

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ



ROSTLINNÁ VÝROBA

PLANT PRODUCTION

8

ROČNÍK 40 (LXVII)
PRAHA 1994
CS ISSN 0370-663X

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADEMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

ROSTLINNÁ VÝROBA

PLANT PRODUCTION

VOLUME 40 (1994)

Redakční rada - Editorial Board

Předseda - Chairman

Doc. ing. Josef Š i m o n , CSc. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně, ČR)

Členové - Members

- Doc. ing. Pavol B a j č i , CSc. (Vysoká škola poľnohospodárska, Nitra, SR)
Prof. dr. Márta B i r k á s (Agrártudományi Egyetem, Gödöllő, Hungária)
Doc. ing. Jozef C i g l a r , CSc. (Vysoká škola poľnohospodárska, Nitra, SR)
Ing. Helena D o n á t o v á , CSc. (Vysoká škola zemědělská, Praha, ČR)
Prof. ing. Václav F r i c , DrSc. (Vysoká škola zemědělská, Praha, ČR)
Ing. Norbert G á b o r č í k , CSc. (Výzkumný ústav lúk a pasienkov, Banská Bystrica, SR)
Ing. Alois C h a l u p a , CSc. (Výzkumný ústav technických plodin a luskovin, Šumperk, ČR)
Ing. Bohdan J u r á n i , CSc. (Univerzita Komenského, Bratislava, SR)
Prof. dr. Günter K a h n t (Universität Hohenheim, Stuttgart, BRD)
Prof. ing. Josef K o z á k , DrSc. (Vysoká škola zemědělská, Praha, ČR)
Prof. ing. Vladimír K r a j č o v i č (Výzkumný ústav lúk a pasienkov, Banská Bystrica, SR)
Ing. Ladislav L o r e n č í k , DrSc. (Oblasťný výskumný ústav agroekológie, Michalovce, SR)
Prof. ing. Lubomír M i n x , DrSc. (Vysoká škola zemědělská, Brno, ČR)
Ing. Timotej M i š t i n a , CSc. (Výzkumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany, SR)
Dr. Peter N e w b o u l d (The Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, Scotland, UK)
Ir. Cees van O u w e r k e r k (Instituut voor Bodemvruchtbaarheid, Haren Gn, Nederland)
Ing. Jaromír P r o c h á z k a , CSc. (Výzkumný ústav pícninářský, Troubsko u Brna, ČR)
Prof. ing. Stanislav P r o c h á z k a , DrSc. (Vysoká škola zemědělská, Brno, ČR)
Doc. ing. Vlastimil R a s o c h a , CSc. (Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod, ČR)
Doc. ing. Ladislav S l a v í k , DrSc. (Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, Praha, ČR)
Doc. ing. Miron S u š k e v i č , DrSc. (Výzkumný ústav výživy zvířat, Odbor základní agrotechniky, Hrušovany u Brna, ČR)
Prof. ing. Václav V a n ě k , CSc. (Vysoká škola zemědělská, Praha, ČR)
Ing. Marie V á ň o v á , CSc. (Výzkumný ústav obilnářský, Kroměříž, ČR)
Ing. Jaroslav V o š k e r u š a , CSc. (Výzkumný ústav olejnin, Opava, ČR)
Doc. ing. Karel V o ř í š e k , CSc. (Vysoká škola zemědělská, Praha, ČR)
Doc. ing. František V r k o č , DrSc. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně, ČR)
Prof. dr. hab. Kazimiera Z a w i ś l a k (Akademia Rolniczo-Techniczna, Olsztyn, Polska)

Vedoucí redaktorka - Editor-in-Chief

RNDr. Eva S t ř í b r n á

THE EFFECT OF ELEVATED CO₂ CONCENTRATION ON PHOTOSYNTHETIC CO₂ FIXATION, RESPIRATION AND CARBON ECONOMY OF WHEAT PLANTS

J. Šantrůček¹, H. Šantrůčková², J. Květoň¹, M. Šimková¹, K. Roháček¹

¹*Institute of Plant Molecular Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic*

²*Institute of Soil Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic*

Winter wheat plants were grown under controlled atmospheric and light conditions for 25 days to assess the response of photosynthesis, respiration and carbon allocation to elevated ambient CO₂ concentration. Daily balance of carbon fixation and loss was measured separately for shoots and roots including root exudation. Doubled CO₂ (700 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) stimulated photosynthetic CO₂ uptake and dark respiration rate when calculated on the leaf area basis. However, total daily carbon gain per plant and total dry matter of shoot was lower for high-CO₂-grown plants due to reduced leaf area. After 23 days of exposition to high CO₂, photosynthesis was depressed probably due to limiting regeneration of ribulose biphosphate. Both stomatal resistance and water use efficiency were markedly higher in high-CO₂-grown plants. Higher evaporative demand in low-CO₂-grown plants promoted root elongation. Total root length was 160% of that in high-CO₂-grown plants. Root exudation of high-CO₂-grown plants was higher in the first days of plant development, but the inhibition of net photosynthesis was followed by a decrease in exudation.

Burning of fossil fuels as well as extensive deforestation of the rain forests are the primary causes of progressive increase in CO₂ concentration in atmosphere. Over the past 150 years, CO₂ level has increased from about 270 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ to 350 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ and doubling to 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ is expected to occur sometimes in the next century (B a e s et al., 1977). Photosynthesis represents an efficient trap for atmospheric CO₂ and the natural and artificial plant ecosystems are the primary sinks. It is well known that photosynthetic CO₂ fixation responds to CO₂ level in ambient atmosphere by saturation-type of the curve. The CO₂ saturation is observed between 1 000 to 3 000 $\mu\text{mol (CO}_2\text{) mol}^{-1}$ in C₃ plants. Thus, one should expect a permanent increase in photosynthetic carbon fixation resulting from global increase of CO₂ in atmosphere. Similar trend could be expected in primary plant production and yield (B a z z a z , 1990). However, both the photosynthesis rise and the biomass (yield) increase were doubted in the last decade

due to the effect called CO₂ acclimation. When the plants in experiments are exposed to elevated CO₂ for a long time (weeks or months), photosynthesis rate declines from the initial increase to lower level, often similar to that before CO₂ has been risen.

It was the aim of the presented work to follow the long-term photosynthesis and growth responses of wheat plants to doubled ambient CO₂ concentration.

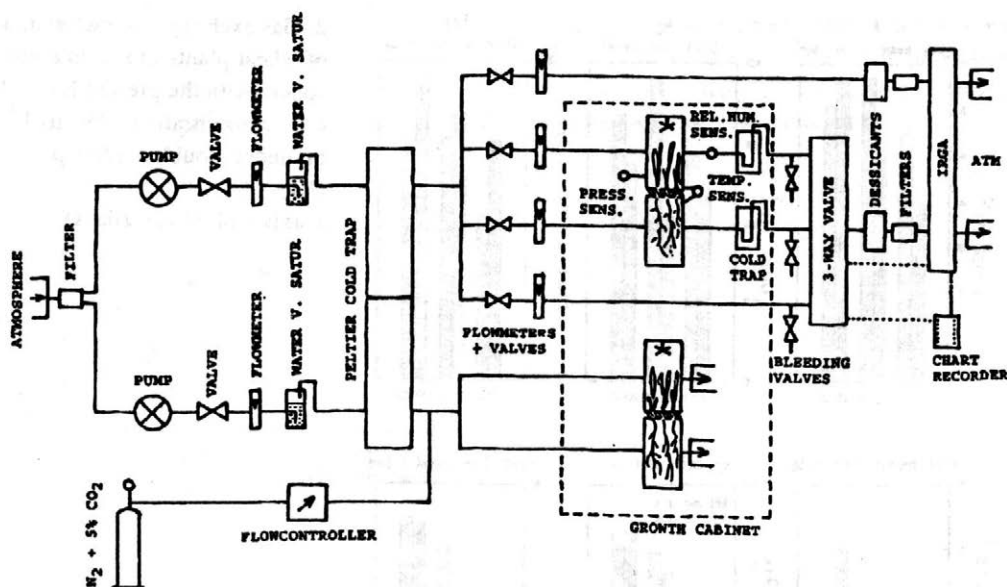
MATERIAL AND METHODS

Winter wheat cultivar Ritmo (the Netherlands) was used in the experiments. Seeds were inoculated with suspension of rhizosphere microflora and germinated for five days on filter paper in the Petri dishes and then planted into cylindrical glass chambers with the bottom (root) part filled with pure coarse (1 to 2 mm) silica sand free of any organic carbon. In the growth chambers, the above- and below-ground parts of the plant were hermetically separated. The chambers with plants were put into air-conditioned cabinet with controlled air temperature (20/17 °C day/night) and light regime (15/9 h of light/dark period, photon flux rate of photosynthetic active radiation 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The root space (volume 450 cm³) was supplied with complete nutrient solution (IBP nutrient solution) from darkened infuse flask. Air in the shoot space of the volume of 800 cm³ was mixed by miniature fan (Micronell, Switzerland).

Both above- and below-ground parts were ventilated separately with air of the same inlet composition. Both outlet air streams (passing the root or shoot areas) were analysed alternatively for CO₂ content by LI-Cor 6250 infrared gas analyser (USA) every three minutes. Humidity of air entering and leaving the shoot areas, leaf temperature, total pressure of air in shoot areas and other necessary parameters were sampled during light and dark periods. The open gas exchange system is in Fig. 1.

Two series with three growth chambers in each were supplied by air with control or elevated concentration of CO₂. The control CO₂ ranged from 300 to 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, elevated from 690 to 730 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ during light and dark periods. In a couple of chambers high- and low-CO₂-grown plants were measured alternatively with period of 24 hours for about 10 days. Leaf area was estimated non-destructively every two days. When plants exhibited features of CO₂ acclimation, we tested causes of the acclimation by measuring CO₂ response of photosynthesis. After about 10 days of gas exchange measurements, another couple of chambers was connected to the gas analysis system and the following parameters were measured destructively: leaf and root area, root length (by DELTA T Image Analysis System, England), leaf and root fresh and dry matter. Three destructive samplings were taken from plants 18, 24 and 29 days old.

Before morphological and anatomical analyses, roots with attached sand were washed and the obtained suspension was used for carbon determination in rhi-



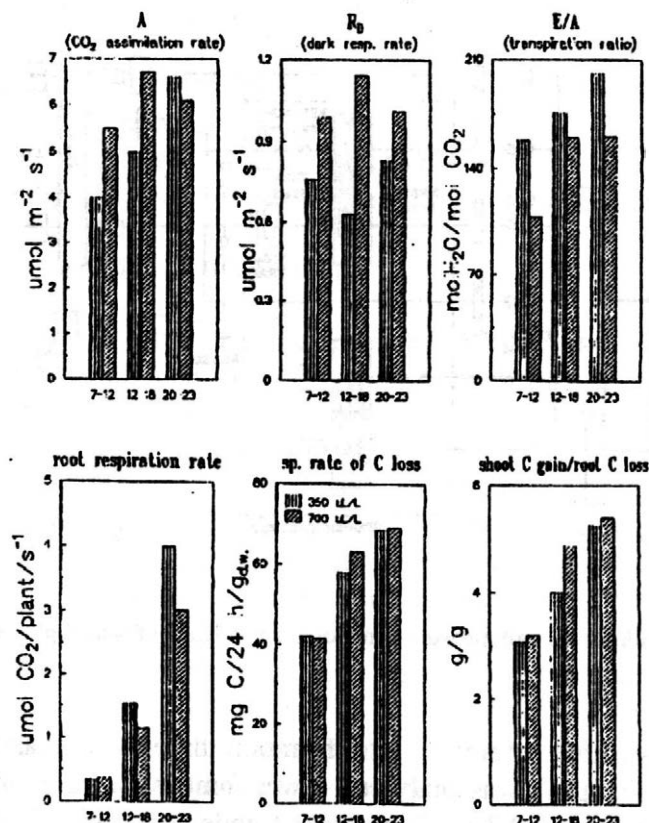
1. The open gas system used for cultivation and measurements of gas exchange of wheat plants

zosphere. Carbon content, measured before and after filtration through glass and membrane filters (2.7, 1 and $0.3 \mu\text{m}$), was analysed by wet combustion. Carbon deposited in plant debris (fraction $> 2.7 \mu\text{m}^3$), microbial cells (fraction 2.7 to $0.3 \mu\text{m}^3$) and soluble material (fraction $< 0.3 \mu\text{m}^3$) was calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

CO_2 assimilation rate (A) was higher in high- CO_2 -grown plants (137% of A in low- CO_2 -grown plants) until the 18th day after planting and decreased to the level of control plants during the next three days (all plants' age data given in this section and in all figures refer to the day after planting of seedlings into chambers; to get total plant age, five days has to be added). From the 21st day, CO_2 assimilation rate was inhibited in high- CO_2 -grown plants (Fig. 2). To check whether this inhibition was in biochemistry of CO_2 fixation or in stomata closure, CO_2 response of photosynthesis of control and high- CO_2 -grown plants was measured on the days 22 and 23 of experiment (Fig. 3). The initial slopes of CO_2 response curves differed only slightly but CO_2 saturated rate of photosynthesis in high- CO_2 -grown plants was lowered to 72% of that in low- CO_2 -grown plants. According to Farquhar, Caemmerer (1982) concept, limiting regeneration of ribulose-bisphosphate (RuBP) in Calvin cycle is responsible for the inhibition observed. We observed a lack of sensitivity to oxygen-free atmosphere

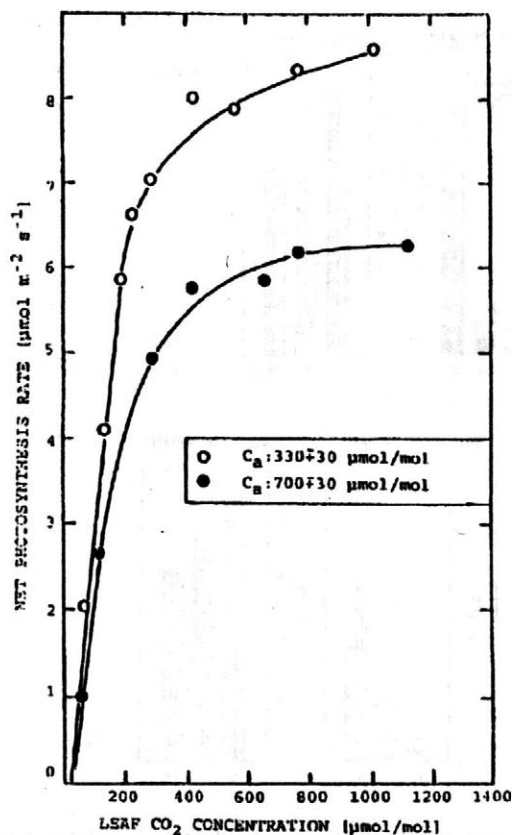
2. Gas exchange characteristics of wheat plants grown in atmosphere with the present level of CO_2 concentration ($350 \mu\text{l l}^{-1}$) or under doubled ($700 \mu\text{l l}^{-1}$) CO_2
x axis - plant age (days)



in high- CO_2 -grown plants proportionally to the response of low- CO_2 -grown plants (data not shown). This could indicate a feedback inhibition of CO_2 fixation caused by reduced utilization of triosophosphates and lack of phosphate for phosphorylation.

Transpiration ratio was evidently lower for high- CO_2 -grown plants (Fig. 2). It corresponds to markedly depressed stomatal conductance by elevated CO_2 in atmosphere (data not shown).

Respiration rate of roots per one plant was lower in high- CO_2 -grown plants (Fig. 2). However, when respiration rate was calculated per unit of root dry weight, the loss of carbon per unit of time was the same for both growth treatments (Fig. 2). Dark respiration rate of shoots calculated per unit of leaf area of above-ground biomass was higher in high- CO_2 -grown plants (Fig. 2). The relation persisted even after photosynthesis rate of high- CO_2 -grown plants has been inhibited. About 20% of carbon fixed by photosynthesis was lost by dark respiration of shoots. On the whole plant basis (including root respiration), each third to fifth mole of fixed carbon was lost by respiration (Fig. 2). Leaf area and fresh weight of shoots increased with plant age and was always higher in

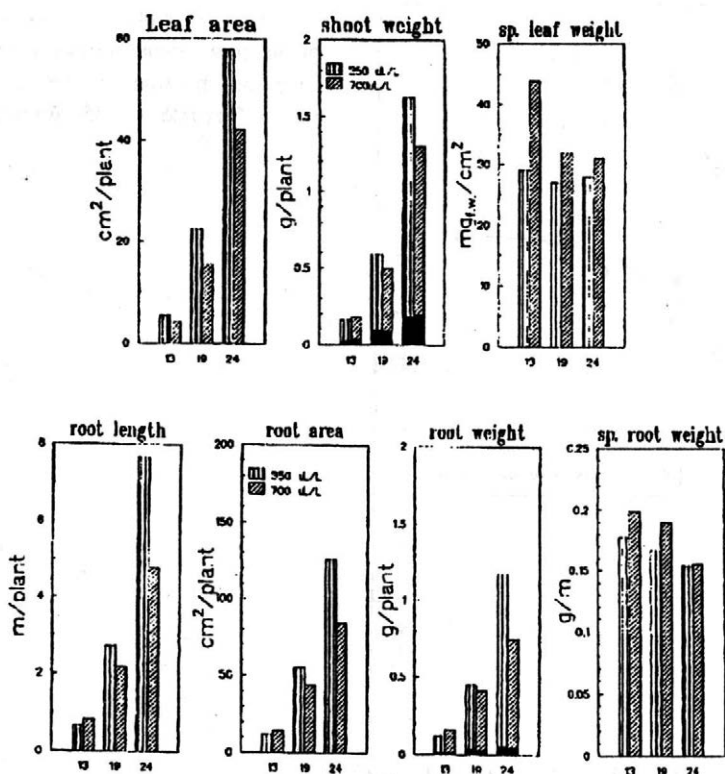


3. CO₂ response of photosynthesis rate of wheat plants grown under normal ambient or doubled CO₂ concentration (c_a) for 22 days; incident photon flux rate was $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

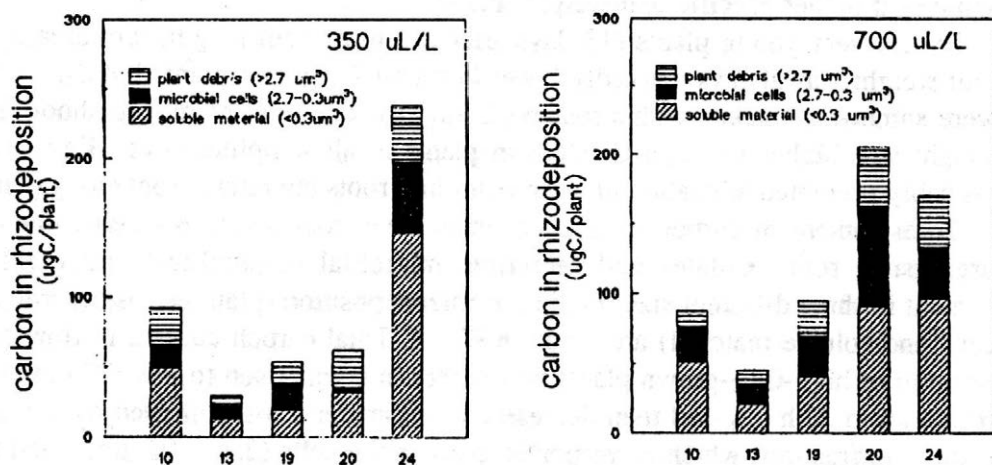
low-CO₂-grown plants (Fig. 4). On the contrary, high-CO₂-grown plants had somewhat higher specific leaf weight (Fig. 4).

Except very young plants (13 days after planting), root length, root area and root weight was always markedly lower in high-CO₂-grown plants but the roots were somewhat thicker in this treatment (Fig. 4). The ratio of root to shoot dry weight was higher for high-CO₂-grown plants in all sampling days. High CO₂ probably promoted allocation of assimilates into roots but retards root elongation.

Total content of carbon in rhizodeposition (i.e. root hairs, root cells, microorganisms, root exudates and secretion, microbial metabolites) and carbon content in three different size fraction of rhizodeposition (plant debris, microbial cells and soluble material) are given in Fig. 5. Total carbon content in rhizodeposition of high-CO₂-grown plants was higher in comparison to low-CO₂-grown plants up to 20th day and then decreased. Similar trend was followed by carbon content in fractions which corresponds to microbial cells (2.7 to $0.3 \mu\text{m}^3$) and to soluble material ($< 0.3 \mu\text{m}^3$). In the time when carbon content in rhizodeposition of high-CO₂-grown plants fell down, the inhibition of net photosynthesis rate and the slower development of root length and weight were established.



4. Area and weight (fresh weight - open bars, dry weight - dark bars) of leaves and roots of plants grown in the present atmospheric or in doubled CO₂ for 24 days
x axis - plant age (days)



5. Carbon content in rhizodeposition of plants grown in atmosphere with control or elevated CO₂ concentration
x axis - plant age (days)

Acknowledgements

This research was supported by the Commission of the European Communities and was a part of the PL 910121 CROPCHANGE project.

References

- BAES, C. F. - GOELLER, H. E. - OLSON, J. C. - ROTT, R. M.: Carbon dioxide and climate: uncontrolled experiment. *Amer. Sci.*, 65, 1977: 310-320.
- BAZZAZ, F. A.: The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ levels. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 21, 1990: 167-196.
- FARQUHAR, G. D. - CAEMMERER, S. VON: Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. In: LANGE, O. L. - NOBEL, P. S. - OSMOND, C. B. - ZEIGER, H. (eds): *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Vol. 12B*, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag 1982.

Received on March 17, 1994

ŠANTRŮČEK, J. - ŠANTRŮČKOVÁ, H. - KVĚTOŇ, J. - ŠIMKOVÁ, M. - ROHÁČEK, K. (Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR, České Budějovice; Ústav půdní biologie AV ČR, České Budějovice):

Účinek zvýšené koncentrace CO₂ v atmosféře na fotosyntézu, respiraci a bilanci uhlíku rostlin pšenice.

Rostl. Výr., 40, 1994 (8): 689-696.

Klíční rostliny ozimé pšenice cv. Ritmo byly pěstovány po dobu 25 dnů v atmosféře s dvojnásobnou koncentrací oxidu uhličitého (700 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) proti kontrolním rostlinám. Obě varianty byly shodně kultivovány ve sterilním křemičitém hrubozrnném písku ve skleněných válcových komorách, které umožňovaly hermetické oddělení kořenů od nadzemních částí a jejich ventilaci. Komory byly umístěné v klimatizovaném boxu s denní a noční teplotou 22 a 17 °C při umělém osvětlení o hustotě toku fotonů fotosynteticky aktivního záření 300 až 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Klíční rostlinky byly před výsadbou inokulovány suspenzí mikroorganismů izolovaných z kořenové zóny rostlin rostoucích v půdě. Po dobu 25 dnů byla měřena rychlost fotosyntézy a respirace nadzemních částí a kořenů. Analýzy růstu prýtlů a kořenů a nepřímá měření množství kořenových exsudátů a rozvoje mikrobiální biomasy v rhizosféře byly provedeny po 13, 19 a 23 dnech inkubace.

Zvýšená koncentrace CO₂ vedla ke zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy vztahované na jednotku plochy listu. Celkový 24h zisk uhlíku jedné rostliny byl však nižší u rostlin rostoucích při vyšší koncentraci CO₂ v důsledku menší plochy listů. Po 23 dnech

expozice vysokou koncentrací CO_2 došlo k inhibici fotosyntetické fixace CO_2 pravděpodobně v důsledku zpomalené regenerace ribulózo-1,5-bisfosfátu. Zvýšení koncentrace CO_2 vedlo podle očekávání k přivřetí průduchů a ke zvýšení efektivity využití vody. Vyšší nároky na transpiraci u rostlin s nízkým obsahem CO_2 se projeví ve větší celkové délce kořenů. Zvýšení koncentrace CO_2 v atmosféře stimulovalo exsudaci kořenů. Stejně jako rychlost fotosyntézy i kořenová exsudace klesla pod úroveň kontrolních rostlin po cca 20 dnech expozice zvýšenou koncentrací CO_2 .

Contact Address:

Ing. Jiří Š a n t r ů č e k , CSc., Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR,
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika, tel.: 038/437 51,
fax: 038/414 75

PLANT REGENERATION IN CALLUS CULTURES OF FABA BEAN (*VICIA FABA* L.)

M. Griga, H. Klenotičová

Research Institute of Technical Crops and Legumes, Šumperk

Callus cultures of *Vicia faba* L. were established using immature zygotic embryos and shoot apices of aseptically germinated seedlings. The calli induced on auxin-containing media (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D; α -naphthaleneacetic acid, NAA) were separated from the initial explants and subcultured in series. Regeneration of embryoids and shoot-bud primordia was observed on auxin-containing induction media as well as after transfer of calli onto regeneration media supplemented with cytokinins. The shoot-bud formation capacity was stable during the long-term culture. Root formation was induced on various rooting media and resulted in complete flowering plants.

Considering the substantial progress in *de novo* regeneration of grain legumes in the last decade, namely via somatic embryogenesis protocols (Christou, 1992), *Vicia faba* L. remains a recalcitrant species in this regard. Faba bean tissues grow very poorly in culture, particularly due to the formation of polyphenolic substances, which causes problems with both establishment and maintenance of faba bean callus cultures by a strong tendency to tissue necrosis.

The establishment of a callus culture in which the regeneration process may be triggered by a simple growth regulator stimulus is very difficult to obtain in *V. faba*. The majority of works described shoot regeneration from faba bean callus (Galzy, Hamoui, 1981; Schulze et al., 1985; Busse, 1986; Thynn, Werner, 1987; Fakhrai et al., 1989) using initial explants containing organized meristematic structures such as shoot apices, stem nodal segments or cotyledonary node segments with axillary buds. The proliferation of cells of these meristematic regions in initial stages of culture is often considered as *de novo* shoot bud or adventive bud organogenesis as compared with serial proliferation of axillary buds or pre-existing meristems.

The extreme recalcitrance of *V. faba* focussed the effort of some laboratories to *Vicia narbonensis* L., taxonomically the nearest wild relative to faba bean, and these experiments resulted in successful plant regeneration via somatic embryogenesis (Albrecht, Kohlenbach, 1989; Pickardt et al., 1989).

This paper describes *de novo* plant regeneration in long-term callus cultures of *V. faba*.

Plant material: White-flowering *V. faba* lines 6806 and 6823 were used in our experiments. The immature pods were harvested from plants growing in the greenhouse, surface-sterilized, as described earlier (G r i g a et al., 1987). Whole immature embryos (3 to 6 mm in length) were isolated aseptically from the seeds.

Seeds were sterilized as reported by G r i g a (1988b), soaked in sterile water for 12 h and placed onto the 0.7% Difco-Agar (250 ml Erlenmeyer flasks, 50 ml agar, 5 seeds per flask) for germination in the dark at 21 ± 1 °C. The shoot-tips of 3 day old etiolated seedlings were used as initial explants (P i c k a r d t et al., 1989).

Callus induction from immature zygotic embryos: Three media formulations were tested for callus initiation: L2 (P h i l l i p s , C o l l i n s , 1979) with 2.5 (L2-1) or 40 μ M 2,4-D (L2-2), EB (B a r w a l e et al., 1986) with 40 μ M NAA and OR (B a r w a l e et al., 1986) with 15 μ M BAP and 0.2 μ M NAA. One part of the cultures was placed in the dark at 25 °C for 4 weeks, the second part was cultured in parallel at 16 h photoperiod, cool white fluorescent light, irradiance 20 μ mol m⁻² s⁻¹, 25 °C day / 20 °C night. Each treatment (genotype x medium x culture regime) consisted of minimum 30 embryos. After 4 weeks, all cultures were evaluated and transferred onto fresh media of the same composition or regeneration media MSR and R5 (see below).

Callus induction from shoot tips of etiolated seedlings: MS medium (3% sucrose) with 0.5, 2.3, 4.5, and 9.0 μ M 2,4-D was used as callus inducing medium (dark, 22 ± 1 °C). 20 shoot tips in two replicates were treated in each experimental variant. After 4 weeks the cultures were transferred onto MS medium (1.5% sucrose) with 5.4 μ M NAA and grown at a 16 h photoperiod, 26 °C. The calli were subcultured every four weeks to fresh NAA-medium.

Regeneration induction: The immature embryo-derived calli after 4 weeks on callus initiation media were placed onto the regeneration media MSR with 2 μ M BAP and 0.2 μ M IBA, and R5 with 10 μ M IBA, 5 μ M BAP and 5 μ M GA₃ (both formulations after B a r w a l e et al., 1986) or subcultured on callus induction media. For shoot elongation, various modifications of MSB medium were tested (cytokinins, yeast extract, caseine hydrolysate, activated charcoal, coconut water, GA₃).

The shoot tip-derived calli were monthly subcultured (10 months) on MS medium with 5.4 μ M NAA and calli with globular appearance and dark green domes were selected and multiplied. These potentially morphogenic cultures were transferred onto modified BKZ medium (L a z z e r i et al., 1985; P i c k a r d t et al., 1989) with 0.5 μ M NAA and 0.1 μ M each of BAP, kinetin and zeatin.

Root induction and plant formation: Various rooting media were tested, mostly with NAA as auxin. Rooted shoots were washed with 0.15% v/v Previ-

cur N (Schering AG, FRG) and transferred into autoclaved perlite saturated with half strength MS-salts in liquid medium, then into sterile soil and acclimated in non-sterile conditions in the greenhouse.

Histology: Samples of calli were fixed in Navashin's fluid for 24 h, dehydrated in ethanol: xylem series and embedded in paraffin with 15% w/w bee wax. Sections of 10 μ m thickness were stained with saturated basic fuchsin and picro-indigocarmine. Permanent slides were prepared by mounting in solakryl.

RESULTS

Immature zygotic embryo - derived cultures: Formation of callus with compact to friable consistence was observed on all induction media tested (Tab. I shows data in line 6823). On media L2-1, L2-2, EB (light), the globular structures developed resembling in their morphology globular stage of somatic embryos. These embryos originated directly from senescing cotyledons and swollen embryo axes. However, these globular embryos, which appeared in the initial culture had a strong tendency to vitrification and callogenesis. In most of the cases the callus completely overgrew these structures during the 1st subculture (6 to 8 weeks after explant isolation).

All plant material (both dark- and light-cultured) was placed at 16 h photoperiod with the 1st subculture. The calli (still containing initial explant) were transferred onto the same fresh media and regeneration media MSR and R5. Most of the media sequences tested (L2-1 to L2-1, MSR, R5; L2-2 to L2-2, MSR, R5 etc.) did not result in morphogenic callus, the necrosis of calli was frequently observed phenomenon. Only in the sequence EB-dark to EB-light, green, viable, well growing calli (12% of initially plated embryos) were found. These calli were isolated from the rest of the initial explant and callus culture was multiplied on EB medium to the extent of approximately 100 explants in the course of the 2nd to 4th subculture. In the 4th subculture (approximately after 100 days), the calli maintained and multiplied on EB medium started spontaneously to differentiate globular embryos (Fig. 1A, C) and shoot-bud primordia (Fig. 1B). The attempts to support further development and conversion of globular embryos by their mechanical isolation and culture on different agar as well as liquid media (data not shown) failed and usually resulted in recalling or necrosis.

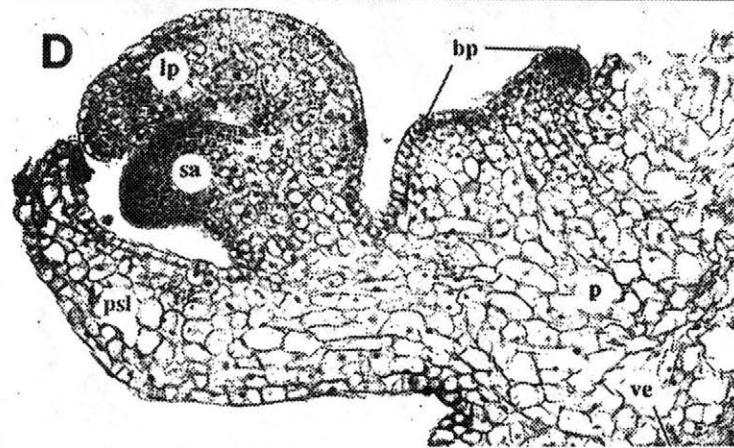
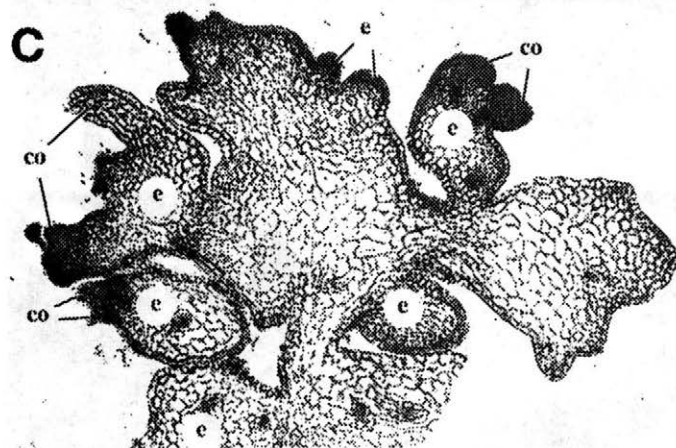
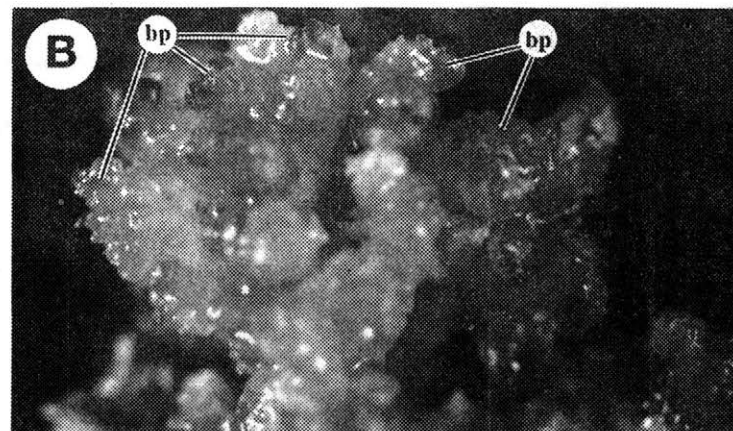
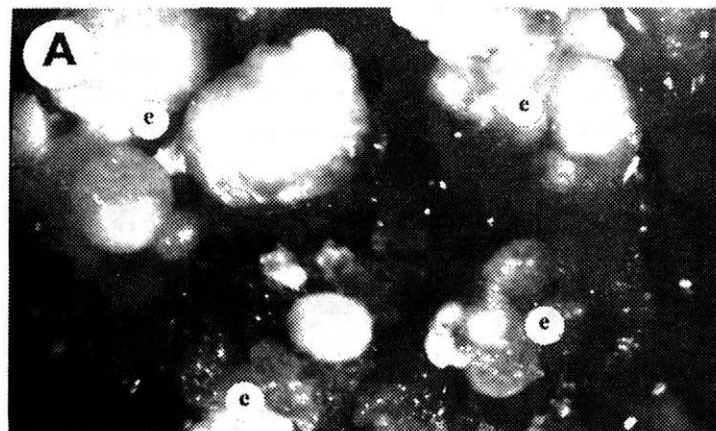
During the following subcultures on EB medium the bud primordia developed into distinct shoot-buds (Fig. 1D, 2A), however, their elongation was limited up to 5 mm, whose length was not sufficient for root induction. Therefore, EB medium was used only for maintaining the organogenic culture in sufficient amount (300 uniform explants) and organogenic calli were transferred to various shoot elongation media (Fig. 2B). Of 19 media tested, the best results were obtained on MSB medium with 0.1 μ M NAA and 5 μ M zeatin (shoots 5 cm in

I. Growth responses recorded in culture of immature zygotic embryos of *Vicia faba* line 6823 on induction media L2-1, L2-2 (Phillips, Collins, 1979), EB and OR (Barwale et al., 1986) in the end of initial culture (4 weeks)

Basal medium	Phytohormones (μM)		Culture regime	Embryos plated	Callus formation frequency (%) and intensity ¹	Necrosis ²	Explants with another growth response (%)	
L2-1	2.5	2,4-D	dark	44	100 2.34 $\pm$ 0.08	0.93 $\pm$ 0.13	globular embryos	9
							roots	2
			16 h photoperiod	43	100 2.51 $\pm$ 0.09	1.35 $\pm$ 0.11	globular embryos	56
L2-2	40	2,4-D	dark	42	100 1.95 $\pm$ 0.08	1.48 $\pm$ 0.13	globular embryos	2
							roots	5
			16 h photoperiod	41	100 2.29 $\pm$ 0.10	1.59 $\pm$ 0.13	globular embryos	42
EB	40	NAA	dark	30	87 1.40 $\pm$ 0.15	1.27 $\pm$ 0.18	embryo germination	40
							globular embryos	8
			16 h photoperiod	39	92 1.41 $\pm$ 0.11	1.90 $\pm$ 0.12	embryo germination	87
OR	15 0.2	BAP NAA	dark	45	96 2.44 $\pm$ 0.12	1.51 $\pm$ 0.15	embryo germination	53
							multiple shoot formation	22
			16 h photoperiod	50	90 1.10 $\pm$ 0.08	2.40 $\pm$ 0.07	embryo germination	95
							multiple shoot formation	65

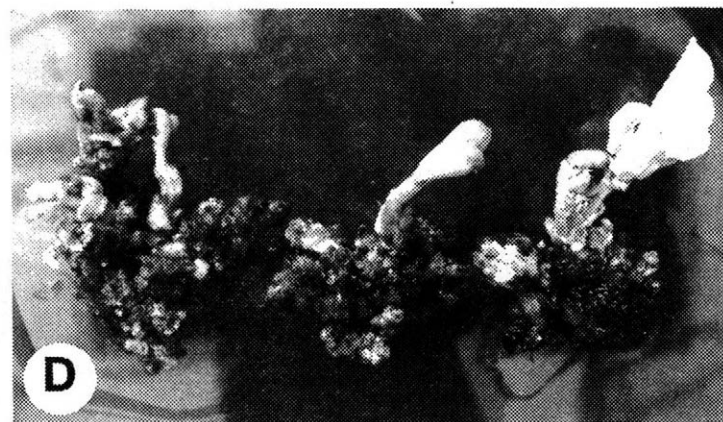
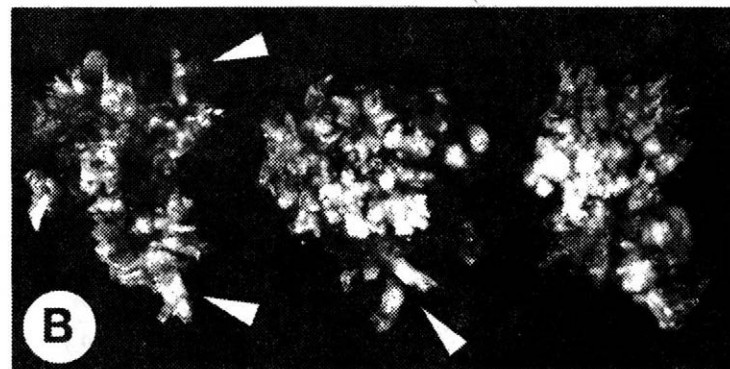
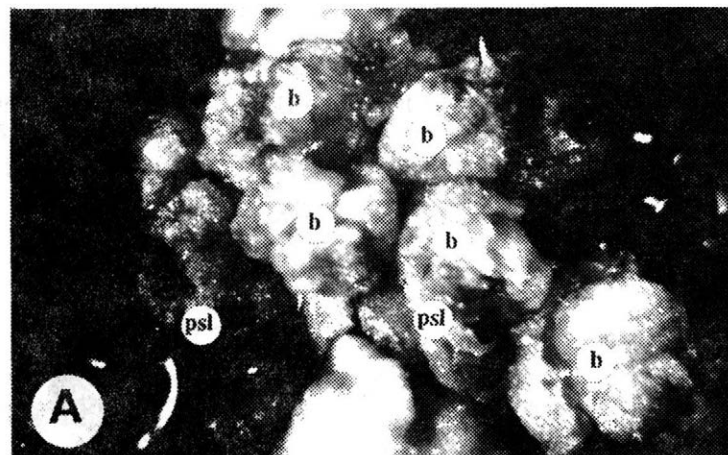
¹) Intensity of callus formation (0 - without callus; 1 - weak callus formation, 25% of explant volume represents callus; 2 - medium callus formation, 25-75%; 3 - strong callus formation, > 75% or whole explant changed into callus)

²) Rate of blackening (necrosis) (0 - without necrosis; 1 - < 25% of explant blackened; 2 - 25-75%; 3 - > 75% or whole explant necrotic)



1. (A) Clumps of faba bean somatic embryos on callus derived from immature zygotic embryo. (B) Shoot bud primordia on the surface of organogenic callus. (C) Histological section of a compact callus nodule forming clump of superficially produced somatic embryos in various stages of development. (D) Histology of shoot bud differentiation from superficial tissues of organogenic callus.

e - embryos and clumps of embryos; co - cotyledon; bp - bud primordium; psl - primary scale leaf; sa - shoot apex; p - parenchymatous cells; ve - vascular elements



2. (A) Distinct shoot buds covered by primary scale leaves. (B) Development of shoots (arrows) on „shoot elongation medium“ (MSB with 5 μ M BAP and 0.1 μ M NAA). (C) Differentiation of shoot buds with multiple tips, probably developing into flower buds *in vitro*. (D) Direct flower bud and flower formation from organogenic calli.

