentrací pomocí průměrného rozdílu v délce prýtu nebo kořene a při jaké hladině významnosti. Při výpočtech byla použita hladina významnosti 0,05.

8. Výsledky

8. 1. Výsledky multiplikace jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.)

8. 1. 1. Vliv brassinosteroidů a IBA na jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia* L.)

Tento výzkum byl založen 14. 6. 2014 s prýty jeřábu z již založených a iniciovaných kultur. Délka výzkumu trvala 57 dní a ukončen byl ke dni 9. 8. 2014. Vzhledem k vysoké kontaminaci rostlinného materiálu přesazeného po jednom měsíci zde uvádím výsledky multiplikace po 29 dnech trvání pokusu.

Největší průměrný přírůst vykazovaly prýty nasazené na variantě A ($1,00 \pm 0,42$ cm), C ($0,93 \pm 0,30$ cm), B ($0,88 \pm 0,41$ cm) a nejmenší průměrný přírůst vykazovaly prýty varianty D ($0,70 \pm 0,54$ cm).

Tab. č. 6 Výsledky multiplikace s brassinosteroidy a IBA

Varianta koncentrace	Průměrný přírůst [cm]	Směrodatná odchylka [cm]	Maximální přírůst [cm]	Minimální přírůst [cm]
A	1,00	0,42	2,00	0,00
B	0,88	0,41	1,60	0,00
C	0,93	0,30	1,40	0,30
D	0,70	0,54	2,10	0,00

Již po jednom měsíci byla nulová hypotéza H_0 , která tvrdila, že není významný rozdíl v přírůstu prýtů mezi variantami koncentrací zamítnuta a Tukeyova metoda mnohonásobného porovnání prokázala statisticky významný rozdíl v přírůstu délek prýtů mezi variantou D a A, kde varianta A dosahovala většího průměrného přírůstu délek prýtů než varianta D.

Tab. č. 7 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání pokusu s brass. a IBA

Porovnání mezi variantami koncentrací	Průměrný rozdíl v přírůstu prýtů [cm]	Hladina významnosti
B-A	-0.112	0.638
C-A	-0.067	0.895
D-A	-0.302	0.009
C-B	0.045	0.964
D-B	-0.190	0.187
D-C	-0.236	0.065

Tab. č. 8 Namnožení prýtů pokusu s brassinosteroidy a IBA

Varianta koncentrace	Počáteční počet prýtů [ks]	Počet nových prýtů [ks]	Průměrná délka nového prýtu [cm]	Namnožení prýtů [%]
A	42	70	0,59	166,67
B	42	59	0,63	140,48
C	42	62	0,57	147,62
D	42	59	0,60	140,48

Při pozorování množení prýtů bylo zjištěno, že varianta A vytvořila nejvíce nových prýtů, varianta B vykazovala největší průměrnou délku nově vzniklých prýtů.

8. 1. 2. Vliv brassinosteroidů na jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia* L.) bez přidání BAP a IBA

Opakovaný výzkum vlivu brassinosteroidů při multiplikaci jeřábu ptačího probíhal od 23. 8. 2014 do 19. 10. 2014, tedy 58 dní.

Největší průměrný přírůst vykazovaly prýty varianty A' ($1,84 \pm 0,63$ cm), dále varianty B' ($1,50 \pm 0,66$ cm), D' ($1,37 \pm 0,70$ cm) a nejmenší průměrný přírůst délek prýtů vykazovala varianta C' ($1,29 \pm 0,65$ cm).

Tab. č. 9 Výsledky multiplikace s brassinosteroidy bez BAP a IBA

Varianta koncentrace	Průměrný přírůst [cm]	Směrodatná odchylka [cm]	Maximální přírůst [cm]	Minimální přírůst [cm]
A'	1,84	0,63	3,00	0,60
B'	1,50	0,66	3,10	0,30
C'	1,29	0,65	3,60	0,30
D'	1,37	0,70	3,90	0,00

Při použití analýzy rozptylu byla nulová hypotéza H_0 zamítnuta a Tukeyova metoda mnohonásobného porovnání potvrdila statisticky významný rozdíl v přírůstu prýtů mezi variantami C' a A', kde prýty varianty A' dosahovaly většího přírůstu než prýty varianty C'.

Tab. č. 10 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání pokusu s brass. bez IBA

Porovnání mezi variantami koncentrací	Průměrný rozdíl v přírůstu prýtlů [cm]	Hladina významnosti
B'-A'	-0.341	0.272
C'-A'	-0.544	0.022
D'-A'	-0.470	0.077
C'-B'	-0.203	0.668
D'-B'	-0.128	0.900
D'-C'	0.075	0.977

Prýtlý varianty s přidanými koncentracemi brassinosteroidů (0,00004 a 0,0004 mg.l⁻¹) B' a C' dosahují nejvyššího namnožení, ovšem největší průměrné délky nově vzniklých prýtlů dosahovaly prýtlý na variantách D' (s 0,004 mg.l⁻¹ brassinosteroidů). Z tohoto výsledku lze vyvodit, že brassinosteroidy sice nestimulují dlouhivý růst samotného prýtlů, ale spíše jeho namnožení a délky nových prýtlů.

Tab. č. 11 Namnožení prýtlů pokusu s brassinosteroidy bez IBA

Varianta koncentrace	Počáteční počet prýtlů [ks]	Počet nových prýtlů [ks]	Průměrná délka nového prýtlů [cm]	Namnožení prýtlů [%]
A'	24	10	1,00	41,67
B'	28	23	0,95	82,14
C'	29	21	0,92	72,41
D'	25	12	1,11	48,00

8. 1. 3 Srovnání výsledků multiplikace jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.)

Srovnání pokusů multiplikace jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) proběhlo mezi základním pokusem s přidanými brassinosteroidy a IBA a opakovaným pokusem s brassinosteroidy bez IBA. Výsledky byly vypočteny po prvním měření (jeden měsíc) z důvodu nezdařilosti pokusu s přidanými brassinosteroidy a IBA po přesazení a jeho následné kontaminaci.

