STANOVENÍ RYCHLOSTI KLÍČENÍ OBILEK JEČMENE

DORMANCE A KLÍČENÍ SEMEN

Termínem **klíčení** (obilek, semen) obilek rozumíme obnovení metabolické aktivity embrya (a také aleuronu v obilkách a některých semenech) vedoucí k prodlužování buněk radikuly za současného příjmu vody. Jde o termín používaný obecně v biologii (fyziologii) rostlin, v zemědělství (rostlinná výroba) a ve sladovnictví, přičemž jeho význam se pak nepatrně liší, podstatné však je, že toto období je ukončeno počátkem prodloužování buněk radikuly a hypokotylu embrya. Zahrnuje tedy příjem vody obilkou a procesy respirace, včetně syntézy bílkovin dle přítomných m-RNA. Následující životní děje jsou jsou pak procesy "**růstu klíční rostliny**", zahrnující využití zásobních látek (hydrolýzy polysacharidů aj.), dělení buněk a prodlužování buněk radikuly a hypokotylu aj. Klíčení obilek a semen (obecně embrya) je ovlivněno řadou faktorů. Rozhodujícím dějem, který ovlivňuje nástup klíčení populace obilek či semen je jejich dormance, resp. posklizňové dozrávání. **Dormance** semen často vnímaná jako "klid semen" je tedy definována jako neschopnost živých semen klíčit v příznivých fyzikálních či environmentálních podmínkách. Účelem této adaptace je zabránění klíčení semen v nevhodnou roční dobu, zpravidla před zimou. Rozlišuje se 5 tříd dormance semen:

- dormance fyziologická (izolace embryí či aplikace giberelinu neindukuje vždy klíčení)
- dormance morfologická (malá diferencovaná, avšak plně nevyvinutá embrya)
- dormance morfofyziologická (kombinace výše uvedených typů dormance)
- dormance fyzikální (nepropustnost testy pro vodu bez skarifikace)
- dormance kombinovaná

Rozlišujeme také dormanci semen primární a sekundární. Primární dormance je dána růstem, vývojem a zráním semen na mateřské rostlině, sekundární je dána sníženou citlivostí semen k vodě, taková semena pak musí projít druhým cyklem dormance (přechod nedormantních semen do dormantního stavu). Environmentální podmínky mohou dormanci zesilovat. Mluvíme pak např. o dormanci semen psychrolabilních druhů (kosatec, trávy, obilniny) u nichž je dormance zesílena vlivem chladného a vlhkého počasí v podmínkách příznivého podnebí.

DORMANCE A POSKLIZŇOVÉ DOZRÁVÁNÍ OBILEK

U některých druhů rostlin, jejichž semena neklíčí bezprostředně po odloučení od mateřských rostlin, mohou po jisté době proběhnout i v suchých semenech procesy,

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

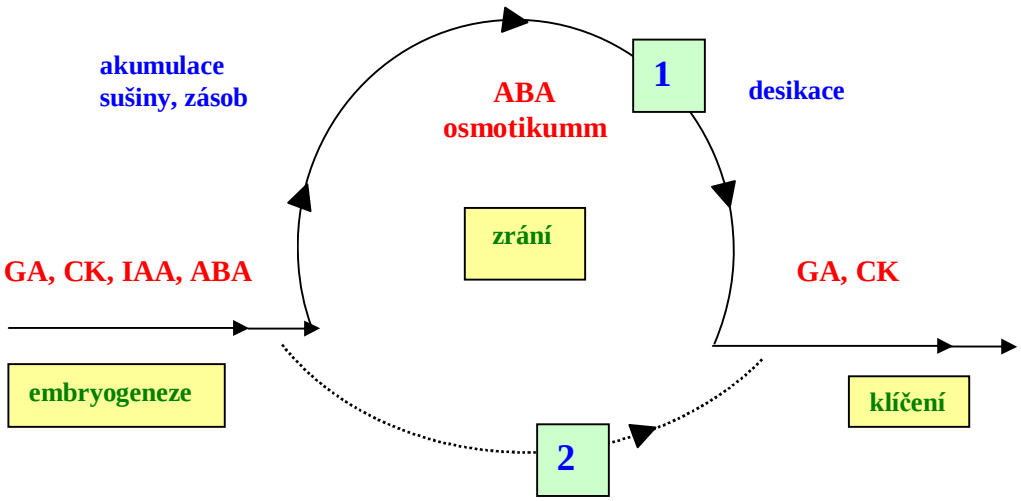
které umožní jejich normální klíčení. Tyto procesy charakterizují tzv. posklizňové dozrávání semen. **Posklizňové dozrávání obilek** je fyziologický proces podobný dormanci - v obilkách probíhají děje na molekulární úrovni, přičemž výsledkem jejich aktivity je eliminace (předčasného) klíčení. Posklizňové dozrávání semen (či obilek) i jejich klíčení je regulováno především fytohormony a řadou dalších vlivů.

