

# Cvičení z fyziologie rostlin



## 9. Fytohormony

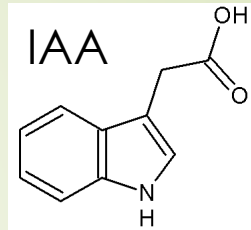
# Fytohormony

- ▶ Obecněji „růstové regulátory“ (= včetně syntetických látek)
- ▶ Organické molekuly (zejména endogenního původu) – syntéza v určité části rostliny, transport do jiné části, fyziologický účinek v nízkých koncentracích
- ▶ Regulace růstu a vývoje rostliny, udržování celistvosti rostliny
  - ▶ udržování správných vztahů na úrovních buňka – pletivo – orgán, zprostředkování komunikace, přenos informace o změně jedné části rostliny do ostatních částí, korelace růstu (vztahy mezi orgány související s růstem), podpora regenerace při porušení celistvosti.
  - ▶ Působení stimulační i inhibiční
- ▶ Skupiny růstových regulátorů
  - ▶ **Auxiny**
  - ▶ **Cytokininy**
  - ▶ **Gibereliny**
  - ▶ **Etylen**
  - ▶ **Kyselina abscisová**
  - ▶ Kys. jasmonová,
  - ▶ Brasinosteroidy
  - ▶ Polyaminy, oligosacharidy, oligopeptidy.....

# Účinky fytohormonů

## ► Auxiny:

- Syntéza ve vzrostném vrcholu a mladých listech, transport bazipetální do starších částí rostliny
  - Přírodní: kys. indolyl-3-octová (IAA), kys. indolyl-máselná (IBA), kys. fenyl-octová (PAA)
  - Umělé: kys. naftyl-octová (NAA), kys. 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), ...
- Stimulují: prodlužovací růst (stonku i kořene), fototropismus, gravitropismus, polarita buněk/pletiv/orgánů, vývoj cévních svazků, vývoj plodů, tvorba adventivních kořenů, regenerace
- Inhibují: tvorba postranních výhonů do určité vzdálenosti od vzrostného vrcholu (tzv. **apikální dominance**)



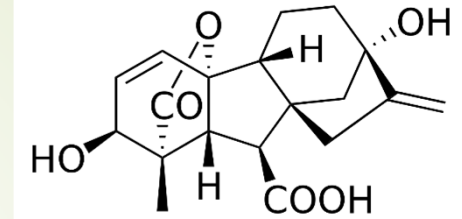
# Účinky fytohormonů

## ➤ Cytokininy

- Syntéza v kořenech a v intenzivně se dělících meristémech, transport z kořenů do nadzemní části
- Benzyladenin (BA), benzylaminopurin (BAP), m-topolin (mT), zeatin (Z), izopentenyladenin (iP)...
- Stimulují – buněčné dělení, regenerace, větvení nadzemní části (**potlačení apikální dominance**), zpomalení stárnutí, odolnost vůči stresu, diferenciaci plastidů, tvorba chlorofylu, tvorba zásob škrobu
- Důležitá je správná rovnováha s auxiny a dalšími fytohormony



# Účinky fytohormonů



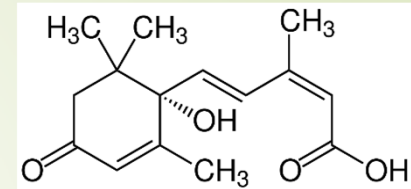
Kys. giberelová, G3

## ► Gibereliny

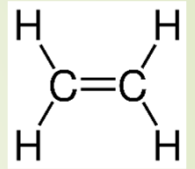
- Syntéza v celé rostlině, nejvíce v oblastech aktivního růstu
- Kys. giberelová (GA3) a další - GA4, GA12 ,... více než 80 látek
- Stimulují: prodlužovací růst stonku (spolu s auxiny), jarovizace, indukce kvetení, indukce klíčení semen (spuštění rozkladu zásobních látek z endospermu pro výživu embrya)

# Účinky fytohormonů

- ▶ Kyselina abscisová (ABA)
  - ▶ Syntéza v dormantních orgánech (pupeny, semena, zásobní orgány), v kořenových špičkách, v listech; transport z kořenů do nadzemních částí
  - ▶ Stimuluje: stárnutí (senescence) pletiv a orgánů, opad listů, regulace vodního provozu – uzavření průduchů při suchu, indukce obranné reakce při stresu
  - ▶ Inhibuje: prodlužovací růst a rychlost růstu, způsobuje dormanci (podle rovnováhy s gibereliny)