Vyhodnocení potvrzuje předchozí výsledky, které dokazují, že prýtlý na variantě A dosahují nejvyššího průměrného přírůstu, dále v pořadí prýtlý varianty C, B a D.

Tab. č. 12 Výsledky multiplikace jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.)

Varianta koncentrace	Průměrný přírůst [cm]	Směrodatná odchylka [cm]	Maximální přírůst [cm]	Minimální přírůst [cm]
A	1,00	0,42	2,00	0,00
B	0,88	0,41	1,60	0,00
C	0,93	0,30	1,40	0,30
D	0,70	0,54	2,10	0,00
A'	1,08	0,47	1,80	0,10
B'	0,78	0,35	1,40	0,00
C'	0,89	0,52	2,10	0,10
D'	0,78	0,78	3,90	0,00

Nejúspěšnější namnožení prýtů bylo v celkovém souhrnu multiplikace zaznamenáno u prýtů nasazených na variantě A, dále C, B a D. V tomto souhrnu je značně viditelný rozdíl mezi namnožením prýtů v základním a opakovaném pokusu, což je dáno nepřítomností cytokininu BAP a auxinu IBA. Nejvyšší průměrné délky nových prýtů byly dosaženy u koncentrací s nejvyšším obsahem brassinosteroidů (0,004 mg.l⁻¹), brassinosteroidy tak příliš neovlivňují samotnou proliferaci, jako elongaci buněk. U médií kde nebyly přidány fytohormony, ovlivnily brassinosteroidy znatelně i namnožení, které ale u výsledků s použitými fytohormony bylo také velmi úspěšné.

Tab. č. 13 Namnožení při multiplikaci jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.)

Varianta koncentrace	Počáteční počet prýtů [ks]	Počet nových prýtů [ks]	Průměrná délka nového prýtu [cm]	Namnožení prýtů [%]
A	42	70	0,59	166,67
B	42	59	0,63	140,48
C	42	62	0,57	147,62
D	42	59	0,60	140,48
A'	24	10	0,74	41,67
B'	28	21	0,68	75,00
C'	29	20	0,69	68,97
D'	25	11	0,99	44,00

8. 2. Výsledky zakořeňování jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.)

8. 2. 1. Zakořeňování ½ WPM médium

Pokus zakořeňování jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) pěstovaného na ½ WPM médiu probíhal od 20. 9. 2014 do 17. 11. 2014, tedy 59 dní.

V tomto pokusu byl zkoumán jak dlouhivý růst prýtů, tak tvorba kořenů a jejich délka. Nejvyšších průměrných přírůstků dosahovaly prýty nasazené na variantě B ($1,97 \pm 0,69$ cm), D ($1,89 \pm 0,75$ cm) a nejmenších C a A ($1,28 \pm 0,43$ cm); ($1,27 \pm 0,65$ cm).

Tab. č. 14 Dlouhivý růst prýtů ve fázi zakořeňování ½ WPM

Varianta koncentrace	Průměrný přírůstek [cm]	Směrodatná odchylka [cm]	Maximální přírůstek [cm]	Minimální přírůstek [cm]
A	1,27	0,65	2,60	0,30
B	1,97	0,69	3,30	0,50
C	1,28	0,43	2,10	0,70
D	1,89	0,75	3,10	0,50

V následující tabulce je vyhodnocen průměrný rozdíl v délkách prýtů na jednotlivých variantách, kde bylo prokázáno, že při hladině významnosti nižší než 0,05 jsou výrazné statistické rozdíly mezi přírůsty prýtů variant B a A, D a A a C a B.

Tab. č. 15 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání v délce prýtů pokusu ½ WPM

Porovnání mezi variantami koncentrací	Průměrný rozdíl v přírůstu prýtů [cm]	Hladina významnosti
B-A	0.726	0.003
C-A	0.034	0.999
D-A	0.640	0.021
C-B	-0.693	0.014
D-B	-0.086	0.973
D-C	0.606	0.061

Nejvhodnější koncentrací se jeví varianta D a C, kde prýty dosahovaly nejvyššího zakořeňování, oproti tomu na variantách A a B dosahovaly kořeny delších rozměrů.

Tab. č. 16 Výsledky zakořeňování ½ WPM

Varianta koncentrace	Počet prýtů [ks]	Počet zakořeněných prýtů [ks]	Počet rhizoidů [ks]	Průměrná délka rhizoidu [cm]	Zakořeněných prýtů [%]
A	20	1	1	0,40	5,00
B	28	1	1	0,40	3,57
C	14	2	2	0,35	14,29
D	20	3	3	0,20	15,00

8. 2. 2. Zakořeňování ½ MS médium s brassinosteroidy

MS médium s polovičním obsahem prvků bylo použito pro výzkum zakořeňování trvajícím od 17. 11. 2014 do 11. 1. 2015, tedy 56 dní.

Při zkoumání délek prýtů dosahovaly největšího průměrného přírůstu prýty nasazené na variantě AA ($0,82 \pm 0,60$ cm), dále DD ($0,59 \pm 0,39$ cm), CC ($0,55 \pm 0,33$ cm) a BB ($0,47 \pm 0,25$ cm).

Tab. č. 17 Dlouhivý růst prýtů ve fázi zakořeňování ½ MS + brassinosteroidy

Varianta koncentrace	Průměrný přírůst [cm]	Směrodatná odchylka [cm]	Maximální přírůst [cm]	Minimální přírůst [cm]
AA	0,82	0,60	2,20	0,10
BB	0,47	0,25	0,90	0,10
CC	0,55	0,33	1,20	0,00
DD	0,59	0,39	1,80	0,00

Po zamítnutí nulové hypotézy H_0 prokázala Tukeyova metoda mnohonásobného porovnání statisticky významný rozdíl v přírůstu prýtů mezi variantami koncentrací BB a AA, kdy prýty nasazené na variantě AA dosahovaly většího průměrného délkového přírůstu prýtů než prýty nasazené na variantě BB.

