

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



Studium vlivu exogenní aplikace brassinosteroidů na  
jejich endogenní hladiny u etiolovaných rostlin hrachu  
setého (*Pisum arvense L.*)

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

<b>Autor:</b>	<b>Helena Vlasáková</b>
<b>Studijní program:</b>	B1501 Biologie
<b>Studijní obor:</b>	Experimentální biologie
<b>Forma studia:</b>	prezenční
<b>Vedoucí práce:</b>	<b>Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.</b>
<b>Termín odevzdání práce:</b>	2020

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Helena Vlasáková
Název práce	Studium vlivu exogenní aplikace brassinosteroidů na jejich endogenní hladiny u etiolovaných rostlin hrachu setého ( <i>Pisum arvense L.</i> )
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce se zabývá objasněním, jak exogenně aplikované brassinosteroidy ovlivňují jejich endogenní hladiny u etiolovaných rostlin. Teoretická část popisuje vlastnosti, chemickou strukturu, biosyntézu a signální dráhu brassinosteroidů a jejich interakce s ostatními fytohormony. Vysvětluje, jaké funkce v rostlinách zastávají a jak na rostliny působí. Také seznamuje se způsoby testování, izolace z rostlinného materiálu a jejich stanovení. V experimentální části práce byl nejprve proveden biotest inhibice etiolovaného růstu rostlin hrachu setého (<i>Pisum arvense L.</i>), v němž jsou rostliny ovlivněny koncentrační řadou 24-epibrassinolidu. Následně byla u těchto rostlin provedena kvantifikace endogenních hladin brassinosteroidů. K jejich izolaci byla využita extrakce na pevné fázi (SPE) spolu s imunoafinitní chromatografií (IAC) a endogenní koncentrace brassinosteroidů byly stanoveny pomocí UHPLC-MS/MS analýzy. Na závěr bylo vyhodnoceno, jaké koncentrace exogenně aplikovaného 24-epibrassinolidu dokáží ovlivnit endogenní hladiny brassinosteroidů u etiolovaných rostlin.</p>
Klíčová slova	Brassinosteroidy, biotest, etiolizace, hrách setý, SPE, imunoafinitní chromatografie, UHPLC-MS/MS
Počet stran	55
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Helena Vlasáková
Title of the thesis	Effect of brassinosteroid exogenous application on their endogenous levels in etiolated pea seedlings ( <i>Pisum arvense L.</i> )
Type of the thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>The aim of this bachelor thesis is to elucidate on how the exogenously applied brassinosteroids affect their endogenous levels. The theoretical part describes characteristic properties, chemical structure, biosynthesis and signaling pathway of the brassinosteroids, along with their interactions with other phytohormones. It presents details about their functions in a plant tissue, how they affect it, what bioassays are being used for measuring their biological activity and how they can be isolated, detected and quantified in a plant matter. In the experimental part an etiolated pea growth inhibition bioassay is performed on <i>Pisum arvense L.</i>, during which 24-epibrassinolide is applied on etiolated seedlings in a range of concentrations from <math>2 \cdot 10^{-9}</math> to <math>2 \cdot 10^{-2}</math> M. The solid-phase extraction (SPE) and the immunoaffinity chromatography (IAC) are used for an isolation of brassinosteroids from the samples and their endogenous levels are determined by performing the UHPLC-MS/MS analysis. Thanks to obtained values it is concluded, which concentrations of exogenously applied 24-epibrassinolide do affect brassinosteroid endogenous levels in etiolated peas.</p>
Keywords	Brassinosteroids, bioassay, etiolation, pea seedlings, solid-phase extraction, immunoaffinity chromatography, UHPLC-MS/MS
Number of pages	55
Number of appendices	1
Language	Czech

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

V Olomouci dne:

podpis:

Ráda bych poděkovala Mgr. Janě Oklešťkové, Ph.D. za její čas, trpělivost a pomoc při práci v laboratoři i při vyhodnocování a Ing. Petře Amakorové za provedení UHPLC-MS/MS analýzy. Dále bych ráda poděkovala Laboratoři růstových regulátorů za poskytnutí prostor a přístrojů pro provádění experimentální části práce.

Tato bakalářská práce byla realizována za podpory Interní grantové agentury UP (IGA\_PrF\_2020\_021).

