

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky & Laboratoř růstových regulátorů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Olomouc 2012

Eva Procházková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky & Laboratoř růstových regulátorů

**TESTOVÁNÍ VLIVU RŮSTOVÝCH
REGULÁTORŮ NA TVORBU ETHYLENU
U BAVLNÍKU**

(*Gossypium herbaceum L.*)

**Testing The Effect of Growth Regulators on Production of Ethylene
on *Gossypium herbaceum L.***

Autor:	Eva Procházková
Studijní program, studijní obor:	Chemie pro víceoborové studium – biologie (R09386)
Forma studia:	prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Jaromír Mikulík, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	13.8. 2012

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala zcela samostatně pod odborným dohledem pana Ing. Jaromíra Mikulíka, Ph.D. za použití pramenů uvedených v seznamu literatury. U obrázků, kde jsem sama autorkou nejsou uvedeny zdroje, v opačném případě je zdroj uveden.

Olomouc 13.8. 2012

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto upřímně poděkovat panu Ing. Jaromíru Mikulíkovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, trpělivost a čas, který mi věnoval.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Eva Procházková

Název práce: TESTOVÁNÍ VLIVU RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ NA TVORBU ETYLENU U BAVLNÍKU (*Gossypium herbaceum* L.)

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP & Laboratoř růstových regulátorů PřF UP

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

Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt:

Úkolem bakalářské práce bylo měření množství vyprodukovaného ethyleny vlivem různých růstových regulátorů a jejich kombinací na rostlinách bavlníku (*Gossypium herbaceum* L.). Vysoká produkce ethyleny rostlinou je v některých případech spojována s opadem jejich listů, tzv. defoliací. V praxi to umožňuje rychlejší mechanický sběr bavlníkových tobolek na plantážích. Měření byli zástupci růstových regulátorů ze skupin auxinů, cytokininů, brassinosteroidů a jejich kombinace. Konkrétně byly použity látky: TDZ, 24-EP, IAA, NAA a látka LGR 951 z „cytokininové knihovny“ LRR. Výsledky této práce byly srovnávány s výsledky publikovanými ve článku Arteca RN, Arteca JM. 2008. Effects of brassinosteroid, auxin and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* 11, 3019-3026, kde byl tento efekt zkoumán na rostlině huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Z naměřených výsledků lze konstatovat, že nejvyšších výsledků dosahovaly látky cytokininové povahy, tedy látky TDZ a LGR 951 v koncentracích 100 a 200 μM. Produkce ethyleny u auxinů a brassinosteroidů nedosahovaly zdaleka tak vysokých hodnot jako u TDZ a LGR 951.

Klíčová slova: fytohormon, ethylen, bavlník, plynová chromatografie, defoliace, TDZ, LGR 951, 24-EP, IAA, NAA

Počet stran: 49

Počet příloh: 1

Jazyk: Čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Eva Procházková

Title: Testing The Effect of Growth Regulators on Production of Ethylene on *Gossypium herbaceum L.*

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Botany & LRR

Supervisor: Ing. Jaromír Mikulík, Ph.D.

The year of presentation: 2012

Abstract:

The task of bachelor thesis was to measure the quantity of ethylene produced by different growth regulators and their combinations on cotton plants (*Gossypium herbaceum L.*). High ethylene production is in some cases associated with leaf fall, called defoliation. This allows faster mechanical collection of cotton capsules on plantations. The representatives of auxins, cytokinins, brassinosteroids, and it's combinations were measured. Concretely TDZ, 24-EP, IAA, NAA and LGR 951 from "cytokinin library" LRR. The results of this study were compared with results published in the article Arteca RN, Arteca JM. 2008 Effects of brassinosteroids, auxin and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. Journal of Experimental Botany 11, 3019-3026. The study was made on the plant *Arabidopsis thaliana*. The highest ethylene production reached the substance TDZ and LGR 951 100 and 200 μ M. Ethylene production of auxins and brassinosteroids didn't reach as high values as TDZ and LGR 951.

Key words: phytohormone, ethylene, cotton, gas chromatography, defoliation, TDZ, LGR 951, 24-EP, IAA, NAA

Number of pages: 49

Number of appendices: 1

Language: Czech

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE	9
2. ÚVOD	10
3. ROSTLINNÉ HORMONY	11
3.1. FUNKCE A STRUKTURA	11
3.1.1. DRUHY RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ	11
3.2. AUXINY	12
3.3. CYTOKININY	14
3.4. GIBERELINY	15
3.5. KYSELINA ABSCISOVÁ (ABA)	17
3.6. ETYLEN	18
3.7. DALŠÍ LÁTKY FYTOHORMONÁLNÍ POVAHY	19
3.7.1. BRASSINOSTEROIDY	19
3.7.2. JAMONÁTY	20
3.7.3. POLYAMINY	20
3.7.4. OLIGOSACHARIDY, FENOLICKÉ LÁTKY	20
4. BAVLNÍK	22
4.1. HISTORIE	22
4.2. ZAŘAZENÍ	22
5. PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE	24
5.1. ZÁKLADNÍ ČÁSTI PLYNOVÉHO CHROMATOGRAFU	25
5.2. UPLATNĚNÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE	26
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
6.2. ROSTLINNÝ MATERIÁL	28
6.2.1. PODMÍNKY PRO RŮST A PĚSTOVÁNÍ ROSTLINNÉHO MATERIÁLU	28
6.3. POSTUP PŘI EXPERIMENTU	28
6.3.1. PŘÍPRAVA RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ	28
6.3.2. PŘÍPRAVA VZORKU	30
6.3.3. MĚŘENÍ	30
6.4. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	31
6.4.1. KALIBRAČNÍ KŘIVKA	31
6.5. VÝSLEDKY	32
7. DISKUSE	38

8. ZÁVĚR	40
9. PŘÍLOHA	41
10. SEZNAM ZKRATEK	45
11. SEZNAM OBRÁZKŮ	46
12. SEZNAM FOTOGRAFIÍ	46
13. SEZNAM TABULEK	47
14. SEZNAM GRAFŮ	47
15. INTERNETOVÉ ZDROJE OBRÁZKŮ	47
16. BIBLIOGRAFIE	48

1. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Hlavní cíle této bakalářské práce jsou:

1. Seznámení se s metodikou měření ethylenu.
2. Samostatně pracovat s plynovým chromatografem Agilent Technologies
6890 N Network GC SYSTEM
3. Vypracovat z dostupných zdrojů literární rešerši zadaného tématu.
4. Shrnout experimentálně získané výsledky do bakalářské práce.

2. ÚVOD

Bavlna patří mezi nejvýznamnější textilní vlákna na světě a některé zdroje uvádějí, že měla své uplatnění již ve starém Egyptě před více než dvanácti tisíci lety. V Evropě byla neznámá až do pozdního středověku. Velký převrat v textilním průmyslu nastal koncem 19. století, kdy bavlna činila asi čtyři pětiny objemu všech textilních materiálů. ^[1]

Pěstování bavlny je pro celý svět nezbytné. Zejména rozvojové země západní Afriky jsou na její produkci závislé. Jak pro přežití zdejších venkovanů, tak i pro makroekonomickou stabilitu jsou příjmy z obchodu s bavlnou důležitým aspektem. ^[2]

V celosvětové produkci bavlny dominuje zejména Čína, Indie a USA. ^[3] Výnos světové produkce bavlny pro rok 2012/13 odhaduje ERS na 745 kg/ha na celkové ploše 33.3 milionů hektarů, tedy podobně jak tomu bylo v letech 2011/12. ^[4]

Ve většině zemí se praktikuje sklizeň mechanická, již výrazně usnadňuje defoliace, neboli opad listů. Pro tento účel byla v minulých letech vynaložena snaha najít látky, na něž rostlina reaguje opadem listů. Bylo zjištěno, že právě defoliace je spojena se zvýšenou produkcí ethylenu.

Ve své bakalářské práci se zaměřuji na produkci ethylenu terčíky listů bavlníku (*Gossypium herbaceum L.*) vybraných růstových regulátorů a jejich kombinací. Jednotlivé látky byly vybrány z „cytokininové knihovny“ Laboratoře růstových regulátorů PŘF Univerzity Palackého. Mým úkolem bylo pak jejich měření, vzájemné porovnání výsledků mezi sebou a rovněž porovnání s výsledky zjištěnými v jiných pracích. Pokud by se podařilo najít látku, popř. kombinace látek, u nichž by se prokázala indukce ethylenu v listech bavlníku srovnatelná s běžně v praxi používanou látkou TDZ (thidiazuron), mohla by se tato látka v budoucnu začít používat v praxi.

3. ROSTLINNÉ HORMONY

3.1. Funkce a struktura

Předpoklady o přítomnosti rostlinných hormonů vznikaly již na konci 19. století, avšak fyziologicky prokázány byly ve 20. letech minulého století. Fytohormony představují specifický systém signálních látek zastupujících významné funkce v rostlinách. Především mají nezastupitelnou úlohu v koordinaci vývoje rostlin.

Patří mezi organické nízkomolekulární látky plnící funkci endogenních signálních látek, a to ve velmi nízkých koncentracích 10^{-6} až 10^{-9} M. Přenášejí informace mezi rostlinnými pletivy a orgány. Chemická struktura v zásadě určuje charakter přenášené informace.

Signály produkované fytohormony jsou v buňkách zachycovány pomocí specifických receptorů. Záleží však i na schopnosti dané buňky signál rozeznat a posléze na něj zareagovat. To je dáno i tím, v jakém stavu se buňka nachází. Roli při rozeznávání signálů hraje množství specifických receptorů, což určuje citlivost buňky k signálu nebo např. stupeň diferenciací trofických poměrů buňky. Obecně lze tedy konstatovat, že výsledné efekty fytohormonů jsou navzájem odlišné. Za účinek projevu určitého signálu fytohormonu odpovídá také jeho koncentrace. Neznamená však, že se pokaždé přímo úměrně se stoupající koncentrací zvedá i míra účinku projevu. Při vyšších koncentracích totiž mohou působit některé látky inhibičně. Hladina určitého fytohormonu je řízena hlavně intenzitou jeho syntézy a rozkladu v místě vzniku. Řídícím faktorem však může být i rychlost transportu do místa odpovědi, intenzita jeho odbourávání nebo reverzibilní inaktivace v místě působení.

Faktem je, že vzájemné působení fytohormonů činí růstové a vývojové procesy v rostlině velmi komplexními. Spolu s dalšími znalostmi o vztazích rostlin s fytohormony je toto téma dlouhodobým aktuálním problémem ve fyziologii rostlin. ^[5]

3.1.1. Druhy růstových regulátorů

Mezi nejzákladnější fytohormony patří auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová a ethylen. Další signální látky tohoto charakteru pak reprezentuje – kyselina jasmonová, kyselina salicylová, brassinosteroidy popř. polypeptidy a oligopeptidy.

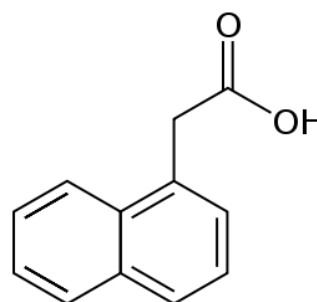
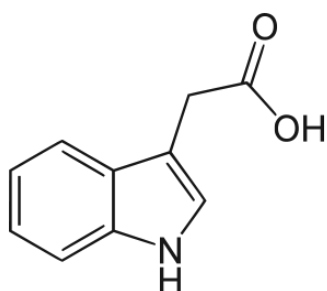
Vedle přirozených metabolitů je známo mnoho dalších synteticky připravených látek, jež se strukturou fytohormonům podobají. V rostlinách se váží na receptory fytohormonů a jejich signály simulují. Takové látky se spolu s fytohormony označují jako růstové regulátory. ^[5]

V této práci uvádím výsledky účinků jak přírodních fytohormonů, tak i těch syntetických, tedy růstových regulátorů.

Nadcházející část je věnována souhrnu všech výše zmíněných látek, základních reprezentantů fytohormonů a jejich hlavním účinkům a funkcím.

3.2. AUXINY

Existence auxinů byla prokázána ve 20. letech minulého století. Staly se tak vůbec první objevenou skupinou rostlinných hormonů, a to díky objevu elongace buněk, kterou vykazují např. segmenty koleoptily trav nebo hypokotyle klíčících rostlin. ^[6] Přirozené auxiny reprezentuje malá skupina strukturně podobných látek: kyselina **indolyl-3-octová** – **IAA** (z angl. *indole-3-acetic acid*), kyselina **indolyl-3-máselná** – **IBA**, kyselina 4-chlorindolyl-3-octová – **4-Cl-IAA** a kyselina fenylactová – **PAA**, a další přítomnost celé řady strukturních analogů. ^[5] Nejznámější jsou např. kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), kyselina α -naftylactová (NAA). ^[6]



Obrázek č.1 Kyselina indolyl-3-octová(IAA)^[26] **Obrázek č. 2** Kyselina α -naftylactová(NAA)^[27]

IAA – kyselina indolyl-3-octová

IAA je **slabá kyselina**, syntetizovaná ve vrcholu koleoptily. U jednoděložných rostlin se od vrcholu k bázi hladina IAA snižuje. Podobně je tomu i u dvouděložných rostlin, s tím rozdílem, že nejvyšší hladina je v nejrychleji rostoucí subapikální zóně. Zdrojem IAA jsou na jaře pupeny, protože právě v tomto období dosahuje svého maxima růst buněk kambia, a tedy i obsah IAA v kambiu.