Tab. č. 18 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání ½ MS s brass.

Porovnání mezi variantami koncentrací	Průměrný rozdíl v přírůstu prýtů [cm]	Hladina významnosti
BB-AA	-0.343	0.023
CC-AA	-0.271	0.090
DD-AA	-0.230	0.202
CC-BB	0.073	0.922
DD-BB	0.113	0.770
DD-CC	0.040	0.984

Pokus zakořeňování na živném médiu ½ MS s brassinosteroidy nebyl zcela úspěšný, dokazuje to procentuelní vyjádření zakořenělých prýtů, kde nejvyšších hodnot dosahovaly prýty nasazené na variantě D a C, nýbrž tento výsledek potvrzuje výsledky u zakořeňování na médiu ½ WPM. Vlivem by mohla být přítomnost brassinosteroidů, které někdy inhibují tvorbu kořenů.

Tab. č. 19 Výsledky zakořeňování ½ MS s brassinosteroidy

Varianta koncentrace	Počet prýtů [ks]	Počet zakořenělých prýtů [ks]	Počet rhizoidů [ks]	Průměrná délka rhizoidu [cm]	Zakořeněných prýtů [%]
AA	28	0	0	0,0	0
BB	29	0	0	0,0	0
CC	29	1	1	3,0	3,45
DD	27	1	1	0,2	3,70

8. 2. 3. Zakořeňování ½ MS médium bez brassinosteroidů

Díky neuspokojivým výsledkům předchozích pokusů zakořeňování byl založen pokus na médiu ½ MS bez brassinosteroidů, aby bylo zjištěno, jaká koncentrace auxinů IBA nebo NAA je nejvhodnější pro iniciaci zakořeňování a zda se potvrdí inhibiční účinky brassinosteroidů v zakořeňovacím médiu. Pokus byl zahájen 12. 12. 2014 a ukončen 11. 2. 2015, celkem trval 62 dní.

Nejvyššího přírůstu délek prýtů dosahovaly prýty varianty F ($0,93 \pm 0,46$ cm), H ($0,78 \pm 0,95$ cm) a nejmenších hodnot prýty nasazené na variantě G ($0,29 \pm 0,27$ cm).

Tab. č. 20 Dlouhivý růst prýtů ve fázi zakořeňování ½ MS bez brassinosteroidů

Varianta koncentrace	Průměrný přírůst [cm]	Směrodatná odchylka [cm]	Maximální přírůst [cm]	Minimální přírůst [cm]
C	0,33	0,29	0,90	0,00
D	0,56	0,39	1,10	0,00
E	0,49	0,46	1,30	0,00
F	0,93	0,46	2,00	0,10
G	0,29	0,27	1,00	0,00
H	0,78	0,95	3,70	0,10
I	0,40	0,43	1,40	0,00
J	0,32	0,28	1,00	0,00
K	0,40	0,28	0,90	0,00
L	0,38	0,31	1,00	0,00
M	0,36	0,29	1,00	0,00
N	0,72	0,73	2,60	0,00
O	0,61	0,52	2,00	0,00
P	0,65	0,40	1,40	0,10

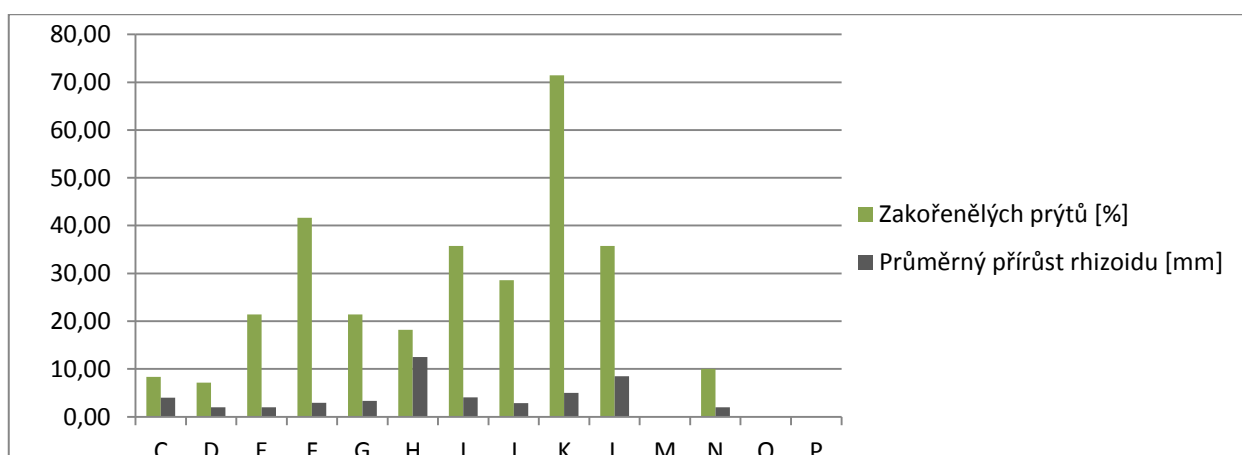
Nulová hypotéza H_0 , která tvrdila, že není rozdíl v průměrném přírůstu prýtů, nebyla zamítnuta, výsledek Tukeyovy metody je uveden v příloze č. 4 a je zde vidět, že hladina významnosti mezi jednotlivými variantami neklesla pod hodnotu 0,05.

Nejvyšší procento zakořeňování vykazovaly prýty nasazené na variantě K s koncentrací IBA $0,20 \text{ mg.l}^{-1}$ a NAA $0,20 \text{ mg.l}^{-1}$, dále varianty F ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA), I ($0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ IBA + $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA) a L ($0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ IBA + $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA), Prýty nasazené na variantách koncentrací M, O a P nevytvořily žádný rhizoid.