# Účinky fytohormonů



- ▶ Etylen
  - ▶ Plynný fytohormon
  - ▶ Produkt oxidace kys. 1-aminocyklopropan-1-karboxylové (ACC), syntéza ve stárnoucích pletivech, dozrávajících plodech, také v reakci na stres (zejména poranění)
  - ▶ Stimuluje: radiální růst (tloušťnutí stonků a kořenů), dozrávání plodů, tvorba odlučovací vrstvy při opadu listů
  - ▶ Inhibuje: prodlužovací růst a gravitopické reakce, zavírání průduchů způsobené ABA



# Stanovení obsahu fytohormonů

- ▶ Plynný etylen se stanovuje přímo ze vzduchu okolo rostliny pomocí plynové chromatografie
- ▶ Ostatní fytohormony (v aktivní i neaktivní formě a prekurzory):
  - ▶ Homogenizace biomasy v kapalném dusíku (nutná nízká teplota!)
  - ▶ Extrakce polárními (nebo nepolárními) rozpouštědly
  - ▶ Nutné přečištění extraktu (iontoměniče, C-18 Sep-Pak kolonky), použití antioxidantů
  - ▶ Analýza:
    - ▶ kapalinovou nebo plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí
    - ▶ Radioimmunoassay (RIA) – použití radioaktivně značené analogické látky, soupeření o vazebná místa na protilátkách, vyhodnocení podle podílu radioaktivity
    - ▶ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) – vazba fytohormonu na specifické protilátky, navázání způsobí aktivaci enzymu, který přemění substrát na barevný produkt – barevná reakce, kolorimetrické vyhodnocení



# Využití fytohormonů v praxi

## Rostlinné biotechnologie:

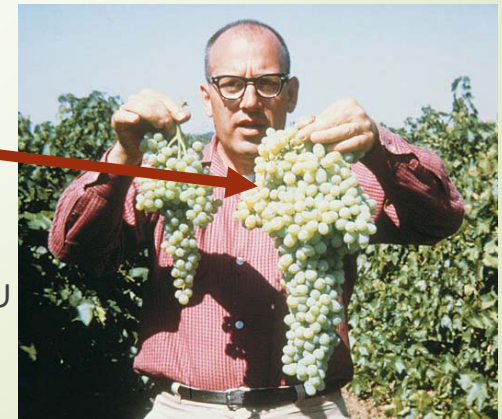
- Kultivace a množení rostlin in vitro, mikropropagace, udržování odrůd, ... (nutná správná rovnováha auxinů a cytokininů)




- Řízkování a zakořeňování (**auxiny**)



- Urychlení klíčení semen, jarovizace a indukce kvetení, větší nasazení plodů (**gibereliny**)



- Řízení dozrávání plodů (**etylen**) při transportu na dlouhé vzdálenosti



# Práce s fytohormony, kultivace in-vitro

V rámci předmětů vyučovaných na ÚEB-EBR

- ▶ Bi6120 Rostlinné explantáty
- ▶ Bi8670 Principy rostlinných biotechnologií

Kontaktní osoba: Mgr. Hana Cempírková, Ph.D.



