

VLIV 24-EPIBRASSINOLIDU NA VLASTNOSTI SEMEN A JEJICH KLÍČIVOST

Influence of 24-epibrassinolide on Characteristics and Germination of Seeds

Ladislav Bláha¹; Pavlína Gottwaldová²; František Hnilička³; Pavel Kadlec⁴;

Petra Jankovská⁴; Ladislav Kohout⁵

¹VÚRV Praha - Ruzyně

²VÚP, spol. s r. o.

³ČZU v Praze

⁴VŠCHT Praha

⁵ÚOCHB, ČAV

Abstract

Application of 24-epibrassinolide has positive influence on the tolerance of plants to the abiotic stresses (drought and high temperature) and in the filial generation on the seed vigour and seed quality. According to chemical analysis of proteins, lipids, starch (total starch, damaged starch, Ewers), macronutrients and micronutrients and combustion heat it stands to reason the influence by treatment of 24-epibrassinolide without substantial effect. The application of 24-epibrassinolide on the seeds after harvest (no dormant seeds) has partly positive effect on the seed traits, but not at every species (cultivars).

Key words: *abiotic stresses, seed traits, plant traits, influence of 24-epibrassinolide*

Souhrn

Testoval se vliv 24-epibrassinolidu u sklizených nedormantních semen na klíčivost, energii klíčení a počet tvrdých semen. Z výsledků vyplývá, že nejlépe na použití dané látky reagovala (z celé řady plodin) zvýšením celkové klíčivosti, energie klíčení a poklesem procenta tvrdých semen svazenka vratičolistá (*Phacelia tanacetifolia*) a nejhůře svatojánské žito (*Secale cereale* L. var. *multicaule*). Dvouhodinové máčení semen v roztoku testované látky mělo větší efekt, než klíčení semen na filtračním papíře nasátém roztokem uvedeného hormonu. Aplikace 24-epibrassinolidu během vegetace na počátku tvorby semen (po ukončení kvetení) neměla vliv na jejich energetický obsah a chemické složení, ale vitalita semen byla ve většině případů vyšší. Nabízí se zde využití pro praktické účely.

Úvod

Aplikace 24-epibrassinolidu v době kvetení rostlin má **většinou** pozitivní vliv na tvorbu semen a v následné generaci na vývoj a růst klíčících rostlin z takto ovlivněných semen. Zejména u vitality semen. V literatuře se udává, že brassinosteroidy podporují vitalitu semen, která však nejsou ve stádiu dormance. Ne vždy však lze k uvedeným závěrům dospět. Aplikace 24-epibrassinolidu byla provedena z důvodu posouzení jeho vlivu na celkovou klíčivost semen, ale také na energii klíčení a počet tvrdých semen. Velké zastoupení tvrdých semen v osivu mají z uvedených plodin zejména krmný sléz (*Malva verticillata*) a komonice bílá (*Melilotus albus*). Žádoucí je snížení tvrdosemennosti, která především v polních podmínkách způsobuje nevyrovnané porosty těchto plodin.

Materiál a metody

A) Aplikace během vegetace v době tvorby semen

U vybraných odrůd pšenice a ozimé (*Tritium aestivum* L.), slézu krmného (*Malva verticillata* L.), pohanky (*Fagopyrum esculentum*) byly sledovány vybrané vlastnosti rostlin a semen po aplikaci 24-epibrassinolidu formou spreje, či pomocí injekční stříkačky například do internodia pšenice (0,1 cm³). Testován byl též vliv uvedeného fytohormonu na klíčivost (nedormantních) semen na Petriho miskách. Semena byla bez předchozího máčení dána na klíčivost, jen místo destilované vody byl ke zvlhčení filtračního papíru použit roztok 24-epibrassinolidu o koncentraci 10⁻⁹ mol (0,05 ml roztoku 24-epibrassinolidu + 2,5 ml vody).