Tab. č. 21 Výsledky zakořeňování ½ MS bez brassinosteroidů

Varianta koncentrace	Počet prýtů [ks]	Počet zakořeněných prýtů [ks]	Počet rhizoidů [ks]	Průměrná délka rhizoidu [cm]	Zakořeněných prýtů [%]
C	12	1	2	0,4	8,33
D	14	1	1	0,2	7,14
E	14	3	4	0,2	21,43
F	12	5	8	0,3	41,67
G	14	3	7	0,3	21,43
H	11	2	4	1,3	18,18
I	14	5	6	0,4	35,71
J	14	4	6	0,3	28,57
K	14	10	16	0,5	71,43
L	14	5	11	0,8	35,71
M	14	0	0	0,0	0,00
N	10	1	1	0,2	10,00
O	10	0	0	0,0	0,00
P	14	0	0	0,0	0,00

Nulová hypotéza H_0 , která tvrdila, že není rozdíl v průměrném přírůstu kořenů, byla zamítnuta a Tukeyova metoda mnohonásobného porovnání (příloha č. 5) určila statistické rozdíly mezi jednotlivými variantami koncentrací IBA a NAA v médiu. Nejdelšího průměrného přírůstu délek kořenů dosáhla varianta L (0,8 cm), proto je zvýrazněn rozdíl mezi varianty L-E, L-F, L-G, L-I a L-K (příloha č. 5), kde je vyhodnocen průměrný rozdíl v přírůstu kořenů mezi jednotlivými varianty koncentrací fytohormonů.



Graf č. 1 Závislost průměrného přírůstu rhizoidů a zakořeněných prýtů

Jako nejvhodnější koncentraci fytohormonů pro zakořeňování *Sorbus aucuparia* proto hodnotím variantu K (0,2 mg.l⁻¹ IBA + 0,2 mg.l⁻¹ NAA), kde dosáhly prýty nejvyššího procenta zakořeňování. Varianta koncentrace L (0,4 mg.l⁻¹ IBA + 0,4 mg.l⁻¹ NAA) má však také z hlediska zakořeňovaných prýtů a průměrného přírůstu rhizoidů uspokojivé účinky.

8. 3. Výsledky převodu jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) do nesterilního prostředí

Pokus s přesazením prýtů do nesterilního prostředí nebyl po 26 dnech trvání úspěšný. V tabulce jsou uvedeny počty prýtů, průměrný přírůst prýtů a jejich mortalita, ta byla však tak vysoká, že pokus nemohl být statisticky vyhodnocen.

Tab. č. 22 Výsledky převodu prýtů do nesterilního prostředí

Označení varianty koncentrace	Počet prýtů [ks]	Počet přeživších prýtů [ks]	Průměrný přírůst prýtů [cm]	Mortalita [%]
A	30	1	0,5	96,67
B	32	1	1	96,86
C	32	5	0,9	84,36

9. Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit vliv brassinosteroidů na růst jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) v *in vitro* kulturách ve fázích multiplikace, zakořeňování a převodu do nesterilního prostředí. Výzkum zakořeňování ovlivnila přítomnost brassinosteroidů v živném médiu, prýty tvořily kořeny pouze ojediněle, proto bylo později přistoupeno k soustředování se na hledání média s koncentrací fytohormonů vhodnou pro úspěšnou iniciaci zakořeňování a aplikace brassinosteroidů byla proto vynechána.

Výzkum multiplikace jeřábu byl prováděn na již založených a iniciovaných kulturách jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.). Po dostatečném namnožení prýtů započaly pokusy na MS médiu s přidanými brassinosteroidy v koncentracích 0,0 – 0,004 mg.l⁻¹ a v základním pokusu s navíc přidanými fytohormony BAP (0,8 mg.l⁻¹) a IBA (0,2 mg.l⁻¹). Nejlepších výsledků v délkovém přírůstu prýtů a namnožení dosahovaly prýty jeřábu nasazené na MS médiu s přidanými fytohormony. Nepřítomnost fytohormonů v opakované části pokusu znatelně snížila namnožení prýtů, avšak nejvyšších hodnot namnožení zde dosahovaly prýty s přidanými brassinosteroidy v koncentraci 0,00004 mg.l⁻¹. S vyšší koncentrací brassinosteroidů (0,004 mg.l⁻¹) není namnožení sice vysoké, ale průměrná délka nově vzniklých prýtů je podstatně vyšší než u prýtů s nižšími koncentracemi brassinosteroidů.

Veliký vliv má přítomnost cytokininu BAP v médiu, který stimuluje množení prýtů a bez kterého prýty dosahují velmi nízkého namnožení. Marques et al. (2013) uvádí nejvhodnější koncentraci BAP v médiu 2,0 mg.l⁻¹, při které dosahovaly prýty jeřábu břeku (*Sorbus torminalis* L.) nejvyššího namnožení.

Chalupa (2000) prováděl experimenty *in vitro* rozmnožování jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.), které probíhaly ve fázích multiplikace na živném médiu MS a se stoupající koncentrací BAP (0,2–1,0 mg.l⁻¹) stoupal počet nově vytvořených prýtů, ovšem na úkor jejich délky. Dále vysokých hodnot množení dosahovaly prýty na MS médiu s přidaným TDZ (Thidiazuron) v koncentraci 0,05 mg.l⁻¹, ovšem prýty byly velmi krátké (0,5 ± 0,2 cm). Dále byla v médiích přítomna IBA v nízké koncentraci (0,1 mg.l⁻¹).

Ördögh et al. (2006) použili MS médium s polovičním obsahem makroprvků. Největšího namnožení dosahovaly prýty s koncentrací fytohormonů BAP (0,75 mg.l⁻¹) a IBA (0,05 mg.l⁻¹). Pozorování vlivu fytohormonů na proliferaci *Sorbus redliana* trvalo 50-52 dní.

Vliv brassinosteroidů na růst *Arachis hypogaea* L. zkoumali Verma et al. (2012). Explantáty byly nasazeny na MS médium s přidáním koncentracemi brassinosteroidů (0,5, 1,0 a 2,0 ml.l⁻¹) v kombinaci s 3,0 mg.l⁻¹ cytokininu BA. Výsledky byly vyhodnoceny po 40 dnech. Pozorování morfologických znaků potvrdilo, že brassinosteroidy výrazně zlepšily růst explantátů. Nejvyšší proliferace dosáhly explantáty nasazené na médiu s přidanou koncentrací brassinosteroidů 1,0 ml.l⁻¹ + 3 mg.l⁻¹ BA.