## OBSAH

SEZNAM ZKRATEK .....	8
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1 BRASSINOSTEROIDY .....	11
2.1.1 Chemická struktura BRs .....	11
2.1.2 Biosyntéza BRs .....	13
2.1.3 Signální dráha BRs .....	15
2.1.4 Funkce BRs v rostlinách a jejich účinky .....	16
2.1.5 Cross-talk BRs s ostatními fytohormony .....	20
2.2 BIOTESTY VYUŽÍVANÉ PŘI STUDIU BRs .....	22
2.3 METODY IZOLACE A STANOVENÍ BRs .....	24
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	27
3.1 POMŮCKY A MATERIÁLY .....	27
3.1.1 Pomůcky .....	27
3.1.2 Biologický materiál .....	27
3.1.3 Chemikálie .....	27
3.1.4 Přístrojová technika .....	28
3.2 METODY PRÁCE .....	29
3.2.1 Příprava etiolovaných rostlin – Biotest .....	29
3.2.2 Homogenizace rostlinného materiálu .....	30
3.2.3 Extrakce .....	30
3.2.4 SPE purifikace .....	30
3.2.5 Imunoafinitní chromatografie .....	31
3.2.6 Příprava vzorků na UHPLC-MS/MS analýzu .....	32
4 VÝSLEDKY .....	33

5	DISKUZE .....	42
6	ZÁVĚR.....	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	46
	PŘÍLOHA 1 .....	55

## SEZNAM ZKRATEK

- 24-epiBL** – 24-epibrassinolid
- 24-epiCS** – 24-epicastasteron
- 28-homoBL** – 28-homobrassinolid
- ABI5** – abscisic acid insensitive 5
- ACS** – synthasa 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny
- BAK1** – BRI1-associated receptor kinasa 1
- BES1/BZR2** – BRI1-EMS supresor 1
- BIN2** – glycogen synthase kinase 3 (GSK-3)
- BKI1** – BRI1 kinase inhibitor 1
- BL** – brassinolid
- BRs** – brassinosteroidy
- BRI1** – brassinosteroid insensitive kinasa 1
- BSU1** – BRI1 supresor 1
- BZR1** – brassinazole resistant 1
- CS** – castasteron
- CUC** – cup-shaped cotyledon geny
- CYP72B1** – cytochrom P450 72B1
- CYP90B1** – cytochrom P450 90B1
- FW** – čerstvá hmotnost
- GAs** – gibberelliny
- HCS** – 28-homocastasteron
- IAA** – kyselina indol-3-octová
- IAC** – imunoafinitní chromatografie
- LLE** – extrakce kapalina-kapalina
- LRR** – leucin-rich repeats



**PBS** – fosfátový pufr

**ROS** – reactive oxygen species

**SA** – kyselina salicylová

**SPE** – extrakce na pevné fázi

**UHPLC-MS/MS** – Ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií

## 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Brassinosteroidy (BRs) jsou rostlinné steroidní hormony účastníci se komplexních procesů rostlinného vývoje a růstu, které dokáží regulovat především díky jejich vlivu na buněčnou expanzi a proliferaci. Mezi jejich nejdůležitější vlastnosti patří schopnost ovlivňovat vývoj rostliny, senescenci, fertilitu, účastnit se odpovědí na stresové faktory a zvyšovat rezistenci rostlin ve stresových podmínkách. Jde o jedny z nejstudovanějších fytohormonů posledních let, a to především díky možnosti jejich využití pro zvýšení výnosu pěstovaných plodin, ale i pro potenciální využití v medicíně.

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit, jaký vliv má koncentrace exogenně aplikovaných BRs na hladiny endogenních BRs v rostlině. Vliv exogenní aplikace BRs na morfologické a fyziologické změny v rostlinné tkáni byl mnohokrát zkoumán a pomohl též k porozumění propojení mezi signálními drahami BRs s ostatními fytohormony. Tato práce by mohla rozšířit poznatky o tom, jaký je vztah mezi aplikovanou koncentrací a vnitřní koncentrací BRs.