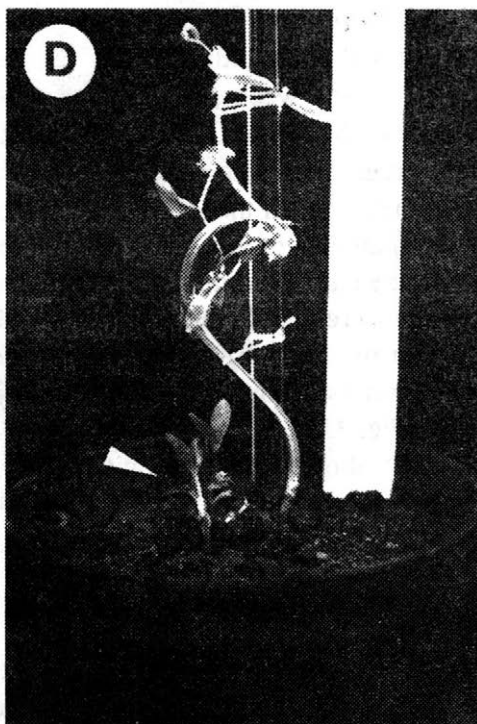
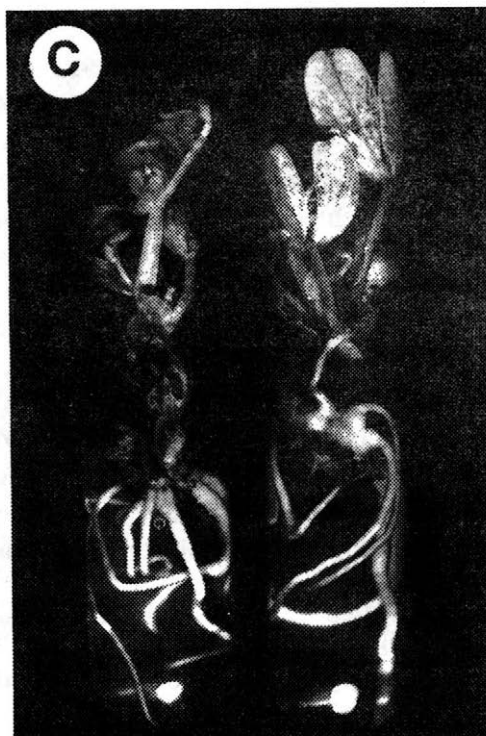
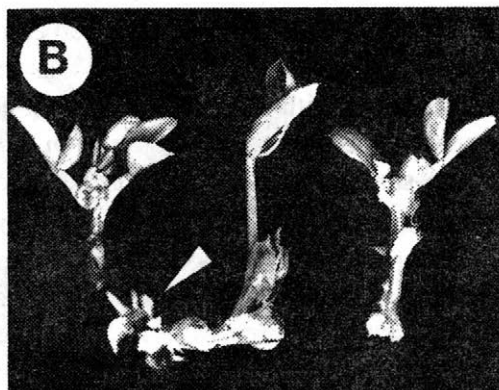
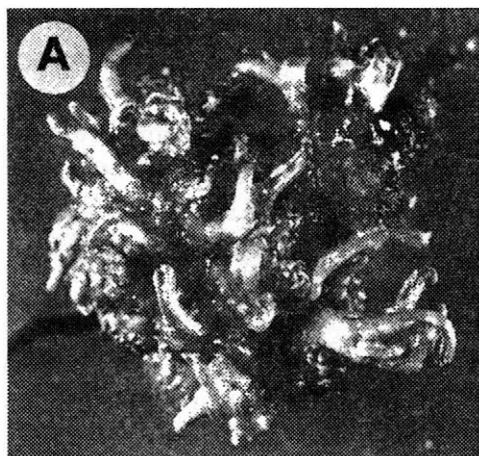
sa - shoot apex; b - shoot bud; psl - primary scale leaf; ve - vascular elements

length), MSB with 0.1 μM NAA and 5 μM kinetin (1 cm) and MSB with 10% v/v coconut milk (1 cm). The flower bud formation and flower development directly from callus was often observed on shoot elongation media (Fig. 2D). The root formation on isolated shoots was induced on MSB medium without growth regulators or with 1 μM NAA, but the frequency of rooting was low (10%) and rooted shoots frequently flowered *in vitro*, which limited the success of transfer to non-sterile conditions and further vegetative growth of plantlets.

Subcultivation of organogenic calli on MSB medium without growth regulators (starting after 18 months on EB medium) and repetitive selection of highly organogenic callus lines resulted in habituated, growth regulator-independent morphogenic culture. The callus cultures maintained on EB and MSB medium exhibited no decrease in morphogenic potential (shoot bud formation) after 5.5 years in culture.

Shoot tip - derived cultures: Within the range of 2,4-D concentrations tested, the optimal callus initiation and growth was observed on medium with 4.5 μM 2,4-D. After 4 weeks, the cultures were transferred to MS medium supplemented with 5.4 μM NAA. Undifferentiated cream compact calli gradually changed to light green ones with dark green centres within the 5 months of subculturing on NAA-medium. In this period the culture was represented by pure callus without any remainders of initial explant tissue. After 10 months of culture on NAA-medium, the calli exhibited dark green nodular domes and the first signs of morphogenesis were visible microscopically (15% of cultures). Transfer of morphogenic calli on modified BKZ medium resulted in formation of the globular structures or - the most frequently - shoot buds. Individual calli differentiated numbers of buds (Fig. 3A), of which 1 to 2 shoots per explant usually elongated and reached a length about 1 to 2 cm within four weeks. Selection of viable morphogenic explants on NAA or BKZ medium and subculturing them on the same media led to establishment of 100% morphogenic culture, whose organogenic capacity was stable during the long-term culture (3 years).

Elongating shoots from cultures of different age were excised and rooted on various rooting media (Fig. 3B, C), the best frequency of rooting being obtained in MSB medium without growth regulators (28%), 1/2 MSB medium with 1 μM NAA (25%) and 1/2 MS medium with 0.5 μM NAA and 2.3 μM kinetin (20%). The rooting ability of isolated shoots decreased with the age (number of subcultures) of organogenic calli. A serious obstacle preventing the completion of the whole regeneration cycle (similarly as in zygotic embryo-derived calli) was flower bud formation and subsequent flowering of shoots on regeneration and / or rooting media. The flowering shoots usually finished their vegetative growth, which was connected with successive flower and leaf senescence. Rooted shoots (complete plantlets) were successfully established in the soil (Fig. 3D).



3. (A) Shoot-tip derived organogenic callus; elongation of shoots on BKZ medium. (B) Well developed faba bean shoots (1 week on rooting medium; see root initiation - arrow). (C) Complete faba bean plantlets (MSB medium without growth regulators). (D) Faba bean regenerated plant established in the soil; two axillary shoots emerged from the main shoot basis (arrow).

DISCUSSION

Reproducible *de novo* regeneration is a necessary condition for application cell and gene technology in faba bean improvement (Heszky et al., 1988; Huyghe, 1990; Christou, 1992). The need for effective regeneration system is evident mainly in transformation experiments, which are very time-consuming in grain legumes (Pionti-Kaerlas et al., 1990; Pickardt et al., 1991).

Papers published earlier (Galzy, Hamoui, 1981; Schulze et al., 1985; Busse, 1986) described either (1) regeneration via stimulation of growth of organized meristems in explant (shoot apical meristem, axillary meristems of primary scales and cotyledons) or (2) regeneration from initial or short-term callus derived from explants mentioned above; participation of meristems persisting in callus in regeneration cannot be unambiguously excluded if histological evidence is not available. The attempts to obtain faba bean regenerants via somatic embryogenesis from cotyledon-derived callus failed due to inability of somatic embryos to undergo normal development and conversion (Griga et al., 1987; Griga, unpublished results).

The genotype responsiveness as well as organ sensitivity in relation to regeneration *in vitro* still plays an important role in grain legumes. The choice of the initial explant is mostly restricted to immature zygotic embryos (Christou, 1992) or shoot tips (Kysely, Jacobsen, 1990; Pickardt et al., 1989). The attempts to induce morphogenic callus from other organs / tissues mostly failed (Taha, Francis, 1990; Busse, 1986; Fakhr ai et al., 1989; Griga, 1990).

In recent experiments we observed the formation of globular embryos in certain stages of callus differentiation in both regeneration systems. The structures observed were attached by a relatively broad base to the callus tissue (Fig. 1C), which could suggest a multicellular origin of embryos (Williams, Maheswaran, 1986). In addition, the arrangement of embryos into clumps suggests the possible embryo formation via cleavage polyembryony from callus nodules or somatic proembryos (Erdelská, Vidovencová, 1992). However, up to date we were not able to regulate effectively the following development or conversion of these embryos. Nevertheless, the culture schemes used (auxins applied, sequence of media) are very similar to those successfully used in other grain legumes and it is probable that a somatic embryo developmental programme also exists in the faba bean genetic background. The proof of true somatic embryo initiation should be done by the detection of specific storage proteins typical for seeds and expressing also in somatic embryos (Stuart et al., 1988; Krochko et al., 1992; Stejskal, Griga, 1992).

The interesting result is a habituation of morphogenic callus (loss of requirements for exogenous auxin and cytokinin in long-term culture), a phenomenon, which was not reported by other authors dealing with faba bean regeneration (Galzy, Hamoui, 1981; Fakhr ai et al., 1989; Busse, 1986) so far.

Regeneration activity is expressed predominantly in superficial layers of morphogenic callus (Fig. 1C, D); these calli containing meristematic centres (bud primordia) could be quickly multiplied similarly as in pea (Hussey, Gunn, 1984).

The critical step for grain legumes in culture is the limited shoot elongation (Cheng, Saka, 1980; Kalantidis, Griga, 1993) and rapid transition to generative developmental phase (Hussey, Gunn, 1984; Griga, 1988a, b). The histological study revealed the development of shoot buds with multiple tips (Fig. 2C) covered by primary scale leaves. We assume these structures preferentially went through from vegetative to generative phase and differentiated flower buds *in vitro* (4 to 5 flower buds on shortened stem). The difficulties with rhizogenesis in shoots from long-term culture we recently tried to solve by grafting *in vitro* shoot onto decapitated faba bean seedling of the same genotype (unpublished data).

The possibility of *de novo* regeneration from undifferentiated callus tissue, as well as location of regeneration initiation sites in superficial callus cell layers, makes the system described above a suitable tool for *Vicia faba* transformation experiments.

Acknowledgement

The authors wish to express their special thanks to Miss J. Vysloužilová and Mrs. J. Vychodilová for excellent technical assistance.

References

- ALBRECHT, C. - KOHLENBACH, H. W.: Induction of somatic embryogenesis in leaf-derived callus of *Vicia narbonensis* L. Pl. Cell Rep., 8, 1989: 267-269.
- BARWALE, U. B. - KERNS, H. R. - WIDHOLM, J. M.: Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta, 167, 1986: 473-481.
- BUSSE, G.: *In vitro* cultivation of *Vicia faba* and induction of morphogenesis. Biol. Zbl., 105, 1986: 97-104.
- CHENG, T. Y. - SAKA, H. - VOQUI-DINH, T. H.: Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. Pl. Sci. Lett., 19, 1980: 91-99.
- CHRISTOU, P.: Genetic engineering and *in vitro* culture of crop legumes. Lancaster - Basel, Technomic Publ. 1992.

- ERDELSKÁ, O. - VIDOVENCOVÁ, Z.: The polyembryonic character of somatic embryogenesis. In: GRIGA, M. - TEJKLOVÁ, E. (eds): Regulation of Plant Somatic Embryogenesis. Šumperk, VÚTPL 1992: 78-79.
- FAKHRAI, H. - FAKHRAI, F. - EVANS, P. K.: *In vitro* culture and plant regeneration in *Vicia faba* subsp. *Equina* (var. Spring Blaze). J. Exp. Bot., 40, 1989: 813-817.
- GALZY, R. - HAMOUI, M.: Induction de l'organogénèse sur des cals de *Vicia faba minor* provenant d'apex. Can. J. Bot., 59, 1981: 203-207.
- GRIGA, M.: Auxin-cytokinin regulation of *in vitro* morphogenesis in *Vicia faba* meristem-tip culture. In: KUTÁČEK, M. - BANDURSKI, R. S. - KREKULE, J. (eds): Physiology and Biochemistry of Auxins in Plants. Praha, Academia 1988a: 293-294.
- GRIGA, M.: The study of differences in regeneration potential of various *Vicia faba* L. genotypes in meristem-tip culture *in vitro*. Rostl. Vyr., 34, 1988b: 613-626.
- GRIGA, M.: The study of *in vitro* regeneration systems in pea, horse bean and soybean. Brno, Masaryk University, Ph. D. Thesis 1990.
- GRIGA, M. - KUBALÁKOVÁ, M. - TEJKLOVÁ, E.: Somatic embryogenesis in *Vicia faba* L. Pl. Cell Tissue Organ Cult., 9, 1987: 167-171.
- HESZKY, L. - MOLNAR, Z. - MANNINGER, S. - POCSAI, K. - HOLLY, L.: The situation of research and application of biotechnological methods in the breeding of broad beans (*Vicia faba* L.). Növénytermelés, 37, 1988: 71-82.
- HUYGHE, C.: Les cultures *in vitro* chez les légumineuses à grosses graines. Agronomie, 10, 1990: 29-49.
- HUSSEY, G. - GUNN, H. V.: Plant production in pea (*Pisum sativum* L. cvs. Puget and Upton) from long-term callus with superficial meristems. Pl. Sci. Lett., 37, 1984: 143-148.
- KALANTIDIS, K. - GRIGA, M.: Micropropagation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by multiple shoot induction. Rostl. Vyr., 38, 1993: 115-128.
- KROCHKO, J. E. - PRAMANIK, S. K. - BEWLEY, J. D.: Contrasting storage protein synthesis and messenger RNA accumulation during development of zygotic and somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Pl. Physiol., 99, 1992: 46-53.
- KYSELY, W. - JACOBSEN, H. J.: Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. Pl. Cell Tissue Organ Cult., 20, 1990: 7-14.
- LAZZERI, P. A. - HILDEBRAND, D. F. - COLLINS, G. B.: A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. Pl. Molec. Biol. Rep., 3, 1985: 160-167.
- PHILLIPS, G. C. - COLLINS, G. B.: *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci., 19, 1979: 59-64.
- PICKARDT, T. - HUANCARUNA-PERALES, E. - SCHIEDER, O.: Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Vicia narbonensis*. Protoplasma, 149, 1989: 5-10.
- PICKARDT, T. - MEIXNER, M. - SCHADE, V. - SCHIEDER, O.: Transformation of *Vicia narbonensis* via *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Pl. Cell Rep., 9, 1991: 535-538.
- PUONTI-KAERLAS, J. - ERIKSSON, T. - ENSTRÖM, P.: Production of transgenic pea (*Pisum sativum* L.) plants by *Agrobacterium tumefaciens* - mediated gene transfer. Theor. Appl. Genet., 80, 1990: 246-252.
- STEJSKAL, J. - GRIGA, M.: Biochemical characterization of soybean somatic embryogenesis: Analysis of several isoenzyme systems and detection of seed storage proteins. In: GRIGA, M. - TEJKLOVÁ, E. (eds): Regulation of Plant Somatic Embryogenesis, Šumperk, VÚTPL 1992: 111-115.

- STUART, D. A. - NIELSEN, J. - NICHOL, J. W.: Expression of 7S and 11S alfalfa seed storage proteins in somatic embryos. *J. Pl. Physiol.*, 132, 1988: 134-139.
- SCHULZE, S. - GRUNEWALDT, J. - SCHMIDT, H.: Zur *in vitro* Regeneration von *Vicia faba* L. *Z. Pfl.-Zücht.*, 94, 1985: 244-250.
- TAHA, R. M. - FRANCIS, D.: The relationship between polyploidy and organogenetic potential in embryo- and root-derived tissue cultures of *Vicia faba* L. *Pl. Cell Tissue Organ Cult.*, 22, 1990: 229-236.
- THYNN, M. - WERNER, D.: Plantlet regeneration and somatic differentiation in faba bean (*Vicia faba* L.) from callus culture of various explants. *Angew. Bot.*, 61, 1987: 483-492.
- WILLIAMS, E. G. - MAHESWARAN, G.: Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57, 1986: 443-462.

Received on March 17, 1994

GRIGA, M. - KLENOTIČOVÁ, H. (Výzkumný ústav technických plodin a luskovin, Šumperk):

Regenerace rostlin v kalusových kulturách bobu obecného (*Vicia faba* L.)

Rostl. Výr., 40, 1994 (8): 697-709.

Byla vyvinuta metoda *de novo* regenerace v kalusové kultuře bobu obecného (*Vicia faba* L., bílekvetoucí linie 6806 a 6823 s nízkým obsahem taninu). Kalus byl indukován (A) z nezralých zygotických embryí na EB médiu (Barwale et al., 1986) se 40 μM kyseliny 2,4-dichlorofenoxyoctové (2,4-D) a (B) ze vzrostných vrcholů aseptických klíčenců na MS médiu se 4,5 μM 2,4-D a následným přenosem na MS médium s 5,4 μM kyseliny α -naftyloctové (NAA) (Pickardt et al., 1989). V obou případech byla během několika následných subkultur získána dobře rostoucí čistá kalusová kultura bez přítomnosti pletiv výchozího explantátu. Po 100 dnech kultivace kalusu odvozeného z nezralých embryí na EB médiu docházelo ke spontánní iniciaci embryoidů (obr. 1A) a pupenových primordií (obr. 1B). Oba způsoby *de novo* regenerace (somatická embryogeneze, organogeneze) byly potvrzeny histologickými studiemi (obr. 1C, D). Snaha o podporu vývoje a konverzi embryoidů nebyla úspěšná. Organogenní kultury se vyznačovaly limitovaným prodlužovacím růstem založených pupenů, proto byly subkultivovány na média s cytokininy (zeatin, kinetin, 6-benzylaminopurin (BAP) v koncentraci 5 μM) nebo kokosovým mlékem (10 % v/v) doplněná nízkou hladinou NAA (0,1 μM). Na uvedených médiích docházelo k uspokojivému prodlužování prýtů (1 až 5 cm; obr. 2B), které byly následně zakořeněny na MSB médiu bez růstových regulátorů či s 1 μM NAA (frekvence 10 %) a získány kompletní rostliny.

U kalusu odvozeného ze vzrostných vrcholů docházelo po 10 měsících kultivace na NAA médiu k tvorbě embryoidů a pupenových primordií (obr. 3A). Ani v tomto případě se nepodařilo embryoidy dopěstovat do fáze kompletních rostlin. Vývoj prýtů v organogenní kultuře byl podpořen subkultivací na modifikované BKZ médium se zeatinem, kinetinem, BAP a NAA (Lazzeri et al., 1985; Pickardt et al.,

1989). Dostatečně vyvinuté prýty (2 cm) byly zakořeněny na MSB médiu bez růstových regulátorů či 1/2 MS médiu s 0,5 až 1 μ M NAA, případně doplněného kinetinem (frekvence kořenění 20 až 28 %; obr. 3B, C). Kompletní rostliny byly převedeny do zeminy a aklimatizovány ve skleníku (obr. 3D).

Selekcí a multiplikací morfogenních explantátů byly získány v kulturách obou původů dlouhodobé kultury (A - 5,5 roku, B - 3 roky) disponující vysokým a stabilním regeneračním potenciálem (organogeneze). V kultuře (A) byla navíc získána habituovaná kalusová linie s dobrou regenerační schopností v dlouhodobé kultuře bez požadavku na exogenní auxin a cytokinin.

Kritickými momenty obou regeneračních protokolů je (1) limitovaný prodlužovací růst založených pupenů, (2) vysoký výskyt fenoménu kvetení *in vitro* (obr. 2D), který znesnadňuje převod kvetoucích prýtů do nesterilních podmínek, (3) snižující se schopnost rhizogeneze u prýtů z dlouhodobé kultury. Samostatným problémem vyžadujícím další studium je regulace vývoje embryoidů a jejich konverze; skutečnost, že bělokvěté linie bobu disponují schopností somatické embryogeneze, byla však prokázána již dříve (G r i g a et al., 1987).

Schopnost *de novo* regenerace z nediferencovaného kalusu, vysoký regenerační potenciál v dlouhodobé kultuře a lokalizace regenerace v povrchových buňkách kalusu vytváří z obou regeneračních protokolů vhodný systém pro transformační experimenty u bobu.

Contact Address:

RNDr. Miroslav G r i g a , CSc., Výzkumný ústav technických plodin a luskovin,
Zemědělská 16, 787 01 Šumperk, Česká republika, tel.: 0649/45 12, fax: 0649/59 75

PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY

A. L. Lehninger, D. C. Nelson, M. M. Cox

New York, Worth Publ. Inc. 1992, 1012 s.

Druhé vydání monografie Biochemie navazuje na předcházející známé vysokoškolské učebnice prof. A. L. Lehningera, které vycházely periodicky v doplněných a přepracovaných vydáních více než tři desítky let. Na konci 70. let překročila publikace prof. A. L. Lehningera rámec učebnice a stala se jakýmsi kompendiem. Autor proto v roce 1982 vydal stručnější a pedagogicky propracovanější publikaci *Principles of Biochemistry*, která výborně sloužila, ale časem přece jen trochu zastarala. Po smrti autora se úpravy učebnice ujali dva profesori biochemie na Wisconsinské univerzitě v Madisonu.

Kniha dodržuje Lehningerovo klasické členění, které autoři považují stále ještě po pedagogické stránce za nejlepší. Autoři jiných učebnic biochemie již přešli na modernější výklad, založený na přenosu genetické informace jakožto základním biochemickým pochodu, od něhož se ostatní aspekty tzv. chemie života odvíjejí. Tato kniha je naproti tomu členěna do čtyř částí, přičemž statická biochemie a metabolismus tvoří první tři části a čtvrtá část je věnována přenosu genetické informace. Jde tedy o koncept klasický, sledující víceméně chronologický vývoj biochemie, jak se učí i u nás.

Kniha je dobře propracována, na každé stránce jsou barevné ilustrace, četná schémata, fotografie a informativní tabulky. Grafické stránce knihy bylo zjevně věnováno mnoho pozornosti nejen z estetického hlediska, ale především z hlediska pedagogického.

Oproti prvnímu vydání je tato kniha v mnohém modernizována, jsou zařazeny některé zcela nové kapitoly (např. o molekulárních mechanismech přenosu signálů). Kniha má vysoce didaktickou úroveň, je v ní zachováno klasické členění biochemie a obsahuje řadu nejnovějších vědeckých poznatků. Stane se jistě užitečnou pomůckou nejen pro vědecké pracovníky, ale i pro ostatní čtenáře, kteří se o biochemii ve své práci opírají.

Doc. RNDr. ing. Josef Zahradníček, CSc.

ODEZVA BRAMBORŮ NA STRES SUCHEM ZVÝŠENOU HLADINOU PROLINU V HLÍZÁCH

J. Zrůst

Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod

V polním pokusu a v pěti variantách skleníkových pokusů s možností klimatizace byl zjišťován obsah prolinu v hlízách brambor. Skleníkové pokusy byly realizovány v letech 1986 až 1992 většinou se čtyřmi odrůdami. Do polního pokusu v roce 1990 bylo zařazeno 11 odrůd. Ve skleníkových pokusech byl obsah prolinu v hlízách ovlivněn ve všech letech stresem sucha a zvyšoval se se snižující se půdní vlhkostí. Mezi odrůdami byly zjištěny vysoce průkazné rozdíly v obsahu prolinu. Odrůda Désirée ve skleníkových pokusech a odrůdy Ibis a Désirée v polním pokusu, které jsou známé odolností vůči přísuškům, měly nejvyšší obsah prolinu. Výsledky naznačují, že změny nastávající v obsahu prolinu v hlízách jako odezva na stres sucha by mohly mít význam při identifikaci odolných, resp. citlivých odrůd brambor vůči suchu.

Nepříznivé podmínky velmi často značně ovlivňují růst a vývoj plodin, a tím i jejich výnosy v závislosti na období ontogeneze rostlin. Negativní vliv na popsané projevy je výraznější v citlivém období růstu rostliny.

V našich podmínkách je nejzávažnějším limitem při pěstování bramborů nedostatek dešťových srážek. Cílené šlechtění na odolnost vůči suchu předpokládá výběr a testování kříženců bramborů ve stresových podmínkách nedostatku vláhy. Prověřují se jednotlivé bílkoviny, které by mohly mít význam pro odolnost vůči suchu.

Někteří autoři (např. Stewart, Hanson, 1980; Levy, 1983) připisují významnou indikační úlohu aminokyselině prolinu, jejíž zvýšená hladina je dávana do přímého vztahu k odolnosti rostlin vůči suchu. Prolin může zvyšovat odolnost rostlin také vůči dalším stresům.

Akumulace volného prolinu v rostlinách nacházejících se ve stresu sucha byla poprvé zjištěna v roce 1954 u žita, později u dalších plodin. Pahlich, Grieb (1983) pracovali např. s kukuřicí a z dosažených výsledků usoudili, že ztráta turgoru způsobuje tzv. metabolický zmatek v rostlině, což nakonec vede ke zvýšení obsahu prolinu ve stresovaných kořenech. V pokusech s kulturou buněk z rajčat Handa et al. (1986) zjistili, že úroveň prolinu zůstala vysoká po více než 100 buněčných generací při nízkém vodním potenciálu média, ale rychle klesala při přenosu do média s méně negativním vodním potenciálem.

Výsledky naznačily pozitivní roli akumulace prolinu pro adaptaci buněk na měnící se vnější vodní potenciál.

Naopak např. Balasimha (1983) a Bansal, Nagarajan (1986) nezjistili ve svých pokusech pozitivní korelaci výše obsahu prolinu s tolerancí vůči suchu a tvrdí, že akumulace prolinu nemůže být použita jako testovací metoda na odolnost odrůd vůči suchu.

Cílem práce bylo prověřit obsah prolinu v hlízách jako odrůdovou reakci rostlin bramboru na stres způsobený suchem.

MATERIÁL A METODA

V prvních čtyřech letech (1986 až 1989) jsme do skleníkového pokusu s vegetačními nádobami vybrali čtyři odrůdy s rozdílnou délkou vegetační doby i užitkového směru pěstování, a to dvě z našeho a dvě ze zahraničního šlechtění: Resy (velmi raná, konzumní, Nizozemsko), Radka (poloraná, konzumní, ČR), Désirée (polopozdní, konzumní, Nizozemsko, doporučovaná pro pěstování v aridních oblastech), Kamýk (pozdní, průmyslová, ČR).

V roce 1990 jsme do skleníkového pokusu zařadili šest odrůd: Resy (velmi raná, konzumní, Nizozemsko), Désirée (polopozdní, konzumní, Nizozemsko), Kamýk (pozdní, průmyslová, ČR), Karin (raná, konzumní, ČR), Svatava (poloraná, konzumní, ČR) a Ibis (poloraná, konzumní, Polsko, snášející dobře přísušky).

V roce 1990 jsme rovněž založili polní pokus s 11 odrůdami: Resy (Nizozemsko), Klára (ČR), Koruna (ČR), Ausonia (Nizozemsko), Gloria (SRN) - velmi rané; Karin (ČR) - raná; Svatava (ČR), Lada (ČR), Ibis (Polsko) - polorané; Désirée (Nizozemsko) - polopozdní; Kamýk (ČR) - pozdní. V dalších dvou letech (1991 a 1992) jsme pokračovali v pokusech s odrůdami zařazenými již dříve: Resy, Karin, Désirée a Kamýk.

Skleníkový pokus v rozsahu devíti variant (tab. I) po deseti nádobách od každé varianty byl uspořádán do osmi bloků, v nichž byly odrůdy i varianty náhodně rozmístěny. Do vegetačních nádob bylo použito 14 kg vrstvy ornice (do 20 cm) z těch partií pole, na nichž tentýž rok proběhly polní pokusy s brambory. Nádoby byly plněny na jaře před výsadbou. Pro zajištění dobré výživy v omezeném prostoru vegetačních nádob (10 l) jsme do nádob přidávali živiny (týden před výsadbou): 0,4571 g N, 0,3017 g P a 0,7589 g K.

Relativní půdní vlhkost v procentech (RPV) byla zjišťována ve dvou- až tří-denních intervalech během celého vegetačního období gravimetrickou metodou, kterou popsal Novák (1954), a to ze tří vegetačních nádob každé odrůdy z varianty kontrolní (první) a z variant, u nichž byla udržována snížená RPV. Voda byla do nádob doplňována po zjištění deficitu a ve slunných dnech s vysokou evapotranspirací každý druhý den.

Varianty půdní vlhkosti ¹	Relativní půdní vlhkost v období vývoje ² (%)			
	a	b	c	d
1	75	75	75	75
2	50	75	75	75
3	30	75	75	75
4	75	50	75	75
5	75	30	75	75
6	75	75	50	75
7	75	75	30	75
8	75	75	75	50
9	75	75	75	30

období vývoje - developmental periods:

a - od výsadby do vzejití rostlin - planting to emergence

b - od vzejití rostlin do tvorby poupát - emergence to bud formation

c - od tvorby poupát do plného květu - bud formation to full flowering

d - od plného květu do fyziologického dozrání - full flowering to physiological maturity

¹treatments of soil moisture, ²relative percentage of the soil moisture in single developmental periods

Momentální stav vodní bilance pokusných rostlin byl kontrolován stanovením vodního sytostního deficitu (VSD) v týdenních intervalech podle postupu, který publikoval Č a t s k ý (1960), a sice syčením vyseknutých terčků o velikosti 50 mm² z listového pletiva ve vlhké plotně z polyuretanové pěny.

Od fáze tvorby poupát (patrné okem) až do fyziologické zralosti jsme u variant 6 až 9 stanovili v odebraných hlízách obsah volného prolinu podle metody, kterou popsali G ö r i n g , P l e s c h n e r (1986) a modifikovali T r o l l , L i n d s l e y (1955). Uvedená metoda používá materiál získaný z 500 mg vzorku cortexu (korové vrstvy) pěti hlíz. Měření prolinu u variant, ve kterých působil stres sucha od výsadby až do tvorby poupát, nebylo prováděno, neboť se hlízy v té době ještě netvořily.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Hodnoty relativní půdní vlhkosti bylo velmi nesnadné zajistit bez automatického přívodu závlivky do vegetačních nádob. Pro porovnání vodního provozu rostliny s půdní vlhkostí jsme proto využili vodního sytostního deficitu (VSD),

jímž lze vyjádřit i absolutní množství vody, které rostlině chybí do plného nasycení (tab. II). Dosycovací křivky terčků z listů sklizených před fyziologickou zralostí nedosahují hodnot listů relativně mladších (Č a t s k ý , 1962). Po celou vegetaci jsme proto odebírali terčky vždy z již dospělých listů - ze čtvrtého až pátého listu (počítáno od vrcholu rostliny), u kterých je i rychlost fotosyntézy nejvyšší (Z r ů s t , 1973). Eliminovali jsme tak chyby při stanovení VSD z mladých, dlouživě rostoucích listů, které přijímají vodu podstatně déle.

II. Procento vodního sytostního deficitu v listech rostlin bramboru – The percentage of water saturation deficit in leaves of potato plants

a) pět dnů před odběrem hlíz ke zjištění obsahu prolinu při stresu sucha v období od objevení se poupát do květu v roce 1988 – five days before tuber taking for establishment of proline content under the drought stress in period from bud appearance to flowering in 1988

b) 11 dnů před odběrem hlíz při sklizni ke zjištění obsahu prolinu při stresu sucha v období od květu do fyziologické zralosti v roce 1988 – 11 days before tuber taking at harvest for establishment of proline content under the drought stress in period from flowering to physiological maturity in 1988

	Varianty půdní vlhkosti ¹	Odrůdy ²							
		Resy		Radka		Désirée		Kamýk	
		$\bar{x}$	s_x	$\bar{x}$	s_x	$\bar{x}$	s_x	$\bar{x}$	s_x
a	1	9,90	2,09	5,05	2,38	12,75	4,33	8,51	1,61
	6	11,53	1,90	12,21	3,97	15,22	3,23	15,75	3,67
	7	15,82	4,64	20,69	2,61	26,83	4,01	23,45	5,55
b	1	1,55	0,75	3,48	2,33	2,09	1,28	1,51	0,57
	8	1,30	0,50	4,38	1,28	4,53	1,52	1,85	1,34
	9	5,05	2,40	8,68	4,87	9,48	3,51	9,18	6,15

¹treatments of soil moisture, ²varieties

Obsah prolinu v hlízách byl ve všech letech ovlivněn stresem sucha, bylo-li vyvoláno jak ve fázi iniciace hlíz a jejich počátečního růstu, tak i v průběhu intenzivního růstu hlíz až do fyziologické zralosti porostu (tab. III). Výsledky poměrně dobře odpovídají naměřeným hodnotám VSD, uvedeným v tab. II u všech čtyř odrůd pro jejich vzájemné porovnání. Obsah prolinu se výrazně zvyšoval se snižující se půdní vlhkostí. V závěru vegetace již tak velké rozdíly mezi variantami nebyly, byly však významné (tab. IV). Také absolutní hodnoty byly nižší zřejmě v důsledku snižujícího se metabolismu rostlin.

