

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra pěstování lesa

Obor Provoz a řízení myslivosti

Potenciál využití brassinosteroidů
v lesním semenářství se zřetelem na druhy
využitelné k produkci vánočních stromků

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Praha 2016

Zpracoval: Jan Jílek

Vedoucí práce: doc. Ing. Ivan Kuneš, Ph.D.



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Autor práce: Jan Jílek
Studijní program: Lesnictví
Obor: Provoz a řízení myslivosti

Vedoucí práce: Ing. Ivan Kuneš, Ph.D.
Garantující pracoviště: Katedra pěstování lesů

Název práce: **Potenciál využití brassinosteroidů v lesním semenářství se zřetelem na druhy využitelné k produkci vánočních stromků**

Název anglicky: **Potential of brassinosteroids for forest seed management with regard to species utilizable as Christmas trees**

Cíle práce: Cílem práce je posoudit vliv brassinosteroidů na klíčení vybraných druhů lesních dřevin s potenciálem využití pro produkci vánočních stromků.

Metodika: Prostudujte literaturu o brassinosteroidech. Seznamte se s experimenty týkajícími se brassinosteroidů, které se uskutečňují v semenářské laboratoři Katedry pěstování lesů na Trubech. Proveďte konfrontaci výsledků studií s dostupnou literaturou, případně rozšiřte spektrum studií o vlastní experiment na osivu vybraného druhu dřeviny. Připravte elaborát bakalářské práce.

Doporučený rozsah práce: 40 stran

Klíčová slova: brassinosteroidy; lesní semenářství; vánoční stromky; osivo; klíčení

Doporučené zdroje informací:

1. Bajguz A, Hayat S (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1–8. doi:10.1016/j.plaphy.2008.10.002
2. Bajguz A, Tretyn A (2003) The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 62: 1027–1046
3. Krishna P (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 289–297. doi:10.1007/s00344-003-0058-z
4. Leubner-Metzger G (2003) Brassinosteroids promote seed germination. In: Hayat S, Ahmad A (eds) *Brassinosteroids*. Kluwer Academic Publisher, pp 119–128
5. Li KR, Wang HH, Han G, Wang QJ, Fan J (2008) Effects of brassinolide on the survival, growth and drought resistance of *Robinia pseudoacacia* seedlings under water-stress. *New Forests* 35: 255–266. doi:10.1007/s11056-007-9075-2

Předběžný termín obhajoby: 2015/16 LS - FLD

Elektronicky schváleno: 10. 3. 2015
prof. Ing. Vilém Podrázský, CSc.
Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno: 30. 10. 2015
prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.
Děkan

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně. Veškeré použité podklady, ze kterých jsem čerpal informace, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány.

V Praze dne

.....

Jméno a příjmení studenta

Poděkování

Děkuji panu doc. Ing. Ivanu Kunešovi, Ph.D., a Ing. Nadě Rašákové za odborné vedení práce, věcné připomínky, dobré rady a vstřícnost při konzultacích a vypracovávání bakalářské práce.

Abstrakt

Název práce: Potenciál využití brassinosteroidů v lesním semenářství se zřetelem na druhy využitelné k produkci vánočních stromků.

Cíl práce: Cílem práce bylo posoudit vliv brassinosteroidů na klíčení borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.).

Metodika: V práci byly hodnoceny účinky synteticky připraveného analogu 24 – epibrassinolidu (brassinosteroid 2 α , 3 α , 17 β – tri – hydroxy – 5 α – androstan – 6 – one) ve třech různých koncentracích a v kontrole (0 % účinné látky) na klíčení semen borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.). Semena byla v roztocích o příslušné koncentraci použitého brassinosteroidu máčena 48 hodin před započatím pokusu. U kontroly máčení proběhlo v destilované vodě. Semena byla dále rozdělena do dvou teplotních režimů, stresovaného a nestresovaného. Ve stresovaném teplotním režimu byla semena vystavena přechodně teplotám až 42 °C. V nestresovaném režimu probíhalo klíčení po celou dobu pokusu při teplotách definovaných normou ČSN 48 1211. Na každou kombinaci koncentrační varianty a kultivačního režimu bylo použito 500 kusů semen. Semena byla vyseta po sto kusech do klíčnicích nádob na vodu zavlažený filtrační papír. Nádoby byly umístěny do růstové komory. Plně naklíčená semena (klíček je 4x delší než samotné semeno) byla počítána a byla měřena konkrétní délka klíčku každého naklíčeného semene.

Výsledky: Nejlepší výsledek ukázala koncentrace H – nejvyšší (0,4 mg. l⁻¹), a to v obou režimech, ve stresovaném i optimálním. Vysoká koncentrace zvýšila klíčivost v nestresovaném režimu o 16,8 % a při stresu dokonce o 31 % ve srovnání s klíčivostí semen v kontrolní variantě.

Klíčová slova: brassinosteroidy; lesní semenářství; vánoční stromky; osivo; klíčení

Abstract

Title: Potential of brassinosteroids for forest seed management with regard to species utilizable as Christmas trees.

Objectives: The aim of this work is to assess the effect of brassinosteroids on germination of selected forest tree species with a potential to be used for the production of Christmas trees.

Method: The synthetically prepared analog 24 – epibrassinolide (brassinosteroid 2 α , 3 α , 17 β – tri – hydroxy – 5 α – androstan – 6 – one) was tested on germination of seeds of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Prior to launch of germination, the seeds were being soaked for 48 hours at three different concentrations of the tested brassinosteroid (BR – treatments) and in distilled water only (control), respectively. Seeds of each above-mentioned treatment were exposed to two alternative regimes: the stressed and unstressed one, respectively. In the stressed regime, seeds were exposed to a stress episode with temperatures up to 42 °C. In the unstressed regime the temperatures followed a pattern prescribed by Czech seed testing rules. Fully germinated seeds (the length of root radicle at least 4 times longer than the size of seed) were calculated. The root radicle length of each germinated seed was measured as well.

Results: The best results were recorded in the BR-treatment with the highest concentration of the tested brassinosteroid (0.4 mg.dm⁻³) in both germination regimes.

As contrasted to the control, the high concentration treatment increased germination capacity in the unstressed and stressed regime by 16.8% and 31%, respectively.

Key words: brassinosteroids; forest seed; Christmas trees; seed; germination

Obsah

ABSTRAKT	- 5 -
ABSTRACT	- 6 -
OBSAH	- 7 -
SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	- 10 -
1 ÚVOD	- 11 -
2 LITERÁRNÍ REŠERŠE	- 12 -
2.1 REGULÁTORY ROSTLINNÉHO RŮSTU	- 12 -
2.1.1 <i>Obecné informace o fytohormonech</i>	- 12 -
2.1.2 <i>Přehled nejdůležitějších endogenních růstových regulátorů</i>	- 14 -
2.2 BRASSINOSTEROIDY	- 16 -
2.2.1 <i>Historie objevu, charakteristika a přirozený výskyt brassinosteroidů</i>	- 16 -
2.2.2 <i>Vliv brassinosteroidů na rostliny</i>	- 17 -
2.2.2.1 <i>Vliv brassinosteroidů na růst rostlin a diferenciaci pletiv</i>	- 17 -
2.2.2.2 <i>Vliv brassinosteroidů na kořeny</i>	- 17 -
2.2.2.3 <i>Vliv brassinosteroidů na květy a na klíčení semen</i>	- 17 -
2.2.2.4 <i>Vliv brassinosteroidů na výnos</i>	- 18 -
2.2.2.5 <i>Vliv brassinosteroidů na stárnutí (senescenci)</i>	- 18 -
2.3 KLÍČENÍ SEMEN	- 18 -
2.3.1 <i>Obecná stavba semene (obilky)</i>	- 19 -
2.3.2 <i>Možnosti hormonální regulace klíčení</i>	- 20 -
2.3.3 <i>Typy klíčících rostlin</i>	- 21 -
2.3.4 <i>Biochemické změny při klíčení</i>	- 21 -
2.3.5 <i>Klíčivost semen</i>	- 22 -
2.3.5.1 <i>Zkoušky klíčivosti</i>	- 22 -
2.3.6 <i>Vnější podmínky klíčení</i>	- 23 -

2.3.6.1	Voda	- 23 -
2.3.6.2	Kyslík	- 23 -
2.3.6.3	Teplota	- 23 -
2.3.7	<i>Vnitřní podmínky klíčení</i>	- 24 -
2.3.7.1	Nepropustnost povrchových vrstev pro vodu.....	- 24 -
2.3.7.2	Nepropustnost povrchových vrstev pro plyny	- 24 -
2.3.7.3	Mechanická pevnost testy	- 24 -
2.3.7.4	Nevyvinutost embrya.....	- 24 -
2.3.7.5	Vysoký obsah inhibičních látek v semenech a plodech a hormonální regulace klíčení	
2.4	STRESOVÉ FAKTORY A ELIMINACE JEJICH ÚČINKŮ POMOCÍ BRASSINOSTEROIDŮ	- 25 -
2.4.1	<i>Obecná problematika stresu</i>	- 25 -
2.4.2	<i>Přehled druhů stresu vyskytujících se u rostlin</i>	- 26 -
2.4.3	<i>Formy stresu u klíčících semen a jejich eliminace pomocí aplikace brassinosteroidů</i>	- 26 -
2.4.3.1	Náhlé změny teplot.....	- 26 -
2.4.3.2	Sucho a zamokření substrátu.....	- 26 -
2.4.3.3	Patogeny	- 27 -
2.4.3.4	Stres zasolením	- 27 -
2.5	LESNÍ SEMENÁŘSTVÍ	- 27 -
2.5.1	<i>Sběr a označení semenného materiálu</i>	- 27 -
2.5.1.1	Sběr	- 27 -
2.5.1.2	Označení	- 28 -
2.5.2	<i>Kvalita semenného materiálu</i>	- 28 -
2.5.2.1	Posouzení kvality semenného materiálu	- 28 -
3	CÍL PRÁCE	- 29 -
4	MATERIÁL A METODIKA	- 30 -
4.1	PRACOVÍŠTĚ	- 30 -
4.2	METODIKA.....	- 30 -

4.2.1	<i>Materiály použité k laboratornímu pokusu</i>	- 30 -
4.2.1.1	Použitý brassinosteroid	- 30 -
4.2.1.2	Použitý semenný materiál	- 30 -
4.2.1.3	Použité pomůcky	- 30 -
4.2.2	<i>Laboratorní pokus</i>	- 31 -
4.2.2.1	Máčení semen v roztocích brassinosteroidů	- 31 -
4.2.2.2	Postup	- 32 -
4.2.2.3	Vyhodnocení klíčení semen	- 33 -
4.2.2.4	Růstové podmínky semen	- 34 -
4.2.2.5	Využití stresového faktoru ke zkoumání účinnosti brassinosteroidu	- 34 -
5	VÝSLEDKY	- 36 -
5.1	VÝSLEDNÉ UKAZATELE TESTU HOMOGENITY BINOMICKÝCH ROZDĚLENÍ	- 36 -
5.1.1	<i>Vyhodnocení klíčení semen v optimálních podmínkách</i>	- 36 -
5.1.2	<i>Vyhodnocení klíčení semen ve stresových podmínkách</i>	- 37 -
5.2	POROVNÁNÍ PROCENTUÁLNÍ KLÍČIVOSTI SEMEN	- 38 -
5.3	ENERGIE KLÍČENÍ	- 39 -
6	DISKUSE	- 40 -
7	ZÁVĚR	- 41 -
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 42 -
9	SEZNAM PŘÍLOH	- 44 -
10	PŘÍLOHY	- 45 -
10.1	TÝDENNÍ KONTROLA; MĚŘENÍ VÝSLEDKŮ	- 45 -
10.1.1	<i>Stav semen po jednom týdnu klíčení</i>	- 45 -
10.1.2	<i>Stav semen po dvou týdnech klíčení</i>	- 46 -
10.1.3	<i>Stav semen po třech týdnech klíčení</i>	- 48 -
10.1.4	<i>Stav semen po čtyřech týdnech klíčení</i>	- 50 -