Pokusy se prováděly v polních podmínkách a v řízených skleníkových podmínkách. Jednalo se o plnou závlahu s 70 % polní vodní kapacity a o omezenou závlahu (stres sucha) během celé vegetace, kdy rostliny dostávaly pouze 35-40% vody z celkové polní vodní kapacity, kombinovanou se stresem vysoké teploty, kdy v průběhu dne byla teplota v průměru 33°C a v noci 20°C. U standardního pokusu se teplota pohybovala od 20°C do 25°C přes den a 15°C přes noc. Délka dne činila, pokud se nejednalo o letní pokusy, 14 hodin (přisvětlování sodíkovými 400W výbojkami) a délka noci byla 8 hodin. Pokusy byly kultivovány v Mitcherlichových nádobách s homogenizovanou půdou a o stejném objemu půdy. Do nádob bylo vyseto vždy dvacet semen pšenice a krmného slézu. Pokusy byly pěstovány ve čtyřech opakováních. Rozmístění nádob ve skleníku bylo uskutečněno metodou znáhodněných bloků. Během vegetace byly experimenty 2x přihnojeny úplným živným roztokem. Pokusy byly celkem rozděleny na čtyři varianty. Kombinace stresu sucha a vysoké teploty, standardní podmínky a kromě toho kombinace stresu sucha a vysoké teploty a standardní podmínky spojené s postřikem 24-epibrassinolidu (10⁻⁹mol) v době kvetení za účelem snížení vlivu abiotických stresorů na vlastnosti rostlin, zejména semen. Jako doplňkové pokusy byly testovány i výše uvedené pokusné varianty u dalších plodin (proso, pohanka, fazole, hrách).

B) Přímá aplikace na sklizená semena

K pokusům bylo použito osivo komonice bílé jednoleté (odrůda Adéla), lesknice kanárské (odrůda Judita), slézu krmného (odrůda Dolina), svazenky vratičolisté (odrůda Větrovská), štirovniku jednoletého (odrůda Junák) a žita svatojánského (odrůda Lesan). Osivo uvedených plodin (kromě štirovniku) bylo vypěstováno v roce 2003, pouze štirovník byl ze sklizně roku 2000.

Fytohormon 24-epibrassinolid o molární koncentraci 10⁻⁹ byl na osivo aplikován dvěma způsoby. Při prvním postupu byla semena v jeho roztoku máčena po dobu 2 hodin a po oschnutí byla dána na klíčivost. Druhý postup spočíval v tom, že byla semena bez předchozího máčení dána na klíčivost, pouze místo destilované vody byl ke zvlhčení filtračního papíru použit roztok 24-epibrassinolidu.

Od každé plodiny bylo dáváno na klíčivost 4 x 100 ks semen jako kontrola a stejné množství semen bylo také použito k oběma způsobům aplikace 24-epibrassinolidu. U všech vybraných plodin byla současně s klíčivostí zjišťována i energie klíčení a počet tvrdých semen. Klíčivost a její hodnocení byla provedena podle metodik ÚKZÚZ, kde je také pro každou plodinu uvedeno, který den se provádí energie klíčení, tj. kolik semen ze sta vyklíčilo při prvním hodnocení klíčivosti semen a který den hodnocení končí. Počet tvrdých semen při posledním hodnocení klíčivosti je započten do celkové klíčivosti semen. V tabulce s výsledky je však procento tvrdých semen (neboli počet tvrdých semen ze sta) pro přehlednost a možnost porovnání uvedeno také zvlášť.

Výsledky

A) Aplikace během vegetace v době tvorby semen

Z tabulky 1 vyplývá, že aplikace hodnoceného fytohormonu u pohanky výrazně zvyšuje hmotnost semen u všech sledovaných typů prostředí a u stresového prostředí-prakticky až na úroveň hmotnosti semen ze standardního prostředí.