Dokumentaci výsledků zhodnocených analýzou variance jsme záměrně vybrali z jiného roku, v němž byly vzorky hlíz odebrány jak z rostlin, které byly podro-

III. Obsah prolinu v hlízách bramboru a jejich výnos ovlivněné rozdílnou půdní vlhkostí –
Proline content in potato tubers and their yield affected by different soil moisture

a) v období tvorby pupat až květu v roce 1988 – in period from bud formation to flowering in 1988

b) v období od květu do fyziologické zralosti v roce 1988 – in period from flowering to physiological maturity in 1988

	Odrůdy ¹	Varianty půdní vlhkosti ²	Obsah prolinu ³ ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)		Hmotnost hlíz jednoho trsu ⁴		Ztráty výnosu oproti kontrole ⁵ (%)
			č. hmotn. ⁶	s_x	g	s_x	
a	Resy	1	2,47	0,37	335,0	52,2	0
		6	12,71	2,93	240,0	10,1	28,36
		7	25,52	2,96	188,7	10,7	43,67
	Radka	1	2,34	0,31	305,3	51,8	0
		6	6,78	1,76	234,7	3,5	23,12
		7	24,66	5,26	163,0	9,6	46,61
	Désirée	1	4,50	1,12	424,7	28,6	0
		6	16,65	2,30	252,3	15,6	40,6
		7	24,58	2,63	161,7	10,5	61,9
	Kamýk	1	1,17	0,19	304,7	49,4	0
		6	3,81	0,85	214,7	13,0	29,54
		7	15,78	2,21	198,7	25,6	34,79
b	Resy	1	2,02	0,23	339,3	23,4	0
		8	1,61	0,20	326,3	18,8	3,83
		9	4,72	1,79	284,0	13,3	16,30
	Radka	1	4,39	0,48	356,0	60,0	0
		8	5,04	0,70	286,3	7,3	19,58
		9	7,01	0,85	235,7	31,6	33,79
	Désirée	1	3,52	0,76	287,0	34,0	0
		8	3,04	0,55	285,0	23,2	0,70
		9	7,44	3,01	263,3	15,4	8,25
	Kamýk	1	2,08	0,30	347,0	15,4	0
		8	2,64	0,14	274,7	45,2	21,04
		9	6,98	2,24	205,3	13,7	40,84

¹ varieties, ² treatments of soil moisture, ³ proline content, ⁴ tuber weight per hill, ⁵ percentage yield losses compared with control, ⁶ weight number

IV. *F*-hodnoty z analýzy rozptylu (průkazné rozdíly podle Tukeyho na 5% a 1% hladině) pro obsah prolinu v hlízách v $\mu\text{mol.g}^{-1}$ čerstvé hmotnosti čtyř odrůd (Resy, Karin, Désirée, Kamýk) v pěti variantách skleníkového pokusu – *F*-values from the analysis of variance (significant differences at 5% and 1% levels using the Tukey's test) for proline content in tubers in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of fresh weight of four varieties (Resy, Karin, Désirée, Kamýk) in five treatments of glasshouse trial

a) odběr hlíz 17. 6. 1991 – tuber taking on June 17, 1991

b) odběr hlíz 3. 7. 1991 – tuber taking on July 3, 1991

	Zdroj proměnlivosti ¹	Stupně volnosti ²	<i>F</i> -hodnoty ³	Průkaznost ⁴
a	R opakování ⁵	5	0,836	
	A varianty ⁶	4	434,099	xx
	B odrůdy ⁷	3	18,077	xx
	A x B	12	17,624	xx
b	R opakování	5	0,811	
	A varianty	2	630,729	xx
	B odrůdy	3	70,466	xx
	A x B	6	68,903	xx

Průkazné rozdíly pro varianty⁸ a: 5% - 0,931; 1% - 1,122; b: 5% - 0,839; 1% - 1,059

xx statisticky vysoce průkazné⁹: ($P < 0,01$)

Průměrné hodnoty obsahu prolinu v hlízách u jednotlivých variant¹⁰ a: 7. var. - 15,126; 6. var. - 8,538; 9. var. - 7,663; 8. var. - 4,125; 1. var. - 2,397; b: 9. var. - 14,765; 8. var. - 8,799; 1. var. - 2,402

Průkazné rozdíly pro odrůdy¹¹ a: 5% - 0,782; 1% - 0,958; b: 5% - 1,067; 1% - 1,313

Průměrné hodnoty obsahu prolinu v hlízách u jednotlivých odrůd¹² a: Désirée - 8,311; Kamýk - 8,254; Karin - 7,294; Resy - 6,420; b: Kamýk - 12,141; Désirée - 8,153; Resy - 7,505; Karin - 6,824

¹ source of variability, ² d. f., ³ *F*-values, ⁴ significance, ⁵ replication, ⁶ treatments, ⁷ varieties, ⁸ significant differences for treatments, ⁹ significant at 0.01 probability level, ¹⁰ average values of proline content in tubers at individual treatments, ¹¹ significant differences for varieties, ¹² average values of proline content in tubers at individual varieties

beny stresům sucha v období od tvorby poupat do plného květu (varianty 6 a 7) a dále až dva týdny potom, co stres sucha skončil, tak zároveň z rostlin, u kterých byla půdní vlhkost snižována v dalším období od plného květu do fyziologické zralosti (varianty 8 a 9), porost se tedy v té době nacházel na konci květu. Hlízy z variant 6 a 7 si ještě uchovávaly vysoký obsah prolinu, kterého hlízy z dalších dvou variant (8 a 9) ještě nedosahovaly, přičemž obsah prolinu byl u nich v té době poloviční (u varianty 8 oproti variantě 6 a u varianty 9 oproti variantě 7).

Hodnoty varianty kontrolní převyšovala v průměru čtyř odrůd varianta 8 dvojnásobně a varianta 9 více než trojnásobně (tab. IVa).

Při odběru o 16 dnů později (3. 7.) byl zjištěn v hlízách z porostu, na který působil stres sucha v době od plného květu do fyziologické zralosti, dvojnásobný obsah prolinu v porovnání se stejnými variantami v předchozím odběru (17. 6.), jak je uvedeno v tab. IVb. V té době byly rostliny těchto variant pod vlivem stresu již téměř čtyři týdny.

Naše výsledky jsou v soulase s údaji z literatury, a to jak pro zdravé rostliny bramboru (D a r , R o s a r i o , 1981; J e r e z et al., 1991), tak pro rostliny nemocné, napadené např. virem svinutky (P e d r i z e t , 1974). Četná pozorování také u jiných kulturních a planě rostoucích druhů rostlin dokazují, že při jakémkoliv stresu se zvyšuje syntéza aminokyseliny prolinu.

V tab. III. jsou uvedeny rovněž výsledky zjištěné při sklizni hlíz po jejich fyziologickém dozrání v přepočtu na jeden trs a v přepočtu procentuální ztráty výnosu oproti kontrole. Rozdíly mezi variantami v hmotnosti hlíz odpovídají výši stresu. Rozdíly mezi odrůdami souvisejí v případě variant, u nichž stres sucha působil v období tvorby pupat až do plného květu, jak s délkou vegetační doby dané odrůdy, a tedy s její možností eliminovat tento stres svým dalším intenzivním růstem v příznivých podmínkách, tak i s citlivostí odrůdy na suchu v určitém období svého vývoje. Stres působící na konci vegetace urychlil zrání porostů a způsobil ztráty na výnosu podle citlivosti odrůd k půdnímu suchu. V takovýchto podmínkách potvrdila odrůda Désirée svoje přednosti.

Mezi odrůdami byly zjištěny rovněž vysoce průkazné rozdíly v obsahu prolinu (tab. IV, V). V převážné většině měření vykazovala odrůda Désirée jeho nejvyšší obsah. V polním pokusu se obě odrůdy, jejichž odolnost k přísuškům je známá (Ibis a Désirée), rovněž umístily na prvních místech v obsahu prolinu (tab. V). V mnohých případech tak byla hladina prolinu v přímém vztahu k odolnosti vůči suchu, což vede k úvahám o možnosti sledovat hladinu prolinu v cíleně zaměřených zkouškách a využít tohoto vztahu při identifikaci kříženců odolnějších vůči suchu.

Při velkém stresu (30 % RPV) se rozdíly mezi odrůdami stíraly, o čemž svědčí hodnoty získané u variant 7 a 9 (tab. III), kdežto při mírném stresu (50 % RPV) byly rozdíly mezi odrůdami velké (varianty 6 a 8). V jednotlivých letech i odběrech během jedné vegetace docházelo častěji k rozdílným v hodnotách obsahu prolinu u odrůd a pořadí odrůd podle výše obsahu prolinu nebylo většinou zachováno. Tato skutečnost je v soulase se zjištěným citovanými autory, kteří neprokázali ve svých pokusech pozitivní korelaci výše obsahu prolinu s tolerancí vůči suchu. Vyskytovaly se i názory, že obsah prolinu je pouze symptomem silného vnitřního stresu, z čehož lze vyvodit, že existuje malá pravděpodobnost, že by byl účinným ochranným činitelem během počátečních stadií vývoje stresu, a tudíž nemá praktický význam pro šlechtění na rezistenci vůči suchu.

V. *F*-hodnoty z analýzy rozptylu (průkazné rozdíly podle Tukeyho na 5% a 1% hladině) pro obsah prolinu v hlízách v $\mu\text{mol.g}^{-1}$ čerstvé hmotnosti 11 odrůd brambor pěstovaných v polním pokusu; odběr hlíz 25. 7. 1990 – *F*-values from the analysis of variance (significant differences at 5% and 1% levels using the Tukey's test) for the proline content in tubers in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of fresh weight of 11 potato varieties grown in field experiment; tuber taking on July 25, 1990

Zdroj proměnlivosti ¹	Stupně volnosti ²	<i>F</i> -hodnoty ³	Průkaznost ⁴
R opakování ⁵	1	1,280	
B odrůdy ⁶	10	3,222	x

Průkazné rozdíly pro odrůdy⁷: 5% - 4,751; 1% - 6,114

x statisticky průkazné⁸: ($P < 0,05$)

Průměrné hodnoty obsahu prolinu v hlízách u jednotlivých odrůd⁹: Ibis - 6,333; Désirée - 5,183; Lada - 4,866; Svatava - 4,433; Kamýk - 3,667; Klára - 3,567; Koruna - 3,383; Resy - 2,633; Karin - 2,167; Gloria - 2,133; Ausonia - 1,417

For 1 - 4 see Tab. IV, ⁵replication, ⁶varieties, ⁷significant differences for varieties, ⁸significant at 0.05 probability level, ⁹average values of proline content in tubers at individual varieties

Akumulace prolinu jako kritérium odolnosti byla podrobena rozsáhlé diskusi, z níž vyplývá předpoklad, že prolin jako prekurzor chlorofylu je zdrojem energie a dusíku po stresu - pro regeneraci tkání, stabilizuje membrány a působí jako inertní osmotikum proti dehydrataci cytoplazmy - podporuje zřejmě osmotické přizpůsobení. Řešení problému, zda prolin má nebo nemá praktický význam pro šlechtitele, není jednoznačně uzavřeno. Naše výsledky spíše podporují názor, že změny nastávající v obsahu prolinu v hlízách jako odezva na stres sucha by mohly přispět k identifikaci odolnosti nebo citlivosti vůči suchu u bramborů.

Pro vyvození jednoznačného závěru by bylo třeba ověřit výsledky rozsáhlejšími pokusy v řízených podmínkách s polovinou odrůd vyžadujících pro dosažení uspokojivého výnosu dobré zásobení vodou a s polovinou odrůd snášejících přísušky, aniž by byl výnos ohrožen. Náhradou za takové pokusy by mohlo být víceleté sledování těchto odrůd v polních pokusech s proměřováním výše hladiny prolinu.

Literatura

- BALASIMHA, D.: Proline accumulation in water stressed potatoes. *J. Indian Potato Assoc.*, 10, 1983: 56-59.
- BANSAL, K. O. - NAGARAJAN, S.: Leaf water content, stomatal conductance and proline accumulation in leaves of potato (*Solanum tuberosum* L.) in response to water stress. *Indian J. Pl. Physiol.*, 29, 1986: 397-404.

- ČATSKÝ, J.: Determination of water deficit in disks cut out from leaf blades. *Biol. Plant.*, 2, 1960: 76-78.
- ČATSKÝ, J.: Leaf - disk method for determining water saturation deficit. *Int. Symp. Meth. Pl. Eco-Physiol.* Montpellier, 1962.
- DAR, W. D. - ROSARIO, D. A. DEL: Response of white potato (*Solanum tuberosum* L.) to moisture stress. *Philipp. Agric.*, 64, 1981: 125-134.
- GÖRING, H. - PLESCHNER, F.: Proline accumulation induced by weak acids and IAA in coleoptiles of wheat seedlings. *Biol. Plant.*, 28, 1986: 401-406.
- HANDA, S. - HANDA, A. K. - HASEGAWA, P. M. - BRESSAN, R. A.: Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Pl. Physiol.*, 80, 1986: 938-945.
- JEREZ, E. - TORRES, W. - DELL' AMICO, J. - MORALES, D.: Indicadores fisiológicos y bioquímicos en el cultivo de la papa en respuesta al estrés hídrico. *Cult. Trop.*, 12, 1991: 21-26.
- LEVY, D.: Water deficit enhancement of proline and amino nitrogen accumulation in potato plants and its association with susceptibility to drought. *Physiol. Plant.*, 57, 1983: 169-173.
- NOVÁK, V.: Voda v půdě - vodní režim půdní. In: KLIKA, J. - NOVÁK, V. - GREGOR, A. (eds): *Praktikum fytoecologie, ekologie, klimatologie a půdoznalství*. Praha, NČSAV 1954: 440-484.
- PAHLICH, E. - GRIEB, B.: Turgor pressure and proline accumulation in water stressed plants. *Angew. Bot.*, 57, 1983: 295-299.
- PEDRIZET, E.: Vlivy nedostatečnosti chlorofyllu na metabolismus prolina u vyšších rostlin. *Fiziol. Rast.*, 21, 1974: 61-68.
- STEWART, C. E. - HANSON, A. D.: Proline accumulation as a metabolic response to water stress. In: TURNER, N. C. - CRAMER, P. J. (eds): *Adaptations of plants to water and high temperature stress*. New York, Wiley Interscience 1980: 173-184.
- TROLL, W. - LINDSLEY, J.: J. Biol. Chem., 215, 1955: s. 655. In: BATES, L. S. - WALDREN, R. P. - TEARE, I. D.: Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Pl. and Soil*, 39, 1973: 205-207.
- ZRŮST, J.: Vliv umístění listů na proměnlivost hodnot rychlosti fotosyntézy u brambor. *Rostl. Výr.*, 19, 1973: 243-252.

Došlo 17. 3. 1994

ZRŮST, J. (Potato Research Institute, Havlíčkův Brod):

Response of potato plants to drought stress by increased proline level in tubers.

Rostl. Výr., 40, 1994 (8): 711-720.

Proline content in tubers was investigated in the field trial, and in five treatments of greenhouse trials with the possibility of climatization. In the greenhouse trials (1986 to 1992) there were planted mostly four varieties and in the field trial (1990) 11 varieties were planted. As for comparison and examination of plant water regime at planned different soil moisture, water saturation deficit determined according to progress of Č a t s k ý (1960), was used.

In the greenhouse trials, it was found out that proline content in tubers was affected by drought stress in all years, being effective both at tuber initiation and their initial

growth, and during their intensive growth up to physiological maturity of the crop. Proline content was significantly increased with decreasing soil moisture or with increasing drought stress, resp. Much greater differences in tuber proline content among treatments were shown at drought stress in period of bud formation to full flowering, rather than stress being effective in the end of vegetation. Highly conclusive differences in proline content were also found among varieties. In a greater part of measurements, variety Désirée, grown in the greenhouse trials, showed its highest content. In the field trial, varieties known for their resistance to drought (Ibis and Désirée), placed on the first places among varieties in proline content.

At a high stress (30% relative soil moisture), any high differences between varieties were not shown, but at a moderate stress (50%) they were shown. In individual years and samplings during one vegetation period, more frequently differences were in values of proline content in individual varieties and variety sequence according to proline content level did not remain the same.

Decision, whether proline accumulation has or has not any practical significance for breeders, is not unambiguously set. Some authors (for example, Stewart, Hanson, 1980; Levy, 1983) ascribe a great role to proline aminoacid, at origination of plant resistance to drought, others (for example, Balasimha, 1983; Bansal, Nagaranjan, 1986) did not found positive correlation of proline content level to tolerance to drought, and they indicate, that proline accumulation cannot be used to test the variety resistance to drought.

Our results support the idea, that the changes in tuber proline content as response to drought stress, could help in identification of potato variety resistance or sensitivity to drought. To deduce an explicit conclusion it would be necessary to verify the results in an extensive experiment under controlled conditions with a large number of varieties or in field experiments of several years.

Kontaktní adresa:

Ing. Jaromír Zrůst, CSc., Výzkumný ústav bramborářský, Dobrovského 2366,
580 01 Havlíčkův Brod, Česká republika, tel.: 0451/323, fax: 0451/215 78

FYZIOLOGICKÁ REGULACE RŮSTU TRANSFORMANTŮ BRAMBOR

Z. Sladký, I. Gális, J. Macas, P. Brinca, J. Dubová

Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Inkorporace bakteriálních genů do genomu brambor se projevuje tvorbou fenotypicky rozdílných transformantů, kteří vykazují růstové a metabolické změny. Transformanti cv. Zvíkov 1361 vytvářejí bohatý kořenový systém, který podmiňuje přítomnost plazmidu Ri. Pro indukci tuberizace transformantů musela být rhizogeneze omezována vhodnými koncentracemi trijodbenzoové kyseliny (2 až 4 mg.l⁻¹) nebo kumarinu (25 až 50 mg.l⁻¹). Na indukčních médiích se zvyšovalo procento axilárních hlízek. Jiný typ transformantů cv. Oreb byl odvozen plazmidem 1334, který vnáší do brambor i gen 4 pro zvýšenou syntézu cytokininů. Transformanti vytvářejí značné množství lodyžek, neschopných regenerovat kořeny a zakládat hlízky na indukčních médiích s auxinovými látkami. Teprve po naroubování transformantů na rajče docházelo k prodlužování lodyh a po jejich zakořenění v zemině i k pozdější tvorbě hlízek. Hlízky byly podlouhého tvaru s pupeny vyčnívajícími nad povrch a obsahovaly méně škrobových zrn. Při analýze aminokyselin byl pozoruhodný dva- až třikrát nižší obsah prolinu. Byl proto ověřován účinek exogenně aplikovaného prolinu v listech cv. Oreb, pěstovaného na záhonech a v paňeništi. Z biotestů na endogenní látky vyplynulo, že prolin ve většině případů snižuje obsah auxinových látek a navozuje inhibice.

Vnášení bakteriálních genů do genomu rostlin se ukazuje jako perspektivní metoda genetických manipulací, které v optimálních případech mohou výrazně podpořit růstové i metabolické procesy. Slibná se zdá transformace a transgeneze prostřednictvím plazmidů Ti a Ri bakterií rodu *Agrobacterium*. Inkorporací genu 1 a 2 T-DNA je stimulována syntéza auxinových látek nebo začleněním plazmidu Ri je zvyšována citlivost pletiv na jejich přítomnost. Při kultivaci transformantů *in vitro* dochází k tvorbě bohatého kořenového systému, který by se mohl uplatnit jak při sorpci živin a vody, tak i v metabolické činnosti.

Jiný typ modifikovaných plazmidů *A. tumefaciens* vnáší do transformantů gen 4, který výrazně zvyšuje syntézu cytokininů. Dochází až k teratologickému pomnožení lodyžek s redukovanými lístky a zvýšená hladina cytokininů nedovoluje regeneraci kořenů ani tvorbu jiných základů. Pozoruhodné je, že exprese inkorporovaných genů probíhá při kultivaci *in vitro* dlouho, ale u transformantů pěstovaných ve skleníku nebo na pokusných záhonech slábne. K represi aktivity

jednotlivých genů T-DNA dochází postupně a potlačení není zpravidla úplné, resp. je do určité míry reverzibilní.

Značnou nevýhodou konstrukcí současných plazmidů je skutečnost, že není regulovatelná exprese příslušných genů a jejich aktivita mnohdy omezuje nástup dalších morfogenních procesů. Proto je úsilí současných pracovníků zaměřeno na expresi inkorporovaných genů jen do určité etapy ontogeneze (B r z o b o h a t ý et al., 1993; C a m p o s et al., 1993). Dokud nebudou konstruovány linie plazmidů s nastavitelnou expresí, můžeme podpořit nástup morfogenních etap stávajících plazmidů fyziologickou regulací růstu transformantů. Předložená práce je příkladem záměrné regulace růstu dvou rozdílných transformantů brambor.

MATERIÁL A METODA

Pro studium regulací byli vybráni regeneranti brambor cv. Zvíkov po transformaci kmenem *A. tumefaciens* C 58C1, obsahující plazmid pRi A4b z *A. rhizogenes* a plazmid pGA 472, upravený začleněním genu pro leghemoglobin pCB 1361. Transformanti jsou označováni jako cv. Zvíkov 1361. Dále byli sledováni regeneranti cv. Oreb po transformaci *A. tumefaciens* LBA (pCB 1334), nesoucí upravený plazmid pGA 472 s genem 4, zabezpečující zvýšenou syntézu cytokininů. Jejich označení je cv. Oreb 1334.

Oba typy jsme získali z Ústavu molekulární biologie ČAV v Českých Budějovicích. Obdobně jsme odvodili i transformanty cv. Kamýk, Nicola a Resy. Ukazuje se, že na změně fenotypu se výrazněji podílí typ modifikace plazmidu než růstové zvláštnosti kultivarů.

Transformanti byli množeni na médiích (M u r a s c h i g e , S k o o g , 1962) bez přídavku příslušného regulátoru. Nadměrnou tvorbu kořenů cv. Zvíkov omezovaly uvedené koncentrace trijodbenzoové kyseliny a kumarinu. Pro následnou indukci hlízek byla média modifikována přidáním 8 g sacharózy a 10 mg BAP (P a l m e r , S m i t h , 1969). Růstové rozdíly jsou zpracovány statisticky (tab. I) a dokumentovány fotograficky (obr. 1 až 6).

Obsah prolinu v hlízkách transformovaného cv. Oreb byl zprvu zjišťován kolorimetricky (B a t e s et al., 1973). Podrobnější analýza aminokyselin 10 hlízek byla provedena ve VÚP v Troubsku na automatickém analyzátoru AAA 339. Pro exogenní aplikaci byla zvolena koncentrace prolinu 5,6 mM, listy byly ponořené 12 h ve vodných roztocích.

Biotesty pro zjištění změn charakteru stimulačních a inhibičních látek v listech transformantů pěstovaných na záhonech a v pařeništi byly prováděny podle postupu, který popsali B e n t l e y , H o u s l e y (1954).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Expresí genů plazmidu Ri, vnesených vektorovým plazmidem *A. tumefaciens*, indukovala růst kořínků nejen na bázi lodyžek, ale i v úžlabí lístků v apikální části cv. Zvíkov 1361 (obr. 1). Výrazný projev rhizogeneze omezoval možnosti indukce tuberizace explantátů na médiích se zvýšeným obsahem sacharózy a BAP. V prvních experimentech jsme snižovali hladinu auxinových látek účinkem trijodbenzoové kyseliny TIBA (obr. 2) nebo jsme navozovali určitou míru inhibice růstu kořínků kumarinem KUM. Jak vyplývá z hodnot v tab. I, omezovala TIBA růst kořenů v rozmezí 2 až 4 mg.l⁻¹ a podporovala vznik axilárních hlízek od 23,5 do 26,1 %. Kumarin rovněž inhiboval růst kořenů transformantů v rozmezí koncentrací 25 až 50 mg.l⁻¹ a podporoval tuberizaci na indukčních půdách od 76,9 do 84,2 %.

Kumarin je účinnější látkou v indukci axilárních hlízek. Tato skutečnost souhlasí s dřívějšími poznatky (Stalke, Farnsworth, 1982) i s našimi studiemi (Sladký, Bartošová, 1990) naznačujícími sepětí procesů tuberizace s inhibičními látkami přirozené nebo syntetické povahy. Hlízky transformantů odvozené *in vitro* nebo *in vivo* se lišily od kontrol protáhlejším tvarem a uložením pupenů (obr. 3). Při další kultivaci na záhonech se fenotypické

I. Regulace růstu kořenů a tvorba axilárních hlízek transformantů cv. Zvíkov 1361 po 60 dnech kultivace v médiích s přidávkou různých koncentrací trijodbenzoové kyseliny a kumarinu – Regulation of root growth and inducing of axillary tubers in transformants cv. Zvíkov after 60 days of cultivation on media with different concentration of triiodobenzoic acid and cumarin

		Délka kořínků ² (cm)	Čerstvá biomasa všech kořenů ³ (g)	% indukovaných hlízek ⁴
Kontrolní transformant ¹		5,6 ± 0,2	21,8 ± 2,1	4,5 ± 0,3
TIBA mg.l ⁻¹	0,1	3,8 ± 0,2	23,6 ± 2,4	8,7 ± 0,2 ⁺
	1	1,9 ± 0,1	16,9 ± 1,8	15,6 ± 1,4 ⁺⁺
	2	1,2 ± 0,1	12,4 ± 1,6	23,5 ± 1,9 ⁺⁺
	4	0,6 ± 0,1	10,2 ± 1,6	26,1 ± 1,8 ⁺⁺
	8	0,3 ± 0,1	8,9 ± 0,9	6,8 ± 0,4
Kumarin mg.l ⁻¹	5	3,2 ± 0,2	16,7 ± 2,1	27,3 ± 1,4 ⁺⁺
	10	1,6 ± 0,3	14,6 ± 1,9	56,1 ± 3,4 ⁺⁺
	25	0,6 ± 0,2	9,3 ± 1,2	84,2 ± 3,9 ⁺⁺
	50	0,3 ± 0,1	8,4 ± 0,9	76,9 ± 3,7 ⁺⁺
	100	0,2 ± 0,1	3,6 ± 0,2	69,2 ± 2,8 ⁺⁺

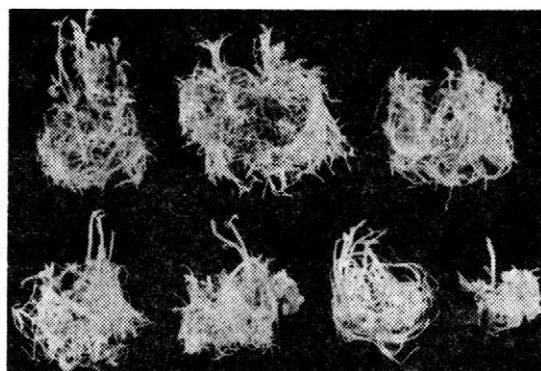
⁺průkazné – significant ⁺⁺vysoce průkazné – highly significant

¹control transformant, ²rootlet length, ³fresh biomass of all roots, ⁴% of induced tubers

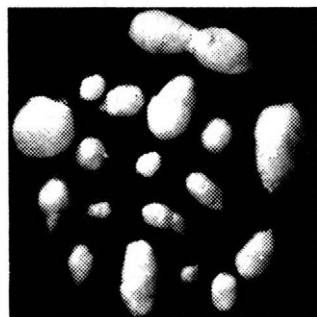
1. - 6. Fenotypicky rozdílní transformanti brambor a indukce hlíz – Phenotypically different potato transformants and inducing of tubers



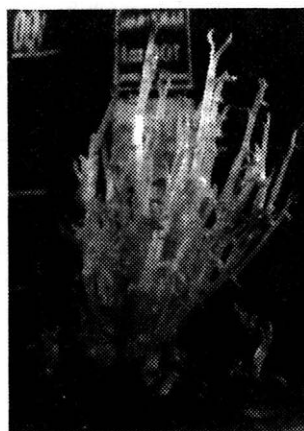
1. Transformanti cv. Zvíkov 1361 s plazmidem Ri se vyznačují výraznou tvorbou kořenů – Transformants cv. Zvíkov 1361 with plasmid Ri are noted for excessive root formation



2. Trijodbenzoová kyselina omezuje rhizogenezi pro indukci hlízek na médiích se sacharózou a BAP – The triiodobenzoic acid limits the rhizogenesis in order to induce tubers on media with sucrose and BAP



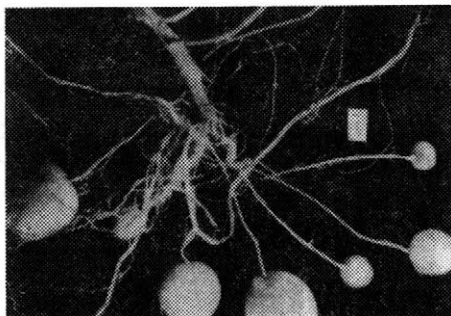
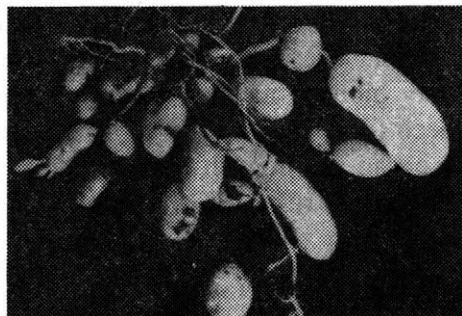
3. Hlízky transformantů jsou malé, podlouhého tvaru a obsahují méně škrobových zrn – Transformant tubers are smaller and have a prolonged shape and contained few starch grains



4. Transformanti cv. Oreb 1334 s genem 4 pro zvýšenou syntézu cytokininů se vyznačují tvorbou zmnožených lodyžek – Transformants cv. Oreb 1334 with gene 4 for higher synthesis of cytokinin were noted for the formation of multiple shoots



5. Roubování transformovaných lodyžek na rajče podpořilo prodlužování, zakořenění v zemině a pozdější tvorbu hlízek – Grafting of transformant stems on a tomato caused the elongation, rooting in the soil and later tuber formation



6. V dalším vegetačním období mohly být mezi transformanty vybrány klony s rozdílným typem hlíz – In the next vegetation period clones with different type of number formation could be selected

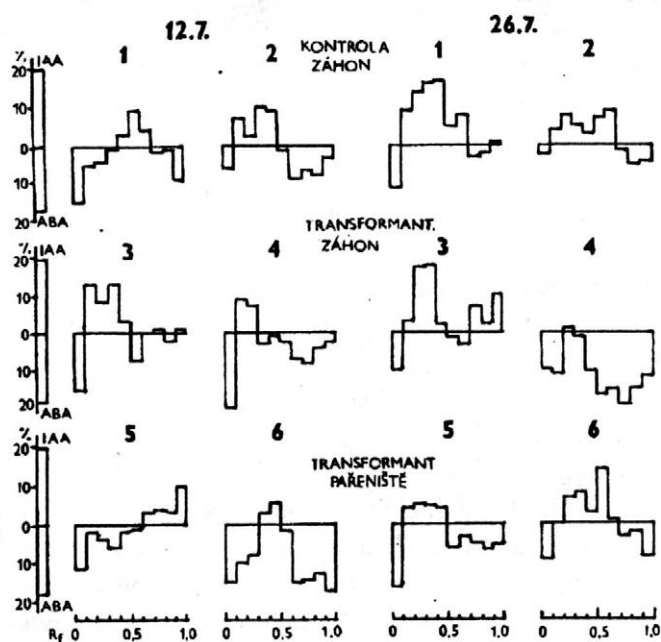
rozdíly ztrácely, zatímco v podmínkách *in vitro* se udržely se stejnou intenzitou již tři roky.

Druhý typ transformace cv. Oreb 1334 se zvýšenou syntézou cytokininů se projevoval zmnožením lodyžek chudých na chlorofyl s malými lístky (obr. 4). Při pasážování na média se zvyšující se koncentrací auxinových látek nedocházelo k tvorbě funkčních kořínků ani hlízek. Teprve roubováním lodyžek na podložku rajčat cv. Imun docházelo k jejich prodlužování a vzniku zelených lichozpeřených listů (obr. 5). Po naklonění a přikrytí lodyh zeminou docházelo k zakořenění a pozdější tvorbě hlízek. Při kultivaci transgenních brambor ve skleníku jsme pozorovali časté vadnutí listů. Sytě zelené čepele byly tlustší a různě zprohýbané. Palisádové buňky byly větší s průkazně vyšším počtem chloroplastů. Převážná část průduchů zůstávala otevřená nebo projevovала sníženou reaktivitu. Vadnutí listů jsme částečně omezovali postřikem abscisové kyseliny 5 mg.l^{-1} , na kterou rostliny reagovaly uzavíráním průduchů.

Zvýšenou péčí během kultivace ve skleníku jsme získali přes 50 hlízek transformantů cv. Oreb 1334. Hlízky byly rovněž protáhlého tvaru s pupeny vyčnívajícími nad povrch a v parenchymatických buňkách dřene bylo méně škrobových zrn. Při analýze aminokyselin byl pozoruhodný dva- až třikrát nižší obsah prolinu, který poklesl ze $109 \text{ } \mu\text{mol}$ na 1 g hmoty dřene u kontrol na $45,2$ a $39,1 \text{ } \mu\text{mol}$ u transformantů ve skleníku a pařeništi.

Pokles prolinu by mohl být považován za jednu z příčin snížené odolnosti transgenních rostlin v méně příznivých podmínkách. Jak uvádějí Sw a a i j et al. (1985), vykazuje prolin schopnosti osmoregulace, ochranu buněčných membrán a enzymů a udržuje energii fotosyntézy pro další růst po stresu. B a t e s et al. (1973) využili rychlou metodu detekce volného prolinu pro studium vodního deficitu a pro orientační zjišťování příčin.

Při následujícím množení transformantů na záhonech a v pařeništi jsme pozorovali variabilitu v růstu i ve schopnostech přizpůsobit se klimatickým změnám. V období zakládání hlíz (12. 7. 1993) a při počátečním růstu (26. 7. 1993) jsme ověřovali účinek exogenně přidaného prolinu na charakter endogenních látek v izolovaných listech transformantů. Hodnoty biotestů na koleoptilových segmentech ovsa jsou uspořádány v histogramech (obr. 7). Ukazuje se, že přidání prolinu snižuje v listech ve většině případů obsah auxinových látek a navozuje inhibice při zakládání hlíz (12. 7. 1993) i na počátku růstu (26. 7. 1993).



7. Charakter endogenních látek v listech transformantů cv. Oreb, pěstovaných na záhonu a v pařeništi (1, 3, 5) a změny po aplikaci 5,6 mM prolinu u pokusných variant (2, 4, 6) v době zakládání hlíz (12. 7.) a při jejich počátečním růstu (26. 7.); přidání prolinu ve většině případů snižuje obsah auxinových látek a navozuje inhibice – The character of endogenous substances in the leaves of potato transformants cv. Oreb, cultivated in a field and hotbed (1, 3, 5) and changes after 5.6 mM proline application in experimental series (2, 4, 6) in the time of tuber initiation (12. 7.) and in the first stage of their growth (July 26); proline, in the most cases, lowers the content of auxins and evokes inhibitions

Naše poznatky se shodují s údaji z literatury (Swaij et al., 1985) o účinku exogenně aplikovaného prolinu na zvyšování odolnosti některých genotypů rodu *Solanum*. Současně naznačují další možnosti selekce *in vitro* rezistentních buněčných linií hydroxyprolinem. V této souvislosti je nutné připomenout, že při inkorporaci genů T-DNA jsou vnášeny do genomu rostlinných buněk i geny pro syntézu bazických aminokyselin opinů, které ovlivňují metabolické procesy transformantů. Opiny jsou látky odvozované od argininu a lyzinu a jejich výchozí látkou může být kyselina α -ketoglutarová z Krebsova cyklu, ze které vzniká rovněž i prolin. Je možné předpokládat, že přednostně podporovaná syntéza opinů omezuje syntézu potřebného prolinu. Bylo by asi třeba při konstrukci plazmidů nového typu vzít v úvahu i tuto možnost.

Při sklizni hlíz transformantů cv. Oreb jsme pozorovali rozšíření variability, která by mohla být východiskem pro selekci dalších klonů jak v délce vegetační doby, tak i morfologického tvaru hlíz (obr. 6).