Seznam obrázků a tabulek

- obr. 1 *Přehled nejdůležitějších endogenních růstových regulátorů*
- obr. 2 *Přehled nejdůležitějších endogenních růstových regulátorů*
- obr. 3 *Obecná stavba semene (obilky)*
- obr. 4 *Přehled nejdůležitějších stresových faktorů u rostlin*
- obr. 5 *Průvodní lístek k Průvodnímu listu osiva*
- obr. 6 *Plně naklíčené semeno (měřítko v centimetrech s milimetrovou přesností)*
- obr. 7 *Vzor zápisového listu délek klíčků*
- obr. 8 *Grafické znázornění stresového procesu*
- obr. 9 *Grafické znázornění stresového procesu*
- obr. 10 *Porovnání procentuální klíčivosti semen u stresovaných a nestresovaných režimů pokusu*
- obr. 11 *Grafické procentuální znázornění energie klíčení semen měřených sedmý den od založení pokusu*
- tab. 1 *Přehled variant koncentrací při pokusu*
- tab. 2 *Přehled porovnávaných koncentrací pomocí testu homogenity; nestresovaná varianta*
- tab. 3 *Přehled porovnávaných koncentrací pomocí testu homogenity; stresovaná varianta*

1 Úvod

Role brassinosteroidů ve funkci rostlinného systému je intenzivně studována v posledních několika letech. Analýza prokázala, že schopnost syntetizovat, vnímat a reagovat na brassinosteroidy je nezbytná pro normální růst a vývoj rostlin. Tato práce si klade za cíl pokusem ověřit schopnost brassinosteroidů, jakožto nedávno objevených rostlinných hormonů, působit na klíčení semen borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.). Je zároveň pokládáno za potřebné zjistit, do jaké míry jsou brassinosteroidy schopny potlačit následky stresování semen při klíčení, konkrétně teplotami vyššími než 40 °C.

Laboratorní práce a klíční pokusy byly prováděny ve výzkumné stanici Truba Fakulty lesnické a dřevařské České zemědělské univerzity v Praze, v období od 12. 6. 2015 do 10. 7. 2015. Každý sedmý den od založení pokusu probíhalo měření délek klíčků u vyklíčených semen, která se po změření délky pro přehlednost pokusu nevracela zpět. Klíčky se měřily pouze v případě, že jejich délka přesáhla čtyřnásobek délky celého semene. Výsledná data laboratorního pokusu byla zpracována pomocí testu homogenity binomických rozdělení.

2 LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Regulátory rostlinného růstu

2.1.1 Obecné informace o fytohormonech

Látky, které regulují růstové a vývojové procesy u rostlin, jsou všeobecně nazývány růstovými regulátory. Tento obecný název však neodlišuje látky přirozené od látek synteticky připravených. Přirozené regulátory růstu lze rozdělit do dvou skupin: rostlinné hormony (fytohormony) a další látky s regulační aktivitou (Procházka et al., 1998).

Z výzkumu zákonitostí růstu a vývoje rostlin vyplývá, že v rostlinných procesech fytohormony a jejich interakce hrají významnou roli. Neexistuje růstový proces, který by byl ovlivňován (regulován) pouze jedním fytohormonem. Na základě určitých analogií s působením hormonů živočišných je pět skupin endogenních růstových regulátorů považováno za růstové hormony. Jsou to **auxiny**, **cytokininy**, **gibereliny**, **kyselina abscisová** a **etylen** (Procházka et al., 1998).

Hlavním představitelem auxinů je kyselina indolyl-3-octová (IAA), existuje však řada dalších sloučenin s auxinovým účinkem. Tyto látky stimulují apikální dominanci, tvorbu kořenů, prodlužování a dělení buněk, diferenciaci buněk, polaritu buněk, schopnost atrahovat asimiláty vyvíjejícími se plody atd.

Kyselina giberelová (GA) a asi 90 dalších molekul s giberelinovou strukturou stimuluje dlouhivý růst, klíčení, buněčné dělení a u některých rostlin indukuje kvetení, determinuje pohlaví květů a urychluje, popřípadě zvyšuje nasazení plodů atd.

Cytokininy jsou odvozeny od adeninu, ale cytokininové účinky vykazují i aromatické deriváty močoviny. Stimulují buněčné dělení, větvení stonků, zpomalování stárnutí, diferenciaci plastidů, rezistenci rostlin vůči nepříznivým podmínkám prostředí, iniciaci tvorby semen atd.

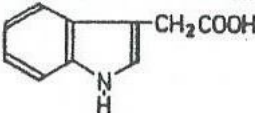
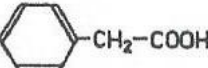
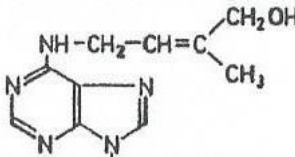
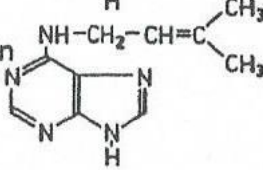
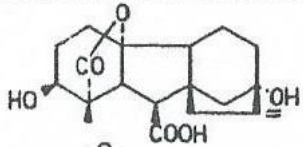
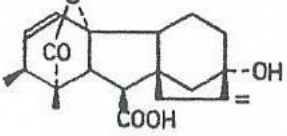
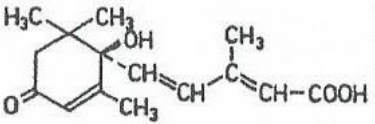
Kyselina abscisová (ABA) obdržela jméno podle jednoho ze svých účinků, totiž opadu (abscize) listů. Dále hraje významnou roli v dormanci, senescenci (stárnutí), v reakci rostlin na stres atd.

Etylen je plynný fytohormon hrající roli při dozrávání plodů, defoliaci, v reakci rostlin na stres atd. (Psota, Šebánek, 1999).

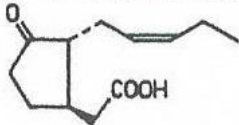
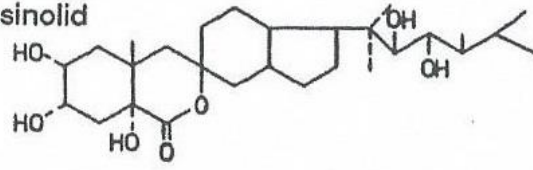
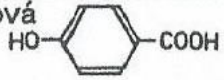
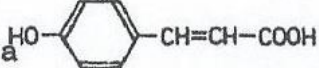
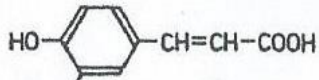
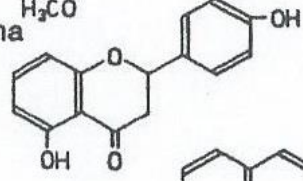
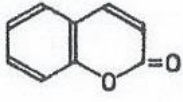
Mimo tyto fytohormony existuje v rostlinách množství látek s růstově regulační aktivitou, které mezi hormony řazeny nejsou. Jsou to zejména brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmonová, oligosachariny a velká skupina fenolických látek (viz obr. 1 a 2).

Rostlinné hormony se liší od hormonů živočišných v mnoha aspektech. Rostliny nemají specifické žlázy s vnitřní sekrecí, které by hormony vytvářely, a většina fytohormonů je syntetizována na více místech v rostlině. Koncentrační závislost účinku fytohormonů není tak zřejmá jako u hormonů živočišných a může se pohybovat od stimulace k inhibici růstové reakce. Fytohormony jsou výrazně méně specifické než hormony živočišné: každý z fytohormonů ovlivňuje několik často odlišných procesů a naopak, týž proces bývá ovlivněn větším počtem různých látek (Procházka et al., 1998).

2.1.2 Přehled nejdůležitějších endogenních růstových regulátorů

SKUPINA	NEJDŮLEŽITĚJŠÍ LÁTKY VZOREC	ZKR.
auxiny	indolyl-3-octová kyselina 	IAA
	fenyloctová kyselina 	PAA
cytokininy	zeatin (4'-hydroxy-6-izopentenyloaminopurin) 	Z
	izopentenyloadenin (6-izopentenyloaminopurin) 	IPA
gibereliny	giberelin A ₁ 	GA ₁
	giberelin A ₃ 	GA ₃
abscisová kyselina	abscisová kyselina 	ABA
etylen	etylen $H_2C=CH_2$	—

obr. 1 Přehled nejdůležitějších endogenních růstových regulátorů (Procházka et al., 1998).

SKUPINA	NEJDŮLEŽITĚJŠÍ LÁTKY	VZOREC	ZKR.
polyaminy	putrescin	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	Put
	spermidin	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	Spd
	spermin	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	Sp
jasmonová kyselina	jasmonová kyselina		JA
brassinosteroidy	brassinolid		
fenolické látky	<i>p</i> -hydroxybenzoová kyselina		pHBA
	<i>p</i> -kumarová (4-hydroxy-skořicová) kyselina		pCA (HCA)
	ferulová (4-hydroxy-3-metoxyskořicová) kyselina		FA
	naringenin		—
	kumarin		—

obr. 2 Přehled nejdůležitějších endogenních růstových regulátorů (Procházka et al., 1998).

2.2 Brassinosteroidy

2.2.1 Historie objevu, charakteristika a přirozený výskyt brassinosteroidů

Brassinosteroidy jsou steroidní rostlinné hormony, známé od roku 1988. Aktivují dlouhivý růst a stimulují buněčné dělení. Jsou dosud málo prozkoumané (Hradecká, 2009). Jsou skupinou rostlinných polyhydroxy – steroidů, které byly uznány jako nový druh hormonů, které hrají zásadní roli ve vývoji rostlin (Bajguz, 2011).

Role brassinosteroidů ve funkci rostlinného systému je intenzivně studována v posledních několika letech. Analýza prokázala, že schopnost syntetizovat, vnímat a reagovat na brassinosteroidy je nezbytná pro normální růst a vývoj rostlin (Haubrick et al., 2006).

Brassinosteroidy byly pojmenovány podle řepky (*Brassica napus* L.), z jejíhož pylu byla jedna z nich – brassin – prvně izolována. Dnes je jich známo již na 70. Přírodní se označují jako brassinolidy (BL). Syntetické a jejich deriváty jako brassinosteroidy (BRs). Pod pojmem brassinosteroidy bývají označovány i brassinolidy připravené v laboratoři (Hradecká et al., 2009). Velký pokrok byl dosažen v jejich izolaci, charakterizaci a možném mechanismu účinku (Hayat et al., 2003).

Problematika využití brassinosteroidů je v současné době řešena zejména v zemědělství. Z výzkumů vyplynulo, že brassinosteroidy měly pozitivní (dynamický) vliv na prodloužení stonku, včetně podpory epikotylu, hypokotylu, koleoptile a mezokotylu u dvouděložných rostlin. Dále bylo prokázáno, že brassinosteroidy mají pozitivní vliv na klíčení semen (Nováková et al., 2015).