Dormance (posklizňové dozrávání) obilek ječmene je odrůdovou vlastností a její hloubka je ovlivněna podmínkami prostředí, které převládaly mezi časem oplození a sklizňovou zralostí. Obecně se na počátku zrání semen na mateřských rostlinách zvyšuje obsah fytohormonů inhibiční povahy (ABA – abscisová kyselina nebo inhibičně působící IAA – indolyl-3-octová kyselina) a klesá obsah giberelinů.

HORMONÁLNÍ REGULACE DORMANCE OBILEK

Hormonální regulace dormance obilek ječmene jarního souvisí s etapami růstu a zrání embrya. V době, která následuje po oplození, je dělící se vaječná buňka bohatým zdrojem auxinu, který stimuluje růst embrya při současné tvorbě endospermu. Vyvíjející se obilka se tak stává silným sinkem a regulace jejího vývoje se promítá do interakcí řady fytohormonů. Ve stadiu počátku tvorby obilek je zvýšená aktivita cytokininů a ve fázi mléčné zralosti má obilka vysoký obsah vody. Na počátku tohoto období se hladina cytokininů a giberelinů snižuje, ale zvyšuje se obsah IAA. V období mléčné zralosti dosahuje svého maxima aktivita giberelinů. Vosková zralost je charakterizována zvýšením obsahu zásobního škrobu, poklesem obsahu vody, poklesem hladiny giberelinů a auxinů, ale i zvýšením aktivity přirozených inhibitorů, přecházejících do obilky ze stárnoucích listů. Současně však v této fázi dochází k vzestupu aktivity cytokininů, pravděpodobně v souvislosti s dělením buněk v aleuronové vrstvě. Nezastupitelnou roli má **abscisová kyselina** (ABA). Její začlenění do vývoje a zrání obilek je na obr. č. 1.

Obr. č. 1 Regulace embryogeneze, zrání a klíčení obilek fytohormony



1 normální proces průběhu zrání, následuje posklizňové dozrávání, dormance

2 předčasné klíčení (izolovaná embrya, ABA-deficitní mutanti - viviparní, ošetření inhibitory biosyntézy ABA – fluridon aj.)