Vliv koncentrace růstových regulátorů v kultivačních médiích na prýty pěti druhů *Dioscorea* Spp. porovnávali Engelman-Sylvestre et al. (2013). Polovina prýtů byla nasazena na S médium s přidáním koncentracemi 0,6 μM BAP, 1,07 μM NAA, 0,23 μM GA3 bez přidání brassinosteroidů, druhá polovina byla kultivována na EBR médiu s přidáním koncentracemi giberelinu 0,23 μM GA3 a 0,1 μM brassinosteroidů. Bylo zjištěno, že prýty rostly lépe na médiu s brassinosteroidy, např. u druhu *Dioscorea alata* dosahovaly prýty délek 7,93 ± 3,03 mm na EBR médiu, oproti prýtům na S médiu (6,73 ± 3,03 mm), měřeno po 2 měsících.

Výše uvedené experimenty jiných autorů potvrzují, že přítomnost cytokininu BAP v živném médiu je nutná k dosažení uspokojivých hodnot namnožených prýtů. Proto v části multiplikace bez BAP došlo k výraznému snížení namnožených prýtů z důvodu nepřítomnosti BAP v médiu. Dále bylo zjištěno, že přítomnost brassinosteroidů v médiích pozitivně ovlivňuje proliferaci a délkový přírůst prýtů.

Prýty namnožené ve fázi multiplikace byly použity při fázi zakořeňování, které bylo zkoumáno na médiích MS a WPM s polovičním obsahem makro a mikro prvků. Přidány byly auxiny IBA a NAA (0,0-0,4 mg.l⁻¹) a brassinosteroidy (0,0-0,004 mg.l⁻¹). Zkoumán byl jak dlouhý růst prýtů, tak zakořeňování a délky kořenů. Nejvyšších průměrných přírůstků délek prýtů bylo dosaženo u ½ WPM média na variantách s koncentrací IBA (0,50 mg.l⁻¹) a NAA (0,30 mg.l⁻¹) a brassinosteroidy (0,00004 mg.l⁻¹). Zakořeňovací pokusy s přidáním brassinosteroidy nebyly úspěšné, pravděpodobně z důvodu inhibice tvorby kořenů brassinosteroidy. Nejvhodnější médium pro zakořeňování jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) se projevilo ½ MS s koncentrací IBA (0,2 mg.l⁻¹) a NAA (0,2 mg.l⁻¹) bez přidání brassinosteroidů, kde procento zakořeňování dosahovalo necelých 72 %.

Mikrořízky endemitních druhů jeřábů byly pasážovány na MS médium s koncentracemi hormonů a přídatných látek MeOBAP 0,2 mg.l⁻¹, IBA 0,1 mg.l⁻¹, glutamin 100 mg.l⁻¹, kaseinový hydrolyzát 100 mg.l⁻¹, sacharóza 30 g.l⁻¹, agar 6 g.l⁻¹, při pH 5,8. Fáze zakořeňování probíhala ve dvou fázích, nejprve byly mikrořízky

přesazeny na MS médium obsahující jednu třetinu makro a mikro prvků. Přidána byla NAA (14 mg.l^{-1}), tato fáze trvala 7 dní a probíhala ve tmě, dále byly mikrořízky přesazeny na stejné médium, tentokrát bez přidání auxinu a zde byly již kultivovány za běžných podmínek. První kořeny se začaly objevovat během 4-6 týdnů u 70-80 % mikrořízků (Malá et al., 2014).

Marques et al. (2013) popisují dosažení maximálních procent zakořenění (67-77 %, kde nejdelší kořen dosáhl délky 5,4 cm) u prýtů *Sorbus torminalis* L. vložených na MS médium po dobu 42-78 hod. s koncentrací IBA ($50-100 \text{ mg.l}^{-1}$), při následném přesazení prýtů a jejich aklimatizaci nedošlo k úhynu, vzhledem k vyvinutému kořenovému systému byl tak převod do nesterilního prostředí 100% úspěšný.

González et al. (2003) hodnotili indukci prýtů a zakořenění (*Ipomoea batatas* L.) s koncentracemi brassinosteroidů ($0,0-0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) na MS médiu s přidaným auxinem IAA ($0,05 \text{ mg.l}^{-1}$). Bylo zkoumáno pět různých klonů (*Ipomoea batatas* L.) a u všech došlo k nejvyššímu procentu zakořenění (66,7-100 %) při koncentraci brassinosteroidů $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$.

Po ukončení pokusů zakořeňování *Sorbus aucuparia* byly prýty převedeny do nesterilního prostředí. Na prýty, které nevytvořily kořeny, byl aplikován práškový stimulant, který podporuje tvorbu kořenů. Mortalita prýtů byla vysoká (84,36-96,86 %), pravděpodobně z nedostatečně vyvinutého kořenového systému. Na prýty dvou variant byla dále aplikována zálivka s brassinosteroidy, která mohla inhibovat účinky použitého stimulantu.

Na část sazenic lesních dřevin (*Pinus sylvestris*, *Fagus sylvatica*) byla aplikována zálivka s brassinosteroidy v koncentraci $0,02 \text{ mg.l}^{-1}$, zbylé sazenice byly ponechány pro kontrolu. Zkoumány byly přírůsty výšky sazenic a přírůsty kořenových krčků, u sazenic borovice lesní s aplikací brassinosteroidy byly výsledky přírůstů nižší než u kontrolních sazenic, u buku lesního byly výsledky vyšší, ale ne s příliš vysokým rozdílem od kontrolních sazenic. Mortalita sazenic u borovice lesní (v průměru 39,72 %) byla vyšší než u kontrolních sazenic (36,30 %), u buku lesního tomu bylo naopak (22,15 %), avšak opět s nízkým rozdílem oproti kontrole (18,95 %) (Poláček, 2014).