Literatura

- BATES, L. S. - WALDREN, R. P. - TEARE, I. D.: Rapid determination of free proline for water stress studies. *Pl. and Soil*, 39, 1973: 205-207.
- BENTLEY, J. A. - HOUSLEYS, S.: Bio-assay of plant hormones. *Physiol. Plant.*, 7, 1954: 403-419.
- BRZOBOHATÝ, B. - MOORE, I. - KRISTOFFERSEN, P. - BAKO, L. - CAMPOS, N. - SCHELL, J. - PALME, K.: Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262, 1993: 1051-1054.
- CAMPOS, N. - BAKO, L. - BRZOBOHATÝ, B. - FELDWISCH, J. - ZETTL, R. - BOLAND, W. - PALME, K.: Identification and characterization of a novel phytohormone conjugate specific β -glucosidase activity from maize. *Amer. Chem. Soc.*, 97, 1993: 205-212.
- MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 1962: 473-497.
- PALMER, C. E. - SMITH, O. E.: Cytokinin and tuber initiation on isolated stolon *Solanum tuberosum*. *Nature*, 221, 1962: 473-497.
- SLADKÝ, Z. - GALIS, I. - MACAS, J.: Fyziologické aspekty tuberizace transgenových rostlin bramborů *in vitro*. In: Sbor. Výsledky genového inženýrství pro šlechtění rostlin, České Budějovice, 1989: 189-198.
- SLADKÝ, Z. - BARTOŠOVÁ, L.: *In vitro* induction of axillary potato microtubers and improvement of their quality. *Biol. Plant.*, 32, 1990: 181-188.
- STALKNECHT, G. F. - FARNSWORTH, S.: General characteristic of coumarin induced tuberization of axillary shoots of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Amer. J. Potato*, 59, 1982: 17-31.
- SWAIJ, A. C. VAN - JACOBSEN, E. - FEENSTRA, W. J.: Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of *Solanum*. *Physiol. Plant.*, 64, 1985: 230-236.

Došlo 17. 3. 1994

SLADKÝ, Z. - GÁLIS, I. - MACAS, J. - BRINCA, P. - DUBOVÁ, J. (Masaryk University, Faculty of Science, Brno):

Physiological transformation of growth potato transformants.

Rostl., Výt., 40, 1994 (8): 721-728.

The incorporation of bacterial genes into the potato genome induces the formation of phenotypically different transformants that show expressive growth and metabolic changes. The transformants cv. Zvíkov 1361 are noted for their excessive root formation which is stimulated by the presence of the plasmid Ri. It is necessary to limit the rhizogenesis in order to induce transformant tuberization. 2,3,5-triiodobenzoic acid and coumarin in the concentration 2 and 4 mg.l⁻¹ TIBA or 25 and 50 mg.l⁻¹ coumarin limit the root growth and induce axillary microtubers.

Another type has been derived by the transformation of the cv. Oreb with plasmid LBA 1334. This type also brings gene 4 into potatoes and induces higher synthesis of cytokinins. The transformants were noted for the formation of multiple shoots which were not able to produce roots and tubers on media modified by auxin substances. Only transformant grafting on a tomato has caused elongation and stem rooting in the soil and also the formation of tubers in flower-pots. The tubers were smaller and had a prolonged shape and contained few starch grains. During the analysis of amino acids it was remarkable to observe two to three times lower proline content. The shortage of proline in transformants could result in the lower resistance of transformants under less positive conditions.

In the next vegetation period we verified the influence of exogenously applied proline on transgenic cv. Oreb in leaves that were growing in an experimental field and in a hotbed. As a result of the bioassays on coleoptile oat segments, it is evident that proline in leaves lowers the content of auxin substances in most cases and evokes inhibitions. The changes suggest the possible presence of abscisic acid which could contribute to the regulation of leaf stomata.

Kontaktní adresa:

Prof. dr. Zdeněk S l a d k ý , DrSc., Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika, tel.: 05/41 12 95 76, fax: 05/41 21 16 23

REAKCE VOJTĚŠKY A SLUNEČNICE NA NITRÁTOVOU A AMONNOU VÝŽIVU VE VODNÍ A PÍSKOVÉ KULTUŘE PŘI TŘECH INTENZITÁCH SVĚTLA

F. Plhák

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno

Růst rostlin vojtěšky a slunečnice ve vodní kultuře byl inhibován při amonné a močovinové výživě v koncentraci 200 mg N.l^{-1} živného roztoku. Míra inhibice prokázala nepříznivý účinek N-red forem v tomto prostředí zejména na růst kořenů. V pískové kultuře se projevil inhibiční účinek $\text{NH}_4^+\text{-N}$ na růst vojtěšky a stimulační účinek močoviny na růst nadzemních částí a zejména kořenů slunečnice. Zvýšená produkce celkové biomasy rostlin byla průkazná a dosahovala na plném světle 40 %. Zastínění na 66 a 33 % plné sluneční radiace snižovalo úměrně růst nadzemních částí a kořenů obou pokusných rostlin s výjimkou nadzemních částí slunečnice v pískové kultuře s $\text{NH}_4^+\text{-N}$ výživou. Zastínění rostlin zvyšovalo obsah NO_3^- v rostlinných orgánech všech pokusných variant, a to nejvíce v kořenech, méně v lodyhách a nejméně v listech. Aktivita nitrátoreduktázy měřená v nadzemních částech slunečnice z pískové kultury se vesměs snižovala úměrně se zastíněním, přičemž nejvyšší byla u varianty s NO_3^- výživou a nejmenší u varianty s NH_4^+ výživou. Ze zvyšování obsahu NO_3^- v rostlinných orgánech N-red variant úměrně s inhibicí růstu vlivem zastínění lze usuzovat na průběh nitrifikačních procesů s malou intenzitou ve vodních kulturách a s výraznou intenzitou v pískových kulturách. Průběh nitrifikačních přeměn obou N-red substrátů byl prokázán i v písku bez rostlin.

Dusík hraje základní úlohu ve výživě rostlin. Je přijímán ve formě aniontu NO_3^- a kationtu NH_4^+ , popřípadě jako vzdušný dusík prostřednictvím symbiotické fixace. Většina rostlin přijímá přednostně nitráty, které značně převažují v aerobních půdních podmínkách, kde probíhá nitrifikace (H a y n e s , G o h , 1978; P l h á k , 1993a).

Je-li zdrojem dusku pro rostliny je pouze $\text{NO}_3^-\text{-N}$, dochází k alkalizaci externího média, která souvisí s vylučováním OH^- kořeny za přijatý aniont. Příjem a metabolizace NO_3^- je spojena s tvorbou organických kyselin a rostliny mají vyšší obsah organických aniontů (I s r a e l , J a c k s o n , 1982; C h a i l l o u et al., 1986). Avšak i při nadměrné koncentraci NO_3^- , při níž dochází i k značnému hromadění nitrátů v tkáních, probíhá růst rostlin víceméně bez inhibice.

Při výživě rostlin pouze $\text{NH}_4^+\text{-N}$ dochází naopak k acidifikaci externího média vylučováním H^+ a vyšší koncentrace NH_4^+ podmiňují u většiny rostlin růstovou

inhibici až toxicitu (Magalhães, Wilcox, 1984b). Amonná výživa je dále spojena se zvýšenou tvorbou aminokyselin, sníženou tvorbou organických kyselin a se značným hromaděním glutaminu a asparaginu (Lorens, 1975; Magalhães, Wilcox, 1984a; Chailou et al., 1986, 1991). Rovněž se značně snižuje příjem kationtů jako Ca^{2+} , Mg^{2+} a K^+ (Cox, Raisenauer, 1973; Salsac et al., 1987).

Z teoretického hlediska by amonná forma dusíku měla být preferenční v příjmu a metabolizaci, protože nevyžaduje energii. Absorpce a akumulace NO_3^- kořeny vyžaduje 2ATP a redukce na NH_4^+ 15 ATP ekvivalentů na 1 mol (Canvin, Atkins, 1974; Salsac et al., 1987). Vysoká hladina světelné radiace by měla být proto příznivější pro příjem a metabolizaci NO_3^- -N.

V pracích zabývajících se studiem účinků obou N-forem na růst a metabolismus rostlin jsou převážně používány vodní kultury s možností snadnější úpravy změn pH, avšak i pískové kultury (Magalhães, Wilcox, 1984a, b; Peuke, Jeschke, 1993) či jiná pevná média jako perlit a vermikulit (Barro et al., 1991; Alfoldi, Pinter, 1992). V půdním prostředí vzhledem k nitrifikačním přeměnám N-red forem je nutné hodnotit výsledky s ohledem na tuto skutečnost. Pokusně není vyloučeno, že v nesterilních podmínkách pískových i vodních kultur může nitrifikace rovněž probíhat.

Cílem práce je porovnání účinku nitrátové a amonné výživy ve formě NH_4^+ -N a močovinného dusíku ve vodních a pískových kulturách u dvou rostlin s odlišným typem N-výživy a při odstupňované sluneční radiaci. Růstová reakce spolu se změnami obsahu nitrátů a aktivity nitrátoreduktázy pokusných rostlin byly vybrány jako kritéria uvedených účinků.

MATERIÁL A METODA

K pokusům byla použita vojtěška cv. Pálava a slunečnice cv. Albena. Pokusy probíhaly ve skleníku, pouze v případě vojtěšky v pískové kultuře venku pod skleněným přístřeškem, v měsících červnu a září.

Byl srovnáván účinek nitrátové, amoniakální a močovinné formy dusíku v koncentraci 200 mg N.l^{-1} živného roztoku ve vodní a pískové kultuře na oba druhy rostlin. Byl použit živný roztok ve složení: KH_2PO_4 7,3 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3,4 mM, MgSO_4 4,2 mM, KCl 6,7 mM, Fe-chelaton 2 mg $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{l}^{-1}$ a stopové prvky H_3BO_3 2,86 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,8 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08 mg a $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02 mg.l⁻¹. Dusík byl přidáván ve formě KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a močoviny vždy v množství 14 mM, tj. 200 mg N.l^{-1} . KCl byl přidáván jen do varianty s amonnou a močovinnou formou dusíku jako náhrada za KNO_3 . U varianty s NH_4^+ formou dusíku byl obsah MgSO_4 snížen na polovinu. Živné roztoky byly průběžně upravovány na pH 6.

V případě vodních kultur bylo použito kultivačních van s 5 l živného roztoku, v nichž bylo umístěno 16 rostlin. Živné roztoky byly během kultivace rostlin provětrávány. Pro pískové kultury bylo použito Mitscherlichových nádob o obsahu 6 l, které byly plněny říčním pískem promytým destilovanou vodou (pískoviště Bračice). Do nádob bylo vyséváno po 30 rostlinách vojtěšky a 20 rostlinách slunečnice ve formě předklíčených semen.

Pokusné rostliny byly rozděleny na variantu s plnou sluneční radiací, která dosahovala ve skleníku $1\,200\,\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ hustoty toku fotonů a na varianty s odstupňovaně sníženou světelnou radiací na 800 a $400\,\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Snížení světelné radiace bylo provedeno zastíněním pomocí jedno- nebo vícevrstevné síťoviny.

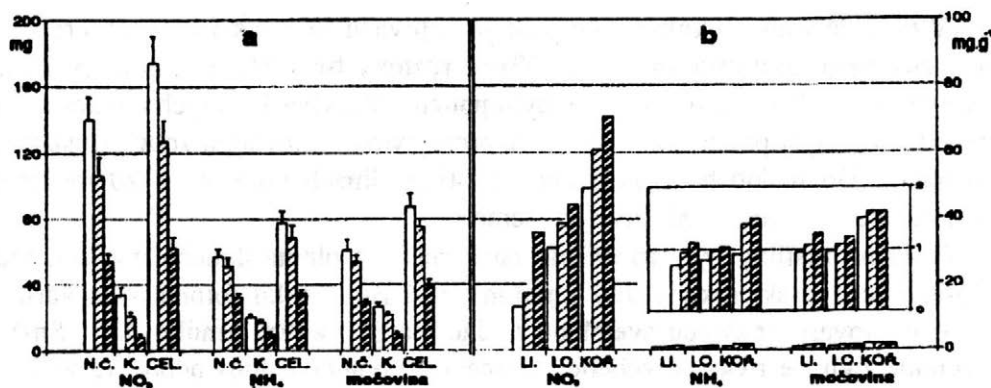
Růst rostlin probíhal 18 až 25 dnů a poté byla stanovena čerstvá a suchá hmotnost jednotlivých rostlin odděleně nadzemních částí a kořenů. V rostlinných orgánech byl stanoven obsah nitrátů selektivní nitrátovou kapalnou elektrodou (Š e n k ý ř , P e t r , 1979) ve třech opakováních. Aktivita nitrátoreduktázy byla stanovena *in vivo* v listových terčících a v lodyžních segmentech (H a r p e r , H a g e m a n , 1972; N i c h o l a s e t a l . , 1976) ve třech opakováních. Statistické hodnocení bylo provedeno výpočtem střední chyby průměrů a *t*-testem. Střední chyby průměrů obsahu nitrátů byly nižší než 5 % a nejsou ve výsledcích uvedeny. Hodnoty průkaznosti rozdílů (t_{n-2}) jsou uvedeny v textu a vyjadřují průkaznost rozdílu NO_3^- varianty s N-red variantou většinou při plném osvětlení, popřípadě při stejném stupni osvětlení.

VÝSLEDKY

Růst rostlin vojtěšky vyjádřený hmotností sušiny byl největší ve vodní kultuře s nitrátovou formou dusíku ve srovnání s amonnou a močovinnou formou, které brzdily růst rostlin. Růstová inhibice byla výrazná jak u kořenů, tak i u nadzemních částí a dosahovala na plném světle u amonné varianty 64 % ($t_{30} = 5,9^{++}$) u nadzemních částí a 41 % ($t_{30} = 3,1^{++}$) u kořenů. U močovinné varianty byla poněkud menší, u nadzemních částí byla inhibice i zde průkazná ($t_{30} = 5,4^{++}$). Zastínění rostlin vyvolalo u všech pokusných variant uměrné snížení růstu obou orgánů. Inhibice růstu vlivem zastínění byla nejvíce patrná u NO_3^- -N varianty (obr. 1a).

Obsah nitrátů v NO_3^- -N variantě byl nejvyšší v kořenech a nejnižší v listech. Vliv zastínění se projevil zvyšováním obsahu nitrátů ve všech orgánech. Obsah nitrátů v obou dalších variantách byl výrazně nízký a bez rozdílů mezi jednotlivými orgány. Vliv zastínění se projevil i zde určitou tendencí zvyšování obsahu NO_3^- v rostlinných orgánech (obr. 1b).

Růst rostlin slunečnice vyjádřený tvorbou sušiny ve vodní kultuře byl opět nejvyšší v NO_3^- -N variantě a byl výrazně inhibován v NH_4^+ -N variantě o 42%



1. Účinek na vojtěšku ve vodní kultuře (pokus probíhal ve sklenisku 20 dní od 1. 9. do 20. 9.) – Effect on lucerne in water culture (experiment took place in glasshouse 20 days from September 1 to 20)

Vysvětlivky k obr. 1 až 4 – Explanations to Figs 1 to 4:

Účinek NO_3^- , NH_4^+ a močoviny v koncentraci 14 mM na tvorbu sušiny v mg (a), obsah NO_3^- v mg.g^{-1} (b) a aktivitu nitrátoreduktázy v $\mu\text{g NO}_2\text{.g}^{-1}$ sušiny (c) pokusných rostlin – Effect of NO_3^- , NH_4^+ and urea on dry matter production in mg (a) of aboveground parts (N.Č.), roots (K) and whole plants (CEL.), NO_3^- content in mg.g^{-1} (b) and nitrate reductase activity in $\mu\text{g NO}_2\text{.g}^{-1}$ of dry matter (c) of experimental plants

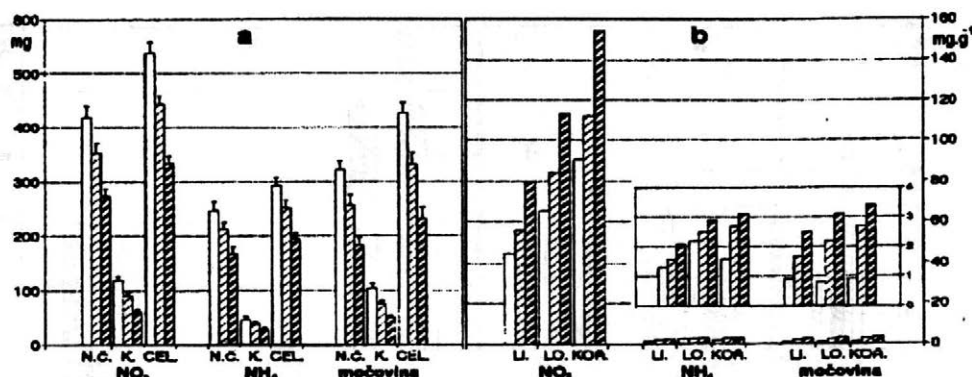
- při plné sluneční radiaci – at full solar radiation ($1\ 200\ \mu\text{mol.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$ PFD)
- ▨ při redukované sluneční radiaci na 2/3 – at reduced solar radiation to 2/3 ($800\ \mu\text{mol.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$ PFD)
- ▩ při redukované sluneční radiaci na 1/3 – at reduced solar radiation to 1/3 ($400\ \mu\text{mol.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$ PFD)

u nadzemních částí ($t_{30} = 6,3^{++}$) a o 29 % u kořenů ($t_{30} = 7,9^{++}$). Inhibice růstu slunečnice ve variantě s močovinou dosahovala jen 23 % u nadzemních částí ($t_{30} = 3,6^{++}$) a 6 % u kořenů ($t_{30} = 1,3$), jak uvádí obr. 2a.

Obsah nitrátů byl vysoký v rostlinách z NO_3^- -N varianty a podobně jako u rostlin vojtěšky byl nejvyšší v kořenech a nejnižší v listech. V rostlinách z obou N-red variant byl obsah NO_3^- nízký. Vliv zastínění se opět projevil vzestupem obsahu nitrátů ve všech rostlinných orgánech a ve všech pokusných variantách (obr. 2b).

Růst sušiny rostlin vojtěšky v pískové kultuře byl při plném osvětlení opět nejvyšší ve variantě s NO_3^- -N a jen mírně (neprůkazně) byl inhibován ve variantě s močovinou. Ve variantě s NH_4^+ -N dosahovala inhibice 47 % u nadzemních částí ($t_{58} = 4,9^{++}$) a 10 % u kořenů ($t_{58} = 0,66$).

Snížení intenzity světelné radiace o jednu třetinu podmínilo zvýšený růst sušiny nadzemních částí vojtěšky u NO_3^- -N varianty o 18 % ($t_{58} = 1,25$) vůči ne-



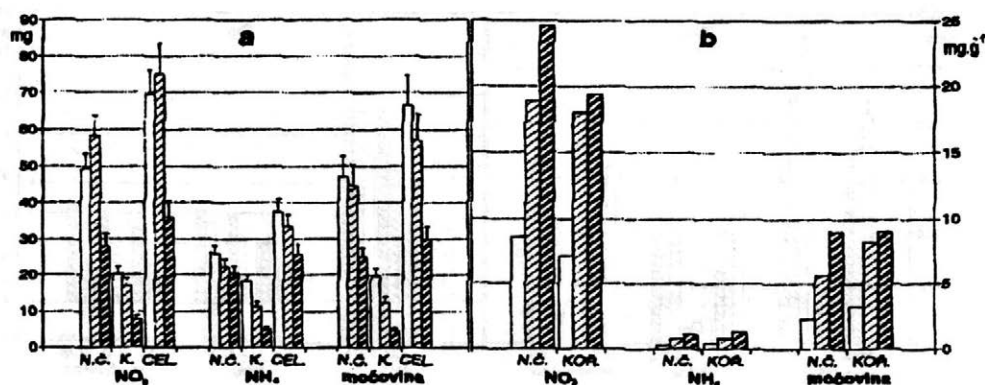
2. Účinek na slunečnici ve vodní kultuře (pokus probíhal ve skleníku 25 dní od 5. 9. do 30. 9.)
 – Effect on sunflower in water culture (experiment took place in glasshouse 25 days from September 5 to 30)

zastíněné variantě, u varianty s močovinou byl růst nadzemních částí snížen jen nepatrně. V ostatních případech došlo u nadzemních částí i kořenů ke snížení růstu úměrně se stoupajícím zastíněním (obr. 3a).

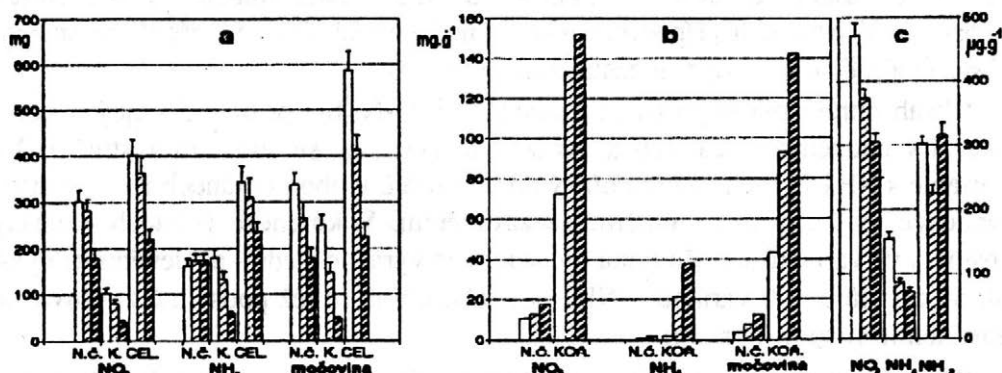
Obsah nitrátů byl nejvyšší ve variantě s NO_3^- -N, byl přibližně stejný v kořenech i v nadzemních částech a výrazně se zvyšoval se stupněm zastínění. Ve variantě s NH_4^+ -N byl naměřen nízký obsah nitrátů v obou orgánech a byla patrná tendence jeho zvyšování úměrně se zastíněním. V kořenech i listech vojtěšky rostoucí ve variantě s močovinou byl stanoven výrazně (sedm- až devětkrát) vyšší obsah nitrátů oproti variantě s NH_4^+ -N a jeho obsah se též podstatně zvyšoval se zastíněním rostlin (obr. 3b).

Růst sušiny rostlin slunečnice v pískové kultuře byl při plné světelné radiaci největší u varianty s močovinným dusíkem a převyšoval růst sušiny rostlin z NO_3^- -N varianty u nadzemních částí o 12 % ($t_{38} = 1,2$) a u kořenů o 146 % ($t_{38} = 6,1^{++}$). Při snížené světelné radiaci o jednu třetinu se růst sušiny nadzemních částí obou uvedených variant vyrovnal, avšak růst sušiny kořenů byl u varianty s močovinou o 83 % vyšší ($t_{38} = 2,9^{++}$). Při dvojnásobném zastínění došlo k dalšímu snížení růstu, avšak ve variantě s močovinou byl růst kořenů stále o 15 % vyšší ($t_{38} = 1,3$). Podobné, i když ne tak výrazné zvýšení sušiny kořenů bylo zaznamenáno u NH_4^+ -N varianty, a to u všech tří stupňů světelné radiace. Růst sušiny nadzemních částí této varianty byl výrazně nižší proti rostlinám z NO_3^- -N varianty, a to při plné intenzitě radiace o 46 % ($t_{38} = 4,3^{++}$) a při snížené světelné radiaci o 38 % ($t = 4,1^{++}$), jak uvádí obr. 4a.

Obsah nitrátů v rostlinách slunečnice z pískové kultury byl stanoven opět nejvyšší v NO_3^- -N variantě a u všech variant byl výrazně vyšší v kořenech než



3. Účinek na vojtěšku v pískové kultuře (pokus probíhal ve venkovních podmínkách pod skleněným přístřeškem 20 dní od 2. 6. do 22. 6.) – Effect on lucerne in sand culture (experiment took place in outdoor conditions under glass roof 20 days from June 2 to 22)



4. Účinek na slunečnici v pískové kultuře (pokus probíhal ve skleníku 18 dní od 14. 6. do 2. 7.) – Effect on sunflower in sand culture (experiment took place in glasshouse 18 days from June 14 to July 2)

v nadzemních částech. V rostlinách s $\text{NH}_4^+\text{-N}$ výživou byla stanovena obdobná relace při nižší hladině NO_3^- . Obsah nitrátů v rostlinách z močovinné varianty byl výrazně vyšší ve srovnání s $\text{NH}_4^+\text{-N}$ variantou. Ve všech orgánech rostlin všech pokusných variant se obsah nitrátů zvyšoval se stupněm zastínění (obr. 4b).

Rozdílnost v obsahu NO_3^- mezi pokusnými variantami dosahující více než 20 % byla statisticky průkazná, což bylo v převážné většině případů včetně nízkých hodnot obsahu NO_3^- naměřených v N-red variantách.

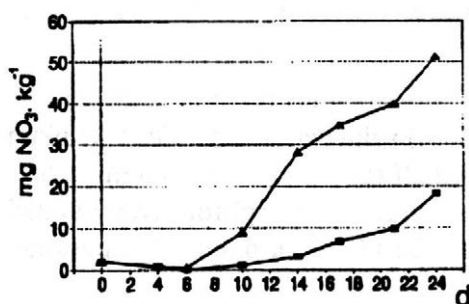
Aktivita nitrátreduktázy v nadzemních částech slunečnice rostoucí v písku byla nejvyšší v rostlinách s nitrátovou výživou, o něco málo nižší byla v rostlinách varianty s močovinou a výrazně nižší v rostlinách s $\text{NH}_4^+\text{-N}$ výživou. Ve většině případů se aktivita nitrátreduktázy snižovala se stupněm zastínění rostlin (obr. 4c).

DISKUSE

V předchozí práci jsme prokázali rychlou přeměnu N-red ve formě NH_4^+ a močoviny v půdním prostředí, přičemž rychlost přeměny klesala s poklesem C_{ox} v zemině (P l h á k , 1993a). Dusík přidáný ve formě NH_4^+ k rostlinám vojtěsky zvýšil výrazně během 14 dní obsah nitrátů v rostlinách (P l h á k , 1993b). V současných pokusech byl použit praný říční písek s neprokazatelným obsahem C_{ox} a dusíku. Aplikace živného roztoku s $\text{NH}_4^+\text{-N}$ a ve formě močoviny k pokusným rostlinám způsobila i zde zvýšení obsahu NO_3^- v rostlinách, které se stupňovalo spolu se snižováním aktivity nitrátreduktázy vlivem zastínění, což svědčí o průběhu nitrifikačních procesů. Nitrifikační přeměna NH_4^+ a močoviny na nitráty byla prokázána v téměř písku i bez přítomnosti rostlin (obr. 5). Přeměna N-red močoviny byla téměř trojnásobně rychlejší než NH_4^+ , což ukazuje na stimulaci průběhu nitrifikační přeměny mikrobiálně využitelným uhlíkem močoviny.

Ve vodních kulturách byl rovněž patrný jistý vzestup obsahu nitrátů v orgánech pokusných rostlin z N-red variant vlivem zastínění, který i zde musel být produkovan nitrifikačními přeměnami. Zdrojem uhlíku pro nitrifikační bakterie zde mohly být kořenové exsudáty rostlin. Z dosažených výsledků vyplývá, že při studiu účinku N-red výživy je nutné brát na zřetel i možné přeměny N-red substrátů na nitráty, které při použití písku či jiných pevných substrátů (agropertit, vermikulit) nejsou zanedbatelné.

Využitelnost dusíku ve formě NO_3^- se ukazuje u rostlin více závislá na intenzitě světelné radiace než samotný proces fotosyntézy, což bylo naznačeno již v předchozích pokusech (P l h á k , 1993b). Snížení světelné radiace bylo téměř



5. Časový průběh přeměny N-red substrátů na NO_3^- v písku zalitým živnými roztoky s příslušnou formou N-red při 22 °C – Time course of transformation of N-red substrates to NO_3^- in sand floated with nutrient solution with corresponding N-red form at 22 °C

■ — ■ NH_4^+
 ▲ — ▲ močovina – urea

ve všech pokusných variantách doprovázeno sníženým růstem a výrazným zvýšením obsahu NO_3^- v rostlinách. Pouze v případě rostlin slunečnice rostoucích v písku s NH_4^+ -N se vliv zastínění na snížení růstu neprojevil. Podobná reakce na zastínění při NH_4^+ výživě byla zaznamenána u rajčat (Magalhães, Wilcox, 1984a, b). Autoři vysvětlují větší růstovou depresi rostlin s NH_4^+ výživou na plném světle možným zvýšením obsahu volného NH_4^+ v listové tkáni vlivem vyšší transpirace a zejména vyšší aktivitou fotorespirace vedoucí k uvolňování NH_3 při oxidaci glycinu.

Zvyšování obsahu NO_3^- v pokusných rostlinách při jejich zastínění bylo podmíněno pravděpodobně snižováním redukce nitrátů při nižších intenzitách světla. Závislost aktivity nitrátoreduktázy, která tuto redukci uskutečňuje, na světelné intenzitě je dobře dokumentována (Canvin, Atkins, 1974; Beever, 1976; Nicholas et al., 1976). Aktivita nitrátoreduktázy je též závislá na přítomnosti nitrátů (Haba et al., 1988; Cheng et al., 1989). Naměřené hodnoty aktivity nitrátoreduktázy v nadzemních částech slunečnice odrážejí obě závislosti. V NO_3^- variantě převážil faktor světelné závislosti, ve variantě s močovinou mohly ovlivňovat aktivitu enzymu oba faktory. Výsledky ukazují, že snížená redukce NO_3^- při zastínění rostlin může hrát významnou úlohu v růstové inhibici.

Amonná i močovinová forma N-výživy působily na růst vojtěšky v obou kultivačních prostředích inhibičně, na růst slunečnice jen ve vodní kultuře. Ve vodních kulturách byl u obou rostlin více inhibován růst kořenů, což svědčí o negativním účinku použité koncentrace N-red substrátů na kořeny. V pískové kultuře působily u slunečnice obě formy N-red při vyšším osvětlení naopak na růst kořenů značně stimulačně vůči NO_3^- -N variantě. Vysvětlení je možné nalézt v snížení koncentrace N-red forem vlivem nitrifikačních přeměn na fyziologicky příznivou úroveň. Celková biomasa rostlin byla v těchto případech rovněž stimulována u močovinové varianty na plném světle o 46 % ($t_{38} = 3,5^{++}$) a při prvním stupni zastínění o 14 % ($t_{38} = 1,0$). U NH_4^+ -N varianty bylo patrné zvýšení biomasy o 7 % ($t_{38} = 0,6$), a to v podmínkách sníženého osvětlení. Vhodná relace mezi obsahem NO_3^- a NH_4^+ -N je považována za optimální pro růst rostlin (Vilka et al., 1992). U obou N-red variant se mohly na zvýšení růstu uplatnit též procesy spojené s menší energetickou náročností metabolizace NH_4^+ -N (Salsac et al., 1987).

Při zkoumání účinků amonné výživy v prostředí vodních kultur se doporučují podstatně nižší koncentrace NH_4^+ (1 mM a nižší) vzhledem k inhibičním účinkům vyšších koncentrací na kořeny v tomto prostředí (Smarťák, Blahos, 1993). Naše výsledky naznačují, že optimální koncentrace NH_4^+ v přirozených půdních podmínkách, kde probíhá dostatečná nitrifikační přeměna, mohou být posunuty k vyšším hodnotám.

Literatura

- ALFOLDI, Z. - PINTER, L.: Accumulation and partitioning of biomass and soluble carbohydrates in maize seedlings as affected by source of nitrogen concentration, and cultivars. *J. Pl. Nutr.*, 15, 1992: 2537-2583.
- BARRO, F. - FONTES, A. G. - MALDONADO, J. M.: Organic nitrogen content and nitrate and nitrite reductase activities in *tritordeum* and wheat grown under nitrate or ammonium. *Pl. and Soil*, 135, 1991: 251-256.
- BEEVERS, L.: Nitrogen metabolism in plants. New York, Elsevier 1976.
- CANVIN, D. T. - ATKINS, C. A.: Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves: Effect of light, carbon dioxide and oxygen. *Planta*, 116, 1974: 207-224.
- COX, W. J. - RAISENAUER, H. M.: Growth and ion uptake by wheat supplied with nitrogen as nitrate, or ammonium, or both. *Pl. and Soil*, 38, 1973: 363-380.
- HABA, P. DE LA - AGÜERA, E. - MALDONADO, J. M.: Development of nitrogen-assimilating enzymes in sunflower cotyledons during germination as affected by the exogenous nitrogen sources. *Planta*, 173, 1988: 52-57.
- HARPER, J. E. - HAGEMAN, R. H.: Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybean (*Glycine maxima* L. Merr.). *Pl. Physiol.*, 49, 1972: 146-154.
- HAYNES, R. J. - GOH, K. M.: Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol. Rev.*, 53, 1978: 465-610.
- CHAILLOU, S. - MOROT-GAUDRY, J. F. - SALSAC, L. - LESANT, C. - JOLIVET, E.: Compared effects of NO_3^- and NH_4^+ on growth and metabolism of french bean. *Physiol. veg.*, 24, 1986: 679-687.
- CHAILLOU, S. - VESSEY, J. K. - MOROT-GAUDRY, J. F. - RAPER, C. D. - HENRY, L. T. - BOUTIN, J. P.: Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. *J. exp. Bot.*, 42, 1991: 189-196.
- CHENG, C. L. - DEWNEY, J. - KLEINHOF, A. - GOODMAN, H. M.: Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 83, 1989: 6825-6828.
- ISRAEL, D. W. - JACKSON, W. A.: Ion balance, uptake, and transport processes in N_2 -fixing and nitrate- and urea-dependent soybean plants. *Pl. Physiol.*, 69, 1982: 171-178.
- LORENS, H.: Free amino acids in tomato plants in relation to form and concentration of nitrogen in the rooting medium. *Pl. and Soil*, 45, 1975: 163-168.
- MAGALHAES, J. R. - WILCOX, G. E.: Ammonium toxicity development in tomato plants relative to nitrogen form and light intensity. *J. Pl. Nutr.*, 7, 1984a: 1477-1496.
- MAGALHAES, J. R. - WILCOX, G. E.: Growth, free amino acids, and mineral composition of tomato plants in relation to nitrogen form and growing media. *J. Amer. Soc. hort. Sci.*, 109, 1984b: 406-411.
- NICHOLAS, J. C. - HARPER, J. E. - HAGEMAN, R. M.: Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max.* L. Merr.). *Pl. Physiol.*, 58, 1976: 731-735.
- PLHÁK, F.: Podíl půdní nitrifikace na znečišťování podzemních vod nitráty. *Rostl. Výr.*, 39, 1993a (3): 277-286.
- PLHÁK, F.: Změny růstu a obsahu nitrátů vojtěšky v podmínkách umělého a přirozeného osvětlení. *Rostl. Výr.*, 39, 1993b (1): 85-91.
- PEUKE, A. D. - JESCHKE, W. D.: The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. *J. exp. Bot.*, 44, 1993: 1167-1176.

- SALSAC, L. - CHAILLOU, S. - MOROT-GAUDY, J. F. - LESAIN, C. - JOLIVET, E.: Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Pl. Physiol. Biochem.*, 25, 1987: 805-812.
- SMART, D. R. - BLOOM, A. J.: Relationships between the kinetics of NH_4^+ and NO_3^- absorption and growth in the cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. T-5). *Pl. Cell and Envir.*, 16, 1993: 259-267.
- ŠENKÝŘ, J. - PETR, J.: Nitrátová iontově selektivní elektroda. *Chem. listy*, 73, 1979: 1097.
- VILLA, M. S. - GONZÁLES, G. A. - TORRES, J. L. T. - SANTELISES, A. A.: Effect of the NH_4/NO_3 ratio on GS and PEPCase activities and on dry matter production in wheat. *J. Pl. Nutr.*, 15, 1992: 2545-2557.

Došlo 17. 3. 1994

PLHÁK, F. (Masaryk University, Faculty of Science, Brno):

Response of lucerne and sunflower on nitrate and ammonia nutrition in water and sand cultures at three intensities of solar radiation.

Rostl. Výr., 40, 1994 (8): 729-739.

In experiments dealing with the effects of different N-forms on the growth and metabolic reactions of plants mostly water culture method is used with good possibility of pH control in growth medium which changes contraversally by different N-substrate uptake. Sand culture (M a g a l h a e s , W i l c o x , 1984a, b; P e u k e , J e s c h k e , 1993) or another concrete media, as agropelit and vermiculit (B a r r o et al., 1991; A l f o n d i , P i n t e r , 1992), are also used for these purposes. It has not yet experimentally clearly confirmed, if or in what extent microbial N-red transformation to NO_3^- -N in above-mentioned media occurs. Results of such studies can be useful for better understanding of plant reaction on N-nutrition. The possible course of NH_4^+ -N and urea-N transformation to NO_3^- in water and sand cultures evaluated by means of NO_3^- level and partially nitrate reductase activity changes in two experimental plants at three solar radiation densities was the topic of the present study.

Experiments were carried out with lucerne and sunflower in glasshouse or in outdoor conditions under glass roof in June or September. Nutrient solutions with 14 mM NO_3^- , NH_4^+ and urea were used in both cases of growth media. Containers with aerated 5 l nutrient solution or Mitscherlich's pots with 6 l volume filled with washed river sand were used. Corrections of acidity in nutrient solutions to pH 6 were performed.

Ammonium and urea nutrition in comparison with nitrate nutrition inhibited the growth of lucerne and sunflower plants, especially root growth in water cultures. The inhibition effect of ammonia on lucerne growth was confirmed also in sand culture, but stimulation effect of urea in sand culture on sunflower plants especially on roots was established. In the case of NH_4^+ the growth of aboveground part was inhibited and the growth of roots was stimulated in sunflower plants in sand culture (Fig. 4a).