Brassinolid se v přírodních materiálech vyskytuje v nepatrných množstvích. V pylu řepky je obsazen v koncentraci asi 0.1 ppm, v hálkách kaštanu 0.001 ppb a v čínském zelí 0.0003 ppb (Hradecká et al., 2009). Brassinolid byl nalezen i v mnoha dalších rostlinných materiálech, jako jsou například rostliny a semena fazole, je přítomen v ředkvičkách, v zeleném čaji, hálkách kaštanu, slunečnici, rýži, čaji, pylu borovice a olše, je přítomen ve včelím medu apod. Obsah brassinolidu ve všech těchto materiálech je však velmi nízký, jeho izolace je pracná a nákladná. Protože se brassinolid v přírodním materiálu vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích (pod 0,1 ppm), izolace z přírodního materiálu pro praktické použití nepřichází v úvahu. Byly proto provedeny pokusy připravit brassinolid synteticky. Přestože dosud bylo publikováno několik syntetických způsobů přípravy brassinolidu, všechny mají jednu

nevýhodu – jejich příprava je velice dlouhá a nákladná. Proto byla syntetizována řada analogů brassinolidu – brassinosteroidů, tj. látek, které mají účinky podobné brassinolidu, ale které jsou podstatně dostupnější (Kohout, 1995).

Brassinolid a jeho analoga jsou regulátory růstu rostlin, které podporují růst velkého množství rostlin. U rostlin dochází jak ke zvýšení počtu nasazených květů, tak ke zvýšení suché a mokré hmotnosti zelené hmoty, zvětšení počtu a zvýšení velikosti semen či plodů. Zvláště významný je antistresový účinek, který se projevuje zvýšením odolnosti vůči působení herbicidu, chloridu sodného, chladu, suchu, nedostatku živin apod. (Kohout, 2004). V rostlinách se však nevyskytuje pouze brassinolid. Do dnešní doby je známo více než 30 přirozených brassinosteroidů, z nichž některé byly dokonce nejdříve syntetizovány a teprve potom nalezeny v rostlinách (Kohout, 1995).

2.2.2 Vliv brassinosteroidů na rostliny

2.2.2.1 Vliv brassinosteroidů na růst rostlin a diferenciaci pletiv

Mnohé studie prokázaly roli brassinosteroidů jak samostatně, tak i v interakci s ostatními rostlinnými hormony v procesech, jako je buněčné prodloužení a klíčení semen. Na rozdíl od těchto studií je jen málo známo o tom, jak je vnímání brassinosteroidů spojeno s konkrétní fyziologickou reakcí, jako je odolnost vůči stresu. (Haubrick et al., 2006).

2.2.2.2 Vliv brassinosteroidů na kořeny

Ve srovnání s jinými částmi rostliny, vykazují kořeny mnohem nižší množství brassinosteroidů (Kim et al., 2000).

Kořeny vyžadují aktivní brassinosteroidy v mnohem menší míře než ostatní části rostliny. Brassinosteroidy jsou důležité regulační látky v kořenech a platí, že brassinosteroidy náhodnou tvorbu kořenů inhibují. Růst kořenů se výrazně odvíjí od koncentrace použitého brassinosteroidu (Müssig et al., 2003).

2.2.2.3 Vliv brassinosteroidů na květy a na klíčení semen

Brassinosteroidy pravděpodobně podporují růst pylové láčky při prorůstání bliznou (Müssig, 2005).

Obsah brassinosteroidů v pylu je oproti jiným částem rostliny velmi vysoký, což naznačuje, že brassinosteroidy mohou mít významnou roli při regulaci reprodukce.

Velmi vysoké koncentrace brassinosteroidů byly nalezeny také v semenech. Pyl a nezralá semena jsou nejbohatší zdroje s rozsahy 1–100 ng.g⁻¹ čerstvé hmotnosti, zatímco ostatní části rostliny a listy mají obvykle nižší množství 0.01–0,1 ng.g⁻¹ čerstvé hmotnosti (Bajguz, Tretyn, 2003).

Aplikace brassinolidu zlepšila klíčení řeřichy či eukalyptu (*Eucalyptus camaldulensis*). Brassinolid, 24-epibrassinolid a 28-homobrassinolid podpořily klíčení semen podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*). Obdobné výsledky byly získány při ošetření semen řepky, rajčete, tabáku, a dalších (Rao et al., 2002).

2.2.2.4 Vliv brassinosteroidů na výnos

Brassinosteroidy např. zvyšují výnosy ředkviček o 84 %, fazole a pepře o 35 %, rajských jablíček až o 40 % apod. Příznivý vliv brassinosteroidů byl prokázán i při pěstování okurek, pšenice, rýže, ječmene, brambor, hořčice, lesních stromků a dalších rostlin. Koncentrace brassinolidu v roztocích používaných pro ošetřování rostlin je 10⁻⁷ až 10⁻¹⁴ mol/l. Některé brassinosteroidy, např. 24-epibrassinolid, byly aplikovány na kultury pšenice, ječmene, brambor a rýže i ve velkém měřítku (Kohout, 2004).

2.2.2.5 Vliv brassinosteroidů na stárnutí (senescenci)

Brassinosteroidy hrají důležitou roli při regulaci procesu stárnutí rostlin. Například studium zrání oplodí rajčete jedlého (*Lycopersicon lycopersicum* (L.)) přineslo poznatek, že po ošetření 24 – epibrassinolidem nebo 28 – homobrassinolidem, dojde ke zvýšení produkce lykopenu, sacharidů a ethylenu, kdežto obsah kyseliny abscisové klesá, tzn., urychluje se zrání plodu. Ošetření rýže seté (*Oryza sativa* L.) brassinosteroidy urychlilo zrání a výrazně zvýšilo obsah škrobu v zrně (Vlašánková, 2012).

2.3 Klíčení semen

Klíčení jako fyziologický proces začíná příjmem vody do semene, popřípadě obilky, tj. inhibicí a končí počátkem prodlužování (zvětšování) kořínku (radikuly). Do klíčení je tedy zahrnována řada procesů od hydrolýzy škrobu, bílkovin a dalších zásobních látek přes subcelulární strukturální změny, dělení buněk, respiraci, makromolekulární syntézy až po zvětšování buněk. Kombinace všech těchto změn vede

k přeměně dehydratovaného embrya se silně utlumeným metabolismem v embryu, které má mohutný metabolismus promítající se do jeho růstu, a následně do růstu celé rostliny. Klíčení ve fyziologickém smyslu slova již tedy nezahrnuje počáteční růst klíčící rostliny (Psota et al. 1999)

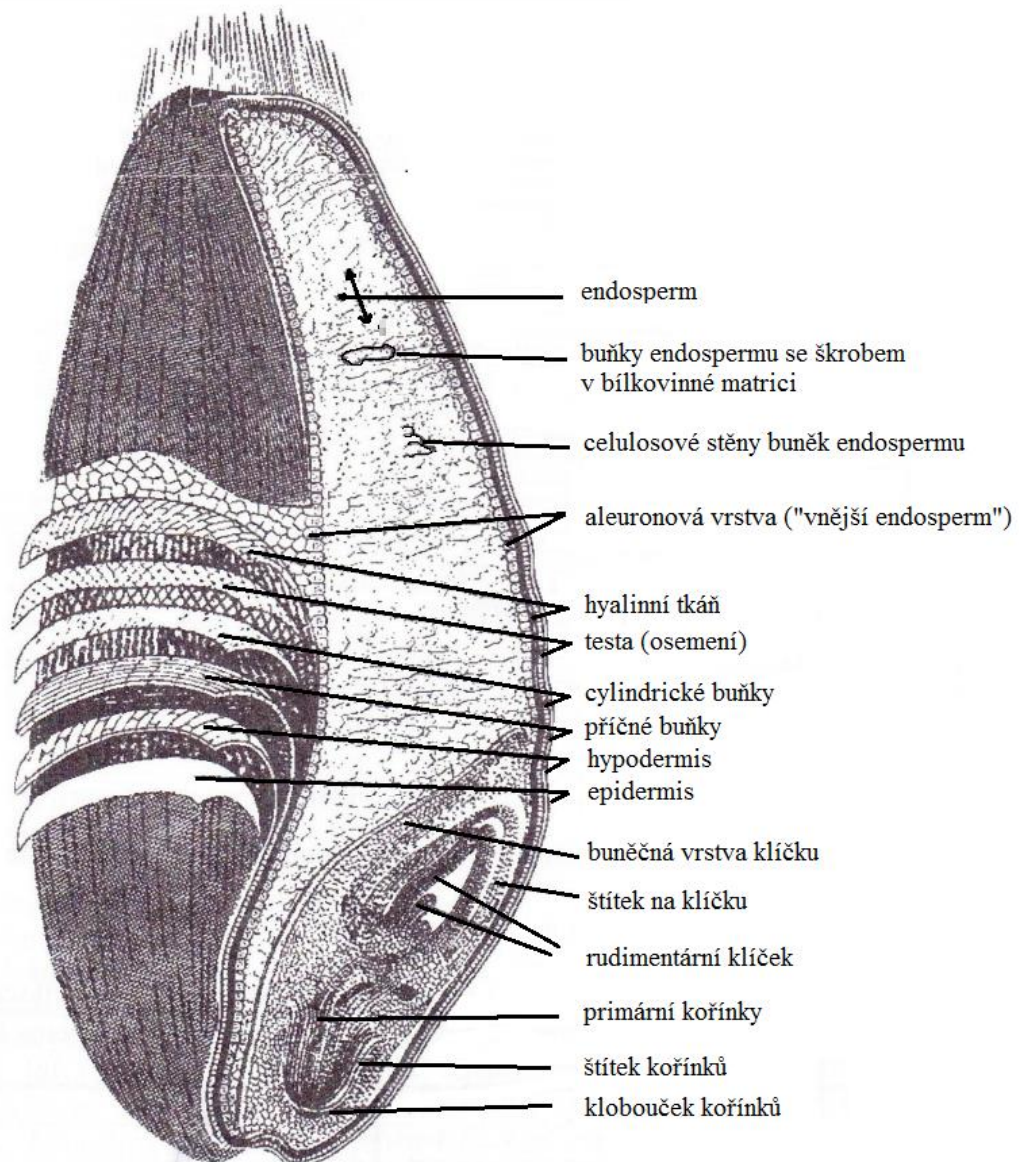
Klíčení je obnovení metabolické aktivity semen vedoucí k prodlužování buněk radikuly a hypokotylu. Semena v endogenní dormanci mohou klíčit až po jejím odeznění. Semenům bez endogenní dormance postačí ke klíčení zbobtnání ve vodě, jsou-li při tom splněny další vnější podmínky (teplota, obsah kyslíku a u některých druhů intenzita světla). Příjmem vody do koloidního systému semen během bobtnání je narušen klid semen (dormance), související s odvodněním cytoplazmy. Bobtnat mohou i mrtvá semena, neschopná klíčit. U semen s živým embryem dochází k aktivaci dýchání a stupňování enzymatické a hormonální aktivity. Ta je nezbytná k mobilizaci látek uložených v rezervních orgánech semen (v endospermu, dělohách, popřípadě i v perispermu) a využívaných pro výživu klíčícího embrya. To vše se děje ještě před tím, než dojde k viditelnému klíčení, tj. k růstu radikuly embrya skrz prasklou testu semene. Kořínek roste zprvu jen prodlužováním buněk vytvořených v embryu (Procházka et al., 1998).

