



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů PřF UP a AV ČR

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv brassinosteroidů a vybraných růstových regulátorů
na etiolované rostliny pelušky (*Pisum arvense L.*) -
biotest

Autor:. Bc. Petra Kořínková

Studijní program, studijní obor: N1501 Biologie, Fyziologie rostlin

Forma studia: prezenční

Vedoucí práce: Ing. Jaromír Mikulík, Ph.D.

Termín odevzdání práce: 2015

Bibliografická identifikace

Jméno autora:	Petra Kořínková
Název práce:	Vliv brassinosteroidů a vybraných růstových regulátorů na etiolované rostliny pelušky (<i>Pisum arvense L.</i>) - biotest
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Ing. Jaromír Mikulík, Ph.D.
Rok obhajoby:	2015
Klíčová slova:	biotest, brasinosteroidy, ethylen, etiolovaný růst, peluška (<i>Pisum arvense L.</i>), plynová chromatografie
Počet stran:	72
Počet příloh:	1 CD
Jazyk:	Český

Abstrakt:

Brasinosteroidy (BRs) tvoří skupinu steroidních rostlinných hormonů, která zahrnuje kolem 70 příbuzných endogenních látek a vyskytují se u nižších i vyšších rostlin. BRs byly nalezeny a vyzolovány ze semen, plodů, listů, květů a pylu. Mezi hlavní fyziologické účinky BRs na rostliny patří vliv na růst a dělení buňky a vliv na průběh stresové reakce. Identifikace BRs vyžaduje vysoce citlivý biotest, protože BRs se přirozeně vyskytují ve velmi nízkých koncentracích.

Ethylen je jednoduchý, plynný rostlinný hormon. Ačkoliv jeho struktura je velmi jednoduchá, ethylen se podílí na regulaci řady vývojových procesů u rostlin. Ethylen ovlivňuje klíčení rostlin, senescenci rostlin a abscisi listů.

Cílem diplomové práce byl vývoj a optimalizace biotestu, který sleduje inhibici etiolovaného růstu pelušky a který je založen na předpokladu, že BRs ve vyšší koncentraci inhibují etiolovaný růst. Tato inhibice je pravděpodobně způsobena zvýšenou produkcí ethylenu, která je zprostředkována skrze BRs. V tomto biotestu byla sledována aktivita přirozených BRs (BL, 24-epiBL) a dalších fytohormonů (cytokininů, auxinů a giberelinů). Vyvinutý biotest se ukázal pro BRs jako velmi citlivý a lze v něm detekovat aktivitu BRs i ve fmol množstvích. Rovněž jsme vyvinuli a optimalizovali vhodnou metodu pro měření produkce ethylenu u etiolovaných rostlin pelušky a otestovali jsme vliv BRs a dalších růstových regulátorů na produkci ethylenu.

Bibliographical identification

Author's name:	Petra Kořínková
Title of thesis:	Effect of brassinosteroids and others growth regulators on etiolated plants of <i>Pisum arvense L.</i> - bioassay
Type of thesis:	Master
Department:	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor:	Ing. Jaromír Mikulík, Ph.D.
The year of presentation:	2015
Keywords:	bioassay, brassinosteroids, ethylene, etiolation, gas chromatography, pea (<i>Pisum arvense L.</i>)
Number of pages:	72
Number of appendices:	1 CD
Language:	Czech

Abstract:

Brassinosteroids (BRs) represent a large group of plant steroids which include more than 70 congeners distributed from lower to higher plants. Physiological functions proposed for BRs include cell elongation, cell division and modulation of stress responses. Because BRs are present in plants in extremely low concentrations and have potent biological activity, their identification requires highly sensitive bioassays. Ethylene is the simplest, gaseous plant hormone. Even though the structure is very simple it participates in the regulation of a variety of developmental processes in plants.

The aim of this thesis was to develop and optimize a new pea inhibition biotest based inhibition of the growth of etiolated seedlings at high BR concentration; this inhibition is probably caused by ethylene production which is mediated by BRs. Activities of several natural BRs were studied in this test and then were compared with other phytohormones (cytokinin, auxin and gibberellin). We observed that pea inhibition bioassay is very sensitive, because as little as 10 fmol of brassinolide may be detected. Finally we evaluated the optimal conditions for the induction of ethylene by different plant hormones, and the interactions between BRs and other plant hormones on the induction of ethylene in etiolated pea seedlings.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala Ing. Jaromírovi Mikulíkovi, PhD. za vedení diplomové práce, Mgr. Janě Oklešťkové, PhD. za cenné rady a věnovaný čas a Evě Hirnerové za pomoc během práce v laboratoři.

Obsah

1. SEZNAM ZKRATEK.....	8
2. ÚVOD	10
2.1. Brasinosteroidy.....	11
2.1.1. Chemická struktura a výskyt BRs	11
2.1.2. Biosyntéza a metabolismus brasinosteroidů	13
2.1.3. Vliv brasinosteroidů na růst a vývoj rostlin	15
2.1.4. Biotesty brasinosteroidů.....	20
2.1.3. Signální dráhy a transport brasinosteroidů.....	22
2.2. Další testované regulátory růstu	24
2.2.1. Kyselina indol-3yl-octová (IAA)	24
2.2.2. Kyselina gibberelová (GA3)	24
2.2.3. <i>Trans</i> -zeatin ribosid (tZR).....	25
2.2.4. Thidiazuron (TDZ).....	25
2.3. Ethylen	26
2.3.1. Historie	26
2.3.2. Struktura a biosyntéza ethylenu	27
2.3.3. Vliv ethylenu na růst a vývoj rostlin	28
2.4. Plynová chromatografie	31
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
3.1. Materiál a přístroje	33
3.1.1. Biologický materiál	33
3.1.2. Chemikálie	33
3.1.3. Pracovní pomůcky.....	33
3.1.4. Přístroje a zařízení.....	33
3.2. Metody	34
3.2.1. Test inhibice etiolovaného růstu pelušky.....	34

3.2.2. Měření produkce ethylenu.....	37
3.3. Výsledky.....	39
3.3.1. Brasinolid (BL)	39
3.3.2. 24-epibrasinolid (24-epiBL).....	41
3.3.3. Trans-zeatin ribosid (tZR).....	43
3.3.4. Kyselina indol-3yl-octová (IAA)	45
3.3.5. Kyselina gibberelová (GA3)	47
3.3.6. Thidiazuron (TDZ).....	49
3.3.7. Vliv testovaných látek na délku epikotylu etiolovaných rostlin pelušky	51
3.3.8. Vliv testovaných látek na produkci ethylenu u etiolovaných rostlin pelušky	52
3.3.9. Produkce ethylenu etiolovanými rostlinami pelušky po aplikaci 24- epiBL v časovém rozmezí 6-96 hodin.....	53
3.3.10 Optimalizace sycení Erlenmayerovy baňky ethylenem	55
4. DISKUSE	56
5. ZÁVĚR.....	60
6. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA	62
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	64

1. SEZNAM ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
ACO	ACC oxidáza
ACS	ACC syntasa
BA	benzyladenin
BAK	BRI1-associated receptor kinase
BES1	BRI1-ethyl methanesulfonate- supressor 1
BKI1	BRI1-kinase inhibitor 1
BL	brasinolid
BRs	brasinosteroidy
BRI1	brassinosteroid-insensitive 1
CCA1	circadian clock associated 1
CS	kastasteron
FID	plameno-ionizační detektor
GA	gibereliny
GA1,2	giberelin 1,2
GA3	kyselina giberelová
IAA	kyselina indol-3yl-octová
LRR	leucine-rich repeat
NAA	kyselina naftyloctová
PID	fotoionizační detektor
RT	retenční čas

TCD	termálně konduktivní detektor
TDZ	thidiazuron
TOC1	timing of CAB expression 1
tZR	trans-zeatin ribosid
UP	Univerzita Palackého
ÚEB AV ČR	Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky
XTHs	xyloglukan endo-transglukosylázy/hydrolázy
24-epiBL	24-epibrassinolid
24-epiCS	24-epikastasteron

2. ÚVOD

Brasinosteroidy (BRs) tvoří skupinu steroidních rostlinných hormonů, která zahrnuje kolem 70 příbuzných látek a jsou rozšířené v celé rostlinné říši. BRs byly nalezeny a izolovány ze semen, plodů, listů, květů a pylu. Mezi hlavní fyziologické účinky BRs na rostliny patří vliv na růst a dělení buňky a vliv na průběh stresové reakce.

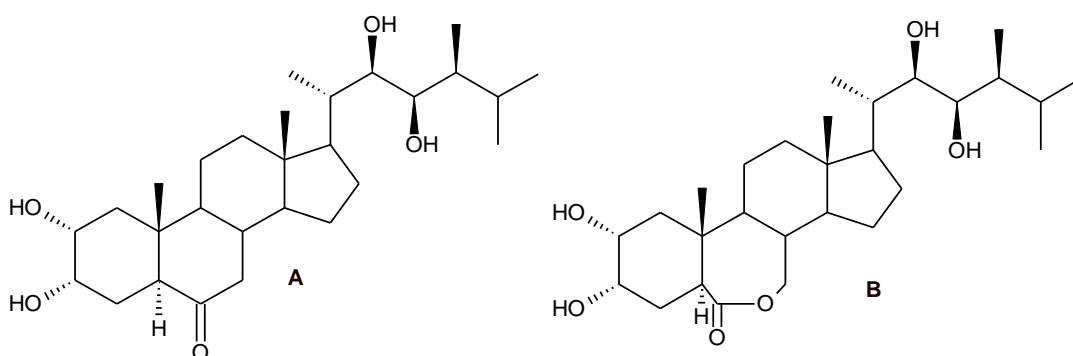
Ethylen je jediný plynný hormon. Ačkoliv jeho struktura je velmi jednoduchá, ethylen se podílí na regulaci řady vývojových procesů v rostlinách. Ovlivňuje klíčení rostlin, senescenci rostlin a abscisi listů. V literatuře můžeme najít zprávy o stimulaci produkce ethylenu vlivem brasinosteroidů (Arteca et al. 1983; 1987).

V Laboratoři růstových regulátorů byl sestaven a optimalizován nový biotest inhibice etiolovaného růstu pelušky, který je založen na skutečnosti, že BRs ve vyšší koncentraci inhibují růst etiolovaných klíčících rostlin – tato inhibice je pravděpodobně způsobena produkcí ethylenu, která je vyvolána vlivem BRs. V tomto testu byla použita semena pelušky (*Pisum arvense* L. sort *Arvika*). Jako testované látky byly použity přírodní brasinosteroidy (BL, 24-epiBL), jejichž účinky byly srovnávány s jinými fytohormony (tZR, IAA, GA3, TDZ). Tento biotest se ukázal jako velmi citlivý, protože díky němu bylo možné detekovat i velmi nízká množství (10 fmol brasinolidu). Na závěr byla také sestavena a optimalizována vhodná metoda na detekci produkovaného ethylenu a následně byl otestován vliv různých fytohormonů na produkci ethylenu v etiolovaných rostlinách pelušky.

2.1. Brasinosteroidy

2.1.1. Chemická struktura a výskyt BRs

Brasinosteroidy patří mezi poměrně mladou skupinu rostlinných hormonů. Byly objeveny v roce 1970, když Mitchell a jeho spolupracovníci zjistily, že extrakty z pylu řepky (*Brassica napus*) mají podpůrný vliv na růst stonku a dělení buněk rostlin (Mitchell et al., 1970) V roce 1979 pak byla izolována první biologicky aktivní látka, odpovědná za zmíněné biologické účinky řepkového pylu a byla nazvána brasinolid (Grove et al., 1979). V následujících dvou letech se podařilo brasinolid (BL) a jeho stereoizomer 24-epibrasinolid (24-epiBL) chemicky syntetizovat, což nahradilo vysoce nákladný postup izolace těchto látek z rostlin. S dostatkem nasyntetizované látky se výzkum mohl zaměřit na určení fyziologického vlivu brasinosteroidů (Cutler, 1991). Brasinolid je z chemického hlediska polyhydroxyderivát 5α -cholestanu. Rostlinné brasinosteroidy jsou tedy látky strukturně podobné cholesterolu, ze kterého jsou odvozeny steroidní hormony u živočichů - například androgeny, estrogeny, kortikoidy (u obratlovců) a ekdysteroidy (u korýšů a hmyzu) (Fujioka, 1999). Kromě BL řadíme do skupiny brasinosteroidů dalších asi 68 endogenních BRs. Podle struktury B kruhu můžeme BRs rozdělit do 2 velkých skupin na 6-keto BRs a brasinosteroidy s laktonovou strukturou.



Obr č. 1: Chemická struktura kastasteronu (A) a brasinolidu (B) jako dvou nejrozšířenějších zástupců brasinosteroidů.

Brasinosteroidy se v rostlinách vyskytují i ve formě konjugátu s mastnými kyselinami nebo cukry (Bajguz, 2011) nebo jako biosyntetické prekurzory a metabolické produkty brasinolidu (Mandava, 1988).

Výskyt brasinosteroidů byl potvrzen v celé řadě vyšších i nižších rostlin (53 krytosemenných rostlin, z toho 41 dvouděložných a 12 jednoděložných, 6 rostlin gymnospermních, 3 řasy, 1 mech a 1 pterophytu) (Bajguz, 2011). Endogenní hladina brasinosteroidů se liší v závislosti na druhu rostliny a rostlinném orgánu. Nejvyšší obsah brasinosteroidů je v semenech, pylu a květních částech. Mladé, rostoucí výhonky mají vyšší hladinu BRs než dospělá pletiva a kořeny (Bajguz, 2011).

2.1.2. Biosyntéza a metabolismus brasinosteroidů

BRs jsou skupina modifikovaných sterolů, proto můžeme jejich biosyntézu rozdělit na dvě hlavní části:

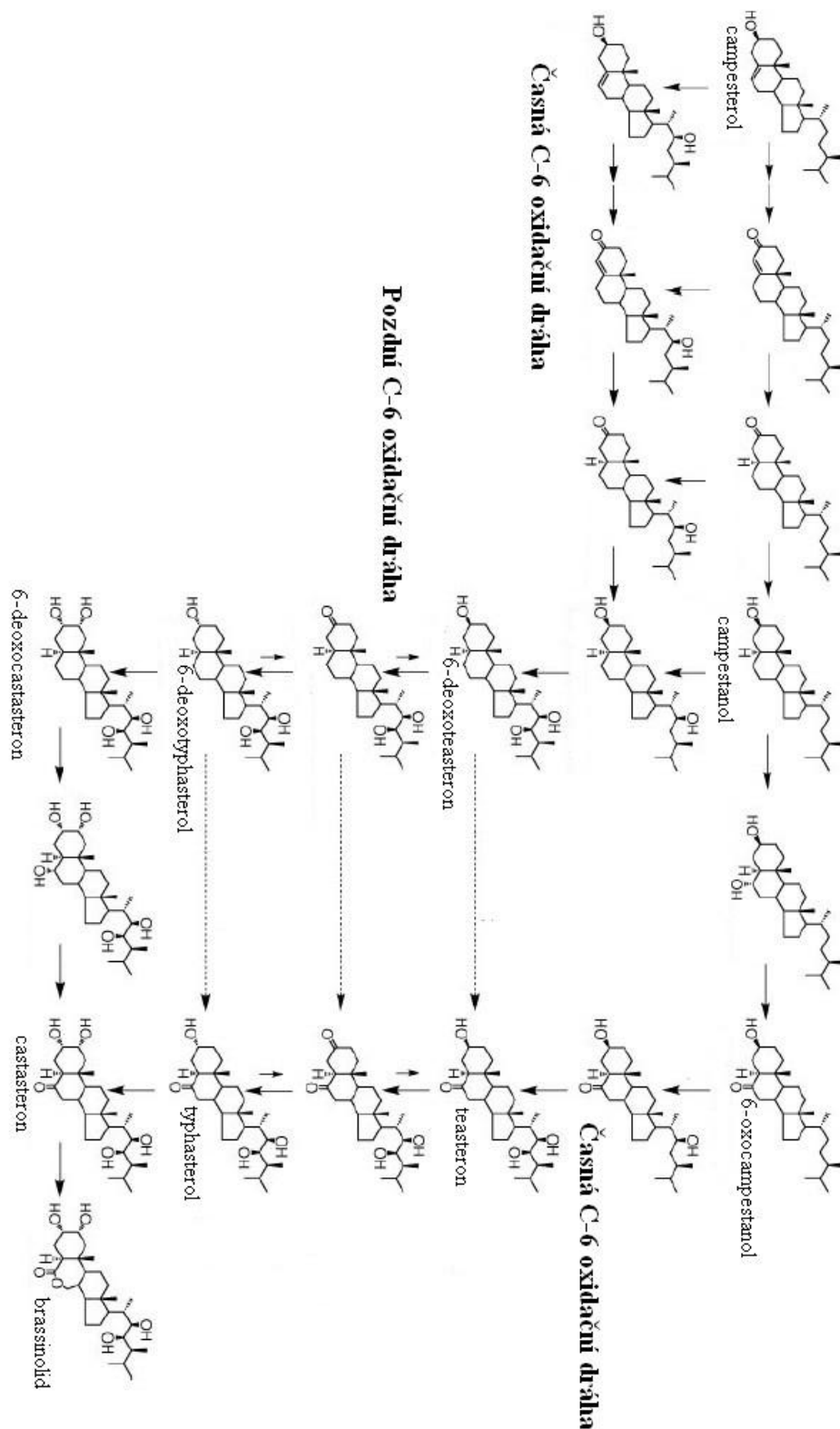
- 1.) biosyntetickou dráhu, jednotnou pro steroly (skvalen -> kampesterol)
- 2.) biosyntetickou dráhu, specifickou pro brasinosteroidy, která je nutná pro vznik bioaktivních BRs ze sterolů. (kampesterol->brasinolid)

Biosyntetické dráhy brasinolidu byly poprvé objasněny při použití kultury nediferenciovaných buněk barvínku růžového (*Catharanthus roseus* L.). Rozsáhlé metabolické studie navrhly dvě paralelní biosyntetické dráhy pro BL. Jedná se o ranou a pozdní C-6 oxidační dráhu (Sakurai a Fujioka, 1997; Sakurai, 1999). Dnešní studie předpokládají, že raná a pozdní C-6 oxidační dráha nejsou zcela autonomní, ale že jsou obě tyto biosyntetické dráhy propojené (Hong et al., 2002; Noguchi et al., 2000). Na obrázku (Obr č.2) lze vidět, že kampesterol je nejdříve přeměněn na kampestanol, který je pak dále přeměněn na kastasteron a to buď časnou nebo pozdní C-6 oxidací. Poslední krok je přeměna kastasteronu na brasinolid. V rostlině rajčete nebo tabáku se ukázalo, že pozdní C-6 oxidační dráha je dominantní, protože endogenní brasinosteroidy v těchto druzích zahrnují pouze látky pozdní C-6 oxidační dráhy (Koka et al., 2000).

Detailní analýza metabolismu brasinosteroidů na molekulární a biochemické úrovni je nezbytná k pochopení regulačního mechanismu bioaktivních brasinosteroidů. Metabolické cesty zjištěné pomocí experimentů založených na aplikaci exogenních brasinosteroidů nemusejí vždy odpovídat metabolismu endogenních BRs, ale dokazují schopnost rostlin metabolizovat BRs (Fujioka a Yokota, 2003). Základní deaktivační krok je v metabolismu brasinosteroidů β -epimerizace 2α -OH a 3α -OH (Yokota a Mori, 1992), tyto epimerizace mohou být pozorovány v metabolismu CS, BL a jejich 24-epimerů skrze odpovídající ketony (Hai et al., 1996). Při metabolismu 24-epimerů probíhá u houby *Cunninghamella echinulata* hydroxylace na C12, u vyšších rostlin je hydroxylován C20, C25 a C26. Hydroxylace na C20 je doprovázena štěpením vedlejšího řetězce mezi C20 a C22.