Tab. 1: Vliv aplikace 24-epibrassinolidu v době kvetení na vybrané vlastnosti pohanky (skleníkový pokus)

<i>Fagopyrum tataricum</i> – český původ			
Typ prostředí	Hmotnost sušiny jedné rostliny (g)	Hmotnost 1000 semen (g)	Výška rostliny (cm)
Standardní podmínky	2,12	13,98	103
Standardní podmínky s aplikací 24-epibrassinolidu	4,66	15,99	120
Vysoká teplota a sucho	2,11	10,07	64
Vysoká teplota a sucho s aplikací 24-epibrassinolidu	4,51	15,68	110
<i>Fagopyrum tataricum</i> – původ USA			
Typ prostředí	Hmotnost sušiny jedné rostliny (g)	Hmotnost 1000 semen (g)	Výška rostliny (cm)
Standardní podmínky	1,31	14,96	95
Standardní podmínky s aplikací 24-epibrassinolidu	2,66	15,34	105
Vysoká teplota a sucho	1,36	12,19	50
Vysoká teplota a sucho s aplikací 24-epibrassinolidu	2,50	14,71	95

Výsledky jsou z nádobového pokusu v řízených podmínkách, podobné výsledky byly získány i z polních pokusů. Obdobné závěry lze učinit i u pšenice, kde aplikace testované látky má pozitivní vliv na všechny sledované znaky obilí. Existují však rozdíly mezi odrůdami. Z pokusů s ozimou a s jarní pšenicí vyplynulo, že vliv 24-epibrassinolidu má vliv i na morfologické vlastnosti rostlin po postřiku. Výnosové prvky mají po aplikaci dané látky vyšší hodnoty, obilky u většiny odrůd vyšší vitalitu (tabulka 2), zejména větší kořenový systém, i když na počátku jejich klíčení se může projevit oproti standardu mírné zpoždění v růstu kořenů.

Tab. 2: Vliv postřiku 24-epibrassinolidem na klíčící rostliny ozimé pšenice v následné generaci (průměr tří odrůd)

Pokusné podmínky	Délka klíčku (mm)	Délka nejdelšího kořene (mm)	Celková délka rostliny (mm)	Hmotnost sušiny klíčku (g)	Hmotnost sušiny kořínku (g)	Celková hmotnost (g)
Standardní podmínky	240,1	180,01	420,54	0,68	0,39	1,07
Stresové podmínky	210,1	175,22	385,32	0,65	0,31	0,96
Standardní podmínky a	258,8	245,60	504,40	0,72	0,38	1,10
Stresové podmínky a 24-epibrassinolid	263,1	267,32	530,30	0,75	0,39	1,14

Z tabulky 3 a z dalších opakovaných pokusů u hrachu vyplývá, že u odrůdy Komet v polních podmínkách testovaného hormonu je vliv na vlastnosti rostlin značný. Bohužel, v polních podmínkách se stabilně v jednotlivých opakováních opakují i výsledky opačné, tedy u odrůdy Komet je vliv stabilně nižší a to jak ve stresových, tak ve standardních podmínkách prostředí. Znamenalo by to, vzhledem k opakovatelnosti výsledků, že vliv prostředí tedy výrazně ovlivnil vliv testovaného fytohormonu.

Tab. 3: Vliv 24-epibrassinolidu na vlastnosti rostlin hrachu a jejich semen (skleníkový pokus)