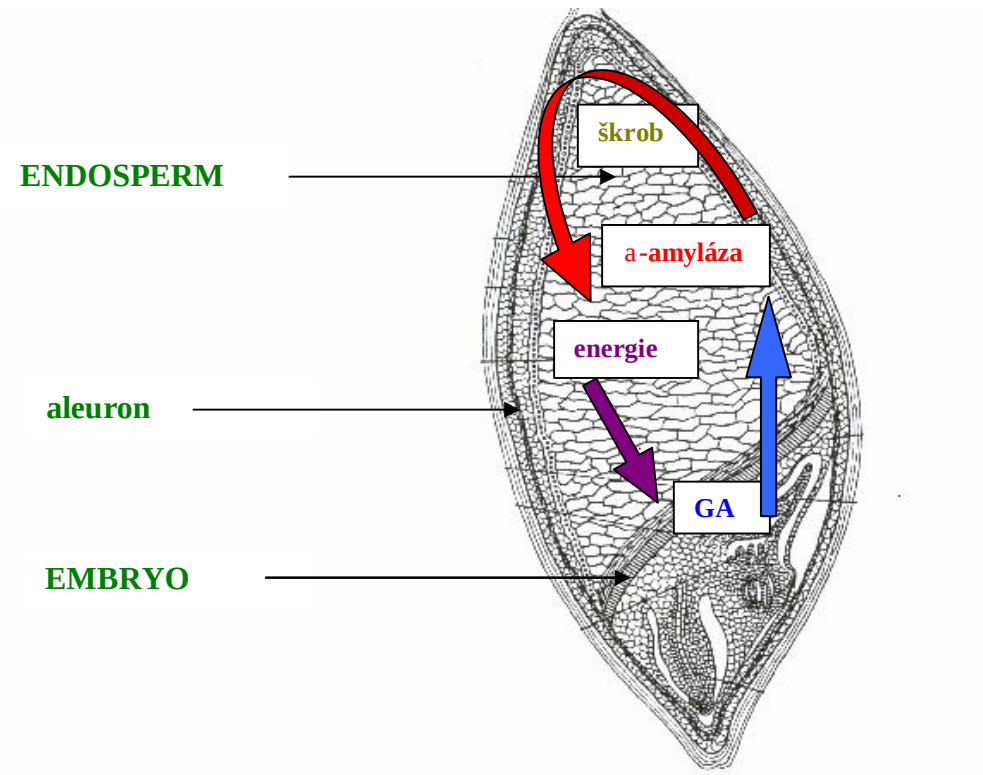
PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Klíčení obilek ječmene a stupeň jejich dormance nejsou bezprostředně kontrolovány jenom interakcí a poměrem hladiny ABA/GA, ale jinými fytohormony a efekty, které jsou časově a často i lokálně odděleny (ABA zodpovídá za vývoj embrya, GA mnohem později indukují tvorbu α-amylázy při klíčení). Navíc ABA inhibuje tvorbu α-amylázy při klíčení a oddaluje programovanou buněčnou smrt buněk aleuronu obilek z nichž vyrůstá klíční rostlina. Apoptóza aleuronu je indukována rovněž gibereliny. Na udržení dormance se podílejí také látky fenolické povahy, především v pluchách (obalových vrstvách obilky), prostřednictvím odčerpávání kyslíku při imbibici obilek.

KLÍČENÍ OBILEK JEČMENE

Klíčení ve fyziologickém pojetí začíná příjmem vody semenem a končí začátkem prodlužovacího růstu radikuly v embryu. V agronomickém pojetí je ovšem klíčení ztotožňováno s vynořením klíční rostliny nad povrch půdy. Příjem vody do obilek se odehrává na prosté fyzikální bázi, provázené zvýšením čerstvé hmotnosti. Procesy hydratace mají význam pro enzymatický aparát živých obilek. **Klíčení** je spojeno s hydratací proteinů, subcelulárními změnami, zvýšenou respirací a počátkem prodlužování buňek radikuly, případně hypokotylu. Signál pro mobilizaci zásob v semeni vychází z embrya a je giberelinové povahy. Embryo obilky ječmene uvolňuje gibereliny do aleuronové vrstvy endospermu, a ty aktivují geny pro syntézu hydrolytických enzymů, především α-amylázy štěpící škrob (viz obr. č. 2).

Obr. č. 2 Struktura obilky a regulační vlivy fytohormonů ve vztahu ke klíčení



PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

FAKTORY KLÍČENÍ SEMEN A OBILEK

Po ukončení dormance je klíčení semen či obilek závislé pouze na vnějších faktorech jako je dostatek vlhkosti (vody), příznivá teplota, dostupnost kyslíku a (ne)přítomnost světla (kladně a záporně fotoblastická semena).