# Praktické návody



# Vliv fytohormonů na růst a vývoj rostlin

## **Úloha 1:**

Sledování projevů apikální dominance u klíčnic hrachu

## **Úloha 2:**

Indukce tvorby adventivních kořenů auxinem



# Úloha 1 – Regulace vývoje klíčních rostlin

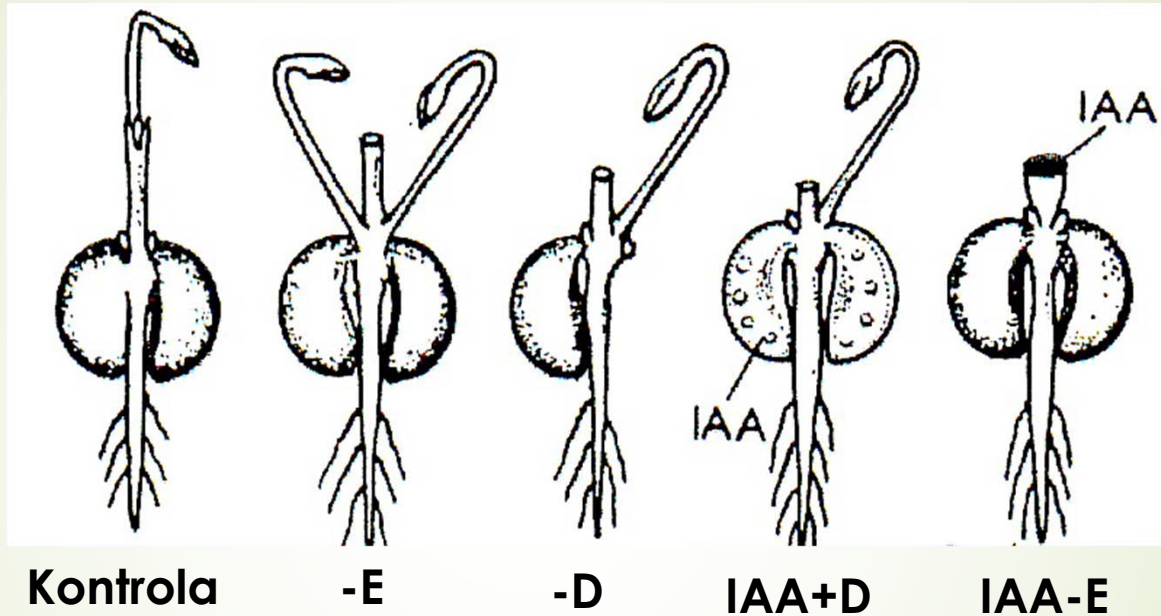
## ► Princip:

(experiment podle prof. Rudolfa Dostála (Dostál, 1959))

Auxiny produkované vzrostným vrcholem klíčící rostliny a obsažené v dělohách způsobují apikální dominanci vzrostného vrcholu, a brání tak rozvoji postranních, tzv. kotylárních pupenů (kotylárů) umístěných těsně nad dělohami.

Odříznutí vzrostného vrcholu, nebo jedné dělohy a nebo aplikace umělého zdroje auxinů na místo vzrostného vrcholu nebo na obnaženou dělohu změni rovnováhu fytohormonů a způsobí změnu ve vývoji kotylárů.

# Úloha 1 – Regulace vývoje klíčních rostlin



## Hypotézy:

- Odstranění epikotylu (přírozeného zdroje auxinů; -E) zruší apikální dominanci a umožní rozvoj obou kotylárů.
- Odstranění epikotylu a jedné dělohy (-D) poruší rovnováhu auxinů a umožní rozvoj kotyláru nad odstraněnou dělohou.
- Aplikace auxinu na jednu dělohu (IAA+D) posílí inhibiční vliv dělohy a vzniklá nerovnováha umožní rozvoj kotyláru nad neošetřenou dělohou.
- Aplikace auxinu na řeznou plochu po epikotylu (IAA-E) zachová apikální dominanci vzrostného vrcholu a kotyláry se vyvíjet nebudou.



# Úloha 1 – Regulace vývoje klíčních rostlin

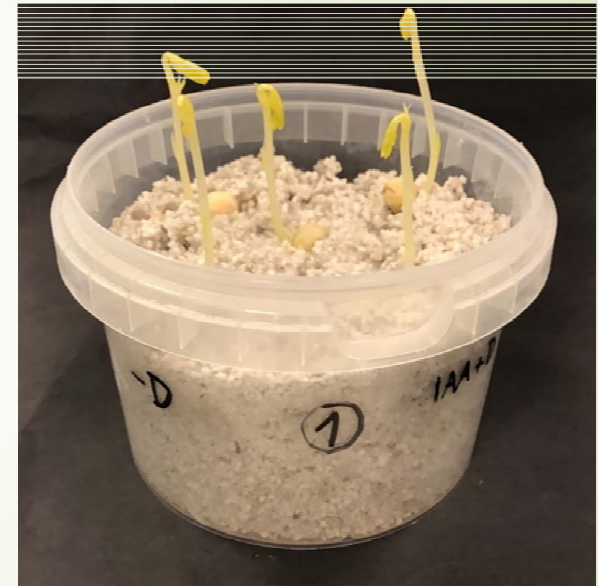
- ▶ Pomůcky a potřeby:
  - ▶ Rostlinný materiál: klíčící rostliny hrachu (*Pisum sativum*) pěstované ve tmě v destilované vodě
  - ▶ Potřeby: pinzeta, žiletka, párátko, popisovač
  - ▶ Chemikálie: lanolinová pasta s přídavkem 1% kys. indolyl-3-octové (IAA)





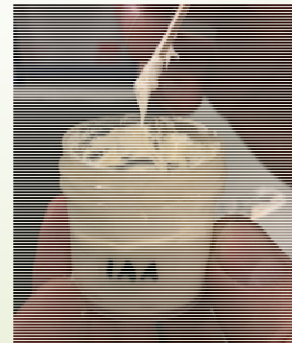
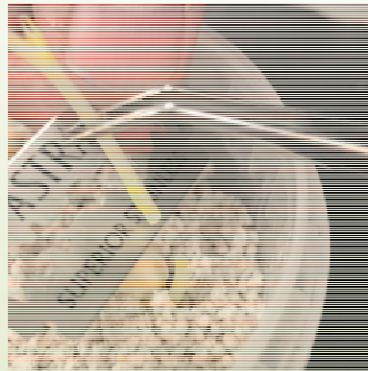
# Úloha 1 – regulace vývoje klíčních rostlin

- Provedení:
- Příprava rostlin:
  - Označit kultivační nádobu pořadovým číslem
  - Označit rostliny podle zkoumaných variant (popis na kultivační nádobě)
    - „-E“ – rostlina bez epikotyly
    - „-D“ – rostlina bez epikotyly s odstraněnou jednou dělohou
    - „IAA-E“ – rostlina bez epikotyly s aplikací pasty s IAA na řeznou plochu
    - „IAA+D“ – rostlina bez epikotyly s aplikací pasty s IAA na obnaženou jednu dělohu
  - Rostlina uprostřed nádoby bude sloužit jako neošetřená kontrola



# Úloha 1 – regulace vývoje klíčních rostlin

- Provedení:
- Příprava rostlin:
  - „-E“ – rostlina bez epikotyly
    - žiletkou odříznout epikotyl (zhruba 1 cm od semene, pod prvními šupinovítymi palisty)
  - „IAA-E“ – rostlina bez epikotyly s aplikací pasty s IAA na řeznou plochu
    - Žiletkou odříznout epikotyl
    - Na řeznou plochu nanést pastu s IAA



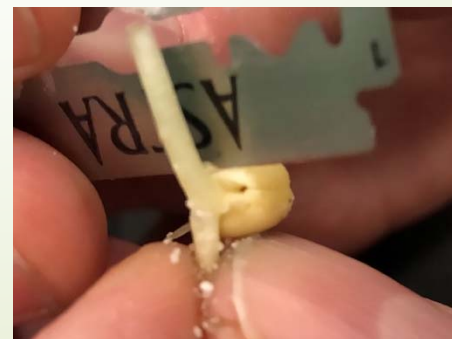
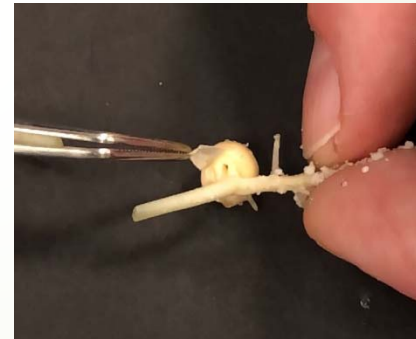
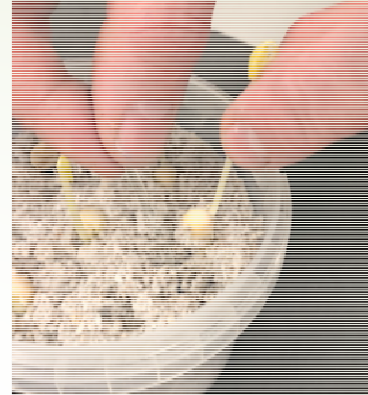
# Úloha 1 – regulace vývoje klíčních rostlin

➤ Provedení:

➤ Příprava rostlin:

„-D“ – rostlina bez epikotylu s odstraněnou jednou dělohou

- Klíčnou rostlinu šetrně vyjmout ze substrátu
- Žiletkou odříznout epikotyl
- Pomocí pinzety šetrně sloupnout osemení
- Žiletkou odříznout jednu z děloh
- Rostlinku zasadit zpět do substrátu