Pro kontrolu hladiny brasinosteroidů jsou také důležité konjugační procesy. Byl izolován gen odpovědný za sulfonaci 24-epimerických brasinosteroidů. U lilie je konjugována 3β -hydroxylová skupina teasteronu s mastnou kyselinou nebo

glukózou. V rajčeti je β -hydroxylová skupina 24-epiteasteronu modifikována glukózou nebo disacharidovými konjugáty. Obecně bývá teasteron udržován v rostlinách na nízké hladině, zřejmě protože bývá rychle konjugován. Naproti tomu typhasterol konjugován nebývá (Fujioka a Yokota, 2003).



Obr. č. 2: Biosyntetická dráha brassinosteroidů. Převzato a upraveno z Fujioka a Yokota (2003).

2.1.3. Vliv brasinosteroidů na růst a vývoj rostlin

2.1.3.1. Vliv BRs na růst rostlin

Nejlépe známý a nejvíce prozkoumaný biologický vliv brasinosteroidů je jejich schopnost stimulovat růst rostlin. Stimulační vliv BRs na růst semenáčků byl sledován v řadě biotestů, ve kterých bylo například pozorováno prodlužování epikotylů hrachu, fazole nebo hypokotylů okurky, slunečnice (Katsumi, 1991). Obecně mají brasinosteroidy vliv na růst rostlin na světle, tento vliv naopak není pozorován ve tmě (Mandava, 1988).

Inhibiční vliv BRs na růst adventivních kořenů byl pozorován na hypokotylu fazole mungo (Yopp, 1981). Další studie však ukazují, že tato inhibice možná není způsobena primárně vlivem BRs, ale je dána rozdílem v optimální koncentraci brasinosteroidů pro vývoj adventivních kořenů a pro růst nadzemní části (Roddick, 1995). Další testování prokázalo, že BRs v nízké koncentraci mohou vyvolávat formování postranních kořenů, za těchto podmínek fungují synergicky s auxiny (Bao et al., 2004).

Fenotypy BR-deficientních mutantů mají zřetelně redukováný kořen, což naznačuje, že BRs jsou nutné pro správný růst kořene. V závislosti na koncentraci mohou mít exogenně aplikované BRs pozitivní i negativní vliv na růst kořene. V nízké koncentraci brasinosteroidy podporují růst kořene a naopak při vysoké koncentraci aplikovaných BRs je růst kořene inhibován. Práh koncentrace pro inhibici růstu kořene je různý v závislosti na aktivitě použitého BR-analogu (Mussing, 2005).

3.1.3.2. Vliv BRs na prodlužování buněk

Zakrslý vzrůst BR-deficientních mutantů, který mizí po exogenním přidání brasinosteroidů je přímý důkaz, že brasinosteroidy jsou nepostradatelné pro normální růst rostlin. Zkoumáním buněk normálních *Arabidopsis* a *cbb*, *dwf4*, *cpd* a *dim* mutantních rostlin světelným a elektronovým mikroskopem bylo dokázáno, že u mutantních rostlin je redukován dlouhivý růst buněk (Takahashi et al., 1995; Kauschmann et al., 1996; Szekeres et al., 1996; Azpiroz et al., 1998).

Zvětšování buněk nutné pro růst a diferenciaci všech rostlinných orgánů je řízeno koordinovanými změnami mechanických vlastností buněčné stěny, buněčné hydrauliky, biochemickými procesy a genovou expresí (Cosgrove, 1997). Jasnými cílovými místy pro hormony, které mají vliv na růst buněk, jsou proto místa regulace syntézy nebo aktivity enzymů, které mají vliv na modifikaci buněčné stěny (například XTHs, glukánázy, celulozasyntázy) (Clouse, 2011). Ve prospěch tohoto tvrzení byla v sóji, rajčeti a *Arabidopsis* potvrzena regulace genů kódujících XTHs a expanziny právě vlivem brasinosteroidů (Clouse, 1997).

Biofyzikální měření potvrdily význam brasinosteroidů při rozvolňování buněčné stěny v epikotylu sóji (*Glycine max*) (Zurek et al., 1994) a v hypokotylech čínské zelné (*Brassica chinensis*) a tykve (*Cucurbita maxima*) (Wang et al., 1993; Tominaga et al., 1994). Vyvolání buněčného růstu skrze BR-regulovanou expresi genů zapojených do modifikace buněčné stěny, biosyntézy celulózy, transportu vody a iontů bylo demonstrováno v několika genetických studiích (Vert et al., 2005; Kim a Wang, 2010).

Je známo, že pro určení orientace růstu buněk je důležité uspořádání kortikálních mikrotubulů. Ukázalo se, že brasinosteroidy ovlivňují rekonfiguraci mikrotubulů na transverzální orientaci a tak je umožněn longitudinální růst (Mayumi and Shibaoka, 1995).

U mutantu *dim* je redukována exprese specifického tubulinového genu, který je pravděpodobně zahrnut v procesu růstu buňky (Takahashi et al., 1995). Pomocí imunofluorescence alfa-tubulinu v BR-deficientních mutantech *Arabidopsis* se ukázalo, že brasinosteroidy mohou vyvolávat reorganizaci mikrotubulů a buněčný růst bez nárůstu tubulinové genové exprese (Catterau et al., 2001).

Kromě změn vlastností buněčné stěny mohou brasinosteroidy vyvolávat také změnu transportu vody přes aquaporiny a změnu aktivity H⁺-ATPázy. Tyto dvě změny jsou také spojeny s růstem buňky (Schumacher et al., 1999; Morillon et al., 2001).

Dnešní studie, které kombinují fluorescenční spektroskopii, konfokální mikroskopii a elektrofyziologii předpokládají, že brasinosteroidy vyvolávají membránovou hyperpolarizaci a rychlé prodlužování buňky skrze BR-modulovanou interakci BRI1 a ATPázy v plazmatické membráně (Caesar et al., 2011).

2.1.3.3. Vliv BRs na buněčné dělení

Prvotní testy brasinosteroidů na druhém internodiu fazole odhalily vliv BRs na dělení buněk (Steffens, 1991). V kultuře parenchymatických buněk slunečnice topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) (Clouse a Zurek, 1991) a v protoplastu čínské zeli (*Brassica chinensis*) a petunie (*Petunia hybrida*) (Nakajima et al., 1996; Oh and Clouse, 1998) bylo prokázáno, že brasinosteroidy v přítomnosti auxinů a cytokininů stimulují buněčné dělení. Další pokusy potvrdily, že brasinosteroidy zvyšují mitotický index v buňkách kořenové špičky cibule (*Allium cepa*) (Howell et al., 2007)

2.1.3.4. Vliv BRs na diferenciaci buňky

Bylo dokázáno, že kromě auxinů a cytokininů mají i brasinosteroidy vliv na proces diferenciaci cévních svazků. Například již nanomolární hladina brasinolidu stimuluje tvorbu tracheid ve dvou základních modelových systémech pro studium xylogeneze: v explantátech slunečnice topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) a v izolovaných mezofylních buňkách ostálky sličné (*Zinnia elegans*) (Clouse a Zurek, 1991; Iwasaki a Shibaoka, 1991). V systému *Zinnia elegans* brasinosteroidy také regulují expresi několika genů zapojených do formování xylému (Fukuda, 1997).

Další práce na *Arabidopsis* ukazují, že brasinosteroidy ovlivňují počet cévních svazků v nadzemní části rostliny (Ibanes, 2009). V několika pokusech bylo také prokázáno, že brasinosteroidy regulují diferenciaci prekambialiálních buněk v xylému částečně skrze regulaci transkripce genů, případně HD-ZIP transkripčních faktorů, které jsou nutné pro tento proces (Ohashi-Ito a Fukuda, 2003; Fukuda, 2004; Ohashi-Ito et al., 2005; Ohashi-Ito a Fukuda, 2010). Pro tento proces je

nezbytná BRI1 receptorová kináza a její blízké příbuzné BRL1 a BRL2 kinázy (Cano-Delgado et al., 2004; Fukuda, 2004).

2.1.3.5. Vliv BRs reprodukci a senescenci

Pro většinu BR-deficientních a BR-insenzitivních mutantů je charakteristická nižší plodnost nebo samčí sterilita. Pyl je bohatý zdroj endogenních brasinosteroidů a *in vitro* pokusy na třešni (*Prunus avium*) ukazují, že růst pylové láčky je částečně závislý na hladině brasinosteroidů (Hewitt et al., 1985). Dnešní studie ukazují, že transkripční faktor BES1 se váže přímo na promotory některých genů, které regulují vývoj prašníku a pylu. U BR-mutantů mají tyto geny pozměněnou expresi, která vede k viditelným defektům na prašnicích nebo k defektům pylové morfologie (Ye et al., 2010).

U mutantu *cpd* je samčí sterilita způsobena neschopností pylu tvořit pylovou láčku (Szekeres et al., 1996). U mutantu *dwf4* je pyl na rozdíl od mutantu *cpd* životaschopný a sterilita je v tomto případě způsobena zkrácenou délkou tyčinek (Choe et al., 1998). Jediný fertilní BR-mutant *Arabidopsis* je *dwf5-1*, který má jako jediný tyčinky delší než pestík (Choe et al., 2000). Přestože je mutant *dwf5-1* fertilní, tvoří semena, která se nevyvíjejí normálně, a pro správné klíčení je nutné exogenně dodat brasinosteroidy. Na základě tohoto zjištění se usuzuje, že brasinosteroidy mají vliv na klíčení semen, přestože žádný jiný BR-mutant nevyžaduje pro klíčení BRs v médiu (Choe et al., 2000).

Během vývoje semen hrají kyselina abscisová (ABA) a gibereliny (GA) antagonistickou roli při spouštění či ukončení dormance. Bylo zjištěno, že brasinosteroidy ruší vady klíčení, které jsou způsobeny nedostatkem giberelinů u GA-deficitních nebo GA-insenzitivních mutantů. Dále bylo zjištěno, že BR-mutanti *det2* a *bril* jsou více citliví na inhibici klíčení způsobenou ABA než normální *Arabidopsis*. Z těchto poznatků vyplývá, že přenos BR signálu je nutný k narušení dormance indukované ABA a ke stimulaci klíčení (Steber and McCourt, 2001). Genetické studie naznačují, že specifický protein v signální dráze ABA by zároveň mohl být cílovým místem vazby brasinosteroidů při regulaci klíčení (Xi and Yu., 2010).

Kromě snížené plodnosti charakterizuje většinu BR-mutantů také delší životnost a opožděná senescence. Průměrně *Arabidopsis* přechází do senescence přibližně po 60 dnech, BR-mutanti dokážou zůstat zelení a iniciovat nové květy

i po 100 dnech. Oddálení senescence koreluje se sníženou fertilitou - zcela sterilní mutanti (například *br11*) mají nejdelší vývoj. Předpokládá se tedy, že neschopnost vytvářet a přenášet signál pro nástup senescence vede u sterilního mutanta k prodloužení životnosti (Choe et al., 1999). Naopak fertilní mutant *dwf5-1* nevykazuje oddálenou senescenci (Choe et al., 2000).

2.1.3.6. Zapojení BRs při stresových reakcích

Vliv brasinosteroidů na zvyšování rezistence rostlin vůči vnějším abiotickým stresům byl zkoumán a hodnocen především s myšlenkou na uplatnění a aplikaci BRs v zemědělství. Nejvíce byl zkoumán teplotní stres, protože teplotní změny se zdají být nejrychlejší. Semenáčky kukuřice jsou během klíčení a během časných období růstu velmi citlivé na chladový stres. Po aplikaci brasinosteroidů semenáčky obnovovaly růst i za nízké teploty. BRs navíc vyvolávaly znovuzelenání etiolovaných listů na světle (He et al., 1991).

Při stresu vysokými teplotami brasinosteroidy vyvolávaly v listech pšenice syntézu proteinů. Syntéza proteinů po aplikaci BRs byla zachována i při 43 °C na úrovni syntézy při 23 °C, zatímco bez aplikaci BRs byla hladina proteinů při 43 °C 2,5 krát nižší (Kulaeva et al., 1991).

Byla také studována schopnost brasinosteroidů zvýšit rezistenci rostlin vůči infekci houbovými patogeny. Rostliny brambor po aplikaci BRs ve formě spreje vykazovaly menší výskyt infekce *Phytophthora infestans* (Khripach et al., 1999). Některé koncentrace BRs, případně aplikace BRs v určitých vývojových stádiích můžou být spojeny s podporou růstu houbového patogena a rozvoji choroby. Z toho vyplývá, že koncentrace BRs, správné načasování a způsob aplikace jsou důležitá hlediska pro použití BRs jako fungicidů (Krishna, 2003).

2.1.4. Biotesty brasinosteroidů

Biotesty jsou obecně velmi důležité pro studium látek, které podporují růst rostlin. BRs se v rostlinách vyskytují v extrémně nízkých koncentracích a vykazují významnou biologickou aktivitu, proto jejich identifikace vyžaduje citlivé a specifické biotesty, které jsou schopné odlišit BRs od ostatních endogenních fytohormonů. Pro testování BRs byly použity testy sestavené pro jiné rostlinné hormony, zároveň však byly vyvinuty i nové specifické biotesty pro BRs (Khripach et al., 1999).

2.1.4.1. Biotest na druhém internodu fazole

Tento biotest byl poprvé použit při monitorování biologické aktivity „brasinového komplexu“ (Mitchell et al., 1970, 1971; Mandava a Mitchell, 1971). Později byl také použit pro izolaci čistého brasinolidu z pylu řepky olejky (Grove et al., 1979).

Během tohoto testu jsou rostliny fazole (*Phaseolus vulgaris*) pěstovány 6 dní při teplotě 25-27 °C. Testovaná látka rozpuštěná v lanolinu se aplikuje na místo odstraněného listenu na bázi druhého internodia semenáčků, přičemž pro dosažení optimálního efektu nesmí být délka internodia větší než 2 mm. Na kontrolní rostliny je aplikován čistý lanolin. Po 4 dnech od aplikace se provádí hodnocení, které spočívá v porovnávání délek druhého internodia testovaných rostlin oproti druhému internodiu kontrolní rostliny. Tento biotest je použitelný i pro gibereliny, které ale způsobují pouze prodloužení internodia, kdežto BRs zároveň vyvolávají i zakřivování, štěpení a zduření internodií. Tato reakce bývá nazývána „brasinová aktivita“ a je pozorovatelná pouze po aplikaci BRs. Zduření a zakřivení je viditelné již při aplikaci 0,01 µg BL na rostlinu. Citlivost biotestu lze zvýšit vynecháním nitrátu a přidáním Ca^{2+} a Mn^{2+} do živného roztoku (Kohout et al., 1991).

2.1.4.2. Rýžový ohybový biotest

Tento biotest je jeden z nejvíce populárních a nejvíce používaných testů pro hodnocení BR-aktivity. Původně byl vyvinut Maedou (1965) pro gibereliny a IAA. Pro brasinosteroidy byl použit ve dvou různých úpravách a to buďto s použitím intaktních rostlin (Takeno and Pharis, 1982) nebo s odříznutými segmenty (Wada et al., 1981). Biotest sestavený Wadou (1981) vypadá takto: semena zakrslé rýže (*Oryza sativa* L., cv. Kinmaze) jsou 2 dny inkubována ve vodě. Klíčící semena jsou poté přenesena na 1% agar a pěstována při teplotě 30 °C při fotoperiodě 8 hodin světlo/16 hodin tmy další 4 dny. Poté jsou ze semenáčků vyříznuty segmenty obsahující jazýček (1 cm dlouhý), kolénko a pochvu. Tyto segmenty jsou máčeny 24 hodin v destilované vodě, poté jsou inkubovány 48 hodin ve tmě při teplotě 30 °C v 1 ml 2,5 nM draselno-malátového roztoku a známým množstvím testované látky. Při hodnocení se měří úhel vzniklý mezi jazýčkem a pochvou. U kontrolních segmentů je tento úhel asi 90°, kdežto v přítomnosti 0,0005 µg/ml BL se úhel zvětší na 140°.

IAA způsobuje pouze slabý vliv na odchylku jazýčku v koncentraci 50 µg/ml (Wada et al., 1981). Také gibereliny mají slabý vliv na odchylku jazýčku v koncentraci 100 µg/ml. Citlivost tohoto testu se mění s použitím různého kultivaru rýže. Z 60 kultivarů byly vyhodnoceny jako nejvíce spolehlivé kultivary Arborio J-1 a Nihinbare (Wada et al., 1984).

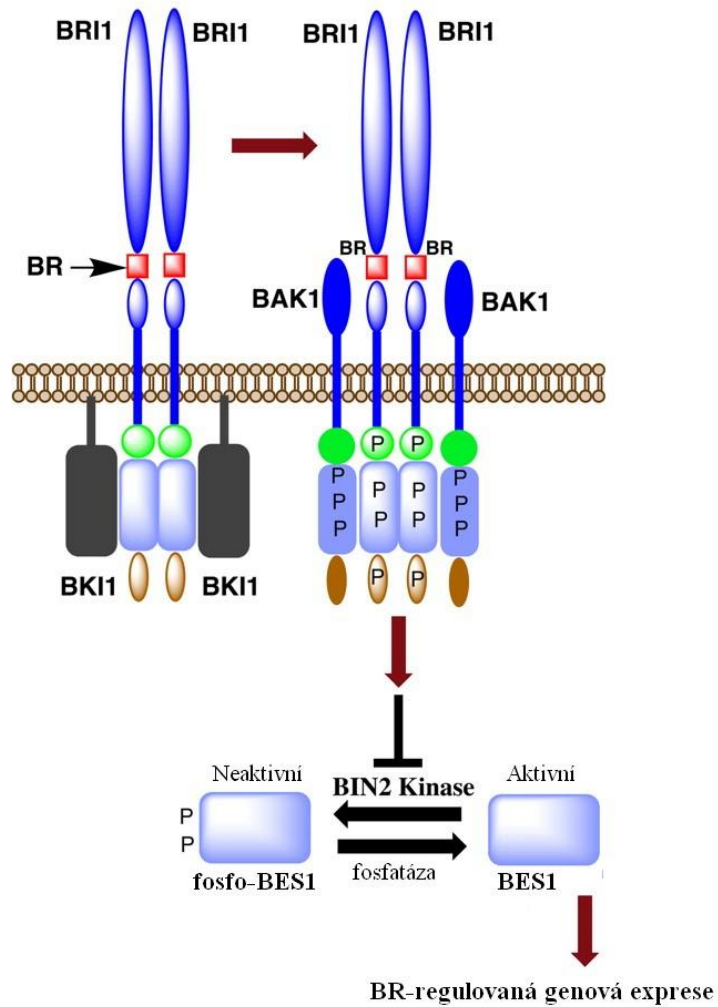
2.1.3. Signální dráhy a transport brasinosteroidů

Díky genetickým analýzám BR-odpovědi byl identifikován nejen receptorový protein lokalizovaný na plazmatické membráně, ale i několik dalších součástí BR-signální dráhy. Díky tomu dnes mnohem lépe rozumíme aktivitě brasinosteroidů na molekulární bázi.

K identifikaci složek signální dráhy brasinosteroidů u *Arabidopsis* byly genetické analýzy zpočátku zaměřeny na izolaci mutantů, kteří se vyznačovali normálním prodlužováním kořene i při vysoké koncentraci BL. Tak byl identifikován jednoduchý bri1 mutant (brasinosteroid insenzitivní 1) (Clouse et al., 1996). Další analýzy ukázaly, že všechny BR-insenzitivní mutanti mají mutantní alelu BRI1 (Li and Chory, 1997), což prokazuje, že BRI1 je esenciální složka signální dráhy BRs. Z navazujících studií vyplývá, že BL se s vysokou specifitou váže přímo na BRI1, což znamená, že BRI1 je receptor pro brasinosteroidy (Kinoshita et al., 2005). BRI1 je receptorová kináza bohatá na leucin nacházející se na plazmatické membráně. Receptorové kinázy bohaté na leucin zastupují u *Arabidopsis* největší třídu receptorů. Tyto kinázy mají charakteristickou doménovou strukturu, která se skládá z N-koncové extracelulární domény s vícenásobným tandemem LRR motivů, jednoduché transmembránové domény a z cytoplazmatické kinázové domény se specifitou k tyrosinovým, serinovým a threoninovým zbytkům. V BRI1 je 25 LRR, BRI1 také obsahuje úsek aminokyselin nazývaný „island domain“, který se nachází mezi 21 a 22 LRR. Tato doména spolu se sousední LRR 22 vytváří specifické vazebné místo pro BRs (Kinoshita et al., 2005). Rozsáhlé analýzy BR-mutantních alel dokazují, že pro přenos BR-signálu z cytoplazmatické membrány do zbytku buňky je nutná jak extracelulární receptorová, tak i vnitřní kinázová doména (Friedrichsen et al., 2000; Vert et al., 2005).