BIOSYNTÉZA

Tvorba auxinů probíhá především v lodyžním vrcholu a v nejmladších listech. Dále pak v kambiu, kde podporují dělení a tvorbu dřeva a lýka. V neposlední řadě je najdeme také v oplozeném vajíčku, kde se za jejich podpory přeměňuje semeník v plod. ^[6]

TRANSPORT

Na krátké vzdálenosti (mezi buňkami)

Mezibuněčný transport se vyznačuje tím, že je polární a membránový. Auxin je jediným polárně transportovaným fytohormonem. Ve stonku putuje bazipetálně, tedy od vrcholu k bázi, v kořeni akropetálně. Ve stonku a listech je auxin takto transportován parenchymem vodivých pletiv.

Na dlouhé vzdálenosti

Za těchto okolností probíhá přenos nepolárně, a to floémem.

Některé další funkce auxinu

Jak jsem již zmínila, auxin způsobuje prodlužování buněk. Účinné koncentrace pro buňky stonkových internodií jsou 10^{-5} až 10^{-6} M. Co je ale zajímavé, prodlužování buněk kořene má v této koncentraci inhibiční účinky. Elongace v kořenech vlivem auxinu je v koncentracích o několik řádů nižších (10^{-9} až 10^{-10} M). Důležitá je jeho role při směrovaných reakcích, tzv. tropismech. Mezi ty nejznámější patří fototropismus, reakce na světlo, gravitropismus na zemskou tíži nebo podráždění pevným předmětem thigmotropismus. Tyto reakce způsobuje právě nerovnoměrný laterální transport auxinu v pletivu. ^[5]

Apikální dominance. Vztah mezi pupenem apikálním a axilárními pupeny, kdy dochází k inhibici vývoje axilárních meristémů. Odstranění apikálního pupenu pak vede k aktivaci rašení postranních pupenů. Aplikuje-li se však na odříznutý vrchol hlavního stonku auxin (např. IAA), zůstanou postranní pupeny nadále inhibovány. ^[7]

Stimulace tvorby laterálních i adventivních kořenů. Indukcí dělení buněk v pericyklu se vytvoří základy postranního kořene. Stimulace buněčného dělení v kambiu se v praxi běžně uplatňuje v zahradnictví k zakořeňování řízků při vegetativním množení rostlin.

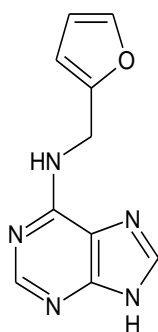
Oddálení abscise listů. Auxin se hojně tvoří v čepeli mladých listů. S jejich stárnutím však jeho produkce klesá, až zcela ustane (senescence). Oddělování listů se děje v abscisní zóně situované v abscisní vrstvě. Postupně dojde k enzymatickému narušení vrstev a stěny buněk se oddělí.

Ovlivnění růstu plodů. V časných vývojových stádiích se auxin tvoří v embryích, kde je nezbytný pro jejich polarizaci. Zastupuje velmi komplexní úlohu při růstu plodů. Podílí se na stimulaci dělení buněk vznikajícího oplodí a na jejich prodlužování. Zároveň se uplatňuje i při diferenciaci vodivých pletiv transportujících asimiláty.^[5]

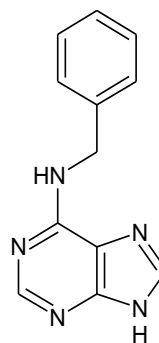
3.3. CYTOKININY

Cytokininy byly objeveny o tři desetiletí později než auxiny, tedy v 50. letech minulého století. Silně podněcují cytokinezi, čili dělení buněk, z čehož pochází i samotný název.^[5] Většina cytokininů jsou deriváty adeninu substituovaného na aminoskupině v poloze 6. Tato konfigurace také podmiňuje biologickou aktivitu dané látky. Struktura postranního řetězce navázaného na aminoskupině odpovídá aktivitě cytokininů. Mezi látky s nejvyšší aktivitou patří ty, se substituentem, které mají jako substituent v poloze N-6 izoprenoidní řetězec s dvojnou vazbou.^[8]

V současnosti je známo více než 200 přirozených a synteticky připravených látek s cytokininovou aktivitou.^[5] Jako první z nich byl objeven zeatin, dihydrozeatin (DZ), isopentenylaminopurin (IPA). Nejpoužívanějším syntetickým cytokininem je kinetin (6-furfurylaminopurin) a BAP (6-benzylaminopurin).^[6]

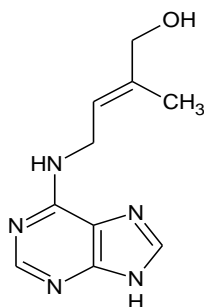


Obrázek č. 3 Kinetin (6-furfurylaminopurin)^[7]



Obrázek č. 4 6- benzylaminopurin (BAP)^[7]

Kinetin, chemicky furfuryladenin, má v pětičlenném kruhu zabudovaný atom kyslíku. Zeatin, chemicky 6- benzylaminopurin má jak *cis*-, tak i *trans*- formu, přičemž se obě vyskytují v přírodě a dají se enzymaticky konvertovatelné. Fyziologicky efektivnější je forma *trans*- .^[5]



Obrázek č. 5 Zeatin ^[7]

BIOSYNTÉZA A TRANSPORT

K tvorbě cytokininů dochází v kořenech, embryích, mladých listech a plodech. Zkrátka všude tam, kde se buňky dělí. Poté dochází k jejich transportu z místa jejich tvorby - kořenového apikálního meristému. Transport se uskutečňuje bazipetálně, xylémem do prýtu. ^[6]

Některé další funkce cytokininu

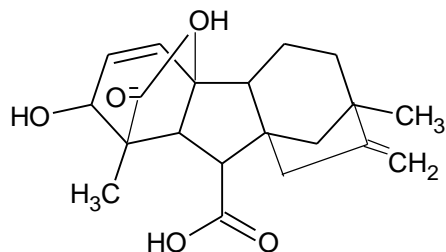
Fyziologické efekty jsou velmi různé. Cytokiny mají, jak už jsem zdůraznila, zásadní význam pro dělení buněk a ovlivňují celkový habitus rostliny. Stimulují vývoj axilárních pupenů a výrazně snižují apikální dominanci. Stimulací objemového růstu zvětšují plochu listu a inhibují prodlužování buněk internodií a kořenů. Rovněž významně ovlivňují transport v rostlině. Příkladem je např. jev zvaný mobilizace živin. Oddalují senescenci listu, zpomalují odbourávání chlorofylu, inhibují tvorbu superoxidu a hydroxylových radikálů. Tím omezují oxidaci membránových lipidů a stabilizují thylakoidy. Podílejí se na diferenciaci vodivých pletiv kořenu, především floému a urychlují diferenciaci chloroplastů při deetiolaci. Dále stimulují syntézu fotosyntetických pigmentů a proteinů fotosystému II i I.

Dokonce některé patogenní bakterie, hmyz nebo nematoda v rostlinách silně aktivují syntézu cytokininů, indukují dělení buněk, a tedy i vznik charakteristických struktur, např. tumorů. ^[5]

3.4. GIBERELINY

Gibereliny byly objeveny v Japonsku jako produkt houby *Gibberella fujikuroi*, jenž je znám jako choroba *bakanae*. Houba napadala rýži, způsobovala její abnormální prodlužování, snižovala produkci semen a výnos. Hlavním a nejhojněji se vyskytujícím zástupcem je kyselina giberelová, značená jako giberelin A₃ – GA₃ a giberelin GA₁. ^[5]

Gibereliny patří mezi cyklické diterpeny. Základní struktura tvořená čtyřmi kruhy se často označuje jako gibanový skelet.



Obrázek č. 6 Kyseliny giberelová (GA₃) - první identifikovaný giberelin ^[7]

Většina giberelinů je tvořena dvaceti atomy uhlíku, některé mají jen devatenáct. U jednotlivých druhů rostlin se vyskytují jen určité typy giberelinů. Často tvoří konjugáty se sacharidy, nejčastěji s glukózou, které jsou však biologicky neaktivní. V současnosti je známo více než 125 přirozených a uměle připravených látek s různou fytohormonální aktivitou (všechny se značí GA s číselným indexem).^[5]

BIOSYNTÉZA A TRANSPORT

Určité množství giberelinů se tvoří v kořenech, ale hlavní místo syntézy je v mladých semenech, vyvíjejících se plodech, ale i v aktivně rostoucích mladých listech, pupenech a internodiích. Jejich biosyntéza a degradace je reverzibilně ovlivňována teplotou, světelnými podmínkami, samotnou hladinou giberelinů, ale také auxinem.

Floémem putují gibereliny tvořené v nadzemní části rostliny, xylém je naopak transportuje z kořenů do nadzemní části.

FUNKCE GIBERELINU

Fyziologické efekty jsou často druhově specifické a podobně jako u cytokininů se velmi různí. Mezi základní projevy je zahrnováno prodlužování růstu stonku, kdy dochází k aktivaci meristematických buněk a jejich zvětšování. Buňky se prodlužují postupným rozvolňováním jednotlivých složek buněčné stěny. Na rozdíl od auxinů, snižujících pH v BS, mají gibereliny jiný rozvolňovací mechanismus.

U trav *gibereliny aktivují činnost interkalárních meristémů* v internodiích, u jiných druhů rostlin, stimulují dělení a prodlužování buněk v oblasti subapikální.

Obojí, *auxiny i gibereliny jsou co se týče prodlužovací funkce synergisté*. Na dlužení kořenů mají gibereliny menší vliv než na buňky stonku. Co se týče vzniku zakrslých rostlin, ten je důsledkem deficiencie giberelinu. ^[5]

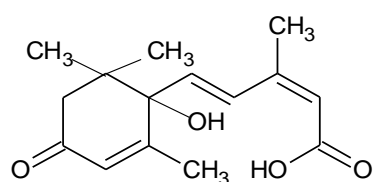
Další významná role giberelinů se uplatňuje při *klíčení semen a překonávání dormance* u semen i pupenů. V embryích (např. obilek ječmenu) se během klíčení syntetizují gibereliny, odtud difundují do aleuronových buněk, kde podněcují syntézu α -amyláz. ^[8]

Ovlivňování ukončení juvenilní fáze a přechod do fáze generativní. Tento efekt může působit jak ve smyslu pozitivním, tak i negativním. U dlouhodobých rostlin rozetového typu je pozitivní působení obzvláště významné, jelikož dochází ke stimulaci růstu stonku. Jiné typy rostliny jako např. u břechťanu se po aplikaci giberelinu juvenilní období prodlouží. U jehličnanů lze zkrátit juvenilní období dokonce o řadu let a uspišit tak kvetení.

Druhově specifický vliv na pohlaví květů. Při jejich aplikaci zvyšují buď produkci samčích nebo samičích květů např. kukuřice, jež má jednopohlavné květy, a kde jsou oba typy na jedné rostlině. V tomto případě funkce giberelinů zřejmě spočívá v negativním vlivu na vývoj tyčinek, a proto dochází ke vzniku samičích květů v samčím květenství. K opačnému efektu dochází např. u špenátu, okurky nebo konopí, kde se tvoří květy samčí na úkor samičích. ^[8]

3.5. KYSELINA ABSCISOVÁ (ABA)

Patří mezi seskviterpeny, je to slabá kyselina a zároveň ji řadíme k všudypřítomným fytohormonům. Podílí se na řízení stresových reakcí a dlouhodobých vývojových a růstových procesů. Obecně lze konstatovat, že ji můžeme najít u všech buněk rostlinných pletiv. Na rozdíl od všech tří výše uvedených skupin fytohormonů, je ABA představitelem růstového inhibitoru, je tedy jejich antagonistou. Byla identifikována při studiu opadu plodů bavlníku v 60. letech, v nichž její množství rapidně stoupalo. ^[5]



Obrázek č. 7 Kyselina abscisová (ABA) ^[7]

BIOSYNTÉZA, TRANSPORT a FUNKCE

Syntéza pravděpodobně probíhá převážně v listech (je spojena s plastidy). K transportu opět slouží jak floém, směrem do kořenů i do apikální části stonku, tak i xylém vycházející z kořenů. [5]

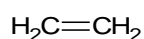
Její funkce mají hlavní opodstatnění při *regulaci nástupu a trvání dormance* semen a pupenů. Stimuluje opad listů i plodů, inhibuje klíčení atd. [6] Během zrání embrya významnou měrou ovlivňuje složení a ukládání zásobních proteinů v embryu. Po jeho vyvinutí brání dalšímu vývoji, a tedy navozuje stav dormance. To je fáze, kdy je hladina aktivních auxinů a giberelinů snížena a ABA je přítomna obvykle ve zvýšeném množství v dělohách.