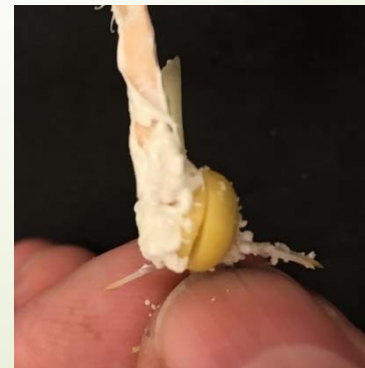
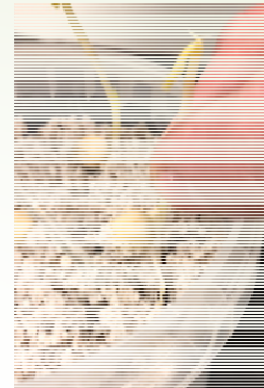


# Úloha 1 – regulace vývoje klíčních rostlin

- Provedení:
- Příprava rostlin:

„**IAA+D**“ – rostlina bez epikotylu s aplikací pasty s IAA na obnaženou dělohu

- Klíčnou rostlinu šetrně vyjmout ze substrátu
- Žiletkou odříznout epikotyl
- Pomocí pinzety šetrně sloupnout osemení (celé nebo alespoň z jedné dělohy)
- Jednu obnaženou dělohu potřít pastou s IAA
- Rostlinku zasadit zpět do substrátu





# Úloha 1 – regulace vývoje klíčnicích rostlin

► Vyhodnocení:

Po 7-14 dnech kultivace na světle vyhodnotit stav rozvoje kotylárů



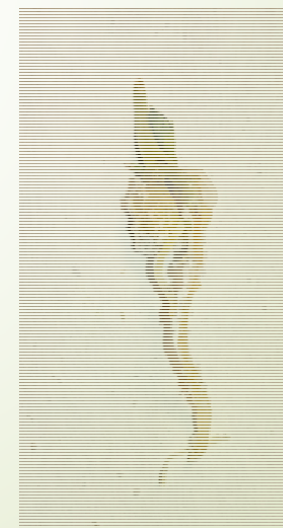
**Kontrola**



**-E**



**-D**



**IAA+D**



**IAA-E**

# Úloha 1 – regulace vývoje klíčnicích rostlin

Kontrola: normální vývoj hlavního stonku



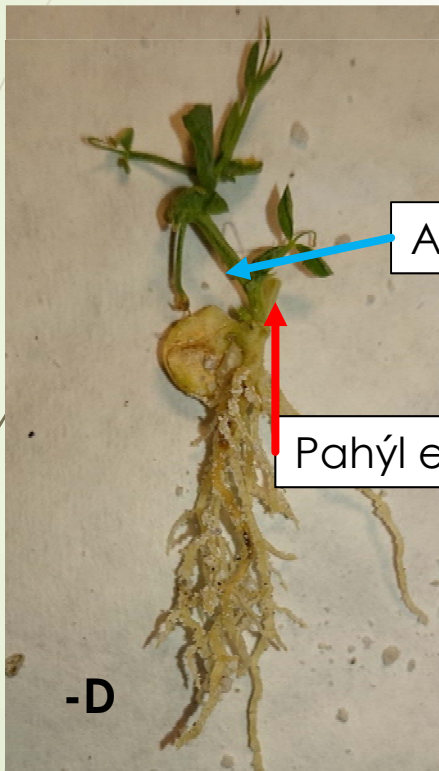
Rostlina bez epikotyly (-E): rozvoj obou kotylárů, z nich nové postranní výhony



Rostlina bez epikotyly s aplikací IAA na řeznou plochu (IAA-E):  
- kotyláry se nevyvíjí (zachována apikální dominance)  
- pahýl epikotyly deformovaný (ztloustlý) s častým výskytem nových adventivních kořenů