Odrůda hrachu	Ošetření	Hmotnost jedné rostliny (g)	Počet lusků na rostlinu (g)	Počet zrn na rostlinu	Hmotnost zrn na rostlinu
Menhir	kontrola	2,85	2,4	5,7	1,47
Menhir	kontrola	2,30	1,9	5,0	1,05
Menhir	kontrola	2,6	2,4	5,6	1,34
Menhir	kontrola	5,0	2,14	8,0	2,59
Průměr		3,19	2,21	6,07	1,61
Menhir	24 -epibrassinolid	2,85	1,46	5,0	1,45
Menhir	24 -epibrassinolid	2,3	2,25	3,5	1,07
Menhir	24 -epibrassinolid	3,1	2,0	6,1	1,65
Menhir	24 -epibrassinolid	2,9	2,46	5,36	1,53
Průměr		2,78	2,04	4,99	1,43
Komet	kontrola	2,6	2,25	8,12	1,28
Komet	kontrola	2,25	1,65	4,2	1,06
Komet	kontrola	2,55	2,22	6,8	1,16
Komet	kontrola	2,9	2,7	7,7	1,79
Průměr		2,57	2,2	6,7	1,32
Komet	24 -epibrassinolid	3,3	2,9	8,1	1,66
Komet	24 -epibrassinolid	3,3	3,1	10,1	1,96
Komet	24 -epibrassinolid	3,08	2,75	8,75	1,68
Komet	24 -epibrassinolid	3,3	2,08	3,28	1,72
Průměr		3,24	2,7	7,55	1,75

U krmného slézu jsou ze skleníku (tabulka 4) výsledky jednoznačně lepší po aplikaci uvedeného hormonu, v polních podmínkách byly získány střídavé výsledky - záleží tedy též na vlivu provenience a na ročníku. Z výsledků uvedených pokusů a z pokusů s dalšími plodinami lze ve většině případů konstatovat pozitivní vliv daného hormonu na toleranci vůči suchu a vysoké teplotě a na zlepšení vitality semen.

Tab. 4: Příklad krmného slézu (*Malva verticillata*)

Pokusné podmínky	Hmotnost sušiny jedné rostliny (g)	Hmotnost 1000 semen (g)	Výška rostlin (cm)
Standardní podmínky	2,475	2,84	64,59
Stresové podmínky	2,125	2,65	60,54
Standardní podmínky a apl.	1,995	3,28	58,70
Stresové podmínky a apl. 24-epibrassinolidu	1,998	3,22	59,98

B) Přímá aplikace na sklizená semena

Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách. Jedná se vždy o průměrné hodnoty ze čtyř opakování (po 100 ks semen na jednu Petriho misku). Klíčivost semen v tabulkách zahrnuje všechna vyklíčená semena, včetně energie klíčení a tvrdých semen. Tučně jsou vyznačeny nejvyšší (u tvrdých semen nejnížší) hodnoty. V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky klíčivosti semen, jejich energie klíčení a procento tvrdých semen po předchozím máčení v roztoku 24-epibrassinolidu, který měl pozitivní vliv na klíčivost komonice, svazenky a štirovníku. Počet tvrdých semen byl po aplikaci roztoku nejnižší u lesknice a svazenky. Pokud vezmeme v úvahu energii klíčení semen, pozitivní efekt 24-epibrassinolidu se projevil u komonice, lesknice, svazenky a u štirovníku. Všechny tři sledované znaky ovlivnil roztok 24-epibrassinolidu jednoznačně pozitivně u svazenky, jejíž semena měla po aplikaci nejvyšší energii klíčení, celkovou klíčivost a nejnižší počet tvrdých semen oproti kontrole. Negativní efekt měla aplikace uvedeného hormonu na sléz a žito; obě plodiny měly lepší výsledky v kontrolní variantě.

Tab. 5: Klíčivost semen po předchozím 2 hod. máčení v roztoku 24-epibrassinolidu o molární koncentraci 10^{-9}

Název vzorku		Energie klíčení v %	Tvrdá semena v %	Klíčivost v %
Komonice	24-epibrassinolid	51,50	40,50	93,25
	kontrola	44,75	38,50	85,25
Lesknice	24-epibrassinolid	54,00	14,00	89,50
	kontrola	50,00	14,50	95,75
Sléz	24-epibrassinolid	6,50	87,25	95,25
	kontrola	8,00	86,25	96,25
Svazenka	24-epibrassinolid	99,00	0,00	99,25
	kontrola	96,50	0,25	96,75
Štirovník	24-epibrassinolid	22,50	0,00	22,50
	kontrola	17,00	0,00	17,25
Žito	24-epibrassinolid	90,50	0,00	90,50
	kontrola	91,50	0,00	92,50