Semena *Ailanthus altissima* byla nejprve sterilizována a poté máčena dva dny v koncentracích brassinosteroidů ($0,1-0,6 \text{ mg.l}^{-1}$). Část semen byla ponechána pro kontrolu. Klíčivost semen máčených v koncentracích brassinosteroidů byla vyšší než u semen ponechaných pro kontrolu. Nejvyššího klíčení dosáhla semena s koncentrací brassinosteroidů $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ (66,8 %) oproti kontrole (49,2 %). Délkový

přírůst hypocotylu byl opět nejvyšší s koncentrací brassinosteroidů $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ (Li, Zhang et Li, 2005).

Vliv brassinosteroidů na lesní dřeviny není k dnešnímu dni příliš prozkoumán. Zkoumání brassinosteroidů v kulturách *in vitro* u lesních dřevin takřka neprobíhá, proto jsou v diskuzi uvedeny výzkumy i na jiných druzích rostlin.

10. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo popsat vliv brassinosteroidů na růst jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) v kultuře *in vitro*. Při práci v laboratoři byly použity již založené kultury jeřábu, jejichž primární explantát pocházel z mateřských stromů v Ozeleňovacím středisku ŠLP v Kostelci nad Černými lesy.

Při multiplikaci *Sorbus aucuparia* se jeví jako nejvhodnější množít prýty na MS médiu s přidáním brassinosteroidy v koncentraci $0,00004 \text{ mg.l}^{-1}$, avšak s přidáním fytohormonů BAP a IBA, které výrazně zvyšují namnožení prýtů. V případě většího zájmu o délkový přírůst prýtů oproti namnožení doporučuji koncentraci brassinosteroidů zvýšit na $0,04 \text{ mg.l}^{-1}$.

Zakořeňování *Sorbus aucuparia* s přidáním brassinosteroidů se v práci dařilo velmi obtížně. Při absenci brassinosteroidů prýty nasazené na MS médiu s polovičním obsahem prvků a přidáním fytohormony IBA a NAA ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}$) dosahovaly nejvyššího procenta zakořeňování. Vliv brassinosteroidů na zakořeňování proto navrhuji zkoumat na tomto živném médiu s brassinosteroidy ve větším rozpětí koncentrací.

Převod prýtů do nesterilního prostředí se stal z důvodu nevytvořených kořenových systémů takřka nemožný. Přesto u prýtů s aplikovanou zálivkou s brassinosteroidy došlo k nižší úmrtnosti. Doporučila bych tak po úspěšném zakořeňování prýtů a přesazení do substrátu aplikovat zálivku s vyšší koncentrací brassinosteroidů.

Ke zdárnému zakončení pěstování jeřábu ptačího v *in vitro* kulturách je potřeba rozšířit oblast pozorování ve fázích zakořeňování a převodu do nesterilního prostředí. Vhodné určení samotného média a koncentrace brassinosteroidů může mít významný vliv na vývoj explantátů.

11. Použitá literatura

AGEEVA, I. F.; PRUSAKOVA, L. D.; CHIZHOVA, S. I. *Influence of brassinosteroids on stem formation and potassium and calcium ions content in spring barley plants*. Agrokhimiya 6. 2001. s. 49-55.

BAJGUZ, A.; HAYAT, S. *Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses*. Plant Physiology and Biochemistry 47. 2009. s. 1-8

BEČKA, D.; KLOUČEK, P.; HRADECKÁ, D.; KOUHOUT, L. *Influence of Brassinosteroids Application on Growth, Yield and Winter Rapeseed Quality*. Sborník z konference „Prosperující olejniny“. 2007. s. 59-63

BÜRKI, M.; TOMMASINI, D.; JAKOB, F. *Bildatlas Bäume und Sträucher in Ziergärten und Parkanlagen: Steckbriefe und Tabellen von A - Z*. Stuttgart (Hohenheim): Ulmer, 2002. ISBN 9783800138890.

CLOUSE, S. D.; SASSE, J. M. *Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49. 1998. s. 427–451

CUTLER, H. G.; YOKOTA, T.; ADAM G. *Brassinosteroids Chemistry, Bioactivity, and Applications*. Am. Chem. Soc., Washington DC. 1991. s.

ENGELMANN-SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. *Effect of 24-Epibrassinolide on Growth of in Vitro Shoot Tips of Different Yam (Dioscorea Spp.) Species*. American Journal of Plant Sciences, 2013, 4. 2013. s. 2271-2274

CHALUPA, V. *In vitro propagation of mature trees of Sorbus aucuparia L. and field performance of micropropagated trees*. Journal of forest science, 48. 2002 (12). s. 529–535

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, M. D.; THORPE, A. T. *Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 32. 1996. s. 272-289

GAUTHIER, N. W.; KAISER, CH.; KLAHR, M. *Transplant Shock: Disease or Cultural Problem?* Cooperative Extension Service University of Kentucky College of Agriculture Food and Environment PPFs-OR-W-19. 2014. 10 s.

GONZÁLES, O.; HERNÁNDEZ, M. M.; SILVA, J.; ESPINOSA, A.; OLIVA, E.; SIGARROA, A. NÚÑEZ, M. *Evaluation of two brassinosteroid analogues on callus formation and shoot induction in sweet potato (Ipomoea batatas (L.) Lam.)*. Cultivos Tropicales, 2003, vol. 24, no. 3. 2003. s. 11-18