Teoretická část práce představuje přehled vlastností a funkcí BRs, popisuje jejich biosyntetickou a signální dráhu a jejich nejčastější způsob analýzy a využití v praxi. V experimentální části práce je popsáno, jak byl proveden biotest na etiolovaných rostlinách pelušky (*Pisum arvense L.*), optimalizovaný v diplomové práci Mgr. Petry Jiroutové (Košínková, 2015), při kterém byly aplikovány různé koncentrace 24-epibrassinolidu (24-epiBL) a jeho působení bylo zhodnoceno změřením délky epikotyly narostlých rostlin. Jednotlivé rostlinky byly následně zhomogenizovány, byla provedena extrakce acetonitrilem, vzorky byly purifikovány pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) a následně imunoafinitní chromatografií (IAC). Pomocí UHPLC-MS/MS analýzy byly stanoveny endogenní hladiny BRs v rostlinách ovlivněných různými koncentracemi exogenně aplikovaných BRs. Po kvantifikaci byly výsledky zhodnoceny a srovnány s publikovanými výsledky.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 BRASSINOSTEROIDY

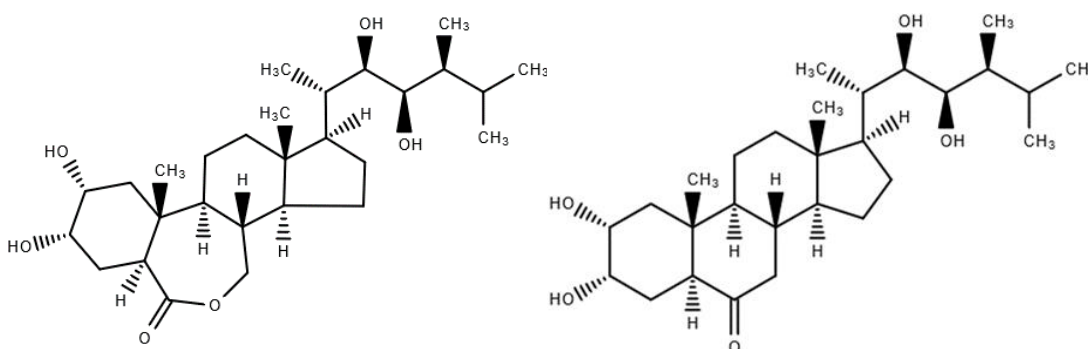
Brassinosteroidy (BRs) jsou jednou z nejnovějších tříd fytohormonů, přirozeně se vyskytujících látek sloužících k přenosu informací v rostlinném těle. Poprvé byly izolovány z pylových zrn rostliny řepky olejky (*Brassica napus L.*), podle které také dostaly jméno (Mitchell *et al.*, 1970). Dodnes však byla jejich přítomnost prokázána u více než stovky dalších rostlinných druhů napříč celou rostlinnou říší. V rostlinných tkáních se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, především v pylu a semenech, která obsahují až 100 ng BRs na 1 g čerstvé hmoty, dále v tyčinkách, mladých vegetativních tkáních, ale též v listech, stoncích, kořenech a květech (Bajguz & Tretyn, 2003; Bajguz, 2011). V rostlinách zastávají esenciální funkci, jelikož svým působením ovlivňují rostlinný vývoj, růst, rozmnožování, senescenci a významně se účastní odpovědi na vnější stres. Rostlina je díky nim schopná bránit se před účinky různých stresových faktorů, ať už jde o zvýšenou salinitu, sucho, extrémní teploty, těžké kovy nebo herbicidy (Sasse, 1999).

Díky tomu, že BRs hrají významnou roli v rostlinném růstu a vývoji, našly své uplatnění v zemědělství. Ukázalo se, že dokáží zvýšit výnosy plodin a též jejich kvalitu zejména ve stresových podmínkách (Khripach *et al.*, 2000). Nedávné výzkumy ukázaly, že by BRs mohly být kromě zemědělství potenciálně využity i v medicíně a to díky jejich antiproliferativním, protirakovinným (Malíková *et al.*, 2008), antiangiogenním (Rárová *et al.*, 2012), neuroprotektivním (Ismaili *et al.*, 2012), antivirálním (Wachsmann *et al.*, 2000; Michelini *et al.*, 2004), imunomodulativním (Michelini *et al.*, 2008), antioxidantivním (Vitvitskaya *et al.*, 1997), anabolickým (Esposito *et al.*, 2011) a anticholesterolemickým (Statsenko *et al.*, 2008) vlastnostem prokázaným v živočišných modelech a lidských buňkách.