Tab. 6: Klíčivost semen na filtračním papíře navlhčeném roztokem 24-epibrassinolidu o molární koncentraci 10^{-9}

Název vzorku		Energie klíčení v %	Tvrdá semena v %	Klíčivost v %
Komonice	24-epibrassinolid	46,50	46,75	94,75
	kontrola	48,00	44,50	95,75
Lesknice	24-epibrassinolid	69,00	5,75	88,25
	kontrola	70,00	4,00	84,00
Sléz	24-epibrassinolid	6,75	77,00	86,50
	kontrola	6,00	82,00	89,75
Svazenka	24-epibrassinolid	98,25	0,25	98,50
	kontrola	95,75	1,00	97,50
Štirovník	24-epibrassinolid	18,25	1,25	21,75
	kontrola	30,50	1,25	33,25
Žito	24-epibrassinolid	81,00	0,00	83,00
	kontrola	87,00	0,00	88,50

Tabulka 6 uvádí výsledné hodnoty energie klíčení, počtu tvrdých semen a celkové klíčivosti semen na filtračním papíře navlhčeném roztokem 24-epibrassinolidu, který pozitivně ovlivnil klíčivost lesknice a svazenky. Z hlediska tvrdých semen a současně i u energie klíčení se pozitivní efekt aplikovaného roztoku projevil u slézu a svazenky. U všech sledovaných znaků na roztok reagovala

pozitivně opět pouze svazanka. Negativní vliv při tomto způsobu aplikace měl 24-epibrassinolid na komonici, štirovník a žito, které dosáhly lepších výsledků v kontrolní variantě.

Z porovnání výsledných hodnot obou variant je zřejmé, že varianta s máčením semen vykázala lepší výsledky než varianta s vlhčeným filtračním papírem. Nezáleží tedy pouze na aplikaci 24-epibrassinolidu, ale i na způsobu aplikace tohoto fytohormonu. Mezi reakcemi plodin na aplikovaný fytohormon jsou zjevné rozdíly, což je nejspíše dáno geneticky.

Diskuse

Z výsledků vyplývá, že zejména ve skleníkových podmínkách (ještě lépe v klimaboxu) se pozitivně projeví vliv aplikace 24-epibrassinolidu na růst rostlin, na tvorbu semen a jejich vlastnosti téměř u všech plodin. Velký vliv na výsledky má testovaná plodina, odrůda a počet aplikací 24-epibrassinolidu. Například u kvetoucí pšenice stačí jeden postřik, avšak u rostlin, kde však postupně nakvétají vždy jednotlivá „patra“ (pohanka, sléz, fazole, hrách atd.) se efekt projevuje vždy jen po opakovaných postřicích, které byly vždy aplikovány po rozkvetení květů na dalším internodiu. Jednoznačně pozitivní výsledky jsou vždy u skleníkových pokusů.

U polních pokusů jsou výsledky aplikace testované látky střídavé. U semen klíčících rostlin, kde byl aplikován 24-epibrassinolid, jsou kořeny větší a to často i přes nečekanou a atypicky sníženou počáteční energii klíčení a růstu kořenů.

Pokusy s ovlivněním vlastností semen, zejména klíčivosti u jednotlivých plodin - jak ze standardního prostředí, tak z podmínek sucha a vysoké teploty a z obou prostředí ovlivněných aplikací testovaného fytohormonu, jsou střídavé. Je možno souhlasit na základě dalších testovaných plodin a jejich odrůd se závěry výsledků z Výzkumného ústavu pícninářského v Troubsku s tím, že existují plodiny, které vždy pozitivně reagují na uvedený fytohormon, a jsou plodiny, kde jsou výsledky střídavé, či stále negativní. V dalším výzkumu je třeba se soustředit na plodiny, které na uvedený fytohormon nereagují, a na plodiny, které reagují velmi pozitivně ve všech typech prostředí. Tedy na dva kontrasty.