- GROVE, M. D.; SPENCER, G. F.; ROHWEDDER, W. K.; MANDAVA, N.; WORLEY, J. F.; STEFFENS, J. D. W. G. L.; FLIPPEN-ANDERSON, J. L.; CARTER COOK, J. *Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen*. Nature 281. 1979. s. 216–217
- KAZAKOVA, V. N.; KARSUNKINA, N. P.; SUKHOVA, L. S. *Effect of brassinolide and fusicoccin on potato productivity and tuber resistance to fungal diseases under storage*. Izvestiia Timiryazevskoi sel'skokhoziaistvennoi Akademii. 1991. s. 82-88
- KHRIPACH, V. A.; ZHABINSKII, V. N.; GROOT, A. D. *Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century*. Annals of Botany 86. 2000. s. 441-447
- KHRIPACH, V. A.; ZHABINSKII, V. N.; MALEVANNAYA, N. N. *Recent advances in brassinosteroids study and application*. Proc. the Plant Growth Regulation Society of America, 24. 1997. s. 101-106.
- KHRIPACH, V. A.; ALTSIVANOVICH, K.; ZHABINSKII, V. N.; SAMUSEVICH, M. *Natural plant compound with anti-HIV activity*. Patent. 2005
- KINCL, L.; KINCL, M.; JAKRLOVÁ, J. *Biologie rostlin*. Nakladatelství Fortuna. 2000. 256 s. ISBN 9788071689478.
- LI, K., ZHANG, W., LI, H.. *Effect of natural brassinolide on germination of Ailanthus altissima seeds*. Forestry Studies in China 7(2). 2005. s. 12 – 14
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. *Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture*. Proceedings of the International Plant Propagation Society. 1981. 30: s. 421-427.
- LOHMANN, M. *Bäume und Sträucher*. 3., durchges. Aufl. München, Wien, Zürich: BLV, 1997. ISBN 3405143004.
- LUŠTINEC, J.; ŽÁRSKÝ, V. *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 261 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0563-5.
- MALÁ, J.; CVRČKOVÁ, H.; MÁCHOVÁ, P.; BURIÁNEK, V. *Mikropropagace endemických jeřábů (Sorbus spp.)*. Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. Lesnický průvodce 4/2014. 2014. 22 s.

- MARQUES, S. L.; CANHOTO, J.; GONÇALVES, J. C.; DIOGO, M. G. *Micropropagation of Sorbus torminalis (L.) Crantz: Hormonal Effects during Multiplication and Rooting Phases*. Acta Hort. (ISHS) 990. 2013. s. 397-404
- MERGL, J. *Lesnícka botanika*. 2. vyd. Bratislava: Príroda, 1990, 243 s. ISBN 80-07-00379-7.
- MEUDT, W. J.; THOMPSON, M. J. *Investigations on the mechanism of brassinosteroid response. II. A modulation of auxin action*. Proceedings of the 10th Annual Meeting of the Plant Growth Regulators Society of America. Madison, USA. 1983. s. 306-311
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 1962. 15: s. 473-497
- ÖRDÖGH, M.; JÁMBOR-BENCÚR, E.; TILLY-MÁNDY, A.; LELIK, L. *The effects of growth regulators in proliferation of Sorbus redliana 'Burokvölgy'*. International Journal of Horticultural Science, 12 (1). 2006. s. 77–83
- PEREIRA-NETTO, A. B. *Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health*. Bentham Science Publishers. 2012. 103 s.
- POLÁČEK, J. *Vliv brassinosteroidů na prosperitu mladých kultur lesních dřevin*. Česká zemědělská univerzita v Praze. 2014. 54 s.
- PODLEŠÁKOVÁ, K.; TARKOWSKÁ, D.; PĚNČÍK, A.; OKLEŠŤKOVÁ, J.; TUREČKOVÁ, V.; FLOKOVÁ, K.; TARKOWSKI, P. *Nové trendy v analýze fytohormonů*. Chem. Listy 106. 2012. s. 373-379
- PROCHÁZKA, S. *Morfologie a fyziologie rostlin: Určeno pro posl. agronomické a zahradnické fak.* 1. vyd. Brno: Vysoká škola zemědělská, 1994, 222 s. ISBN 80-7157-108-3.
- PROCHÁZKA, S.; a kol. *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1998, 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
- RAO, S. S. R.; VARDHINI, B. V.; SUJATHA, E.; ANURADHA, S. *Brassinosteroids – A new class of phytohormones*. Current Science, vol. 82, NO. 10. 2002. s. 1239-1245
- VERMA, A.; MALIK, C. P.; GUPTA, V. K. *In Vitro Effects of Brassinosteroids on the Growth and Antioxidant Enzyme Activities in Groundnut*. International Scholarly Research Network, ISRN Agronomy, volume 2012. 2012. 8 s.

WACHSMAN, M. B.; RAMIREZ, J. A.; GALAGOVSKY, L. R.; COTO, C. E. *Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures*. *Antiviral Chemistry Chemotherapy*. 13. 2002. s. 61-67.

WATSON, G. W. *Tree transplating and establishment*. *Arnoldia* 12 Winter 1996-1997. 6 s.

12. Seznam příloh

Příloha č. 1 Složení MS média (Murashige a Skoog, 1962)	48
Příloha č. 2. Složení WPM média (Lloyd, McCown, 1982)	49
Příloha č. 3 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání při srovnání měření multiplikace jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.)	50
Příloha č. 4 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání při srovnání měření délek prýtů u zakořeňování jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.) ½ MS médium bez brassinosteroidů	51
Příloha č. 5 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání při srovnání měření délek kořenů u zakořeňování jeřábu ptačího (<i>Sorbus aucuparia</i> L.) ½ MS médium bez brassinosteroidů	54

13. Přílohy

Příloha č. 1. Složení MS média (Murashige et Skoog, 1962)

Sloučenina	MS médium mg.l ⁻¹
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ . 4H ₂ O	8,6
KI	0,8
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,02
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02
Thiamine HCl	1,0
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Myo-Inositol	100
Sacharóza	30 000
Agar	7 000

Příloha č. 2. Složení WPM média (Lloyd et McCown, 1982)

Sloučenina	WPM médium mg.l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	400
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	556
CaCl ₂ · 2H ₂ O	96
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
K ₂ SO ₄	990
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25
Thiamine HCl	1
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Myo-Inositol	100
Sacharóza	30 000
Agar	7 000

Příloha č. 3 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání při srovnání měření multiplikace jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.)