Decreasing light radiation caused by shading of plants to 2/3 and 1/3 of full solar radiation decreased gradually the growth of aboveground as well as underground parts with some exceptions of aboveground parts - in lucerne with NO_3^- nutrition and in sunflower with NH_4^+ nutrition. Shading of plants increased gradually NO_3^- content in all plant organs of all experimental trials. The NO_3^- changes were largely significant. Nitrate reductase activity in aboveground parts of sunflower in sand culture decreased predominantly with light reduction. The highest activity was determined in plants with NO_3^- nutrition, lower with urea nutrition and the lowest activity was recorded in plants with ammonium nutrition (Fig. 4c).

The increase in nitrate content in plants grown with NH_4^+ and urea nutrition, which was high enough in sand culture and rather low in water culture, was connected with light reduction and growth decrease. It demonstrated that nitrification processes occurred in different extent in both cultivation media. Conversion of urea and ammonium to nitrate in sand medium without plants was confirmed in another experiment (Fig. 5).

Growth stimulation of sunflower plants in sand culture connected with N-red substrates was established. In the case of NH_4^+ nutrition different effect on aboveground parts, which were inhibited, in comparison with roots, which were stimulated, reflects rather complicated metabolic reactions. In the case of urea nutrition a significant growth increase in dry matter production up to 40% reflected perhaps positive influence of N-red decrease connected with suitable $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio formation (V i l l a et al., 1992).

The results showed that decreased NO_3^- reduction at plant shading accompanied by nitrate reductase activity decrease, which is documented as light dependent enzyme (B e e v e r s , 1976), can play an important role in the plant growth inhibition. The results with urea and partially with ammonium nutrition showed that rise in nitrate in plants was not accompanied always with plant growth decrease. Lower energetic demand of N-red metabolism can be taken into account (S a l s a c et al., 1987). More positive effect of N-red forms on root growth than on aboveground parts can reflect also possible favorable influence of microbial processes occurring in sand medium during N-red to NO_3^- transformation.

Kontakní adresa:

Doc. RNDr. František P l h á k , CSc., Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika, tel.: 05/411 29, fax: 05/41 21 16 23

GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ KULTURNÍCH ROSTLIN

M. Ondřej

Praha, Academia 1992, 232 s.

Po delší přestávce přichází na náš knižní trh zdařile zpracované kompendium o genovém inženýrství užitkových rostlin, které shrnuje nejnovější poznatky v této oblasti.

Kniha je členěna do třinácti kapitol: První kapitola podrobně popisuje strukturu rostlinných genů, zabývá se srovnáním transkripce u prokaryot a eukaryot. Druhá kapitola je věnována typům genů rostlinného genomu; jsou popsány geny pro rRNA, tRNA a geny kódující rostlinné proteiny, jejichž poznání je perspektivní z hlediska šlechtění rostlin, tj. geny zásobních proteinů hlíz a semen, geny pro hemoglobiny, geny pro enzymy fotosyntézy, geny pro stressové proteiny. Ve třetí kapitole se autor zabývá regulací genů rostlinného genomu, v následující kapitole pak transportovatelnými elementy v rostlinném genomu, a to především elementem Cointo, systémem Ac-Ds, systémem Spm a elementem Mu. V páté kapitole jsou popsány repetitivní sekvence rostlinného genomu a šestá kapitola je věnována popisu principu metody detekce polymorfů délky restrikčních fragmentů (RFLP) a jejímu využití v praxi. V kapitole sedmé je charakterizován mitochondriální genom a mitochondriální plasmidy a v osmé kapitole chloroplastová DNA; je popsána transformace rostlinných buněk prostřednictvím bakterií rodu *Agrobacterium*; jsou uvedeny druhy *Agrobacteria* používané k transformacím, popis jejich Ti plasmidů a T-DNA, mechanismy integrace a excise T-DNA a způsoby (integrace) transformace rostlinných pletiv. V desáté kapitole se seznámíme s vnášením klonovaných genů do rostlinného genomu prostřednictvím bakterií rodu *Agrobacterium*; jsou popsány výsledky pokusů s vnášením genů do rostlinného genomu a využití transgeneze ve šlechtění rostlin. Jedenáctá kapitola pojednává o přímé transformaci rostlinných protoplastů bez využití *Agrobacteria* a T-DNA. Dvanáctou kapitolu věnuje autor rostlinným virům v genovém inženýrství, konkrétně viru mozaiky tabáku (TMV), viru ránových nádorů (VTV), viru zlaté mozaiky rajčete (TGMV) a viru mozaiky kvěťáku (CaMV). Třináctá kapitola popisuje viroidy, jejich reprodukci v rostlinách a transformaci rostlin viroidy s použitím T-DNA *Agrobacterium tumefaciens*.

Text knihy je zakončen slovníčkem obecných termínů molekulární genetiky a genového inženýrství, seznamem použitých zkratek a seznamem literatury. Publikace je určena hlavně pro šlechtitele a biology, bude však vhodnou pomůckou i pro přírodovědce, zemědělce, lesníky a všechny, kdo se šlechtěním rostlin a genovým inženýrstvím zabývají.

Doc. RNDr. ing. Josef Zahradníček, CSc.

ROLE ETYLENU A INDOLYL-3-OCTOVÉ KYSELINY V PRŮBĚHU ONTOGENEZE OBILEK OZIMÉ PŠENICE (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

M. Dundelová, S. Procházka

Vysoká škola zemědělská, Brno

V období od vymetání klasu do voskové zralosti obilek byla v týdenních intervalech sledována produkce etylenu klasy ozimé pšenice (*Triticum aestivum* L.) a byla stanovena endogenní hladina indolyl-3-octové kyseliny (IAA) v apikálních, mediálních a bazálních obilkách těchto klasů. Současně byla sledována hmotnost obilek. Experiment byl rozdělen na variantu s odstraněným posledním listem, s odstraněnými mediálními obilkami a na variantu kontrolní - intaktní rostliny. Průběh produkce etylenu v intaktních klasech u varianty s odstraněným posledním listem a varianty kontrolní byl stejný. Klasy s odstraněnými mediálními obilkami produkovaly etylen odlišně. Z výsledků vyplývá, že v klasech ozimé pšenice účinkuje IAA syntetizovaná v klasech a IAA transportovaná z posledního listu. Odlišný průběh produkce etylenu by mohl být způsoben IAA syntetizovanou *in situ*. Kauzální vztah hmotnosti sušiny obilek a endogenní hladiny IAA nebyl potvrzen.

Hmotnost obilek a jejich velikost v závislosti na postavení obilek v klasu zájímají pěstitele i šlechtitele. Obecně jsou proximální obilky větší a mají větší hmotnost v porovnání s obilkami distálními, mediální obilky dosahují větší hmotnosti a velikosti v porovnání s obilkami nacházejícími se v apikální a bazální části klasu. Tento jev je vysvětlován např. dostupností asimilátů či transportní kapacitou (H a n i f, L a n g e r, 1972). E v a n s et al. (1972) uvádějí, že pravděpodobně hormonální signál, nikoliv dostupnost asimilátů může být hlavní příčinou rozdílné hmotnosti obilek. Fytohormonální podstatu mediální dominance obilek v klase popsali M i c h a e l, B e r i n g e r (1980). Fytohormony se podílejí na regulaci růstu obilek. B a n g e r t h et al. (1985) uvádějí, že korelace mezi indolyl-3-octovou kyselinou (IAA) a akumulací sušiny v obilkách představuje pouze nahodilou změnu a zvýšená hladina IAA je dokonce výsledkem vyšší rychlosti růstu. D u n d e l o v á, P r o c h á z k a (1989) neprokázali přímou korelaci mezi hladinou IAA a hmotností sušiny obilek. Poznatek, že IAA indukuje tvorbu etylenu (Y a n g, H o f f m a n, 1984), byl signálem pro studium interakcí etylenu s ostatními fytohormony jak ve vegetativních, tak i v generativních orgánech. D u n d e l o v á et al. (1993) uči-

nili závěr, že etylen produkovaný listy pšenice se může podílet na senescenci listů ozimé pšenice.

Cílem předložené práce bylo stanovit endogenní hladinu IAA v apikálních, mediálních a bazálních obilkách klasu a produkci etylenu klasem ozimé pšenice (*Triticum aestivum* L.) ve vztahu k počtu obilek v klasu a k redukované dostupnosti asimilátů.

MATERIÁL A METODA

K pokusům byly použity klasy hlavních stébel ozimé pšenice (*Triticum aestivum* L.) cv. Košútka. Rostliny byly předpěstovány na polním pokusném pozemku. Po přezimování byly rostliny přeneseny do vegetačních nádob o objemu 1 dm³, ve kterých byly dále pěstovány na původním stanovišti. Po vymetání klasů byla provedena defoliace posledního (praporcového) listu (za účelem redukce zdroje asimilátů) a byly odstraněny mediální obilky z klasu hlavního stébela (za účelem odstranění hlavního zdroje endogenní IAA).

Takto kultivované rostliny byly odebírány v týdenních intervalech a postupně použity ke stanovení produkce etylenu a endogenní volné IAA. Současně s hodnotami endogenních fytohormonů byla sledována tvorba hmotnosti čerstvé biomasy obilek u každé varianty.

Produkce etylenu byla měřena na plynovém chromatografu Chrom 5 podle metodiky, kterou popsali Dundelová et al. (1993). Endogenní volná IAA byla stanovena spektrofotometrickou metodou - Shimadzu (Moudal et al., 1978). Hodnoty uvedené v tab. I až III jsou aritmetickým průměrem ze tří opakování.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V průběhu ontogeneze klasu byly maximální hodnoty IAA zjištěny během mléčné zralosti obilek ve všech variantách (tab. I). Mezi jednotlivými variantami byly v období mléčné zralosti zjištěny výrazné kvantitativní rozdíly. Nejvyšší hladina IAA v klase byla stanovena u kontrolní varianty, přičemž mediální obilky se na této aktivitě podílely 62,6 %. Druhá nejvyšší hodnota endogenní IAA v klase byla zjištěna u varianty s odstraněnými mediálními obilkami, přičemž apikální a bazální obilky se podílely na této aktivitě téměř stejným dílem. Výrazně nejnižší endogenní hladina IAA byla stanovena u varianty s odstraněným posledním listem, i na této aktivitě se podílely především mediální obilky (82,2 %).

Změny endogenních hladin v závislosti na ontogenezi obilek probíhaly ve všech variantách stejně. Od metání klasu se hladina endogenní IAA postupně zvyšovala, maxima bylo dosaženo na počátku mléčné zralosti. U varianty

I. Hladina endogenní IAA [ng / část klasu ($x \pm \sigma$)] v obilkách odebíraných z různých částí klasu v období od metání do voskové zralosti obilek (podle makrofenologické stupnice Feekese) – Endogenous IAA level [ng / segment of spike ($x \pm \sigma$)] in caryopses taken from various parts of spike from earing to wax ripeness of caryopses (according to the Feekes' s macrophenological scale)

Makrofenologická fáze ¹	Obilky ⁵	11.5.	11.5.4.	12.1.	12.1.	12.2.1.
Kontrolní varianta ²	apikální ⁶	4,5±3,4	3,3± 1,3	240,0±191,8	69,9± 21,7	22,0±20,5
	mediální ⁷	4,8±1,3	14,9± 4,6	512,2±159	416,0± 85,9	4,2± 3,7
	bazální ⁸	1,7±0,3	18,4± 5,2	66,2± 9,2	28,8± 2,5	0
	klas celkem ⁹	11,0±5,0	36,6±11,1	818,4±260	514,7±110,1	26,2±24,2
Odstraněný poslední list ³	apikální	6,9±4,2	2,1± 0,5	16,9± 4,5	74,5± 14,5	1,2± 0,9
	mediální	6,7±2,9	31,8± 2,3	120,0± 7,9	199,9± 42,0	20,0±15,0
	bazální	1,6±1,1	2,1± 0,7	9,6± 2,9	17,1± 4,3	21,2±20,0
	klas celkem	15,4±8,1	36,0± 3,5	146,5± 15,3	291,5± 60,8	42,4±36,0
Odstraněné mediální obilky ⁴	apikální	4,2±0,3	11,0± 6,3	158,7± 2,2	25,9± 5,6	1,7± 1,3
	bazální	4,1±2,3	11,3± 3,5	203,2± 56,5	192,1± 11,6	1,7± 1,6
	klas celkem	8,3±2,6	22,3± 9,7	361,7± 58,7	218,0± 17,2	4,4± 2,9

¹macrophenological stage, ²control variant, ³removed last leaf, ⁴removed medial caryopsis, ⁵caryopses, ⁶apical, ⁷medial, ⁸basal, ⁹spike in total

s odstraněným posledním listem bylo maxima IAA dosaženo na konci mléčné zralosti. V období voskové zralosti hladina endogenní IAA opět klesala.

Dynamika produkce etylenu intaktními klasy, tzn. klasy kontrolní varianty a varianty s odstraněným posledním listem, probíhala odlišným způsobem v porovnání s variantou, u které byly z klasů odstraněny mediální obilky. V prvních dvou případech se produkce etylenu od vymetání klasu do počátku mléčné zralosti obilek zvyšovala. Po dosažení maxima prudce klesala. U varianty s odstraněnými mediálními obilkami byla zjištěna maximální produkce (tab. II) ihned po vymetání klasu, potom se postupně snižovala.

Nejvyšší hmotnosti čerstvé biomasy dosáhly apikální a bazální obilky v klasích varianty s odstraněnými mediálními obilkami (tab. III). Hmotnost sušiny obilek v kontrolní variantě se měnila podle známého schématu. Ve variantě s odstraněným posledním listem byla obdobná distribuce sušiny jako u kontrolní varianty s tím rozdílem, že hmotnosti sušiny dosahovaly nižších hodnot. Hmotnost sušiny celého klasu však byla nejnižší u varianty s odstraněnými mediálními obilkami, nejvyšší pak u kontrolní varianty (tab. I).

II. Množství etylenu ($\text{nl.h}^{-1} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$) produkovaného klasy ozimé pšenice odrůdy Košútka v jednotlivých makrofenologických fázích podle stupnice Feekese – Ethylene amount ($\text{nl.h}^{-1} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$) produced by winter wheat spikes, Košútka cultivar, in individual macrophenological stages according to Feekes' s scale

Makrofenologická fáze ¹	11.5.	11.5.4.	12.1.	12.1.	12.2.1.
Kontrolní varianta ²	4,7	5,4	5,6	1,6	1,3
Hmotnost klasu ⁵ (g)	1,8+0,08	2,39+0,4	2,93+0,5	4,02+0,2	3,75+0,6
Odstraněný poslední list ³	5,1	5,4	6,8	3,3	1,9
Hmotnost klasu (g)	1,53+0,1	1,99+0,2	2,34+0,3	2,66+0,3	3,12+0,9
Odstraněné mediální obilky ⁴	6,1	4,9	4,8	2,5	1,7
Hmotnost klasu (g)	1,3+0,02	1,61+0,1	2,42+0,3	2,34+0,2	2,0+0,5

For 1 - 4 see Tab. I, ⁵ spike weight

III. Průměrná hmotnost obilek (mg) z různých částí klasu v průběhu sledovaných makrofenologických fázích podle stupnice Feekese – Average weight of caryopses (mg) in various segments of the spike during studied macrophenological stages according to Feekes' s scale

Makrofenologická fáze ¹	Obilky ⁵	11.5.	11.5.4.	12.1.	12.1.	12.2.1.
Kontrolní varianta ²	apikální ⁶	1,27	15,74	34,30	46,14	54,49
	mediální ⁷	1,62	18,86	39,40	52,22	54,65
	bazální ⁸	1,55	14,13	32,45	44,55	44,65
Odstraněný poslední list ³	apikální	1,87	11,77	21,71	37,57	41,79
	mediální	2,17	14,58	26,32	42,73	48,60
	bazální	1,45	10,16	20,39	34,94	41,84
Odstraněné mediální ⁴	apikální	1,88	27,87	47,42	59,42	60,05
	bazální	1,69	20,26	43,61	59,40	56,75

For 1 - 8 see Tab. I

Z uvedených výsledků lze soudit, že pro sink představovaný klasem, resp. obilkami v klase je poslední list zdrojem nejen asimilátů, ale také IAA. V klasech se pak vyskytuje IAA syntetizovaná *in situ* a IAA transportovaná z posledního listu. Odlišný průběh produkce etylenu intaktními klasy v porovnání s klasy zbavenými mediálních obilek může vést k hypotéze nepřímého účinku auxinu v korelativní inhibici, podle které může být účinek auxinu zprostředkován sekundárním přenašečem, za který je etylen považován. Podle teorie nepřímého

účinku auxinu je možné chápat růst apikálních a bazálních obilek v klase pod nadvládou mediálních obilek jako inhibici způsobenou etylenem, jehož produkci indukovala IAA syntetizovaná právě v mediálních obilkách. Současně však platí, že hmotnost obilek je dána úložnou kapacitou každé buňky endospermu, jež je limitována plasticitou buněčné stěny, kterou mohou ovlivňovat IAA i další fytohormony (C l e l a n d , 1983). Naše závěry podporují názor (A u f h a m m e r et al., 1986; D u n d e l o v á , P r o c h á z k a , 1989), že nelze hledat přímou korelační závislost mezi endogenní IAA a hmotností obilek.

Pro objasnění role fytohormonů v tvorbě výnosu jsou požadovány detailní znalosti o distribuci fytohormonů v rostlinných pletivech, jakož i o mechanismu účinků fytohormonů.

Literatura

- AUFHAMMER, W. - ZINSMAIER, P. - BANGERTH, F.: Variation of dry matter accumulation at definite positions within wheat ears and levels of indolyl-3-acetic acid (IAA). *Pl. Growth Reg.*, 4, 1986: 305-310.
- BANGERTH, F. - AUFHAMMER, W. - BAUM, O.: IAA level and dry matter accumulation at different positions within a wheat ear. *Physiol. Plant.*, 63, 1985: 121-125.
- CLELAND, R. E.: The capacity for acid-induced wall loosening as a factor in the control of *Avena* coleoptile cell elongation. *J. Exp. Bot.*, 34, 1983: 676-680.
- DUNDELOVÁ, M. - PROCHÁZKA, S.: Hladina indolyl-3-octové kyseliny v obilkách pšenice ozimé (*Triticum aestivum* L.) a ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L.). *Rostl. Výr.*, 23, 1989: 381-387.
- DUNDELOVÁ, M. - REINÖHL, V. - PROCHÁZKA, S.: Produkce etylenu u ozimé pšenice v průběhu ontogeneze rostlin. *Rostl. Výr.*, 39, 1993: 589-593.
- EVANS, L. T. - BINGHAM, J. - ROSKAMS, M. A.: The pattern of grain set within ears of wheat. *Austral. J. Biol. Sci.*, 25, 1972: 1-8.
- HANIF, M. - LANGER, R. H. M.: The vascular system of the spikelet in wheat (*Triticum aestivum*). *Ann. Bot.*, 36, 1973: 721-727.
- MICHAEL, G. - BERINGER, H.: The role of hormones in yield formation. In: *Proc. 15th Coll. Int. Potash Inst. Physiological aspects of crop productivity*, Bern, Wageningen, 1980: 85-116.
- MOUSDALE, D. N. A. - BUCHTER, D. N. - POWELL, R. G.: Spectrophotofluorimetric methods of determining indole-3-acetic acid. In: HILLMAN, J. R. (ed.): *Isolation plant growth substances*. London, 1978: 27-39.
- YANG, S. F. - HOFFMAN, N. E.: Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Pl. Physiol.*, 35, 1984: 369-379.

Došlo 17. 3. 1994

The ethylene production by the winter wheat (*Triticum aestivum* L.) spikes has been studied in week intervals from earing to wax ripeness of caryopses and the endogenous level of indolyl-3-acetic acid (IAA) was determined in apical, medial and basal caryopses of these spikes. Simultaneously, caryopsis weight was investigated too. An experiment was divided into variant with removed last leaf, removed medial caryopses and the control - intact plants. The ethylene production was determined by gas chromatography - Chrom 5 (D u n d e l o v á et al., 1993), free IAA level was set spectrofluorometrically - Shimadzu (M o u s d a l e et al., 1978).

The course of ethylene production in intact spikes ($\text{nl.h}^{-1} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$) in the variant with removed last leaf and in the control was identical. From earing (5.1; 4.7) to the beginning of milk ripeness (6.8; 5.6) the production was slightly increasing, after attaining the maximum it was falling steeply (1.9; 1.3); or in spikes with removed medial caryopses the ethylene production reduced (1.7) from earing to wax ripeness, as presented in Tab. II.

Endogenous IAA level (ng) was the highest in the control in medial caryopses (512) in milk ripeness of caryopses. Removal of the last leaf intensified the dominance of medial caryopses. It follows from the results that IAA synthesized in spikes and IAA transported from the last leaf act in wheat spikes. A distinct course of ethylene production would be caused by the way of IAA synthesized *in situ*. The causal relation of caryopsis dry matter weight and IAA endogenous level was not confirmed (Tab. I). The highest weight of fresh biomass was achieved by apical and basal caryopses in spikes of the variant with removed medial caryopses (Tab. III).

Kontaktní adresa:

Ing. Miroslava D u n d e l o v á , CSc., Vysoká škola zemědělská, Zemědělská 1,
613 00 Brno, Česká republika, tel.: 05/45 13 60 01, fax: 05/45 21 20 44

VLIV HUMINOVÝCH LÁTEK NA RYCHLOST RŮSTU ORCHIDEJÍ V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*

H. Vlašínová, Z. Ježek, S. Procházka

Vysoká škola zemědělská, Brno

V práci byl sledován vliv koncentrace vybraných huminových látek v kultivačním médiu na růst mladých rostlin čeledi *Orchidaceae* v podmínkách *in vitro*. Byl zjištěn stimulační vliv na vývin kořenů, listů, nárůst biomasy, tvorbu chlorofylu i na vzcházivost. Studované látky humát i hymatomelanát sodný lze doporučit pro kultury orchidejí *in vitro*, humát sodný v koncentraci 50 mg.l⁻¹ a hymatomelanát sodný v koncentraci 5 až 50 mg.l⁻¹ média.

Huminové látky se významně podílejí na zvyšování výnosů a kvality rostlinné produkce v první řadě vlivem na sorbní schopnost půdy. Velmi významný je však i jejich přímý vliv na základní metabolické procesy rostlin. Je známo, že stimulují růst rostlin prostřednictvím stimulace příjmu a transportu vody a roztoku živin, zvýšené respirace, zvýšené intenzity fotosyntézy a prostřednictvím vlivu na enzymatické systémy rostlin (T i c h ý , 1982; V i s s e r , 1986). V některých případech vykazují aktivitu srovnatelnou s auxiny, gibereliny nebo cytokininy (T i c h ý , 1982).

Cílem předložené práce bylo prozkoumat možnosti jejich využití také při klíčení a růstu mladých rostlin *in vitro*. Komplexní charakter těchto chemikálií ne zcela definovaných látek je nevýhodou pro využití v experimentální práci, ale v případě čeledi *Orchidaceae* se komplexní přísady (kokosové mléko, banánový extrakt apod.) běžně používají a jejich nahrazení huminovými látkami může mít i ekonomický efekt.

MATERIÁL A METODA

Byly provedeny čtyři pokusy s různým rostlinným materiálem: pokus č. 1: *Paphiopedilum Panther* x (*Nitens* x *Leander*); pokusy č. 2 a 3: *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó; pokus č. 4: *Orchis morio* L.

Metody aplikace huminových látek

1. Semena byla vyseta v aseptických podmínkách do zkumavek na kultivační médium 1/4 Sladden modif. Burgeff var. Lucke (L u c k e , 1972), doplněné o huminové látky hymatomelanát sodný (NaHy) a humát sodný (NaHu)

v koncentracích: 5, 10, 50, 100 a 500 mg.l⁻¹ (12 opakování). [Obě látky byly získány alkalickou extrakcí z rašeliny (T i c h ý , Č e c h o v á , 1974)]. Po třech měsících kultivace při fotoperiodě 16 h, intenzitě světla 1 200 lx a teplotě 23 ± 2 °C byly rostlinky přeneseny na bazální médium bez huminových látek s plnou koncentrací makroelementů a dále kultivovány při 2 200 lx.

2. K výsevu bylo použito médium M (M i c h l , 1988) bez huminových látek. Po jednom měsíci kultivace byly mladé rostlinky (protokormy) přeneseny po 10 ks na média doplněná NaHu a NaHy v koncentracích: 5, 25 a 50 mg.l⁻¹ (10 opakování).

3. Semena byla vyseta na médium M s doplňkem: M_B - 50 mg.l⁻¹ Tr (Terra regulátor III - komerční přípravek s obsahem rašelinového výluhu); M_C - 50 mg.l⁻¹ NaHu; M_A - 0 (kontrola). Po jednom měsíci kultivace byly protokormy z těchto kultur přeneseny po pěti na média s obsahem NaHu nebo NaHy: 10, 50, 100 mg.l⁻¹ (tři opakování).

4. Semena byla vyseta na médium M s doplňkem NaHu nebo NaHy: 10, 50, 100 mg.l⁻¹ (tři opakování) a po čtyřech měsících byly protokormy s diferencovaným vrcholem kultivovány po 20 kusech na čerstvém médiu stejného složení v Erlenmayerových baňkách s obsahem 100 ml.

Ve všech pokusech byla zařazena kontrola bez huminových látek.

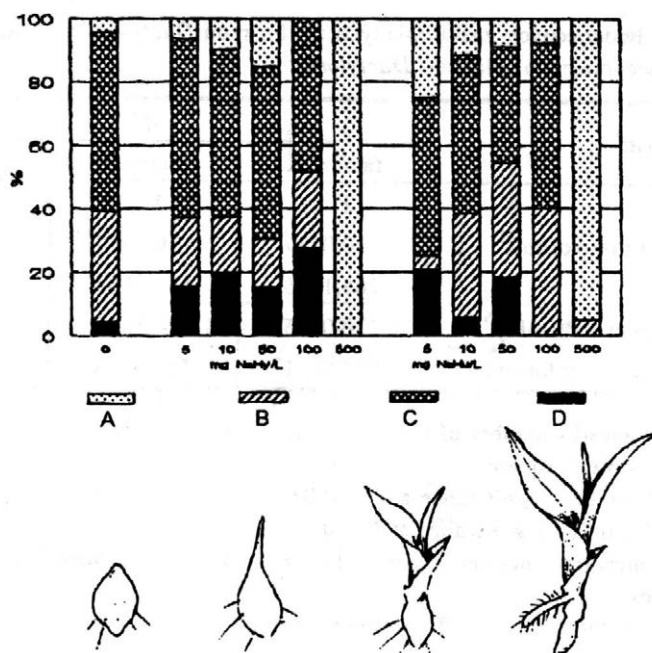
VÝSLEDKY

1. Po třech měsících kultivace bylo hodnoceno zastoupení rostlin v jednotlivých stadiích růstu (obr. 1). Vliv huminových látek se projevil příznivě na iniciaci kořenů, nadoptimální koncentrace 500 mg.l⁻¹ však inhibovala vývin rostlinek.

Po šesti měsících kultivace byly hodnoceny průměrné délky listů, výsledky byly statisticky vyhodnoceny metodou *t*-testu a graficky znázorněny prostřednictvím intervalů spolehlivosti (obr. 2). Z grafu na obr. 2 je patrný statisticky vysoce průkazný příznivý efekt 5 mg.l⁻¹ NaHy na prodlužovací růst listů a statisticky vysoce průkazný inhibiční vliv 500 mg.l⁻¹ NaHy i NaHu.

2. Po pěti měsících kultivace byla hodnocena průměrná čerstvá hmotnost protokormů, vyhodnocena metodou *t*-testu a graficky znázorněna pomocí intervalů spolehlivosti (obr. 3). Z grafu na obr. 3 je patrný vysoce významný příznivý efekt NaHy (5 až 50 mg.l⁻¹) a NaHu (50 mg.l⁻¹).

3. Po osmi týdnech byla sledována závislost pěti hodnocených znaků na druhu a koncentraci huminových látek v kultivačním médiu (faktor A) a na druhu startovacího média (faktor B). Výsledky jsou uvedeny v tab. I. Vliv druhu a koncentrace huminových látek se statisticky vysoce významně projevil na tvorbě rhizoidů, vliv startovacího média zase na velikosti protokormů. Statisticky byl prokázán i vliv huminových látek na vzcházivost a tvorbu chlorofylu. Z obr. 4



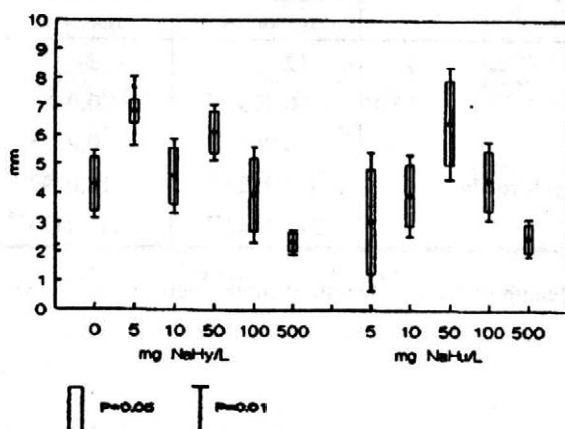
1. Vliv huminových látek na růstová stadia rostlinek rodu *Paphiopedilum* po třech měsících kultivace – Effect of humin substances on the percentage of *Paphiopedilum* plantlets in individual growth stages after three months' cultivation

A - iniciace kořenů - root initiation

B - objevení 1. listu - 1st leaf initiation

C - další listy - further leaves

D - protokorm - protocorm



2. Konfidenční intervaly pro průměrnou délku listů rostlinek rodu *Paphiopedilum* po šesti měsících kultivace – Confidence intervals for average *Paphiopedilum* plants length after six months' cultivation

+ průměrná délka listu - average length of leaf

I. Analýzy variance hodnocených znaků mladých rostlin rodu *Dactylorhiza* – Analysis of variance of studying phenomena of plantlets *Dactylorhiza*

Zdroj proměnlivosti ¹	MS		
	faktor ² A	faktor B	reziduální ³
DF	12	2	24
Průměrná velikost protokormů ⁴	0,0539 ⁺	0,1969 ⁺⁺	0,0197
Vzcházivost ⁵	268,1136 ⁺	635,5664 ⁺	116,3636
Procento protokormů s rhizoidy ⁶	1 110,0815 ⁺⁺	1 046,3846	320,7802
Procento protokormů s chlorofylem ⁷	772,9091 ⁺	517,4638	317,998

DF - počet stupňů volnosti - number of degrees of freedom

MS - střední čtverec - mean square

+ průkaznost při $P = 0,05$ - significance at $P = 0.05$

++ průkaznost při $P = 0,01$ - significance at $P = 0.01$

faktor A - druh a koncentrace huminové látky - factor A - kind and concentration of humin substances

faktor B - startovací médium - factor B - starting medium

¹source of variability, ²factor, ³residual, ⁴average size of protocorms, ⁵emergence rate, ⁶percentage of protocorms with rhizoids, ⁷percentage of protocorms with chlorophyll

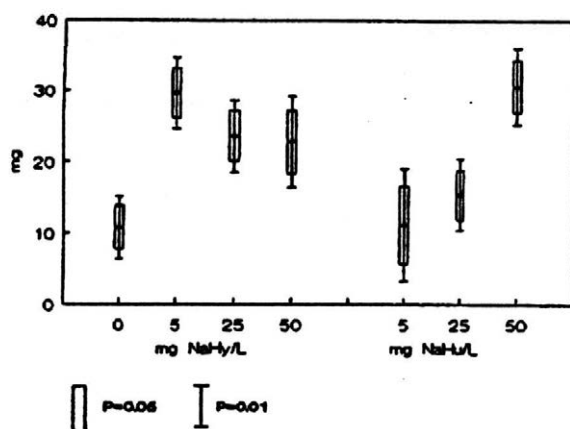
II. Analýzy variance hodnocených znaků mladých rostlin rodu *Orchis* – Analysis of variance of studying phenomena of plantlets *Orchis*

Zdroj proměnlivosti ¹	MS		
	faktor ² A	faktor B	reziduální ³
DF	12	3	36
Délka listů ⁴	0,2053 ⁺⁺	0,0087	0,0137
Délka kořenů ⁵	0,0691 ⁺⁺	0,0125	0,0205
Procento nekrotických rostlin ⁶	332,9327 ⁺⁺	112,0192	83,8942
Procento abnormalit ⁷	215,1442 ⁺⁺	238,9423 ⁺⁺	36,5118

For 1 - 3 see Tab. I, ⁴length of leaves, ⁵length of roots, ⁶percentage of necrotic plants, ⁷percentage of abnormalities

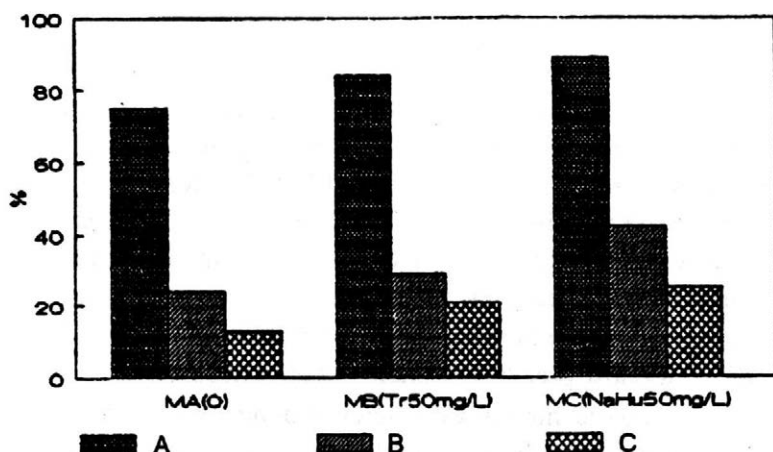
je patrné, že obohacení startovacího média o 50 mg.l⁻¹ NaHu působilo nejlépe na vývin protokormů.

4. Výsledky byly zpracovány statistickou metodou analýzy variance, závislost mezi jednotlivými znaky byla sledována na základě korelačního koeficientu. Vliv ošetření (koncentrace a druhu huminové látky v médiu) na vývin mladých rostlin



3. Konfidenční intervaly pro průměrnou čerstvou hmotnost rostlinek rodu *Dactylorhiza* po pěti měsících kultivace – Confidence intervals of average weight of protocorms *Dactylorhiza* after five months' cultivation

+ průměrná hmotnost - average weight



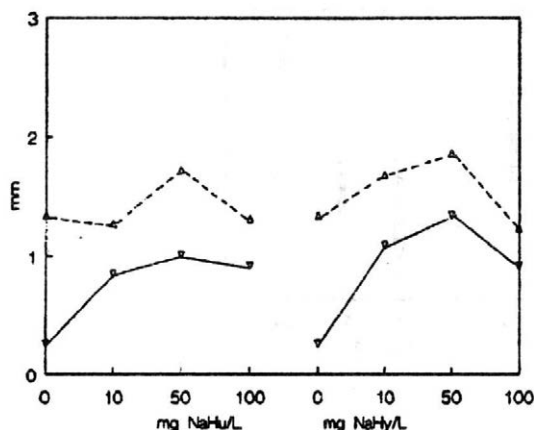
4. Vliv startovacího média na sledované vlastnosti protokormů rodu *Dactylorhiza* po osmi týdnech kultivace – Effect of initial medium on the protocorms *Dactylorhiza* after eight weeks' cultivation

A - procento přežití protokormů - percentage of living protocorms

B - procento protokormů s rhizoidy - percentage of protocorms with rhizoids

C - procento zelených protokormů - percentage of green protocorms

byl statisticky vysoce průkazný u všech sledovaných ukazatelů, vliv opakování jen u procenta abnormálně vyvinutých rostlin - proliferace, deformace (tab. II). Na obr. 5 je znázorněn vliv druhu a koncentrace huminových látek na délku listů



5. Vliv druhu a koncentrace huminové látky na průměrnou délku listů (Δ) a kořenů (▽) mladých rostlin rodu *Orchis* – Effect of humin substances on average length of leaves (Δ) and roots (▽) of plantlets *Orchis*

a kořenů mladých rostlin. Největší prodlužovací růst byl zaznamenán na médiu s 50 mg.l⁻¹ NaHy, efekt 10 mg.l⁻¹ NaHy byl srovnatelný s 50 mg.l⁻¹ NaHu (obr. 5).

DISKUSE

Dodání huminových látek s výjimkou nadoptimálních koncentrací stimulovalo u všech sledovaných rodů především iniciaci kořenů a tvorbu rhizoidů, což je v souladu s dřívějšími poznatky, že huminové látky mají větší vliv na kořeny než na nadzemní části rostliny (S l a d k ý, 1962). V závislosti na koncentraci se tento vliv projevuje pozitivně (V i s s e r, 1986). Stimulace kořenění ukazuje na možnou souvislost s metabolismem IAA. Někteří autoři uvádějí inhibici IAA oxidázy huminovými látkami (V a u g h a n, 1986).

Na médiích s obsahem huminových látek (hlavně 50 mg.l⁻¹ NaHu) měly rostlinky i lepší schopnost přežít a rychleji tvořily chlorofyl.