Aplikace během vegetace je většinou účinnější než aplikace na vlastní sklizená semena po uplynutí dormance semen, a to i přes pozitivní reakci semen po aplikaci 24-epibrassinolidu buď máčením po dobu dvou hodin, či jejich klíčením na filtračním papíře nasátem uvedeným fytohormonem.

Pokud se jedná o případy, kdy fytohormon pozitivně ovlivnil vitalitu semen, vyvstává zde tedy otázka pro další výzkum, (který již probíhá) a tedy zjistit podstatu problému z hlediska metabolismu - zda je uvedený fytohormon transportován do semen, kde působí na vitalitu, nebo zda upravuje poměr obsahu GA₃, cytokininů a ABA, či zda se jedná o „signál“, který má za následek vyšší aktivitu fytohormonů.

Zatím byl analyzován obsah cytokininů na ÚEB v Praze-6, Lysolajích. Cytokiny byly z obilek extrahovány 80% metanolem, čištěny na kolonkách C18 SepPak a na iontoměničových celulosách, rozděleny na frakci volných basí, ribosidů, ribosid-monofosfátů a glukosidů a stanoveny metodou LC/MS. Koncentrace většiny stanovených cytokininů byly pod limitem citlivosti. Byl detekován pouze isopentenyladenin, cis-zeatin O-glukosid, cis-zeatinribosid O-glukosid, cis-zeatinribosid-fosfát a isopentenyladenosinfosfát. V obsahu těchto cytokininů nebyl mezi kontrolní a 24-epi ošetřenou variantou nalezen žádný výraznější rozdíl.

Výzkum nyní probíhá též u sklizených semen. V pokusech s nedormantními semeny se testuje vliv vitality stimulačních látek a jejich porovnání s vlivem 24-epibrassinolidu a kombinace tohoto rostlinného hormonu s dalšími látkami.

Další uplatnění daného hormonu lze předpokládat u drobnosemenných plodin a květin, kde šlechtění zanedbalo kvalitu semen. Jedná se o zlepšení energie klíčení a o možnost dlouhodobějšího skladování.

Literatura

- Bláha,L., Kadlec,P., Kohout, L., Hnilička,F., Gottwaldova P., Jankovská P.:ESA Congress, Book of proceedings, Copenhagen, 11-15 July 2004, s.82.
- Bláha,L., Gottwaldová,P., Hnilička,F., Kohout,L.: Sborník z konference-Brassinosteroidy 2004, p.47.
- Golley, F.B. Ecology, 42 (3), 1961, s.581-584.
- Hansen, F., Diepenbrock, W. Fett Wissenschaft Technologie 96,4,1994:129-136.
- Paine R.T. Ann. Rev. Ecol. Systematics 2, 1971, s.145–164.
- Toppi, L.S., Skowrońska, B.P. Abiotic stresses in plants. Kluwer, 2003.
- Hayat,S., Amad,A. Brassinosteroids-Bioactivity and Crop Productivity, Kluwer 2003.
- Zubko, E., Adams, C.J., Macháčeková, I., Malbeck, J., Scollan, C., Mexer, P.: Plant J.29.,797-808,2002.

Poděkování:

Tato práce byla podpořena projektem NAZV Mze ČR QF 3056 „Vitalita osiva a sadby a jejich význam u tradičních a vybraných netradičních perspektivních plodin pro šlechtění, semenářství a pěstitele“.

Dále jsme zavázáni prof. RNDr I. Macháčekové CSc, z Ústavu experimentální botaniky ČAV, Rozvojová 135, 165 00 Praha 6 – Lysolaje, machackova@ueb.cas.cz, za analýzu obsahu fytohormonů.

Kontaktní adresa autora: Ing. Ladislav Bláha, CSc., Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně, e-mail: opidum@volny.cz; lblaha@vurv.cz