2.3.1 Obecná stavba semene (obilky)

Semeno je mnohobuněčný rozmnožovací útvar, který vznikl (vyvíjí se) na mateřské rostlině z oplozeného vajíčka. Jeho velikost je velmi rozmanitá. Semena mohou mít rozličný tvar, například kulovitý, vejcovitý, ledvinovitý, válcovitý, vřetenovitý aj. Podrobnější popis jednotlivých částí semene ukazuje obr. 3.

Plně vyvinuté semeno tvoří:

- osemení (testa) – vytváří se z obalů vajíčka nebo jen z jejich částí
- živné pletivo pod osemením (perisperm) – vzniká přeměnou pletivového jádra vajíčka
- živné pletivo vnitřní (endosperm) – vyvíjí se z centrálního jádra zárodečného vaku
- zárodek (embryo) – je umístěno centrálně nebo bočně a vzniká z oplozené vaječné buňky



obr. 3 Obecná stavba semene (obilky), (Mahdalová; 2012)

2.3.2 Možnosti hormonální regulace klíčení

Pokusy s ovlivněním klíčení semen jejich zbobtnáním v roztocích auxinových fytohormonů byly konány v oblasti zemědělských osiv již v čtyřicátých a padesátých letech minulého století. Užívalo se většinou kyselin indol-3-máselné nebo naftyloctové, často v kombinaci s kyselinou nikotinovou. Výsledky byly velmi kolísavé (podle provenience a stáří osiva, klimatických a půdních podmínek, druhu a intenzity výživy rostlin a dalších vlivů prostředí). Úspěchy byly zaznamenány v některých pokusech zejména u kořenové zeleniny a byly vysvětlovány zásahem auxinů do embryonálních

korelací (upřednostnění růstu radikuly v neprospěch plumuly). Zaznamenané stimulační účinky se obecně (i obilnin) daly často vysvětlit i pouhým vyloužením inhibičních látek při předsetbovém máčení semen (obilek) v příslušných stimulačních roztocích. Případné stimulační účinky byly také často zřejmé jen v prvních etapách růstu klíčení rostliny.

Také aplikace giberelinů a cytokininů na osiva může v některých případech působit pozitivně na klíčení, což zpravidla souvisí s účinkem těchto fytohormonů na rušení endogenní dormance semen. Zbobtnání osiv v roztocích giberelinů je však spojeno s nebezpečím, že od počátku může dojít k nežádoucí poruše korelace mezi plumulou a radikulou ve prospěch plumuly a může tak dojít k nevhodnému počátečnímu zesílení prodlužovacího růstu lodyžních internodií (Psota, Šebánek; 1999).

2.3.3 Typy klíčících rostlin

Klíčení začíná vždy růstem kořínku. Ten po určitou dobu nejprve brzdí růst nadzemních částí klíčící rostliny (plumuly). U dvouděložných rostlin je klíčení buď nadzemní (epigeické), nebo podzemní (hypogeické). V prvním případě jsou dělohy vyneseny rostoucím hypokotylem nad povrch půdy a představují první asimilační orgány (např. len, tykev, buk). Ve druhém případě zůstávají dělohy pod zemí a představují zásobárnu živin pro začátek růstu klíčící rostliny. Hypokotyl je tu velmi krátký a vlastní klíčící lodyžka je v podstatě článkem nadděložním, epikotylem (např. hrách, bob, dub, mandloň), (Procházka et al., 1998). V případě borovice lesní (*Pinus sylvestris*) se jedná o klíčení epigeické.

2.3.4 Biochemické změny při klíčení

U suchých semen v době klidu je aktivita životních procesů nepatrná. S příjmem vody do semene dochází k pronikavému zvýšení intenzity dýchání. Proto většina semen potřebuje ke klíčení dostatek kyslíku. V prvních etapách převažuje u všech semen anareobní typ dýchání. U většiny semen je po 24 – 36 hodinách od začátku klíčení komplex procesů dýchání představován aerobně.

Mezi nejčastější zásobní látky patří škrob. Na jeho štěpení se podílí enzymy glykolýzy. Dalšími zásobními látkami jsou bílkoviny, které obsahují značné množství glutaminu, argininu a asparaginu (Procházka et al., 1998).

2.3.5 Klíčivost semen

Klíčivost semen je ukazatel jakosti určený počtem čistých vyklíčených semen v průměrném vzorku za stanovenou dobu, vyjádřený v procentech. Zjišťuje se laboratorní zkouškou během stanovené doby na lůžku (např. na filtračním papíře, vatě, písku apod.). K zjišťování klíčivosti se také používají různé typy klíčidel (Jakobsenovo, klíčidlo, SLH apod.), které musíme před zkouškou dezinfikovat (např. 0,4% roztokem formalínu). Dnes jsou však klasické metody stanovení klíčivosti nahrazovány biochemickými a rentgenologickými.

V určených dnech se stanovuje energie klíčení. Energie (rychlost) klíčení semen je ukazatel jakosti určený poměrem počtu vyklíčených semen v průměrném vzorku na začátku a na konci stanovené doby. Vyjadřuje se v procentech.

Semena ztrácejí i v optimálních podmínkách po určité době životnost, což je spojováno s degradací DNA. K optimálním podmínkám skladování patří kromě snížení obsahu vody v semenech především snížení teploty. Vysoká teplota a vlhkost během skladování mohou působit velmi škodlivě, neboť kromě ztrát vzniklých „prodýcháním“ zásob semene hrozí nebezpečí, že teplo uvolněné při dýchání semen poškodí probuzený zárodek.

Životnost semen má v závislosti na druhu rostlin odlišnou dobu trvání. Některé druhy mají semena životná jen několik týdnů (vrba, topol, kávovník), u jiných mohou být životná i déle než 100 let (např. leknín, lotos). Ke ztrátě klíčivosti během doby skladování semen dochází dříve u semen, která byla sklizena nedostatečně vyzrálá nebo byla skladována za nevhodných podmínek (Procházka et al., 1998).

2.3.5.1 Zkoušky klíčivosti

Semena různých druhů vyžadují pro objektivní stanovení různé typy substrátů, například na povrchu filtračního papíru nebo mezi vlhčeným filtračním papírem, v roličkách, skládaných „harmonikách“, na písku, cihlové drti atd. Některé druhy musejí být zkoušeny ve tmě nebo s regulovanou délkou doby osvětlení. Druhová odlišnost je také u teploty.

Hodnota energie klíčení je založena na spočítání vyklíčených semen v prvních dnech po nasazení; čím větší je počet vyklíčených semen, tím vyšší vitalitu osiva lze předpokládat (Houba, 2007).

2.3.6 Vnější podmínky klíčení

2.3.6.1 Voda

Voda je nezbytná pro zbobtnání semen, jež předchází jejich klíčení. Testa (osemení) je pro vodu nejvíce prostupná kolem pupku semene. Ve vodě často tvoří nejprve záhyby. Rychlost absorpce vody je největší hned poté, co semena přišla do styku s vodou. Příjem vody v této první etapě nezávisí na životních pochodech a zvyšuje se se vzestupem teploty (při růstu o 10 °C 1,6 až 2krát) Závislost příjmu vody na osmotickém tlaku roztoku, v němž semena bobtnají, je nepřímá.

Největší úroveň hydratace je v embryu. Jakmile v něm stoupne obsah vody nad 60 %, začnou se v semeni aktivovat metabolické systémy, a tím započne i příprava na objemový růst embryonálních buněk. Příjem vody do embrya pak souvisí také s transportem organických sloučenin ze zásobních částí semen. Když pak kořínek prorazí osemení, dojde k dalšímu zvýšení rychlosti příjmu vody (Procházka et al., 1998).

2.3.6.2 Kyslík

Energie nezbytná ke klíčení se získává při oxidační fosforylaci. Kyslík je proto nezbytnou podmínkou klíčení (Procházka et al., 1998).

2.3.6.3 Teplota

Většina semen klíčí v laboratorních podmínkách při konstantní teplotě. Semena některých druhů však nejsou schopna klíčit bez kolísání teplot, které je v přírodě obvyklé. Optimum a maximum klíčení leží obvykle o něco níž než optimum a maximum růstu.

Teplota klíčení semen se uplatňuje i při chladové stratifikaci, při níž dochází k odbourání inhibičních látek podílejících se na dormanci semen (Procházka et al., 1998).

2.3.7 Vnitřní podmínky klíčení

Některá semena neklíčí, i když jsou u nich splněny všechny vnější podmínky ke klíčení potřebné (Procházka et al., 1998).

2.3.7.1 Nepropustnost povrchových vrstev pro vodu

Rozhodující překážkou klíčení je vrstva palisádového sklerenchymu, jež znemožňuje prostupnost vody testou. U tvrdých semen je možno navodit bobtnání narušením palisádového sklerenchymu. Může se to dít chemicky (např. kyselinou sírovou) nebo mechanicky pískem či rozbitým sklem (skarifikace). V přirozených podmínkách může jít o narušení činností mikroorganismů (Procházka et al., 1998).

2.3.7.2 Nepropustnost povrchových vrstev pro plyny

V některých případech jsou vnější vrstvy semene (endosperm, nucellus nebo testa) či plodu (perikarp) neprostupné pro kyslík a oxid uhličitý, takže embryo není schopno růst. Osemení neprůchodné pro plyny má např. jasan (*Fraxinus*). U semen některých druhů je nutno dokonce odloupnout celé osemení, aby se umožnila výměna plynů, a tím i klíčení (Procházka et al., 1998).

2.3.7.3 Mechanická pevnost testy

Snížení této mechanické pevnosti je možno dosáhnout střídavým vysušováním a zavlažováním semen (Procházka et al., 1998).

2.3.7.4 Nevyvinutost embrya

Někdy semena neklíčí po odloučení od mateřské rostliny i za příznivých vnějších podmínek, protože nemají ještě dobře vyvinuté embryo. Z našich stromů se to týká např. jasanu. Po dobu dodatečného vývinu embrya nesmějí semena zaschnout (Procházka et al., 1998).

2.3.7.5 Vysoký obsah inhibičních látek v semenech a plodech a hormonální regulace klíčení

Inhibiční látky bývají kromě dužnatých plodů (např. rajčat) obsaženy i v plodech suchých, kde mohou zpomalovat klíčení. Tyto inhibiční látky je přitom možno vyplavit vodou nebo je adsorbovat na aktivní uhlí. Jedno a totéž osivo může pak ukázat různé hodnoty klíčivosti, podle toho, jaké množství je na lůžku klíčoviny rozprostřeno.

Je-li rozprostřeno hustě, klíčení je nižší, protože se hromadí inhibiční látky vyluhované vodou (Procházka et al., 1998).