Fyzikální stimulace klíčení semen se využívá pouze prostřednictvím odbourání endogenní dormance tyv. **stratifikací** (působení nízké teploty) a **skarifikací** (mechanické narušení testy). Laserové záření se už nepoužívá. K chemické stimulaci klíčení se používaly růstové regulátory, především gibereliny, cytokininy a syntetické látky CEPA (2-chloretylfosfonová kyselina – rostliny uvolňují z této látky etylen) a fluridon (inhibitor syntézy kyseliny abscisové). Přímá stimulace klíčení semen a obilek byla prokázána oxidem dusnatým (NO).

PŘEDSKLIZŇOVÉ KLÍČENÍ (PORŮSTÁNÍ) OBILEK

Porůstání obilek v klasech je předčasné klíčení na mateřské rostlině a je dáno souhrou nepříznivých klimatických podmínek, výživou, napadení patogeny a hormonální regulací během tvorby obilek v období před jejich plnou zralostí. Mezi fyziologické aspekty porůstání náleží hloubka dormance odrůdy v korelaci s endogenními inhibitory, odolnost obalových vrstev k penetraci kyslíku a absorpci vody a citlivost odrůdy ke giberelinu. Porůstání snižuje objemovou hmotnost obilek a jejich technologickou kvalitu a dochází k němu častěji ve vlhčí bramborářské oblasti. Vysoká hladina ABA v semenech eliminuje předčasné klíčení. Navzdory zvýšenému obsahu ABA během pozdních fází vývoje embrya a semene, zralé embryo obsahuje redukovaný obsah ABA (izolovaná embrya lépe klíčí – viz obr. č. 3). Předčasnému klíčení brání ABA a osmotický stres, stimuluje ho vyplavení inhibičních látek z obalových vrstev obilek při dlouhodobém deštivém počasí (viz obrázek č. 4). Efektivní možnost ke studiu klíčení umožňují **viviparní mutanti** (byly popsáni u kukuřice - absence karotenoidů - méně ABA) jež velmi často klíčí ještě na mateřské rostlině. Předčasné klíčení lze hodnotit pomocí tzv. provokačních testů, jejichž princip spočívá v máčení odstřižených klasů po dobu cca 3 dnů v lahvi s inkubačním médiem, každý den po určitý počet hodin. Po té se klasy udržují několik dní ve vlhku a sleduje se porůstání v procentech.

Obr. č. 3 – klíčení izolovaného embrya ječmene



Obr. č. 4 – porůstání obilek v intaktním klasu ječmene



PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

VÝZNAM REGULACE KLÍČENÍ OBILEK PRO SLADOVÁNÍ

Fyziologické studium těchto procesů má značný význam v technologiích skladování osiv (semenářství, šlechtitelství) či jejich využití pro potravinářskou výrobu (sladovnictví, lihovarnictví aj.) především z hlediska optimalizace klíčení. Biotechnologické nároky na technologii přípravy sladu vyžadují **vyrovnané** parametry **klíčení obilek** a proto je při studiu fytohormonální podstaty posklizňového dozrávání obilek ječmene věnována pozornost vzestupu aktivity nejenom ABA, ale také cytokininů a ostatních fytohormonů. Všechny fyziologické a biochemické změny při klíčení obilek i během vlastního sladování podléhají fytohormonální kontrole a to za veškerých změn vlastní technologie, avšak s ohledem na odrůdovou vhodnost (klíčení ve velmi úzkém časovém rozpětí).

Mluví se o tzv. **homogenitě klíčení** (jednotnosti), která byla vytvořena procesem šlechtění odrůd. To se odehrávalo dlouhodobě a především pro znaky spojené s odolností vůči chorobám, na výnos aj. Nevyrovnanost klíčení v období posklizňového dozrávání je tedy fenoménem geneticky fixovaným.