Neopomenutelná je rovněž její *role při stresových reakcích*, zejména při stresu z nedostatku vody. Může být způsoben suchem, mrazem nebo vysokou koncentrací solí v půdním roztoku. Za těchto podmínek může v jedné hodině ABA stoupnout až 50x. [5]

U některých druhů rostlin ABA *podporuje senescenci a abscisi listů* popř. květů a plodů. Stejně tak urychluje stárnutí pletiv, způsobuje uzavírání průduchů při deficienci vody a zvyšuje propustnost kořenů pro vodu. [8]

3.6. ETHYLEN

Ethylen je plyn hydrofobní povahy, jenž byl uznán za rostlinný hormon podstatně později. V porovnání s ostatními rostlinnými hormony působil vzhledem ke své jednoduché struktuře (C₂H₂) „podezřele“, i přesto, že již ve 30. letech bylo známo, že má značný vliv na růst rostlin. Zjistilo se například, že se uvolňuje ve zrajících plodech, čímž celý proces urychluje. [6]



Obrázek č. 8 Etylen (eten) [7]

BIOSYNTÉZA a FUNKCE

Nejvyšší produkce byla zaznamenána v meristematických částech rostliny. Jeho hladina se zvyšuje během senescence, opadu listů, zrání plodů, při stresu a po poranění. Může se ale také vytvářet v podstatě ve všech částech rostliny.

Mezi funkce patří *urychlování dozrávání dužnatých plodů*, což je rovněž spojeno se zvýšenou respirací tzv. klimakterickým dýcháním (např. u banánů, jablek, hrušek, rajčat, fíků,

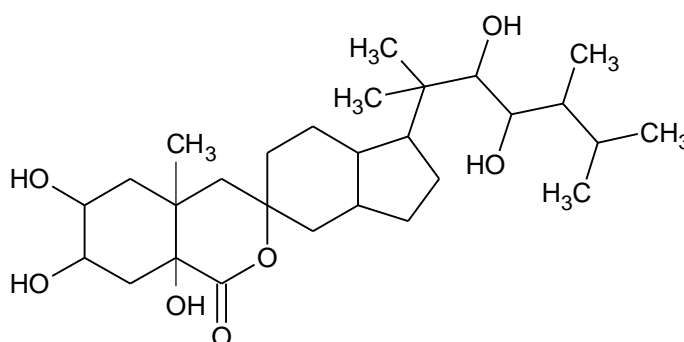
manga, broskví a avokáda). U vybraných druhů rostlin *zkracuje dormanci semen* (např. u podzemnice olejné) nebo pupenů (např. u hlíz bramboru). Co se týká růstu, působí při zakřivování stonkové části pod apikálním pupenem u etiolovaných dvouděložných rostlin, popř. prodlužování stonků u vodních rostlin, např. pryskyřníku (*Ranunculus sceleratus*).

Produkce ethylenu je v některých fyziologických procesech ovlivňována auxinem, cytokininem nebo kyselinou abscisovou.^[5]

3.7. DALŠÍ LÁTKY FYTOHORMONÁLNÍ POVAHY

3.7.1. BRASSINOSTEROIDY

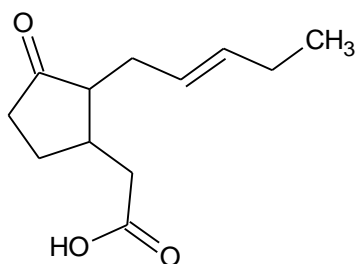
Tato skupina v současnosti zahrnuje na třicítku látek, převážně se vyskytujících v nadzemní části rostliny.^[5] Stejně jako předešlé fytohormony vykonají v rostlině široké spektrum funkcí. Mezi ty nejvýznamnější patří ovlivňování růstu a diferenciacce orgánů, ovlivňují tvorbu biomasy, regulují počet a velikost semen i plodů a rovněž oddalují stárnutí rostliny. Svě opodstatnění mají také v přizpůsobivosti rostliny na nepříznivé životní podmínky, a to zejména při nedostatku vody, živin, přítomnosti herbicidů, chladu, nadbytku solí, chlad, popř. napadení. Některé studie dokonce ukázaly, že tyto látky působí obdobně jako peptidové hormony u živočichů. Přenos signálu se tedy uskutečňuje prostřednictvím receptoru lokalizovaného na buněčné membráně.^[9] Mezi další významné funkce patří ještě zvyšování odolnosti rostliny k nízkým teplotám či suchu a vliv na dlouhivý růst.^[5]



Obrázek č. 9 Brassinolid ^[7]

3.7.2. JASMONÁTY

Biosyntéza kyseliny jasmonové (JA) a jejího methylesteru vychází z kyseliny linolenové. Izolovány byly tyto látky z jasmínového a rozmarýnového oleje, obsahují je však i jiné orgány mnoha druhů rostlin. Jejich hladina stoupá především při stresových reakcích, např. po poranění nebo napadení patogenem. Kromě „varovných“ reakcí před útokem patogenu stimuluje JA expresi genu kódujících inhibitory proteáz. ^[5]



Obrázek 10 Kyselina jasmonová (JA) ^[7]

3.7.3. POLYAMINY

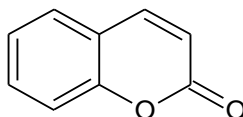
Mají ve své struktuře zabudováno, jak již název napovídá několik aminoskupin, a patří k jednoduchým organickým látkám. Mezi nejhojněji se vyskytující v rostlinách patří např. putrescin, spermin či spermidin. Z hlediska funkcí spojí za zmínku např. stimulace růstového dělení (zejména v *in vitro podmínkách*, kde probíhá velmi intenzivní buněčné dělení), rovněž stabilizují buněčné pH, zvyšují vnitrobuněčnou osmolaritu a působí jako obrana při stresových faktorech. ^[7]

3.7.4. OLIGOSACHARIDY

Z chemického hlediska dlouhé řetězce cukrů, vzniklé rozkladem buněčné stěny rostliny při napadení patogenem. Mezi hlavní funkce patří inhibice dlouhivého růstu a obranné reakce. ^[7]

3.7.5. FENOLICKÉ LÁTKY

Zahrnují velice pestrou škálu sekundárních metabolitů, kam patří např. flavonoidy, kumariny, antokyany, deriváty benzeny, kyseliny benzoové skořicové, ale i látky složitější povahy, jak řadíme např. třísloviny. Schopností některých derivátů kyseliny skořicové, benzoové nebo flavonoidů je inhibice přirozeného dlouhivého růstu i toho indukovaného, způsobeného IAA. Účastní se také infekce rostlin bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, jež napadá pouze poraněné dvouděložné rostlin. ^[7]



Obrázek č. 11 Kumarin ^[7]

4. BAVLNÍK

4.1. HISTORIE

Bavlněné látky se tkaly už 500let př. n. l. ve Východní Indii a odtud se tato tradice rozšířila



do Číny Arabie, dále do Egypta a jihoevropských zemí. V Evropě se podle zdrojů s touto tkaninou začalo pracovat koncem 17. století pravděpodobně v Nizozemí a posléze v Anglii. Zajímavostí je, že v Jižní Americe a v Mexiku se bavlnářství věnovali ještě před jejím objevením Kryštofem Kolumbem. Z toho lze usoudit, že se bavlnářský průmysl vyvíjel buď nezávisle na asijském nebo byl do Ameriky zavléčen Čiňany. ^[11]

Obrázek č. 12 Ruční sběr bavlny na jihu USA na počátku 20. století ^[22]

4.2. ZAŘAZENÍ

Bavlník patří mezi jedno až víceleté keře z čeledi *Malvaceae* (slézovité). Dosahuje výšky 0,7 až 2 m v závislosti na podmínkách pěstování a na odrůdě. V různých literárních zdrojích jsou uvedeny také různé počty druhů tohoto rodu, avšak v souvislosti s pěstováním v praxi jsou uváděny zpravidla druhy čtyři, a to bavlník srstnatý (*Gossypium hirsutum*), egyptský (*Gossypium barbadense* L.), bylinný (*Gossypium herbaceum* L. a *Gossypium arboreum* L.), pěstovaný v Asii a Africe.

Tabulka č. 1 Taxonomické zařazení bavlníku ^[18]

Taxonomické zařazení	
Říše (Regnum):	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše (Subregnum):	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení (Divisio):	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída (Classis):	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád (Ordo):	slézotvaré (<i>Malvales</i>)
Čeleď (Familia):	slézovité (<i>Malvaceae</i>)
Rod (Genus):	bavlník (<i>Gossypium</i>)

Mnou používaná rostlina, tedy *Gossypium herbaceum L.* se pěstuje převážně v Číně, Indii, na Středním východě a částečně i v jižní Evropě. Je to menší rostlina s dlouze řapíkatými, dlanitě 3-5 klannými. Na květech se objevuje skvrna podobně jako u bavlníku egyptského.



Plodem je malá nepukavá tobolka o hmotnosti 1-10g. Uvnitř je 3-5 přehrádek s 15-35 semeny oválného tvaru. Pokrývá je semenné vlákno, bavlna. Semeno může být holé nebo má na povrchu jemnou plst' a váží většinou 100-150g. Dozrává poměrně dlouhou dobu, asi 2 měsíce.

Bohatě větvený stonek nese vegetativní i plodonosné větvičky. Dalším znakem monopodiálních vegetativních větviček, jež se tvoří v dolní části kořene, je fakt, že svírají s hlavní osou ostrý úhel. Stáří rostliny lze odhadnout podle jejich počtu. Čím je jich méně, tím je rostlina mladší. Postavení listů na lodyze je spirálovité a dle barvy, tvaru, velikosti a ochlupení se lze řídit při určování jednotlivých odrůd.

Obrázek č. 13 Bavlník bylinný (*Gossypium herbaceum L.*), F – řez květem, f semeno s vlnou ^[23]



Květy se netvoří přímo na koncových vrcholech, nýbrž až na větvičkách vyrůstajících z úžlabí jejich listů. Jsou v počtu 1-5 na koncích plodonosných větviček a tvoří se na krátké stopce. Korunní plátky na bázi srůstají a stejně tak i tyčinky. ^[10]

Obrázek č. 14 Květ *Gossypium herbaceum L.* ^[24]

Na světě se bavlna pěstuje celkem asi v osmdesáti zemích světa a z toho dvě třetiny produkce obstarává USA, Čína a Indie. USA figuruje na třetím místě ve světové produkci je však hlavním exportérem surové bavlny a celkově obstarává více než třetinu světového obchodu se surovou bavlnou. ^[17]

Světová produkce bavlny pro rok 2012/13 se odhaduje na 113,8 milionů žoků, což činí asi sedmi procentní propad oproti předchozímu roku. V celosvětovém měřítku za rok 2012/13 se plocha sklizně odhaduje na 33,3 milionů hektarů a výnos na 745 kg/ha, podobně jak to mu bylo v letech 2011/12.

5. PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie je analytická separační metoda a umožňuje tedy kvalitativní i kvantitativní analýzu směsi. Slouží zejména k rozdělení složitých směsí látek s podobnými chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Uplatnění má velmi široké ve všech vědeckých odvětvích.^[12]

Využívá rozdělení koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fázi na základě adsorpce a rozpouštění, přičemž se předpokládá, že toto rozdělení je rovnovážné.^[13] Separace se uskutečňuje v kapilární nebo náplňové koloně. V ní je přítomna stacionární (nepohyblivá) fáze neboli (sorbent) a mobilní (pohyblivá) fáze (nosný plyn či eluent). Nejčastěji používanými nosnými plyny jsou vodík, dusík, helium, argon. Při jejich volbě hraje roli několik faktorů, a to viskozita, reaktivita, účinnost, čistota, typ používaného detektoru a cena plynu.^[14]

Mobilní fázi představuje kapalina, u kapalinové chromatografie nebo v mém případě plyn (plynová chromatografie = GC). **Fáze stacionární** může být buď pevná látka nebo film kapaliny na pevné látce zakotvený.^[12]

Plynový chromatograf je připojen ke zdroji nosného plynu (tlaková láhev) a k zařízení, které je schopné zpracovat signál z detektoru (dnes PC s tiskárnou). Výsledný vytištěný záznam chromatografické analýzy se nazývá chromatogram.^[12]

5.1. ZÁKLADNÍ ČÁSTI PLYNOVÉHO CHROMATOGRAFU

Hlavní části plynového chromatografu tvoří tyto komponenty:

1. Regulátor průtoku nosného plynu
2. Nástřikový port
3. Separální kolona
4. Termostat
5. Detektor

1. Nosný plyn a regulátor průtoku. Slouží k udržení konstantní průtokové rychlosti (nebo konstantního tlaku) nosného plynu v separační koloně během analýzy.^[12] Zdrojem nosného plynu jsou, jak jsem již zmínila tlakové lahve s těmito plyny. V mém případě tlaková láhev s heliem, vodíkem, dusíkem a vzduchem. Plyn nemá přímý vliv na separaci a slouží tedy k unášení vzorku

kolonou. O předpokladech, jenž musí plyny splňovat jsem se již výše zmínila. Důležitým předpokladem je také inertní chování vůči složkám vzorku.