Brasinolid se tedy váže na BRI1 skrze steroidní vazebnou doménu velkou přibližně 100 aminokyselin. Tato doména zahrnuje „island domain“ a LRR sekvenci, která s ní sousedí. Vazba BL na tuto doménu aktivuje BRI1 receptor, aktivovaný BRI1 receptor se vyznačuje vyšší autofosforylační aktivitou a zároveň se spojuje s další LRR receptor kinázou - BAK (BRI1-associated receptor kinase 1). V přítomnosti brasinolidu na BRI1 jsou fosforylovány in vivo intracelulární domény.

Tato fosforylační místa hrají důležitou roli při regulaci receptorové aktivity a při kontrole disociace inhibitoru BKI1 (BRI1-kinase inhibitor 1) z plazmatické membrány (Wang et al., 2005a,b; Wang a Chory, 2006; Tang et al., 2008).



Obr. č. 3: Signální dráha brasinosteroidů. Převzato a upraveno z Clouse (2008).

2.2. Další testované regulátory růstu

2.2.1. Kyselina indol-3yl-octová (IAA)

Indol-3yl-octová kyselina (IAA) je hlavním přírodním auxinem. Ve vyšších rostlinách byly objeveny i další auxiny, ale IAA je z fyziologického hlediska nejdůležitější a vyskytuje se v rostlinách v největším množství. Protože struktura IAA je relativně jednoduchá, řada laboratoří začala rychle syntetizovat mnoho molekul s auxinovou aktivitou. Některé z těchto látek jsou dnes hojně využívány v zemědělství jako herbicidy. Auxiny ovlivňují především buněčnou elongaci v koleoptile a stonku, schopnost tvořit adventivní kořeny na oddělených stoncích nebo listech a podporují buněčné dělení v kalusu za přítomnosti cytokininů (Taiz a Zeiger, 2010).

2.2.2. Kyselina giberelová (GA₃)

V 50. letech 20. století objasnily dvě skupiny vědců (jedna z Velké Británie a jedna z USA) chemickou strukturu látky, kterou obě vyizolovali z kultury houby *Gibberella* a tuto látku pak pojmenovaly kyselina giberelová (Taiz a Zeiger, 2010).

Přibližně ve stejnou dobu japonští vědci vyizolovali a charakterizovali tři další gibereliny, pojmenovali je giberelin A₁ (GA₁), giberelin A₂ (GA₂) a giberelin A₃ (GA₃). Později se ukázalo, že GA₃ odpovídá kyselině giberelové, kterou izolovali britští a američtí vědci, takže se pro GA₃ používá označení kyselina giberelová. GA₃ je jedním z giberelinů, který je zastoupen v rostlinách. Kyselina giberelová má výrazný vliv na prodlužování stonků a to i u trpasličích rostlin, dále GA₃ jako i ostatní gibereliny podněcují klíčení semen, stimulují růst kořenů a podporují vývoj pylu a růst pylové láčky (Taiz a Zeiger, 2010).

2.2.3. *Trans*-zeatin ribosid (tZR)

Trans-zeatin ribosid je (vedle *cis*-zeatin ribosidu) jednou ze dvou možných konfigurací zeatinu. Ve vyšších rostlinách se nacházejí obě konfigurace a přechod mezi *cis*- a *trans*-konfigurací je zprostředkováván enzymem, který se nazývá zeatin-izomeráza. *Trans* forma zeatinu se v biotestech projevuje jako více aktivní. Fyziologický vliv zeatinu a ostatních cytokininů spočívá v inhibici růstu kořene, v oddálení senescence listů a ve snižování apikální dominance. Podstatný je také vliv cytokininů na transportní procesy v rostlinách a dále hrají cytokininy důležitou roli při tvorbě hlízek a při symbióze s bakteriemi, které váží vzdušný dusík (Taiz a Zeiger, 2010).

2.2.4. Thidiazuron (TDZ)

Thidiazuron je synteticky připravená látka vyvolávající cytokininovou aktivitu. Komerčně se thidiazuron používá jako defoliant a herbicid (Taiz a Zeiger, 2010).

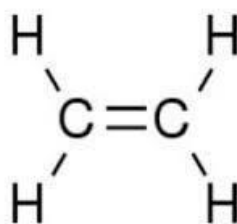
2.3. Ethylen

2.3.1. Historie

V roce 1901 si Dimitry Něljubov (student v St. Petěrburgu) všiml, že ethylen uvolňovaný z laboratorních lamp spalujících svítíplyn, způsobuje odlišný růst etiolovaných rostlin hrachu. Zároveň si všiml, že stromy, které na ulici rostou v blízkosti lamp spalujících svítíplyn, shazují listy předčasně. Proto považujeme Něljubova za prvního, kdo poukázal na vliv ethylenu na růst a vývoj rostlin (Hodson a Bryant, 2012).

V roce 1910 byl H. H. Cousinsem popsán vliv ethylenu (jakožto přirozeného plynného produktu) na dozrávání banánů. Při delší přepravě ovoce v uzavřených lodních prostorech doporučil skladovat pomeranče a banány zvlášť, protože při společném skladování banány předčasně dozrávají. Ethylen se dodnes používá v běžné praxi pro dozrávání banánů (Pavlová a Fischer, 2011). V roce 1934 byl R. Ganem ethylen identifikován jako přirozený plynný metabolit fytohormonální povahy. R. Gane tehdy analyzoval těkavé látky, které produkovala zrající jablka (Pavlová and Fischer, 2011).

Rozvoj studia ethylenu jako plynného fytohormonu ovšem nastal až s vývojem metod plynové chromatografie v 50. letech 20. století a teprve v 80. letech byla popsána jeho biosyntetická dráha (Hodson a Bryant, 2012).



Obr. č. 4: Struktura ethylenu.

2.3.2. Struktura a biosyntéza ethylenu

Ethylen je z chemického hlediska nejjednodušší alken, jehož molární hmotnost je 28. Ve fyziologických podmínkách je lehčí než vzduch a lehce se oxiduje. Téměř všechny části vyšších rostlin mohou produkovat ethylen, ačkoliv množství produkovaného ethylenu je závislé na typu pletiva a fázi vývoje. Produkce ethylenu roste během opadu listů, dozrávání plodů a stárnutí rostliny. Biosyntéza ethylenu může být také vyvolána jakýmkoliv typem poranění rostliny, vlivem fyziologického stresu, případně vlivem infekce způsobené rozmanitými patogeny. Prekurzorem ethylenu je aminokyselina methionin a meziproduktem přeměny methioninu na ethylen je 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina (ACC). Po exogenní aplikaci ACC na rostlinné pletivo značně stoupá produkce ethylenu v rostlině. Enzym ACC syntasa (ACS) katalyzuje přeměnu AdoMet (S-adenosyl-methioninu) na ACC. Hladina ACS je ovlivňována vnějším prostředím (poraněním, suchem) i vnitřními faktory (hladinou auxinů). Enzym ACC oxidasa (ACO) katalyzuje poslední krok v biosyntéze ethylenu, tzn. přeměnu ACC na ethylen (Taiz a Zeiger, 2010). Na biosyntézu ethylenu má vliv mnoho vnitřních a vnějších faktorů:

- Stresem indukovaná produkce ethylenu

Biosyntéza ethylenu narůstá ve stresových podmínkách, jako je například sucho nebo naopak zaplavení, chlad, vystavení ozónu a mechanické poranění. V těchto případech vzniká ethylen skrze obvyklou biosyntetickou dráhu. Tento „stresový ethylen“ je součástí počáteční fáze stresové reakce (Taiz a Zeiger, 2010).

- Periodická regulace produkce ethylenu

U mnoha rostlinných druhů řídí biosyntézu ethylenu takzvané cirkadiální hodiny. Obecně je nejvyšší produkce ethylenu pozorována v poledne, nejnižší produkce ethylenu je naopak zaznamenána uprostřed noci. Tyto výkyvy jsou pravděpodobně způsobeny transkripční kontrolou několika ACS genů, která je zprostředkována u *Arabidopsis* skrze TOC1/CCA1 hodiny (Thain et al., 2004).

- Auxiny indukovaná produkce ethylenu

V některých případech vyvolávají u rostlin auxiny a ethylen podobnou odpověď. Tyto odpovědi jsou pravděpodobně způsobeny schopností auxinů vyvolávat syntézu ethylenu a to prostřednictvím zvýšení aktivity enzymu ACS. Tento fakt by znamenal, že některé reakce rostlin přisuzované auxinům by ve skutečnosti byly způsobeny ethylenem, který vznikl jako odpověď na auxin (Yang a Hoffman, 1984). Po aplikaci IAA na oddělené subapikální části stonků hrachu, byl skutečně pozorován nárůst v produkci ethylenu (Jones a Kende, 1979).

2.3.3. Vliv ethylenu na růst a vývoj rostlin

- Dozrávání plodů

Po vystavení plodů ethylenu dochází u většiny rostlin ke zrychlení procesů spjatých s jejich dozráváním. Tato skutečnost dává možnost ovlivňovat zrání plodů během skladování. Jako jeden z důkazů nutnosti ethylenu při dozrávání plodů lze uvést mutantní rostlinu rajčete, která bývá označována jako „nezrající“. Jak název vypovídá, tato mutace zcela brání dozrávání plodů rajčete. Molekulární analýzy odhalily, že nedozrávání plodů tohoto mutanta je způsobeno mutací ethylenového receptoru, který je pozměněný a není schopný vázat ethylen (Lanahan et al., 1994).

- Epinastie listů

Ethylen a vysoké koncentrace auxinů způsobují epinastii listů. Bylo zjištěno, že auxiny způsobují epinastii nepřímo a to svým vlivem na zvýšení produkce ethylenu (Taiz a Zeiger, 2010).

U rajčete a dalších dvouděložných rostlin způsobuje zaplavení kořenů zvýšení syntézy ethylenu v prýtu, která vede k epinastické odpovědi. Protože tento environmentální stres je zaznamenáván kořeny, ale odpověď na něj je pozorována v nadzemní části rostliny, musí existovat signál, který je transportován z kořene do prýtu. Tento signál je ve skutečnosti ACC - přímý biosyntetický prekurzor ethylenu, což bylo prokázáno v experimentu, ve kterém byla zaznamenána výrazně vyšší hladina ACC v xylému rostlin rajčat, která byla vystavena zaplavení (Bradford a Yang, 1980).

- Laterální růst buněk

Již při nízké koncentraci ethylen mění u semenáčků rostlin růstový vzorec tak, že se u těchto semenáčků zastavuje elongační růst a naopak je podporován růst laterální, což vede k tloušťnutí hypokotyly či epikotyly. Tyto jevy jsou součástí takzvané trojné odezvy na ethylen. Směr růstu buňky je vymezen orientací mikrofibril v buněčné stěně. Během trojné odezvy na ethylen se mikrofibrily v buněčných stěnách otočí o 90°. Toto nové uspořádání buněčné stěny zvyhodňuje laterální růst nad prodlužováním (Taiz a Zeiger, 2010).

- Zakřivení vrcholu u rostlin rostoucích ve tmě

Apikální klička vzniká asymetrickým růstem vlivem ethylenu stejně jako epinastie. Toto zakřivení usnadňuje pronikání klíčící rostliny skrze půdu (Taiz a Zeiger, 2010).

- Ukončení dormance semen a pupenů

Ethylen má u některých semen schopnost přerušit dormanci a zahájit klíčení. Zároveň ethylen může porušit i dormanci pupenů, proto bývá používán k vyvolání rašení pupenů například u brambor (Taiz a Zeiger, 2010).

- Vznik kořenů a kořenových vlásků

Ethylen je schopný vyvolat vznik adventivních kořenů na listech, stoncích nebo jiných kořenech. Odříznuté vegetativní stonky rajčete nebo petunie vytvářejí jako odpověď na aplikaci auxinů mnoho adventivních kořenů, ale u mutantů insensitivních k ethylenu tento podpůrný jev auxinů nebyl pozorován nebo se vyskytoval v omezené míře, což naznačuje, že podpůrný vliv auxinů na vznik adventivních kořenů je zprostředkován skrze ethylen (Clark et al., 1999). Bylo prokázáno, že ethylen také funguje jako pozitivní regulátor vzniku kořenových vlásků u některých druhů rostlin. Tato regulace je nejlépe prozkoumána u *Arabidopsis* (Taiz a Zeiger, 2010).

- Regulace kvetení a determinace pohlaví

Přestože u většiny rostlin ethylen brzdí kvetení, tak u ananasu ethylen kvetení naopak iniciuje (Trusov a Botella, 2006), čehož se komerčně využívá k synchronizaci tvorby plodů.

U rostlin, které mají oddělené samčí a samičí květy, může ethylen u vyvíjejících se květů měnit pohlaví (Taiz a Zeiger, 2010).

- Defoliace listů

Ukázalo se, že ethylen je jedním ze základních pozitivních regulátorů abscise listů (Taiz a Zeiger, 2010).

2.4. Plynová chromatografie

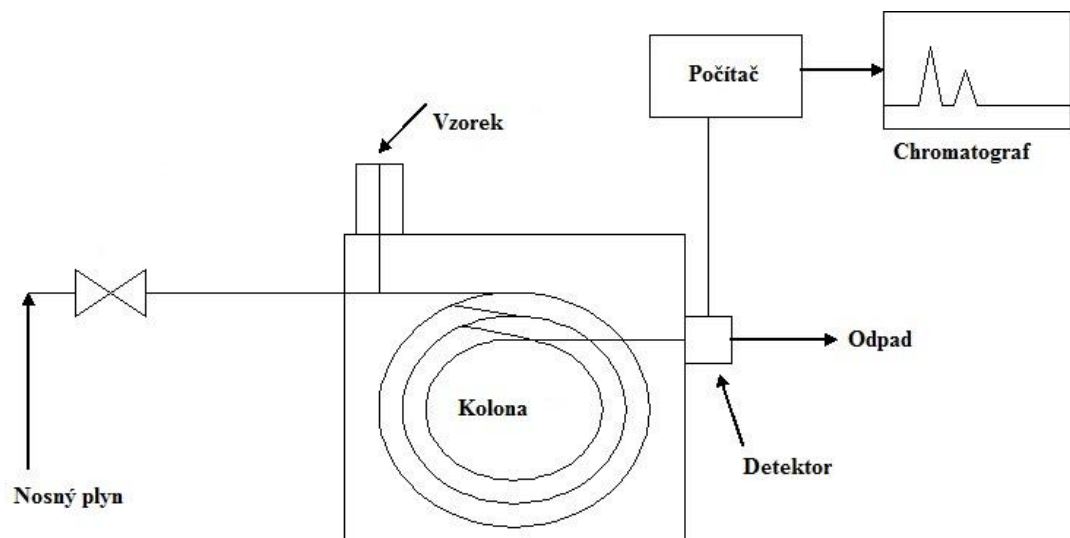
Plynová chromatografie je běžná detekční technika používaná v mnoha laboratořích pro oddělení a analýzu těkavých látek (James a Martin, 1952). Plynová chromatografie může díky použití specifické kolony oddělit složky komplexní směsi, poté tyto složky analyzovat a individuálně kvantifikovat (Schomburg, 1990).

Vzorek plynu je nosným plynem (nazývaným též mobilní fází) přenášen přes kolonu (stacionární fází). Jako nosný plyn bývá používán inertní, nereaktivní plyn jako je například helium, argon nebo dusík. Stacionární fází je mikroskopická vrstva kapaliny nebo polymeru na inertním pevném nosiči, která interaguje se složkami vzorku a nachází se uvnitř kolony. Rychlost, kterou molekuly prostupují kolonou je dána silou absorpce na povrch stacionární fází. Molekuly dané složky mohou být silně zachyceny stacionární fází, a proto jim průchod kolonou trvá delší dobu, znamená to, že mají delší retenční čas (RT) (Phillips, 1994).

Detektor, který je umístěn na konci kolony měří konečný signál, který tvoří výsledný chromatogram. Každá jednotlivá složka může být identifikována na základě času dopadu na detektor (tzn. na základě retenčního času). Navíc oblast pod výsledným píkem představuje kvantitativní míru koncentrace dané látky (Cristescu et al., 2012).

Separace jednotlivých složek a retenční čas se odvíjí od několika faktorů jako je například polarita stacionární fází, teplota nebo délka kolony. Polarita stacionární fází určuje retenční čas - polární látky mají delší RT díky jejich silné adsorpci na stacionární fází. Rychlost průchodu vzorku kolonou je dána teplotou kolony a proudem nosného plynu (Bernhard, 1960; Blumberg a Klee, 2000). Zvyšování teploty nebo proudu nosného plynu způsobuje rychlejší průchod vzorku skrze kolonu a zároveň méně interakcí mezi vzorkem a stacionární fází, to vede k tomu, že se zkracuje retenční čas, ale zároveň se oddělí méně složek ze směsi. Proto je teplota kolony volena jako kompromis mezi délkou analýzy a výsledkem separace. Další důležitý faktor je délka kolony. Čím delší kolona je, tím probíhá lepší separace, ale zároveň to vede k delšímu retenčnímu času (Gupta, 1969). V roce 1959 byla poprvé použita plynová chromatografie k měření ethylenu v jablkách (Huelin a Kennett, 1959).

Hlavní nevýhodou plynové chromatografie byl tehdy nedostatečný detekční limit i.e. 10–100 ml/l, který byl omezen dostupným detekčním systémem - termálně konduktivním detektorem (TCD) (Lawson and Miller, 1966). Zásadní průlom pro plynovou chromatografii nastal v 60. letech 20. století, kdy se objevily nové technologie detekce (Lovelock, 1960; McWilliam, 1983). Vývoj plamenoionizačního detektoru (FID) a fotoionizačního detektoru (PID) výrazně snížil detekční limit pro ethylen o desítky nl/l (Bassi and Spencer, 1989).



Obr. č. 5: Schema plynového chromatografu. Převzato a upraveno z <http://imgbuddy.com/gas-chromatography-diagram.asp> (2015).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál a přístroje

3.1.1. Biologický materiál

- Semena hrachu polního (*Pisum arvense* L.) tzv. pelušky, odrůda Arvika.

3.1.2. Chemikálie

- testované látky - BL, 24-epiBL, IAA, GA3, tZR, TDZ
- chemikálie na přípravu Hoaglandova roztoku - H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, H_2SO_4
- chemikálie na přípravu živného roztoku - FeEDTA, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- chemikálie k rozpouštění testovaných látek - isopropanol x methylenchlorid (v/v, 1:1), lanolin

3.1.3. Pracovní pomůcky

- buničitá vata, nůžky, pinzeta, kádinka (2000 ml), fotografický ták, odměrný válec (50 ml), odměrná baňka (100 ml, 500 ml), automatická pipeta (10-100 μl , 100-1000 μl), špičky k pipetám, skalpel, skleněné lékovky s víčky, měřítko z milimetrového papíru, Erlenmayerovy baňky (500 ml), laboratorní rukavice, parafilm, injekční stříkačky s jehlou (2,5 ml), gumové špunty

3.1.4. Přístroje a zařízení

- magnetická míchačka (Lavatec a.s. Chotutice, Česká republika)
- pH metr (Hanna Instruments, USA)
- topný blok na zkumavky (Grant, United Kingdom)
- vortex (Heidolph, Germany)
- analytické váhy (Kern, Germany)
- vzduchovací motorek (Maxima, Germany)
- fytokomora (Convion, Canada)
- plynový chromatograf (Agilent Technologies, USA)
- skleněný exikátor
- lampa se zeleným světlem

3.2. Metody

3.2.1. Test inhibice etiolovaného růstu pelušky

V Laboratoři růstových regulátorů UP & ÚEB AV ČR byl sestaven nový biotest na testování biologické aktivity brasinosteroidů, který byl v letech 2012-2013 optimalizován (Kořínková, 2013). Biotest se skládá z pěti základních kroků a celý trvá 9 dní. Pro provedení experimentu je nejdříve nutné připravit Hoaglandův roztok a rozředit testované látky v lanolinu.

Příprava Hoaglandova roztoku

Hoaglandův roztok je roztok anorganických solí, který je koncipován tak, aby svým složením poskytoval rostoucím rostlinám nejdůležitější esenciální prvky. Smícháním Hoaglandova roztoku, železa (FeEDTA) a $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ vznikl živný roztok, kterým byl v biotestu zaléván perlit, do kterého se přesadily naklíčené rostliny pelušky. Při přípravě Hoaglandova se nejdříve rozpustilo 280 mg H_3BO_3 , 340 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 10 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml H_2O . Těchto 100 ml roztoku bylo rozděleno na 10 ml aliquotey, ty se uchovávali zamražené.

Výsledný Hoaglandův roztok o objemu 1 l byl připraven smícháním a rozpuštěním jednoho 10 ml aliquotey, 1 ml ředěné H_2SO_4 , 9,4g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6,6 g KNO_3 , 1,2 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ v destilované vodě. Látky $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 a $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ bylo nutné před smícháním rozpouštět zvlášť v malém množství destilované vody. Hoaglandův roztok se uchovává v lednici po dobu maximálně jednoho měsíce.

Příprava testovaných látek o různém látkovém množství

Testované látky byly rozpuštěny ve 100 μl směsi isopropanolu x methylenchloridu (1:1, v/v) a dále byly naředěny v lanolinu, který zajišťoval zafixování testované látky na místě aplikace. Konečné rozmezí látkového množství testovaných látek v lanolinu bylo pro tento pokus aplikováno množství v rozmezí 10^{-7} - 10^{-14} mol v 5 μl .

Postup experimentu

Výsledný postup experimentu po optimalizaci vypadá následovně (Košínková, 2013, obrazová příloha str. 60-61):

1. DEN - bobtnání semen

Semena pelušky byla zalita dostatečným množstvím vody a ve tmě bobtnala minimálně 12 hodin.

2. DEN - vložení nabobtnaných semen do exsikátoru

Spodní část exsikátoru byla naplněna vodou. Na jednotlivá proděravělá patra exsikátoru se vyskládala kola z buničité vaty, buničina byla následně zalita vodou a proděravěna pinzetou tak, že otvory v kotoučích exsikátoru odpovídaly otvorům v buničité vatě. Nabobtnaná semena pelušky byla vyskládána na takto připravená patra tzv. pupkem (pólem) dolů. Nakonec byl k exsikátoru připojen vzduchovací motorek a celý exsikátor přesunut do tmy do kultivační skříně.

4. DEN - vysazení klíčenců do perlitu

Klíčenci byli vysázeni na fotografický tác do perlitu. K zajištění správné výživy byl perlit zalit živným roztokem, jehož 1 l byl připraven smícháním 10 ml Hoaglandova roztoku, 3 ml 10^{-3} M CaCl_2 a 1 ml Fe EDTA a 986 ml destilované vody. Hodnota pH živného roztoku byla následně upravena na 5,8. Na jeden fotografický tác bylo vyseto 10 řad po osmi sloupcích klíčenců, celkem tedy 80 klíčenců. Rostliny vyseté v prvním a posledním sloupci sloužily jako kontroly, rozmístění kontrol na okraj tácu mělo vyloučit poziční efekt na rostliny. Tác s vysazenými klíčenci byl umístěn do tmy to kultivační komory.

5. DEN - aplikace testovaných látek na semenáčky

Na každou rostlinku bylo aplikováno automatickou pipetou 5 μl lanolínu s rozpuštěnou látkou dané koncentrace. Rozpuštěné testované látky byly aplikovány na místo extirpovaného prvního lístku, který byl před samotnou aplikací odstraněn skalpelem. Tác s označenými semenáčky byl opět přemístěn do tmy do kultivační komory.

9. DEN - hodnocení délky epikotylu

Délka epikotylu jednotlivých rostlin byla měřena pomocí měřítka zhotoveného z milimetrového papíru. Hodnoty byly přeneseny do MS Excel, kde byly vypočítány průměrné hodnoty pomocí funkce (PRŮMĚR) a směrodatné

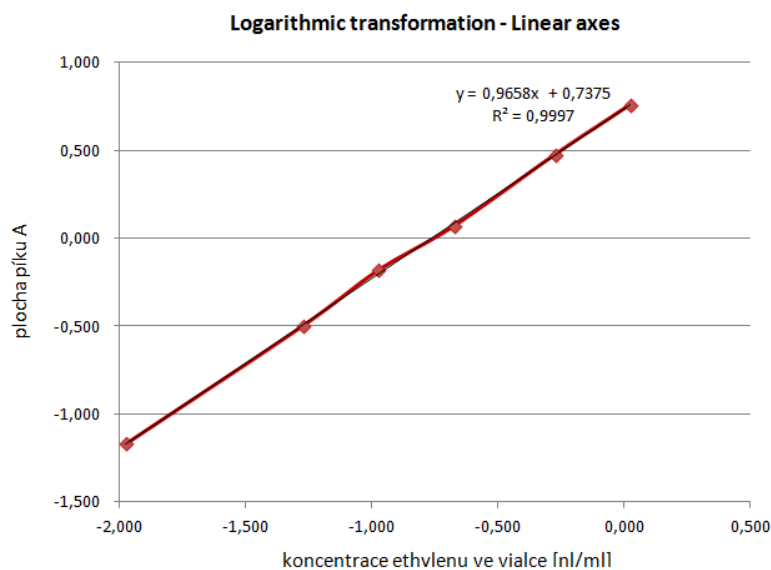
odchylky pomocí funkce (SMODCH), z těchto dat byl následně vytvořen graf s chybovými úsečkami.

Všechny kroky biotestu byly prováděny v temné místnosti za zeleného osvětlení, aby nedošlo k narušení procesu etiolizace.

3.2.2. Měření produkce ethylenu

V rámci této diplomové práce byla sestavena a optimalizována metoda měření produkce ethylenu. Metoda spočívá ve vzduchotěsném uzavření rostlin, odběru vzduchu obsahujícího vyprodukovaný ethylen a následném vyhodnocení produkce ethylenu plynovým chromatografem. V rámci optimalizace byla stanovena nejlépe vyhovující velikost nádoby a její utěsnění, dále byla stanovena optimální délka uzavření testovaných rostlin v nádobě a vhodná metoda odběru vzduchu z nádoby.

Výsledný postup měření produkce ethylenu po optimalizaci vypadá následovně: po měření délky epikotyly testovaných rostlin byly všechny rostlinky jedné koncentrace (8 ks) přeneseny do Erlenmayerovy baňky (500 ml), kvůli zajištění vlhkosti bylo do Erlenmayerovy baňky přidáno malé množství destilované vody, přes baňku byla následně přetažena laboratorní rukavice, která byla parafilmem neprodyšně připevněna k hrdlu baňky. Po 24 hodinách, kdy rostliny byly uzavřeny ve tmě v baňce, se odebíral vzorek vzduchu z baňky. Vzorek byl odebrán jehlou skrze nataženou blánu rukavice (v jejím nejméně napnutém místě) do injekční stříkačky. Hladina ethylenu ve vzorku byla stanovena plynovým chromatografem. Plynovým chromatografem byl analyzován vždy 1 ml vzorku odebraného vzduchu. Výsledný chromatogram udával produkci ethylenu ve velikosti ploch píků odpovídajících retenčnímu času stanovenému pro ethylen. Hodnoty velikostí ploch píků byly následně přepočítány pomocí kalibrační křivky na objem ethylenu v nl/ml. Během kalibrace bylo 25 μ l čistého ethylenu vstříknuto do vzduchotěsné nádoby o objemu 590 ml, odtud byl následně prováděn nástřík v objemech 10-1500 μ l do vialky o objemu 40 ml, kde došlo k promíchání a následné analýze 1 ml vzduchu (odebraného z vialky) pomocí plynového chromatografu. Poté byla přiřazena hodnota koncentrace ethylenu ve vialce k odpovídající ploše píku A na chromatogramu a sestavena kalibrační křivka.



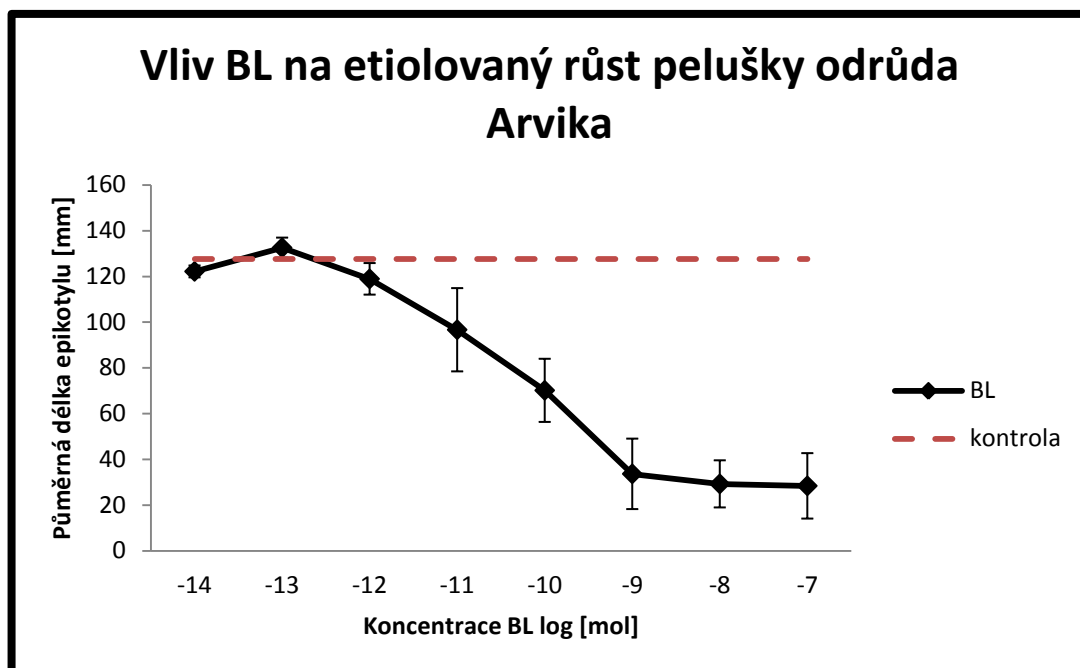
Obr. č. 6: Kalibrační křivka ethylenu po logaritmické transformaci.

Hodnoty byly přeneseny do MS Excel, kde byly vypočítány průměrné hodnoty pomocí funkce (PRŮMĚR) a směrodatné odchylky pomocí funkce (SMODCH), z těchto dat byl následně vytvořen graf s chybovými úsečkami.

3.3. Výsledky

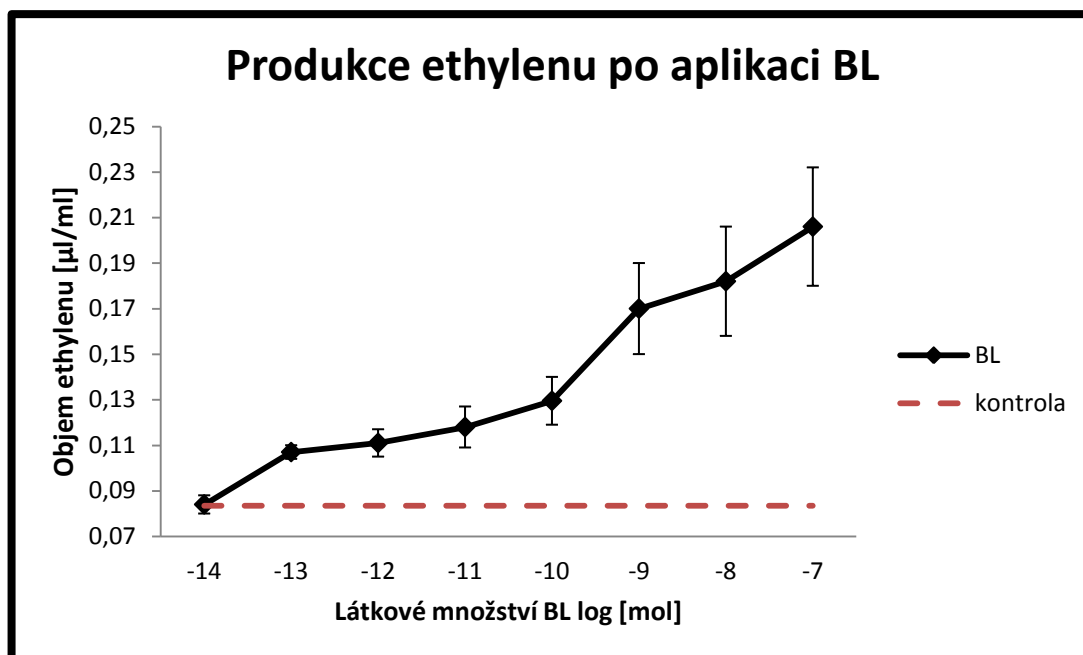
V následující kapitole jsou zobrazeny a okomentovány grafy, které zobrazují vlivy testovaných látek (BL, 24-epiBL, tZR, IAA, GA3, TDZ) na etiolovaný růst pelušky a na produkci ethylenu v těchto testovaných rostlinách. K testování byl použit výše popsáný biotest inhibice etiolovaného růstu pelušky. Výsledky jsou zpracované z jednoho opakování biotestu.

3.3.1. Brasinolid (BL)



Graf č. 1 Vliv brasinolidu na dlouhivý růst epikotylu u etiolovaných rostlin pelušky odrůda Arvika. BL byl testován v rozmezí 10^{-7} až 10^{-14} mol.

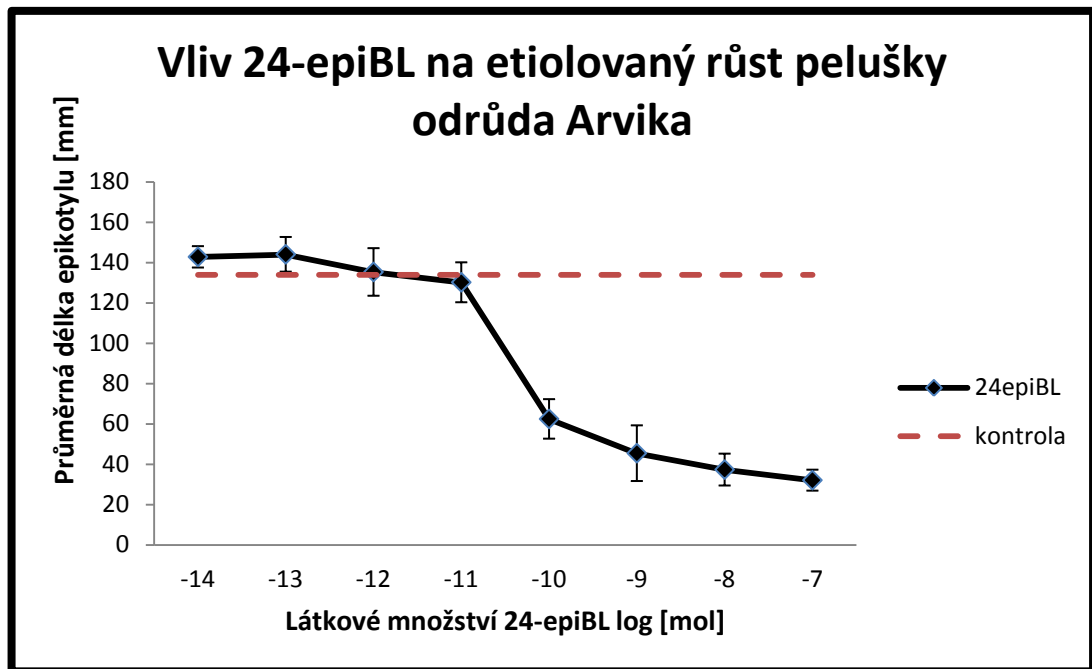
Po aplikaci BL ve vyšším látkovém množství (10^{-7} , 10^{-8} a 10^{-9} mol) vykazovaly epikotily testovaných rostlin výrazně nižší vzrůst (Graf č. 1). Zároveň tyto epikotily byly výrazně ztlouštělé a pokroucené. Všechny tyto znaky odpovídají tzv. trojně odezvě, která vzniká vlivem ethylenu. Se snižující se koncentrací BL rostla výška testovaných rostlin a zároveň vymizelo pokroucení a ztlouštění epikotylů. Po aplikaci BL v látkovém množství 10^{-12} mol a nižší se epikotily testovaných rostlin nelišily od epikotylů kontrolních rostlin (Graf č. 1).



Graf č. 2 Vliv brasinolidu na produkci ethylenu v etiolovaných rostlinách pelušky odrůda Arvika. BL byl testován v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

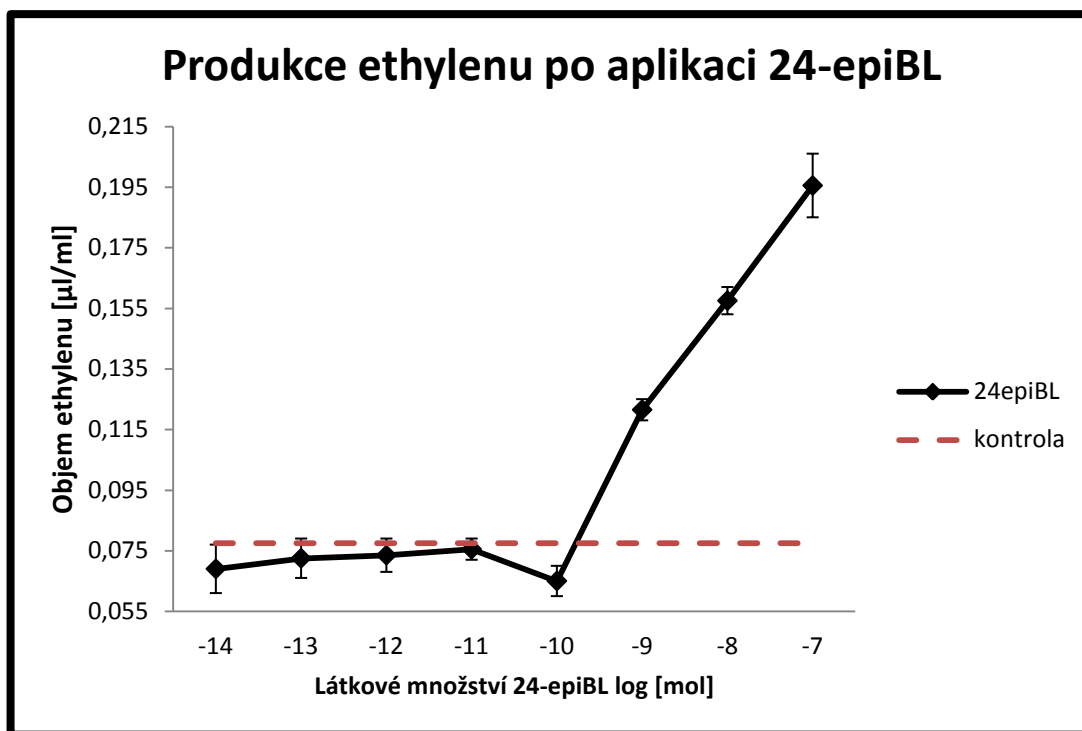
Po aplikaci BL ve vyšším látkovém množství (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol) byla u testovaných rostlin naměřena vyšší produkce ethylenu než u kontrolních rostlin. Se snižující se koncentrací aplikovaného BL klesala i hladina produkovaného ethylenu. Vyšší hladina ethylenu byla naměřena i po aplikaci BL v látkovém množství 10^{-12} a 10^{-13} mol. Po aplikaci BL 10^{-14} mol produkovaly testované rostliny stejné množství ethylenu jako kontrolní rostliny (Graf č. 2). Korelace obou grafů (Graf č. 1 a 2) naznačuje, že ztloustlé, pokroucené, a nižší epikotyly testovaných rostlin jsou způsobené vlivem ethylenu, jehož produkce je indukována aplikací BL ve vyšším látkovém množství (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol).

3.3.2. 24-epibrasinolid (24-epiBL)



Graf č. 3 Vliv 24-epibrasinolidu na dlouhivý růst epikotylu u etiolovaných rostlin pelušky odrůda *Arvika*. 24-epiBL byl testován v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

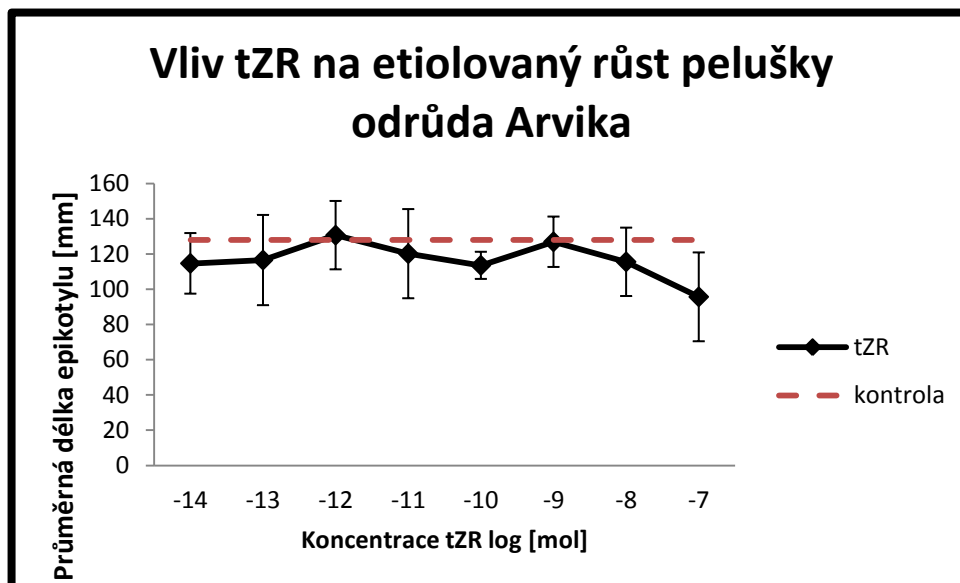
Podobně jako v případě BL, tak i po aplikaci 24-epiBL ve vyšším látkovém množství (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol) vykazovaly epikotylы testovaných rostlin výrazně nižší vzrůst než epikotylы kontrolních rostlin (Graf č. 3). Zároveň tyto epikotylы byly výrazně ztloustlé a pokroucené. Se snižujícím se látkovým množstvím 24-epiBL rostla výška testovaných rostlin. Po aplikaci 24-epiBL 10^{-11} mol a nižší se epikotylы testovaných rostlin nelišily od epikotylů kontrolních rostlin (Graf č. 3). Mezi rostlinami, na které byl aplikován 24-epiBL v látkovém množství 10^{-10} a 10^{-11} mol, byl výrazný skokový rozdíl ve vzhledu epikotylů. Epikotylы rostlin po aplikaci 24-epiBL v 10^{-10} mol, byly nižšího vzrůstu a výrazně pokroucené, zatímco epikotylы rostlin po aplikaci 24-epiBL v 10^{-11} mol se svým vzhledem ani výškou zásadně nelišily od epikotylů kontrolních rostlin.



Graf č. 4 Vliv 24-epibrasinolidu na produkci ethylenu v etilovaných rostlinách pelušky odrůda Arvika. 24-epiBL byl testován v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

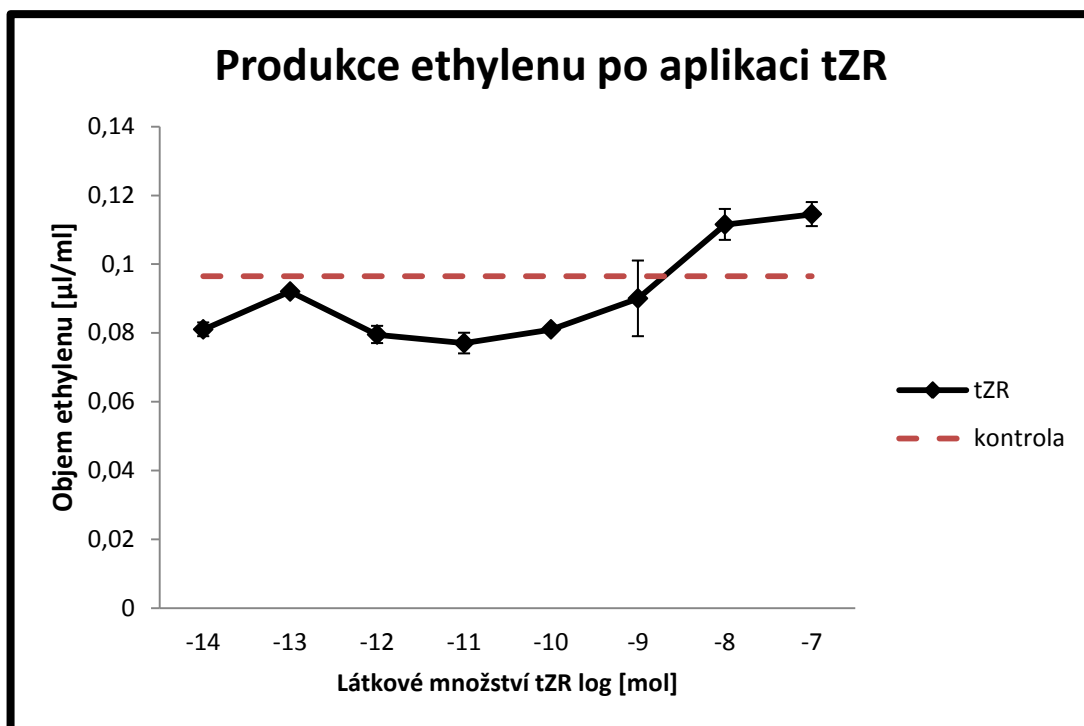
Po aplikaci 24-epiBL ve vyšším látkovém množství (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M) byla u testovaných rostlin naměřena vyšší produkce ethylenu než v kontrolních rostlinách. Se snižujícím se látkovým množstvím aplikovaného 24-epiBL klesala i hladina produkovaného ethylenu. Po aplikaci 24-epiBL 10^{-10} mol a nižší produkovaly testované rostliny srovnatelné množství ethylenu jako rostliny kontrolní (Graf č. 4). Podobně jako v případě BL i u 24-epiBL můžeme pozorovat korelaci grafů č. 3 a 4., která uvádí do souvislosti hladinu produkovaného ethylenu a výsledný vzhled epikotylů rostlin.

3.3.3. Trans-zeatin ribosid (tZR)



Graf č. 5 Vliv tZR na dlouhivý růst epikotylu u etiolovaných rostlin pelušky odrůda *Arvika*. tZR byl testován v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

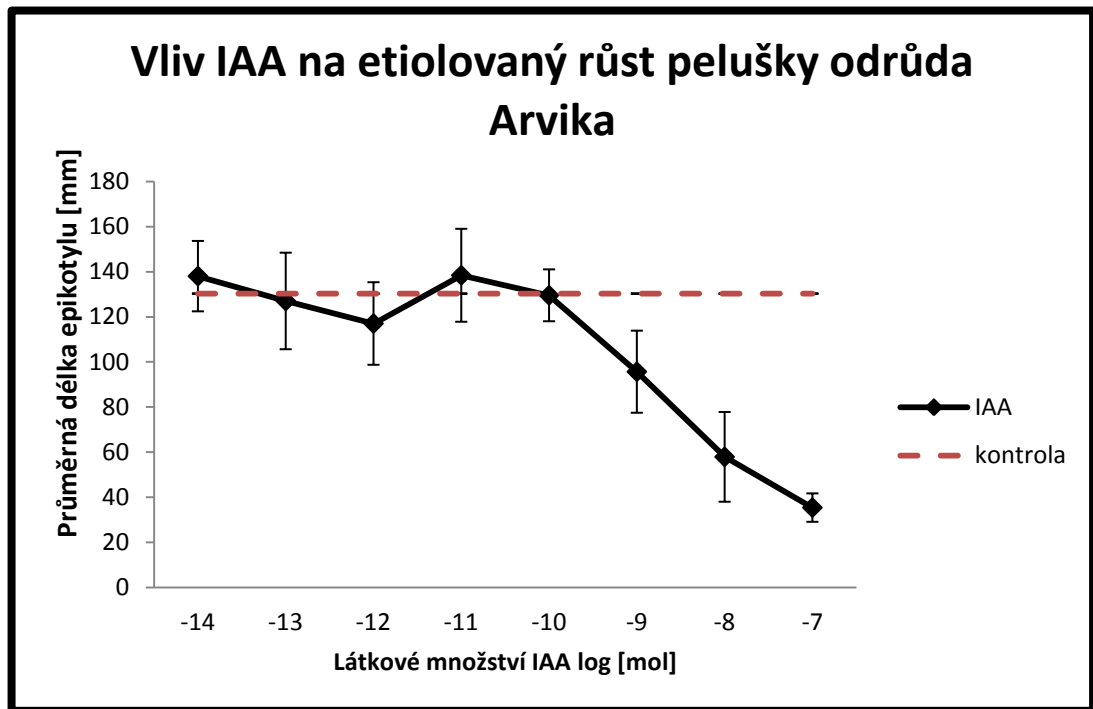
Po aplikaci tZR v látkovém množství 10^{-7} mol vykazovaly epikotylы testovaných rostlin mírně nižší vzrůst (graf č. 5). Na těchto rostlinách nebylo patrné ztloustnutí epikotylů a v zakřivení apikální části se tyto epikotylы nelišily od epikotylů kontrolních rostlin. Po aplikaci tZR v látkovém množství 10^{-8} mol se epikotylы testovaných rostlin lišily od epikotylů testovaných rostlin pouze nepatrně. Po aplikaci tZR v 10^{-9} mol a nižší odpovídal vzhled testovaných rostlin vzhledu kontrolních rostlin.



Graf č. 6 Vliv tZR na produkci ethylenu v etiolovaných rostlinách pelušky odrůda Arvika. tZR byl testován v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

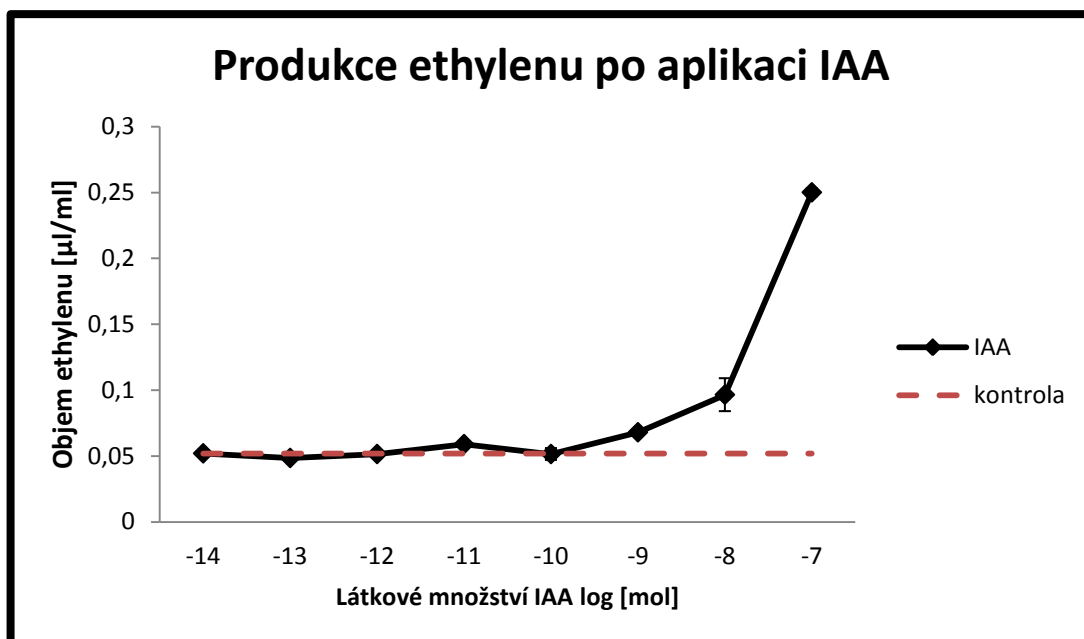
Menší nárůst produkce ethylenu u testovaných rostlin je patrný pouze po aplikaci tZR ve vysokém látkovém množství 10^{-7} a 10^{-8} mol a i v těchto případech jsou tyto výkyvy zanedbatelné ve srovnání s produkcí ethylenu po aplikaci BRs.

3.3.4. Kyselina indol-3yl-octová (IAA)



Graf č. 7 Vliv IAA na dlouhý růst epikotylu u etiolovaných rostlin pelyšky odrůda *Arvika*. IAA byla testována v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

Po aplikaci IAA ve vyšším látkovém množství (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol) vykazovaly epikotily testovaných rostlin výrazně nižší vzrůst především v látkovém množství 10^{-7} a 10^{-8} mol (graf č. 7). V tomto rozsahu koncentrací byla prokázána téměř lineární závislost mezi délkou epikotylů a koncentrací aplikované IAA. Zároveň tyto epikotily byly výrazně pokroucené. Se snižujícím se látkovým množstvím IAA rostla výška testovaných rostlin, po aplikaci IAA 10^{-10} mol a nižší zcela vymizelo pokroucení epikotylů a jejich délka byla srovnatelná s délkou epikotylů kontrolních rostlin (graf č. 7).

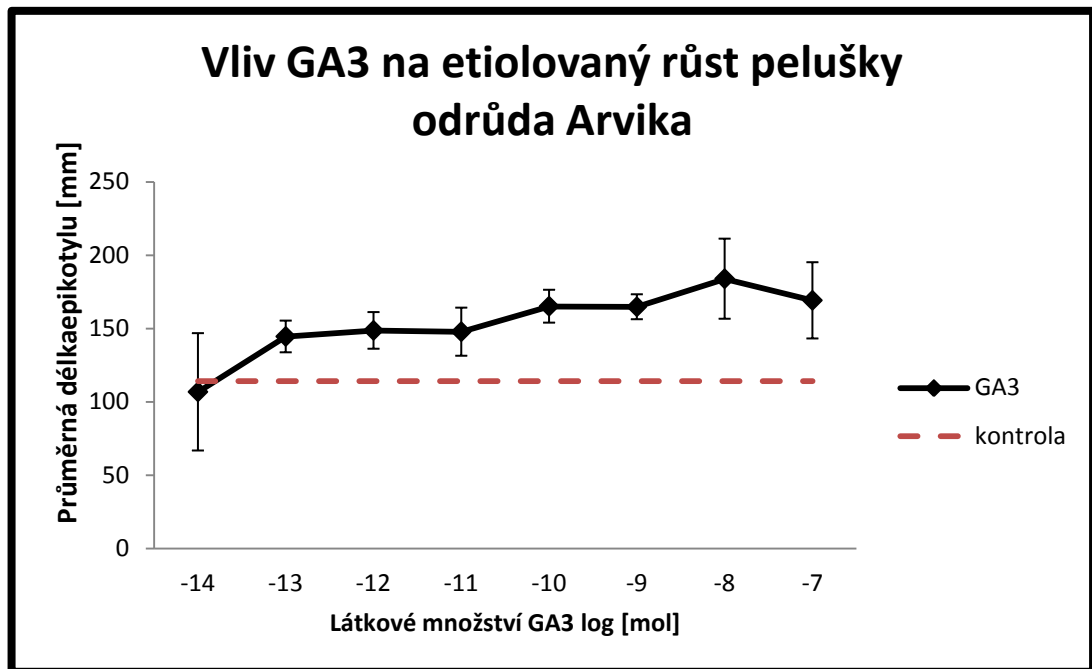


Graf č. 8 Vliv IAA na produkci ethylenu v etiolovaných rostlinách pelušky odrůda Arvika. IAA byla testována v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

Po aplikaci IAA ve vysokém látkovém množství 10^{-7} mol byla u testovaných rostlin naměřena nejvyšší produkce ethylenu. Vyšší produkce ethylenu byla také naměřena po aplikaci IAA v látkovém množství 10^{-8} mol. Mírně zvýšená produkce byla naměřena u rostlin po aplikaci IAA v látkovém množství 10^{-9} mol. Po aplikaci IAA v látkovém množství 10^{-10} mol a nižší produkovaly testované rostliny stejné množství ethylenu jako kontrolní rostliny (graf č. 8).

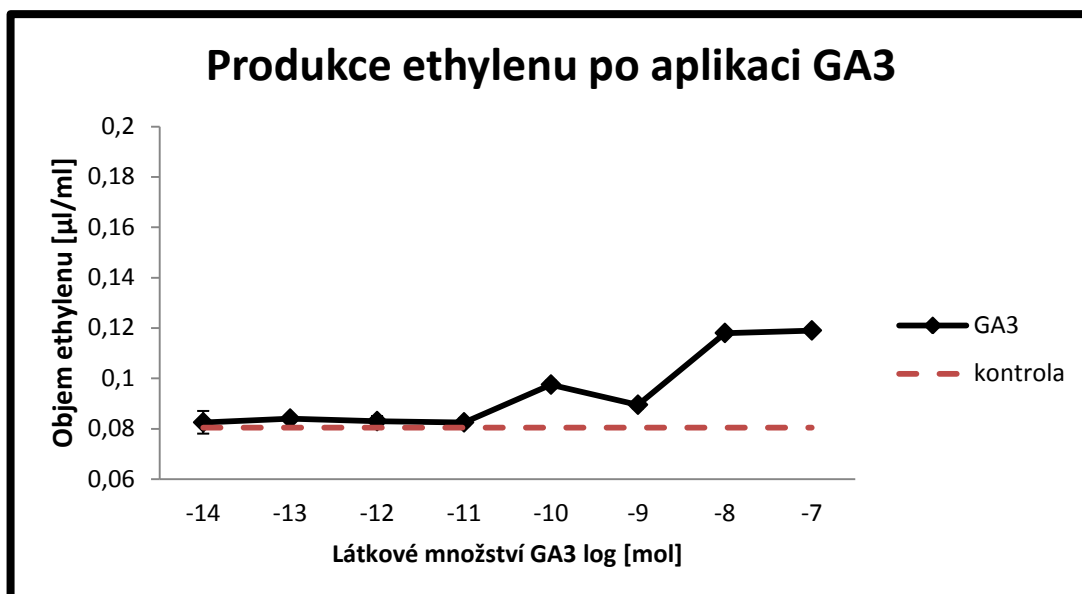
Korelace grafů (graf č. 7 a 8) naznačuje, že pokroucené a nižší epikotyly testovaných rostlin jsou způsobené vlivem endogenně produkovaného ethylenu po aplikaci IAA.

3.3.5. Kyselina gibberelová (GA3)



Graf č. 9 Vliv GA3 na dlouhý růst epikotylu u etiolovaných rostlin pelušky odrůda *Arvika*. GA3 byla testována v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

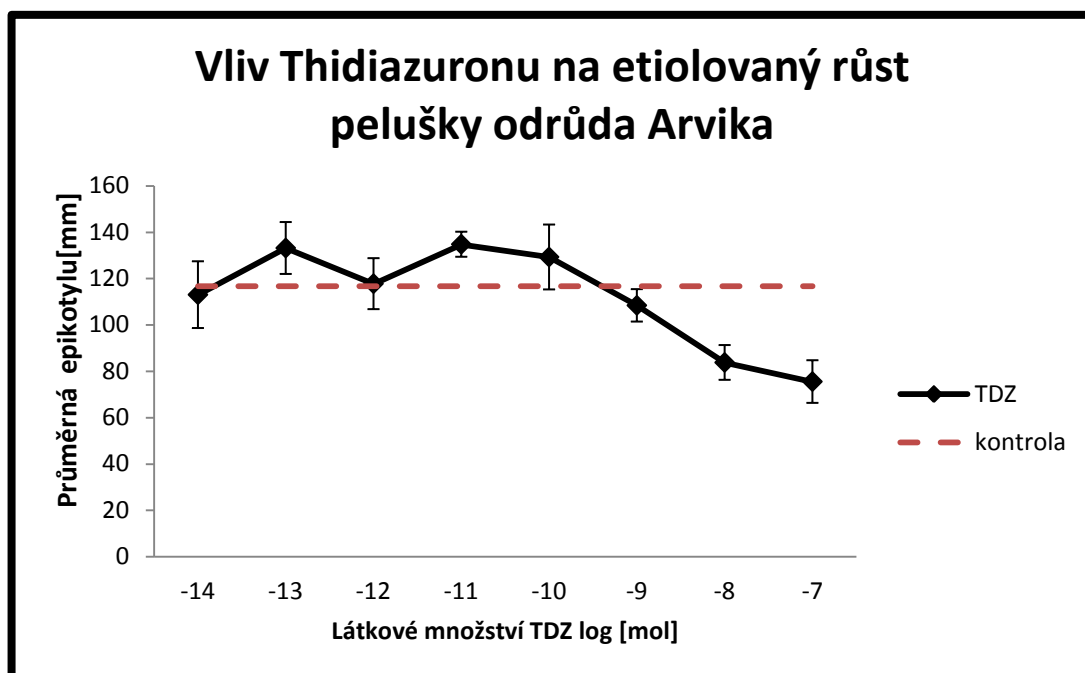
Po aplikaci GA3 v látkovém množství 10^{-7} a 10^{-8} mol byl zaznamenán nárůst délky epikotylu oproti kontrole. Po aplikaci GA3 v 10^{-9} mol délka epikotylů testovaných rostlin opět mírně klesla a se snižující se koncentrací GA3 už se dále neměnila (graf č. 9). Rostliny, na které byla aplikována GA3 v látkovém množství 10^{-14} mol vykazovaly nerovnoměrný růst. Některé epikotily těchto rostlin byly výrazně nižší a zakroucené. K tomuto jevu pravděpodobně došlo díky produkci ethylenu vlivem blíže neurčeného stresu.



Graf č. 10 Vliv GA3 na produkci ethylenu v etiolovaných rostlinách pelušky odrůda Arvika. GA3 byla testována v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

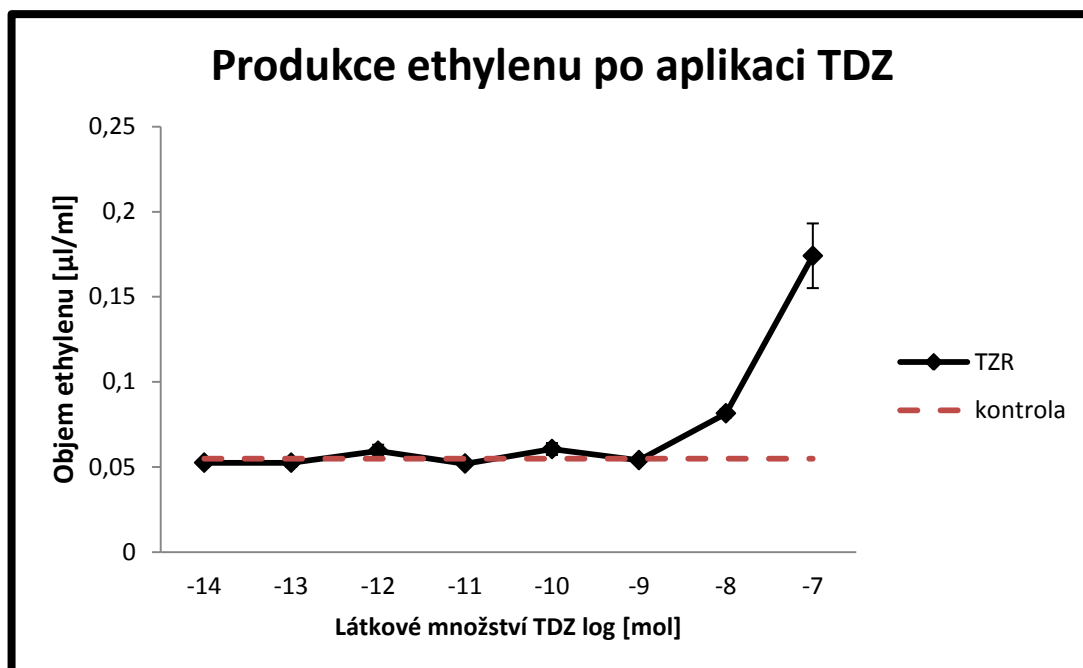
Zvýšená produkce ethylenu byla naměřena u rostlin, na které byla aplikována GA3 v látkovém množství 10^{-7} a 10^{-8} mol. Mírný nárůst produkce ethylenu byl zaznamenán ještě po aplikaci GA3 v látkovém množství 10^{-10} mol. Po aplikaci GA3 v látkovém množství 10^{-9} mol, 10^{-11} mol a nižší se míra produkce ethylenu nelišila od kontrol (graf č. 10).

3.3.6. Thidiazuron (TDZ)



Graf č. 11 Vliv TDZ na dlouhivý růst epikotylu u etiolovaných rostlin pelušky odrůda *Arvika*. TDZ byl testován v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

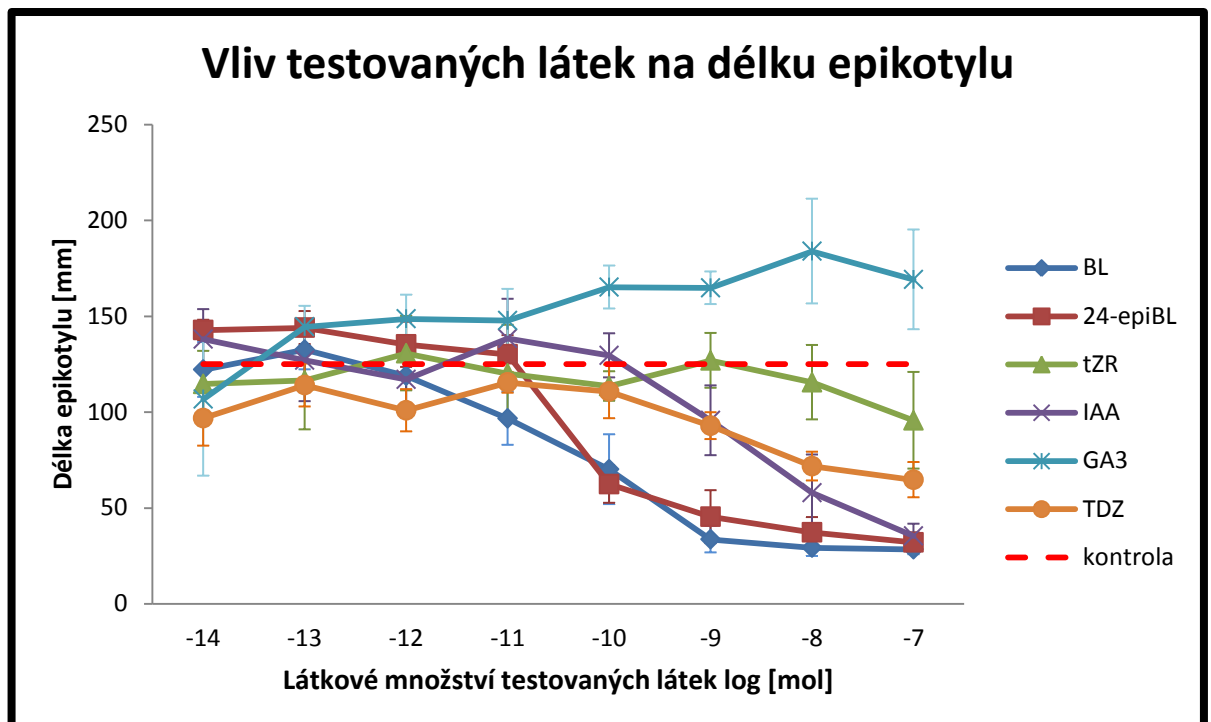
Po aplikaci TDZ ve vyšším látkovém množství (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol) vykazovaly epikotylы testovaných rostlin nižší vzrůst (graf č. 11). Se snižující se koncentrací TDZ rostla výška testovaných rostlin. Po aplikaci TDZ v látkovém množství 10^{-10} mol a nižší se epikotylы a ani svým vzhledem nelišily od epikotylů kontrolních rostlin (Graf č. 11).



Graf č. 12 Vliv TDZ na produkci ethylenu v etiolovaných rostlinách pelušky odrůda Arvika. TDZ byl testován v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

Po aplikaci TDZ ve vysokém látkovém množství 10^{-7} mol byla u testovaných rostlin naměřena nejvyšší produkce ethylenu. Vyšší produkce ethylenu byla také naměřena po aplikaci TDZ v látkovém množství 10^{-8} mol. Po aplikaci TDZ v látkovém množství 10^{-9} mol a nižší produkovaly testované rostliny stejné množství ethylenu jako kontrolní rostliny (graf č. 12).

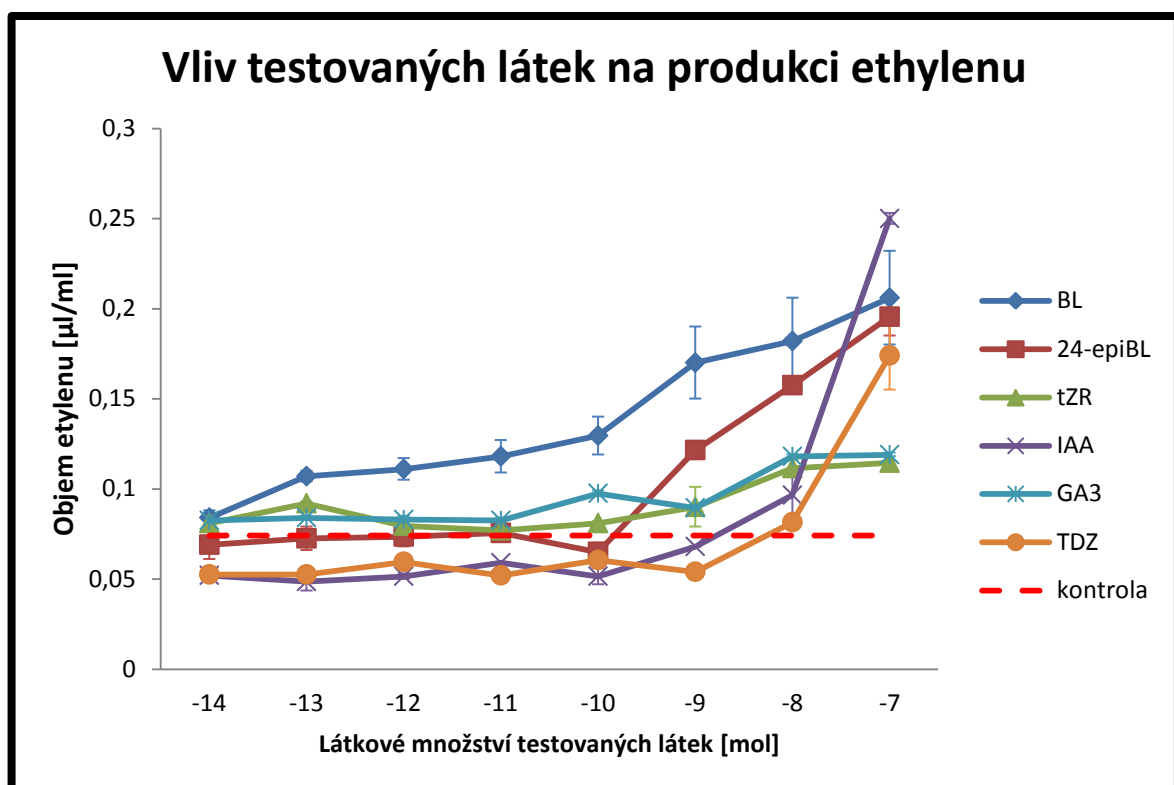
3.3.7. Vliv testovaných látek na délku epikotylu etiolovaných rostlin pelušky



Graf č. 13 Souhrnný graf znázorňující vliv všech testovaných látek (BL, 24epiBL, tZR, IAA, GA3, TDZ) na délku epikotylu etiolovaných rostlin pelušky. Látky byly testovány v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

Z grafu (graf č. 13) je patrné, že největší inhibiční efekt na dlouhivý růst epikotylu etiolovaných rostlin pelušky měly IAA, BL a 24-epi BL v látkovém množství 10^{-7} mol. V případě brasinosteroidů byl tento inhibiční účinek pozorován i po aplikaci látky v látkovém množství 10^{-8} a 10^{-9} mol a tento efekt byl doprovázen výrazným ztloustnutím a zkroucením epikotylu. V případě IAA tento účinek prudce klesal se snižujícím se látkovým množstvím. Inhibiční účinek na etiolovaný růst zcela vymizel v případě IAA látkovém množství 10^{-10} mol, v případě 24-epiBL v látkovém množství 10^{-11} mol a v případě BL v látkovém množství 10^{-12} mol. Mírnější inhibiční účinek na etiolovaný růst byl pozorován po aplikaci TDZ a tZR v látkovém množství 10^{-7} až 10^{-9} mol. Naopak po aplikaci GA3 v látkovém množství 10^{-7} až 10^{-10} mol byl zaznamenán nárůst epikotylu.

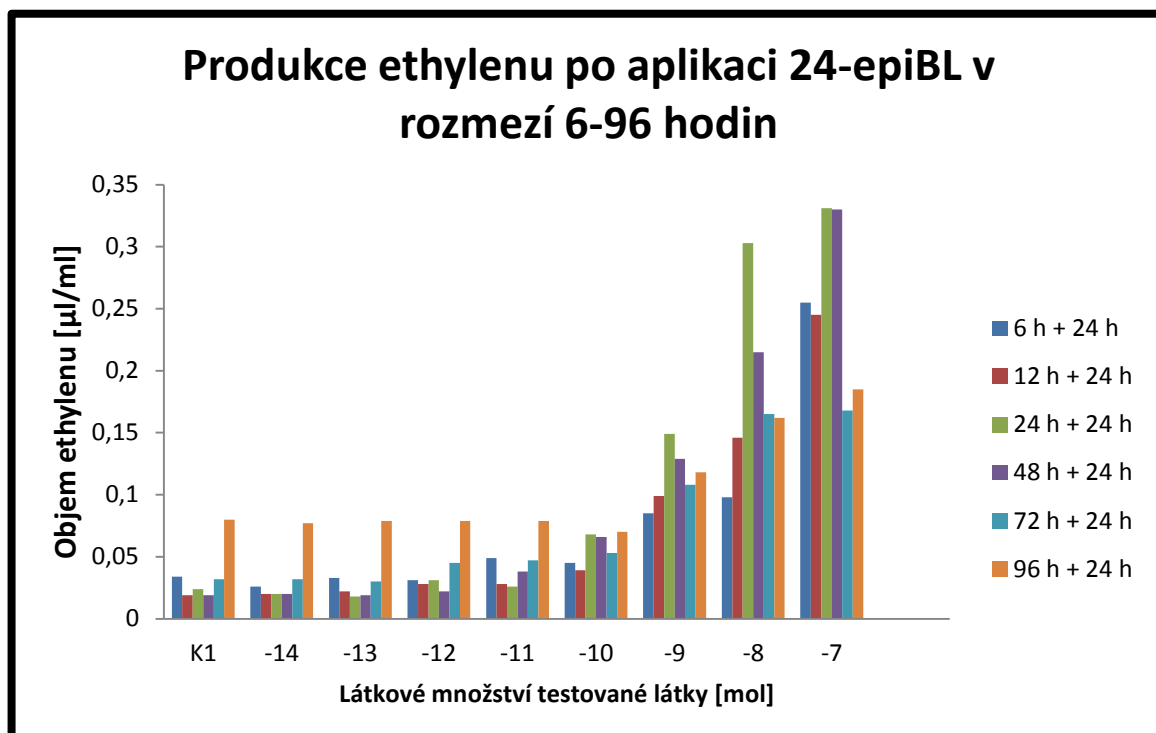
3.3.8. Vliv testovaných látek na produkci ethylenu u etiolovaných rostlin pelušky



Graf č. 14 Souhrnný graf znázorňující vliv všech testovaných látek (BL, 24epiBL, tZR, IAA, GA3, TDZ) na produkci ethylenu u etiolovaných rostlin pelušky. Látky byly testovány v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol.

Z grafu (graf č. 14) je patrné, že nejvíce ethylenu (0,25 $\mu\text{l/ml}$) sice produkovaly rostliny pelušky po aplikaci IAA v látkovém množství 10^{-7} mol. Ten byl ale provázen prudkým poklesem produkce téměř na úroveň kontroly. Určitý nárůst produkce ethylenu ve srovnání s kontrolou byl zaznamenán ve všech případech po aplikaci testovaných látek v množství 10^{-7} mol. V případě BL byl zaznamenán výrazný nárůst v produkci ethylenu u rostlin pelušky po aplikaci látek v širokém látkovém rozmezí 10^{-7} až 10^{-13} mol, v případě 24-epiBL v látkovém množství 10^{-7} až 10^{-9} mol. U obou látek v rozmezí těchto látkových množství platilo, že se snižujícím se látkovým množstvím klesala i hladina vyprodukovaného ethylenu. Rovněž aplikace TDZ vedla k výraznému nárůstu produkce ethylenu oproti kontrole u rostlin po aplikaci 10^{-7} mol a mírnější nárůst po aplikaci látky v látkovém množství 10^{-8} mol. V případě tZR a GA3 byl nepatrný nárůst produkce ethylenu zaznamenán pouze u rostlin, na které byly testované látky aplikovány v látkovém množství 10^{-7} a 10^{-8} mol.

3.3.9. Produkce ethylenu etiolovanými rostlinami pelušky po aplikaci 24-epiBL v časovém rozmezí 6-96 hodin

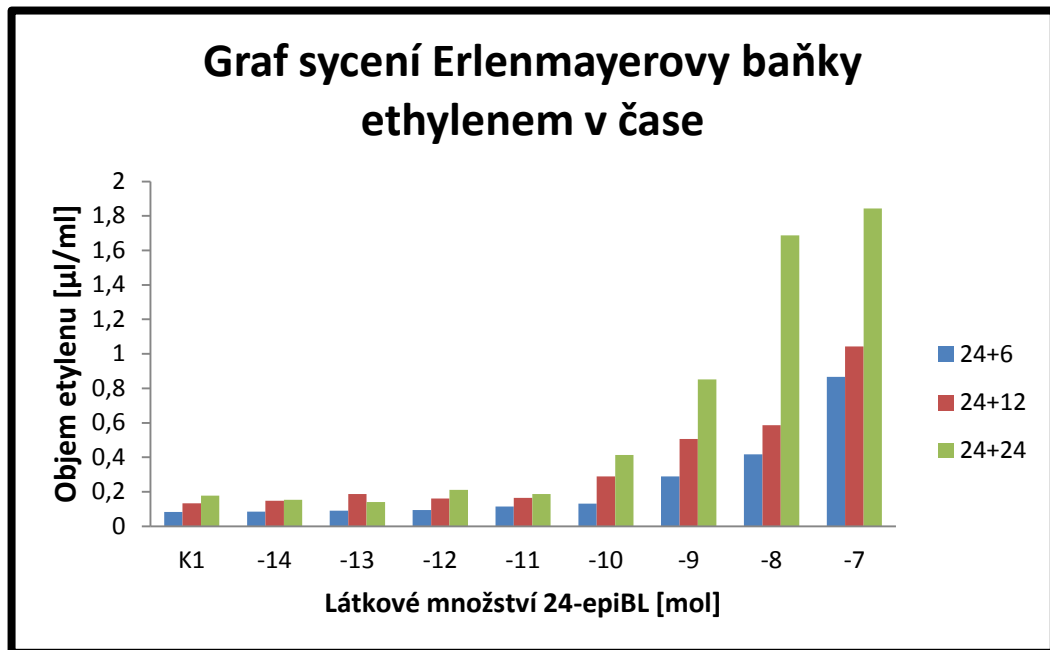


Graf č. 15 Graf znázorňující vliv 24-epiBL na produkci ethylenu u etiolovaných rostlin pelušky v čase. Rostliny byly vzduchotěsně uzavírány do Erlenmayerových baněk 6, 12, 24, 48, 72 a 96 hodin po aplikaci 24-epiBL v rozmezí látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol. K1 představuje kontrolu – na rostliny byl aplikován pouze lanolin bez testované látky. Produkce ethylenu byla měřena vždy 24 hodin po uzavření rostlin do Erlenmayerových baněk.

K analýze produkce ethylenu v závislosti na době mezi aplikací testované látky a uzavřením rostlin do Erlenmayerovy baňky byl jako testovaná látka použit 24-epiBL. Výhodou 24-epiBL je nižší cena a lepší dostupnost než u BL, přičemž je aktivita BL a 24-epiBL téměř srovnatelná. Z grafu č. 15 je zřejmé, že nejvyšší produkce ethylenu v etiolovaných rostlinách pelušky je 24 hodin po aplikaci 24-epiBL. Nárůst produkce ethylenu v testovaných rostlinách byl zaznamenán již 6 hodin po aplikaci 24-epiBL. Naopak pokles v produkci ethylenu oproti maximální produkci byl zaznamenán 48, 72 a 96 hodin po aplikaci 24-epiBL. V případě, kdy byly rostliny uzavírány do Erlenmayerových baněk až po 96 hodinách po aplikaci 24-epiBL, byla pozorována vyšší hladina produkce ethylenu ve srovnání s hladinou ethylenu, která byla naměřena u rostlin, uzavíraných do Erlenmayerových baněk 72 hodin po aplikaci 24-epiBL.

Tento jev je pravděpodobně způsoben tím, že u rostlin, které byly uzavírány do Erlenmayerových baněk až po 96 hodinách od aplikace 24epiBL, byl ethylen produkován nejen vlivem BRs ale i vlivem stresu, kterému byly vystaveny delší dobu než ostatní testované rostliny. Ve všech časech je patrný pokles produkce ethylenu s klesajícím aplikovaným množstvím 24-epiBL. Graf č. 15 naznačuje, že měření produkce ethylenu by bylo nejvhodnější provádět 24 hodin od aplikace testované látky, v návaznosti na předchozí biotest je optimální měřit produkci ethylenu 96 hodin po aplikaci, kdy můžeme pozorovat a zaznamenávat i změny na vzhladu epikotylu testovaných rostlin, které jsou pravděpodobně způsobené právě produkcí ethylenu.

3.3.10 Optimalizace sycení Erlenmayerovy baňky ethylenem



Graf č. 16 Graf znázorňující sycení Erlenmayerovy baňky ethylenem. Rostliny pelušky byly vzduchotěsně uzavřeny do Erlenmayerových baněk 24 hodin po aplikaci 24-epiBL látkového množství 10^{-7} až 10^{-14} mol. K1 představuje kontrolu – na rostliny byl aplikován pouze lanolin bez testované látky. Produkce ethylenu byla měřena 6, 12 a 24 hodin po uzavření rostlin do Erlenmayerových baněk.

Z grafu č. 16 je zřejmé, že hladina ethylenu vyprodukovaného rostlinami stoupá a je nejvyšší 24 hodin po uzavření rostlin do Erlenmayerovy baňky. S prodlužujícím se časem mezi uzavřením rostlin do baňky a měřením hladiny ethylenu se zvyšuje koncentrace ethylenu v baňkách - baňky se sytí ethylenem. Měření hladiny ethylenu po více než 24 hodinách od uzavření rostlin do Erlenmayerových baněk nebylo prováděno, protože po delší době byly rostliny v uzavřené baňce výrazně stresovány.

4. DISKUSE

V této diplomové práci byl testován vliv brasinosteroidů (BL, 24epiBL) a dalších vybraných růstových regulátorů (IAA, tZR, TDZ, GA3) na růst klíčících etiolovaných rostlin pelušky (*Pisum arvense L.*). K tomuto účelu byl využit biotest, který byl optimalizován v rámci bakalářské práce (Kořínková, 2013). Po aplikaci BRs na etiolované klíčící rostliny pelušky ve vyšším látkovém množství (10^{-7} - 10^{-10} mol) byla pozorována výrazná inhibice dlouhivého růstu (graf č. 1 a 3), což odpovídá předešlým výsledkům (Kořínková, 2013).

U těchto rostlin bylo také pozorovatelné ztloustnutí a zakřivení apikální části epikotylů. Všechny tyto jevy odpovídají tzv. trojně odezvě etiolovaných rostlin na ethylen (Guzmán and Ecker, 1990). Proto se domníváme, že inhibice dlouhivého růstu, ztloustnutí a zakřivení epikotylů u těchto rostlin je způsobeno vlivem ethylenu, který je produkován po aplikaci BRs ve vyšších koncentracích. Vliv BRs na produkci ethylenu byl pozorován v dřívějších pracích (Arteca et al. 1983, 1987).

BRs a ethylen jsou hormony, které jsou nezbytné pro vývoj klíčících rostlin ve tmě. Předpokládá se, že mají překrývající se vliv na růst hypokotylu a zakřivení apikální části klíčící rostlin (De Grauwe et al., 2005). Tento jev je důležitý u klíčících rostlin ve tmě pro lepší proražení apikálních částí rostlinek skrze půdu. Po proražení rostlin skrz půdu již není ztloustnutí ani zakřivení hypokotylů nezbytné a mizí. Inhibice produkce ethylenu vlivem světla byla popsána v pracích Arteky a Bachmana (1987).

Navazující analýzy v této diplomové práci se tedy zaměřily na produkci ethylenu po aplikaci BRs. Pro měření ethylenu byla sestavena a optimalizována vhodná metoda měření pomocí plynové chromatografie, která navazuje na biotest inhibice etiolovaného růstu pelušky. V rámci optimalizace byla testována produkce ethylenu v rostlinách v závislosti na době od aplikace 24-epiBL. Bylo zjištěno, že nejvyšší produkce ethylenu nastává 24 hodin od aplikace 24epiBL, v tuto dobu se však zvýšená hladina ethylenu neprojeví na vzhledu rostlin. Výrazně pozměněný vzhled rostlin (ztloustnutí epikotylu, zakřivení apikální části a výrazně kratší délka epikotylu) můžeme pozorovat 4. den (96 hodin) po aplikaci 24-epiBL.

Vzhled rostlin 4. den po aplikaci 24-epiBL je tedy odezvou na nejvyšší produkci ethylenu 1. den po aplikaci.

Dále bylo optimalizováno sycení Erlenmayerovy baňky ethylenem. Bylo potvrzeno, že banka se v průběhu 6-24 hodin sytí ethylenem, který produkují testované rostliny. Měření hladiny ethylenu po více než 24 hodinách od uzavření rostlin do Erlenmayerových baněk nebylo prováděno, protože byly rostliny po delší době v uzavřené baňce výrazně stresovány.

Po optimalizaci metody se ustálilo měření produkce ethylenu následovně: testované rostliny byly 4. den po aplikaci testovaných látek uzavřeny na 24 hodin do Erlenmayerových baněk. Po aplikaci BRs byl zaznamenán nárůst hladiny ethylenu u rostlin, na které byly ošetřeny BRs v rozmezí látkového množství (10^{-7} - 10^{-10} mol). Se snižující se koncentrací testovaného BRs klesala také hladina produkovaného ethylenu. Graf č. 1 resp. 3 koreluje s grafem č. 2. resp. 4 - největší inhibice růstu epikotylu odpovídá nejvyšší produkci ethylenu v testovaných rostlinách. V rámci této fyziologické odpovědi zřejmě existuje limitní množství produkovaného ethylenu nezbytné pro maximální inhibici růstu (např. u BL a 24-epiBL se nachází v rozmezí 10^{-7} - 10^{-9} mol aplikovaného množství). Kompletní inhibice růstu je pozorovatelná ještě při aplikaci 10^{-9} mol, což odpovídá produkci ethylenu v rozmezí 0,1-0,15 $\mu\text{l/ml}$. Většina ostatních růstových regulátorů navazovala při tomto aplikovaném množství výrazně sníženou produkci ethylenu a tím i minimální inhibici v porovnání s účinky BRs.

V této diplomové práci byly v zájmu zjištění specifity testu pro BRs analyzovány i účinky dalších vybraných růstových regulátorů. Po aplikaci těchto látek byla také měřena produkce ethylenu testovanými rostlinami. Jako zástupce cytokininů byl vybrán tZR. Obecně cytokininy mají pozitivní vliv na produkci ethylenu v rostlinách, zejména v kombinaci s IAA (Imaseki et al., 1975). Imaseki zaznamenal výrazný nárůst produkce ethylenu již 2 hodiny po aplikaci benzyladeninu. Během testování cytokininů (tZR) byla mírně vyšší hladina ethylenu pozorována u rostlin, na které byl aplikován tZR v nejvyšším látkovém množství 10^{-7} mol. Vliv tZR na morfologii epikotylu testovaných rostlin byl pozorován v menší míře jen po aplikaci 10^{-7} mol. Imaseki (1975) ve svém pokusu používá benzyladenin (BA) v koncentraci 5×10^{-6} M a produkci ethylenu sledoval v řádech hodin. V této diplomové práci byl použit tZR v látkovém množství 10^{-7} - 10^{-14} mol a produkce ethylenu byla měřena po 4 dnech od aplikace.

Jako další růstový regulátor byla testována IAA (zástupce auxinů). Po aplikaci IAA v látkovém množství 10^{-7} mol rostliny produkovaly nejvíce ethylenu ze všech testovaných rostlin (0,25 $\mu\text{l/ml}$), vyšší produkce ethylenu (oproti kontrolám) byla zaznamenána ještě po aplikaci IAA v látkovém množství 10^{-8} a 10^{-9} mol. Délka a vzhled epikotyly odpovídala produkci ethylenu u testovaných rostlin (graf č. 7 a 8).

Vliv auxinů, konkrétně IAA a NAA (kyselina naftyloctová), na produkci ethylenu byl již popsán (Arteca a Arteca, 2008). V této práci byl testován vliv IAA a NAA v koncentraci 10^{-3} až 10^{-6} M na produkci ethylenu v oddělených květenstvích *Arabidopsis*, přičemž největší produkce ethylenu byla naměřena po aplikaci auxinů v koncentraci 5×10^{-4} M; se snižující koncentrací aplikovaných auxinů klesala i hladina vyprodukovaného ethylenu. Nižší produkce ethylenu byla zaznamenána i po aplikaci auxinů v koncentraci 10^{-3} M (Arteca and Arteca, 2008).

Jako další testovaný regulátor růstu byla použita kyselina giberelová (GA3). Fuchs a Lieberman (1968) ve své práci uvádí, že gibereliny nemají žádný prokazatelný vliv na produkci ethylenu v rostlinách hrachu. V jejich testu byla GA3 použita v koncentraci 10^{-4} M. V této diplomové práci byla zaznamenána mírně zvýšená produkce ethylenu v rostlinách po aplikaci GA3 v látkovém množství 10^{-7} a 10^{-8} mol. Vyšší produkce ethylenu však nekorelovala s nižší délkou epikotyly těchto rostlin, naopak rostliny, na které byla aplikována GA3 v látkovém množství 10^{-7} a 10^{-8} mol vykazovaly vyšší vzrůst oproti ostatním rostlinám. To může být pravděpodobně způsobeno pozitivním vlivem giberelinů na dlouhivý růst (Taiz a Zeiger, 2010).

Jako poslední růstový regulátor byl v této diplomové práci testován TDZ. TDZ ve vyšších koncentracích vyvolává produkci ethylenu, což bylo prokázáno již v několika pracích (Yip and Yang, 1986; Suttle, 1985). Velké praktické uplatnění našla aplikace TDZ vedoucí k opadu listů u bavlníku, který je indukován zvýšenou produkcí ethylenu v listech těchto rostlin. V této diplomové práci byla potvrzena zvýšená produkce ethylenu oproti kontrolám v etiolovaných rostlinách pelušky, na které byl aplikován TDZ v látkovém množství 10^{-7} mol a vyšší produkce ethylenu ve srovnání s kontrolami u rostlin po aplikaci 10^{-8} mol, což jsou ale mnohem nižší účinné koncentrace než je tomu u BRs. Množství produkovaného

ethylenu po aplikaci TDZ odpovídalo pozměněnému vzhledu rostlin po aplikaci 10^{-7} a 10^{-8} mol (graf č.11 a 12).

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo otestovat vliv BRs a dalších růstových regulátorů na klíčící rostliny pelušky (*Pisum arvense* L, cv. Arvika) a stanovit jejich vliv na produkci ethylenu. Brasinosteroidy (BL, 24epiBL) a ostatní růstové regulátory (tZR, IAA, GA3, TDZ) byly testovány v látkovém množství 10^{-7} až 10^{-14} mol. Ke stanovení vlivu testovaných látek na délku a vzhled epikotylů rostlin byl použit test inhibice etiolovaného růstu pelušky.

Po aplikaci BRs ve vyšším látkovém množství (10^{-7} - 10^{-9} mol) byla pozorována výrazná inhibice dlouhivého růstu rostlin. Epikotyly těchto rostlin byly také výrazně ztloustlé a zakroucené v apikální části, což odpovídá projevům trojné odezvy u etiolovaných rostlin hrachu, které jsou pozorovatelné po aplikaci ethylenu. Výrazná inhibice dlouhivého růstu byla pozorována také po aplikaci IAA v látkovém množství 10^{-7} mol. Postupné snižování inhibičního účinku růstu etiolovaných rostlin byl pozorován rovněž po aplikaci TDZ a tZR v látkovém množství 10^{-7} až 10^{-9} mol. Naopak po aplikaci GA3 v látkovém množství 10^{-7} až 10^{-10} mol bylo zaznamenáno prodloužení epikotylu. Obecně lze shrnout, že se snižujícím se látkovým množstvím aplikovaných růstových regulátorů se délka epikotylu prodlužovala až na úroveň kontroly. U ošetřených rostlin byla pozorovatelná charakteristická závislost mezi aplikovanou dávkou a fyziologickou (růstovou) odpovědí, kterou bude možné použít nejen ke srovnání účinnosti látek, ale pravděpodobně i k výpočtu IC50 (ED50).

U testovaných rostlin byla také měřena produkce ethylenu etiolovanými rostlinami pelušky po aplikaci testovaných látek. Největší množství ethylenu (0,25 μ l/ml) produkovaly rostliny pelušky po aplikaci 10^{-7} mol IAA. V případě BL byl zaznamenán výrazný nárůst v produkci ethylenu u rostlin pelušky po aplikaci látek v širokém rozmezí 10^{-7} až 10^{-13} mol, v případě 24epiBL v 10^{-7} až 10^{-10} mol. V případě TDZ byl výrazný nárůst produkce ethylenu oproti kontrole pozorován u rostlin po aplikaci látky 10^{-7} mol a mírnější nárůst po aplikaci 10^{-8} mol. V případě tZR a GA3 byl mírný nárůst produkce ethylenu zaznamenán u rostlin, na které byly tyto látky aplikovány v látkovém množství 10^{-7} a 10^{-8} mol. Obecně platí, že se snižujícím se látkovým množstvím aplikované látky klesala i produkce ethylenu v testované rostlině.

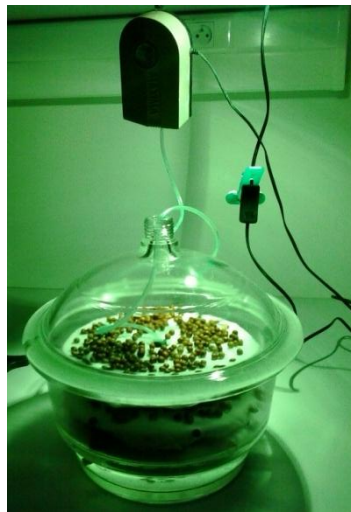
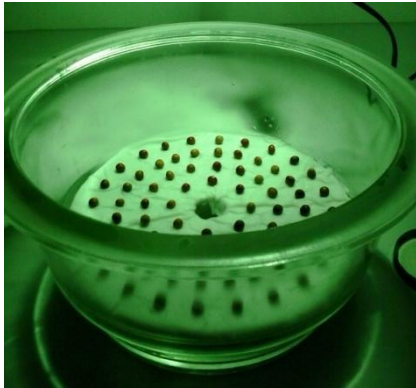
V případě TDZ byl výrazný nárůst produkce ethylenu oproti kontrole pozorován u rostlin po aplikaci látky v látkovém množství 10^{-7} mol a mírnější

nárůst po aplikaci látky v 10^{-8} mol. V případě tZR a GA3 byl mírný nárůst produkce ethyleny zaznamenán u rostlin, na které byly tyto látky aplikovány v látkovém množství 10^{-7} a 10^{-8} mol.

V případě BRs, IAA a TDZ koreluje hladina ethyleny s pozměněným vzhledem rostlin, takže lze předpokládat, že tyto látky mají zásadní vliv na produkci ethyleny v etiolovaných rostlinách.

Výsledky této diplomové práce byly prezentovány na dvou mezinárodních konferencích „Trends in Natural Products Research (2014)“ a „Future Trends in Phytochemistry in the Global Era of Agri-Food and Health (2015)“. V současné době se tento biotest využívá v Laboratoři růstových regulátorů k rutinnímu testování biologické aktivity syntetických analogů brasinosteroidů.

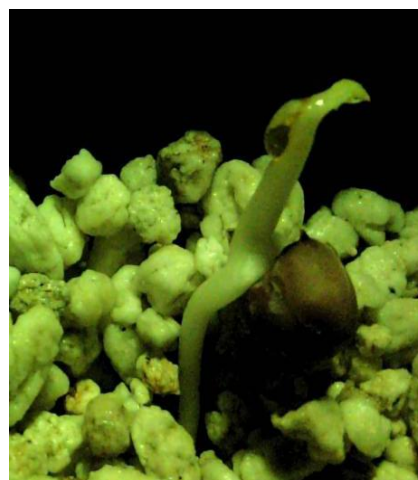
6. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA



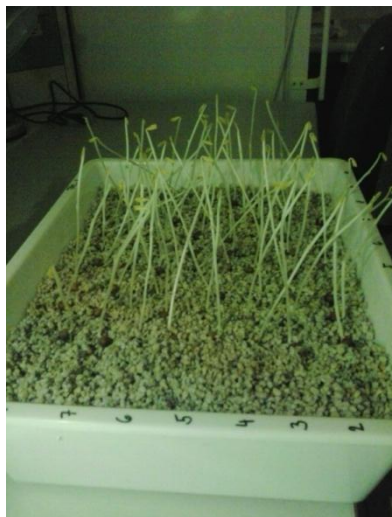
Obr. č. 6: Biotest 2. den: vložení nabobtnaných semen do exsikátoru.



Obr. č. 7: Biotest 4. den: vysazení klíčenců do perlitu



Obr. č. 8: Biotest 5. den: aplikace testovaných látek na semenáčky (před a po aplikaci)



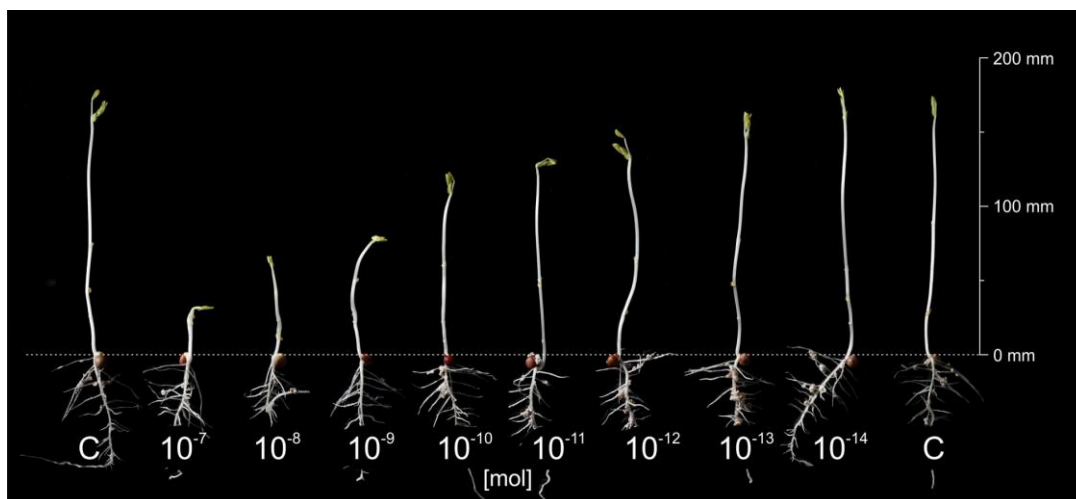
Obr č. 9: Biotest 9. den: testované rostliny před hodnocením délky epikotylu



Obr č. 10: Neprodyšné uzavření testovaných rostlin do Erlenmayerovy baňky.



Obr č. 11: Odebrané vzorky vzduchu z Erlenmayerovy baňky v injekčních stříkačkách



Obr č. 12: Délka epikotylu a celkový vzhled rostlin pelušky 4. den po aplikaci 24-epiBL. (autor fotografie Mgr. Ota Blahoušek)

7. POUŽITÁ LITERATURA

Arteca, R.N., Tsai, D., Schlagnhauser, C., Mandava, N.B. (1983). The effect of brassinosteroid on auxin-induced ethylene production by etiolated mung bean segments. *Physiol. Plant.* **59**, 539-544.

Arteca, R.N., Bachman, J.M. (1987). Light Inhibition of Brassinosteroid-Induced Ethylene Production. *J. Plant Physiol.* **129**, 13-18.

Arteca, R.N., Arteca, J.M. (2008). Effect of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *J. Exp. Botany* **59**, 3019-3026.

Azpiroz, R., Wu, Y., LoCasio, J.C., Feldmann, K.A. (1998). An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell* **10**, 219-230.

Bajguz, A. (2011). Brassinosteroids - Occurrence and Chemical Structures. In: Brassinosteroids: A class of plant hormones, S. Hayat and A. Ahmad, eds. (Dordrecht: Springer), pp. 1-27.

Bao, F., Shen, J., Brady, S.R., Muday, G.K., Asami, T., Yang, Z. (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**, 1624-1631.

Bassi, P. K., Spencer, M.S. (1989). Methods for the quantification of ethylene produced by plants. In: Linskens, H.F., Jacksons, J.F. eds. Gases in plant and microbial cells. Modern methods of plant Analysis, Vol. 9. Berlin: Springer, 309-321.

Bernhard, R. A. (1960). Effect of flow-rate and sample-size on column efficiency in gas-liquid chromatography. *Nature* **185**, 311-312.

Blumberg, L. M., Klee, M. S. (2000). Optimal heating rate in gas chromatography. *J. Microcolumn Sep.* **12**, 508-514.

Bradford, K. J., Yang, S. F. (1980). Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. *Plant Physiol.* **65**, 322-326.

Caesar, K., Elgass, K., Chen, Z., Huppenberger, P., Witthoft, J., Schleifenbaum, F., Blatt, M.R., Oecking, C., Harter, K. (2011). A fast brassinolide-regulated response pathway in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **66**, 528-540.

Cano-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-Garcia, S., Cheng, J.C., Nam, K.H., Li, J., Chory, J. (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* **131**, 5341-5351.

Catterou, M., Dubois, F., Schaller, H., Aubanelle, L., Vilcot, B., Sangwan-Norreel, B.S., Sangwan, R.S. (2001). Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in

Arabidopsis thaliana. II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the *bull* mutant. *Planta* **212**, 673-683.

Choe, S., Dilkes, B.P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., Feldmann, K.A. (1998). The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22-alpha-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **10**, 231-243.

Choe, S., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tissier, C.P., Gregory, B.D., Ross, A.S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F.E., Feldmann, K.A. (1999). The *Arabidopsis* *dwf7/stel* mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **11**, 207-221.

Choe, S., Tanaka, A., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ross, A.S., Tax, F.E., Yoshida, S., Feldmann, K.A. (2000). Lesions in the sterol delta reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *Plant J.* **21**, 431-443.

Clark, D. G., Gubrium, E. K., Barrett, J.E., Nell, T. A., Klee, H. J. (1999). Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiol.* **121**, 53-60.

Clouse, S.D., Zurek, D. (1991). Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. In: *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, & Applications*, H.G. Cutler, T. Yokota, and G. Adam, eds. (Washington, D.C.: American Chemical Society), pp. 122-140.

Clouse, S.D., Langford, M., Mc Morris, T.C. (1996). A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol.* **111**, 671-678.

Clouse, S.D. (1997). Molecular genetic analysis of brassinosteroid action. *Physiol. Plant.* **100**, 702-709.

Clouse, S.D. (2008). The molecular intersection of brassinosteroid-regulated growth and flowering in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 7345-46.

Clouse, S.D. (2011). Brassinosteroids. *The Arabidopsis book*. **9**.

Cosgrove, D. (1997). Relaxation in a high-stress environment: the molecular basis of extensible cell walls and enlargement. *Plant Cell* **9**, 1031-1041.

Cristescu, S. M., Mandon, J., Arslanov, D., De Pessemier, J., Hermans, C., Harren, F. J. M. (2012). Current methods for detecting ethylene in plants. *Annals of Botany*, available online at www.aob.oxfordjournals.org.

Cutler, H.G. (1991). Brassinosteroids through the looking glass. In: *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, & Applications*, H.G. Cutler, T. Yokota, and G. Adam, eds. (Washington, D.C.: American Chemical Society), pp. 334-345.

- De Grauwe, L., Vandenbussche, F., Tietz, O., Palme, K., Van Der Straeten, D. (2005). Auxin, ethylene and brassinosteroids: tripartite control of growth in the *Arabidopsis hypocotyl*. *Plant Cell Physiol.* **46**, 827–836.
- Friedrichsen, D.M., Joazeiro, C.A., Li, J., Hunter, T., Chory, J. (2000). Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* **123**, 1247-1256.
- Fuchs, Y., Lieberman, M. (1968). Effects of kinetin, IAA, and gibberellin on ethylene production, and their interactions in growth of seedlings. *Plant Physiol.* **43**, 2029-2036.
- Fujioka, S. (1999). Natural occurrence of brassinosteroids in the plant kingdom. In *Brassinosteroids: Steroidal plant hormones*, A. Sakurai, T. Yokota, and S. Clouse, eds (Tokyo: Springer), pp. 21-45.
- Fujioka, S., Yokota, T. (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 137-164.
- Fukuda, H. (1997). Tracheary element differentiation. *Plant Cell* **9**, 1147-1156.
- Fukuda, H. (2004). Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 379-391.
- Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N.B., Worley, J.F., Warthen, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L., Cook, J.C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **281**, 216-217.
- Gupta, P. L. (1969). A new variable path length column for gas chromatography. *J. Chrom.* **39**, 373–382.
- Guzmán, P., Ecker, J. R. (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* **2**, 513-523.
- Hai, T., Schneider, B., Porzel, A., Adam, G. (1996). Metabolism of 24-epicastasterone in cell suspension cultures of *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry* **41**, 197-201.
- He, R.Y., Wang, G.J., Wang, X.S. (1991). Effects of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings. In: Cutler, H.G., Yokota, T., Adam, G. (eds.) *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Applications*, ASC Symp Ser 474. Amer. Chem. Soc., Washington DC, 220-230.
- Hewitt, F.R., Hough, T., O'Neill, P., Sasse, J.M., Williams, E.G., Rowan, K.S. (1985). Effect of brassinolide and other growth regulators on the germination and growth of pollen tubes of *Prunus avium* using a multiple hanging drop assay. *Aust. J. Plant Physiol.* **1**, 201-211.

- Hodson, M. J., Bryant, J. A. (2012). Genes, Gene Expression and Development. In: Functional Biology of Plants. Wiley-Blackwell. USA.
- Hong, Z., Ueguchi-Tanaka, M., Shimizu-Sato, S., Inukai, Y., Fujioka, S. et al. (2002). Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cell in the leaves and stem. *Plant J.* **32**, 495-508.
- Howell, W.M., Keller, G.E., 3rd, Kirkpatrick, J.D., Jenkins, R.L., Hunsinger, R.N., McLaughlin, E.W. (2007). Effects of the plant steroidal hormone, 24-epibrassinolide, on the mitotic index and growth of onion (*Allium cepa*) root tips. *Genet. Mol. Res.* **6**, 50-58.
- Huelin, F.E., Kennett, B. H. (1959). Nature of the olefines produced by apples. *Nature* **184**, 996.
- Ibanes, M., Fabregas, N., Chory, J., Cano-Delgado, A.I. (2009). Brassinosteroid signaling and auxin transport are required to establish the periodic pattern of Arabidopsis shoot vascular bundles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 13630-13635.
- Imaseki, H., Kondo, K., Watanabe, A. (1975). Mechanism of cytokinin action on auxin-induced ethylene production. *Plant Cell Physiol.* **16**, 777-787.
- Iwasaki, T., Shibaoka, H. (1991). Brassinosteroids act as regulators of tracheary-element differentiation in isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.* **32**, 1007-1014
- James, A. T., Martin, A. J. P. (1952). Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem. J.* **50**, 679-690.
- Jones, J. F., Kende. H. (1979). Auxin induced ethylene biosynthesis in subapical stem sections of etiolated seedlings of *Pisum sativum* L. *Planta* **146**, 649-56.
- Katsumi, M. (1991). Physiological modes of brassinolide action in cucumber hypocotyl growth. In: Culter, H.G., Yokota, T., Adam, G. (eds.) Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Applications, ACS Symp Ser 474. Amer. Chem. Soc., Washington DC, p. 246-254.
- Kauschmann, A., Jessop, A., Koncz, C., Szekeres, M., Willmitzer, L., Altmann, T. (1996). Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant J.* **9**, 701-713.
- Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N., De Groot, A.E. (1999). Brassinosteroids, a New Class of Plant Hormones. Academic Press, San Diego.
- Kim, T.W., Wang, Z.Y. (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Ann. Rev. Plant Biol.* **61**, 681-704.

- Kinoshita, T., Caño-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., Chory, J. (2005). Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* **433**, 167-171.
- Kohout, L., Strnad, M., Kaminek, M. (1991). Types of brassinosteroids and their bioassay. In: Cutler, H.G., Yokota, T., Adam, G. (eds.) *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Applications*, ASC Symp. Ser 474. Amer. Chem. Soc., Washington DC, 56-73.
- Koka, C.V., Cerny, R.E., Gardner, G.R., Noguchi, T., Fujioka, S., et al. (2000). A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiol.* **122**, 85-98.
- Kořínková, P. (2013). Testování vlivu brassinosteroidů na etiolovaných rostlinách hrachu. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Krishna, P. (2003). Brassinosteroids-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.* **22**, 289-297.
- Kulaeva, O.N., Burkhanova E.A., Fedina, A.B., Vorbodt, H.M., Adam, G., et al. (1991). Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultrastructure under stress conditions. In: Cutler, H.G., Yokota, T., Adam, G. (eds.) *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Applications*, ASC Symp Ser 474. Amer. Chem. Soc., Washington DC, 141-155.
- Lanahan, M., Yen, H.-C., Giovannoni, J., Klee, H. (1994). The Never-ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell.* **6**, 427-441.
- Lawson, A. E., Miller, J. M. (1966). Thermal conductivity detectors in gas chromatography. *J. Gas Chrom.* **4**, 273-284.
- Li, J., Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929-938.
- Lovelock, J. E. (1960). Photoionization detector for gases and vapours. *Nature* **188**, 401.
- Maeda, E. (1965). Rate of lamina inclination in excised rice leaves. *Physiol. Plant.* **18**, 813-827.
- Mandava, N., Mitchell, J.W. (1971). New plant hormones: chemical and biological investigations. *Indian Agr.* **15**, 19-31.
- Mandava, N.B. (1988). Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **39**, 23-52.
- Mayumi, K., Shibaoka, H. (1995). A possible double role for brassinolide in the re-orientation of cortical microtubules in the epidermal cells of Azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* **36**, 173-181.

- McWilliam, I. G. (1983). The origin of the flame ionization detector. *Chromatographia* **17**, 241–243.
- Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R., Smith, M.V. (1970). Brassins - a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* **225**, 1065-1066.
- Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Drowne, M.E. (1971). Fatty hormones in pollen and immature seeds of bean. *J. Agric. Food Chem.* **19**, 391-393.
- Morillon, R., Catterou, M., Sangwan, R.S., Sangwan, B.S., Lassalles, J.P. (2001). Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **212**, 199-204.
- Mussing, C. (2005). Brassinosteroid-promoted growth. *Plant Biol.* **7**, 110-117.
- Nakajima, N., Shida, A., Toyama, S. (1996). Effects of brassinosteroid on cell division and colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts. *Japan. J. Crop Science* **65**, 114-118.
- Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Tax, F.E. et al. (2000) Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **124**, 201-209.
- Oh, M.H., Clouse, S.D. (1998). Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Rep.* **17**, 921-924
- Ohashi-Ito, K., Fukuda, H. (2003). HD-zip III homeobox genes that include a novel member, ZeHB-13 (*Zinnia*)/ATHB-15 (*Arabidopsis*), are involved in procambium and xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol.* **44**, 1350-1358.
- Ohashi-Ito, K., Fukuda, H. (2010). Transcriptional regulation of vascular cell fates. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 670-676.
- Ohashi-Ito, K., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H. (2005). Class III homeodomain leucine-zipper proteins regulate xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1646-1656.
- Pavlová, L., Fischer, L. (2011). Etylén. In: Růst a vývoj rostlin. Karolinum. Praha.
- Phillips, C. S. G. (1949). Organic and biochemical: the chromatography of gases and vapours. *Disc. Faraday Soc.* **7**, 241–248.
- Roddick, J.G., Guan, M. (1995). Brassinosteroids and root development. In: Culter, H.G., Yokota, T., Adam, G. (eds.) Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Applications, ACS Symp. Ser 474. Amer. Chem. Soc., Washington DC, 231-245.
- Sakurai, A., Fujioka, S. (1997). Studies on biosynthesis of brassinosteroids. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 757-762.

- Sakurai, A. (1999). Brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 351-361.
- Schomburg, G. (1990). Gas Chromatography. Weinheim: Wiley VCH.
- Schumacher, K., Vafeados, D., McCarthy, M., Sze, H., Wilkins, T., Chory, J. (1999). The Arabidopsis *det3* mutant reveals a central role for the vacuolar H(+)-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev.* **13**, 3259-3270.
- Steber, C.M., McCourt, P. (2001). A role for brassinosteroids in germination in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **125**, 763-769.
- Steffens, G.L. (1991). U.S. Department of Agriculture Brassins Project: 1970-1980. In Brassinosteroids Chemistry, bioactivity and applications, H.G. Culter, T. Yokota, and G. Adam, eds (Washington, D.C.: American Chemical Society), pp 2-17.
- Suttle, J.C. (1985). Involvement of ethylene in the action of the cotton defoliant thidiazuron. *Plant Physiol.* **78**, 272-276.
- Szekeres, M., Nemeth, K., Koncz-Kalman, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Redei, G.P., Nagy, F., Schell, J., Koncz, C. (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. *Cell* **85**, 171-182.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010). Brassinosteroids. In: Plant Physiology. Fifth edition. Sinauer Associates, Inc. USA.
- Takahashi, T., Gasch, A., Nishizawa, N., Chua, N. (1995). The *DIMINUTO* gene of Arabidopsis is involved in regulating cell elongation. *Genes Dev.* **9**, 97-107.
- Takeno, K., Pharis, R.P. (1982). Brassinosteroid-induced bending of the leaf lamina of dwarf rice seedlings: an auxin-mediated phenomenon. *Plant Cell Physiol.* **23**, 1275-1281.
- Tang, W., Deng, Z., Osés-Prieto, J.A., Suzuki, N., Zhu, S., Zhang, X., Burlingame, A.L., Wang, Z.Y. (2008). Proteomics studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. *Mol Cell Proteom.* **7**, 728-738.
- Thain, S. C., Vandenbussche, F., Laarhoven, L. J., Dowson-Day, M. J., Wang, Z. Y., Tobin, E. M., Harren, F. J., Millar, A. J., Van Der Straeten, D. (2004). Circadian rhythms of ethylene emission in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **136**, 3751-3761.
- Tominaga, R., Sakurai, N., Kuraiishi, S. (1994). Brassinolide-induced elongation of inner tissues of segments of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* **35**, 1103-1106.
- Trusov, Y., Botella, J.R. (2006). Silencing of the ACC synthase gene ACACS2 causes delayed flowering in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. *J Exp. Bot.* **57**, 3953-3960.

- Vert, G., Nemhauser, J.L., Geldner, N., Hong, F., Chory, J. (2005). Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 177-201.
- Wada, K., Marumo, S., Ikekawa, N., Morisaki, M., Mori, K. (1981). Brassinolide and homobrassinolide promotion of lamina inclination of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* **22**, 323-325.
- Wada, K., Marumo, S., Abe, H., Morishita, T., Nakamura, K., Uchiyama, M., Mori, K. (1984). A rice lamina inclination test - a microquantitative bioassay for brassinosteroids. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 719-726.
- Wang, T.W., Cosgrove, D.J., Arteca, R.N. (1993). Brassinosteroid stimulation of hypocotyl elongation and wall relaxation in pakchoi (*Brassica chinensis* cv. *Lei-Choi*). *Plant Physiol.* **101**, 965-968.
- Wang, X., Goshe, M.B., Soderblom, E.J., Phinney, B.S., Kuchar, J.A., Li, J., Asami, T., Yoshida, S., Huber, S.C., Clouse, S.D. (2005a). Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell* **17**, 1685-1703.
- Wang, X., Li, X., Meisenhelder, J., Hunter, T., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J. (2005b). Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Dev. Cell* **8**, 855-865.
- Wang, X., Chory, J. (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* **313**, 1118-1122.
- Xi, W., Yu, H. (2010). MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination and fertility relevant to the brassinosteroid signaling pathway. *Plant Signal Behav.* **5**, 1315-1317.
- Yang, S. F., Hoffman, N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol* **35**: 155-189
- Ye, Q., Zhu, W., Li, L., Zhang, S., Yin, Y., Ma, H., Wang, X. (2010). Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 6100-6105.
- Yip, W., Yang, S.F. (1986). Effect of thidiazuron, a cytokinin-active urea derivative, in cytokinin-dependent ethylene production systems. *Plant Physiol.* **80**, 515-519.
- Yokota, T., Mori, K. (1992). Molecular structure and biological activity of brassinolide and related brassinosteroids. In: *Molecular Structure and Biological Activity of Steroid*, ed. M Bohl, W1 Duax, CRC, Boca raton, 317-340.
- Yopp, J.H., Mandava, N.B., Sasse, J.M. (1981). Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. I. Activity in selected auxin bioassay. *Physiol. Plant.* **53**, 445-452.

Zurek, D.M., Rayle, D.L., McMorris, T.C., Clouse, S.D. (1994). Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. *Plant Physiol.* **104**, 505-513.