#### 2.1.1 Chemická struktura BRs

V roce 1974 byla provedena rentgenová krystalografie látky získané extrakcí pylových zrn *Brassica napus L.* pomocí 2-propanolu, čímž byla objasněna struktura aktivní látky

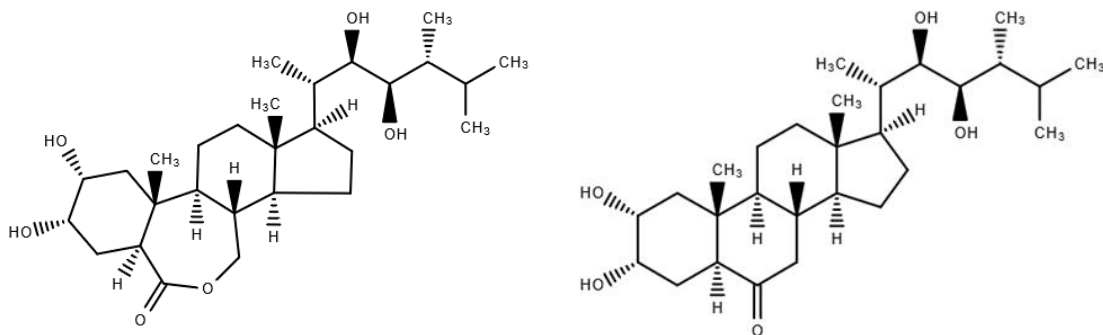
brassinolidu (BL). Bylo stanoveno, že se jedná o steroidní látku (22R, 23R, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ , 22, 23-tetrahydroxy-24-methyl-B-homo-7 $\alpha$ -5 $\alpha$ -cholestan-6-on (viz Obr. 1), a tím se stal první steroidní látkou s regulační aktivitou izolovanou z rostlin se svou strukturou podobnou živočišným steroidům (*Grove et al., 1979*). O 6 let později byl izolován druhý BR z hálek stromu *Castanea crenata*, který byl nazván castasteron (CS). Jeho chemická struktura byla stanovena jako (22R, 23R, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ , 22, 23-tetrahydroxy-24-methyl-5 $\alpha$ -cholestan-6-on (*Yokota et al., 1982*; viz Obr. 1). Od té doby bylo identifikováno okolo 70 různých molekul přírodních BRs a bylo nasyntetizováno mnoho jejich analogů.



Obr. 1: Chemická struktura brassinolidu (vlevo) a castasteronu (vpravo).

Obecně se jedná o polyhydroxysteroidy odvozené od 5 $\alpha$ -cholestanu lišící se různými substituenty na A a B kruhu a postranním řetězcem na C17. BRs s jednou  $\alpha$ -hydroxylovou,  $\beta$ -hydroxylovou nebo keto skupinou na C3 A-kruhu jsou prekurzory aktivních BRs, které mají na A-kruhu povětšinou 2 $\alpha$  a 3 $\alpha$ -hydroxylové skupiny (*Bajguz & Tretyn, 2003*). Modifikace B kruhu též ovlivňují biologickou aktivitu BRs; rozdělují se na nejaktivnější 7-oxolakton, 6-oxo, 6-deoxo a nejméně aktivní s 6-hydroxy skupinou (*Bajguz, 2011*).

Prvními nasyntetizovanými BRs byly strukturální isomery BL a CS – 24-epibrassinolid (24-epiBL) a 24-epicastasteron (24-epiCS; viz Obr. 2) –, k jejichž syntéze byl použit prekurzor ergosterol (*Thompson et al., 1979*). Ze stigmasterolu byl dále nasyntetizován 28-homobrassinolid (28-homoBL) a samotný BL (*Mori et al., 1982*). Metody chemické syntézy nahradily složitou a nákladnou izolaci BRs, která často měla velmi nízké výnosy, a bylo tak umožněno efektivnější využití těchto látek ve výzkumu (*Cutler, 1991*).



Obr. 2: Chemická struktura 24-epibrassinolidu (vlevo) a 24-epicastasteronu (vpravo).

### 2.1.2 Biosyntéza BRs

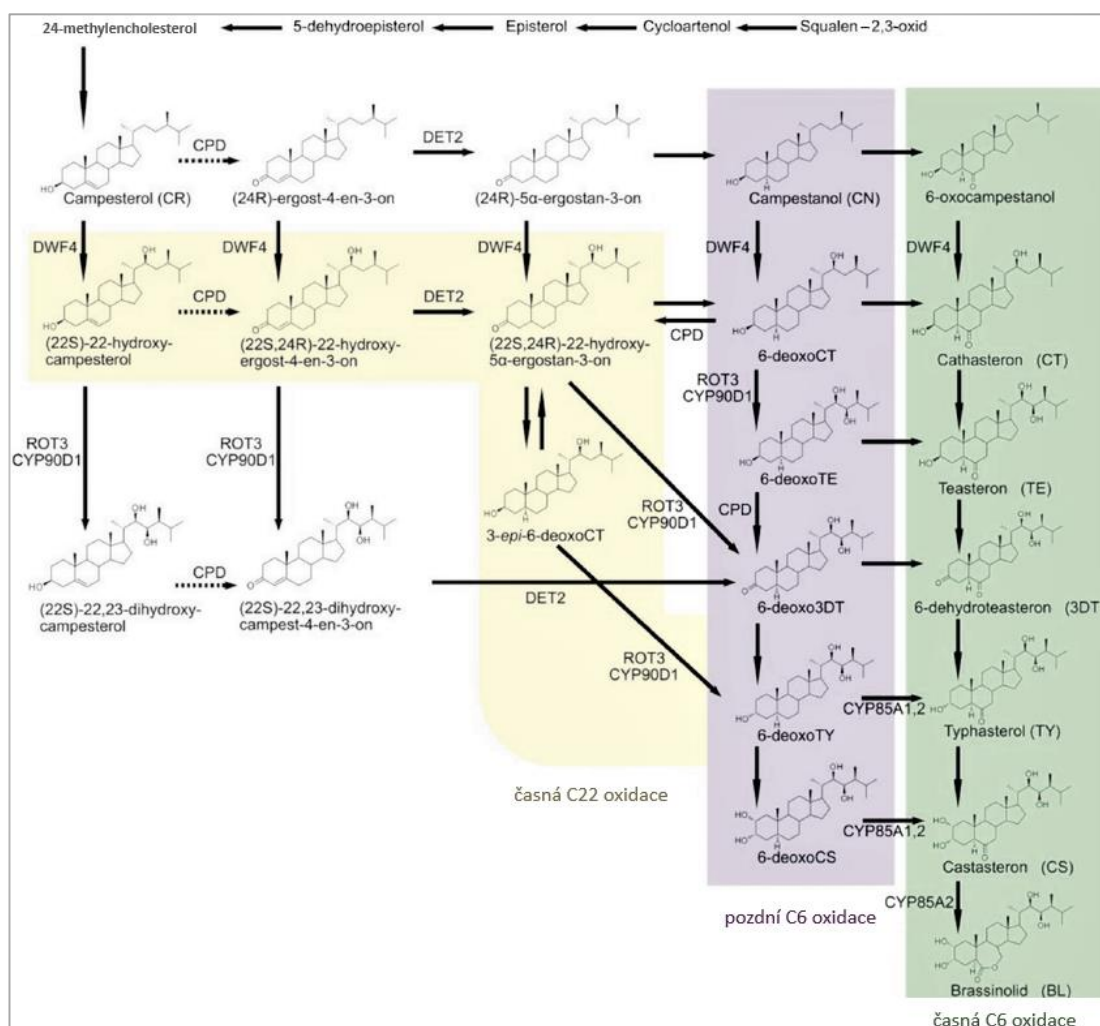
Biosyntéza BRs začíná a probíhá stejně jako u ostatních sterolů přeměnou ze skvalenu. Druhá část biosyntézy je specifická pro BRs a začíná přeměnou prekurzorů, vzniklých ze skvalenu, na aktivní formy BRs.

Prekurzory BRs jsou campesterol, sitosterol či cholesterol, ze kterých jsou BRs syntetizovány terpenoidní cestou (*Clouse & Sasse, 1998*). Nečastější v rostlinách je campesterol, jehož další modifikace probíhají třemi cestami. Dvě hlavní začínají přeměnou campesterolu na campestanol, který je buď časnou nebo pozdní C6 oxidací (ve srovnání s introdukcí hydroxylových skupin na C22 a C23) přeměněn na CS. V časně fázi dochází k C6 oxidaci ihned po vytvoření campestanolu, který je tím přeměněn na 6-oxocampestanol, zatímco v pozdní nastává C6 oxidace až v posledním kroku před vznikem CS. Z CS je následně přímo syntetizován BL. Jde o řadu oxidativních reakcí katalyzovaných cytochrom P450 monooxygenasami (*Fujioka & Yokota, 2003*). Pozdní cesta biosyntézy převažuje v mnoha rostlinných druzích, např. v *Arabidopsis*, hrachu a rajčeti, což poukazuje na její dominantní úlohu v biosyntéze BRs (*Nomura et al., 2001*).

Třetí cesta biosyntézy byla objevena později, začíná hydroxylací campesterolu a oproti předchozím dvěma zcela obchází syntézu campestanolu. Enzym CYP90B1 v *Arabidopsis*, jež katalyzuje C22 hydroxylaci campestanolu (v pozdní C6 oxidaci) a 6-oxocampestanolu (v časně C6 oxidaci), dokáže jako substrát využít samotný campesterol, který je tímto enzymem hydroxylován na (22S)-22-hydroxycampesterol (*Fujita et al., 2006*). Dle této reakce se dráha značí jako časná C22 oxidace. V této cestě 23-hydroxylasy umožňují přeměnu (22S,24R)-22-hydroxyergost-4-en-3-onu na

(22R,23R)-22,23-dihydroxy-campester-4-en-3-on, dále se přeměňuje (22S,24R)-22-hydroxy-5 $\alpha$ -ergostan-3-on na 3-dehydro-6-deoxoteasteron a 3-epi-6-deoxocathasteron na 6-deoxytyphasterol, čímž dochází ke zkrácení biosyntézy o dva enzymatické kroky (Ohnishi *et al.*, 2006; viz Obr. 3).

Regulace biosyntézy BRs je obecně zprostředkována inhibitory se strukturou azolu (např. brassinazol), která je schopná vázat hem obsahující atom železa, jež je součástí prostetické skupiny cytochrom P450 monooxygenas. Tím je aktivita enzymů inhibována a biosyntéza pozastavena. (Wang *et al.*, 2002). Naopak stimulována je biosyntéza BRs přirozeně nízkou hladinou BRs v rostlině (Vriet, 2012).

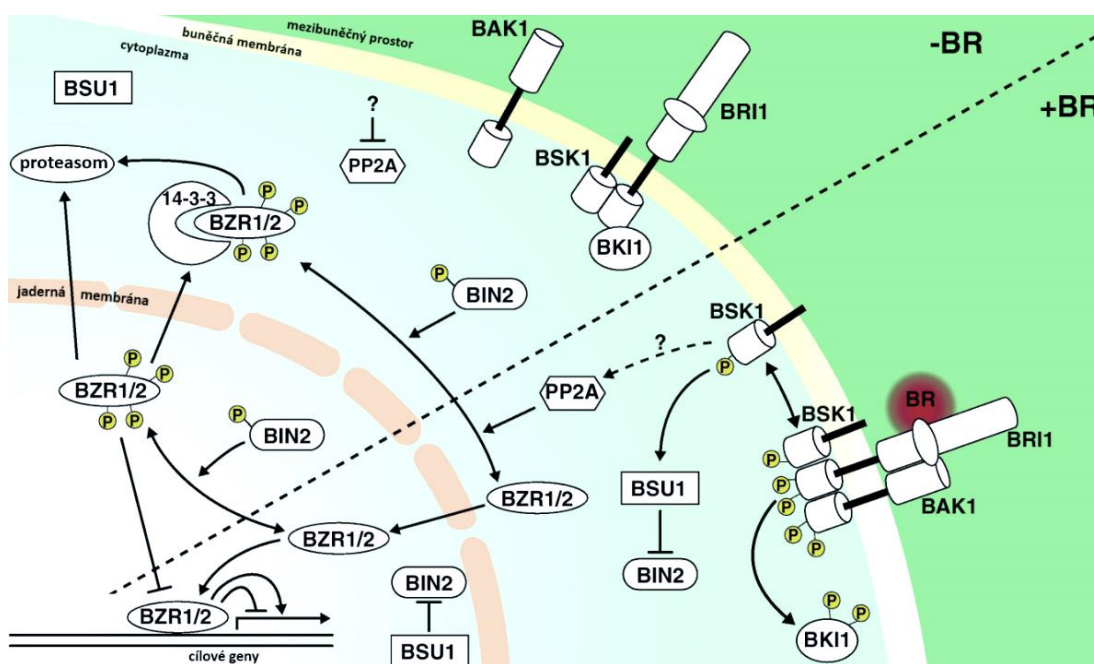


Obr. 3: Schéma biosyntézy BRs z primárního prekursoru campesterolu až po syntézu brassinolidu (BL) třemi hlavními biosyntetickými drahami; vlevo – časná C22 oxidace (žlutě vyznačená) začínající přeměnou campesterolu a jež je nezávislá na campestanolu, a vpravo – z campestanolu vycházející cesta časné C6 oxidace (zeleně vyznačená) a pozdní C6 oxidace (fialově vyznačená), jejichž cesty se pojí tvorbou castasteronu (CS). Každá šipka značí jednu enzymatickou přeměnu, pouze v případě přerušované šipky se jedná o více než jednu (převzato a upraveno z Chung & Choe, 2013).