Porovnání mezi variantami koncentrací	Průměrný rozdíl v délce prýtu [cm]	Hladina významnosti
B-A	-0.112	0.967
C-A	-0.067	0.999
D-A	-0.302	0.092
A'-A	0.084	0.998
B'-A	-0.217	0.611
C'-A	-0.102	0.989
D'-A	-0.235	0.551
C-B	0.045	1.000
D-B	-0.190	0.632
A'-B	0.196	0.772
B'-B	-0.105	0.988
C'-B	0.010	1.000
D'-B	-0.123	0.975
D-C	-0.236	0.351
A'-C	0.151	0.931
B'-C	-0.150	0.914
C'-C	-0.035	1.000
D'-C	-0.169	0.873
A'-D	0.386	0.046
B'-D	0.086	0.996
C'-D	0.200	0.691
D'-D	0.067	0.999
B'-A'	-0.301	0.351
C'-A'	-0.186	0.867
D'-A'	-0.319	0.308
C'-B'	0.115	0.987
D'-B'	-0.019	1.000
D'-C'	-0.133	0.975

Příloha č. 4 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání při srovnání měření délek prýtů u zakořeňování jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) ½ MS médium bez brassinosteroidů

Porovnání mezi variantami koncentrací	Průměrný rozdíl v přírůstu prýtů [cm]	Hladina významnosti
D-C	0.232	0.993
E-C	0.154	1.000
F-C	0.600	0.115
G-C	-0.032	1.000
H-C	0.457	0.550
I-C	0.075	1.000
J-C	-0.004	1.000
K-C	0.075	1.000
L-C	0.054	1.000
M-C	0.039	1.000
N-C	0.395	0.797
O-C	0.285	0.980
P-C	0.325	0.897
E-D	-0.079	1.000
F-D	0.368	0.782
G-D	-0.264	0.970
H-D	0.225	0.996
I-D	-0.157	1.000
J-D	-0.236	0.989
K-D	-0.157	1.000
L-D	-0.179	0.999
M-D	-0.193	0.998
N-D	0.163	1.000
O-D	0.053	1.000
P-D	0.093	1.000
F-E	0.446	0.488
G-E	-0.186	0.999
H-E	0.303	0.947
I-E	-0.079	1.000
J-E	-0.157	1.000
K-E	-0.079	1.000
L-E	-0.100	1.000
M-E	-0.114	1.000
N-E	0.241	0.994
O-E	0.131	1.000
P-E	0.171	1.000
G-F	-0.632	0.052
H-F	-0.143	1.000

I-F	-0.525	0.227
J-F	-0.604	0.080
K-F	-0.525	0.227
L-F	-0.546	0.175
M-F	-0.561	0.146
N-F	-0.205	0.999
O-F	-0.315	0.955
P-F	-0.275	0.970
H-G	0.489	0.373
I-G	0.107	1.000
J-G	0.029	1.000
K-G	0.107	1.000
L-G	0.086	1.000
M-G	0.071	1.000
N-G	0.427	0.646
O-G	0.317	0.939
P-G	0.357	0.769
I-H	-0.382	0.765
J-H	-0.460	0.476
K-H	-0.382	0.765
L-H	-0.403	0.692
M-H	-0.418	0.639
N-H	-0.062	1.000
O-H	-0.172	1.000
P-H	-0.132	1.000
J-I	-0.079	1.000
K-I	0.000	1.000
L-I	-0.021	1.000
M-I	-0.036	1.000
N-I	0.320	0.935
O-I	0.210	0.998
P-I	0.250	0.981
K-J	0.079	1.000
L-J	0.057	1.000
M-J	0.043	1.000
N-J	0.399	0.745
O-J	0.289	0.971
P-J	0.329	0.857
L-K	-0.021	1.000
M-K	-0.036	1.000
N-K	0.320	0.935
O-K	0.210	0.998
P-K	0.250	0.981
M-L	-0.014	1.000
N-L	0.341	0.898

O-L	0.231	0.996
P-L	0.271	0.963
N-M	0.356	0.867
O-M	0.246	0.993
P-M	0.286	0.945
O-N	-0.110	1.000
P-N	-0.070	1.000
P-O	0.040	1.000

Příloha č. 5 Výsledky Tukeyovy metody mnohonásobného porovnání při srovnání měření délek kořenů u zakořeňování jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) ½ MS médium bez brassinosteroidů

Porovnání mezi variantami koncentrací	Průměrný rozdíl v přírůstu kořenů [cm]	Hladina významnosti
D-C	-1.550	0.953
E-C	-1.417	0.845
F-C	-1.264	0.832
G-C	-0.867	0.986
H-C	0.010	1.000
I-C	-1.270	0.862
J-C	-1.350	0.755
K-C	-0.930	0.960
L-C	0.759	0.992
N-C	-1.550	0.953
E-D	0.133	1.000
F-D	0.286	1.000
G-D	0.683	1.000
H-D	1.560	0.903
I-D	0.280	1.000
J-D	0.200	1.000
K-D	0.620	1.000
L-D	2.309	0.402
N-D	0.000	1.000
F-E	0.152	1.000
G-E	0.550	0.999
H-E	1.427	0.584
I-E	0.147	1.000
J-E	0.067	1.000
K-E	0.487	0.999
L-E	2.176	0.027
N-E	-0.133	1.000
G-F	0.398	0.999
H-F	1.274	0.425
I-F	-0.006	1.000
J-F	-0.086	1.000
K-F	0.334	0.999
L-F	2.023	0.002
N-F	-0.286	1.000
H-G	0.877	0.893
I-G	-0.403	1.000
J-G	-0.483	0.996
K-G	-0.063	1.000

L-G	1.626	0.041
N-G	-0.683	1.000
I-H	-1.280	0.533
J-H	-1.360	0.294
K-H	-0.940	0.679
L-H	0.749	0.916
N-H	-1.560	0.903
J-I	-0.080	1.000
K-I	0.340	1.000
L-I	2.029	0.007
N-I	-0.280	1.000
K-J	0.420	0.994
L-J	2.109	0.000
N-J	-0.200	1.000
L-K	1.689	0.001
N-K	-0.620	1.000
N-L	-2.309	0.402