PARAMETRY PRO STANOVENÍ RYCHLOSTI KLÍČENÍ

Pro orientační stanovení klíčivosti postačuje stanovení kumulativní četnosti klíčení v procentech. Tento parametr má však větší výpovědní hodnotu po delší dobu sledování. Byla vypracována řada metod charakterizující úroveň poskliz-ňového dozrávání obilek ječmene pro sladovnické účely. Ty se pak používají ke sledování např. v třítýdenních intervalech během skladování vzorků a dle dosažených parametrů se vybírá nejvhodnější partie pro sladování. Testování se provádí na speciálních klíčidlech nebo na petriho miskách (v praxi vždy 4 x 100 obilek) . Za naklíčené se považují obilky u nichž radikula prorostla obalovými vrstavami obilky nebo se vyvinuly kořínky. Prorostla-li koleoptile není obilka považována za naklíčenou.

Energie klíčení je procento obilek vyklíčených po 72 hodinách.

$$\text{Energie klíčení} = \frac{n_{24} + n_{48} + n_{72}}{400} \cdot 100 \quad (\%)$$

kde „n“ jsou počty obilek vyklíčených v čase 24, 48 a 72 hodin

Index klíčení vychází z průměrného času klíčení MGT, maximální hodnota je 10.

$$\text{Index klíčení} = \frac{10}{MGT} \qquad MGT = \frac{n_{24} + 2\,n_{48} + 3\,n_{72}}{n_{24} + n_{48} + n_{72}}$$

kde „n“ jsou počty obilek vyklíčených v čase 24, 48 a 72 hodin

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Rychlost klíčení lépe charakterizuje procento vyklíčených obilek po 72 hodinách, zahrnuje parametr rychlosti.

$$\text{Rychlost klíčení} = \frac{5\,n_{24} + 3\,n_{48} + n_{72}}{5 \,.\, 4} \quad (\%)$$

Praktické provedení úlohy

1. Experimentální záměr a pokusné varianty

Po dobu třídenní inkubace bude sledováno klíčení intaktních obilek a izolovaných embryí dvou odrůd sladovnického ječmene (např. dormantní Philadephia a nedormantní Respekt) uložených ihned po sklizni do hlubokomrazícího boxu při -70°C. Za takového skladování se úroveň dormance udržuje po delší dobu. V časech 24, 48 a 72 hodin bude zaznamenáno klíčení obilek (a embryí) pro vyhodnocení výše uvedených tří parametrů a kumulativní četnosti klíčení. Rovněž budou v tyto časové intervaly odebrány vzorky pro stanlovení aktivity β-glukosidázy v jiné úloze.

2. Postup a provedení

Do petriho misek vložit 2 kolečka filtračního papíru (s šablonou pro vyložení 100 ks izolovaných embryí či 50 ks obilek), zvlhčite 4 ml destilované vody. Vypreparovat 100 ks embryí z mírně nabobtnalých obilek (cca 1 hodinu), vyložit, 100 ks obilek vyložit do 2 petriho misek. Misky přelepíme parafilmem (utěsnění horního krytu) a po dobu sledování inkubujeme v termostatu při 18 -20 °C. Vyklíčená embrya a obilky odebíráme jako vzorky pro stanovení aktivity β-glukosidázy (v této úloze je uvedený soupis vzorků) a misky opět pečlivě zapáskujeme parafilmem. Jedna pracovní skupina (4 studenti) zakládají a vyhodnocují 1 odrůdu, tedy 1 x 100 ks embryí + 2 x 50 ks obilek)

3. Hodnocení

Výsledky zaznamenat do tabulek a vypočítat příslušné parametry. Protokol vypracuje skupina 4 studentů, bude však uvedeno srovnání s výsledky jiné skupiny pro druhou odrůdu ječmene. (Poznámka: V případě zakládání pouze 100 ks embryí či obilek je nutné příslušné vzorce pro výpočty adekvátně upravit, tj. GE a RK).

Tabulka pro záznamy klíčení obilek a embryí

odrůda		opakování	počet vyklíčených obilek, embr			x	GE	GI	RK
			24 h	48 h	72 h				
	obilek	1							
		2							
		suma=x							
	embryí	1							
		2							
		suma=x							

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz