PRESLIA 1956
28: 1—22

Dagmar Dykyj-Sajfertová a Jaroslav Dykyj:

Vliv růstových stimulátorů na klíčení osiva při různém stupni ionisace.

Věnováno k šedesátinám akademika Silvestra Práta.

Přirozený heteroauxin i synthetické růstové stimulátory jsou s elektrochemického hlediska slabými kyselinami. V pokusech se používají nejčastěji čisté kyseliny, nebo jejich soli, méně často estery, amidy nebo v jiné elektroneutrální vazbě. V r. 1934 dokázal J. Bonner (7), že přirozený heteroauxin v rostlině je účinný jen v podobě celých, nedisociovaných molekul. Jeho inaktivace v rostlině předpokládá přechod v aldehydickou nebo jinou elektroneutrální vazbu (16). Podobně synthetické růstové stimulátory pronikají do rostlinného pletiva lépe a jsou fysiologicky účinnější ve formě neionisované. (D. M. Bonner, 5, Marmer 17, Thimann a Schneider 26, D. M. Bonner 6 a j.).

V praktických pokusech o zvýšení výnosu kulturních rostlin máčením semene v roztocích růstových stimulátoru se často zanedbávalo, v jaké formě se látka použila. Rozdíl v účinnosti disociované nebo nedisociované sloučeniny je velmi značný, proto i voda, v níž se stimulátor rozpouští, může jeho účinnost podstatně změnit (11). Tyto rozdíly se dají dobře pozorovat na klíčivosti stimulovaného osiva, jestliže použitá koncentrace působí již zřetelné zabrzdění klíčivé energie. Zpomalení klíčivých pochodů není ovšem specifickou reakcí, ale u růstových stimulátorů, na rozdíl od jiných sloučenin, je vyvoláno velmi nízkou koncentrací, která snižuje klíčivou energii narkotickým účinkem na dýchací procesy (13), zatím co v pozdějším vývoji rostliny působí již příznivě.

Klíčivá energie osiva, které nabotnalo ve vyšších koncentracích růstových stimulátorů, klesá úměrně se stoupající koncentrací i teplotou roztoku (12). Závislost klíčivé energie na koncentraci roztoku, zejména kyseliny α-naftyloctové, je tak pravidelná, že můžeme pokládat snížení klíčivé energie za biologický test účinnosti růstového stimulátoru. Tato práce sleduje kvantitativně závislost účinnosti stimulátoru v klíčících semenech na stupni jeho disociace v roztoku. Jako míru účinnosti uvádíme buď přímo klíčivou energii semene (graficky) nebo z ní vypočtenou střední dobu klíčivosti M, t. j. aritmetický průměr hodin, za které vyklíčí všechny obilky celého souboru. Výpočet hodnoty M uvádíme ve starší práci (12).

1. Orientační pokusy

Z běžně užívaných růstových stimulátorů je nejstálejší kyselina α-naftyloctová. Její roztoky se dají snadno připravit ve vroucí vodě, takže odpadá obvyklé rozpouštění v etanolu a roztoky nemění po dlouhou dobu účinnost. Pro naše pokusy byla tato látka výhodná též proto, že snižuje energii klíčivou

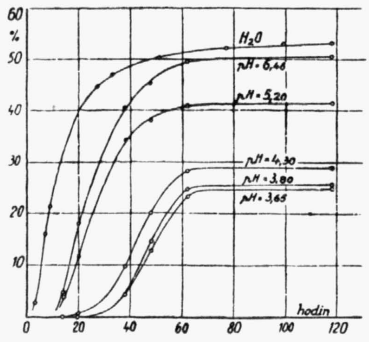
pravidelněji než heteroauxin, který je rostlinnou buňkou poměrně rychle metabolován.

Neutralisujeme-li kyselinu α-naftyloctovou louhem, klesá její účinnost a klíčivá energie stimulovaného osiva se zvyšuje:

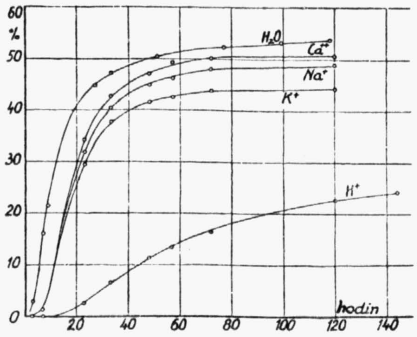
Pokus 1. Roztok, obsahující $1{,}5 \times 10^{-3}$ molů kyseliny α-naftyloctové v litru vody (redest.) byl neutralisován roztokem KOH na různou hodnotou pH. V roztocích botnala 24 hod. jarní pšenice orig. odrůda Huronka. Každý pokus opakován 10krát po 50 obilkách, převrstvených 50 ccm roztoku. Po nabotnání při t = 20° byly obilky opláchnuty destil. vodou a rozloženy do Petriho misek na vlhký filtrační papír, vypraný v destil. vodě. Klíčily v thermostatu potmě při t = 24°. Koncentrace vodíkových iontů měřena skelnou elektrodou (Beckmannův pH-metr).

Na diagramu 1 jsou zakresleny křivky klíčivosti. Se stoupající neutralitou resp. alkalitou roztoku vzrůstá klíčivá energie i klíčivost semene, t. j. účinnost růstového stimulátoru klesá. Roztok o pH 3,8, kde počet nedisociovaných molekul se příliš nelišil od čisté kyseliny, (pH = 3,65), působil přibližně stejně jako kyselina.

Roztoky kyseliny α-naftyloctové, neutralisované částečně KOH, obsahují celkem 4 látky v roztoku: 1. nedisociované molekuly kyseliny α-naftyloctové, 2. anionty α-naftylacetátové, 3. ionty vodíkové, vzniklé disociací kyseliny a 4. kationty draslíku. Protože klíčení je souborem reakcí neobyčejně citlivých na každou změnu vnějšího prostředí, je nutno odlišit vlastní brzdící vliv růstového stimulátoru od účinku iontů K^+ a H^+.



Diagr. 1.



Diagr. 2.

Diagr. 1. Klíčivost pšeničných obilek, nabotnalých v roztocích kyseliny α-naftyloctové ($1{,}5 \times 10^{-3}$ molů v litru) o různé koncentraci vodíkových iontů. Se stoupající alkalitou roztoku klesá jeho účinnost a proto vzrůstá i klíčivost pšenice.

Diagr. 2. Klíčivost pšenice po nabotnání v roztoku kyseliny α-naftyloctové ($1{,}5 \times 10^{-3}$ molů v litru) (H^+) a v roztoku její draselné (K^+), sodné (Na^+) a vápenaté (Ca^{++}) soli. Soli jsou mnohem méně účinné než kyselina.

Vliv K^+ iontu můžeme isolovati:

a) srovnáním účinnosti draselné soli kyseliny α-naftyloctové s jinými jejími solemi (pokus 2).

b) Přidáním různých neutrálních solí draselných do roztoků čisté kyseliny α-naftyloctové tak, aby roztok obsahoval stejné množství draslíku, jako α-naftyloctan draselný (pokus 3).

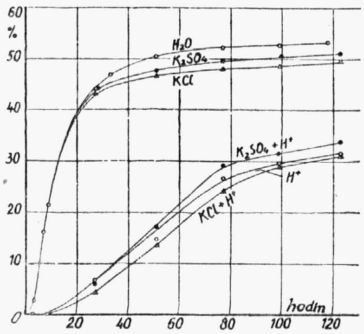
Pokus 2. Roztok, obsahující $1{,}5 \times 10^{-3}$ molů kyseliny α-naftyloctové v litru, byl neutralisován ekvivalentním množstvím KOH, NaOH a $Ca(OH)_2$. Pšenice botnala v těchto roztocích a klíčila za stejných podmínek jako v předcházejícím pokuse.

Na diagramu 2 je vidět, že kyselina je daleko účinnější než všechny její soli. Malé rozdíly u jednotlivých solí neleží v mezích pracovních chyb, pravděpodobně se tu uplatňuje specifický vliv jednotlivých kationtů na protoplasmatické koloidy klíčícího embrya.

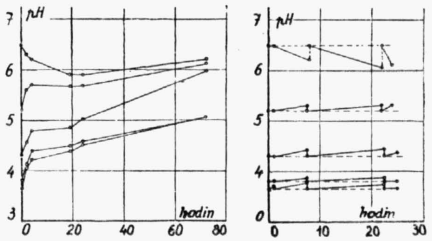
Pokus 3. K roztoku kyseliny α-naftyloctové ($1{,}5 \times 10^{-3}$ molů v litru) bylo přidáno ekvivalentní množství chloridu nebo síranu draselného. Jako kontroly bylo použito destilované vody nebo roztoků chloridu a síranu draselného, obsahujících v 1 litru $1{,}5 \times 10^{-3}$ ekvivalentů solí. Ostatní podmínky pokusu byly stejné.

Také v tomto pokuse snižovala kyselina α-naftyloctová klíčivou energii mnohem více než obě draselné soli. Směsi solí s kyselinou α-naftyloctovou brzdily klíčení téměř stejně jako roztok čisté kyseliny. Ačkoliv nelze popírat vliv solí, zejména kationtů, na účinnost růstových stimulátorů v koloidní struktuře protoplasmy (Wuhrmann, Borris aj.), můžeme je v tomto případě, ve srovnání s účinkem stimulátorů, zanedbati. Srovnáme-li křivky klíčivé energie z naftyloctanu draselného (diagr. 2) s křivkami, které příslušejí roztokům KCl a K_2SO_4 (diagr. 3), je vidět, že brzdivě působí pouze ionty naftylacetátové. Jejich účinek je však mnohem menší než účinek kyselých roztoků, které obsahují celé nedisociované molekuly kyseliny α-naftyloctové.

Zbývá tedy ještě eliminovat současný účinek iontů vodíkových.



Diagr. 3.



Diagr. 4a, b.

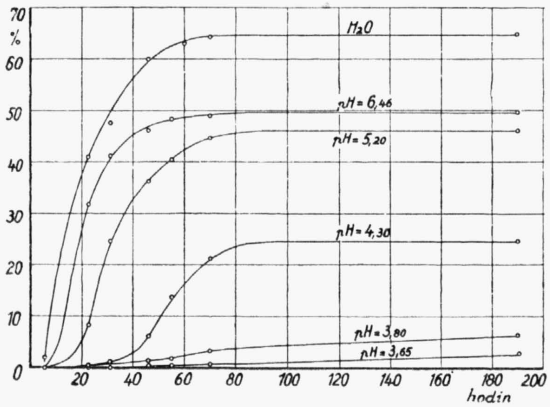
Diagr. 3. Klíčivost pšenice po nabotnání v roztocích kyseliny α-naftyloctové ($1{,}5 \times 10^{-3}$ molů v litru) (H^+) a v těchže roztocích s přídavkem ekvivalentního množství KCl resp. K_2SO_4. Čisté draselné soli bez stimulátoru jsou téměř neúčinné.

Diagr. 4. Změna hodnoty pH během botnání obilek pšenice v roztoku kyseliny α-naftyloctové, neutralisovaném do různého stupně. a) v roztoku nevyměňovaném, b) v roztoku, který byl za 24 hodin třikrát vyměněn.

2. Změny koncentrace vodíkových iontů během botnání

Botná-li semeno v menším množství stimulačního roztoku, mění se značně koncentrace vodíkových iontů vylučovanými látkami ze semene a selektivní absorpcí. Regulační kapacita roztoků kyseliny α-naftyloctové při tak nízkých

koncentracích je nepatrná. Přesvědčili jsme se měřením posunu hodnot pH během botnání semene. V roztocích, neutralisovaných do různého stupně hydroxydem draselným, se hodnota pH během botnání semene značně posunovala k neutrálnímu bodu. Podmínky pokusu byly stejné, jako v pokuse 1. Naměřené hodnoty jsou průměrem tří opakování. V paralelních pokusech byly změny hodnoty pH roztoku dobře reprodukovatelné. Výsledky jsou na diagramu 4a.



Diagr. 5. Křivky klíčivosti pšenice po nabotnání v roztocích kyseliny α-naftyloctové ($1{,}5 \times 10^{-3}$ molů v litru) zalkalisovaných na různou hodnotu pH. Roztoky byly během botnání za 24 hodin čtyřikrát vyměněny. Srov. diagr. 1.

Chceme-li sledovat vliv koncentrace vodíkových iontů, je nutné, aby se hodnota pH roztoku během botnání neměnila. Při malé regulační schopnosti roztoku je možno udržeti hodnotu pH stálou buď použitím obrovského nadbytku roztoku nebo jeho častou výměnou. Příklad, jak se posunuje pH při vyměňovaných roztocích na botnajících obilkách, ukazuje diagram 4b. Měření jsme prováděli tak, že po určitých časových intervalech byl roztok s obilek odlit, v něm změřena koncentrace H^+ iontů a na obilky byl nalit roztok čerstvý. Výměnou roztoků během botnání obilek se podařilo udržet pH roztoků mnohem blíže původní hodnotě. Proto při vyměňovaných roztocích jsou rozdíly v účinnosti roztoků kyseliny α-naftyloctové při různém stupni neutralisace mnohem zřetelnější, než u roztoků nevyměňovaných. Dobře je to vidět při srovnání křivek na diagr. 1 a 5.

Zkoušeli jsme též udržet nezměněnou hodnotu pH stimulačního roztoku během botnání pomocí různých regulátorů (ústojů). Museli jsme však upustit od těchto pokusů, protože koncentrovanější regulátory, na př. Sörensenovy fosfátové, působí již samy na klíčení celkovou koncentrací solí. A regulační kapacita zředěných ústojů je příliš malá. V rozmezí hodnot pH = 3 až 8 vykazovaly největší regulační kapacitu roztoky McIlwaineovy (10) obsahující kyselinu citronovou a sekundární fosforečnan sodný. Ale i v roztocích 10krát zředěných bylo klíčení v kyselé oblasti zabrzděno, v alkalické zrychleno. Brzdící účinek kyseliny citronové v kyselém regulátoru (pH = 3) se projevil ještě při zředění 20násobném. V podstatě, použijeme-li jakéhokoliv regulačního roztoku, komplikuje se otázka permeabilitou a účinkem slabých kyselin,

jejichž specifický vliv na růst klíčků pšenice vykládá na př. E. G a l (14) tím, že mnohé z nich (citronová, mléčná a j.) jsou důležitým substrátem enzymů jmenovitě dehydrogenáz. V jeho pokusech teprve koncentrace 1 : 10 000 neměnily rychlost růstu klíčků pšenice.

Omezili jsme se proto při všech dalších pokusech na pouhou výměnu roztoků při botnání. Klíčení nebylo takto rušeno nijakým specifickým vlivem jiných látek než zkoušených stimulátorů. Tam, kde bylo třeba upravit pH roztoku na přesnou hodnotu, používali jsme jen zředěných kyselin minerálních, resp. zásad, které sice nemají regulační schopnosti, ale vlivem silné disociace pronikají do rostlinného pletiva daleko hůře než slabé kyseliny ústojů. Pracovali jsme nadále tak, že vždy celý pokusný soubor 500 obilek byl převrstven 250 ccm roztoku, který byl vyměňován 5krát za den. Přes noc se roztoky nevyměňovaly, ale jak ukázala měření, podařilo se i takto udržet pH roztoku dostatečně konstantní. Obilky botnaly i klíčily v thetmostatu za stálé teploty a také reservní roztoky pro výměnu byly zde temperovány.

Při vyměňovaných roztocích (diagr. 5) je nápadné, že klíčivá energie obilek kontrolních (z destilované vody) je lepší než z destilované vody nevyměňované (diagr. 1). Snad zde působí jedovaté zplodiny intramolekulárního dýchání, které se hromadí v nevyměňované vodě za dobu 24 hod. Nebo též při výměně vody se z prostředí odstraňují vyluhované látky z oplodí typu blastokolinů, které brzdí klíčení.

3. Vliv koncentrace vodíkových iontů v roztoku na klíčení pšenice

Roztok kyseliny α-naftyloctové o koncentraci 1×10^{-3} molů v litru má hodnotu pH (podle obsahu CO_2 v roztoku) asi 3,75, t. j. obsahuje $1{,}8 \times 10^{-4}$ ekvivalentů vodíkových iontů. Kdyby v rozmezí zkoušených koncentrací růstových stimulátorů působila na klíčivost pouhá změna koncentrace vodíkových iontů, bylo by nutno srovnávat účinek kyseliny α-naftyloctové s kontrolou, okyselenou na stejnou hodnotu pH. Zkoušeli jsme proto vliv různých silných i slabých kyselin o stejném pH jaké měl roztok, obsahující 1×10^{-3} molů kyseliny α-naftyloctové v litru. Údajů z literatury, o účinku vodíkových iontů na klíčení pšenice, na př. výsledků v pokusech A i c h e l e h o (1) jsme nemohli pro naši práci použít, jelikož jeho pokusné podmínky i zkoušené koncentrace byly jiné.

P o k u s 4. Jarní pšenice orig. odrůdy Vesna nabotnala v těchto roztocích:

kyselina	koncentrace	pH
H_2SO_4	$0{,}1 \times 10^{-3}$ molů	3,75
HCl	$0{,}19 \times 10^{-3}$ molů	3,72
vinná	$0{,}81 \times 10^{-3}$ molů	3,70
octová	$2{,}80 \times 10^{-3}$ molů	3,70
α-naftyloctová	$1{,}0 \times 10^{-3}$ molů	3,72

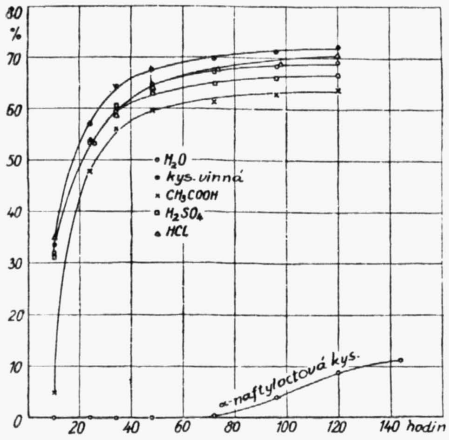
Každý pokus byl opakován v 10 paralelkách po 50 obilkách. Teplota při botnání i klíčení v thermostatu 22,5°, roztoky během botnání byly vyměňovány. Po 24 hodinách byly obilky opláchnuty destilovanou vodou a uloženy do Petriho misek na vlhký filtrační papír.

Z výsledků pokusů je viděti (diagr. 6), že ani jeden roztok kyselin, silných ani slabých, které nejsou růstově aktivní, nepůsobil na klíčení, ačkoliv jejich koncentrace vodíkových iontů byla stejná jako u roztoků kyseliny α-naftyloctové. Zpomalení klíčivé energie v mezích daných koncentrací je tedy způso-

beno pouze růstovým stimulátorem. Od kontroly s destilovanou vodou se nejvíce liší kyselina octová a vinná. Odchylné chování těchto dvou kyselin souvisí nejen s větší permeabilitou málo disociovaných molekul, ale pravděpodobně též se specifickým vlivem aniontu. Růstové stimulátory jsou vesměs deriváty kyseliny octové a jejích homologů. Diagr. 6 a pozdější pokusy (tab. 7). ukazují, že pouhá kyselina octová, propionová a máselná nepůsobí v tak nízkých koncentracích na klíčení, tak jako jejich růstově aktivní deriváty. Při tom jak energie klíčení, tak další vývoj klíčku je u růstových stimulátorů zcela odchylný (obr. 4).

4. Permeabilita pšeničných obilek pro kyselinu α-naftyloctovou

Předcházející pokusy jednoznačně potvrdily, že snížení klíčivé energie v mezích dané koncentrace působí pouze růstově aktivní kyselina α-naftyloctová, nikoliv její vodíkový ion. Protože účinnost této sloučeniny stoupá se stoupající kyselostí, můžeme předpokládat, že do obilky pronikají snadněji nedisociované molekuly než ionty. Pro účinnost stimulátoru uvnitř pletiva obilky je ovšem lhostejné, zda se tam dostane v podobě celých molekul nebo iontů, neboť poměr mezi molekulami a ionty se v živém pletivu ustálí podle pH vnitřního prostředí, které má velkou regulační kapacitu.



Diagr. 6. Křivky klíčivosti pšenice, nabotnalé v milimolárních roztocích kyseliny α-naftyloctové a jiných silných a slabých kyselin o stejné hodnotě pH. Brzdivě působí pouze stimulátor.

Účinnost celých molekul je tedy především otázkou permeability. Ionty α-naftylacetátové s elektrickým nábojem jsou ve vodných roztocích silněji hydratovány než celá elektroneutrální molekula. Představují tedy ve vodných roztocích větší částice, které hůře prostupují do živé buňky. O rozdílu v hydrataci celé molekuly kyseliny a jejího aniontu svědčí též velký rozdíl v rozpustnosti kyseliny a soli: kyselina α-naftyloctová je ve vodě velmi málo rozpustná, kdežto její soli (s výjimkou soli vápenaté) se rozpouštějí neobyčejně dobře.

Fysiologický účinek molekul a iontů nesouvisí ovšem jen s jejich prostupností do živého pletiva, ale s dalším jejich osudem v protoplasmatických struk-

turách. Nízká hydratace a ionisace celých molekul podmiňuje, že se chovají jako látky hydrofobnější a hromadí se v lipidní fázi živé hmoty, v protoplasmatických blanách, v kutikule, v plastidech, atd. O tom podrobněji v části diskusní.

Pro stanovení prostupnosti kyseliny α-naftyloctové do rostlinné buňky nemáme přímé analytické metody. Abychom vyloučili vliv polopropustné testy pšeničných obilek, provedli jsme některé další pokusy jednak na obilkách s odříznutou spodní částí, jednak na semenech jiných druhů, které nemají polopropustnou testu, nebo na oloupaných semenech slunečnice.

Pokus 5. Klíčení obilek s amputovanou basální částí. Na obilkách jarní pšenice orig. odrůdy Dobrovická byla žiletkou odříznuta spodní část a obilky namočeny do roztoku kyseliny α-naftyloctové ($1{,}0 \times 10^{-3}$ molů v litru) a její sodné soli téže koncentrace. Kontrolní amputované obilky botnaly v destilované vodě, pokusy provedeny ve třech opakováních po 100 obilkách, roztoky během máčení vyměňovány, teplota při botnání i klíčení 20°.

V tabulce 1 jsou uvedena procenta vyklíčelých amputovaných obilek v jednotlivých časových intervalech. Je dobře zřetelná vyšší účinnost kyseliny než její sodné soli. (Viz též obr. 3.)

Tabulka 1

Klíčení amputovaných pšeničných obilek v milimolárním roztoku kyseliny α-naftyloctové a její sodné soli

Čas v hodinách od nabotnání	Počet vyklíčelých obilek v %		
	kontrola (voda)	naftyloctan sodný	kyselina α-naftyloctová
5,9	64,4	0	0
20,0	97,8	65,9	0
31,1	98,4	92,5	9,5
45,0	99,0	95,7	31,7
70,2	99,0	96,4	55,6
94,0	99,4	97,4	74,6
116,5	99,4	97,7	81,3
142	—	97,7	87,3
165	—	—	91,1
189	—	—	93,7

Pokus 6. Loupaná semena slunečnice. Stejně jako v předcházejícím pokuse byla v roztocích kyseliny α-naftyloctové a její sodné soli namočena oloupaná semena slunečnice, která pocházela všechna z jednoho úboru sklizně z předchozího roku. Každý pokus opakován 3krát po 100 semenech.

U semen slunečnice s odstraněnou slupkou nebylo spolehlivého kriteria počátku klíčení. Primární zvětšení embrya a děloh po nabotnání bylo u kontrol i pokusných semen stejné a makroskopicky se nedalo odlišit od počínajícího růstu, který jest vnějším znakem klíčení. Proto jsme pokládali za vyklíčelá ta semena, kde primární kořínek se prodloužil o více než dva milimetry. Z průměrné doby klíčivosti (tabulka 2) je vidět rozdíl mezi kyselinou a solí. Protože klíčivá energie tohoto semene byla neobyčejně vysoká a kriterium

klíčení dosti nezřetelné, vystoupily jasnější rozdíly mezi účinkem kyseliny a její soli až u starších klíčků. Na obr. 1A jsou klíčky staré 76 hod. (počítáno od vyjmutí semene z roztoku).

Tabulka 2

Průměrná doba klíčivosti bobu, ředkvičky a loupaných semen slunečnice po nabotnání v milimolárním roztoku kyseliny α-naftyloctové a její sodné soli

	Průměrná doba klíčivosti (v hodinách)		
	kontrola	naftyloctan sodný	kyselina α-naftyloctová
Vicia faba	28,4	48,1	43,5
Raphanus sativus	32,3	46,8	52,3
Helianthus annuus	15,0	17,3	27,1

Pokus 7. Klíčení Vicia faba a Raphanu sativus. Semeno ředkvičky v pěti paralelních pokusech po 100 semenech nabotnalo v roztoku kyseliny α-naftyloctové a její sodné soli (koncentrace stejné jako v předchozích pokusech). Podobně byla namočena semena bobu ve třech opakováních po 50 semenech. Ostatní podmínky pokusu stejné jako dříve.

V tabulce 2 jsou průměrné doby klíčivosti semen obou rostlin. Semena bobu se chovají odchylně, v rychlosti klíčení není zřetelný rozdíl mezi účinností kyseliny a soli. Teprve u starších klíčků je zřetelný silnější vliv kyseliny než její soli. (Obr. 1B). Je tu nápadnější morfogenní účinek růstového stimulátoru, mesokotyl a primární kořínek jsou vlivem kyseliny silněji zduřelé a růst je silněji zabrzděn. Rozdíly v průměrné době klíčivosti u ředkvičky souhlasí s ostatními výsledky.

Z výsledků všech těchto pokusů můžeme soudit, že permeabilita testy semenné nerozhoduje a že tedy účinnost růstového stimulátoru je dána množstvím nedisociovaných molekul v roztoku.

5. Pokusy s amidem kyseliny α-naftyloctové

Další důkaz o rozdílu v účinnosti molekul a iontů růstového stimulátoru může podat růstově aktivní sloučenina, která ve vodných roztocích nedisociuje. Její účinnost není závislá na změně koncentrace vodíkových iontů. K tomu se dobře hodí amid kyseliny α-naftyloctové.

O růstově aktivní povaze této sloučeniny podal nejprve důkaz Mitchell a Stewart (18). V jejich pokusech byla účinnost amidu ve srovnání s kyselinou velmi nízká. Také v našich pokusech na pšenici byla klíčivá energie v roztoku amidu mnohem více snížena než v ekvimolárních roztocích kyseliny α-naftyloctové. Ze zkoušených různých druhů: žito, ječmen, oves, boby, slunečnice, zelí, ředkvička byla klíčivá energie zřetelněji zabrzděna pouze u semene zelí milimolárním roztokem amidu. Malá účinnost této látky může být způsobena buď tím, že nesnadno proniká, nebo že v živé buňce působí specificky pouze kyselina, v kterou musí rostlinné pletivo tento amid nejprve zmýdelnit. Odchylná citlivost u semene zelí v našich pokusech připouští oba výklady.

Všechny práce, které se zabývají vztahem mezi strukturou molekuly a fysiologickou aktivitou, zejména četné práce H. Weldstry a spolupracovníků (viz v diskusní části), zdůrazňují velký význam polarity karboxylové skupiny. Je proto pravděpodobnější druhý výklad.

Před vlastními pokusy s amidem kyseliny α-naftyloctové jsme nejprve zkoušeli chemické vlastnosti jeho vodného roztoku. Protože amidy se ve vodných roztocích zmýdelňují v kyselinu a amoniak, můžeme stupeň zmýdelnění sledovat měřením změn elektrické vodivosti. Vodivost nasyceného vodného roztoku amidu za laboratorní teploty se prakticky neměnila po 24 hodinách, ani po 2hodinovém varu. Roztoky amidu, který je ve vodě málo rozpustný, lze proto připravit, podobně jako roztoky kyseliny, z vroucí vody. Na světle po delší době vodné roztoky tohoto amidu, podobně jako acetamidu (Volman 29), zejména v kyselém prostředí, žloutnou. Avšak ani v prostředí kyselém (pH = 3) ani v alkalickém (pH = 9,5) za obyčejné teploty se roztok nezmýdelnil (negativní reakce s Nesslerovým činidlem). Teprve po povaření alkalického roztoku amidu je reakce s Nesslerovým činidlem positivní.

Pro naše pokusy bylo rozhodující, že za obyčejné teploty se vodný roztok amidu ani za reakce kyselé, ani zásadité, nerozkládal. Nevznikala tedy v jeho roztocích kyselina, která by mohla skreslit účinnost roztoku.

Pokus 8. Milimolární roztok amidu kyseliny α-naftyloctové jsme okyselili kyselinou sírovou, resp. zalkalisovali NaOH na hodnotu pH = 3,0 a 10, 1. Kontrolami byly jednak destilovaná voda, jednak roztok kyseliny sírové resp. NaOH o stejné hodnotě pH jako roztoky amidu, jednak roztok amidu neupravený. V každém z těchto roztoků botnalo:

a) semeno zelí v 10 opakováních po 50 semenech.

b) pšeničné obilky (odrůda Dobrovická jarní) s odříznutou spodní částí ve 4 opakováních po 50 obilkách.

Botnání i klíčení probíhalo za tmy v thermostatu při 20°. Roztoky vyměňovány. Klíčení v Petriho miskách ze stejných podmínek jako v předchozích pokusech.

Tabulka 3

Délka primárního kořínku (v mm) zelí po nabotnání v milimolárním roztoku amidu při různé hodnotě pH roztoku

Čas v hodinách od nabotnání	Vodní kontrola				Amid kys. α-naftyloctové			
	pH	3,0	5,4	10,35	pH	3,0	5,4	10,35
50,5		10	16	17		2	2	2
67,5		20	25	26		3	3	3
91,5		45	50	60		4	5	3

U semene zelí se nedal počátek klíčení dobře zachytit. V okyselených roztocích botnalo semeno tak silně, že slupky popraskaly ještě před počátkem růstu embrya. Účinnost roztoků jsme proto sledovali na délce primárního kořínku klíčících rostlinek. (Tabulka 3.) Na obr. 2 je vidět, že vývoj kořínku byl zabrzděn stejně v kyselém i alkalickém roztoku amidu. Pro srovnání jsou uvedeny klíční rostlinky z kyseliny α-naftyloctové a její soli, okyselené

a zalkalisované na stejnou hodnotu pH, jako roztoky amidu. Zde je vidět velký rozdíl v účinnosti. Stejně se chovaly obilky pšenice s odříznutou spodní částí (obr. 3). Také průměrná doba klíčivosti obilek pšenice byla u roztoků amidu téměř nezávislá na hodnotě pH (tab. 4).

Nedisociovaná forma růstově aktivní sloučeniny, t. j. amid kyseliny α-naftyloctové, působí tedy na klíčení v roztocích kyselých i alkalických téměř stejně. Pokusy s touto sloučeninou vyžadují však ještě dalšího rozšíření, zejména rozdílná citlivost různých semen zasluhuje větší pozornosti. Není vyloučena souvislost s obsahem enzymů, které by mohly amid hydrolysovat.

Tabulka 4

Průměrná doba klíčivosti amputovaných obilek pšenice, nabotnalých v roztoku amidu kyseliny α-naftyloctové při různé hodnotě pH roztoku

pH roztok	Průměrná doba klíčivosti obilek po nabotnání	
	ve vodě	v milimolárním roztoku amidu kyseliny α-naftyloctové
3,0	4,1	7,5
5,4	3,9	8,5
10,35	3,8	6,1

6. Kvantitativní srovnání účinku molekul a aniontů kyseliny α-naftyloctové

Pro kvantitativní srovnání účinnosti aniontu s nedisociovanou molekulou bylo nutno stanovit dissociační konstantu kyseliny α-naftyloctové, která v dostupné literatuře v době pokusů nebyla nalezena.

Kyselina α-naftyloctová (dvakrát překrystalovaný Merckův preparát) byla rozpuštěna v CO_2 prosté destil. vodě a roztok neutralisován na 50% roztokem KOH, prostým karbonátu. Byly připraveny celkem tři roztoky, obsahující 4×10^{-3}, 2×10^{-3} a $0{,}8 \times 10^{-3}$ molů kyseliny α-naftyloctové v litru. Koncentrace H^+ iontů v těchto roztocích byla měřena skelnou elektrodou při 20°.

Disociační konstanta byla vypočtena ze známých rovnic s ohledem na disociaci vody. Výpočtem jsme nalezli pro 4 a 2-milimolární roztok pK = 4,21, pro 0,8-milimolární pK = 4,25. Protože velmi zředěné roztoky dávají vždy méně spolehlivé výsledky, počítáme všude s hodnotou pK = 4,21. Disociační konstanta kyseliny α-naftyloctové je tedy $6{,}2 \times 10^{-5}$ (při 20°).

Ze známé disociační konstanty jsme mohli vypočítat takovou kyselost a alkalitu roztoků, kdy v roztoku bylo buď 88,8 % celých nedisociovaných molekul kyseliny α-naftyloctové (pH = 3,30), nebo méně než 0,01 % nedisociovaných molekul (pH = 8,50). Kyselejší roztok o větším počtu celých molekul jsme nemohli použít, protože při nižším pH působí již zřetelně na klíčení sám ion vodíkový.

Pokus 9. Klíčení pšenice v alkalisovaných roztocích. Protože sůl kyseliny α-naftyloctové snižuje klíčivou energii relativně málo, volili jsme koncentrace roztoků od 0,5 do 20 milimolů v litru. Do roztoku jsme přidali tolik NaOH, aby hodnota pH

byla 8,50. Kontrolou byla jednak destilovaná voda normální, jednak zalkalisovaná na stejnou hodnotu pH jako roztoky stimulátoru. V těchto roztocích nabotnaly obilky jarní pšenice (téže odrůdy i sklizně jako v předchozích pokusech). V deseti opakováních po 50 obilkách. Roztoky se vyměňovaly asi po dvou hodinách, jejich regulační kapacita byla poměrně slabá. V různě koncentrovaných roztocích klesla hodnota pH po dvouhodinovém botnání na 7,20 až 6,90. Tím se přechodně zvýšil obsah nedisociovaných molekul z 0,01 % až na 0,25 %. Po 24hodinovém botnání při 20° byly obilky opláchnuty destilovanou vodou a uloženy do Petriho misek ke klíčení za konstantních podmínek v thermostatu (20°).

Na diagr. 7 je zakreslena průměrná doba klíčivosti různě koncentrovaných alkalických roztoků. Nulová hodnota znamená průměrnou dobu klíčivosti kontroly (z vody alkalisované na pH = 8,50). Střední doba klíčivosti se nejprve prodlužuje úměrně se stoupající koncentrací stimulátoru až asi do obsahu 2 milimolů v litru. Při vyšších koncentracích se přírůstky zabrzdění zmenšují. Číselné hodnoty střední doby klíčivosti jsou v tab. 5.

Tabulka 5

Průměrná doba klíčivosti pšenice, nabotnalé v různě koncentrovaných okyselených a alkalisovaných roztocích kyseliny α-naftyloctové

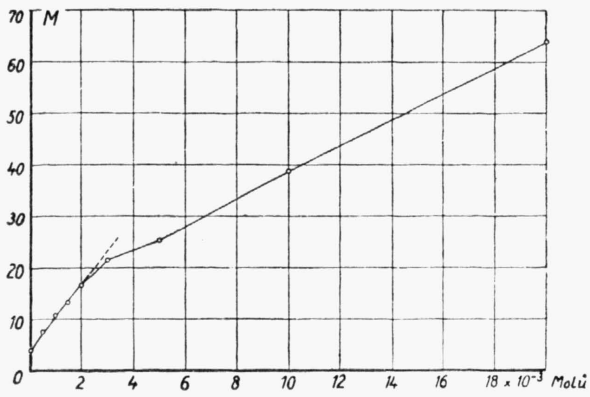
Milimolů kyseliny α-naftyloctové v 1 litru	Průměrná doba klíčivosti v roztocích	
	alkalisovamých (pH = 7)	okyselených (pH = 3,4)
0 (vodní kontrola)	4,0	8,0
0,1	—	16,0
0,3	—	30,2
0,5	7,5	47,1
0,75	—	64,3
1,0	10,8	83,5
1,5	13,2	—
2,0	16,6	—
3,0	21,5	—
5,0	25,3	—
10,0	38,7	—
20,0	64,0	—

Pokus. 10. Klíčení v okyselených roztocích. Roztoky kyseliny α-naftyloctové byly okyseleny kyselinou sírovou na pH = 3,3. Protože kyselé roztoky jsou mnohem účinnější, volili jsme koncentrace od 0,1 do 1,0 milimolů v litru. Regulační kapacita kyselých roztoků byla poněkud větší než u roztoků alkalických, po dvouhodinovém botnání obilek se roztoky alkalisovaly průměrně na pH = 3,4, t. j. počet nedisociovaných molekul kyseliny klesl z 88,8 % na 86 %.

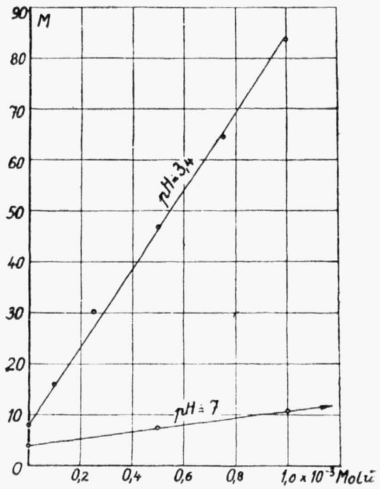
Průměrné doby klíčivosti, uvedené v tab. 5., jsou zakresleny v diagramu 8. Pro srovnání je v tomtéž diagramu zakreslena také průměrná doba klíčivosti v alkalických roztocích při nízké koncentraci. V kyselých roztocích stoupá průměrná doba klíčivosti s koncentrací kyseliny α-naftyloctové také lineárně, ale daleko prudčeji. Výsledky potvrzují lineární vztah mezi koncentrací stimulátoru v roztoku a jeho účinností, vyjádřenou průměrnou dobou klíčivosti.

Nyní můžeme srovnat kvantitativní rozdíl mezi účinností celých molekul a aniontů kyseliny α-naftyloctové. Střední doba klíčivosti v milimolárním roztoku alkalickém je 10,8 hodin (tabulka 5), v alkalické vodní kontrole 4,0 hodiny. Prodloužení střední doby klíčivosti vlivem stimulátoru tedy činí 6,8 hodin. Naproti tomu v kyselém roztoku téže koncentrace je průměrná doba klíčivosti 83,5 hodin, v okyselené kontrole 8,0 hodin; prodloužení činí 75,5 hodin. Kyselý milimolární roztok stimulátoru je tedy 75,5 : 6,8 = 11,1krát účinnější než alkalický roztok téže koncentrace. Protože průměrná doba klíčivosti pšenice při nižších koncentracích je úměrná koncentraci kyseliny α-naftyloctové, platí tento poměr mezi účinností celých molekul a aniontů pro libovolnou koncentraci tohoto stimulátoru až přibližně do jednoho milimolu v litru. Jsou to právě koncentrace, kterých se užívá při stimulaci.

Pozvolné zvyšování průměrné doby klíčivosti se stoupající koncentrací alkalických roztoků je způsobeno stoupající koncentrací aniontů kyseliny α-naftyloctové. Obsah nedisociovaných molekul v alkalických roztocích můžeme zanedbati. V kyselých roztocích v oblasti pH, v níž bylo možno pracovat, jsou poměry poněkud komplikovanější, protože tyto roztoky obsahovaly pouze 86 % nedisociovaných molekul, zbytek byly anionty.



Diagr. 7.



Diagr. 8.

Diagr. 7. Střední doba klíčivosti pšenice (M) po nabotnání v roztocích kyseliny α-naftyloctové o různé koncentraci, neutralisovaných na stejnou hodnotu pH = 7. Na ose x koncentrace kyseliny, na ose y střední doba klíčivosti.

Diagr. 8. Střední doba klíčivosti pšenice (M) po nabotnání v roztocích kyseliny α-naftyloctové o různé koncentraci při hodnotě pH = 3,4. Pro srovnání jsou zde zakresleny také střední doby klíčivosti z neutralisovaných roztoků (pH = 7) z diagr. 7 při nižších koncentracích.

Ke stanovení poměru účinnosti celé molekuly k aniontu kyseliny α-naftyloctové můžeme dojíti též výpočtem. V milimolárním roztoku kyselém bylo 0,86 milimolů nedisociovaných molekul a 0,14 milimolů iontů naftylacetátových. Kdyby roztok obsahoval jen ionty naftylacetátové, pak 0,14milimolární roztok by prodloužil průměrnou dobu klíčivosti o 1 hodinu (z diagramu 8,

pH = 7). Kyselý roztok prodloužil průměrnou dobu klíčivosti o 75,5 hodin, na celé molekuly připadá tedy zvýšení 74,5 hodin. Z diagramu můžeme dále vyčísti, že v alkalickém roztoku, který by obsahoval v 1 litru 0,86 milimolů iontů α-naftylacetátových by byla průměrná doba klíčivosti prodloužena (vzhledem ke kontrole) o 5,8 hodin. Stejná koncentrace celých molekul prodloužila průměrnou dobu klíčivosti o 75,5 hodin. Jsou tedy nedisociované molekuly ve srovnání s anionty naftylacetátovými 13krát účinnější.

Podobným způsobem můžeme z tab. 5 vypočítat prodloužení průměrné doby klíčivosti pro libovolnou hodnotu pH do koncentrace $1{,}0 \times 10^{-3}$ molu kyseliny α-naftyloctové v litru (t. j. v oblasti, v níž platí lineární vztah mezi koncentrací kyseliny v roztoku a průměrnou dobou klíčivosti. Viz tab. 6).

Pokus 11. Stejná odrůda pšenice, jako v pokusech 9 a 10 nabotnala za stejných podmínek v milimolárním roztoku kyseliny α-naftyloctové, který byl alkalisován NaOH na různou hodnotu pH.

Výsledky průměrné doby klíčivosti, uvedené v tab. 6., souhlasí dobře s hodnotami vypočítanými.

Tabulka 6

Rozdíl v účinnosti celých molekul a aniontů milimolárního roztoku kyseliny α-naftyloctové

pH roztoku	% nedisociovaných molekul	Prodloužení doby klíčivosti připadající na molekuly		Průměrná doba klíčivosti	
		nedisociované	disociované	vypočtená	naměřená
3,65	78,4	69,3	1,5	74,8	70,2
3,90	67,1	59,3	2,2	65,5	63,4
4,10	56,3	49,7	3,0	57,7	54,2
4,55	31,4	27,8	4,7	36,5	37,7
5,50	5,0	4,4	6,5	14,9	13,8

7. Účinnost solí a kyselin jiných stimulátorů

Všechny dosavadní pokusy byly provedeny s kyselinou α-naftyloctovou, která ze všech heteroauxinoidů je nejstálejší a na klíčení silně působí. Protože většina růstových stimulátorů jsou slabé kyseliny, můžeme předpokládat, že při různém stupni disociace, t. j. v různě kyselých roztocích, se budou chovati podobně, jako kyselina α-naftyloctová.

Klíčivost pšenice jsme zkoušeli po nabotnání v těchto růstových stimulátorech: heteroauxin, kyselina β-iondolylpropionová, β-indolylmáselná, kyselina fenyloctová a α-naftyloctová. Kontrolami byly: destilovaná voda, kyselina octová, propionová a máselná. Všechny roztoky byly připraveny o koncentraci 1×10^{-3} molu v litru a okyseleny kyselinou sírovou, resp.

zalkalisovány hydroxydem sodným tak, aby, všechny kyselé roztoky obsahovaly 95 % nedisociovaných molekul a alkalické roztoky 99,8 % molekul disociovaných. Hodnota pH roztoků se tedy mírně lišila podle disociačních konstant kyselin (tabulka 7). Kontrolní destilovaná voda byla okyselena na nejnižší hodnotu pH zkoušených kyselin (t. j. kyseliny α-naftyloctové o pH = 2,99) a zalkalisována na nejvyšší hodnotu zkoušených látek (t. j. kyseliny propionové o pH = 7,68).

Tabulka 7

Disociační konstanty a hodnoty pH okyselených a alkalisovaných roztoků řady kyseliny octové a jejích růstově aktivních derivátů. — Koncentrace všech roztoků = 1 milimol v litru

Roztok	pK	pH roztoků	
		alkalisovaných na 99,8 % disociovaných molekul	okyselených na 95 % celých molekul
Voda		7,68	2,93
Kyselina octová	4,756	7,56	3,48
Kyselina propionová	4,88	7,68	3,60
Kyselina máselná	4,812	7,61	3,53
α-naftyloctová	4,21	7,01	2,93
- fenyloctová	4,27	7,07	2,99
β-indolyloctová	4,55	7,35	3,27
β-indolylpropionová	4,86	7,66	3,58
β-indolylmáselná	4,87	7,67	3,59

Disociační konstanty kyselin fenyloctové, octové, propionové a máselné jsou převzaty z Landolt-Börnsteinových tabulek (15), pro kyselinu α-naftyloctovou jsme použili našich výsledků. Disociační konstanty kyselin β-indolyloctové, -propionové a -máselné měřil H. G. Albaum a S. Kaiser (2). V práci však neudávají teplotu, při které měřili a místo disociačních konstant udávají titrační exponenty kyselin. Na základě jejich měření jsme disociační konstanty vypočetli a uvádíme je v tabulce 6.

Pokus 12. V roztocích uvedených látek byla namočena stejná odrůda jarní pšenice a to v deseti opakováních po padesáti obilkách za stejných podmínek jako v předešlých pokusech.

V tabulce 8 jsou uvedeny průměrné doby klíčivosti ve všech roztocích. Rozdíly v účinnosti kyselých a alkalisovaných roztoků jsou dobře viděti z prodloužení průměrné doby klíčivosti ve srovnání s kyselou, resp. alkalickou kontrolou. V posledním sloupci tabulky je uveden poměr mezi účinností nedisociovaných molekul k iontům růstových stimulátorů. Hodnota, získaná v tomto pokuse pro kyselinu α-naftyloctovou, je poněkud vyšší než v pokusu předchozím, což se dá vysvětlit příliš nízkou hodnotou pH, kde se již uplatňuje i brzdivý účinek iontů vodíkových.

Rozdíl v účinnosti celých molekul a aniontů různých stimulátorů.
Koncentrace všech roztoků = 1 milimol v litru

Roztok	Průměrná doba klíčivosti v roztoku		Prodloužení průměrné doby klíčivosti v roztoku		Poměr účinnosti molekul k aniontům
	kyselém (95 % celých molekul)	alkalickém (99,8 % disociovaných molekul	kyselém	alkalickém	
Voda	5,69	5,26	0	0	—
Kyselina octová	6,16	5,54	0,4	0,2	—
Kyselina propionová	8,75	4,75	3,0	0,5	—
Kyselina máselná	10,12	6,8	4,4	1,5	—
Kys. α-naftyloctová	114	13,4	109,5	8,1	13,5
Kys. fenyloctová	33,4	7,0	27,7	1,7	16
Kys. β-indolyloctová	31,4	8,5	27,7	1,7	8
Kys. β-indolylpropion.	24,0	8,6	25,7	3,2	6
Kys. β-indolylmáselná	38,4	10,5	18,3	3,3	6

Podle poměru účinnosti molekul k iontům můžeme zkoušené stimulátory rozdělit do dvou skupin:

a) kyselina α-naftyloctová a fenyloctová, kde molekuly jsou 13—16krát účinnější než ionty; chemicky jsou to látky velmi stálé, které se v kyselém prostředí nerozkládají.

b) Indolové deriváty kyseliny octové a jejích homologů, t. j. kyselina β-indolyloctová, β-indolylpropionová a β-indolylmáselná. Zde účinnost molekul vzhledem k iontům je poloviční než u předchozí skupiny. Molekuly jsou 6—8krát účinnější než ionty. Jsou to látky, které v kyselých roztocích podléhají rozkladu. Tato skupina, nebo alespoň heteroauxin, se liší od kyseliny α-naftyloctové také tím, že vztah mezi koncentrací látky v roztoku a průměrnou dobou klíčivosti není lineární (12). Proto vypočtený poměr mezi účinností celých molekul a aniontů nemůže být nezávislý na koncentraci látky v roztoku. Poměr účinnosti mezi molekulami a anionty této látky, který jsme pokusně našli, platí jen pro roztok milimolární.

Specifický účinek růstových stimulátorů na klíčení můžeme rozlišit srovnáním s účinkem ekvimolárních roztoků kyseliny octové, propionové a máselné. Průměrná doba klíčivosti obilek z těchto roztoků je také poněkud větší v oblasti kyselé než v oblasti alkalické (tab. 8). Se stoupající molekulovou hmotou a hydrofobií se průměrná doba klíčivosti nepatrně prodlužuje. Ale ve srovnání s účinkem růstově aktivních derivátů těchto kyselin (tabulka 8, obr. 4) jsou tyto rozdíly podřadného významu a potvrzují výsledky pokusů č. 4. Na obr. 4 jsou zachyceny individuální rozdíly v účinku různých stimulátorů. Obilky, nabotnalé v kyselých roztocích stimulátorů a v kyselých kontrolách,

jsou fotografovány ve stejnou dobu, t. j. 44 hodin po nabotnání. Obilky z kyseliny octové propionové a máselné se od vodní kontroly téměř neliší. U heteroauxinu a kyseliny β-indolylmáselné je již zřetelná deformace klíčku, obvyklá u vyšších koncentrací růstových stimulátorů. Kyselina β-indolylpropionová a fenyloctová, která také v ovsových testech je málo účinná, zpomalila jen růst kořínku ve srovnání s kontrolou, zatím co vývoj klíčku je normální. Obilky z kyseliny α-naftyloctové v této době dosud neklíčí. Na obr. 5 je zachyceno pozdější vývojové stadium klíčků u těchže obilek, kdy rozdíly jsou ještě nápadnější.

8. Diskuse výsledků

Vliv koncentrace vodíkových iontů na účinnost růstových stimulátorů v roztoku byl konstatován v řadě prací. Většina těchto prací staršího data sledovala hlavně účinek na rychlost růstu blan buněčných jelikož se tehdy ještě předpokládalo, že dlouživý růst buněk je realisován účinkem auxinu (heteroauxinu) na blánu buněčnou. Všechny tyto práce souhlasí s našimi výsledky, kde jde o rychlost komplexního klíčního pochodu a pouze v málo pokusech o prodlužovací růst kořenových vrcholů. Ze starších prací na příklad D. M. Bonner (5) pozoroval v ovsových testech s kyselinou β-indolyloctovou větší účinek kyseliny než draselné soli. Když však smísil kyselinu nebo sůl s ústojem o stejné hodnotě pH, dostal rozdíly menší, neboť kyselina i sůl byly převedeny přibližně na stejný stupeň disociace. V pokusech Marmerových (17) brzdily stimulátory růst primárního kořínku pšenice mnohem více v kyselých regulátorech, než v roztocích alkaličtějších. Totéž pozoroval D. M. Bonner (6) v regulovaných roztocích různých heteroauxinoidů na hrachovém testu.

Výsledky prací, kde nebylo použito ústojných roztoků, se velmi různí. Avery, Burkholder a Creighton (4) dokazovali na př. ovsovými testy, že soli jsou stejně účinné jako kyseliny. Při tak nízkých koncentracích růstového stimulátoru (v ovsových testech se pracuje s koncentracemi řádově 10^{-6} až 10^{-11} molů v litru), musí být výsledek stejný, pracuje-li se s kyselinou nebo solí, protože rostlinné pletivo samo mění koncentraci H^+ iontů neregulovaných roztoků. Proto také Thiman a Schneider (26) při nízkých koncentracích heteroauxinu nenašli téměř rozdílu mezi účinností soli a kyseliny, pokud agar nesmísili s regulátorem. Teprve u koncentrací vyšších než 10 mg v litru mohli tito autoři potvrditi, že sůl je „méně toxická", t. j. že kyselina působila již hyperstimulačně. Při vyšších koncentracích působí již regulačně sám roztok stimulátoru, který je slabou kyselinou. Proto v našich pokusech, ačkoliv jsme pracovali bez regulátorů pH, podařilo se udržeti hodnotu pH dosti stálou, když byly roztoky během botnání dostatečně často vyměňovány.

Při práci s agarem v ovsových testech nestačí brát zřetel pouze na koncentraci agaru v gelu (Thiman a Schneider), nebo na obsah popelovin, které se podle standardního Wentova předpisu (28) mají odstranit týdenním vypíráním agaru v destilované vodě. Již v r. 1923 upozornil Samec a Isajevič (22) na to, že kyselina sírová, která se nedá z agaru vyprat, je konstituční součástí agarové molekuly. Agar je tedy makromolekulárním acidoidem. Prodejný agar je obyčejně „solí", jeho kyselé skupiny jsou neutralisovány různými kationty. Na tyto jeho vlastnosti upozornil akademik

S. Prát v r. 1926 v podrobné studii, kde sledoval zejména vliv solí na botnavost mletého agaru (20). Pozoroval alkalickou reakci agarové suspense v destilované vodě, která vyluhováním mizí a po důkladném vyprání se mění v reakci kyselou. Podle Samce a Isajeviče (l. c.) nestačí k úplnému odstranění solí z agaru ani tříměsíční dialysa.

Smísíme-li s propraným agarem na př. draselnou sůl heteroauxinu, nastává iontová výměna, kterou můžeme schematicky psát:

$$\boxed{\text{Agar}}\text{—}SO_3H + R\text{—}COOK \rightleftarrows \boxed{\text{Agar}}\text{—}SO_3K + R\text{—}COOH$$

při čemž draselná sůl heteroauxinu je převedena v méně disociovanou kyselinu, která vyvolá silnější zakřivení koleoptile. Naopak přidáme-li čistou kyselinu β-indolyloctovou k agaru špatně zbavenému popelovin, nastává výměna iontů v opačném smyslu a kyselina β-indolyloctová je převedena v méně účinnou sůl. Proto tolik prací a diskusí, které shrnuje Thiman a Schneider v tom smyslu, že jen „velmi vysoké" koncentrace růstových stimulátorů jsou účinnější ve formě kyselin než ve formě solí.

K ilustraci jsme provedli s agarem několik měření: Agar po několikadenním promývání mírným proudem destilované vody byl nakonec 16 hodin propírán v proudící vodě redestilované a vysušen při 40°. 0,15 g této suché látky jsme dali nabotnati do 80 ccm n/100 KCL. Po 42 hodinách měl roztok chloridu draselného nad agarem pH = 4,82, kdežto původní roztok pouze 5,62. V dalším pokuse jsme dali nabotnat vypraný a vysušený agar do milimolárního roztoku draselné soli heteroauxinu (na 90 ccm roztoku 0,90 g agaru). Pokus byl proveden s redestilovanou vodou a za vyloučení vzdušného kysličníku uhličitého. Ve styku agaru s roztokem β-indolylacetátu, jehož původní pH bylo 7,90, poklesla hodnota pH za 16 hodin na 5,22.

Rozdíl mezi účinností nedisociovaných molekul a iontů nesouvisí pouze s otázkou permeability slabých kyselin, ale i s dalšími reakcemi sloučeniny v živé protoplasmě. Permeabilita ovšem závisí též na druhu blan, buněk i pletiv, proto kvantitativní rozdíly, které jsme stanovili na klíčících obilkách pšenice, mohou platit jen pro tento případ. Marmer (17) na př. pro růst kořínků pšenice našel zcela jiný poměr mezi heteroauxinem a jeho solí a opět jiný v těchže pokusech pro růst koleoptile. Přímá měření prostupnosti heteroauxinu do buněk Nitelly provedli Albaum, Kaiser a Nestler (3) a dokázali, že se zvyšuje se stoupající koncentrací vodíkových iontů v roztoku.

Výsledky našich pokusů nejsou skresleny t. zv. polopropustností testy pšeničných obilek. Na obilkách, kterým byla spodní část amputována, se rozdíly v klíčivosti z kyselých i alkalických roztoků pouze úměrně zvýšily tím, že řeznou plochou během botnání proniklo do obilek větší množství stimulátoru. Také jiné druhy semen se chovaly obdobně. Odchylné výsledky u bobu se dají vysvětlit větší citlivostí semene k téže koncentraci stimulátoru, takže i v roztocích alkalických byl růst kořínku hyperstimulován.

Pokud růstový stimulátor ve vodném roztoku nedisociuje, jako na příklad amid kyseliny α-naftyloctové, nezávisí jeho účinnost na kyselosti roztoku, nýbrž jen na koncentraci. Amid kyseliny α-naftyloctové je v souhlase se staršími pokusy méně účinný než příslušná kyselina. Vyšší citlivost některých semen, v našich pokusech, na př. zelí, dala by se snad vysvětlit přítomností enzymů, které amid zmýdelňují na příslušnou kyselinu. Experimentální důkaz pro tuto domněnku nebyl podán.

Účinnost nativního heteroauxinu v rostlině závisí na vnitřním pH pletiva (J. Bonner 7, van Santen 23, a j.) J. Bonner první dokazoval, že růst ovsové koleoptile se zrychluje se stoupající kyselostí pletiva a že tato

růstová křivka velmi úzce souvisí s disociační křivkou heteroauxinu. Byla to jedna z prací, která se snažila upevnit význam auxinové hypothesy prodlužovacího růstu proti Struggerově teorii protoplasmatické. Nověji Rietsema (21) opět kontroloval účinnost růstových stimulátorů v závislosti na stupni disociace a došel k poněkud odchylným závěrům. Diskutuje znovu rozcházející se názory mnoha autorů, zda vnitřní pH pletiva se mění vlivem regulátoru ve vnějším prostředí. Podle něho vnitřní pH cytoplasmy a vakuoly zůstává nedotčeno účinkem regulátoru, také proudění cytoplasmy je nezávislé na pH vnějšího prostředí. Připouští, že pouze vnější vrstva protoplasmy by se mohla měnit změnou koncentrace vodíkových iontů v okolí. Závislost růstu ovsové koleoptile je určována dvouvrcholovou křivkou a optimem při pH 4,8 až 5,2 a 5,9 až 6. Autor tvrdí, že jeho výsledky nejsou srovnavatelné s Bonnerovou hypothesou disociace heteroauxinu při autonomním růstu koleoptile. Křivky účinností použitých stimulátorů odpovídají jejich stupni disociace. Přes to se domnívá, že růstové stimulátory vstupují do živé buňky v podobě iontů, zatím co jejich účinek uvnitř buňky zůstává utajen. Jeho práce nám však nebyla dostupná, nemůžeme tedy jeho výsledky srovnat s našimi.

Buchníček (9) v podrobné práci, podložené velmi přesnou experimentální metodikou, měřil závislost růstu kořenových špiček kukuřice na pH a koncentraci solí živného roztoku. Dospěl rovněž k dvouvrcholovým křivkám růstovým, při čemž růstové minimum mezi oběma optimy leží přibližně v isoelektrickém bodě protoplasmy. Podle Buchníčka v souhlase se Struggerem a jinými protoplasmatiky pH regulátoru mění hodnotu pH v buňkách, při čemž se současně mění viskosita a botnavost protoplasmatických koloidů, která podle Struggera je prvním popudem k anosmotickému příjmu vody buňkou a tedy k růstové reakci, vybavené protoplasmou. Buchníček vykládá prodlužovací růst spojením teorie Struggerovy (25) s teorií auxinovou, jakožto výslednici změn v botnavosti protoplasmatických koloidů i blány buněčné, vyvolaných změnou koncentrace iontů vodíkových, iontů neutrálních solí a změnou disociace nativního heteroauxinu. Přitom pro druhé růstové optimum předpokládá zcela hypothetickou další růstově aktivní sloučeninu v buňkách, s disociační konstantou nad isoelektrickým bodem protoplasmy.

Nové práce, které se pokouší vyložit účinek různých skupin fysiologicky aktivních látek jejich molekulární stavbou, přijímají v podstatě názor Paulingův (19), že aktivní sloučenina reaguje s živým substrátem, „receptorem", v buňce za vzniku snadno rozbitelné vazby. Tyto vazby musí být tedy zprostředkovány slabšími mezimolekulárními silami než jsou vazby valenční, tedy na př. vazbou iontovou nebo vodíkovým můstkem. To je jeden z činitelů, kterým lze vysvětlit závislost účinnosti látky na jejím stupni disociace nebo lépe ionisace. Druhým faktorem je podle Wooda (30) adsorpce na vnitřních površích protoplasmatických. Nespecifická adsorpce není závislá na chemické struktuře sloučeniny, takže stejný nebo podobný fysiologický účinek vyvolá celá řada sloučenin chemicky zcela odchylných. Do této skupiny patří právě ono obrovské množství růstově aktivních sloučenin. Weldstra (27) charakterisuje jejich účinek fysikálně chemicky, t. j., jejich účinek spočívá v prostorovém uspořádání hydrofobního a hydrofilního pólu molekuly, které vyvolává změny v hydrataci, permeabilitě, viskotitě a jiných fysikálních vlastnostech fysiologicky významných vnitřních povrchů protoplasmatických. Při nespecifické adsorpci klesá tedy aktivita sloučeniny s její stoupající

disociací, protože elektroneutrální molekula se v (hydrofobních) površích snadněji adsorbuje než hydratovaný ion, který má větší tendenci udržet se v roztoku.

Proto také ionisovaná forma nějaké sloučeniny proniká pomaleji přirozenými blanami než její elektroneutrální molekula.

Závisí ovšem též na stupni ionisace receptorů, kterými jsou převážně protoplasmatické bílkoviny a systémy enzymů. O té se nemůžeme tak snadno experimentálně přesvědčit.

Vysoká fysiologická účinnost nedisociovaných molekul platí nejen pro kyseliny, ale i pro base (colchicin). Disociační a ionisační konstanty se mění s teplotou, proto s teplotou kolísá i aktivita sloučeniny. W o o d dochází k závěru, že pro práce, srovnávající biologickou účinnost různých látek, je nesmírně důležitá podrobná znalost ionisačních konstant.

S i m o n (24) generalisuje již zcela obecně závislost účinnosti slabých kyselin a zásad na jejich disociační konstantě a podává obecnou formu křivky závislosti účinné koncentrace na hodnotě pH aplikovaného roztoku.

V praktických pokusech o zvýšení výnosu stimulací semene různými roztoky růstově aktivních sloučenin bývají výsledky pokusů, prováděných za „stejných podmínek" až diametrálně rozdílné, protože stimulační optimum je úzké a často se přestimuluje. Z kolísajících činitelů, které mohou mít značný význam v praktickém pokuse, je důležitá teplota roztoku (12). Používá-li se k přípravě roztoku místo destilované vody různých vod užitkových, mohou se výsledky značně lišiti podle pH a stupně tvrdosti vody (11). Tato práce vysvětluje rozdíly v účinnosti roztoků, připravených z různých druhů vody.

Souhrn výsledků

1. Roztoky kyseliny α-naftyloctové, neutralisované NaOH nebo KOH na různou hodnotu pH, brzdí klíčení pšenice tím více, čím jsou kyselejší. Klíčivou energii pšenice, resp. z ní vypočtenou průměrnou dobu klíčivosti celého pokusného souboru obilek, považujeme za biologický test účinnosti růstového stimulátoru. Účinnost stimulátoru stoupá s klesajícím pH roztoku.

2. Nižší účinnost solí kyseliny α-naftyloctové není způsobena přítomností kationtů (zkoušeny K-, Na-, a Ca-soli). Vyšší účinnost kyseliny není dána ani ionty vodíkovými: roztoky kyseliny octové, vinné, solné a sírové o stejné koncentraci vodíkových iontů jako milimolární roztok kyseliny α-naftyloctové, mění průběh klíčení ve srovnání se stimulátorem jen zcela nepatrně.

3. Různá účinnost roztoků kyseliny α-naftyloctové, fenyloctové, β-indolyloctové, β-indolylpropionové a β-indolylmáselné ve srovnání s účinností jejich solí, je dána především koncentrací celých nedisociovaných molekul. Anionty růstových stimulátorů jsou mnohem méně účinné.

4. Růstové stimulátory, které v roztoku nedisociují, jsou stejně účinné v kyselém i alkalickém prostředí. Důkaz byl proveden pomocí amidu kyseliny α-naftyloctové.

5. Pokusně byl stanoven kvantitativní rozdíl v účinnosti milimolárních roztoků celých molekul a aniontů růstových stimulátorů. Zkoušené sloučeniny můžeme rozdělit do dvou skupin:

a) kyselina α-naftyloctová a fenyloctová, u nichž celé molekuly jsou 13 až 16krát účinnější než anionty. Tyto látky jsou ve vodných roztocích stálé.

b) Kyseliny β-indolyloctová, β-indolylpropionová a α-indolylmáselná, kde celé molekuly jsou jen 6 až 8krát účinnější než anionty. Jejich roztoky se v kyselém prostředí rozkládají.

6. Kyselina octová, propionová a máselná, které nejsou růstově aktivní, brzdí klíčení pšenice jen nepatrně a nevyvolávají pro růstové stimulátory typické morfologické změny klíčku.

7. Rozdíl v účinnosti molekul a aniontů je částečně otázkou permeability živých blan pro slabé kyseliny. Propustnost slupky semene nemá podstatného významu. Výsledky získané na pšenici se daly potvrdit na obilkách s amputovanou basální částí, na loupaných semenech slunečnice a na semenech ředkvičky, bobu a zelí.

8. Odchylné výsledky jiných autorů, získané na ovsových testech, se dají vysvětlit katexovou povahou agaru, částečně zbaveného popelovin vypíráním vodou. Kyselé skupiny v agarové molekule reagují s přidanou solí růstového stimulátoru tak, že se uvolňuje kyselina, která je aktivnější než sůl. Při nepatrné koncentraci stimulátoru, jaká se užívá v ovsových testech, je proto výsledná účinnost soli i kyseliny stejná.

9. Experimentálně byla stanovena disociační konstanta kyseliny naftyloctové, její pK = 4,21 (při 20°).

10. Závěrem je diskutována literatura, která se snaží vysvětlit závislost účinnosti růstově aktivních sloučenin uvnitř živé protoplasmy na jejich stupni disociace resp. ionisace. Pro praktické pokusy o stimulaci výnosu hospodářských plodin vysvětluje tato práce rozdíly v účinku stimulačních roztoků, připravených z různých druhů vody.

Literatura

1. Aichele F.: Keimung von Gramineensamen in Medien verschiedener Wasserstoffionenkonzentration und die damit verbundenen Reaktionsveränderungen. Bot. Arch. 33 : 406; 1931.
2. Albaum H. G. a Kaiser S.: The titration curves of 3-indoleacetic acid, 3-indole propionic and 3-indole butyric acids. Amer. J. of Bot. 24 : 420; 1937.
3. Albaum H. G., Kaiser S. a Nestler H. A.: The relation of hydrogen-ion concetration to the penetration of 3-indole acetic acid into Nitella cells. Amer. J. Bot. 24 : 513; 1937.
4. Avery G. S., Burkholder P. R. a Creighton H. B. : Avena coleoptile curvature in relation to different concentrations of certain synthetic growth substances. Amer. J. Bot. 24 : 226; 1937.
5. Bonner D. M.: Activity of the potassium salt of indole (3) acetic acid in the avena test. Bot. Gaz. 99 : 408; 1937/38.
6. Bonner D. M.: Relation of environment and the physical properties of synthetic growth substances to the growth relation. Bot. Gaz. 100 : 200; 1938/39.
7. Bonner J.: The relation of hydrogen ions to the growth rate of the Avena coleoptile. Protoplasma 21 : 406; 1934.
8. Borris H.: Die Beeinflussung des Streckungswachstums durch Salze. I. Jahrb. wiss. Bot. 85 : 732; 1937.
9. Buchníček J.: O vlivu koncentrace vodíkových iontů a solí živného roztoku na růst kořenů kukuřice. Spisy přír. fak. Masarykovy university Brno. Č. 280; 1946.
10. Clark W. M.: The determination of hydrogen ions. Baltimore 1928, str. 214.
11. Dykyj-Sajfertová D. a Dykyj J.: Vliv vody na účinnost roztoků růstových látek při horminisaci semene. Sborník ČAZ 18 : 15, 1943.
12. Dykyj-Sajfertová D. a Dykyj J.: Untersuchungen über Samenkeimung und synthetische Wuchsstoffe. Einfluss von Quellungstemperatur u. Wuchsstoffkonzentration auf die Keimung des Weizens. Angew. Bot. 25 : 274; 1943.