# Úloha 1 – regulace vývoje klíčnicích rostlin

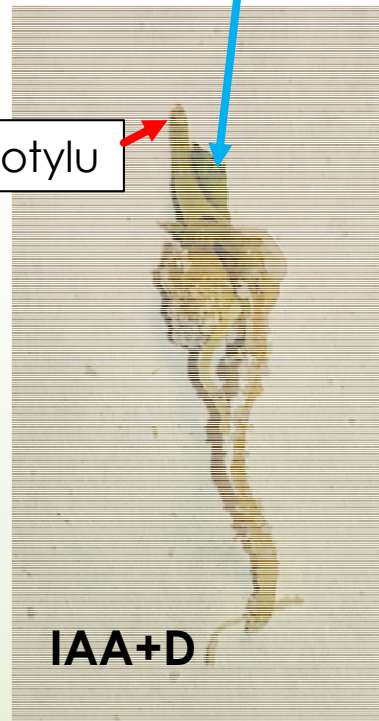
Kontrola: normální vývoj hlavního stonku



Rostlina bez epikotylu a jedné dělohy (-D):  
rozvoj kotyláru nad odstraněnou dělohou

Aktivní kotylár

Pahýl epikotylu



Rostlina bez epikotylu a s jednou dělohou ošetřenou IAA (IAA+D):  
rozvoj kotyláru nad neošetřenou dělohou

IAA+D



## Úloha 2 – Indukce tvorby adventivních kořenů

### ► Princip:

Vhodná koncentrace auxinu (např. okolo  $10^{-7}$  až  $10^{-5}$  M) indukuje tvorbu adventivních kořenů v nodech částí stonků („stonkových řízcích“), ale i v jiných orgánech (např. řapíky a čepele listů).

Nízká koncentrace (menší než  $10^{-7}$  M) může indukovat jen malý počet nových adventivních kořenů.

Vysoká koncentrace ( $10^{-4}$  M a vyšší) může sice indukovat vznik velkého počtu adventivních kořenů, ale vysoká koncentrace auxinu inhibuje jejich další růst a vývoj, takže zůstávají zakrslé a nevyvíjí se.

## Úloha 2 – Indukce tvorby adventivních kořenů

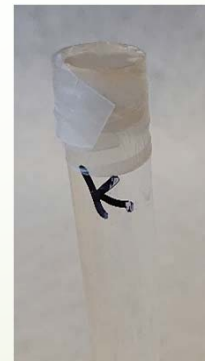
### ► Pomůcky a potřeby:

- Rostlinný materiál: vrcholové řízky stonků rostliny *Tradescantia*
- Potřeby: žiletka, preparační jehla, zkumavky, fólie/parafilm, popisovač
- Chemikálie: vodné roztoky kys. indolyl-máselné (IBA) o koncentracích  $10^{-5}$  M a  $10^{-4}$  M



## Úloha 2 – Indukce tvorby adventivních kořenů

- Provedení:
- Upravit vrcholové řízky- zachovat vrchol se 2-3 nejmladšími listy, odstranit ostatní listy, upravit délku řízku, zachovat 2-3 nody
- Do zkumavek nalít po okraj roztok IBA nebo vodu (kontrola), utěsnit fólií/parafilmem
- Prorazit ve fólii otvor a vložit řízek

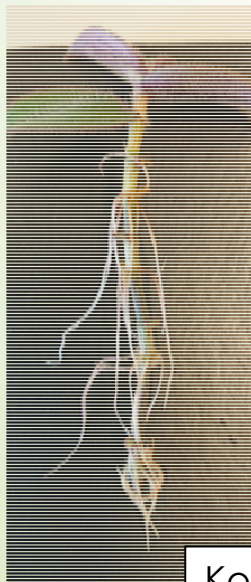




## Úloha 2 – Indukce tvorby adventivních kořenů

### ► Vyhodnocení:

Po 7-14 dnech kultivace na světle vyhodnotit počet a délku adventivních kořenů u jednotlivých variant



Kontrola



IBA  $10^{-5}$  M



IBA  $10^{-4}$  M

## Úloha 2 – Indukce tvorby adventivních kořenů

Kontrola – v každém nodu 1 až 10 dlouhých adventivních kořenů



Kontrola



IBA 10<sup>-5</sup> M

IBA 10<sup>-5</sup> M – v každém nodu 10 a více krátkých adventivních kořenů



IBA 10<sup>-4</sup> M

IBA 10<sup>-4</sup> M – v každém nodu 10 a více zakrnělých základů (primordií) adventivních kořenů, které se dále nevyvíjí kvůli inhibující koncentraci auxinu