Vysoké koncentrace huminových látek mohou ovšem naopak poškodit buněčnou membránu, a tím ohrozit životnost buněk. Tento efekt se v našich pokusech projevil u NaHu v koncentraci 500 mg.l⁻¹, která vysoce statisticky průkazně inhibovala vývin listů a kořenů rodu *Paphiopedilum*.

Při srovnání aktivit dvou sledovaných huminových látek (humátu a hymatomelanátu sodného) jsou patrné určité rozdíly. Pro humát sodný se ukazuje koncentrace 50 mg.l⁻¹ jako optimální pro výsev semen rodu *Paphiopedilum* a dále pro nárůst biomasy u rodu *Dactylorhiza* i pro růst listů a kořenů mladých rostlin rodu *Orchis*. Naproti tomu hymatomelanát sodný výrazně stimuloval vývin kořenů i listů rodu *Orchis* už při koncentraci 10 mg.l⁻¹, u rodů *Dactylorhiza* a *Paphiopedilum* byl dokonce zaznamenán vysoce statisticky průkazný stimulační efekt u koncentrace 5 mg.l⁻¹. Tyto výsledky jsou zcela v souladu s poznatky, které publikovaly Č e r e v č e n k o, K u š n í r (1986). Citované autorky uvádějí

optimální koncentraci NaHu pro orchideje 50 mg.l⁻¹. Naše výsledky rovněž souhlasí s údaji, které uveřejnil S l a d k ý (1962), který stanovil optimální koncentraci NaHy pro rajče 4 mg.l⁻¹.

Přítomnost huminových látek měla příznivý vliv i na vzcházivost a rychlost tvorby chlorofylu, což je v souladu s dřívějšími poznatky (V a u g h a n , 1986; V i s s e r , 1986).

ZÁVĚR

Získané výsledky naznačují, že reakce sledovaných rostlin *in vitro* se neliší od reakcí popisovaných u jiných experimentálních systémů. Dosavadní experimenty však ještě neumožňují dostatečné zevšeobecnění. Zatím se ukazuje jako reálná možnost praktického využití huminových látek jako součásti kultivačního média pro rostliny pěstované *in vitro*. Jde o využití hlavně v pokusech o záchranu genofundu ohrožených rostlin, kde je usilováno o zmírnění selekčního tlaku kultivačních podmínek, případně o využití v zahradnické výrobě, kde je sledováno rychlé namnožení rostlinného materiálu.

Poděkování

Autoři děkují prof. RNDr. V. T i c h é m u , CSc., za poskytnuté huminové látky, za konzultace a zapůjčení literatury.

L i t e r a t u r a

ČEREVČENKO, T. M. - KUŠNIR, G. P.: Orchidei v kultuře. Kyjev, 1986.

LUCKE, E.: Nährboden aus der SBL- und GR-Reihe für die Praxis. Orchidee, 23, 1972: 103-104.

MICHL, J.: Standardizovaná metoda množení evropských orchidejí semeny II. Živa, 36, 1988 (3): 89-91.

SLADKÝ, Z.: Über den Einfluss einiger Humus Fraktionen auf den anatomischen Bau der Pflanzen. In: Studies about Humus. Trans. Int. Symp. Humus et Planta, Praha, 1962: 259-274.

TICHÝ, V. - ČECHOVÁ, M.: Biological activity of humus acids isolated from spruce wood decomposed by fungi. Biol. Plant., 16, 1974: 412-417.

TICHÝ, V.: Physiological and morphological responses of plants to the presence of humus substances. Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Purk. Brun., 12, 1982 (8): 401-406.

VAUGHAN, D.: Effect of humic substances on metabolic processes in plants. In: BURNS, R. G. et al. (eds): Humic substances effects on soil and plants. Reda, 1986: 54-76.

VISSER, S. A.: Effect of humic substances on plant growth. In: BURNS, R. G. et al. (eds): Humic substances effects on soil and plants. Reda, 1986: 89-135.

Došlo 17. 3. 1994

Humin substances can have both indirect (nutrient medium) and direct (metabolism) impact on the growth of plants under *in vitro* conditions. The complex influence of two humin substances on growth of seedlings of three genus of *Orchidaceae* was studied.

The content of humin substances in basal nutrient medium has a positive effect on growth of roots and leaves, weight of protocorms, chlorophyll synthesis and percentage of living plantlets. Differences between studied humin substances were found in several phenomena. Natrium hymatomelanate has a significantly stimulative effect on weight of protocorms of *Dactylorhiza* in a concentration of 5 mg.l⁻¹, while natrium humate in a concentration 50 mg.l⁻¹ (Fig. 3). A concentration of 10 mg.l⁻¹ natrium hymatomelanate has a comparative effect on the plant growth of *Orchis* with 50 mg.l⁻¹ natrium humate (Fig. 5).

Results indicate the stimulative effect of natrium hymatomelanate in the concentration from 5 to 50 mg.l⁻¹ and natrium humate in the concentration 50 mg.l⁻¹. Higher concentration (500 mg.l⁻¹) showed an inhibiting effect (Fig. 1). Both studied substances were extracted from peat at the Masaryk University using the published method (Tichý, Čechová, 1974).

Kontaktní adresa:

Ing. Helena V la š í n o v á , Vysoká škola zemědělská, Zemědělská 1,
613 00 Brno, Česká republika, tel.: 05/45 13 30 24, fax: 05/45 21 20 44

PRODUKCE ETYLENU A ETANU PŘI TVORBĚ ADVENTIVNÍCH KOŘENŮ NA STONKOVÝCH SEGMENTECH RÉVY VINNÉ

H. Fišerová, J. Hradilík

Vysoká škola zemědělská, Brno

Byla sledována tvorba adventivních kořenů a stupeň narašených pupenů na apikálních, mediálních a bazálních stonkových segmentech vinné révy a produkce etylenu a etanu. V počátku tvorby kořenu stoupá produkce etylenu a klesá produkce etanu. Apikální segmenty produkují vysoce průkazně více etylenu a etanu než segmenty mediální a bazální. Regresní vztahy mezi uhlovodíky a délkou kořene či délkou narašených pupenů jsou průkazné a vysoce průkazné pouze u apikálních segmentů. Vztah mezi etylenem a etanem je neprůkazný.

U vinné révy se projevuje výrazná apikální dominance, která byla předmětem studia vztahů mezi nativními růstovými regulátory, jejich topofýzou a interakcí se zvláštním zřetelem na tvorbu kořenů u segmentů letorostu a s tím spojenou produkcí etylenu a etanu.

Řada autorů sleduje vliv etylenu na tvorbu výhonů a kořenů a jejich výsledky jsou často různé. Hladina etylenu v pletivech a indukce tvorby bočních kořenů je regulována auxinem. B a t t e n , M u l l i n s (1978) však proti této úvaze argumentují tím, že nedokázali v hypokotylu fazolí vztah mezi tvorbou bočních kořenů a etylenovou produkcí u segmentů ošetřených auxinem.

K r i s h n a m o o r t h y (1972) uvádí, že etylen uvolňující se z ethrelu (CEPA), působí synergicky s různými auxiny, nikoliv však s 2,4D. Podle citovaného autora jsou hladiny etylenu ($1 \mu\text{l.l}^{-1}$) o mnoho vyšší než produkce v nestresových situacích.

R a d i n , L o o m i s (1969) oznámili, že 2 až $3 \mu\text{l.l}^{-1}$ etylenu inhibují tvorbu bočního kořene u ředkvičky, zatímco D i m a s i - T h e r i o u et al. (1993) zaznamenali při přidávku etylenu 0,01 až $10 \mu\text{l.l}^{-1}$ značné zvýšení počtu výhonů a podstatně vyšší tvorbu adventivních kořenů při regeneraci listů petunie.

Etylen produkují více kořeny dvouděložných rostlin než kořeny rostlin jednoděložných (F e l d m a n , 1984). U mutantu morfologicky abnormálního rajčete se netvoří boční kořeny, avšak po aplikaci etylenu 5 nl.l^{-1} se obnoví normální rozvětvený kořenový systém. D r e w et al. (1981) proto vyslovili předpoklad, že etylen stimuluje zakládání bočních kořenů. Tato problematika však zůstává stále otevřenou otázkou.

Podobně D r e w i t al. (1979) pozorovali růst kořenových a stonkových bází kukuřičných semenáčků v živném roztoku provzdušňovaném vzduchem s obsahem etylenu $5 \mu\text{l}^{-1}$, kdy bylo v kořenových nodech stimulováno zakládání adventivních kořenů.

K o n i n g s , J a c k s o n (1979) uvádějí, že nejdelší kořeny mají nejvyšší produkci etylenu. Nízký poměr etylenové produkce je v korelaci s malým rozvojem kořenového systému. Koncentrace etylenu $0,02$ až $0,1 \mu\text{l}^{-1}$ působí na růst kořenů stimulačně. Inhibice růstu kořenů byla zaznamenána při koncentraci etylenu $1 \mu\text{l}^{-1}$.

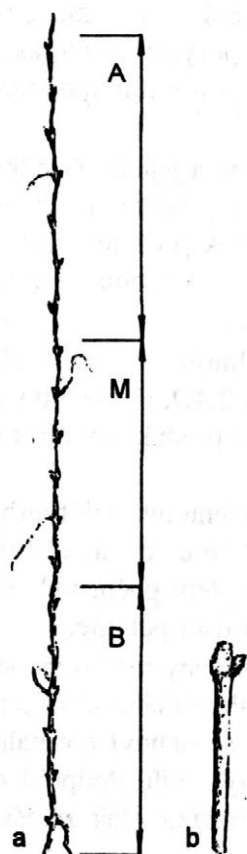
Kromě závislosti produkce etylenu na tvorbě kořenové soustavy byla studována i otázka vztahu etylenu a etanu při rhizogenezi.

MATERIÁL A METODA

Byly zpracovány letorosty odebrané v zimě 22. 1. 1991 z rezistentního kultivaru révy vinné Biana. Letorost byl segmentován po nodech; jako bazálních

bylo ponecháno sedm až devět pupenů ze spodní části letorostu a apikálních sedm až devět pupenů z horní části letorostu. Zbývající segmenty ze střední části byly označeny jako mediální (sedm až devět segmentů po jednom pupenu). Segmenty byly stříhány pod pupenem asi 3 až 5 cm a těsně nad pupenem (obr. 1a, b).

Apikální, mediální a bazální segmenty z jednoho letorostu byly zváženy a uzavírány do 500ml infuzních lahví s bralenem a destilovanou vodou. Takto byly zpracovány tři letorosty, resp. pokus proběhl ve třech opakováních. Lahve byly uzavřeny gumovým uzávěrem a po 24h inkubaci na okně při laboratorní teplotě 24°C z nich bylo odebíráno třikrát

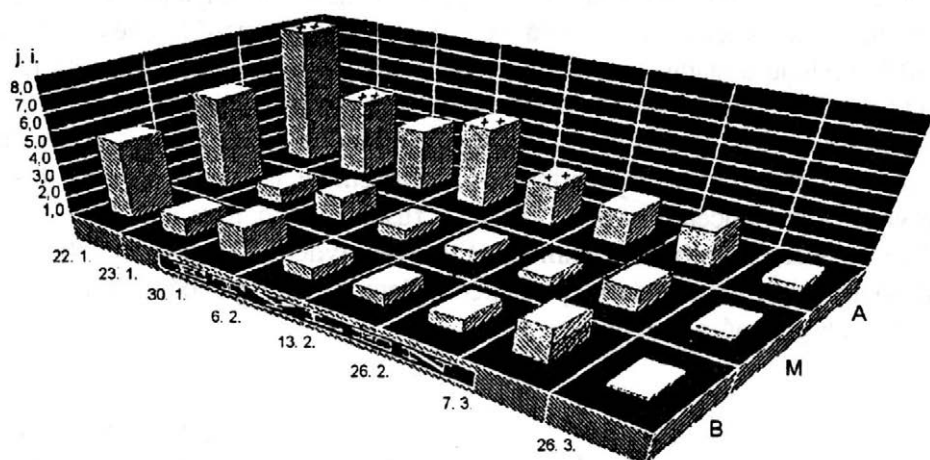


1a. Náskres způsobu rozdělení letorostu révy vinné na apikální (A), mediální (M) a bazální (B) pupeny – Drawing of the method of vine annual shoot classification into apical (A), medial (M), and basal (B) buds

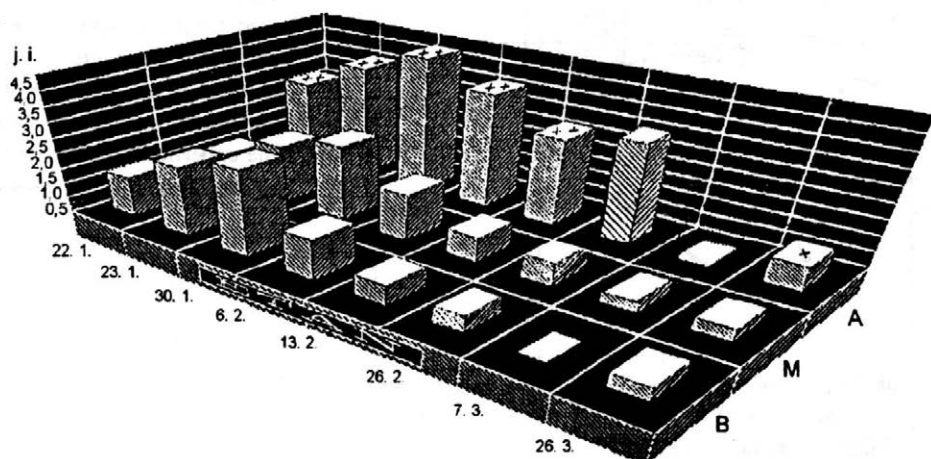
1b. Upravený segment révy vinné – Adapted vine segment

po 1 ml vzduchu, který byl analyzován na plynovém chromatografu CHROM 5 (Laboratorní přístroje Praha) s plamenioionizačním detektorem.

Analýzy byly prováděny na náplňové koloně o průměru 3 mm, dlouhé 1 m a plněné Porapakem N (HEWLET PACKARD). Teplota nástřiku byla 50 °C, kolony 45 °C a detektoru 70 °C. Průtok dusíku činil 30 ml.min⁻¹, vodíku



2. Produkce etylenu u apikálních (A), mediálních (M) a bazálních (B) segmentů révy vinné po dobu trvání pokusu; + - průkazné, ++ - vysoce průkazné – Ethylene production in apical (A), medial (M), and basal (B) segments in vine during the time of the experiment; + - significant, ++ - high significant

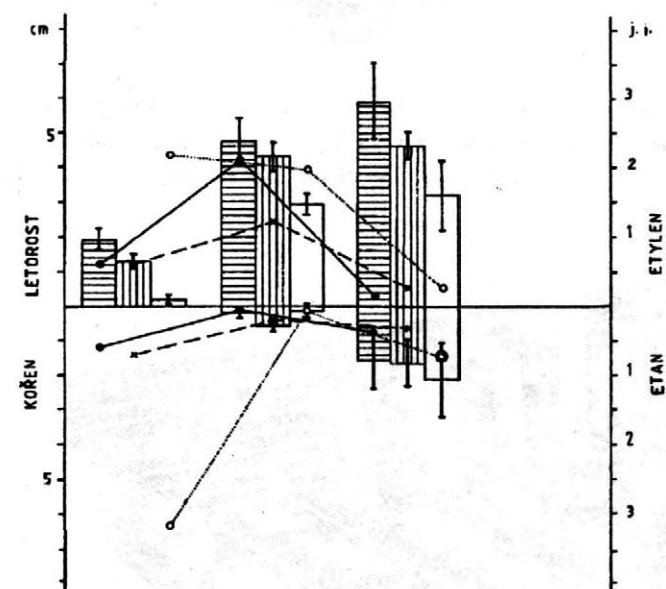


3. Produkce etanu u apikálních (A), mediálních (M) a bazálních (B) segmentů révy vinné po dobu trvání pokusu; + - průkazné, ++ - vysoce průkazné – Ethane production in apical (A), medial (M), and basal (B) segments in vine during the time of the experiment; + - significant, ++ - high significant

33 ml.min⁻¹ a kyslíku 700 ml.min⁻¹. Odezva detektoru byla vyhodnocena integrátorem (Laboratorní přístroje Praha) v jednotkách integrátoru (j. i.).

Po analýze na plynovém chromatografu byly lahve otevřeny a ponechány na okně. Měření probíhala po týdnu s občasnou výměnou vody po dobu dvou měsíců. Získané hodnoty integrátoru byly přepočítány na objem 1 ml ovzduší a 1 g hmotnosti rostlinného materiálu, který byl průběžně zjišťován, a potom statisticky zhodnoceny a zpracovány do grafů (obr. 2 a 3). Pro srovnání hodnot obou uhlovodíků (etylenu a etanu) jsou hodnoty ponechány v jednotkách integrátoru.

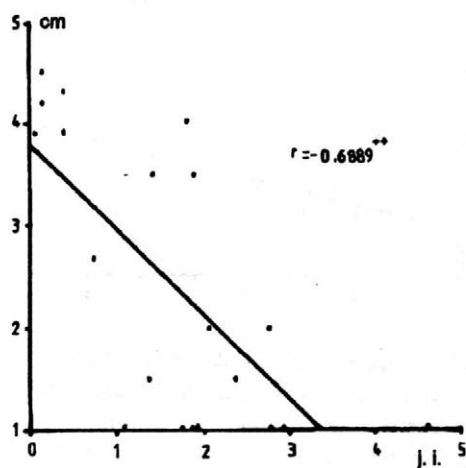
Od založení pokusu do 13. 2. (tři týdny) nevykazovaly segmenty žádné viditelné známky růstové aktivity. 26. 2. (pátý týden) bylo možné již změřit délky narašených pupenů; jejich grafické vyhodnocení je uvedeno na obr. 4 spolu s prvním vyhodnocením tvorby kořene i růstu nového letorostu 7. 3. (sedmý týden) a závěrečným hodnocením 26. 3. (devátý týden). Do grafu na obr. 4 jsou zakresleny i průměrné hodnoty produkce etylenu a etanu v době hodnocení délky vyrašených pupenů a kořenů.



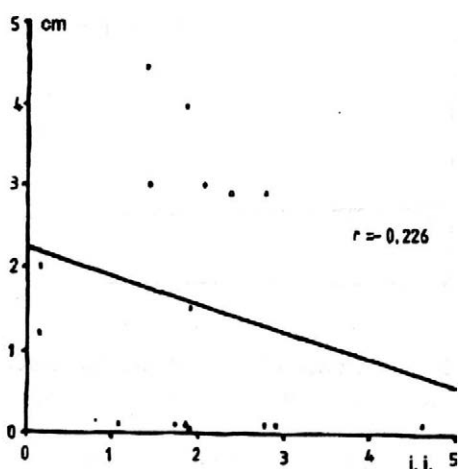
4. Průměrná délka narašených pupenů a kořenů u apikálních, mediálních a bazálních segmentů letorostů v pátém, sedmém a devátém týdnu od založení pokusu a produkce obou uhlovodíků - Mean length of broken buds and root length in apical, medial, and basal segments of annual shoots in the fifth, seventh, and ninth week from starting the experiment and production of the both hydrocarbons

■ apikální - apical ● —
 ▨ mediální - medial x - -
 □ bazální - basal ○
 ⊙ průkazná hodnota - significant value
 osa y (vlevo) - délka - y axis (left) length
 osa y (vpravo) - jednotky integrátoru - y axis (right) - integrator units
 letorost - annual shoot etylen - ethylene
 kořen - root etan - ethane

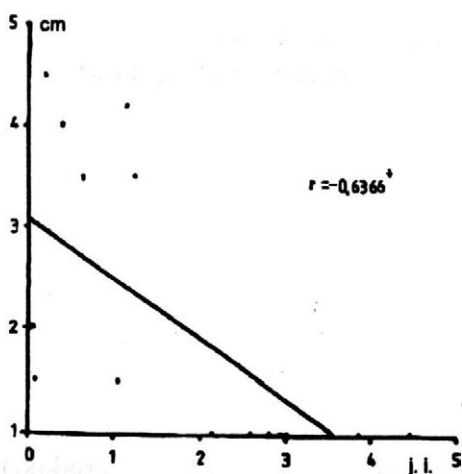
Pro hledání vztahů mezi produkcí plynů a růstovou odezvou segmentů révy vinné byly sledovány regresní závislosti, jejichž výsledky jsou uvedeny na obr. 5 až 8.



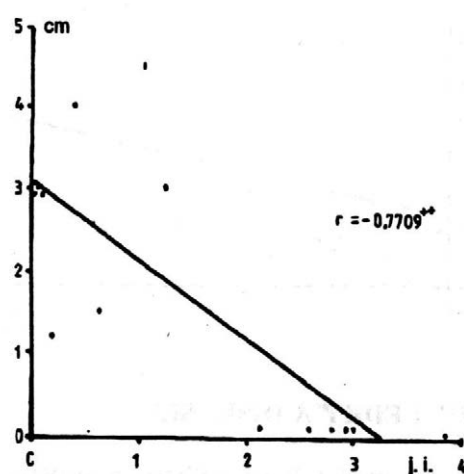
5a. Regresní závislost produkce etylenu na délce rašícího pupenu u apikálních segmentů – Regression dependence of ethylene production on breaking bud length in apical segments



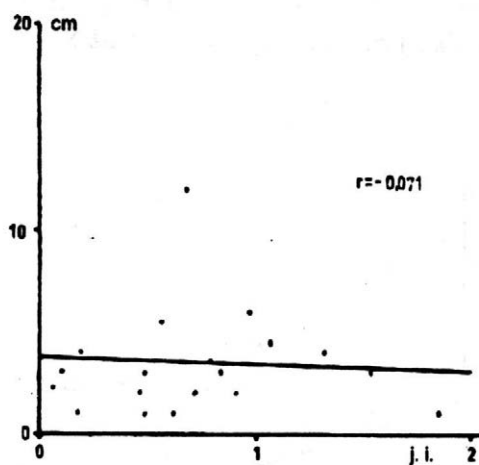
5b. Regresní závislost produkce etylenu na délce kořene u apikálních segmentů – Regression dependence of ethylene production on root length in apical segments



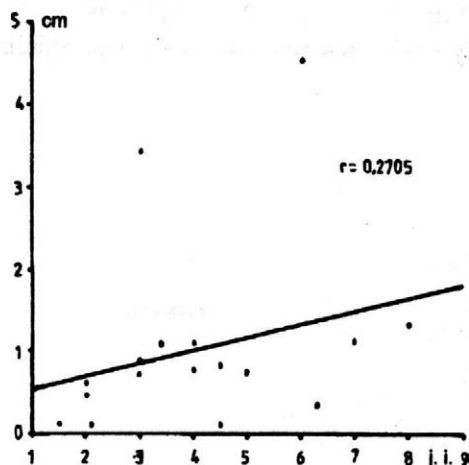
6a. Regresní závislost produkce etanu na délce rašícího pupenu u apikálních segmentů – Regression dependence of ethane production on breaking bud length in apical segments



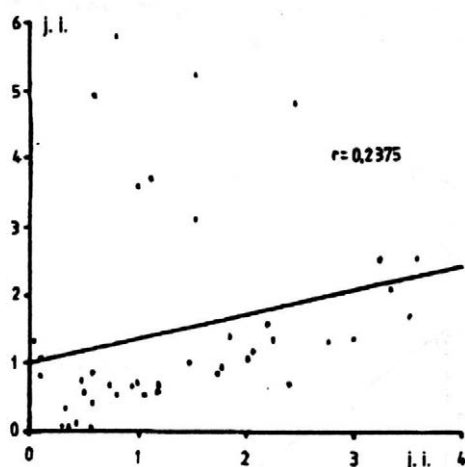
6b. Regresní závislost produkce etanu na délce kořene u apikálních segmentů – Regression dependence of ethane production on root length in apical segments



7a. Regresní závislost produkce etylenu na délce rašícího pupenu u mediálních segmentů – Regression dependence of ethylene production on breaking bud length in medial segments



7b. Regresní závislost produkce etylenu na délce rašícího pupenu u bazálních segmentů – Regression dependence of ethylene production on breaking bud length in basal segments



8. Regresní závislost produkce etanu na produkci etylenu u bazálních segmentů – Regression dependence of ethane production on ethylene production in basal segments

+ průkazné – significant
++ vysoce průkazné – high significant

VÝSLEDKY A DISKUSE

Již za 24 h po odběru letorostů z rostliny jsou patrné rozdíly v produkci etylenu (pupeny z apikální části produkují vysoce průkazně více etylenu než pupeny z části bazální) a tento charakter si uchovávají po celý měsíc (obr. 2).

Také produkce etanu (obr. 3) je vysoce průkazně vyšší u apikálních částí segmentů letorostů, zatímco křivka produkce etylenu však klesá, křivka produkce etanu zpočátku stoupá a od třetího týdne od založení pokusu začíná klesat.

Z pupenů bazálních částí letorostů prorůstají delší výhony než z částí apikálních (obr. 4) a apikální segmenty letorostu tvoří delší kořeny než segmenty bazální, což je reakce na rozložení nativních cytokininů a auxinů a jejich regulační funkci.

Při prvním měření produkce obou sledovaných uhlovodíků byla zjištěna vysoká hladina etylenu u bazálních, mediálních i apikálních segmentů letorostu vinné révy, což může být odezva rostliny na stres vyvolaný segmentací. Produkce etylenu však nedosahuje ani při tomto prvním měření koncentraci $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ a nativní etylen by tak neměl, jak uvádějí Radin, Loomis (1969), působit zpětně na tvorbu kořene inhibičně (obr. 2). Podle výsledků uvedených v grafu obr. 3 není produkce etanu indikátorem stresu rostliny na poranění.

Při iniciaci růstu kořenů (obr. 4) dochází ke zvýšení produkce etylenu a snížení produkce etanu. Při prodlužovacím růstu kořenů klesají hodnoty etylenu nepřímě úměrně s délkou rašícího pupenu a přímo úměrně s délkou kořenů. Produkce etanu stoupá přímo úměrně s délkou kořenů.

Je znázorněna regresní závislost mezi produkcí etylenu a délkou rašícího pupenu (obr. 5a) či délkou kořene (obr. 5b) u apikálních segmentů. Vztah mezi produkcí etylenu a rašením pupenů je vysoce průkazný.

Produkce etanu je u apikálních segmentů vysoce průkazná v případě vztahu etan - kořen (obr. 6b), závislost produkce etanu na narašených pupenech je průkazná (obr. 6a).

Délka rašícího pupenu a produkce etylenu je v případě bazálních a mediálních segmentů neprůkazná (obr. 7a, b), podobně jako neuváděné vztahy etanu a kořenů. Vztah etanu a etylenu u bazálních segmentů je kladný a neprůkazný (obr. 8).

Literatura

- BATTEN, D. J. - MULLINS, M. G.: Ethylene and adventitious root formation in hypocotyl segments of etiolated mung beans (*Vigna radiata* L. Wilczek) seedlings. *Planta*, 138, 1978: 193-197.
- DIMASI-THERIOU, K. et al.: Promotion of petunia (*Petunia hybrida* L.) regeneration *in vitro* by ethylene. *Pl. Cell. Tissue and Organ Cult.*, 32, 1993: 219-225.
- DREW, M. C. - JACKSON, M. B. - GIFFARD, S.: Ethylene promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. *Planta*, 147, 1979: 83-88.
- DREW, M. C. et al.: Inhibition by silver ion of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to endogenous ethylene or to oxygen deficiency. *Planta*, 153, 1981: 217-224.
- FELDMAN, L. J.: Regulation of root development. *Pl. Physiol.*, 35, 1984: 223-242.
- KONINGS, H. - VERSCHUREN, G.: Formation of aerenchyma in roots of *Zea mays* in aerated solutions, and its relation to nutrient supplies. *Physiol. Plant.*, 49, 1980: 265-270.

KRISHNAMOORTHY, H. N.: Effects of ethrel, auxins and maleic hydrazide on the rooting of mung bean hypocotyl cuttings. *Z. Pfl.-Physiol.*, 66, 1972: 273-276.

RADIN, J. W. - LOOMIS, R. S.: Ethylene and carbon dioxide in the growth and development of cultured radish roots. *Pl. Physiol.*, 44, 1969: 1584-1589.

Došlo 17. 3. 1994

FIŠEROVÁ, H. - HRADILÍK, J. (University of Agriculture, Brno):

Ethylene and ethane production during adventitious root formation on vine stem segments.

Rostl. Výr., 40, 1994 (8): 755-762.

The present paper deals with the relation between native growth regulators and their ability to influence the intensity of bud growth and capacity of adventitious root formation as related to the production of hydrocarbons - ethylene and ethane.

The apical segments produce ethylene and ethane highly significantly more than the basal and medial ones. The increased ethylene production immediately after the annual shoot segmentation signalizes that ethylene is an indicator of the stress to plant injury. This relation cannot be stated for ethane (Figs 2, 3).

The ethylene production decreased successively during the time of investigation, i.e. for nine weeks from the start of the experiment. A slight increase in ethylene production before the budbreak initiation (Fig. 2) may be an indicator of enhanced metabolism in the segment. On the contrary, the ethane production (Fig. 3) increased but it began to decrease before the budbreak initiation, as well.

Ethylene production is increasing and ethane production is decreasing in roots initiation (Fig. 4). In elongation growth ethylene production and ethane production is inverse relation to the length of the growing bud and in direct relation to the length of the root.

The regression between ethane and ethylene is insignificant and positive (Fig. 8), and that between ethylene and the root length is insignificant (Fig. 5b). In the case of apical segments, the regression relation between ethane and the root length is highly significant (Fig. 6b).

The relation between the ethylene production and length of breaking buds in apical segments is highly significant and negative (Fig. 5a). The function between the ethane production and breaking bud length in apical segments is significant (Fig. 6a).

Kontaktní adresa:

Ing. Helena Fišerová, Vysoká škola zemědělská, Zemědělská 1,
613 00 Brno, Česká republika, tel.: 05/45 13 30 15, fax: 05/45 21 20 44

VLIV BENZOLINONU NA RŮSTOVÉ KORELACE U KLÍČNÍCH ROSTLIN HRACHU

Š. Klíčová, J. Šebánek, P. Hrstková

Vysoká škola zemědělská, Brno

Byl zkoumán vliv benzolinonu (preparát Rastim 30 DKV) na růstové korelace u klíčnicích rostlin hrachu. Roztok Rastimu v koncentraci 6 mg.l^{-1} , v němž byla zbožtnána semena hrachu, působil více inhibičně na růst epikotylů a kořenů než stejná koncentrace IAA. Obdobně působil Rastim vyšší inhibici růstu děložních axilárů (kotylárů) dekapitovaných rostlin než IAA, byl-li v lanolinu aplikován na dělohy. V případě aplikace Rastimu na řeznou plochu dekapitovaného epikotylu měl Rastim nižší inhibiční vliv na růst kotylárů než IAA. Inhibiční vliv Rastimu působí intenzivněji akropetálně, inhibiční vliv IAA pak bazipetálně. Rastim na rozdíl od IAA, GA a BA projevuje též silný tumorigenní účinek a jeho inhibiční růstový vliv lze zrušit pouze cytokininem, nikoliv však giberelinem nebo Ethrelem. Při aplikaci na jednu z obou děloh dekapitovaných rostlin Rastim a IAA inhibují a BA naopak stimuluje růst pupenu ošetřené dělohy, avšak GA není schopen determinaci mezi kotyláry ovlivnit.

Ve VÚCHT v Bratislavě byl vyvinut přípravek Rastim 30 DKV, jehož účinnou látkou je benzolinon (3-benzyl-oxykarbonyl-methyl-2-benzothiazol). Jsou mu připisovány fyziologické účinky do určité míry podobné regulátorům rostlinného růstu auxinové povahy (V a r k o n d a et al., 1989). Z hlediska regenerace adventivních kořenů má Rastim účinky podobné jako kyselina α -naftyloctová (NAA) a je vhodný i pro regeneraci *in vitro* (P r o c h á z k a , 1992).

U stonkových řízků *Ligustrum vulgare* stimuloval Rastim rhizogenezi méně účinně než kyselina β -indolyloctová (IAA), jak uvádějí R a u s c h e r o v á et al. (1991). Abcisi listů *Ligustrum ovalifolium* brzdil Rastim s obdobnou účinností jako IAA (Š e b á n e k et al., 1994), avšak stárnutí segmentů listů ovsa brzdil méně účinně než IAA (K l í č o v á et al., 1994).

Úkolem předložené práce bylo prozkoumat vliv Rastimu na základní růstové korelace u klíčnicích rostlin hrachu a porovnat účinek Rastimu s účinkem IAA, případně i některých dalších růstových regulátorů.

MATERIÁL A METODA

K pokusům bylo použito osivo hrachu odrůdy Smaragd a těchto regulátorů rostlinného růstu: benzolinon (preparát Rastim 30 DKV, 300 g.l^{-1} benzolinonu),

kyselina β -indolyloctová (IAA), benzyladenin (BA), giberelin (GA_3) a kyselina 2-chloretylfosfonová CEPA (preparát Ethrel, 480 g.l^{-1} chloretylfosfonové kyseliny).

V případě pokusu 1 byla semena máčena ve vodě nebo v roztoku příslušných růstových regulátorů po dobu 12 až 24 h a pak vyložena radikulou dolů do zvlhčených pilin. V nich byly rostliny kultivovány po dobu pěti dní ve tmě při teplotě $22 \pm 2^\circ \text{C}$. Poté byly změřeny epikotyle a kořeny. V každé pokusné variantě bylo 20 až 30 rostlin. Pokusy byly s obdobnými výsledky třikrát opakovány.

V případě pokusů 2 až 6 byla semena máčena 10 až 12 h ve vodě a po zbobtnání přenesena radikulou dolů do zvlhčených pilin. Po třídní kultivaci v pilinách byly klíčící rostliny přeneseny do nádob naplněných vodou a opatřených sítí k prostrčení kořenů. Rostliny byly rozděleny do pokusných sérií, v nichž byly operovány a ošetřeny lanolinovou pastou s příslušnými regulátory. V každé pokusné sérii bylo 20 až 25 rostlin. Kultivace probíhala ve tmě při teplotě $22 \pm 2^\circ \text{C}$. Každý z pokusů byl s obdobnými výsledky jednou až dvakrát opakován. Výsledky byly zpracovány pomocí *t*-testu.

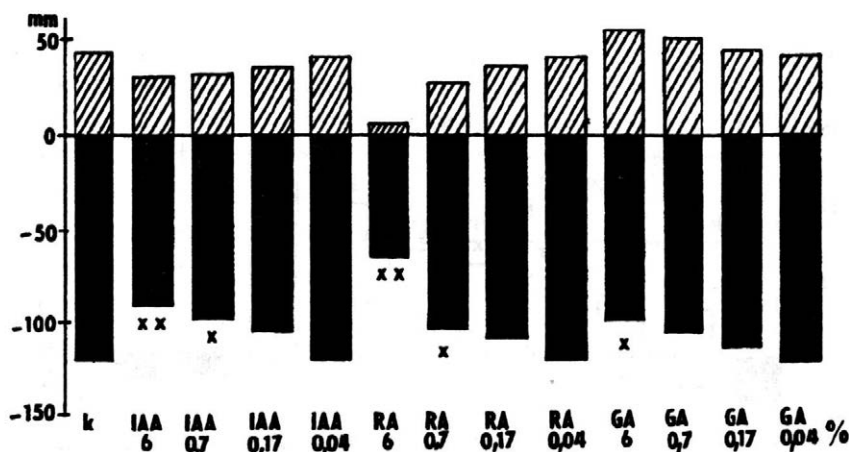
VÝSLEDKY

Korelace mezi kořenem a epikotylem (pokus 1)

Semena byla zbobtnána v roztocích Rastimu, IAA a GA_3 (koncentrace 6; 0,7; 0,17; 0,04 mg.l^{-1}) a pro kontrolu ve vodě. Po pětidenní kultivaci byly rostliny změřeny (obr. 1). Poměr mezi epikotylem a kořenem je nápadně zvýšen pod vlivem GA (z 0,36 až na 0,58). Rastim i IAA působily na epikotyl i kořen inhibičně, přičemž Rastim v nejvyšší užití koncentraci působil inhibičně podstatně účinněji než IAA v téže koncentraci. Inhibiční účinek Rastimu v koncentraci 6 mg.l^{-1} byl zvláště nápadný u epikotylu, kde docházelo k silnému zadržení prodlužovacího růstu ve prospěch růstu ztlustňovacího. Poměr mezi epikotylem a kořenem byl rovněž nejnápadněji snížen v případě Rastimu (6 mg.l^{-1}), a to z 0,36 na 0,10.

Růst úžlabních pupenů děložních (kotylárů) pod vlivem regulátorů aplikovaných na řeznou plochu dekapitovaného epikotylu (pokus 2)

Klíčící rostliny byly dekapitovány a na řeznou plochu dekapitovaného epikotylu byla natřena pasta s IAA a s Rastimem v koncentracích zřejmých z obr. 2 (pokus 2a). Za devět dní po dekapitaci byly změřeny dominující a zainhibované kotyláry, přičemž se ukázalo, že příslušné koncentrace IAA mají vyšší inhibiční vliv než odpovídající koncentrace Rastimu. Ještě 0,012% koncentrace IAA měla podstatně vyšší inhibiční účinek než 0,2% Rastim (obr. 2). Rastim (v koncentraci 0,025%) přitom projevoval nápadný vliv na zduření epikotylního pahýlu.