13. Dykyj-Sajfertová D.: Vliv růstových stimulátorů na enzymy klíčícího semene. 1. Histochemická kontrola dehydráz kyselinou tellurovou a 2, 3, 5-trifenyltetrazoliumchloridem. Sborník ČAZ 25 : 317; 1952.
14. Gall E.: Nature, 142 : 1119; 1938.
15. Landolt-Börnstein-Schell-Roth: Physikalisch-chemische Tabellen. V. Aufl. III. Ergbd., 3. Teil. Berlin-Springer 1936.
16. Larsen P.: Indol-acetaldehyd as a growth hormone in higher plant Dansk Bot. Arch. 11 : 11; 1944.
17. Marmer D. R.: Growth of wheat seedlings in solutions containing chemical growth substances. Amer. J. Bot. 24 : 139; 1937.
18. Mitchel J. W. a Stewart W. S.: Vergleich des Wuchswirkung von Naphthylacetamid und Naphthylessigsäure bei Pflanzen. Bot. Gaz. 101 : 410; 1939. Refer.: Ch. Zblt 1940 (I) : 3941.
19. Pauling: Chem. and Eng. News. 24 : 1788; 1946.
20. Prát S.: Antagonistic salt action in relation to the sweeling and dyeing of powdered agar. Amer. Journ. Bot. 14 : 167; 1927.
21. Rietsema J.: Action and penetration of growth substances. Utrecht, 1950; Refer.: Biol. Abstr. 25 : 1960; 1951.
22. Samec M. a Isajevič V.: Kolloid-chem. Beih. 16 : 285, 1922.
23. Santen A. M. A. van: Influence of hydrogen ion concentration on the growth rate of avena coleoptile. Proc. Kon. Need. Akad. Wet. Amsterdam 41 : 513; 1938. Refer.: Protoplasma 31 : 488; 1938.
24. Simon E. W.: Effect of pH on the biological activity of weak acids and bases. Nature 166 : 343 1950.
25. Strugger S.: Beiträge zur Physiologie des Wachstums. I. Zur protoplasmaphysiologischen Kausalanalyse des Streckungswachstums. Jahrb. wiss. Bot. 79; 1934.
26. Thiman K. V. a Schneider Ch. L.: The role of salts, hydrogen-ion concentration and agar in the response of the avena coleoptile to auxins. Amer. J. Bot. 25 : 270; 1938.
27. Weldstra H.: Considerations to the interaction of ergons and their "substrates". Biochem. Biophys. Acta 1 : 364; 1947.
28. Went F. W.: Wuchsstoff u. Wachstum. Rec. trav. bot. Néerl. 25; 1928.
29. Vilman D. H.: Chem. Zblt. I.: 599; 1942.
30. Wood H. C.: S. Ionisation, pH and biological activity. Nature, 170 : 994; 1952.
31. Wuhrman K.: Der Einfluss von Neutralsalzen auf das Streckungswachstum der Avena-Koleoptile. Protoplasma 29 : 361; 1938.

Text k tabulkám I.—V.

Tab. I. Vývoj klíčků po nabotnání semen v milimolárním roztoku kyseliny α-naftyloctové (pH 3,65) a její sodné soli (pH = 5,50). A: loupaná semena slunečnice, klíčky staré 76 hod. B: klíčky bobu, staré 10 dnů. 1 = vodní kontrola, 2 = α-naftyloctan sodný, 3 = kyselina α-naftyloctová.

Tab. II. Klíční rostlinky zelí 48 hodin po nabotnání v destilované vodě (K), v milimolárním roztoku amidu kyseliny α-naftyloctové (A) a v milimolárním roztoku kyseliny α-naftyloctové (B) při různé kyselosti roztoku.

Tab. III. Klíčící pšenice po nabotnání v destilované vodě (K), v milimolárním amidu kyseliny α-naftyloctové (A) a v milimolárním roztoku kyseliny α-naftyloctové (B) při různé hodnotě pH roztoku. K, A, / fotografováno 22 hod. po nabotnání, B / 22,40 a 80 hodin po nabotnání.

Tab. IV. Klíčky pšenice, staré 44 hodin, po nabotnání v milimolárním roztoku různých stimulátorů o stejné koncentraci nedisociovaných molekul (95 %). 1 - kyselina β-indolyloctová, 2 - β - indolylpropionová, 3 - β-indolylmáselná, 4 - fenyloctová, 5 - α-naftyloctová; kontroly: 6 - kys. octová, 7 - propionová, 8 - máselná, 9 - destilovaná voda, okyselená na stejnou hodnotu pH.

Tab. V. Klíčky ze stejného pokusu jako na obr. 4, staré 75 hodin.

D. Dykyj-Sajfertová:

Samenkeimung unter dem Einfluss von Wuchsstoffen bei verschiedenem Ionisationsgrad

1. Die durch Neutralisation mit Kalium- oder Natriumhydroxyd auf verschiedene pH-Werte gebrachten Lösungen der α-Naphthylessigsäure hemmen die Keimung des Weizens umso mehr, je sauerer sie sind. Die Keimungsenergie des Weizens, bzw. die aus ihr errechnete mittlere Keimungsdauer halten wir für den biologischen Test der Wirksamkeit des Wuchsstoffes. Die Wirkung desselben steigt mit sinkendem pH-Werte der Lösung.

2. Die geringere Wirkung der Salze der α-Naphthylessigsäure wird nicht durch Gegenwart von Kationen verursacht (bestätigt an K-, Na-, und Ca-Salzen). Die höhere Aktivität der reinen Säure ist ebenso nicht durch die Wasserstoffionen bedingt: Die Lösungen der Essig-, Wein-, Salz- und Schwefelsäure von gleicher Wasserstoffionen-Konzentration wie die millimolare Lösung der α-Naphthylessigsäure ändern den Verlauf des Keimungsprozesses im Vergleich mit den Wuchsstoffen nur unwesentlich.

3. Unterschiedliche Wirkung der Lösungen der α-Naphthylessigsäure der Phenylessigsäure, β-Indolylessigsäure, β-Indolylpropionsäure und β-Indolylbuttersäure im Vergleich mit derjenigen ihrer Salze ist vor allem durch die Konzentration der ganzen undissoziierten Moleküle gegeben. Die dissoziierten Moleküle (Anionen) der Wuchsstoffe beeinflussen die Keimung viel weniger.

4. Wuchsstoffe, die in Lösung nicht dissoziieren, sind ebenso wirksam in saurem wie in alkalischem Milieu. Diese Tatsache wurde am Amid der α-Naphthylessigsäure bewiesen.

5. Der quantitative Unterschied zwischen der Wirkung der ganzen Moleküle und der Anionen wurde in millimolaren Lösungen der Wuchsstoffe. bestimmt. Die untersuchten Wuchsstoffe können wir danach in folgende zwei Gruppen einteilen:

a) Die α-Naphthylessigsäure und Phenylessigsäure, welcher Moleküle 13- bis 16-mal wirksamer sind, als ihre Anionen. Diese Substanzen sind in wässrigen Lösungen ganz beständig.

b) Die β-Indolylessigsäure, β-Indolylpropionsäure und β-Indolylbuttersäure, bei welchen die ganzen Moleküle nur 6- bis 8-mal wirksamer sind als die Anionen. Ihre sauren Lösungen zersetzen sich.

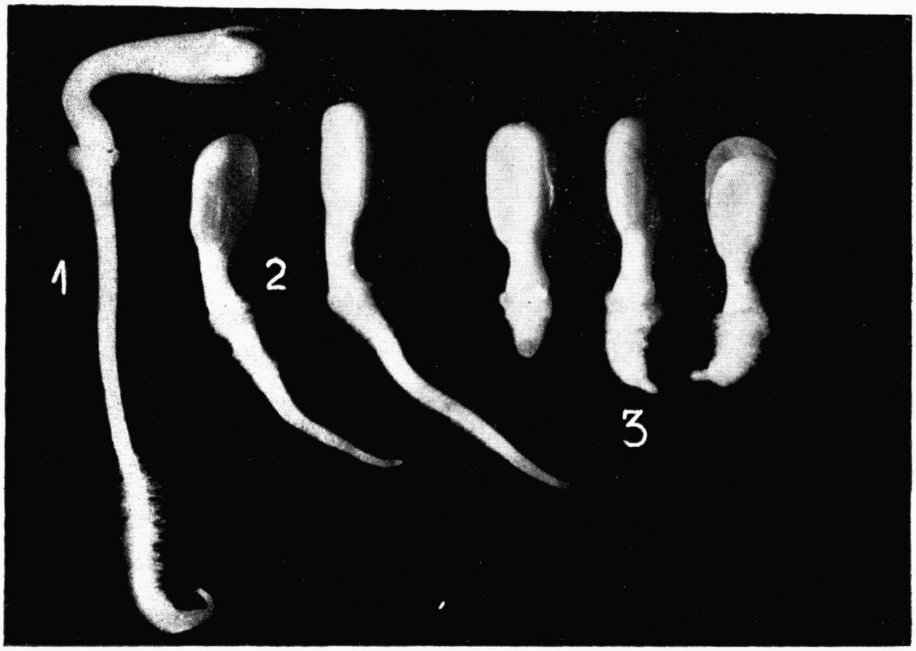
6. Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure, die nicht wachstumsfördernd wirken, hemmen die Keimung des Weizens nur unwesentlich und rufen keine für Wuchsstoffe typischen morphologischen Keimlingsmissbildungen hervor.

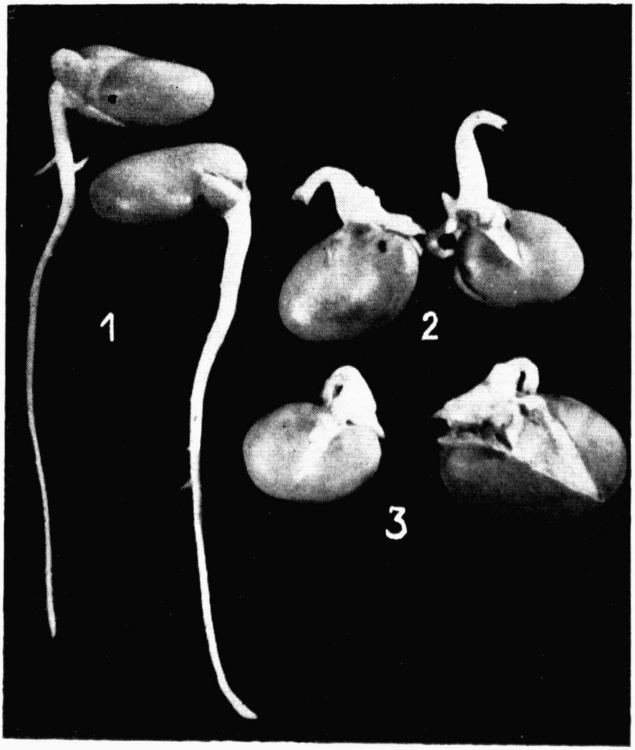
7. Der Wirkungsunterschied der Moleküle und der Anionen des Wuchsstoffes ist teils eine Frage der Permeabilität der lebendigen Zellmembranen für schwache Säuren. Die Durchlässigkeit der Samenschale hat keine grosse Bedeutung. Die an Weizensamen erzielten Ergebnisse liessen sich an Weizenkörnern mit abgeschnittenem Basalteil bestätigen, ferner auch an geschälten Sonnenblumensamen, an Radieschen- und Krautsamen.

8. Abweichende Ergebnisse anderer Autoren, die an Hand von Hafertesten erhalten wurden, lassen sich durch den azidoiden (Katex-) Charakter des Agars, der durch Auslaugen mit Wasser seine Aschenbestandteile teilweise verloren hatte, erklären. Die saueren Gruppen im Agarmolekül ($-SO_3H$, $-COOH$) reagieren mit den zugesetzten Salzen der Wuchsstoffe derart, dass die Säure in Freiheit setzen, die wirksamer ist als der Salz. Bei sehr niedriger Wuchsstoffkonzentration, wie sie bei den Hafertesten verwendert wird, wirkt sich deshalb das Salz sowie die Säure gleich aus.

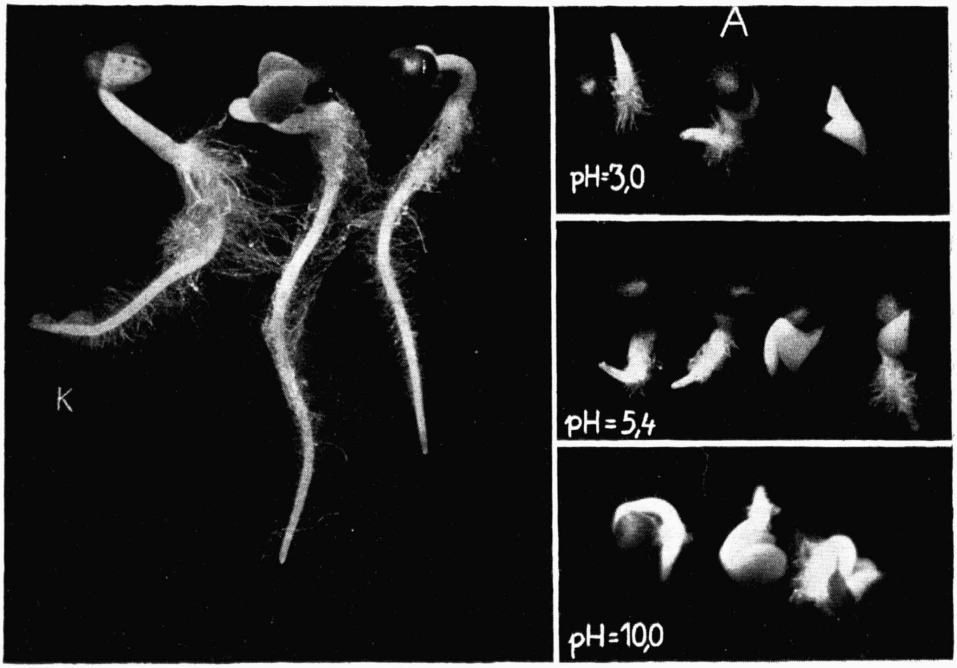
9. Die Dissoziationskonstante der α-Napthylessigsäure wurde experimentell bestimmt, ihre $pK = 4{,}21$ (bei 20°).

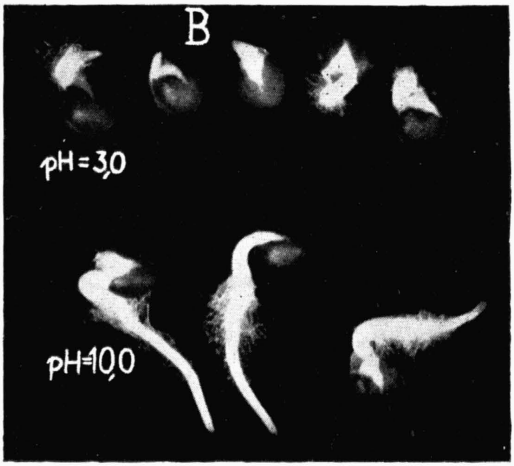
10. Zum Schluss wird solche Literatur diskutiert, die die Abhängigkeit der Wuchsstoffwirksamkeit innerhalb des lebendigen Protoplasmas von dem Ionisations- bzw. Dissoziationsgrad des Wuchsstoffes erklären sucht. Diese Arbeit erklärt auch manche Wirkungsunterschiede zwischen den Wuchsstofflösungen, die bei den praktischen Versuchen um Pflanzenstimulation aus verschiedenen Wasserarten vorbereitet wurden.



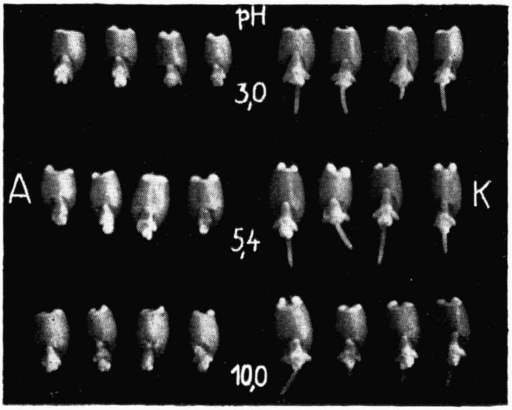


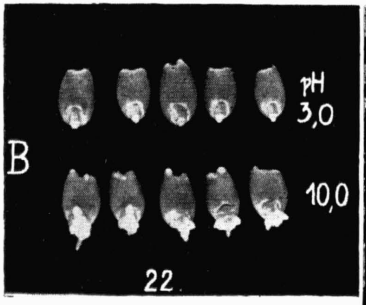
D. Dykyj-Sajfertová a J. Dykyj: Vliv růstových stimulátorů na klíčení osiva při různém stupni ionisace.

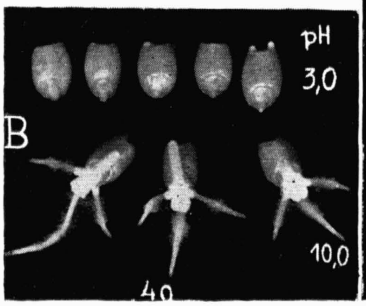


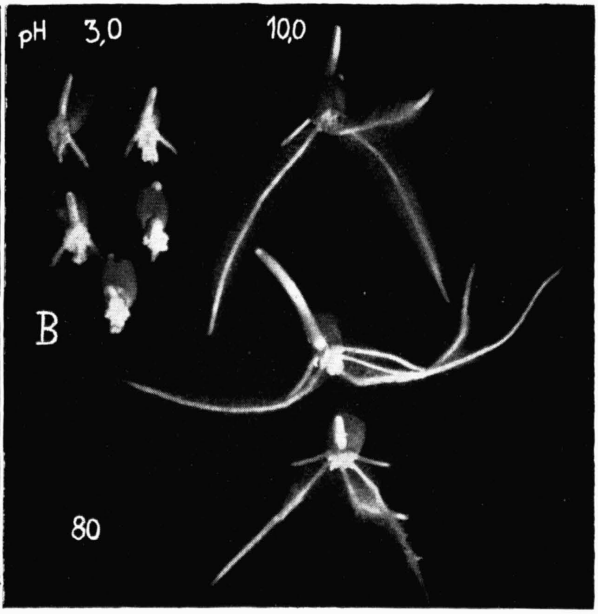


D. Dykyj-Sajfertová a J. Dykyj: Vliv růstových stimulátorů na klíčení osiva při různém stupni ionisace.

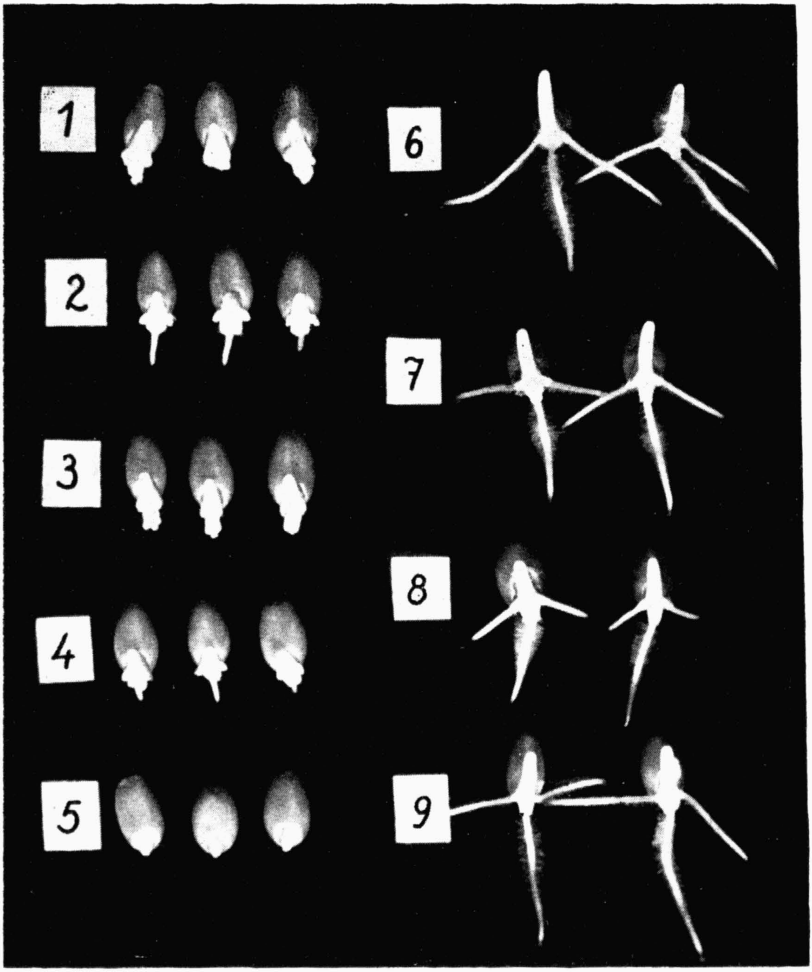




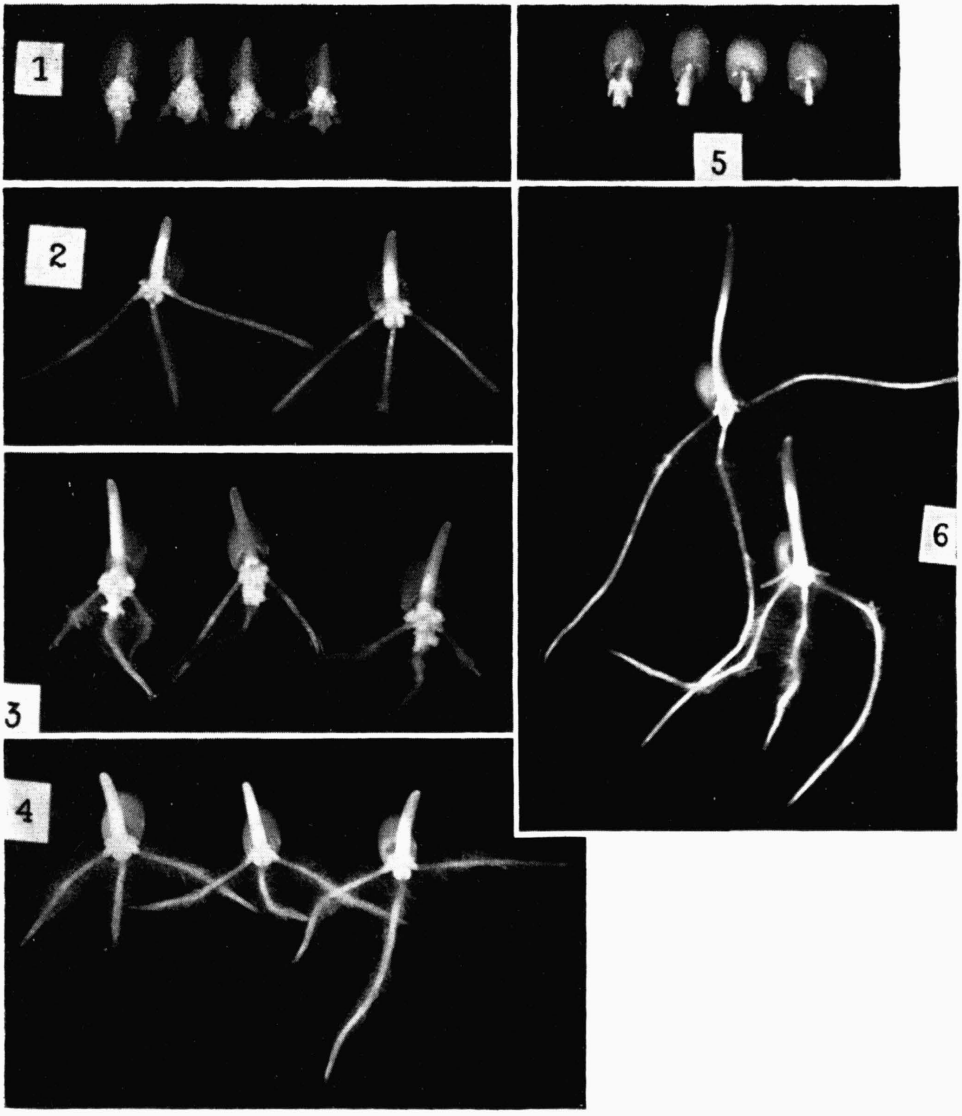




D. Dykyj-Sajfertová a J. Dykyj: Vliv růstových stimulátorů na klíčení osiva při různém stupni ionisace.



D. Dykyj-Sajfertová a J. Dykyj: Vliv růstových stimulátorů na klíčení osiva při různém stupni ionisace.



D. Dykyj-Sajfertová a J. Dykyj: Vliv růstových stimulátorů na klíčení osiva při různém stupni ionisace.