2.4 Stresové faktory a eliminace jejich účinků pomocí brassinosteroidů

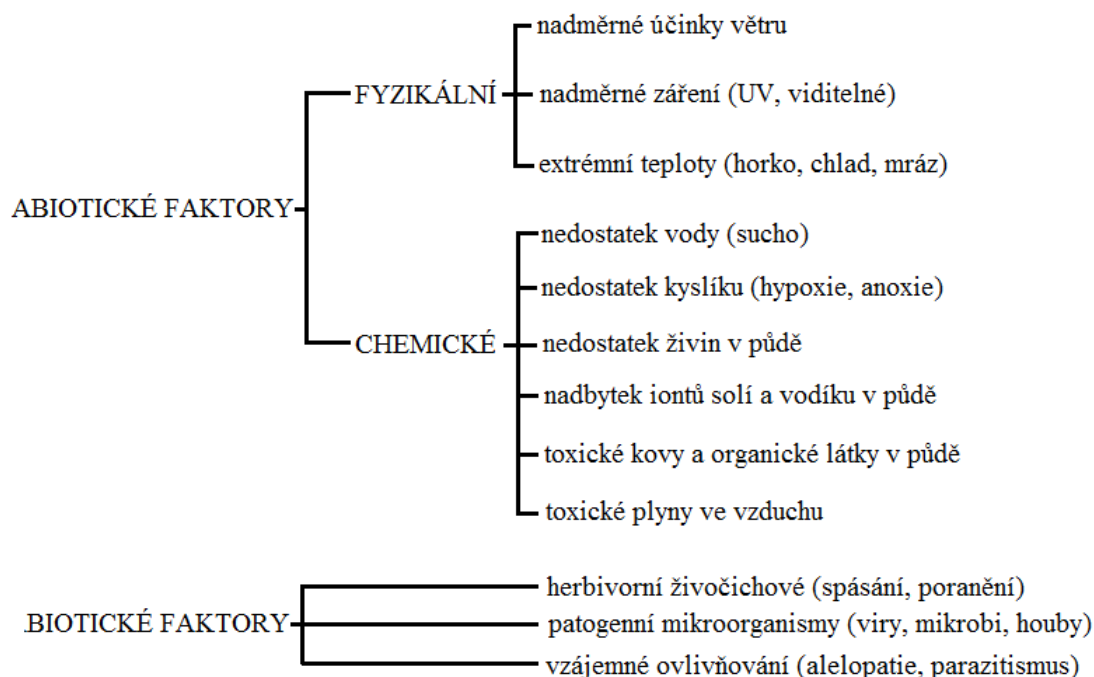
2.4.1 Obecná problematika stresu

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Ty mohou nejen zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést i k jejich uhynutí. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí závažně ohrožující rostlinu označujeme jako stresové faktory (stresory). Termín stres je obvykle (i když nejednotně) používám pro souhrnné označení stavu, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů. Nejde přitom nikdy o nějaký ustálený a snadno definovatelný stav, ale spíše o dynamický komplex mnoha reakcí.

Při negativním působení stresorů dochází ke spuštění řetězce, který bývá označován jako stresová reakce. Bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí (poplachová fáze). Pokud intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň, dochází záhy k mobilizaci kompenzačních mechanismů (fáze rezistence). Ne vždy však toto zvýšení má trvalý charakter. Při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být vystřídáno dalším poklesem (fáze vyčerpání).

Působení stresorů (např. nízké teploty) však může na druhé straně podmiňovat průběh důležitých morfogenetických procesů, např. klíčení či tvorby květních orgánů, a tím zvýšit reprodukční schopnosti i kompetitivní úspěšnost (Procházka et al., 1998).

2.4.2 Přehled druhů stresu vyskytujících se u rostlin



obr. 4 Přehled nejdůležitějších stresových faktorů u rostlin (Procházka et al., 1998).

2.4.3 Formy stresu u klíčících semen a jejich eliminace pomocí aplikace brassinosteroidů

2.4.3.1 Náhlé změny teplot

Vzhledem k tomu, že se změny teploty mohou vyskytnout častěji než jiné stres způsobující faktory v přírodě, stres vyvolaný změnou teploty se stal v dnešní době cílem mnoha studií. Například klíčící rostliny kukuřice jsou vysoce citlivé na chlad a stres během klíčení a rané fáze růstu. Aplikace brassinosteroidu podporovala oživení růstu semenáčků kukuřice. Podobně, semenáčky okurek klíčící ze semen namočené v roztoku brassinosteroidu během inhibice měly rychlejší růst ve srovnání s rostlinami neošetřenými (Krishna, 2003).

2.4.3.2 Sucho a zamokření substrátu

Aplikace brassinosteroidů zlepšuje odolnost proti vysychání a namáhání vysokými teplotami. Expozice rostlin cukrové řepy na suchém stanovišti vedla ke snížení hmotnosti kořenu. Aplikace brassinosteroidu na list plně kompenzovala snížení biomasy

způsobené suchem. Zlepšení stavu nastalo v důsledku vyšší absorpce vody a zvýšení membránové stability (Krishna, 2003).

2.4.3.3 Patogeny

Potenciál brassinosteroidů zvýšit odolnost rostlin proti infekci houbovým patogenem byl zkoumán v několika studiích. V některých případech se aplikace brassinosteroidů ukázala být účinnější než aplikace standardních fungicidů. Například rostliny bramboru postříkané roztokem brassinosteroidu měly menší výskyt plísňe *Phytophthora infestans*. V poslední době bylo prokázáno, že léčba brassinolidem, biologicky nejvíce aktivním brassinosteroidem, vyvolává v rostlinách tabáku odpor proti viru tabákové mozaiky, bakteriálnímu patogenu *Pseudomonas syringae* a houbovému patogenu *Oidium*, sp. (Krishna, 2003).

2.4.3.4 Stres zasolením

Při pokusu zabývajícím se odolností semen vůči stresu zasolením byla semena rýže namočena ve vodě a v roztoku NaCl, a to buď v přítomnosti či nepřítomnosti brassinosteroidů. Testováno bylo klíčení a růst semen. Kde byl doplněn roztok brassinosteroidu, tam byl značně snížen inhibiční účinek soli na klíčení semen. Podpora růstu semen ve slaných podmínkách je spojena se zvýšením hladiny nukleových kyselin a rozpustných proteinů (Krishna, 2003).

2.5 Lesní semenářství

2.5.1 Sběr a označení semenného materiálu

2.5.1.1 Sběr

Semenný materiál se sbírá ve stavu morfologické zralosti přibližně od termínu, uvedeném pro jednotlivé dřeviny, a to za vhodných klimatických podmínek. Přesný termín sběru závisí na průběhu počasí v daném roce a může se v jednotlivých letech lišit i o několik týdnů. Sběr před termínem stanoveným normou ČSN 48 1211 (předčasný sběr) doporučuje laboratoř na základě zkoušek zralosti semenné suroviny (ČSN 48 1211).

2.5.1.2 Označení

Jednotlivé oddíly semenného materiálu průkazně označené průvodním listem podle platných právních předpisů musí být v průběhu sběru, dopravy, zpracování a skladování drženy odděleně (ČSN 48 1211).

2.5.2 Kvalita semenného materiálu

2.5.2.1 Posouzení kvality semenného materiálu

Kvalita oddílů semenného materiálu se posuzuje podle čistoty, absolutní hmotnosti, energie klíčení, klíčivosti nebo životnosti, obsahu vody a počtu klíčivých nebo živých semen v 1 kg; u semenné suroviny také podle sypavosti.

Zkoušky kvality oddílů semenného materiálu lesních dřevin uvedených dle platných právních předpisů provádí akreditovaná laboratoř podle platných právních předpisů (Evropská směrnice o obchodování s reprodukčním materiálem lesních dřevin 1999/105/EC), (ČSN 48 1211).

3 Cíl práce

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce bylo posoudit, zda testovaný brassinosteroid může zvýšit klíčivost semen borovice lesní (*Pinus sylvestris*), a to jak ve standardních podmínkách, tak při teplotním stresu.

O brassinosteroidech je známo, že u některých druhů rostlin jsou schopny při stresu teplem zmírnit následky stresu a zvýšit klíčivost. Důležité je ověřit tuto vlastnost pro vybraný lesnický druh a současně zjistit, jaká koncentrace roztoku brassinosteroidu má nejpozitivější účinek.

4 Materiál a metodika

4.1 Pracoviště

Laboratorní práce a klíční pokusy byly prováděny ve výzkumné stanici Truba Fakulty lesnické a dřevařské České zemědělské univerzity v Praze.

4.2 Metodika

4.2.1 Materiály použité k laboratornímu pokusu

4.2.1.1 Použitý brassinosteroid

K našemu pokusu byl použit brassinosteroid s označením 2α , 3α , 17β -tri-hydroxy- 5α -androstano-6-one, který je synteticky připraven jako analog 24-epibrassinolidu.

4.2.1.2 Použitý semenný materiál

K uskutečnění pokusu bylo použito semenného materiálu ze semenářského závodu Týniště nad Orlicí, patřící k Lesům České republiky, s. p. osivo borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) bylo dovezeno ve vakuovém balení o hmotnosti 0,5 kg. Osivo borovice lesní pochází z přírodní lesní oblasti 18 – Severočeská pískovcová plošina a Český ráj. Podrobnější informace jsou patrné z obr. 5.

4.2.1.3 Použité pomůcky

- pinzeta
- klíční misky
- měrka délky klíčků
- desinfekční roztok chlornanu sodného
- klíční komora KK 700 (POL – EKO Aparatura)
- stříčka
- gumové rukavice

Průvodní lístek k Průvodnímu listu č.	73-2006-PVL
K průvodnímu listu č.	3201/3/6/2014
Číslo oddílu	5105/4/2006
Vystavil:	Městský úřad Česká Lípa
Dne	14. 04. 2006
Dodavatel	42196451/71 LČR SZ Týniště nad Orlicí
Odběratel:	20460709/1 ČZU v Praze
Dřevina:	1301 BO borovice lesní <i>Pinus sylvestris</i> L.
Lesní oblast:	18 Severoč. písk. ploš. a Český ráj
Původ:	N Neznámý
Výškové pásmo	(LVS): 2 bukodubový (351 - 400 m/m)
Kategorie OECD:	Selektovaný
Číslo uznané jednotky:	CZ-2-2B-BO - 3023-18-2-L
Množství semen (plodů)	0,500 kg
Výsledek zkoušky jakosti:	134 2006 11.07.2006
Čistota: 98,50%	Klíčivost: 95 %
Abs. hmotnost: 6,370 g	Energie: 80 %
Poč. klíč. semen/ kg 149992 ks	Semena svěží: 2 %
Forma a počet balení: 1	
Uložení: R256	
Dne: 03. 06. 2014	
Vystavil: Ema Kavuláková	

obr. 5 Průvodní lístek k Průvodnímu listu osiva

4.2.2 Laboratorní pokus

4.2.2.1 Máčení semen v roztocích brassinosteroidů

Máčení semen v roztocích brassinosteroidu probíhalo po dobu 48 hodin před započítáním samotného pokusu.

Koncentrace brassinosteroidů byly následovné: u roztoku s nízkou koncentrací (L) $0,004 \text{ mg.l}^{-1}$, se střední koncentrací (M) $0,04 \text{ mg.l}^{-1}$, u vysoké koncentrace (H) $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Dále jedna várka (500 ks) semen byla máčena v destilované vodě. Tato semena později měla sloužit jako srovnávací ukazatel s ostatními semeny.

Před samotným máčením byla semena dezinfikována roztokem destilované vody a roztoku chlornanu sodného v objemovém poměru 1 : 5 po dobu deseti minut. Podrobné znázornění jednotlivých variant a koncentrací ukazuje schéma (tab. 1)

Dřevina	režim	kód varianty	koncentrace BRs [mg.l ⁻¹]	počet semen
<i>Pinus sylvestris</i> L.	nestresovaný	W	0	500
		L	0,004	500
		M	0,04	500
		H	0,4	500
	stresovaný	WS	0	500
		LS	0,004	500
		MS	0,04	500
		HS	0,4	500

tab. 1 Přehled režimů a koncentrací pokusu (BRs – brassinosteroid)

4.2.2.2 Postup

Pokus byl založen 12. 6. 2015 se semeny borovice lesní (*Pinus sylvestris*).