1. Vliv máčení semen v roztocích IAA, Rastimu (RA) a GA na délku epikotylu a kořenu klíčících rostlin – The effect of soaking of pea seeds in IAA, Rastim (RA) and GA solutions on the epicotyl and root length of seedlings

x rozdíly průkazné - significant differences

xx rozdíly vysoce průkazné - insignificant differences

▨ epikotyl - epicotyl ■ kořen - root

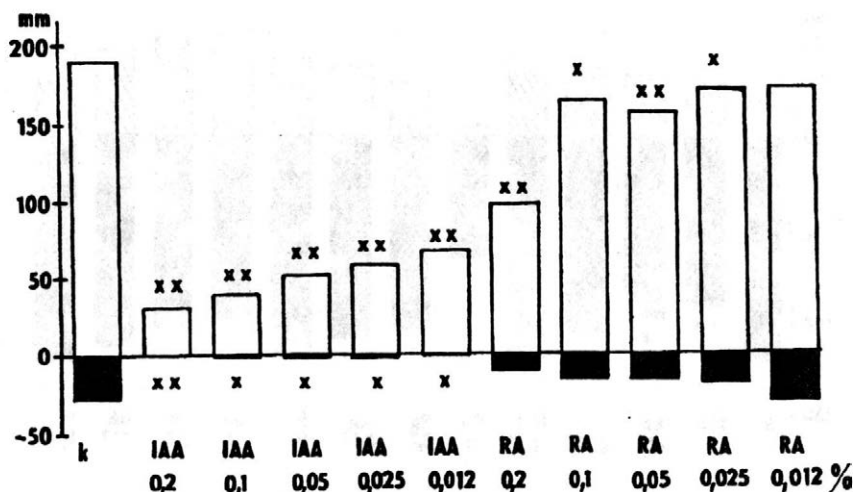
k - kontrola - control

Protože v předešlém pokuse 2a měly všechny použité koncentrace IAA a Rastimu inhibiční vliv na růst kotylárů, bylo užito nižších koncentrací obou regulátorů. Za šest dní po dekapitaci se ukázal opět intenzivnější inhibiční vliv IAA proti Rastimu. V užitých nízkých koncentracích již Rastim nepůsobil inhibičně vůbec, přičemž v 0,003 a 0,0015% koncentraci měl dokonce mírně stimulační vliv (obr. 3).

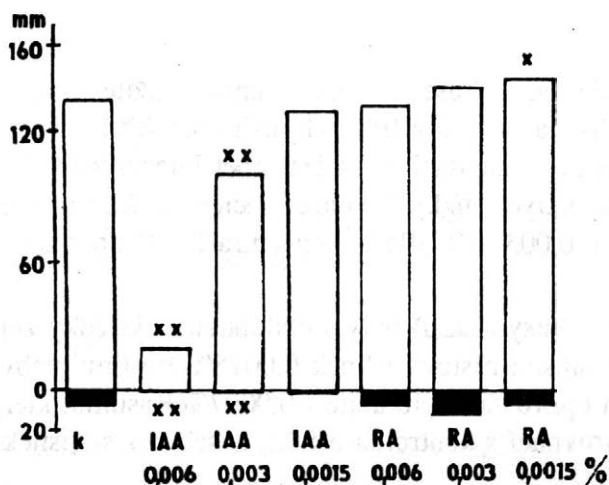
Oba uvedené pokusy (2a, b) byly s obdobnými výsledky zopakovány (pokus 2c), přičemž stimulační růstový účinek 0,0015% Rastimu nebyl statisticky průkazný. V dalším opakování bylo užito i 0,0007% Rastimu, který rovněž působil stimulačně (ve srovnání s kontrolou o 8%), avšak bez statistické průkaznosti.

Růst úžlabních pupenů děložních pod vlivem regulátorů aplikovaných na jednu z děloh dekapitovaných rostlin (pokus 3)

Po dekapitaci rostlin byly obě dělohy svisle skrojeny - redukce děloh o třetinu až polovinu (pokus 3a). Na řeznou plochu jedné dělohy byla pak natřena buď pasta s Rastimem, nebo s IAA (tab. I). Z tab. I vyplývá o něco výraznější inhibiční vliv Rastimu než IAA na determinaci růstu kotylárů, zřejmý ještě v 0,025% koncentraci.



2. Vliv IAA nebo Rastimu (RA) v 0,2 až 0,012% koncentraci v lanolinu aplikovaných na řeznou plochu dekapitovaného epikotylu na růst dominujících a zainhibovaných kotylárních výhonů klíčcích rostlin hrachu – The effect of IAA or Rastim (RA) in 0,2 to 0,012% concentration in lanolin applied on the cut surface of decapitated epicotyl on the growth of dominating and inhibited cotylary shoots of pea seedlings



3. Vliv IAA nebo Rastimu (RA) v 0,006 až 0,0015% koncentraci v lanolinu aplikovaných na řeznou plochu dekapitovaného epikotylu na růst dominujících a zainhibovaných kotylárních výhonů klíčcích rostlin hrachu – The effect of IAA or Rastim (RA) in 0,006 až 0,0015% concentration in lanolin applied on the cut surface of decapitated epicotyl on the growth of dominating and inhibited cotylary shoots of pea seedlings

□ dominující kotyláry - dominating cotylars ■ inhibované kotyláry - inhibited cotylars
k - kontrola - control

I. Růst kotylárů v úžlabí dělohy ošetřené Rastimem, resp. IAA ve srovnání s růstem kotylárů v úžlabí kontrolní neošetřené dělohy dekapitovaných klíčnic rostlin hrachu – The growth of cotylars in the axila of the cotyledon treated with Rastim or IAA in comparison with the growth of cotylars in the axila of control untreated cotyledon of decapitated pea seedlings

Růstový regulátor ¹	Růst pupenu ² (%)	
	děloha ošetřená ³	děloha neošetřená ⁴
IAA 0,2%	5,2	94,8
Rastim 0,2%	0	100,0
IAA 0,05%	21,1	78,9
Rastim 0,05%	4,5	95,5
IAA 0,025%	31,8	68,2
Rastim 0,025%	23,5	76,5
IAA 0,012%	31,8	68,2
Rastim 0,012%	42,2	57,8

¹ growth regulator, ² growing bud, ³ treated cotyledon, ⁴ untreated cotyledon

II. Růst pupenů v úžlabí dělohy ošetřené GA, BA a Ethrelem ve srovnání s růstem pupenů v úžlabí neošetřené dělohy dekapitovaných klíčnic rostlin hrachu – The growth of buds in the axila of the cotyledon treated with GA, BA and Ethrel in comparison with the growth of buds in the axila of untreated cotyledon of decapitated pea seedlings

Růstový regulátor ¹	Intenzivnější růst pupenu ² (%)	
	děloha ošetřená ³	děloha neošetřená ⁴
Ethrel 1%	28,6	71,4
GA 1%	53,0	47,0
BA 0,5%	89,5	10,5

¹ growth regulator, ² more intensive growth of the bud, ³ treated cotyledon, ⁴ untreated cotyledon

Dekapitace a skrojení děloh bylo provedeno jako v předešlém pokusu 3a. Na řeznou plochu jedné dělohy byla pak natřena pasta s GA, BA nebo s Ethrelem (tab. II). Z výsledků je zřejmé, že GA není schopen determinovat dominanci mezi kotyláry vůbec. Naproti tomu Ethrel má trend k inhibiční determinaci růstu kotylárů, s BA naopak výrazně determinuje stimulaci růstu kotylárů.

Porovnání růstu úžlabních pupenů děložních pod vlivem Rastimu aplikovaného na obě dělohy nebo na řeznou plochu epikotylu dekapitovaných rostlin (pokus 4)

Rostliny byly dekapitovány a obě dělohy skrojeny (redukce děloh o třetinu) a pak buď na řeznou plochu epikotylu, nebo na řeznou plochu obou děloh byl

aplikován Rastim. Délka kotylárů byla vyhodnocena za 11 dní po dekapitaci (tab. III). Pod vlivem téže koncentrace Rastimu byl nápadně silněji zadržén růst kotylárů při jeho aplikaci na dělohy než na epikotyl. Při aplikaci na dělohy i na epikotyl došlo přitom ke vzniku epikotylních tumorů.

III. Růst kotylárů pod vlivem Rastimu aplikovaného na dělohy nebo epikotyl dekapitovaných klíčcích rostlin hrachu – The growth of cotylars affected by Rastim applied on the cotyledons or epicotyl of decapitated pea seedlings

Rastim	Aplikace na ¹	Délka kotyláru ⁴ (mm)	
		dominujícího ⁵	zainhibovaného ⁶
0,2%	dělohy ²	0,3 ^{xx}	0
0,2%	epikotyl ³	177,4±66,8 ^{xx}	5,9±9,7 ⁿ
0,1%	dělohy	5,6±12,6 ^{xx}	1,1±1,4 ⁿ
0,1%	epikotyl	244,2±38,3 ⁿ	3,6±6,0 ⁿ
0	-	253±40,6	2,0±3,9

^{xx} vysoce průkazný rozdíl - highly significant difference

ⁿ neprůkazný rozdíl - significant difference

¹ application on, ² cotyledons, ³ epicotyl, ⁴ length of cotylar, ⁵ dominating, ⁶ inhibited

Vliv GA, BA a Ethrelu na růst kotylárů zainhibovaných po aplikaci Rastimu na dělohy (pokus 5)

Na rostliny, u nichž byl v pokusu 4 pod vlivem 0,2% Rastimu zcela zadržén růst kotylárů, byla aplikována na bázi zduřelého epikotylního pahýlu pasta s 0,5% BA, resp. 1% GA nebo 1% pasta s Ethrelem. Po šesti dnech bylo konstatováno, že k růstu pupenů došlo pouze pod vlivem BA, kdy se u 75 % rostlin kotylární pupen zvětšil v průměru na 20 mm, často byl nápadně ztlustlý a s porušenou geotropickou citlivostí (obr. 4, 5). Ethrel a giberelin byly neúčinné.

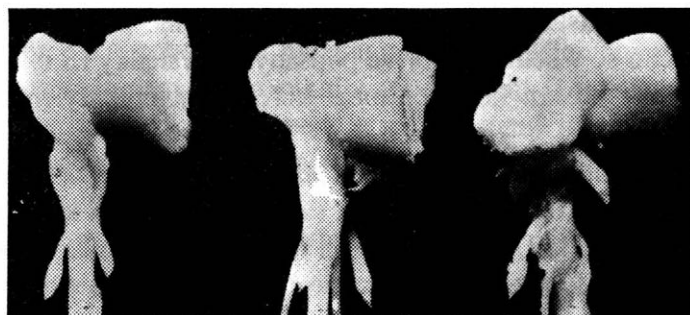
Tumorigenní účinek Rastimu porovnaný s účinkem IAA, BA a Ethrelu při aplikaci na obě dělohy dekapitovaných rostlin (pokus 6)

Na obě dělohy dekapitovaných rostlin se svisle skrojenými dělohami byly aplikovány růstové regulátory. Růst kotylárů byl vyhodnocen po sedmi dnech (tab. IV). Zatímco v pokusu 2a se ukázalo, že při aplikaci na epikotyl má Rastim menší inhibiční vliv na růst kotylárů než IAA, při aplikaci na dělohy je tomu opačně; 1% Ethrel měl přitom zhruba stejný inhibiční účinek jako 0,2% IAA. BA



4. Vliv BA na uvolnění inhibičního účinku Rastimu (RA); vlevo tři rostliny po aplikaci Rastimu (v 0,2% lanolinové pastě na dělohy) se zainhibovanými pupeny; vpravo tři rostliny po aplikaci BA s rostoucími pupeny – The effect of BA on the release of the Rastim (RA) inhibitory effect; left three plants after Rastim application (in 0,2% lanolin paste on cotyledons) with inhibited buds; right three plants after BA application with growing buds

Foto ing. J. Procházka



5. Dekapitované klíčící rostliny hrachu se zainhibovanými pupeny a tumory vzniklémi po aplikaci 0,2% pasty s Rastimem (RA) na dělohy – The decapitated pea seedlings with inhibited buds and tumors originating after the application of 0,2% paste with Rastim (RA) on the cotyledons

IV. Růst kotylárů pod vlivem Rastimu, BA, IAA a Ethrelu aplikovaných na obě dělohy dekapitovaných klíčících rostlin hrachu – The growth of cotylars affected by Rastim, BA, IAA and Ethrel applied on both cotyledons of decapitated pea seedlings

Růstový regulátor ¹	Délka kotyláru ² (mm)	
	dominujícího ³	zainhibovaného ⁴
Rastim 0,2%	0	0
Rastim 0,1%	8,9±22,7	0
IAA 0,2%	29,1±18,9	0
IAA 0,1%	56,2±28,6	1,2±3,1
Ethrel 1,0%	22,6±7,7	2,5±5,0
BA 0,5%	34,2±13,5	30,7±12,6
		9,1±4,4
		1,0±2,8

¹growth regulator, ²length of cotylar, ³dominating, ⁴inhibited

působil nápadné zmnožení růstu pupenů, ale obdobně jako Ethrel a 0,1% IAA nepůsobil na vznik tumorů, které vznikaly nápadně jen pod vlivem Rastimu a pod vlivem 0,2% IAA, kdy bylo zřejmé jen mírné duření apikální části epikotylního pahýlu.

DISKUSE

Růstové korelace na klíčcích rostlinách hrachu začal zkoumat D o s t á l (1908) nejprve ve vztahu ke korelaci mezi dělohou a jejím úžlabním pupenem, později také ve vztahu ke korelaci mezi kořenem a lodyhami (D o s t á l, 1941). V naší práci jsme na tomto modelu věnovali především pozornost korelaci mezi kořenem a epikotylem. Při porovnání účinků Rastimu s účinky IAA se ukázalo, že Rastim inhibuje růst kořenů i epikotylů účinněji než IAA, což se týká zvláště nápadně epikotylu. Poměr mezi epikotylem a kořenem byl nejvýrazněji snížen Rastimem v koncentraci 6 mg.l^{-1} , což souviselo se zadržením prodlužovacího a s podnícením ztlušovacího růstu. Rastim se tak zvláště nápadně projevil protichůdně proti GA, u kterého se v souladu s dříve popsány výsledky (Š e b á n e k, 1962) ukázal naopak přesun korelace mezi kořenem a epikotylem ve prospěch epikotylu.

Inhibiční vliv lodyžního vrcholu na růst úžlabních pupenů děložních (kotylárů) je po odříznutí vrcholu napodobitelný aplikací IAA (T h i m a n n, S k o o g, 1933). V našich pokusech projevila IAA nanesená na řeznou plochu dekapitovaného epikotylu inhibiční vliv v koncentračním rozmezí 0,2 až 0,003% (úměrně stoupající koncentraci). Rastim však inhiboval růst kotylárů pouze v 0,2 až 0,025% koncentraci. Nižší koncentrace Rastimu již růst kotylárů na rozdíl od IAA neinhibovaly, naopak velmi nízké koncentrace (0,0015 až 0,0007%) projevíly tendenci k účinkům stimulačním. Obdobný stimulační účinek byl již dříve popsán i pro 0,0007% IAA (Š e b á n e k, 1967), který posloužil pro důkaz, že apikální dominanci nelze vysvětlit schopností IAA atrahovat trofické substance, neboť atrakční schopnost měly nejen vyšší koncentrace IAA zadržující růst kotylárů, nýbrž i velmi nízká koncentrace IAA, která růst kotylárů dokonce stimulovala. Stimulační účinek velmi nízkých koncentrací Rastimu se však ve všech opakováních našich pokusů neprojevil jako průkazný. Zatímco IAA působil mírné duření řezné plochy epikotylního pahýlu jen v nejvyšších koncentracích, Rastim působil nápadný vznik tumoru na řezné ploše ještě v koncentraci 0,025%.

Byly-li však IAA nebo Rastim nanесeny na dělohy dekapitovaných klíčcích rostlin, projevila naopak Rastim podstatně silnější inhibiční vliv na růst kotylárů než odpovídající koncentrace IAA, což svědčí o tom, že inhibiční vliv Rastimu působí podstatně intenzivněji ve směru akropetálním, inhibiční vliv IAA naopak ve směru bazipetálním. Poučné je zejména srovnání 0,1% Rastimu naneseného na dělohy, který téměř zcela zadržuje růst kotylárů, stejná koncentrace Rastimu

však neovlivňuje jejich růst, je-li nanesena na řeznou plochu epikotylu. Obdobně R a u s c h e r o v á et al. (1991) zaznamenali u dekapitovaných rostlin hrachu s odstraněnou dělohou intenzivnější inhibiční vliv Rastimu než IAA. Tumorigenní účinek Rastimu, zvláště nápadný při jeho aplikaci na dělohy, připomíná působení kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové, spočívající v ovlivnění RNK a proteosyntézy při zásahu do hladiny endogenních fytohormonů auxinového a cytokininového typu (H r a d í l í k , 1994).

Při obdobné aplikaci BA a Ethrelu na dělohy nebyl však v našich pokusech tumorigenní účinek pozorován a v případě IAA bylo zaznamenáno jen mírné duření epikotylního pahýlu po aplikaci nejvyšší užití koncentrace IAA (0,2%). Schopnost Rastimu inhibovat růst kotyláru při aplikaci na jednu z obou děloh je vyšší než u IAA, u níž to popsali již P l c h (1936) a D o s t á l (1939). Cytokinin BA projevil při aplikaci na jednu z obou děloh naopak velmi přesvědčivě schopnost stimulovat kotylár takto ošetřené dělohy, zatímco GA tuto schopnost neprojevil. Obdobně bylo možné po amputaci epikotylu a jedné dělohy a při aplikaci GA nebo BA k pupenu ponechané dělohy uvolnit tento pupen z inhibice jen cytokininem BA a nikoliv giberelinem GA (Š e b á n e k , 1965), což potvrzuje domněnku, že giberelin má podstatně menší úlohu v apikální dominanci než cytokinin (P r o c h á z k a , 1982; Š e b á n e k et al., 1991). Podobně pouze cytokinin a nikoliv giberelin je schopen uvolnit z inhibice pupeny zadržené v růstu po aplikaci Rastimu na dělohy.

L i t e r a t u r a

- DOSTÁL, R.: Korelační vztahy u klíčnicích rostlin *Papilionacea*. Rozp. Čes. Akad. II, 1908: 1-44.
- DOSTÁL, R.: Über die Auslösung der Korrelation zwischen den Kotylaren bei *Pisum sativum*. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 57, 1993: 204-230.
- DOSTÁL, R.: Wuchsstoffstudien betreffend die Korrelationen zwischen Wurzel und Spross bei *Pisum sativum*. Práce Morav. Přír. Spol., 13, 1941: 1-31.
- HRADILÍK, J.: Herbicidy na bázi růstových regulátorů. In: PROCHÁZKA S. - ŠEBÁNEK, J. a kol.: Regulátory rostlinného růstu, Praha, AV ČR 1994.
- KLÍČOVÁ, Š. - ŠEBÁNEK, J. - VÍTKOVÁ, H.: Comparison of the effect of β -indolylacetic acid and benzolinon (Rastim 30 DKV) on the rate of senescence of oat (*Avena sativa* L.) leaves. Biológia (Bratislava), 1994 (v tisku).
- PLCH, B.: Über den Einfluss einiger Phytohormone auf die Korrelationswirkung der Keimblätter bei *Pisum sativum*. Beih. Bot. Cbl., 55, 1936: 358-415.
- PROCHÁZKA, S.: Apical dominance. Folia Univ. Agric. Fac. Agron. (Brno), 1982: 1-45.
- PROCHÁZKA, S.: Studium morforegulačních účinků přípravku Rastim 30 DKV. [Závěrečná zpráva.] Bmo, VŠZ 1992.
- RAUSCHEROVÁ, L. - BIČ, J. - KRÁLÍK, J.: Poznatky z aplikace přípravku Rastim 30 DKV. Agrochémia, 31, 1991: 234-236.

ŠEBÁNEK, J.: Fyziologické a morfofenetické účinky giberelinu a dalších stimúlátorů. [Habilitace.] Brno, 1962. - Vys. Šk. zeměd.

ŠEBÁNEK, J.: Die Interaktion des exogenen Kinins in der Korrelation zwischen den Keimblättern und ihren Achselknospen an *Pisum*-Keimlingen. Acta Univ. agric. (Brno), Řada A, 1965 (3): 363-370.

ŠEBÁNEK, J.: Einfluss von Pasten mit verschiedenen Indolyllessigsäure-Konzentrationen auf den Transport von ^{32}P . Planta (Berlin), 75, 1967: 283-285.

ŠEBÁNEK, J. - KLÍČOVÁ, Š. - VÍTKOVÁ, H.: Interakce přípravku Rastim DKV 30 (benzolinonu) s Ethrelem v abscisi listů dřevin. Acta Univ. agric. (Brno), Fac. Hort., 1994 (v tisku).

ŠEBÁNEK, J. - SLADKÝ, Z. - PROCHÁZKA, S. et al.: Experimental morphogenesis and integration of plants. Praha, Elsevier, Academia 1991.

THIMANN, K. V. - SKOOG, F.: Studies on the growth hormones of plants. Proc. nat. Acad. Sci., 19, 1933: 714-716.

VARKONDA, Š. et al.: Rastim 30 DKV - nový experimentální přípravek na reguláciu rastu rastlín. Agrochémia, 29, 1989: 133-134.

Došlo 17. 3. 1994

KLÍČOVÁ, Š. - ŠEBÁNEK, J. - HRSTKOVÁ, P. (University of Agriculture, Brno):

The effect of benzolinon on growth correlations of pea seedlings.

Rostl. Výr., 40, 1994 (8): 763-773.

The effect of benzolinon (Rastim DKV 30) on the growth correlations of pea seedlings was studied. In the case of a correlation between the stem (epicotyl) and root, Rastim inhibited epicotyl and root growth more effectively than did IAA (Fig. 1). The effect of the highest concentration of Rastim (i.e. 6 mg.l⁻¹) was particularly striking in the epicotyl where elongation growth was inhibited and thickening growth stimulated. The most remarkable difference was that found between the effect of Rastim and GA, Rastim decreasing the epicotyl : root ratio from 0.36 to 0.10, and GA, on the other hand, increasing it from 0.36 to 0.58.

Stem apical dominance is revealed in the inhibiting effect of the epicotyl apex on the growth of cotylars. This effect can be imitated much more effectively if we apply IAA to the cut surface of the decapitated epicotyl than if Rastim is applied (Fig. 2); very low concentrations of Rastim even tend to stimulate cotylar growth (Fig. 3).

On the other hand, when applied to cotyledons of decapitated plants, Rastim inhibited cotylar growth much more effectively than IAA did (Tab. III), confirming that the inhibiting effect of Rastim was more intensive in the acropetal direction, but of IAA, on the other hand, in the basipetal direction. Rastim applied to cotyledons and to the epicotyl caused tumors to arise. A similar application of BA and Ethrel did not cause tumors and IAA slightly affected the origin of tumors only when applied in the highest concentration used (Tab. IV). The cotylars whose growth was completely inhibited after an application of Rastim to the cotyledons could be released from this inhibition only with BA, and not GA or Ethrel (Figs 4, 5).

If one of the two cotyledons of decapitated plants was treated with Rastim or IAA, Rastim had a stronger inhibiting effect on the growth of the cotylar of this treated cotyledon than had IAA (Tab. I). The cytokinin BA with which one of the two cotyledons was treated, stimulated the growth of the cotylar of the treated cotyledon, while GA was not capable of affecting the determination between the cotylars (Tab. II). This fact would suggest that GA plays a considerably smaller role in apical dominance than cytokinin.

Kontaktní adresa:

Ing. Šárka K l í č o v á , CSc., Vysoká škola zemědělská, Zemědělská 1,
613 00 Brno, Česká republika, tel.: 05/45 13 30 28, fax: 05/45 21 20 44



ADEKO a. s. Vám nabízí

- ☐ **FINANČNÍ LEASING**
- ☐ **ZPROSTŘEDKOVATELSKOU OBCHODNÍ
ČINNOST**
- ☐ **PORADENSTVÍ V OBLASTI PODNIKÁNÍ,
FINANCOVÁNÍ A ORGANIZACE**

**ADEKO a. s.
Slezská 7
120 56 Praha 2**

tel.: 258 342

fax: 207 229



MORFOREGULAČNÍ ÚČINKY A TRANSPORT RASTIMU 30 DKV U KLÍČNÍCH ROSTLIN HRACHU

J. Blažková, S. Procházka, L. Havel

Vysoká škola zemědělská, Brno

Na klíčcích rostlinách hrachu byly zkoumány morforegulační účinky a transport Rastimu 30 DKV, který podobně jako IAA inhibuje růst děložních pupenů (kotylárů) u dekapitovaných rostlin. Je schopen u dekapitovaných rostlin simulovat regulační účinky intaktního apexu, resp. exogenně aplikované IAA a atrahovat ^{14}C -BA z kořenů. V intaktních rostlinách je translokován akropetálně i bazipetálně k centrům aktivního růstu (pupeny), resp. k zásobním orgánům (dělohy).

Rastim 30 DKV je chemický přípravek (V a r k o n d a et al., 1989), jemuž jsou připisovány významné fyziologické účinky podobné regulátorům růstu (stimulace růstu a nasazení plodů, tvorba kalusu a kořenů, urychlení dozrávání plodů, stimulace fotosyntézy apod.) Účinnou látkou přípravku je benzolidon (3-benzyl-oxykarbonyl-methyl-2-benzothiazol), jehož účinky jsou podobné účinkům auxinu IAA (kyseliny β -indolyloctové). Rastim podporuje regeneraci kořenů podobně jako kyselina α -naftyloctová (NAA) a je vhodný i pro regeneraci *in vitro* (H a v e l et al., 1994). U *Ligustrum vulgare* brzdil Rastim abscisi intaktních listů i úžlabních pahýlů obdobně jako IAA (Š e b á n e k et al., 1994).

Předložená práce se zabývá regulačními účinky a transportem Rastimu ve vztahu k růstovým korelacím u klíčcích rostlin hrachu (*Pisum sativum* L.)

MATERIÁL A METODA

Všechny pokusy byly prováděny na klíčcích rostlinách hrachu setého (*Pisum sativum* L.) odrůdy Smaragd. Nabotnalá semena hrachu byla vyseta do agroperlitu zvlhčeného destilovanou vodou a naklíčena v termostatu ve tmě při teplotě 22 °C a relativní vzdušné vlhkosti 80 %. Po pěti dnech, když dosahovaly epikotyle klíčcích rostlin přibližně 25 mm, byly rostliny s nepoškozeným habitem vybrány, omyty a přeneseny do kultivačních nádobek s 250 ml destilované vody. Po celou dobu trvání pokusů byly kultivační nádoby s rostlinami ponechány v termostatu ve tmě při 22 °C a relativní vlhkosti vzduchu 80 %.

Rostliny byly po ukončení pokusů odebírány v příslušných časových intervalech a rozděleny na části: vrchol, resp. vrcholová část epikotyle (0,5 cm), epikotyl, kotylární pupeny, dělohy, kořeny. Tyto části byly vždy ze čtyř rostlin spojeny, vysušeny do konstatní hmotnosti a užity pro stanovení radioaktivity.

Každá varianta měla pět opakování (tj. 4 x 5 rostlin) a každý pokus byl dvakrát opakován. Pro statistické zpracování bylo použito *t*-testu.

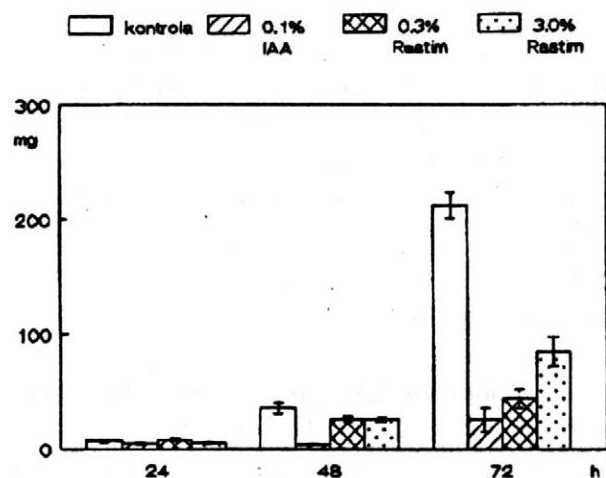
Části rostlin byly spáleny na suché cestě v proudu kyslíku (K a l a , P e š - k a , 1980). Radioaktivita vzorků byla stanovena metodou kapalné scintilace. Radioaktivita scintilátoru se spáleným rostlinným vzorkem byla měřena na scintilačním spektrometru fy Packard TRI-CARB, model 2000CA.

Pro stanovení atrakční schopnosti Rastimu bylo v každé variantě vždy 20 předpěstovaných rostlin přeneseno na 12 h do nádobek s 50 ml destilované vody a s 18,5 kBq radioaktivního roztoku ^{14}C -BA o specifické aktivitě 2 035 MBq/mmol (Radiochemical Centre Amersham, U. K.). Po 12h translokační periodě byly rostliny dekapitovány a na pahýl epikotylu byla nanášena lanolinová pasta - varianty: vodní pasta (kontrola), pasta s 0,1 % IAA, s 0,3 % Rastimu a s 3 % Rastimu. V příslušných časových intervalech (24, 48 a 72 h) byly rostliny sklizeny a zpracovány, jak bylo uvedeno.

Pro sledování transportu byl Rastim aplikován ve formě kapky 5 μl ^3H -Rastimu (aktivita 760 Bq, specifická aktivita 1,22 GBq/mmol, výrobce Výzkumný ústav farmacie a biochemie) na dekapitovaný pahýl hrachového epikotylu a ve druhé variantě byl Rastim aplikován ke kořenům. Ke 20 rostlinám v jedné nádobce bylo přidáno 50 ml destilované vody s 18,5 kBq ^3H -Rastimu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Vliv Rastimu na růst kotylárních pupenů hrachu po jejich uvolnění z inhibice působené apexem je zachycen na obr. 1. Pupeny kontrolní varianty (s vodní lanolinovou pastou) s přibývajícím časem velmi intenzivně rostly. Pupeny varianty s IAA pastou byly ve svém růstu inhibovány a obě použité koncentrace



1. Hmotnost děložních pupenů dekapitovaných klíčnic rostlin hrachu (v mg) pod vlivem regulátorů – Fresh mass of cotyledonary buds (in mg) of pea seedlings under the influence of regulators
kontrola - control

Rastimu (0,3% i 3%) růst pupenů inhibovaly obdobně jako IAA, ale inhibice nebyla tak výrazná jako v případě IAA. Statisticky vysoce průkazná inhibice růstu se projevila až po 72 h.

Schopnost Rastimu atrahovat látky regulační povahy (^{14}C -BA) vyplývá z tab. I až III. U experimentálních variant s aplikací Rastimu je zřejmý vyšší transport do vrchní části epikotylu, tj. k místu aplikace Rastimu. U kontrolních rostlin došlo k výraznému zvyšování ^{14}C -aktivity z ^{14}C -BA v kotylárních pupenech v závislosti na intenzitě jejich růstu (obr. 2). 0,1% IAA růst kotylárních pupenů oproti kontrole brzdila. Také ^{14}C -aktivita nalezená v těchto pupenech byla signifikantně nižší ve všech odběrech. Pupeny rostlin z variant s Rastimem (0,3% i 3%) akumulovaly o něco více ^{14}C -BA než varianta s IAA, ale aktivity nedosahovaly takové úrovně radioaktivity jako varianta kontrolní. Za 24 h byl účinek Rastimu na akumulaci ^{14}C -BA v pupenech velmi podobný variantě s IAA

I. Transport radioaktivity z ^{14}C -BA (v dezintegracích za minutu - dpm) z kořenů do jednotlivých částí dekapitovaných klíčkových rostlin hrachu po 24h translokační periodě – Transport of ^{14}C -BA radioactivity (in desintegration per minute - dpm) from roots to different parts of decapitated pea seedlings after a 24h translocation period

Část rostliny ¹	Vodní pasta ⁷	0,1% IAA	0,3% Rastim	3,0% Rastim
Vrcholy ²	1 271± 135	1 359± 282	1 552± 316	1 529± 168
Epikotyl ³	4 139± 590	4 063± 155	2 520± 190	3 218± 563
Pupeny ⁴	804± 126	422± 82	590± 30	449± 35
Dělohy ⁵	4 759± 738	4 345± 252	3 980± 529	2 711± 540
Kořeny ⁶	39 217±5 821	43 920±2 246	24 233±1 096	27 445±3 705

¹plant segments, ²apexes, ³epicotyls, ⁴buds, ⁵cotyledons, ⁶roots, ⁷water paste

II. Transport radioaktivity z ^{14}C -BA (v dpm) z kořenů do jednotlivých částí dekapitovaných klíčkových rostlin hrachu po 48h translokační periodě – Transport of ^{14}C -BA radioactivity (in dpm) from roots to different parts of decapitated pea seedlings after a 48h translocation period

Část rostliny ¹	Vodní pasta ⁷	0,1% IAA	0,3% Rastim	3,0% Rastim
Vrcholy ²	1 363± 176	1 194± 188	1 601± 209	2 359± 623
Epikotyl ³	4 130± 719	2 570± 419	3 304± 620	2 380± 395
Pupeny ⁴	1 413± 220	321± 39	949± 202	827± 189
Dělohy ⁵	3 821± 385	2 058± 300	3 226± 356	3 708± 846
Kořeny ⁶	40 800±4 847	27 488±4 875	34 034±4 067	35 292±6 497

For 1 - 7 see Tab. I

III. Transport radioaktivity z ^{14}C -BA (v dpm) z kořenů do jednotlivých částí dekapitovaných klíčnic rostlin hrachu po 72h translokační periodě – Transport of ^{14}C -BA radioactivity (in dpm) from roots to different parts of decapitated pea seedlings after a 72h translocation period

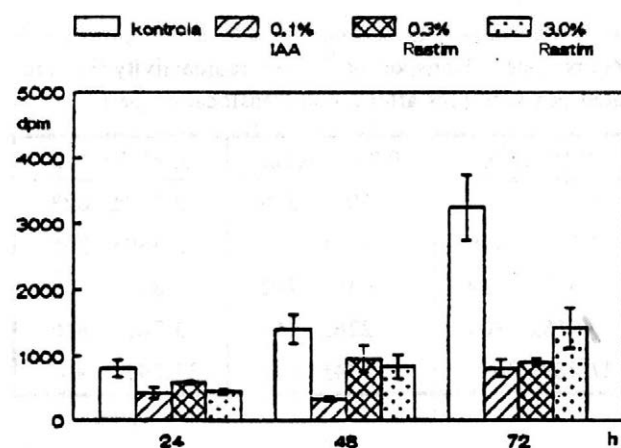
Část rostliny ¹	Vodní pasta ⁷	0,1% IAA	0,3% Rastim	3,0% Rastim
Vrcholy ²	1 051± 168	3 213± 612	3 297± 161	2 341± 325
Epikotyle ³	2 804± 363	2 000± 362	1 987± 348	2 606± 442
Pupeny ⁴	3 242± 493	805± 129	898± 57	1 418± 310
Dělohy ⁵	4 637± 633	2 525± 647	3 100± 337	3 000± 426
Kořeny ⁶	40 361±5 200	30 708±3 515	24 185±2 417	33 218±5 794

For 1 - 7 see Tab. I

a za 72 h byla ^{14}C -aktivita v pupenech obou variant s Rastimem signifikantně nižší oproti kontrolní variantě (tab. I až III). V distribuci ^{14}C -aktivity do ostatních částí rostliny nebyly mezi všemi variantami zjištěny významné rozdíly.

Nebyly nalezeny rozdíly v distribuci ^3H -Rastimu do jednotlivých částí klíčnic rostlin hrachu v závislosti na způsobu aplikace, což je zřejmé z tab. IV. Za 24 h došlo k rovnoměrné distribuci ^3H -aktivity v rostlinných částech při aplikaci ^3H -Rastimu ke kořenům i na epikotyl.

V dalším experimentu byl srovnán transport ^3H -Rastimu v intaktních rostlinách a v rostlinách s odstraněným vrcholem za 6, 24 a 48 h. Z tab. V a VI je patrný výrazný rozdíl v ^3H -aktivitě pupenů intaktních a dekapitovaných rostlin. Aktivita v rostoucích pupenech dekapitovaných rostlin dosahovala za 24 i 48 h téměř dvojnásobku aktivit v inhibovaných pupenech intaktních rostlin.



2. Radioaktivita z ^{14}C -BA (v dezintegracích za minutu - dpm) v děložních pupenech dekapitovaných klíčnic rostlin hrachu pod vlivem regulátorů – Radioactivity from ^{14}C -BA (in desintegration per minute - dpm) in cotyledonary buds of pea seedlings under the influence of regulators
kontrola - control

IV. Distribuce ^3H -Rastimu (v dpm) v klíčcích rostlinách hrachu po 24h translokační periodě – Distribution of ^3H -Rastim (in dpm) in pea seedlings after a 24h translocation period

Část rostliny ¹	na epikotyl ⁷	ke kořenům ⁸
Vrcholy ²	10 936±4 319	1 627± 39
Epikotily ³	2 006± 288	1 813± 332
Pupeny ⁴	5 076± 306	1 447± 319
Dělohy ⁵	10 071±1 345	8 737± 776
Kořeny ⁶	2 739±630	14 006±3 638

For 1 - 6 see Tab. I, ⁷on epicotyl, ⁸to roots

V. Distribuce ^3H -Rastimu (v dpm) v intaktních klíčcích rostlinách hrachu – Distribution of ^3H -Rastim (in dpm) in intact pea seedlings

Část rostliny ¹	6 h	24 h	48 h
Vrcholy ²	116± 32	213± 69	208± 71
Epikotily ³	163± 9	163± 48	123± 12
Pupeny ⁴	215± 73	416± 76	637±481
Dělohy ⁵	414± 76	523± 73	1 382±420
Kořeny ⁶	5 937±662	4 343±784	6 619±776

For 1 - 6 see Tab. I

VI. Distribuce ^3H -Rastimu (v dpm) v dekapitovaných klíčcích rostlinách hrachu – Distribution of ^3H -Rastim (in dpm) in decapitated pea seedlings

Část rostliny ¹	6 h	24 h	48 h
Vrcholy ²	120± 20	153± 37	106± 10
Epikotily ³	171± 20	143± 24	165± 57
Pupeny ⁴	340± 15	969± 58	1 189±147
Dělohy ⁵	654± 35	585± 70	823±128
Kořeny ⁶	5 937±662	6 965±647	10 867±256

For 1 - 6 see Tab. I

Rozdíl aktivit nalezených ve vrcholu, resp. v dalším růstovém centru nebyl již tak markantní, i když i zde byla zaznamenána vyšší aktivita z ^3H -Rastimu v rostoucím vrcholu intaktních rostlin než v horní části epikotylu dekapitovaných rostlin.

Z dřívějších studií morfogenních účinků IAA vyplývá, že aplikace IAA na pahýly epikotylu dekapitovaných rostlin vede k inhibici růstu laterálních pupenů a k ztlusťovacímu růstu vrchní části epikotylových pahýlů (Hall, Hillman, 1975; Procházka et al., 1977; Procházka et al., 1983). Obdobné výsledky byly získány i v našich experimentech s Rastimem. Rastim inhiboval růst pupenů, inhibice však nebyla tak výrazná jako v případě IAA.

Z experimentálních výsledků s ^{14}C -BA vyplývá, že Rastim aplikovaný na pahýly dekapitovaných rostlin je schopen atrahovat ^{14}C -BA z kořenů obdobně jako IAA (Procházka, 1981), a tím pravděpodobně brání toku ^{14}C -BA do laterálních pupenů. Samotný ^3H -Rastim se v rostlinách pohybuje akropetálně i bazipetálně k centrům aktivního růstu, jako jsou vrcholové a děložní pupeny a kořeny, resp. k zásobním orgánům, jako jsou dělohy.

Literatura

- HALL, S. M. - HILLMAN, J. R.: Correlative inhibition of lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L. Timing of bud growth following decapitation. *Planta*, 123, 1975: 137-143.
- HAVEL, L. - KONEČNÁ, H. - SNÁŠELOVÁ, V. - PROCHÁZKA, S. - BLAŽKOVÁ, J.: Vliv benzolinonu a auxinu na regeneraci a aktivitu peroxidáz v explantátové kultuře zelí. *Rostl. Výr.*, 40, 1994 (8): 783-791.
- KALA, A. - PEŠKA, J.: Příprava rostlinného materiálu pro měření ^{14}C a ^3H -aktivity kapalnou scintilací. Spalování v proudu kyslíku. *Semin. Využití nukleárních metod v genetice, šlechtění a fyziologii rostlin*, Brno, 1980: 165-169.
- PROCHÁZKA, S.: Transport of benzyl-(8- ^{14}C)-adenine in pea seedlings in relation to the stem apical dominance. *Biol. Plant.*, 23, 1981: 68-71.
- PROCHÁZKA, S. - SCHRAUDOLF, H. - SONKA, J.: Transport of ^{14}C -kinetin in intact and decapitated pea seedlings. *Z. Pfl.-Physiol.*, 81, 1977: 308-313.
- PROCHÁZKA, S. - ČERNOCH, V. - BLAŽKOVÁ, J. - DUNDELOVÁ, M.: Morphoregulative effects of phenylacetic acid in pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Biochem. u. Physiol. Pfl.*, 178, 1983: 493-501.
- ŠEBÁNEK, J. - KLÍČOVÁ, Š. - VÍTKOVÁ, H.: Interakce přípravku Rastim 30 DKV (benzolinonu) s Ethrelem v abscisi listů dřevin. *Acta Univ. Agric. (Brno), Fak. Hort.*, 1994 (v tisku).
- VARKONDA, Š. et al.: Rastim 30 DKV - nový experimentální přípravok na reguláciu rastu rastlín. *Agrochémia*, 29, 1989: 133-134.

Došlo 17. 3. 1994

BLAŽKOVÁ, J. - PROCHÁZKA, S. - HAVEL, L. (University of Agriculture, Brno): Morphoregulative effects and transport of Rastim 30 DKV in etiolated pea seedlings. *Rostl. Výr.*, 40, 1994 (8): 775-781.

Morphoregulative effects and transport of Rastim 30 DKV (3-benzyl-oxykarbonyl-methyl-2-benzothiazol) in etiolated pea seedlings were studied. Rastim is the new

regulator which effects are oncoming to IAA. Rastim inhibited the growth of cotylars of decapitated pea plants, although the exogenous IAA decreased the growth of cotylars more considerably. Rastim applied on the stumps of the epicotyls of decapitated pea seedlings could take ^{14}C -BA from roots and this ability was comparable with that of IAA. ^3H -Rastim was transported in pea seedlings both acropetally and basipetally towards the centres of the active growth (buds, roots) and to the storage organs (cotyledons). When applied to the roots or to the apex, ^3H -Rastim was distributed equally into the individual parts of plants within a 24h translocation period.

Kontaktní adresa:

RNDr. Jarmila B l a ž k o v á , CSc., Vysoká škola zemědělská, Zemědělská 1,
613 00 Brno, Česká republika, tel.: 05/45 13 30 12, fax: 05/45 21 20 44

Upozornění pro autory vědeckých časopisů

Z důvodu rychlejšího a kvalitnějšího zpracování grafických příloh (grafů, schémat apod.) příspěvků zasílaných do redakce Vás žádáme o jejich dodání kromě tištěné formy i na disketách.

Týká se to samozřejmě těch grafických příloh, které byly vytvořeny v nějakém programu PC (např. CorelCHART, Quatro Pro, Lotus 1-2-3, MS Excel). Vzhledem k tomu, že nejsme schopni upravit a použít pro tisk všechny typy (formáty) grafických souborů, žádáme Vás, abyste nám také kromě originálních souborů (např. z MS Excel typ *.XLS) zasílali grafické předlohy vyexportované jako bodovou grafiku v jednom z těchto formátů:

Bitmap	*.BMP
Encapsulated Postscript	*.EPS
Graphic Interchange Format	*.GIF
Mac paint	*.MAC
MS Paint	*.MSP
Adobe Photoshop	*.PSD
Scitex	*.SCT
Targa	*.TGA
Tag Image File Format	*.TIF

Redakce časopisu

VLIV BENZOLINONU A AUXINŮ NA REGENERACI A AKTIVITU PEROXIDÁZ V EXPLANTÁTOVÉ KULTUŘE HLÁVKOVÉHO ZELÍ

L. Havel, H. Konečná, V. Snášelová, S. Procházka, J. Blažková

Vysoká škola zemědělská, Brno

Porovnání morfogenních účinků benzolinonu (ve formě přípravku Rastim 30 DKV) s kyselinou 1-naftyloctovou (NAA) a kyselinou 2,4-dichlorfenoxycetovou (2,4-D) v explantátové kultuře hypokotylů hlávkového zelí a vlivu těchto látek na spektrum izoenzymů peroxidázy a její aktivitu v průběhu kultivace naznačuje, že tento přípravek působí jako látka auxinové povahy s menším účinkem než má NAA.

Význam růstových látek při kultivaci explantátů je všeobecně znám. Především sloučeniny s cytokininovou a auxinovou aktivitou výrazně ovlivňují diferenciací a diferenciací procesy i růst kultivovaných pletiv. Růstové látky přidávané do kultivačních médií vyvolají nejdříve celou řadu metabolických změn, které jsou příčinou příslušné morfogenní odpovědi nebo ji případně snad jen provázejí. Do této skupiny patří i peroxidázy, o kterých je známo, že jsou spolehlivým znakem morfogeneze (H o o f, G a s p a r, 1976; T h o r p e, G a s p a r, 1978; K a y, B a s i l e, 1984; N e u m a n et al., 1988; S e n et al., 1989). Dosavadní výsledky naznačují, že růstové látky mohou ovlivňovat růst a vývoj právě regulací produkce peroxidáz (J o n e s et al., 1986).

O mechanismu působení peroxidáz existují různé představy, není dosud však plně objasněn (C a m p a, 1991). Je však známo, že v suspenzní kultuře *Phaseolus* kultivované na 2,4-D byly pozorovány velké změny v peroxidázových zymogramech během růstového cyklu. Celková peroxidázová a IAA-oxidázová aktivita se paralelně snižovala během exponenciálního růstu a zvyšovala, když byla rychlost růstu nízká (G a s p a r et al., 1982).

Změny těchto peroxidázových izoenzymů byly také spojeny se stimulací a inhibicí růstu pod vlivem 2,4-D u explantátových kultur *Nicotiana*, *Daucus*, *Trigonella*, *Beta vulgaris* a *Arabidopsis* (G a s p a r et al., 1982). Kyselina abscisová stimulovala regeneraci prýtů na izolovaných dělohách *Pinus taeda* a zároveň ovlivňovala počet izoenzymů peroxidáz (N e u m a n et al., 1988; N e u m a n et al., 1992).

Prokázáný vztah mezi růstovými látkami a morfogenními procesy, morfogenními procesy a peroxidázami, resp. růstovými látkami a peroxidázami může umožnit porovnávání účinků různých látek s regulační aktivitou.

Přípravku Rastim 30 DKV, vyvinutému VÚCHT Bratislava, s účinnou látkou benzolinonem (3-benzyl-oxykarbonyl-methyl-benzothiazol) v 30% koncentraci je připisována řada vlastností podobných účinkům regulátorů růstu. Porovnání jeho působení v explantátové kultuře s látkami auxinové povahy, jimž se některými svými účinky podobá, a jeho vlivu, resp. vlivu těchto auxinových látek na izoenzymy a aktivitu peroxidázy může pomoci k pochopení mechanismu jeho účinků.

MATERIÁL A METODA

V pokusech byly použity rostliny hlávkového zelí [*Brassica oleracea* L. var. *capitata* (L.) Alef.] odrůda Lena (F1 hybrid).

Explantátová kultura

Explantáty byly odebírány ze střední části hypokotylů sterilně napěstovaných klíčnic rostlin. Rostliny v té době dosahovaly celkové délky 3 až 4 cm, hypokotyl byl asi 2 cm dlouhý, velikost explantátu byla 0,5 cm. Explantáty byly umístěny na základní médium (M u r a s h i g e, S k o o g, 1962) s přísadkou 1 mg.l⁻¹ benzyladeninu, 1 mg.l⁻¹ kinetinu a zkoumané látky: benzolinon (ve formě Rastimu 30 DKV, ve kterém je benzolinon přítomen v 30% koncentraci), NAA a 2,4-D v koncentracích 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M.l⁻¹ (indukční médium).

Po třech týdnech kultivace na těchto médiích byly kultury přenášeny na médium bez růstových látek (regenerační médium), kde docházelo k organogenezi prýtlů. Při přenosu na indukční médium byl stanoven nárůst kalusu. Po 14 dnech na regeneračním médiu byly spočteny indukované pupeny a po dalších 14 dnech regenerované prýty. Zároveň byly spočteny kořeny a stanovena celková délka kořenů. V každé variantě bylo statisticky zpracováno 30 explantátů.

Kultivace probíhala při teplotě 22 až 25 °C, zářivkovém osvětlení o intenzitě asi 20 μM.m⁻¹.s⁻¹ a při fotoperiodě 16 h.

Peroxidázy

Pro pokusy sledující aktivitu a izoenzymatická spektra peroxidáz u kultivovaných explantátů byly na základě předcházejících pokusů vybrány tyto koncentrace zkoumaných látek: 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ M.l⁻¹. Jako kontrola sloužilo médium pouze s přísadkou cytokininů.

Anodické peroxidázy byly detekovány po elektroforéze v polyakrylamidovém gelu. Segmenty hypokotylů byly odebírány při zakládání kultury a pak první, druhý, třetí a sedmý den od jejího založení. Tyto segmenty byly homogenizovány

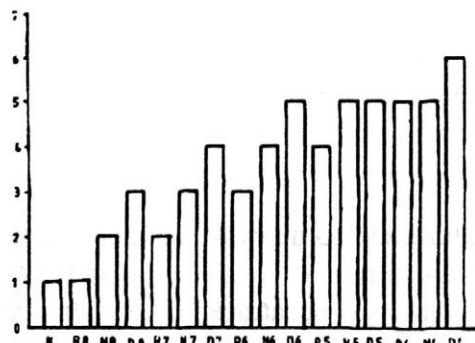
při 7 °C v 0,15M fosfátovém pufru pH 6,5. Následovala centrifugace při 7 °C 15 min při 10 000 g. Vertikální elektroforéza byla provedena v 7,5% PAAE, tloušťka desky 1 mm. Byl použit diskontinuální systém za konstantního napětí 120 V pro stacking gel a 200 V pro resolving gel (potenciálový spád 40 V.cm⁻¹). Anodické peroxidázy byly vizuálně hodnoceny po inkubaci gelu v barvicím roztoku: 4,5mM pyrokatechol, 9,2mM p-fenylendiamin v 0,15M fosfátovém pufru pH 6,5 po přidání 3% peroxidu vodíku (výsledná koncentrace peroxidu v roztoku 0,12 %).

Aktivita celkové peroxidázy byla stanovena kolorimetricky při vlnové délce 405 nm. Jedna jednotka peroxidázové aktivity byla definována jako množství enzymu, které způsobí zvýšení absorpance o 0,001 za 1 min za uvedených reakčních podmínek: 0,3mM guajakol, 0,24mM peroxid vodíku, 0,15M fosfátový pufr pH 6,5, teplota 25 °C.

VÝSLEDKY

Explantátová kultura

Při sledování vlivu benzolinonu, NAA a 2,4-D se ukázala závislost tvorby kalusu na koncentraci dané látky v živném médiu (obr. 1). Indukce kalusu závisí na druhu zkoumané látky, podle očekávání je nejučinnější 2,4-D. Pouze u kon-



1. Vliv benzolinonu a auxinů na indukcii růstu kalusu – The callus induction under the influence of benzolinon and auxins

K = kontrola (1 mg.l⁻¹ benzyladeninu; 1 mg.l⁻¹ kinetinu), R = benzolinon, N = NAA, D = 2,4-D, čísla představují záporný koeficient použitých koncentrací 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M.l⁻¹

K = control (1 mg.l⁻¹ benzyladenin; 1 mg.l⁻¹ kinetin), R = benzolinon, N = NAA, D = 2,4-D, numbers represent the negative coefficient of used concentrations 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M.l⁻¹

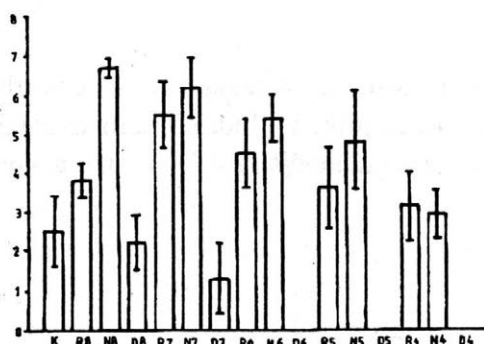
Stupnice indukce kalusu: 1 - velmi slabá, 2 - slabá, 3 - průměrná, 4 - středně silná, 5 - silná, 6 - velmi silná

The scale for callus induction: 1 - very poor, 2 - poor, 3 - average, 4 - medium-vigorous, 5 - vigorous, 6 - highly vigorous

centrace 10^{-5} byla zaznamenána stejná reakce u NAA. Benzolinon působí vždy nejméně, indukce kalusu na médiu s benzolinonem je stejná jako na médiu s NAA o 10x nižší koncentraci. Pouze při nejvyšší variantě je vliv obou těchto látek na indukci kalusu stejný (obr. 1).

Po přenesení kultur na médium bez růstových látek docházelo k regeneraci pupenů, ze kterých vyrůstaly prýty, a k regeneraci kořenů. K této organogenezi docházelo jak na částech explantátu, na nichž se vytvořil předtím kalus, tak v místech, kde k tvorbě kalusu nedošlo.

Při sledování vlivu zkoumaných látek na indukci pupenů, resp. prýtů se ukazuje, že přítomnost 2,4-D podle očekávání tento proces inhibuje, a to při nižších sledovaných koncentracích částečně, při vyšších úplně (obr. 2). Při nejnižší sledované koncentraci v indukčním médiu se nejvíce pupenů vytváří na médiu s NAA. Vliv benzolinonu se projevuje podstatně méně. Se zvyšující se koncentrací se však indukční vliv obou látek vyrovnává. U NAA zároveň klesá, u benzolinonu



2. Vliv benzolinonu a auxinů na indukci pupenů – The bud induction under the influence of benzolinon and auxins

osa y - průměrný počet pupenů na regenerující explantát - y axis - average number of buds on regenerating explants

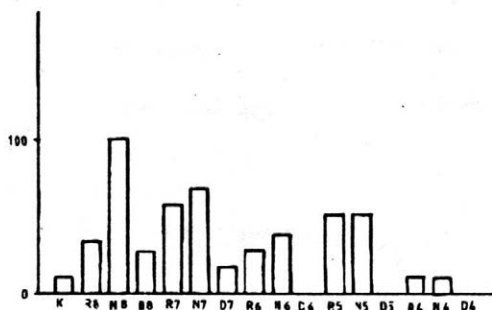
osa x - varianty média (obr. 1) - x axis - media variants (Fig. 1)

$P = 0,05$

nejdříve stoupá a pak též klesá. U nejvyšší sledované koncentrace je účinek obou látek stejný a odpovídá kontrole, tedy médiu, ve kterém jsou přítomny jen cytokiny. Zajímavý je pokles u koncentrace 10^{-6} a opětový vzestup.

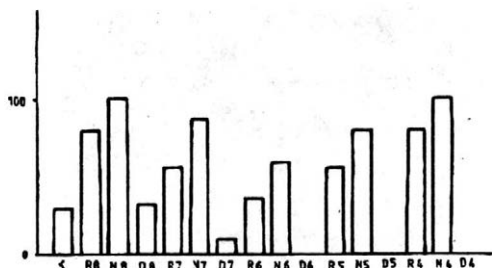
Inhibiční vliv 2,4-D se projevuje i na množství pupenů či prýtů, které se vytvářely na regenerujících explantátech (obr. 3). Mezi NAA a benzolinonem není statisticky průkazný rozdíl v množství regenerantů kromě nejnižší použité koncentrace, u níž je NAA pro indukci morfogeneze lepší. I v ostatních případech je však zřejmá tendence, že NAA působí lépe kromě nejvyšší použité koncentrace.

U kořenů je obdobná situace jako u prýtů (obr. 4). Projevil se očekávaný inhibiční vliv 2,4-D. Na médiu s NAA vytváří kořeny více explantátů než na médiu s benzolinonem. U obou látek počet explantátů s regenerujícími kořeny klesá od nejnižší koncentrace NAA a benzolinonu k minimu při koncentraci 10^{-6} M.l⁻¹



3. Vliv benzolinonu a auxinů na regeneraci prýtlů – The shoot regeneration under the influence of benzolinon and auxins

osa y - explantáty s regenerujícími prýtlů (%)
 - y axis - explants with regenerated shoots (%)
 osa x - varianty média (obr. 1) - x axis - media variants (Fig. 1)



4. Vliv benzolinonu a auxinů na regeneraci kořenů – The root regeneration under the influence of benzolinon and auxins

osa y - explantáty s regenerujícími kořeny (%)
 - y axis - explants with regenerated roots (%)
 osa x - varianty média (obr. 1) - x axis - media variants (Fig. 1)

a pak opět stoupá. Při nejvyšší koncentraci dosahuje u obou látek stejných hodnot jako u koncentrace nejnižší.

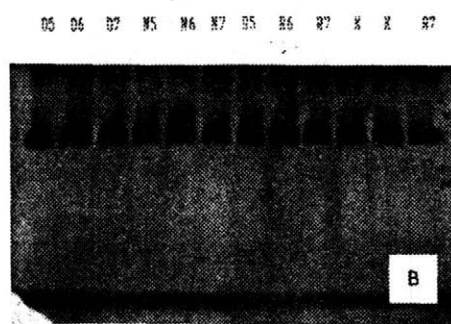
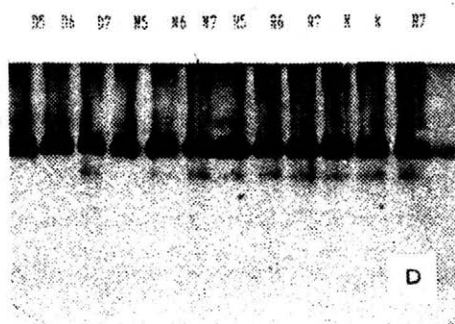
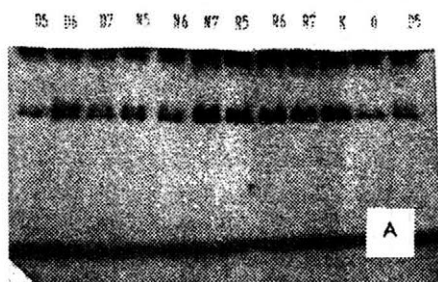
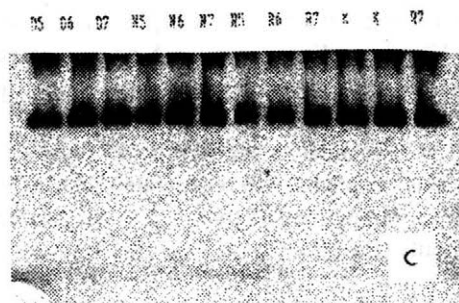
Peroxidázy

Pro studovanou explantátovou kulturu zelí je charakteristický velmi intenzivní pás kyselé peroxidázy v poloze $R_f = 0,32$ (obr. 5a). Jeho intenzita vzrůstá u všech testovaných variant s rostoucí dobou kultivace, nejvyšší je v sedmém dni (obr. 5a-d). U některých variant odebíraných ve třetím dni kultivace se navíc objevuje v poloze $R_f = 0,42$ velmi nezřetelný pás (obr. 5c), který je pak jasně viditelný v sedmém dni (obr. 5d). Tento pás se však nevyskytuje u vyšších sledovaných koncentrací 2,4-D a u nejvyšší koncentrace NAA. Ve zbývajících variantách odpovídá jeho výskyt kontrole (obr. 5d).

Celková aktivita peroxidázy u kontroly je ve všech sledovaných variantách růstových látek i kontroly nejvyšší v sedmém dni, tj. v posledním odběru (obr. 6). U kontroly roste v závislosti na době kultivace.

V přítomnosti 2,4-D je aktivita ve všech sledovaných dnech nejvyšší u koncentrace 10^{-6} M.l^{-1} , u dvou zbývajících sledovaných koncentrací jsou aktivity nižší.

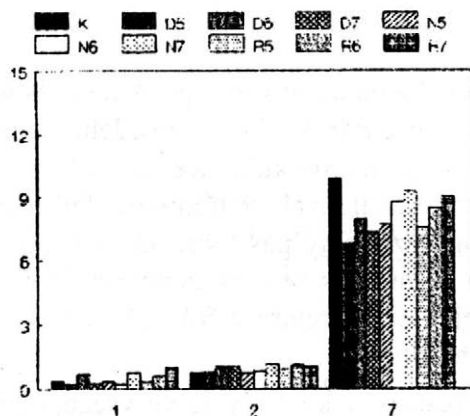
U NAA je ve druhém a sedmém dni zřejmý negativní vztah mezi její koncentrací a aktivitou peroxidázy. V prvním dni z této tendence vybočuje koncentrace 10^{-6} M.l^{-1} .



5. Vliv benzolinonu a auxinů na zymogramy anodických peroxidáz v závislosti na délce kultivace – Zymograms of anodic peroxidases under the influence of benzolinon and auxins and duration of the culture

a - 1, b - 2, c - 3, d - 7 dní - days

osa x - varianty média (obr. 1) - x axis - media variants (Fig. 1)



6. Aktivita peroxidázy v závislosti na růstovém regulátoru a délce kultivace – The peroxidase activity under the influence of growth regulator and duration of the culture

osa x - trvání kultivace ve dnech - x axis - duration of the culture in days

osa y - aktivita (jednotka aktivity představuje množství enzymu, které způsobí zvýšení absorbance o 0,001 za 1 min za podmínek: 0,3mM guajakol, 0,24mM peroxid vodíku, 0,15M fosfátový pufr pH 6,5, teplota 25 °C) - y axis - activity (one unit of the peroxidase activity represents the amount of the enzyme which causes the increase of absorbance by 0.001 per 1 min under conditions: 0.3mM guaiacol, 0.24mM hydrogenperoxid, 0.15M phosphate buffer pH 6.5, temperature 25 °C)

V přítomnosti benzolinonu je v prvním a sedmém dni tato tendence obdobná. Neplatí to pro koncentraci 10^{-6} M.l⁻¹ ve druhém dni.

Ve všech variantách s růstovými látkami v sedmém dni je aktivita peroxidázy nižší než u kontroly, které se nejvíce přibližují nejnižší koncentrace NAA a benzolinonu.

DISKUSE

Pokusy ukázaly, že benzolinon vyvolává u kultivovaných pletiv nejen diferenciaci, ale i dediferenciaci (tvorbu kalusu) obdobně jako dvě sledované látky auxinové povahy - NAA a 2,4-D. Nejsilnější účinek má podle očekávání 2,4-D. Benzolin indukuje tvorbu kalusu méně než NAA, přičemž morfogenní účinek není u většiny sledovaných koncentrací NAA a benzolinonu statisticky rozdílný, což je velmi výhodné z hlediska využití benzolinonu při mikropropagaci, kde je tvorba kalusu nežádoucí.

Izoenzymová analýza prokázala významné rozdíly mezi benzolinonem, NAA a 2,4-D při vyšších koncentracích. Vymizení pásu v poloze $R_f = 0,42$ souvisí buď s větší intenzitou růstu kalusu, nebo je znakem pro snížení regeneračních schopností.

Skutečnost, že varianta s benzolinonem odpovídá kontrole, ukazuje, že tato látka při obdobných morfogenních účincích působí na kultivovaná pletiva méně nepříznivě. Působení při nižších koncentracích naznačuje podobnost s NAA.

Aktivita peroxidázy se u kontroly postupně zvyšovala. Obdobné zvýšení pozoroval G a s p a r et al. (1982), přičemž celková rychlost růstu v suspenzní kultuře fazolu byla nízká. Nepřítomnost auxinů v kontrolním médiu způsobuje pravděpodobně pokles růstu, protože tato kultura je zřejmě pro svůj dlouhodobější růst vyžaduje. Na ostatních variantách média včetně média s benzolinonem je aktivita nižší, což ukazuje na normální pokračování růstu. Opět je zde zřejmá podobnost benzolinonu s látkami auxinové povahy, přičemž se svými účinky blíží NAA.

Za pozornost stojí nepravidelnosti v aktivitě u koncentrace 10^{-6} M.l⁻¹, u které byl též zaznamenán pokles počtu regenerujících explantátů.

Poděkování

Autoři děkují pracovníkům VÚCHT v Bratislavě za finanční podporu tohoto výzkumu a M. C o u f a l o v é za vynikající technickou pomoc.

Literatura

- CAMPA, A.: Biological roles of plant peroxidases: Known and potential function. In: EVERSE, J. - EVERSE, K. E. - GRISHAM, M. B. (eds): Peroxidases in chemistry and biology, vol. II, CRC Press 1991: 26-50.
- GASPAR, T. - PENEL, Ć. - THORPE, T.: Auxin catabolism. In: Peroxidases, 1970-1980. Univ. Ženeva, 1982: 90-100.
- HOOF, P. VAN - GASPAR, T.: Peroxidase and isoperoxidase changes in relation to root initiation of *Asparagus cultures in vitro*. Acta Hort., 4, 1976: 27-31.
- JONES, R. L. - GREPPIN, H. - PENEL, C. - GASPAR, T.: Gibberelic acid and auxin influence the secretion of peroxidase. In: Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. Univ. Ženeva, 1986: 295-308.
- KAY, L. E. - BASILE, D. V.: Specific peroxidase isozymes are correlated with organogenesis. Pl. Physiol., 94, 1984: 99-105.
- MURASHIGE, T. - SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant., 15, 1962: 473-497.
- NEUMAN, P. - FONG, F. - NEWTON, R. J.: Absciscic acid and induced peroxidase activities during shoot induction in loblolly pine cotyledonary cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol., 24, 1988 (2): 51A.
- NEUMAN, P. - FONG, F. - NEWTON, R. J. - SEN, S.: Induction of peroxidase isozymes during shoot enhancement by ABA in cotyledon explants of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). J. Pl. Physiol., 139, 1992: 343-349.
- SEN, S. - NEWTON, R. J. - NEUMAN, P.: Absciscic acid: a role in shoot enhancement from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) cotyledon explants. Pl. Cell Rep., 8, 1989: 191-194.
- THORPE, T. A. - GASPAR, T.: Isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus. In Vitro Cell. Dev. Biol., 14, 1978: 522-526.

Došlo 17. 3. 1994

HAVEL, L. - KONEČNÁ, H. - SNÁŠELOVÁ, V. - PROCHÁZKA, S. - BLAŽKOVÁ, J.
(University of Agriculture, Brno):

Regeneration and peroxidases activity in cabbage tissue culture under the influence of benzolinon and auxins.

Rostl. Výr., 40, 1994 (8): 783-791.

There is no doubt that the plant growth regulators influence the dedifferentiation, differentiation and growth of the plant tissues cultured *in vitro*. Peroxidases are known to be the reliable marker of the development in tissue culture (Hoof, Gaspar, 1976; Thorpe, Gaspar, 1978; Kay, Basile, 1984; Neuman et al., 1988; Sen et al., 1989). At the same time, the peroxidases are influenced by plant growth regulators (Gaspar et al., 1982; Neuman et al., 1988; Neuman et al., 1992). These relations can be used as a good tool for the comparison of a substance with the regulatory activity with known growth regulators.

Benzolinon (3-benzyl-oxykarbonyl-methyl-benzothiazol) is a new substance which is known to influence growth and development *in vivo* even *in vitro* but the mechanism of the regulation of these processes is still unknown.

The explants isolated from the cabbage seedling hypocotyls were cultured on basal medium (Murashige, Skoog, 1962) with 1 mg.l^{-1} benzyladenin and 1 mg.l^{-1} kinetin (control) with addition of benzolinon (in Rastim 30 DKV, a commercial preparation containing 30% of benzolinon), NAA and 2,4-D in concentrations of 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M.l^{-1} , resp. The comparison of the media variants and callus formation (Fig. 1), bud induction (Fig. 2), shoot and root regeneration (Figs 3, 4) suggest that benzolinon has an auxin-like activity. The comparison of the zymograms of anodic peroxidases (Fig. 5) and the enzyme activity (Fig. 6) contributes to the same conclusion.

The results reveal that in the plant tissue culture benzolinon acts as an auxin that is not so effective as NAA.

Kontaktní adresa:

Doc. RNDr. Ladislav Havel, CSc., Vysoká škola zemědělská, Zemědělská 1,
613 00 Brno, Česká republika, tel.: 05/45 13 30 16, fax: 05/45 21 20 44

Upozorňujeme čtenáře, že právě vyšel

**Katalog videotéky
Ústřední zemědělské a lesnické knihovny**

AGROVIDEO

**Katalog je určen všem zájemcům o videopořady z oboru
zemědělství, lesnictví,
ochrany životního prostředí a potravinářství.**

Katalog obsahuje asi 300 titulů, které jsou rozděleny do 27 tematických okruhů, např. věda a výzkum, mechanizace a automatizace rostlinné a živočišné výroby, alternativní zemědělství, půdoznalství, šlechtění rostlin, zahradnictví, chov zvířat, plemenářství, včelařství, rybářství, lesnictví, myslivost, tvorba a ochrana životního prostředí, vodní hospodářství apod. Cena katalogu je 40 Kč.

Videokazety si mohou zájemci osobně půjčit nebo lze objednat zásilku poštou na adrese:

**Agrovideo Ústřední zemědělské a lesnické knihovny
Slezská 7, 120 56 Praha 2 - Vinohrady.**

Uživatelům služeb Agrovidea se může stát každý zájemce, který se seznámí s výpůjčním řádem a zaplatí roční registrační poplatek 30 Kč. Videokazety se půjčují zdarma. Při zasílání poštou je účtováno pouze poštovné.

Informace na tel. čísle:

257 541, l. 520 – dr. Bartošová (informace z databáze, rešerše na téma)

257 541, l. 304 – pí Hedvíková (výpůjční činnost)

259 096 - záznamník (mimo prac. dobu)

Objednávky katalogu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
oddělení odbytu
Slezská 7, 120 56 Praha 2

OBSAH – CONTENTS

Šantrůček J., Šantrůčková H., Květoň J., Šimková M., Roháček K.: The effect of elevated CO ₂ concentration on photosynthetic CO ₂ fixation, respiration and carbon economy of wheat plants – Účinek zvýšené koncentrace CO ₂ v atmosféře na fotosyntézu, respiraci a bilanci uhlíku rostlin pšenice	689
Griga M., Klenotičová H.: Plant regeneration in callus cultures of faba bean (<i>Vicia faba</i> L.) – Regenerace rostlin v kalusových kulturách bobu obecného (<i>Vicia faba</i> L.)	697
Zrůst J.: Odezva bramborů na stres suchem zvýšenou hladinou prolinu v hlízách – Response of potato plants to drought stress by increased proline level in tubers ..	711
Sladký Z., Gális I., Macas J., Brinca P., Dubová J.: Fyziologická regulace růstu transformantů brambor – Physiological transformation of growth potato transformants	721
Plhák F.: Reakce vojtěšky a slunečnice na nitrátovou a amonnou výživu ve vodní a pískové kultuře při třech intenzitách světla – Response of lucerne and sunflower on nitrate and ammonia nutrition in water and sand cultures at three intensities of solar radiation	729
Dundelová M., Procházka S.: Role etylenu a indolyl-3-octové kyseliny v průběhu ontogeneze obilok ozimé pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.) – The role of ethylene and indolyl-3-acetic acid during ontogenesis of winter wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) caryopses	741
Vlašínová H., Ježek Z., Procházka S.: Vliv huminových látek na rychlost růstu orchidejí v podmínkách <i>in vitro</i> – The influence of humin substances on the growth of orchids <i>in vitro</i>	747
Fišerová H., Hradilík J.: Produkce etylenu a etanu při tvorbě adventivních kořenů na stonkových segmentech révy vinné – Ethylene and ethane production during adventitious root formation on vine stem segments	755
Klíčová Š., Šebánek J., Hrstková P.: Vliv benzolinonu na růstové korelace u klíčnic rostlin hrachu – The effect of benzolinon on growth correlations of pea seedlings	763
Blažková J., Procházka S., Havel L.: Morforegulační účinky a transport Rastimu 30 DKV u klíčnic rostlin hrachu – Morphoregulative effects and transport of Rastim 30 DKV in etiolated pea seedlings	775
Havel L., Konečná H., Snášelová V., Procházka S., Blažková J.: Vliv benzolinonu a auxinů na regeneraci a aktivitu peroxidáz v explantátové kultuře hlávkového zelí – Regeneration and peroxidases activity in cabbage tissue culture under the influence of benzolinon and auxins	783
RECENZE – REVIEW	
Zahrádníček J.: A. L. Lehninger, D. C. Nelson, M. M. Cox: Principles of Biochemistry	710
Zahrádníček J.: M. Ondřej: Genové inženýrství kulturních rostlin	740

UPOZORNĚNÍ PRO ODBĚRATELE

Od letošního roku vyřizuje veškeré služby spojené s distribucí časopisu
Rostlinná výroba vydavatel - Ústav zemědělských a potravinářských
informací Praha.

Objednávky na předplatné posílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
referát odbytu
Slezská 7
120 56 Praha 2

Vědecký časopis ROSTLINNÁ VÝROBA ● Vydává Česká akademie zemědělských věd
a Slovenská akadémia pôdohospodárskych vied - Ústav zemědělských a potravinářských
informací ● Vychází měsíčně ● Redaktorka: RNDr. Eva Stříbmá ● Redakce: Slezská 7,
120 56 Praha 2, tel.: 02/25 25 41, fax: 02/25 70 90 ● Sazba: Studio DOMINO - ing. Jakub
Černý, Pražská 108, 266 01 Beroun, tel.: 0311/240 15 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav ze-
mědělských a potravinářských informací, Praha 1994

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 7,
120 56 Praha 2