Čistící zařízení – splňuje funkci zachycovače vlhkosti a nečistot v nosném plynu. Dále odstraňuje stopy kyslíku, jenž nenávratně poškozuje stacionární fázi v koloně. ^[15]

2. Nástřikový port. Je místem pro vpravení vzorku do separační kolony, a tím do plynového chromatografu. Vše se provádí ručně nebo případně speciální automatickou injekční stříkačkou. Nástřikovaný vzorek je plyn, v případě kapalných vzorků musí být teplota injektoru nastavena tak, aby došlo k okamžitému převedení vzorku do plynného skupenství. ^[12] Vnitřní část injektoru bývá zpravidla křemenná. Musí vytvořit inaktivní prostředí pro zplyněný vzorek a druhou funkcí je jeho homogenizace a úprava profilu proudění.

Samotný nástřik musí být proveden co nejrychleji a nejpresněji. V proudu nosného plynu pak vzorek putuje přes kolonu. ^[13]

3. Kolona. Na koloně dochází k vlastní separaci. V plynové chromatografii se používají zpravidla *náplňové* nebo *kapilární* kolony.

Náplňové kolony jsou trubice zhotovené z oceli nebo skla. Uvnitř je buď sorbent (silikagel, oxid hlinitý, apod.) nebo nosič na bázi křemeliny pokrytý kapalnou fází. Délka náplňových kolon se pohybuje od desítek centimetrů do několika metrů a vnitřní průměr 2-3 mm.

Kapilární kolony se vyrábějí z křemenného skla a kvůli pevnosti jsou potaženy filmem polyimidu. Průměr kolony se pohybuje v intervalu 0,1-0,6 mm a pro většinu aplikací postačuje délka kapiláry 30m. Čím menší je průměr kolony, tím vyšší účinnosti, avšak nižší kapacity lze dosáhnout. Délka se může pohybovat od desítek do stovek metrů. Rozlišujeme tři typy kapilárních kolon podle uložení mobilní fáze. Jsou to kolony WCOT, SCOT a PLOT. ^[15]

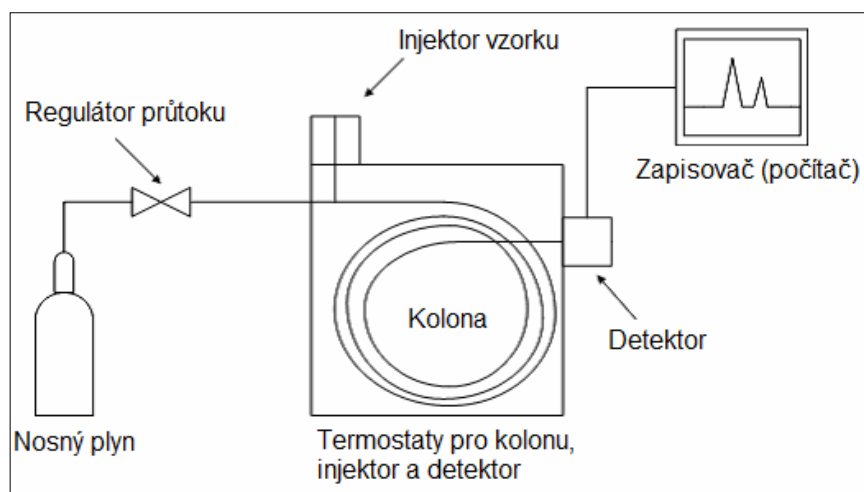
4. Termostat. Udržuje konstantní teplotu separační kolony nebo plynulé změny teploty během analýzy. ^[12]

5. Detektor. Je nedílnou konstrukční součástí měřicího zařízení. Převádí fyzikálně-chemickou vlastnost analytu na měřitelný, zpravidla elektrický signál. ^[13] V plynové chromatografii se používá více různých typů detektorů. Jednotlivé typy detektorů se liší nejen konstrukcí, ale i principem funkce, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Selektivitou detektoru se rozumí jeho schopnost reagovat jen na látky určitého typu. Mez detekce představuje nejmenší možné množství látky, které je na pozadí šumu detektoru možné detekovat. ^[12]

Detektory používané v plynové chromatografii jsou např. tepelně vodivostní detektor (TCD), plamenově fotometrický detektor (FPD) a největší skupinu detektorů tvoří detektory ionizační.

Do této skupiny patří i detektor mnou používaného chromatografu, plamenově ionizační detektor - FID. Jde o univerzální detektor s dobrou citlivostí a mezí detekce, jenž od roku 1958, kdy byl zaveden, patří k nejrozšířenějším detektorům v plynové chromatografii. Podstatou je měření změny ionizačního proudu vodíkovo-vzduchového plamene způsobené přítomností eluovaného analytu.^[13] Jeho předností je vysoká citlivost detekce a limity detekce jsou v pikogramech analytu. Je schopen detekovat širokou škálu látek s výjimkou anorganických par a plynů.^[15]

Za zmínku stojí např. ještě hmotnostní spektrometr (MS) jehož citlivost je až 1000krát menší než pro FID. Pro zajištění citlivých a selektivních měření se tedy velmi často používá spojení obou detektorů, FID-MS.^[13]



Obrázek 15 Zjednodušené schéma plynového chromatografu^[25]

5.2. UPLATNĚNÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE

Obecně lze říci, že se této metody používá k separaci plynů, většiny nedisociovaných kapalin a pevných organických molekul. Naopak nelze použít pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí.^[15] Za zmínku tedy stojí např. její uplatnění v průmyslu organických syntéz, standardně se používá k monitorování kvality ovzduší, nebo ke zjištění stopových množství pesticidů ve vodách, půdách či v potravinách. Častým postupem je také převod analytů s nevyhovujícími vlastnostmi na deriváty k analýze použitelné. Toho se využívá zejména v lékařských, biologických a biochemických oborech k analýzám lipidů, steroidů či aminokyselin v tělních tekutinách.^[17]

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1. POMŮCKY A CHEMIKÁLIE

POMŮCKY

Kádinka (500ml), skleněná tyčinka, Petriho misky, filtrační papír, korkovrt (průměr 10mm), pinzeta, nůžky, eppendorfky, skleněné vialky (60ml), septa, tři velká plata od vajec, pipety, násadce na pipety, injekční stříkačky (2,5ml), injekční jehly (0,4 x 20mm), plastové zkumavky (12ml), stojan na zkumavky.

PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

Květináče, zahradnický substrát od firmy Agro, semena *Gossypium herbaceum L.*, fytotron, plynový chromatograf Agilent Technologies 6890 N Network GC SYSTEM, kolona do GC (HP-ALIS; délka 50m; průměr 0,530mm; film 15 μ m; rozsah teplot -60–200°C), termostat (Biological Thermostat BT 120), teploměr, modré a žluté lepicí pásky proti škůdcům.

CHEMIKÁLIE

Pracovala jsem s těmito chemikáliemi:

- **DMSO** (dimethylsulfoxid; 100% a 0,1%; Sigma),
- **TDZ** (thidiazuron, pevná látka; $M_r=220,50$; Olchemim s. r. o.),
- **LGR 951** (2Cl-6(3MeOBA)(K.C.-6); pevná látka; $M_r=289,68$; vyrobeno LRR v Olomouci),
- **24-EP (epibrassinolid)**, pevná látka; $M_r=480,69$; Olchemim s. r. o.),
- **IAA (kyselina indolyl -3-octová)**, pevná látka; $M_r=179,19$; Sigma-Aldrich)
- **NAA (kyselina α -naftyloctová)**, pevná látka, $M_r=186,21$; Sigma-Aldrich)
- **ethylen** (směs dusíku s ethylenem (99 ppbvol.) v plynové bombě; pro tvorbu kalibrační křivky), **ethanol** (70%; pro oplachování nástrojů), **destilovaná voda** (na promývání terčů, pro oplachování pomůcek, ...)

6.2. ROSTLINNÝ MATERIÁL

6.2.1. PODMÍNKY PRO RŮST A PĚSTOVÁNÍ ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

Pro tento experiment byl vybrán druh bavlníku, jenž se v jižní Evropě pěstuje nejčastěji, tedy bavlník bylinný (*Gossypium herbaceum L.*). Snahou bylo zajistit prostředí a podmínky pro jeho růst ideální, a co nejbližší těm, na který je tato rostlina zvyklá. Pro sadbu jsem použila jak semena, tak zahradnický substrát, které jsou běžně k dostání v obchodě. Semena jsem sázela do plastového květináče po dvou až třech semenech. Rostlina se zalévala pravidelně vodou a v průběhu růstu nebyla ničím hnojena. Pro odběr vzorku byla připravena, jakmile měla pět pravých listů.

Bavlník vyrůstal ve fytotronu, tedy v klimatické komoře při teplotě 25°C. Vlhkost ovzduší se zde pohybovala kolem 80%, světelná perioda (světlo/tma) 16hod/8hod (zářivka Osram, Fluora 18W) a teplotě 25°C.

Pro ochranu proti napadení škůdci byly ve fytotronu vyvěšeny žluté lepové pásy. Z důvodu snížení stresu rostlin jsem bavlník neošetřovala žádnými insekticidy.

6.3. POSTUP PŘI EXPERIMENTU

6.3.1. PŘÍPRAVA RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ

První den. Z vybrané rostliny jsem pomocí korkovrtu o průměru 10mm vysekala terčíky z pravých listů a všechny je důkladně promyla v kádinkách s destilovanou vodou (cca 500ml) po dobu jedné až dvou hodin (viz foto 5 – 10).

Následovala příprava jednotlivých zásobních roztoků. Jednotlivé látky jsem nejdříve navážila na analytických vahách a rozpustila ve 100% DMSO (dimethylsulfoxid) popř. ethanolu v případě 24-EP, NAA a IAA. Zásobní roztoky látek jsem připravila v koncentraci 50mM NAA, 10mM TDZ, LGR 951 a IAA, a 5mM epibrassinolid.

Potřebné množství DMSO jsem vypočítala podle vzorce:

$$V(DMSO) = \frac{m(\text{růst.regulátor})}{c(\text{roztoku}) \cdot M(\text{růst.regulátor})}$$

Pro názornost uvádím konkrétní příklad výpočtu pro látku LGR 951.

např. Navážila jsem 2,3mg látky LGR 951, jež má molární hmotnost $M = 289,68 \text{ mg} \cdot \text{mmol}^{-1}$. Cílem bylo připravit 10mM roztok.

Výpočet pro tuto koncentraci je následující:

$$V(\text{DMSO}) = \frac{2,3 \text{ mg}}{0,01 \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} \cdot 289,68 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}} = 0,794 \text{ ml} = 794 \mu\text{l}$$

Pro přípravu 10mM roztoku LGR 951 bylo třeba k naváženému množství 2,3mg této látky přidat 0,794 ml = 794 μl 100% DMSO.

Každý zásobní roztok příslušné látky jsem důkladně nechala rozpustit a protřepat na vortexu (viz foto 7). Následovalo ředění každého zásobního roztoku na požadovanou koncentraci. Výpočet k získání 100 μM roztoku LGR 951 z původního 10mM zásobního roztoku o objemu 4 ml je uveden níže. Zásobní roztok jsem ředila puřem MeS o pH 6,1 (viz foto 8).

Vzorec pro ředění:

$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$; kde c_1 – koncentrace zásobního roztoku,
 V_1 – objem ze zásobního roztoku použitý na přípravu 100 μM roztoku
 c_2 – koncentrace požadovaného roztoku,
 V_2 – celkový objem roztoku

$$\underline{c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2}$$

$$10\text{mM} \cdot V_1 = 100\mu\text{M} \cdot 4000\mu\text{l}$$

$$10000\mu\text{M} \cdot V_1 = 400\,000$$

$$V_1 = \underline{40\mu\text{l}}$$

Na přípravu 100 μM roztoku LGR 951 z 10mM zásobního roztoku jsem použila 40 μl 10mM zásobního roztoku a zbývající část do 4ml, tedy 3,960ml jsem doplnila puřem MeS. (viz foto 8).

Podle stejného schématu jsem připravila všechny zvolené koncentrace u ostatních látek. Pak jsem označila Petriho misky, kde byly pro každou měřenou látku v dané koncentraci vymezeny tři jamky, tedy tři opakování. Do misky byl vložen filtrační papír a teprve na něj se aplikoval připravený a promíchaný roztok příslušné koncentrace o objemu 1 ml (viz foto 9).