Při založení pokusu bylo do čtyřiceti testovacích vaniček vloženo celkem 4 000 semen. Od každé koncentrace bylo rozděleno do pěti testovacích vaniček po sto semenech. To samé bylo provedeno ještě jednou z důvodu potřeby vytvořit takzvaný stresový režim, který by později ukázal, jak se klíčící semena budou chovat v nepříznivých podmínkách. Semena byla vkládána pomocí sterilizované pinzety do nepoužitých vaniček na přeložený filtrační papír, odpovídající svým rozměrem rozměrům vaničky. Pinzety, které byly nezbytné pro výsev semen a manipulaci při měření délky klíčku, byly dezinfikovány ve sterilizačním přístroji párou o teplotě 121 °C po dobu 15 až 20 minut.

4.2.2.3 Vyhodnocení klíčení semen

Každý týden od založení pokusu probíhalo měření délky klíčků u těch semen, u kterých délka klíčku dosahovala alespoň čtyřnásobku délky semene (obr. 6). Tak vše probíhalo až do dne 10. 7. 2015, kdy byl pokus ukončen.

Dne 10. 7. 2015 byly změřeny délky všech vyklíčených semen bez ohledu na to, zda dosahovaly délky čtyřnásobku délky semene. U každé varianty byla sledována úspěšnost klíčení.



obr. 6 *Plně naklíčené semeno (měřítko v centimetrech s milimetrovou přesností)*, (Suraweera, 2015)

Délky jednotlivých klíčků byly po změření zapisovány každý sedmý den do nového zápisového listu (obr. 7).

Datum založení:	Datum měření:	Jméno:
Druh: <i>Pinus sylvestris</i> L.		
Kód varianty	Délky měřených klíčků	
n e s t r e s o v a n ý r e ž i m		
W1		
W2		
W3		
...		
...		
H3		
H4		
H5		
s t r e s o v a n ý r e ž i m		
WS1		
WS2		
WS3		
...		
...		
HS3		
HS4		
HS5		

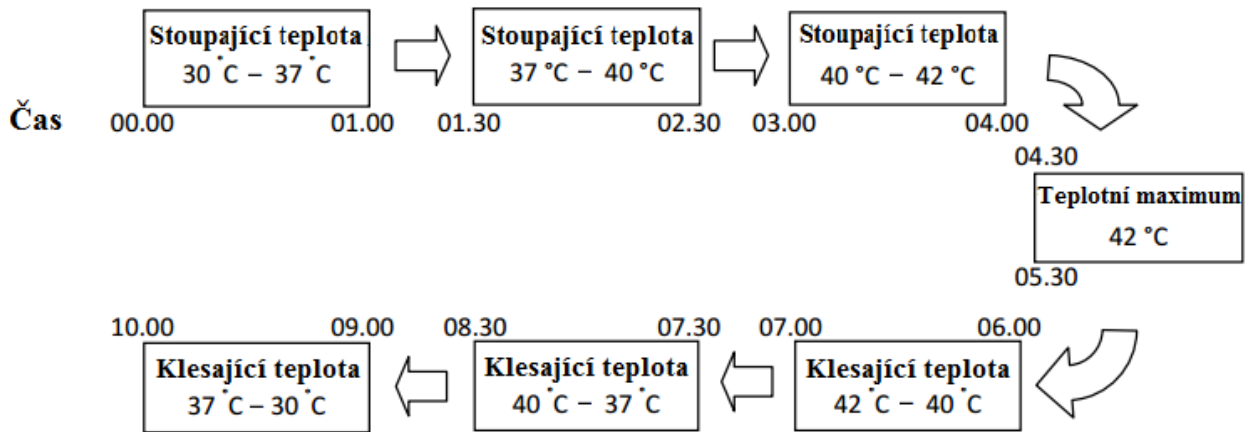
obr. 7 Vzor zápisového listu délek klíčků

4.2.2.4 Růstové podmínky semen

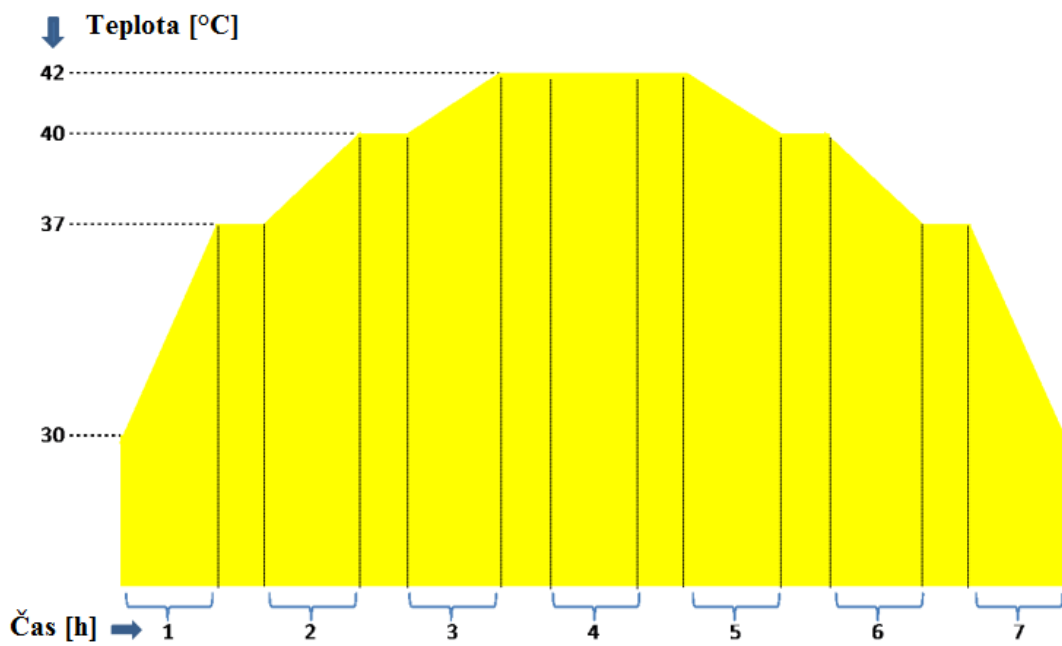
Semena byla po celou dobu pokusu umístěna v klíčnicí komoře KK 700 (POL – EKO Aparatura). Teplota se v klíčnicí komoře pohybovala v mezích stanovených normou ČSN 48 1211 (inkubace při střídavé teplotě – 16 hodin ve tmě při teplotě 20 ± 2 °C a 8 hodin na světle při teplotě 30 ± 2 °C). V klíčnicí komoře o pěti patrech byly pokaždé vloženy do patra nádoby se semeny od obou režimů a od jednotlivých variant.

4.2.2.5 Využití stresového faktoru ke zkoumání účinnosti brassinosteroidu

Při pokusu byla polovina semen v pěti variantách stresována teplem pro porovnání, jak brassinosteroid bude pomáhat semenům při klíčení v nepříznivých podmínkách. Stresování probíhalo v rámci programu HIC v prvním týdnu kultivace při teplotách maximálně 42 °C. Podrobnější znázornění procesu stresování je znázorněno na obrázku 8 a 9.



obr. 8 Grafické znázornění stresového procesu (Suraweera, 2015)



obr. 9 Grafické znázornění stresového procesu (Suraweera, 2015)

5 Výsledky

Výsledná data laboratorního pokusu byla zpracována pomocí testu homogenity binomických rozdělení (Agresti et al., 2008).

5.1 Výsledné ukazatele testu homogenity binomických rozdělení

5.1.1 Vyhodnocení klíčení semen v optimálních podmínkách

Z tab. 2 je patrné, že při srovnání varianty W x L a W x M nacházíme mezi těmito variantami na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ významný rozdíl ($p = 0,0163$, resp. $0,0379$) v účinnosti brassinosteroidu na počet vyklíčených semen.

Významný rozdíl lze konstatovat i při porovnání varianty W a H ($p = 0,0000$). Zde byl pozorovaný rozdíl u klíčení semen v optimálních podmínkách největší, mezi těmito variantami činil 16,8 % ve prospěch varianty H.

Porovnání koncentrací M a H má hodnotu $p = 0,0036$, tudíž se mezi nimi nachází statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Jediný případ, kde na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nelze hovořit o významném rozdílu ($p = 0,9919$), se týká porovnání účinnosti koncentrací L a M. Zde se účinnost použitého brassinosteroidu lišila pouze o 0,8 % ve prospěch varianty L.

Porovnávaná dvojice procedur při opakovaném porovnávání		test. stat. value	critical value	p-value
W	L	4,1836	3,6332	0,0163
W	M	3,7778	3,6332	0,0379
W	H	8,6525	3,6332	0
L	M	0,4036	3,6332	0,9919
L	H	4,4238	3,6332	0,0095
M	H	4,8292	3,6332	0,0036

Legenda: W – voda; L – nízká koncentrace; M – střední koncentrace; H – vysoká koncentrace

tab. 2 Přehled porovnávaných koncentrací pomocí testu homogenity; nestresovaný režim

5.1.2 Vyhodnocení klíčení semen ve stresových podmínkách

Při posouzení účinku brassinostreoidů v jednotlivých koncentracích v přítomnosti stresového faktoru (obr. 10) vychází najevo, že porovnání variant WS a LS vykazuje na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ významný rozdíl ($p = 0,000$). Zde byl pozorovaný rozdíl největší, mezi těmito variantami činil 31 % ve prospěch varianty HS.

Po srovnání koncentrací WS x MS a WS x HS, kde se rovněž p-hodnota rovná nule, se zde opět projevuje na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ významný rozdíl. To samé pak platí i při srovnání koncentrací LS x MS, kde je p-hodnota nižší než 0,05: opět zde nemůžeme hovořit o významném rozdílu. Srovnání varianty MS a HS poukazuje na významný rozdíl mezi počty vyklíčených semen těchto koncentrací.

Jediný případ, kde na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nelze hovořit o významném rozdílu ($p = 0,4881$), se týká porovnání účinnosti koncentrací LS a HS. Zde se účinnost použitého brassinosteroidu lišila o 4,2 % ve prospěch varianty HS.

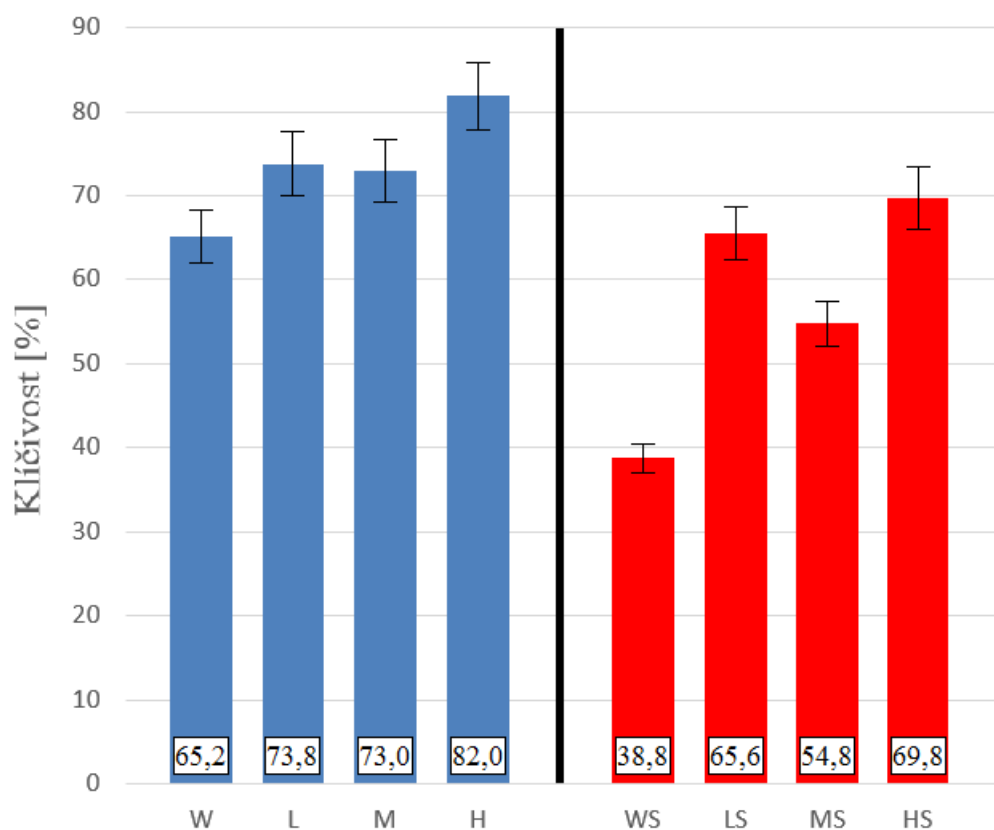
Porovnávaná dvojice procedur při opakovaném porovnávání		test. stat value	critical value	p-value
WS	LS	12,4246	3,6332	0
WS	MS	7,2487	3,6332	0
WS	HS	14,6061	3,6332	0
LS	MS	4,953	3,6332	0,0026
LS	HS	2,0052	3,6332	0,4881
MS	HS	6,9888	3,6332	0

Legenda (vše jsou stresované varianty): WS – voda; LS – nízká koncentrace; MS – střední koncentrace; HS – vysoká koncentrace

tab. 3 Přehled porovnávaných koncentrací pomocí testu homogenity; stresovaný režim

5.2 Porovnání procentuální klíčivosti semen

Obrázek 10 ukazuje pozitivní vliv brassinosteroidu na klíčení semen. Při klíčení semen ve stresovém prostředí ukazuje brassinosteroid (koncentrace LS a HS), kromě koncentrace MS, svou schopnost zmenšit dopad stresového faktoru a zlepšit klíčivost i v nepříznivých podmínkách oproti semenům máčeným pouze v destilované vodě.

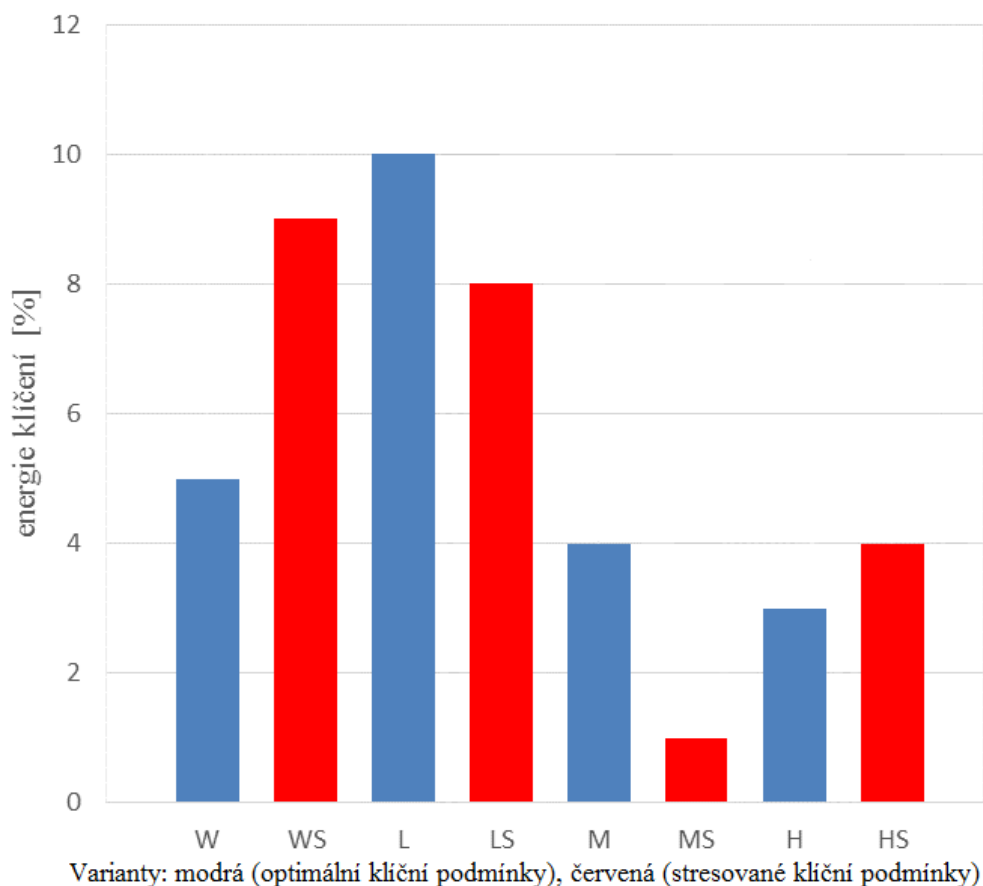


Varianty: modrá (optimální klíční podmínky), červená (stresované klíční podmínky)

obr. 10 Porovnání procentuální klíčivosti semen u stresovaných a nestresovaných režimů pokusu

5.3 Energie klíčení

Energie klíčení byla stanovena sedmý den klíčení semen dle normy ČSN 48 1211 počtem zaklíčených čistých semen vyjádřeným v procentech. Grafické znázornění energie klíčivosti semen jednotlivých variant pokusu u obou režimů je znázorněno na obr. 11.



obr. 11 Grafické procentuální znázornění energie klíčení semen měřených sedmý den od založení pokusu

Z obr. 11 vyplývá, že kontrolní varianta WS a varianta L vykazuje nejvyšší energii klíčení. K hodnotám dosahovaným kontrolní variantou se blíží i varianta LS (nízká koncentrace, stresovaný režim; $0,004 \text{ mg.l}^{-1}$).

Použitý brassinosteroid tedy energii klíčení výrazněji podpořil pouze v nízkých koncentracích. Nejnižší energie klíčení byla zaznamenána u varianty MS, která vykázala hodnotu pouze 1 %.

6 Diskuse

Hong et al. (2005) uvádějí, že na to, aby aplikace brassinosteroidů v lesním hospodářství mohla být možná, není stále dostatek zkušeností s účinky brassinosteroidů na lesních dřevinách. V Evropě donedávna dosud neexistoval v podstatě žádný intenzivní výzkum se zaměřením na uvedenou problematiku (Nováková et al., 2014).

Cílem této studie bylo ověřit vliv exogenní aplikace tří různých koncentrací synteticky připraveného brassinosteroidu na klíčení semen borovice lesní (*Pinus sylvestris*).

Významnou úlohu hrály brassinosteroidy například v termotoleranci rajčete (*Lycopersicon esculentum*). Singh a Shono, (2005) poznamenali, že studované rostliny rajčete po ošetření brassinosteroidy přežily smrtící teplotu 45 °C. Zjistili, že aplikace brassinosteroidu navodila bazální termotoleranci rostliny rajčete.

Předkládaná práce naznačuje podobný výsledek. Brassinosteroidy prokazatelně zlepšily klíčení semen borovice lesní (*Pinus sylvestris*) u stresovaného režimu pokusu, kde maximální teplota dosáhla 42 °C po dobu jedné hodiny. Největší vliv na klíčení semen měla koncentrace H, v optimálním i stresovaném režimu. Při výpočtu energie klíčení sedmý den od založení pokusu je naopak nutno konstatovat, že se nejvíce projevila varianta WS a L, potažmo i LS, která za touto dvojicí mírně zaostávala. Nejhorší výsledek energie klíčení semen podala varianta MS.

Pro další výzkum zůstává několik otázek. Například, proč stresovaná varianta MS vykazovala výrazně menší úspěch v klíčení než varianta LS (v porovnání o 10,8 %), která měla 10x menší koncentraci brassinosteroidu? Mírný náznak tohoto trendu u koncentrace M se projevila i u nestresované varianty pokusu (zde však pouze o 0,8 %). Můžeme očekávat obdobné působení brassinosteroidů i u dalších lesních dřevin? Budou brassinosteroidy u semen lesních dřevin podporovat klíčení i při působení jiných stresových faktorů (např. sucha)?

Vzhledem k tomu, že brassinosteroidy jsou v současné době oblastí, která ještě není zcela prozkoumána, bude zapotřebí ještě dalších výzkumů, které stanoví přednosti jednotlivých koncentrací brassinosteroidů v návaznosti na klíčení semen jednotlivých druhů lesních stromů.

7 Závěr

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce bylo posoudit, zda testovaný brassinosteroid může zvýšit klíčivost semen borovice lesní (*Pinus sylvestris*), a to jak ve standardních podmínkách, tak při teplotním stresu.

Bylo zjištěno, že klíčení borových semen bylo nejpříznivěji ovlivněno ve variantě s nejvyšší koncentrací brassinosteroidu ($0,4 \text{ mg.l}^{-1}$), která zvýšila klíčivost semen u nestresovaného režimu pokusu o 16,8 % a při stresovaném režimu dokonce o 31 % ve srovnání s klíčivostí semen, která byla pouze máčena v destilované vodě. Nejlepší výsledek tedy jednoznačně ukázala koncentrace H – nejvyšší ($0,4 \text{ mg.l}^{-1}$) a to v obou prostředích; stresovaném i optimálním. Tato skutečnost je na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky vysoce průkazná.

8 Seznam použité literatury

- AGRESTI, A., BINI, M., BERTACCINI, B., RYU, E., *Simultaneous confidence intervals for comparing binomial parameters* Biometrics, (2008), 64 (4), 1270–1275.
- BAJGUZ, A., *Brassinosteroids—occurrence and chemical structures in plants. Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Springer Netherlands, (2011), 1–27.
- BAJGUZ, A., TRETYN, A., *The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants*. Phytochemistry, (2003), 62 (7), 1027–1046.
- BELLARMO PEREIRA – NETTO, A., *Brassinosteroids: practical applications in agriculture and human health*. Brazil: Bentham Books, (2012), ISBN 9781608052981.
- ČSN 48 1211 N, *Lesní semenářství. Zkoušky jakosti plodů a semen lesních dřevin*.
- HAUBRICK, L. L., ASSMANN, S. M., *Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles*. Plant Cell Environ. (2006), 29 (3), 446–57.
- HAYAT, S., AHMAD, A., *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Dordrecht: Springer, (2011), ISBN 9789400701892
- HAYAT, S., AHMAD, A., FARIDUDDIN, Q. *Brassinosteroids: A regulator of 21st century* (pp. 231-246). Springer Netherlands, (2003).
- HOUBA, M., *Semenářská kontrola. Příručka úspěšného množitele*. České Budějovice, Kurent, s. r. o., 2007. 63 s.: ISBN: 978-80-903522-8-5
- HRADECKÁ, D., URBAN, J., KOHOUT, L., PULKRÁBEK, J., HNILIČKA, R., *Využití brassinosteroidů k regulaci stresu během růstu a tvorby výnosu řepy cukrové: Utilization of brassinosteroids to stress control during growth and yield formation of sugar beet*. Listy cukrovarnické a řepářské, (2009), 125 (9), 271–273. ISSN 1210-3306.
- KAGELE, S., DIVI, U. K., KROCHKO, J. E., KELLNER, W. A., KRISHNA, P., *Brassinosteroids confers tolerance in Arabidopsis thaliana and Brassica napus to a range of abiotic stresses*. Planta, (2007) 225: 353–364, 2007.
- KIM, S. K., CHANG, S. C., LEE, E. J., CHUNG, W. S., KIM, Y. S., HWANG, S., LEE, J. S., *Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize*. Plant Physiology, (2000), 123 (3), 997–1004.
- KOHOUT, L. *Brassinosteroidy*. Praha: AV ČR. Ústav organické chemie a biochemie, (2004). ISBN 80-86241-23-8.
- KOHOUT, L., *Brassinolid a brassinosteroidy. Bulletin Asociace českých chemických společností, (1995), 26: 1.*
- KRISHNA, P., *Brassinosteroid-mediated stress responses*. Journal of Plant Growth Regulation, (2003), 22 (4), 289–297.

- MAHDALOVÁ, M., *Hodnocení senzorické jakosti chleba*, Bakalářská práce, (2012); Brno
- MÜSSIG, C., *Brassinosteroid – Promoted Growth*. *Plant biology*, (2005), 7 (2), 110 – 117.
- MÜSSIG, C., SHIN, G., ALTMANN, T., *Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis*. *Plant Physiol.* (2003), 133 (3), 1261–1271.
- NOVÁKOVÁ, O., GALLO, J., BALÁŠ, M., ŠPULÁK, O., KUNEŠ, I., *Vliv brassinosteroidů na výškový přírůst, fluorescenci chlorofylu a mortalitu sazenic smrku ztepilého a borovice lesní v podmínkách lesní školky*. *Zprávy lesnického výzkumu*, (2015), 60 (2): 122–129.
- NOVÁKOVÁ, O., KUNEŠ, I., GALLO, J., BALÁŠ, M., *Effects of brassinosteroids on prosperity of Scots pine seedlings*. *Journal of Forest Science*, (2014), 60, 388–393.
- PROCHÁZKA, S., a kol., *Fyziologie rostlin*. PRAHA; ACADEMIA, (1998), 484 s. ISBN 80–200–0586–2
- PSOTA, V., ŠEBÁNEK, J., *Role fytohormonů v klíčení a sladování*. Praha, ÚZPI (1999), ISBN 80–7271–023–0
- RAO, S. S. R., VARDHINI, V. B., SUJATHA E., ANURADHA S. *Brassinosteroids - A new class of phytohormones*. *Current Science*, (2002), 82 (10), 1239–1245.
- SINGH, I., SHONO, M., *Physiological and molecular effects of 24 – epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato*. *Plant Growth Regulation*, (2005), 47, 111–119.
- SURAWEEERA, N., B., *Use of brassinosteroids to overcome unfavorable climatic effects on seed germination of chosen tree species from temperate forests*, Diploma Thesis, (2015), ČZU v Praze, FLD KPL.
- VLAŠÁNKOVÁ, E., *Vliv syntetických brassinosteroidů na růstové a hormonální reakce řepky olejné (Brassica napus L.) a pšenice seté (Triticum aestivum L.)*, Disertační práce, (2008), Brno

9 Seznam příloh

obr. 1 *Varianta WSI (kontrolní varianta, 0 % brassinosteroidu; stresovaný režim)*

obr. 2 *Varianta MSI (střední koncentrace, stresovaný režim)*

obr. 3 *Varianta M3 (střední koncentrace, optimální režim)*

obr. 4 *Varianta LSI (nízká koncentrace, stresovaný režim)*

obr. 5 *Varianta L2 (nízká koncentrace, optimální režim)*

obr. 6 *Varianta MSI (střední koncentrace, stresovaný režim)*

obr. 7 *Varianta M1 (střední koncentrace, optimální režim)*

obr. 8 *Varianta LSI (nízká koncentrace, stresovaný režim)*

obr. 9 *Varianta HSI (vysoká koncentrace, stresovaný režim)*

obr. 10 *Varianta HI (vysoká koncentrace, optimální režim)*

obr. 11 *Varianta WSI (kontrolní varianta, 0 % brassinosteroidu; stresovaný režim)*

obr. 12 *Varianta HSI (vysoká koncentrace, stresovaný režim)*

10 Přílohy

10.1 Týdenní kontrola; měření výsledků

10.1.1 Stav semen po jednom týdnu klíčení

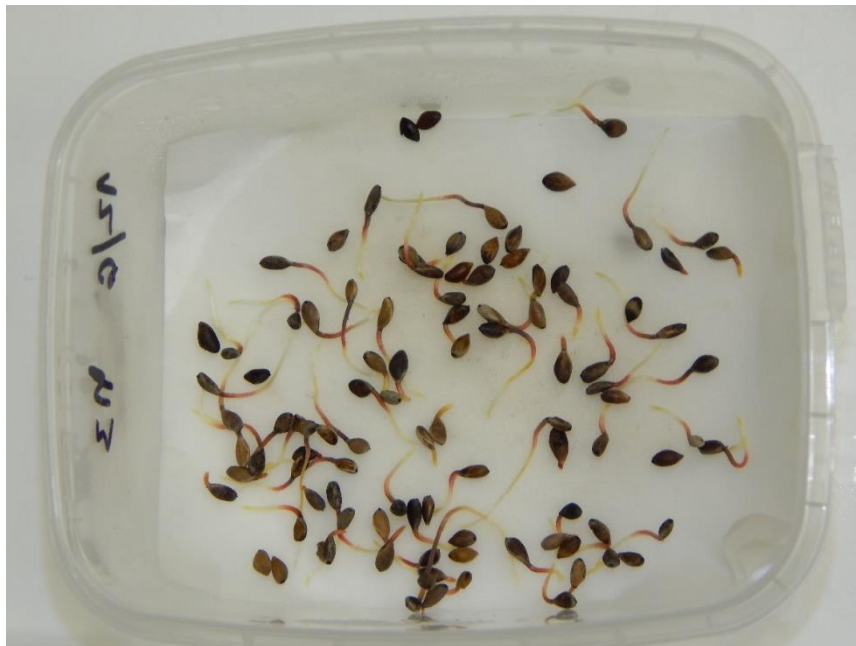


Obr. 1 Varianta WSI (kontrolní varianta, 0 % brassinosteroidu; stresovaný režim)



Obr. 2 Varianta MSI (střední koncentrace, stresovaný režim)

10.1.2 Stav semen po dvou týdnech klíčení



Obr. 3 Varianta M3 (střední koncentrace, optimální režim)



Obr. 4 Varianta LS1 (nízká koncentrace, stresovaný režim)



Obr. 5 Varianta L2 (nízká koncentrace, optimální režim)



Obr. 6 Varianta MS1 (střední koncentrace, stresovaný režim)

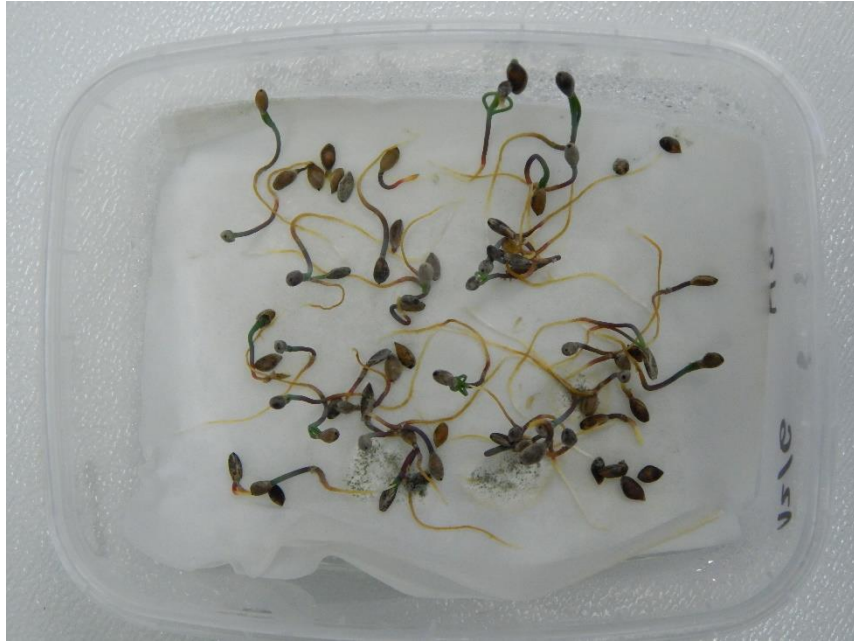


Obr. 7 Varianta M1 (střední koncentrace, optimální režim)

10.1.3 Stav semen po třech týdnech klíčení



Obr. 8 Varianta LS1 (nízká koncentrace, stresovaný režim)

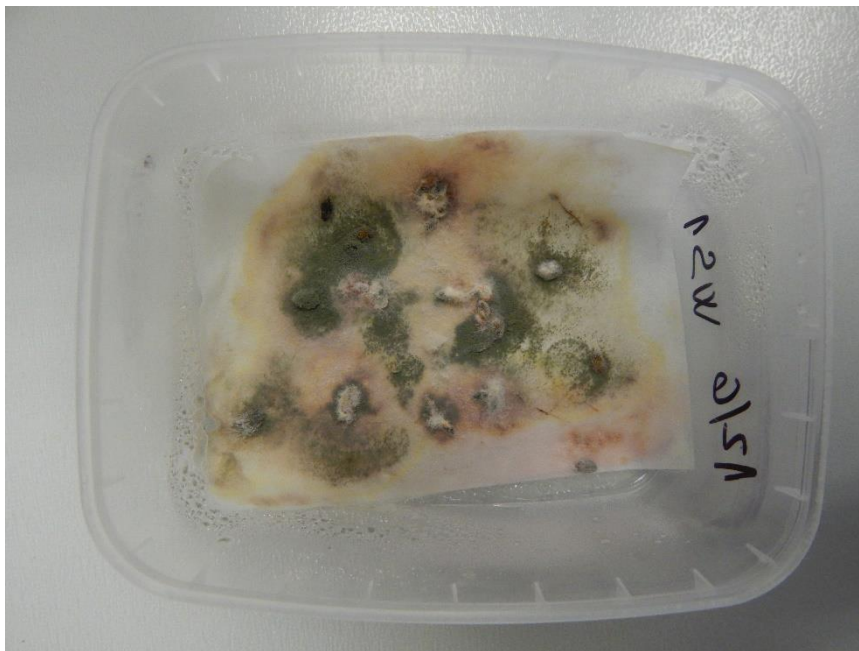


Obr. 9 Varianta HSI (vysoká koncentrace, stresovaný režim)



Obr. 10 Varianta H1 (vysoká koncentrace, optimální režim)

10.1.4 Stav semen po čtyřech týdnech klíčení



Obr. 11 Varianta WS1 (kontrolní varianta, 0 % brassinosteroidu; stresovaný režim)



Obr. 12 Varianta HS1 (vysoká koncentrace, stresovaný režim)