6.3.2. PŘÍPRAVA VZORKU

Do označených Petriho misek s 1ml růstového regulátoru o dané koncentraci jsem postupně vložila osm osušených terčků bavlníku o průměru 10mm. Po naskládání všech terčků tak, aby se vzájemně nepřekrývaly jsem Petriho misky uzavřela víky s popiskem a vše jsem umístila do termostatu (tma; 24,8 °C) na 16 hodin. (viz foto 10-13)

Druhý den. Po 16 hodinách jsem terčiky z misek přemístila do nachystaných vialek (60ml). Všechny osm terčků z jedné jamky tak bylo naskládáno na proužek filtračního papíru na umělé hmotě, pro větší stabilitu. Každá vialka se poté pomocí septa a víčka řádně utěsnila a označila. Jako pomůcka pro dobrou manipulaci mi posloužila plata od vajec, kam jsem všechny vialky naskládala a po dobu 24 hodin nechala inkubovat v termostatu. (viz foto 14-16)

Třetí den. Měření jsem prováděla po 24 hodinách inkubace, kdy byly vialky připraveny k měření ethylenu.

6.3.3. MĚŘENÍ

Před spuštěním samotného přístroje je nejdříve zapotřebí pustit nosné plyny, tedy helium, dusík, vodík a vzduch. Poté se zapne přístroj a k němu připojený počítač s programem, pomocí něhož jsem množství ethylenu vyhodnocovala (viz foto 17-19).

Na PC jsem v příslušném programu nastavila metodu pro měření ethylenu a po vyhřátí kolony byl plynový chromatograf ponechán cca 10min pro vytemperování a ustálení teploty a tlaku.

Vzorky ethylenu jsem odebírala z injekčních stříkaček o objemu 2,5 ml (velikost jehly 0,4 x 20mm). Při odběru vzorku jsem postupovala následovně. Nejprve jsem stříkačkou 2x pomalu nabrala plyn a vrátila jej zpět do vialky. Napotřetí jsem odebrala objem 1,5 ml. Tento objem jsem bezprostředně před samotným měřením snížila na 1ml, a poté aplikovala. Po aplikaci jsem rychle na přístroji zmáčkla tlačítko start a po 2,5 minutách byl výsledek zaznamenán a uložen (viz foto 20-24).

Všechny zaznamenané hodnoty jsem sepsala do tabulky a následně převedla v programu Microsoft Office Excel do grafu. Pro každý z růstových regulátorů v dané koncentraci jsem tedy naměřila tři hodnoty ze tří opakování, z nichž se vypočetl aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Celé měření se pro kontrolu znovu opakovalo v témže týdnu.

6.4. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

6.4.1. KALIBRAČNÍ KŘIVKA

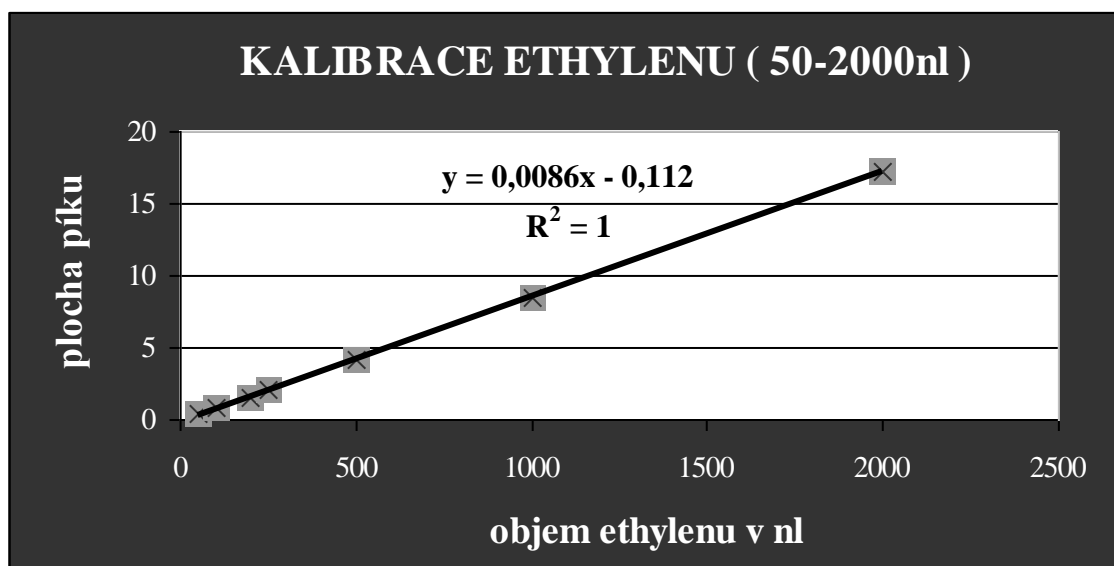
Naměřené hodnoty (plochy píku) ethylenu bylo následně potřeba přepočíst. K tomu všemu posloužilo sestrojení kalibrační křivky opět v programu Microsoft Office Excel. Kalibrační křivka byla sestrojena dle naměřených hodnot čistého ethylenu odebraného z plynové bomby.

Nejprve se čistý ethylen nastříkl do ředících vaků Tedlarů (dusík) a poté se známé koncentrace ethylenu aplikovaly k měření do GC. Z těchto hodnot byla sestavena tabulka a následně i graf s kalibrační křivkou (viz graf 1).

Množství ethylenu v nlEt/ l vzduchu bylo stanoveno přepočtem plochy z kalibrační křivky.

Nástřik (nl)	Plocha píku
50	0,357469
100	0,766248
200	1,5542
250	2,08888
500	4,19782
1000	8,48532
2000	17,1935

Tabulka 2 Nástřiky různých koncentrací ethylenu



Graf 1 Kalibrační křivka ethylenu

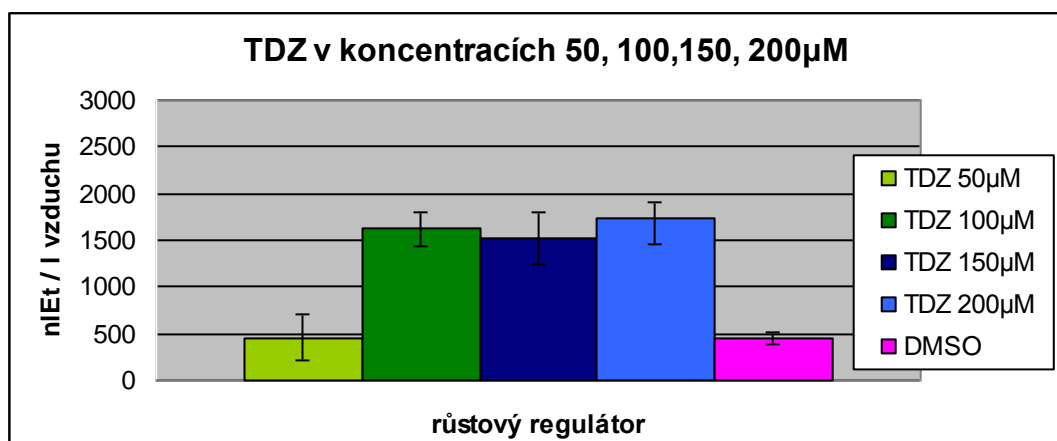
6.5. VÝSLEDKY

Celkem jsem měřila 5 látek v různých koncentracích a vzájemných kombinacích. Tyto látky jsou sepsány v níže uvedené tabulce.

RŮSTOVÝ REGULÁTOR	M_r
TDZ	220,25
LGR-951	289,68
IAA	179,19
NAA	186,21
24-EP	480,69

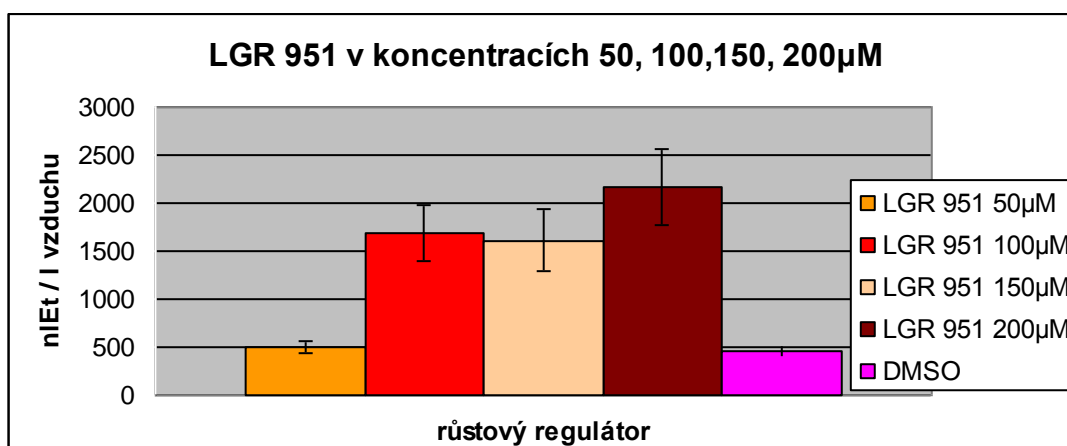
Tabulka 3 Přehled měřených růstových regulátorů

Následuje souhrn všech měřených látek a jejich kombinací, přehledně vyobrazených do grafů.



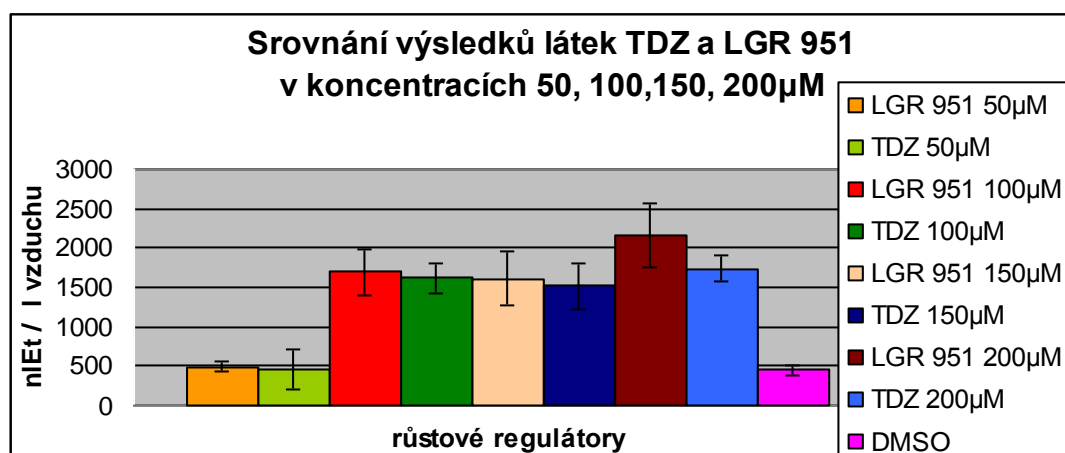
Graf 2 Látka TDZ v koncentracích 50, 100, 150 a 200µM

V grafu č. 2 jsou vzestupně seřazeny všechny měřené koncentrace látky TDZ včetně kontrolního měření s rozpouštědlem DMSO. Látka thidiazuron (TDZ) se běžně používá v praxi jako defoliant a z grafu je patrné, že ve vyšších koncentracích (100, 150, 200µM) způsobuje zvýšenou tvorbu ethylenu a s touto spojený opad listů. Z grafu je patrné, že nejvyšší hodnota ethylenu byla dosažena u koncentrace TDZ 200µM. Významně se však liší pouze od koncentrace 50µM, srovnatelné s naměřenou hodnotou rozpouštědla.



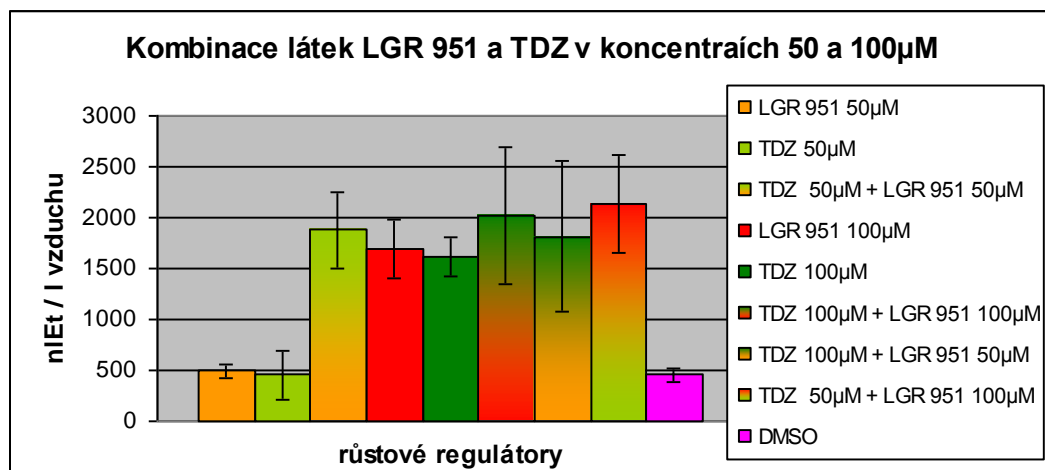
Graf 3 Látka LGR 951 v koncentracích 50, 100, 150 a 200µM

V grafu č. 3 jsou vzestupně seřazeny všechny měřené koncentrace látky LGR 951 včetně kontrolního měření s rozpouštědlem DMSO. Látka LGR 951 produkovala obdobně vysoké hodnoty, srovnatelné s hodnotami látky TDZ ve všech čtyřech měřených koncentracích. Opět je patrná zvýšená produkce ethylenu při vyšších koncentracích LGR 951 (100, 150, 200µM). Množství naměřeného ethylenu u 200µM koncentrace je významně zvýšené oproti 50µM koncentraci (až 4x). Rozdíl mezi zbylými dvěma hodnotami však také není zanedbatelný. LGR 951 v koncentracích 100 a 150µM vyprodukovalo o necelých 22% ethylenu méně než LGR 951 200µM.



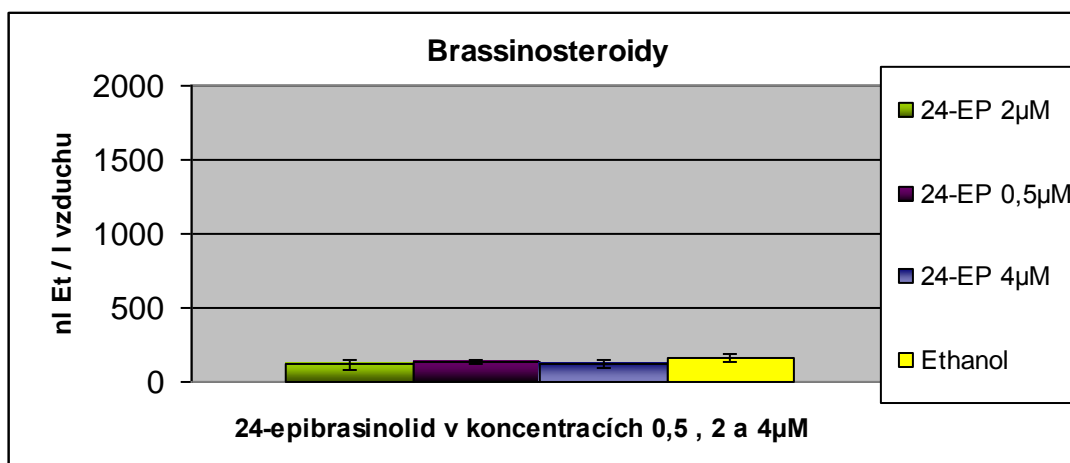
Graf 4 Srovnání výsledků látek LGR 951 a TDZ v koncentracích 50, 100, 150 a 200µM

V grafu č. 4 jsou přehledně vyobrazeny všechny výsledky látek LGR 951 a TDZ řazené dle rostoucí koncentrace včetně kontrolního měření. Z grafu je patrné, že látka LGR 951 v koncentraci 200µM má vyšší vliv na produkci ethylenu terčiky bavlníku, než látka TDZ ve stejné koncentraci, která se používá k defoliaci v praxi.



Graf 5 Kombinace látek LGR 951 a TDZ v koncentracích 50 a 100 μ M

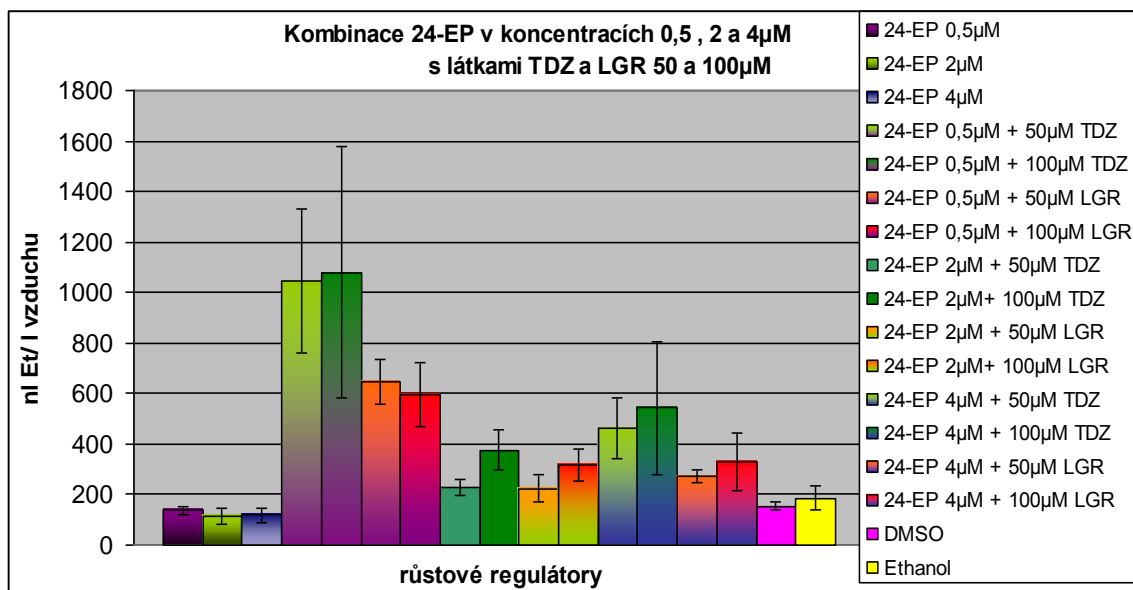
V grafu č. 5 je uveden přehled vzájemných kombinací látek LGR 951 a TDZ v koncentracích 50 a 100 μ M. Stručným shrnutím mohu konstatovat, že všechny čtyři možné kombinace těchto dvou látek předčily svými hodnotami hodnoty látek samostatných. Za zmínku určitě stojí kombinace 50 μ M TDZ a 50 μ M LGR, která se takřka ztrojnásobila oproti produkci ethylenu samostatnými látkami v těchto koncentracích. Při porovnání dvojkombinací 100 μ M TDZ a 50 μ M LGR 951 a naopak, je z grafu patrné, že je hodnota produkce ethylenu vždy vyšší než, hodnota TDZ nebo LGR 951 v koncentraci 100 μ M.



Graf 6 Brassinosteroidy

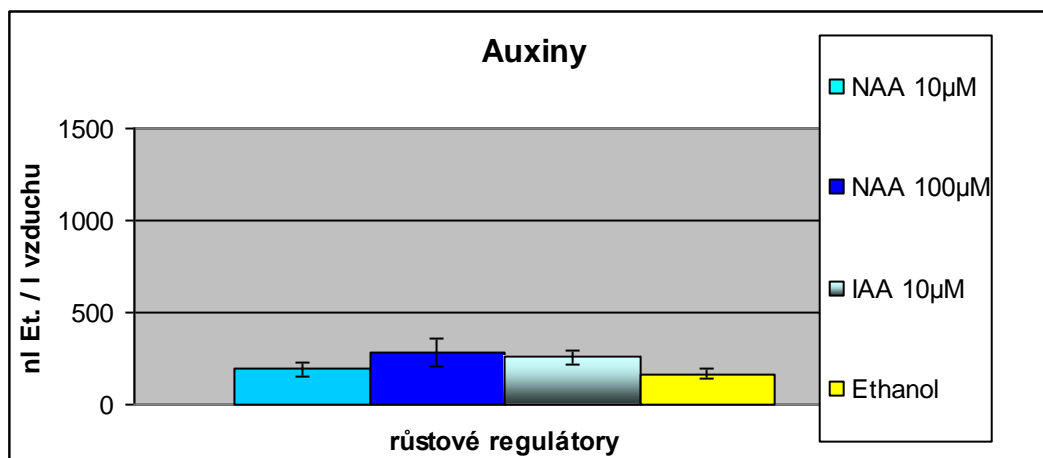
V Grafu č. 6, znázorňujícím 3 měřené koncentrace epibrassinolidu (24-EP) jsou hodnoty o poznání nižší než v grafech předešlých. Dá se říci, že jsou doslova srovnatelné s hodnotami rozpouštědla, jímž je v tomto případě ethanol. Dle studie, kde se testovalo množství vyprodukovaného ethylenu na listech *Arabidopsis thaliana* vlivem samostatného 24-EP byly

hodnoty zanedbatelné, což se shoduje i s mým měřením na terčících listů bavlníku (*Gossypium herbaceum L.*).^[20]



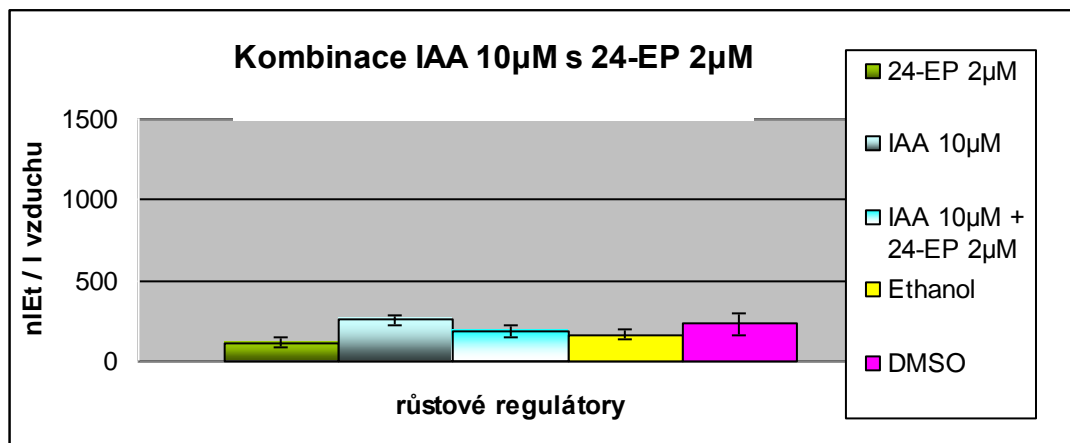
Graf 7 Kombinace 24-EP v koncentracích 0,5, 2 a 4µM s látkami TDZ a LGR 951 50 a 100µM.

Graf č. 7 přehledně zobrazuje všechny naměřené kombinace 24-EP v koncentraci 0,5µM, 2µM a 4µM s látkami TDZ a LGR 951 v koncentracích 50 a 100µM. Z grafu je patrné, že látka 24-EP obecně produkuje ethylen v minimálních množstvích. Hodnota 0,5µM je ze tří koncentrací samotného 24-EP nejvyšší. Co se týče hodnot její kombinace s TDZ a LGR 951, naprosto převyšují všechny ostatní hodnoty. Rozdíl hodnot kombinovaného 2 a 4µM 24-EP s TDZ a LGR 951 je markantní.



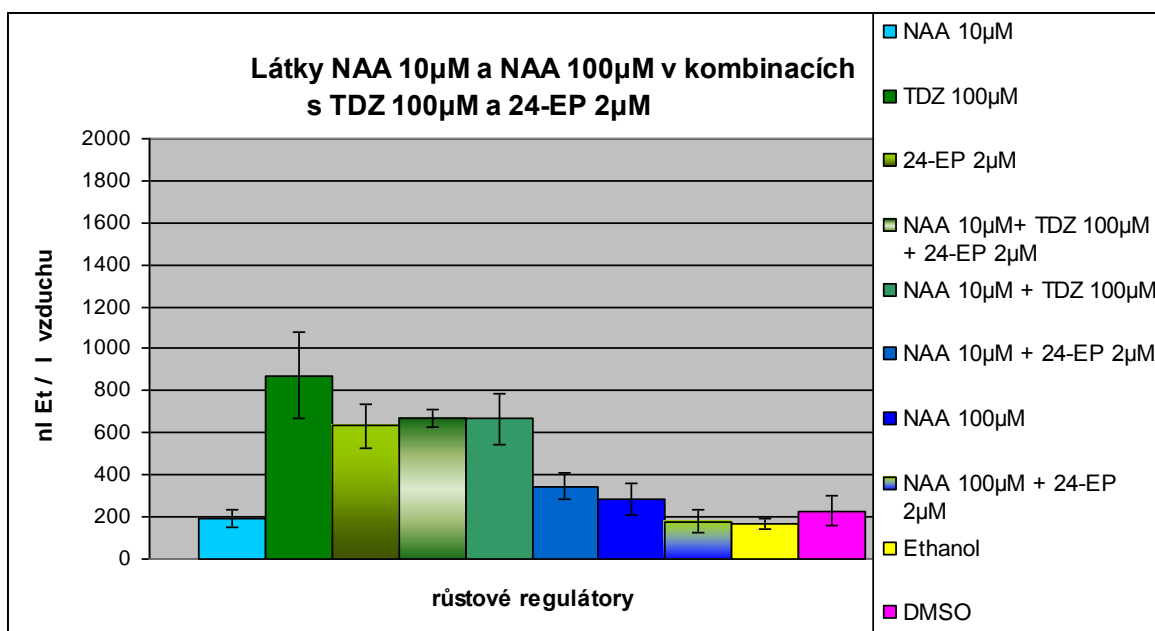
Graf 8 Auxiny

Graf č. 8 zahrnuje výsledky měření látek patřících do skupiny auxinů, NAA a IAA. Rozpouštědlem je ethanol. Dle studie na listech *Arabidopsis thaliana* látka NAA 10 μ M a 100 μ M vykazovala výrazně vyšší hodnoty vyprodukovaného ethylenu než IAA ve stejných koncentracích. Mnou provedené měření na *Gossypium herbaceum L.* však tento fakt nepotvrzuje.^[20]



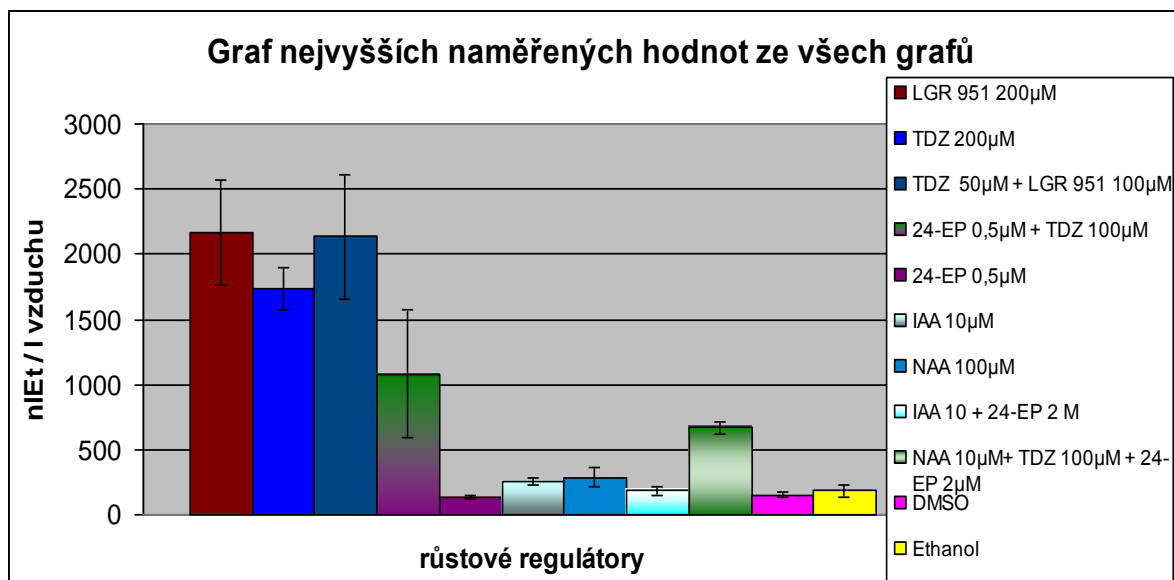
Graf 9 Kombinace IAA 10 μ M s 24-EP

Výsledky grafu č. 9, kde se kombinuje látka IAA s 24-EP nejsou vzhledem k výsledkům předešlého grafu až tak překvapivé. Z grafu vyplývá, že IAA v koncentraci 10 μ M převyšuje jak 24-EP, tak i vzájemnou kombinaci těchto látek, a to cca o 30%. Tento údaj se neshoduje s výsledky testovanými na rostlině *Arabidopsis thaliana*, kde se testovala produkce ethylenu na různých částech rostliny, tedy i na listech.^[20] V případě této studie kombinace IAA s 24-EP (v téže koncentraci) vykazovala velký vzestup produkce ethylenu oproti oběma látkám samostatně. To se však u bavlníku nepotvrdilo.



Graf 10 Kombinace NAA 10 μ M a 100 μ M s TDZ 100 μ M a 24-EP 2 μ M

V grafu č.10 dominují hodnoty ethylenu vlivem látky TDZ 100 μ M, která se běžně používá v praxi. Všechny kombinace s touto látkou pak dosahují poměrně vysokých hodnot. Poloviční už jsou ale hodnoty, kde TDZ nefiguruje. Například naměřená hodnota kombinace NAA 100 μ M s 24-EP 2 μ M je naprosto srovnatelná s hodnotami rozpouštědel.



Graf 11 Graf nejvyšších naměřených hodnot ze všech grafů

Tento graf přehledně uvádí souhrn těch nejvyšších hodnot ze všech grafů. Nejvyšší hodnoty patří látkám LGR 951 200 μ M, kombinace 50 μ M TDZ a 100 μ M LGR 951 a TDZ 200 μ M. Všechny ostatní látky v produkci ethylenu výrazně zaostávají. Naměřená hodnota kombinace 0,5 μ M 24-EP se 100 μ M TDZ patří ještě mezi ty vyšší, a nabízí se zde otázka, proč je tato hodnota oproti hodnotě samotného TDZ tak snižená.

7. DISKUSE

Hlavní úkol a zároveň přínos mojí práce spočívá v měření vlivu růstových regulátorů na produkci ethylenu různými látkami a jejich kombinacemi, který způsobuje defoliaci. Použila jsem stejnou metodu, kterou již přede mnou aplikovala studentka Renata Pařenicová na testování cytokininů metodou terčíkových segmentů listů bavlníku.^[19] Jejich následná produkce ethylenu byla měřena na plynovém chromatografu. Metodika je podrobně uvedena v tomto článku, z něhož jsem rovněž vycházela, co se týče přípravy materiálů a vzorků.^[21]

Tabulka č. 2 (viz str. 32) přehledně shrnuje všechny měřené látky. Co se týče měření látek TDZ a LGR 951, dá se obecně shrnout, že obě dvě látky mají ve vyšších koncentracích naprosto nejvyšší schopnost produkce ethylenu. Pro látku TDZ je však hodnota této koncentrace v podstatě srovnatelná s hodnotami 100 μ M roztoku. Souhrnné výsledky měření těchto dvou látek je možné vyčíst z grafu č. 4.

Hodnota LGR 951 200 μ M všechny ostatní hodnoty převyšuje (viz. graf č. 4) a od ostatních hodnot se liší o 20%–30%, v případě 50 μ M koncentrací skoro o 80%.

Kombinace TDZ s LGR 951 dosahují rovněž vysokých hodnot ethylenu (viz graf č. 5). Na první je patrné, že všechna tato kombinovaná měření dosahují vyšších hodnot než hodnoty látek samostatných. Zejména pak kombinace 50 μ M TDZ a 50 μ M LGR, která se takřka ztrojnásobila oproti produkci ethylenu samostatnými látkami. Z toho se dá usoudit, že se v tomto případě může jednat o vzájemné spolu působení těchto dvou hormonů, která má za následek tak vysokou odezvu. I přesto, že ostatní dvojkombinace vždy převyšují samostatné látky, vzhledem k vysokým směrodatným odchylkám můžu spíše konstatovat, že jsou hodnoty kombinací srovnatelné nebo se liší jen nepatrně od samostatných látek.

Samotný graf brassinosteroidů, konkrétně látky 24-EP měřené ve třech kombinacích, je z hlediska vyprodukovaného ethylenu opakem předešlých grafů. Odezvy jsou v podstatě srovnatelné s odezvami rozpouštědla, 96% ethanolu. Tyto nízké hodnoty se však shodují s měřeními na listech huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) podle studie z roku 2008 (Arteca and Arteca, 2008).^[20]

Kombinace 24-EP ve všech třech koncentracích, tedy 0,5; 2 a 4 μ M s látkami cytokininové povahy (TDZ a LGR 951) v koncentracích 50 a 100 μ M se výrazně zvýšily oproti hodnotám samotného 24-EP. Otázkou však je, zda by 24-EP samotný nebo kombinovaný např. s TDZ vzhledem k ceně TDZ, byl vhodný pro defoliaci v praxi, tak jako je tomu v případě samotného TDZ. Graf hodnot, kde by figuroval TDZ zároveň s kombinovaným TDZ s 24-EP není k porovnání

k dispozici. Stále se tedy nabízí otázka, zda látka 24-EP v kombinaci s TDZ dokáže ve srovnání s hodnotami samotného TDZ bilanci ethylenu vylepšit, nebo ji inhibuje.

Auxiny rovněž působí mj. jako defolianty, avšak hodnoty vyprodukovaného ethylenu terčíky bavlníku v případě NAA a IAA, zastupujících tuto skupinu, nebyly příliš vysoké. Ve srovnání se studií na listech *Arabidopsis thaliana* [20] látka NAA 10 μ M a 100 μ M produkovala výrazně vyšší hodnoty ethylenu než IAA ve stejných koncentracích. Mnou provedené měření na *Gossypium herbaceum* L. však tento fakt nepotvrzuje.

Co se týče kombinace látky IAA 10 μ M a 24-EP 2 μ M, dle výše zmíněného článku [20], produkce ethylenu po aplikaci na listy rostliny *Arabidopsis thaliana* výrazně stoupla oproti produkci, kterou vykazují tyto látky samostatně. U bavlníku tak velká odezva nenastala, jak je z grafu č. 9 patrné. Dá se tedy uvažovat, že každý druh rostlin může mít svoji specifickou odpověď na různé druhy růstových regulátorů.

Látka NAA v kombinaci s TDZ dosáhla poměrně vysokých hodnot ethylenu oproti měření látky samostatně. To se však nedá říci o kombinaci NAA a 24-EP. Tyto hodnoty už byly v podstatě poloviční nebo srovnatelné s rozpouštědlem. Když poměrně vysokou hodnotu TDZ 100 μ M porovnáme s její kombinací s NAA 100 μ M či trojkombinací s 2 μ M 24-EP. Jsou všechny hodnoty stále nižší než samotné měření TDZ 100 μ M. Zde se opět podobně jako v předešlém případě (kombinace 0,5 μ M s 24-EP s TDZ 100 μ M; viz graf č. 7) dá uvažovat o inhibičním účinku 24-EP na vysokou produktivitu ethylenu látky TDZ.

V posledním grafu č. 11 je souhrn nejvyšších naměřených hodnot z veškerých uvedených grafů. Nejvyššími producenty ethylenu jsou tedy látky LGR 951 200 μ M, kombinace 50 μ M TDZ a 100 μ M LGR 951 a TDZ 200 μ M. Dále následuje kombinace 0,5 μ M 24-EP a 100 μ M TDZ, poté jediná měřená trojkombinace kde kromě předešlých dvou látek figuruje ještě 10 μ M NAA a nakonec 100 μ M NAA, 10 μ M IAA, kombinace 10 μ M IAA s 24-EP a 0,5 μ M 24-EP (viz graf č.11).

8. ZÁVĚR

Moje bakalářská práce se zaměřuje na testování produkce ethylenu u vybraných látek a jejich kombinací. K testování bavlníku (*Gossypium herbaceum L.*) byly použity rostliny s pěti pravými listy. Všechny naměřené hodnoty látek samostatných i kombinovaných jsem porovnávala s výsledky měření, které bylo popsáno v článku Arteca RN, Arteca JM.: Effects of brassinosteroid, auxin and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* 11, 2008. na rostlině *Arabidopsis thaliana*. Produkce ethylenu byla stanovena na plynovém chromatografu Agilent Technologies 6890 N Network GC SYSTEM.

Měřila jsem zástupce růstových regulátorů ze skupin auxinů, cytokininů, brassinosteroidů a jejich kombinace. Z naměřených výsledků lze konstatovat, že nejvyšších výsledků dosahovaly látky cytokininové povahy, tedy látky TDZ a LGR 951 v koncentracích 100 a 200 μM . Produkce ethylenu u auxinů a brassinosteroidů nedosahovaly zdaleka tak vysokých hodnot jako TDZ a LGR 951. Výsledný zvýšený efekt produkce ethylenu, kterým působily látky NAA 10 μM a 100 μM na rostlinu *Arabidopsis thaliana* se však na mnou testovaném bavlníku nepotvrdil. Stejně tak se na rostlince bavlníku nepotvrdily ani vysoké hodnoty ethylenu produkované kombinací látek IAA 10 μM a 24-EP 2 μM jako u *Arabidopsis thaliana*. Samostatně působící 24-EP se však u obou rostlin choval podobně, tedy produkce ethylenu byla nízká a srovnatelná s hodnotami ethylenu vyprodukovaného rozpouštědlem.

9. PŘÍLOHA

Foto 1 Semena *Gossypium herbaceum* L.



Foto 2 Sadba semen bavlníku



Foto 3 Rostlinky bavlníku ve fytotronu



Foto 4 Příprava terčků bavlníku



Foto 5 Máčení terčků v destilované vodě



Foto 6 Filtrace a vysušení terčků



Foto 7 Promíchávání zásobního roztoku



Foto 8 Pufr MeS s pH 6,1; 96% ethanol, DMSO

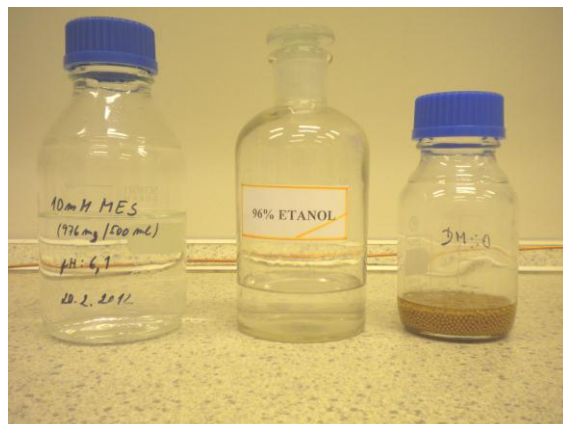


Foto 9 Příprava jamek se zásobním roztokem I

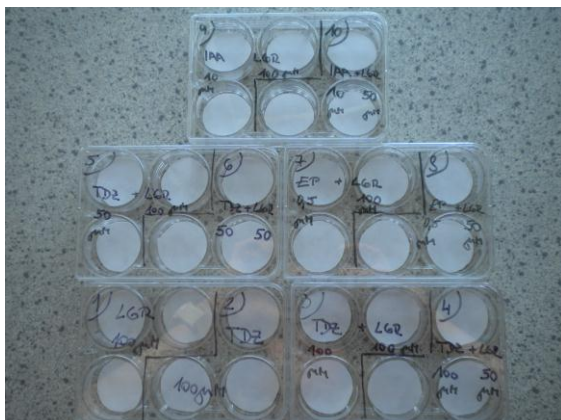


Foto 10 Příprava jamek se zásobním roztokem II



Foto 11 Vkládání terčičků do jamek



Foto 12 Terčičky připravené k inkubaci



Foto 13 Termostat – inkubace terčků v roztocích



Foto 14 Nachystané vialky pro terčky



Foto 15 Vialky s terčky připravené k inkubaci



Foto 16 Inkubace terčků v termostatu



Foto 17 Spouštění nosných plynů -helium^[19]



Foto 18 Spouštění nosných plynů - dusík^[19]



Foto 19 Spouštění nosných plynů – vzduch a H₂^[19]



Foto 20 Odběr vzorku I^[19]



Foto 21 Odběr vzorku II^[19]



Foto 22 Nástřik vzorku^[19]



Foto 23 PC s vyhodnocovacím programem

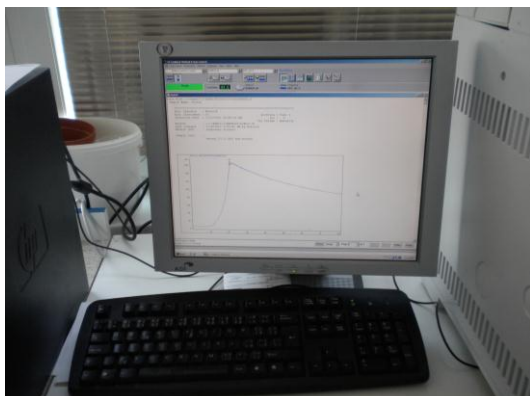


Foto 24 Plynový chromatograf



10. SEZNAM ZKRATEK

951	2-Cl-6(3MeOBA)(K.C.-6)
ABA	kyselina abscisová,
BAP	6-benzylaminopurin
DMSO	dimethylsulfoxid
24-EP	epibrassinolid
ERS	Economic Research Service
GA2	giberelin A2
GA3	kyselina giberelová, giberelin A3
GC	plynová chromatografie, plynový chromatograf
IAA	kyselina indol-3-octová (auxin)
IBA	kyselina indol-3-máselná
IPA	N ⁶ -(β ² -isopentenylamino)-purin
JA	kyselina jasmonová
KIN	kinetin, 6-furfurylaminopurin
LRR	laboratoř růstových regulátorů
MeS	methylysulfoxid
NAA	kyselina α-naftyloctová
PAA	kyselina fenylloctová
PLOT	(Porous Layer Open Tubular) – typ kapilárních kolon s tenkou vrstvou pórovitého materiálu na vnitřní stěně.
SCOT	(Support Coated Open Tubular) – typ kapilárních kolon, u nichž je nanášena na vnitřní stěně vrstva nosiče se zakotvenou kapalinou
TDZ	thidiazuron
WCOT	(Wall Coated Open Tubular) – typ kapilárních kolon, kde je na vnitřní straně kapiláry zakotvena stacionární kapalná fáze

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1	KYSELINA INDOLYL-3-OCTOVÁ IAA (26)	12
OBRÁZEK 2	KYSELINA NAFTYLOCTOVÁ NAA (27)	12
OBRÁZEK 3	KINETIN (6-FURFURYLAMINOPURIN) (7)	14
OBRÁZEK 4	6 - BENZYLAMINOPURIN (BAP) (7)	14
OBRÁZEK 5	ZEATIN (Z) (7)	15
OBRÁZEK 6	GIBERELIN A ₃ (GA ₃) (7)	16
OBRÁZEK 7	KYSELINA ABSCISOVÁ (ABA) (7)	17
OBRÁZEK 8	ETYLEN (ETEN) (7)	18
OBRÁZEK 9	BRASSINOLID (7)	19
OBRÁZEK 10	KYSELINA JASMONOVÁ (JA) (7)	20
OBRÁZEK 11	KUMARIN (7)	21
OBRÁZEK 12	SBĚR BAVLNY NA JIHU USA NA POČÁTKU 20. STOLETÍ (22)	22
OBRÁZEK 13	BAVLNÍK BYLINNÝ <i>GOSSYPIUM HERBACEUM L.</i> (23)	23
OBRÁZEK 14	KVĚT <i>GOSSYPIUM HERBACEUM L.</i> (24)	23
OBRÁZEK 15	ZJEDNODUŠENÉ SCHÉMA PLYNOVÉHO CHROMATOGRAFU (25)	33

12. SEZNAM FOTOGRAFIÍ

FOTO 1	SEMENA <i>GOSSYPIUM HERBACEUM L.</i>	41
FOTO 2	SADBA SEMEN BAVLNÍKU	41
FOTO 3	ROSTLINKY BAVLNÍKU VE FYTOTRONU	41
FOTO 4	PŘÍPRAVA TERČÍKŮ BAVLNÍKU	41
FOTO 5	MÁČENÍ TERČÍKŮ V DESTILOVANÉ VODĚ	41
FOTO 6	FILTRACE A VYSUŠENÍ TERČÍKŮ	41
FOTO 7	PROMÍCHÁVÁNÍ ZÁSOBNÍHO ROZTOKU	42
FOTO 8	PUFR MES S PH 6,1; 96% ETHANOL, DMSO	42
FOTO 9	PŘÍPRAVA JAMEK SE ZÁSOBNÍM ROZTOKEM I	42
FOTO 10	PŘÍPRAVA JAMEK SE ZÁSOBNÍM ROZTOKEM II	42
FOTO 11	VKLÁDÁNÍ TERČÍKŮ DO JAMEK	42
FOTO 12	TERČÍKY PŘIPRAVENÉ K INKUBACI	42
FOTO 13	TERMOSTAT – INKUBACE TERČÍKŮ V ROZTOCÍCH	43
FOTO 14	NACHYSTANÉ VIALKY PRO TERČÍKY	43
FOTO 15	VIALKY S TERČÍKY PŘIPRAVENÉ K INKUBACI	43
FOTO 16	INKUBACE TERČÍKŮ V TERMOSTATU	43
FOTO 17	SPOUŠTĚNÍ NOSNÝCH PLYNŮ -HELIUM (19)	43
FOTO 18	SPOUŠTĚNÍ NOSNÝCH PLYNŮ - DUSÍK (19)	43
FOTO 19	SPOUŠTĚNÍ NOSNÝCH PLYNŮ – VZDUCH A H ₂ (19)	44
FOTO 20	ODBĚR VZORKU I (19)	44
FOTO 21	ODBĚR VZORKU II (19)	44
FOTO 22	NÁSTRÍK VZORKU (19)	44
FOTO 23	PC S VYHODNOCOVAČÍM PROGRAMEM	44
FOTO 24	PLYNOVÝ CHROMATOGRAF	44

13. SEZNAM TABULEK

TABULKA 1 TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ BAVLNÍKU (18)	22
TABULKA 2 NÁSTŘIKY RŮZNÝCH KONCENTRACÍ ETYLENU	31
TABULKA 3 PŘEHLED MĚŘENÝCH RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ	32

14. SEZNAM GRAFŮ

GRAF 1 KALIBRAČNÍ KŘIVKA ETYLENU I	32
GRAF 2 LÁTKA TDZ V KONCENTRACÍCH 50, 100, 150 A 200 μ M	32
GRAF 3 LÁTKA LGR 951 V KONCENTRACÍCH 50, 100, 150 A 200 μ M	33
GRAF 4 SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ L. LGR 951 A TDZ V KONCENTRACÍCH 50, 100, 150 A 200 μ M	33
GRAF 5 KOMBINACE LÁTEK LGR 951 A TDZ V KONCENTRACÍCH 50 A 100 μ M	34
GRAF 6 BRASSINOSTEROIDY	34
GRAF 7 KOMBINACE 24-EP 0,5; 2 A 4 μ M S TDZ A LGR 951 50, 100, 150 A 200 μ M	35
GRAF 8 AUXINY	35
GRAF 9 KOMBINACE IAA 10 μ M S 24- EP	36
GRAF 10 LÁTKY NAA 10 μ M A 100 μ M S TDZ 100 μ M A 24-EP 2 μ M	36
GRAF 11 GRAF NEJVYŠŠÍCH NAMĚŘENÝCH HODNOT ZE VŠECH GRAFŮ	37

15. INTERNETOVÉ ZDROJE OBRÁZKŮ

22. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:CottonNegrosSouth.jpg>

23. <http://botanika.wendys.cz/cizi/rostlina.php?358>

24. [http://fotka.atlasrostlin.cz/bavlnik-bylinny/fotky-pridane-uzivateli-8153 květ](http://fotka.atlasrostlin.cz/bavlnik-bylinny/fotky-pridane-uzivateli-8153_květ)

25. http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf

26. http://en.wikipedia.org/wiki/Indole-3-acetic_acid

27. http://en.wikipedia.org/wiki/1-Naphthaleneacetic_acid

16. BIBLIOGRAFIE

1. **URL:** <http://www.sedmagenerace.cz/text/detail/247> (adresa platná k 15.5.2012)
2. **URL:** <http://ihned.cz/download/rocenka2006.pdf> (adresa platná k 15.5.2012)
3. **URL:** <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/cotton-wool.aspx> (adresa platná k 15.5.2012)
4. **URL:** <http://www.ers.usda.gov/media/852360/cws12e.pdf> (adresa platná k 10.5.2012)
5. **PAVLOVÁ L.:** Fyziologie rostlin. Praha: Karolinum, 2005.
6. **KOVÁČ J.:** Kapitoly z rostlinné fyziologie. Ústí nad Labem: Pedagogická fakulta v Ústí nad Labem, 1991.
7. **PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J.:** *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia Praha, 2003.
8. **LUŠTINEC J., ŽDÁRSKÝ V.** Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Praha : Karolinum, 2005.
9. **URL:** http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_02_93-99.pdf (adresa platná k 12.6.2012)
10. **VÁŠA F. a kol.:** Přádné rostliny. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1965.
11. **POLÍVKA F.:** Užitkové a pamětihodné rostliny cizích zemí. Praha : VOLVOX GLOBATOR., 1996.
12. **URL:** http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc (adresa platná k 15.6.2012)
13. **ŠTULÍK K. a kol.** *Analytické separační metody*. Praha : Karolinum, 2004.
14. **URL:** http://chemie.ocikvideni.cz/ZS/11_chromatografie.pdf (adresa platná k 13.7.2012)
15. **Klouda P.:** Moderní analytické metody. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda. 2003.
16. **URL:** <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/cotton-wool.aspx> (adresa platná k 20.7.2012)
17. **URL:** http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separb.htm (adresa platná k 20.7.2012)
18. Plants Profile for Gossypium. *Plants Profile*. [Online]
URL: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=GOSSY>. (adresa platná k 20.7.2012)
19. **PAŘENICOVÁ R.** 2010. Testování vlivu cytokininů na tvorbu ethylen u bavlníku (*Gossypium herbaceum L.*)
20. **Arteca RN, Arteca JM.:** Effects of brassinosteroid, auxin and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* 11, 2008.

21. **GROSSMANN K.:** Induction of Leaf Abscission in Cotton Is a Common Effect of Urea- and Adenine-Type Cytokinins. 1990.

URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/95/1/234.pdf>. (*adresa platná k 12.6.2012*)