### 2.1.3 Signální dráha BRs

V počátcích výzkumu BRs byla podstata jejich fyziologického účinku neznámá a teprve studium genů regulovaných BRs napomohlo porozumění samotnému mechanismu jejich působení (Clousse & Sasse, 1998). Dnes je jejich signální dráha jednou z nejstudovanějších v rostlinách.

Molekuly BRs jsou buňkami rozpoznávány pomocí integrálního membránového receptoru kinasy brassinosteroid insensitive 1 (BRI1), jejíž gen kóduje serin karboxypeptidasu. Jedná se o úsek plasmatické membrány bohaté na leucin (LRR, leucin-rich repeat) (Li *et al.*, 2001). Po spojení BRs s receptorem se aktivuje receptor i koreceptor – BRI1-associated receptor kinase 1 (BAK1) – a je fosforylován inhibitor BRI1 kinasy (BKI1), který disociuje (odpojí se od plasmatické membrány) a pojí se s proteiny, které interagují s transkripčními faktory. Tím se uvolní místo pro vazbu BAK1 na BRI1 za vzniku heterodimeru, čímž je aktivována signální dráha (Li *et al.*, 2002; Wang & Chory, 2006).



Obr. 4: Signální dráha BRs – v horní části: stav v nepřítomnosti BRs; v dolní části: aktivovaná signální dráha za přítomnosti BRs (převzato a upraveno z Gudesblat & Russinova, 2011)

Po aktivaci membránového receptoru je aktivována fosfatasa BRI1 supresor 1 (BSU1), která defosforyluje a inaktivuje glycogen synthase kinasu 3 (GSK-3 neboli BIN2), která je negativním regulátorem signální dráhy BRs (Kim *et al.*, 2009). Kinasa

BIN2 fosforyluje a způsobuje degradaci transkripčních faktorů – brassinazol resistant 1 (BZR1) a BRI1-EMS supresor 1 (BES1 neboli BZR2) (Wang *et al.*, 2002; Gampala *et al.*, 2007) – které jsou v případě inaktivovaného BIN2 defosforylovány (Tang *et al.*, 2011). Defosforylované aktivní transkripční faktory BES1 a BZR1 se hromadí v jádře, kde regulují geny zodpovědné za BRs odpověď (Yin *et al.*, 2002; viz Obr. 4).

#### 2.1.4 Funkce BRs v rostlinách a jejich účinky

Už před objevem samotných BRs se vědělo o tom, že extrakt z pylu *Brassica napus L.* aplikovaný na mladé semenáčky dokáže urychlit jejich růst. Příčina nebyla jasně známá, ale předpokládalo se, že pylová zrna této rostliny obsahují neznámé látky, pojmenované brassiny, které tuto aktivitu způsobují (Mitchell *et al.*, 1970). Po tom, co se podařilo některé BRs izolovat a identifikovat, se začaly studovat jejich funkce v rostlině. Většina těchto funkcí byla pozorována na BR-deficientních mutantech a mutantech se sníženou senzitivitou k BRs, které vykazovaly malý vzrůst, krátké řapíky, zpožděné kvetení, oddálenou senescenci a sníženou fertilitu. Tento objev ukázal, že BRs mají esenciální funkci pro normální vývoj a růst rostliny (Clouse, 2011).

Svou aktivitou ovlivňují řadu růstových a vývojových procesů. Jejich hlavní funkcí je elongace buněk a jejich proliferace, diferenciaci buněk vodivých pletiv, pomáhají udržovat fertilitu, ovlivňují vývoj reprodukčních orgánů, načasování senescence, fotomorfogenezi a vývoj listů. Stejně jako živočišné steroidní hormony regulují funkci stovek genů a ovlivňují tak mnoho metabolických drah (Bajguz, 2011).

BRs účinkují ve velmi nízkých koncentracích a jejich exogenní aplikace v mikromolárních až nanomolárních koncentracích způsobuje u rostlin celé spektrum změn, např. elongaci stonku, inhibici růstu kořene, stimuluje buněčné dělení a zvyšuje rezistenci rostliny vůči biotickému i abiotickému stresu (Wachsman *et al.*, 2004). Někdy je ale účinek závislý na koncentraci aplikovaných BRs. Rozdílný účinek je pozorován u kořenového růstu, jenž je stimulován při nízkých koncentracích a inhibován při vysokých koncentracích exogenně aplikovaných BRs (Müssig *et al.*, 2003). Pro normální růst kořenů jsou BRs esenciální, jelikož jejich fyziologická hladina je důležitá pro dostatečné dělení meristemických buněk v kořeni (Lv *et al.*, 2018) a spolu s auxiny pozitivně ovlivňuje laterální kořenový růst (Bao *et al.*, 2004).



#### 2.1.4.1 Vliv na expanzi a diferenciaci buněk

Stimulací elongace buněk BRs podporují dlouhivý růst rostlinného těla. Tento efekt je výrazněji pozorován u mladých vegetativních tkání a klíčících rostlin, které jsou k účinku BRs více citlivé. Elongace buněk je způsobena aktivací genů kódujících enzymy zajišťující morfogenezi buněčné stěny buněk. Jedním z těchto genů v *Arabidopsis thaliana* je gen TCH4 (Touch 4), který kóduje hydrolasu xyloglukanendotransglukosylasu, jenž štěpí molekuly xyloglukanu v buněčné stěně. To stěnu rozvolňuje a umožňuje její přestavbu a roztažení (Campbell & Braam, 1999; Yang et al., 2011). Oproti auxinům, které vykazují v této funkci synergii s BRs, jejich účinek nastává později, jelikož indukují daný gen s větším zpožděním. Na druhou stranu jejich účinek přetrvává až o několik hodin déle (Clouse & Sasse, 1998).

BRs stimulují dlouhivý růst prýtu rostliny, ale i kořene. Je zjištěno, že zatímco prodlužování kořene nízkými koncentracemi BRs je způsobeno expanzí buněk, růst listů je důsledkem stimulace proliferační aktivity buněk a následného růstu už diferencovaných buněk (Nakaya et al., 2002; Zhiponova et al., 2013). Např. expresí BRI1 receptorů nízkými koncentracemi BRs je stimulována jednosměrná elongace vláskových buněk (Singh & Savaldi-Goldstein, 2015). Ovlivňování proliferace buněk v apikálním vrcholu je zprostředkováno působením BRs na cup-shaped cotyledon (CUC) geny. Nízké hladiny BRs jsou v buňkách tvořících hranice orgánů, které se jen minimálně dělí, a naopak jejich akumulace stimuluje buněčnou proliferaci. Aktivní transkripční faktory BES1 a BZR1 v takovém případě potlačují geny CUC, jejichž úkolem je zpomalení proliferace a přeměna meristematičtých buněk na primordiální (Gendron et al., 2012; Singh & Savaldi-Goldstein, 2015).

Buňky BR-deficientních mutantů se zkrácenými listy vykazují prodlouženou mitotickou fází a oddálení diferenciaci, tudíž lze předpokládat, že účinek BRs je důležitý pro správnou funkci mitosy a načasování diferenciaci v listech (Zhiponova et al., 2012). Navýšením jejich signalizace v kořeni lze vyvolat buněčné dělení v quiescentním centru a jejich vliv na progresi buněčného cyklu jim umožňuje pozitivně regulovat velikost meristému v kořeni (González-García et al., 2011). Též se významně podílí na diferenciaci buněk xylemu. Stimulují tvorbu jejich buněčné stěny a buněčnou smrt v poslední fázi diferenciaci (Yamamoto et al., 1997).

#### 2.1.4.2 Vliv na reprodukční orgány

Významná je funkce BRs pro vývoj pylových zrn a tyčinek, ale ovlivňují i růst pylové láčky. Při deficienci BRs rostliny kvůli nedostatku pylu vykazují sterilitu (Ye *et al.*, 2010; Vogler *et al.*, 2014). Ovlivňují množství produkovaných semen, čímž se též podílí na fertilitě rostliny (Huang *et al.*, 2013). Jejich vliv byl prokázán i u větvení a tvorby květu (Müssig, 2005) a jejich vysoká koncentrace v semenech stimuluje klíčení (Steber & McCourt, 2001). Vedle toho byl též zaznamenán vliv na dormanci semen, u které pravděpodobně regulují její trvání. Při studiu overexprese genu účastníčího se signální dráhy BRs totiž došlo k redukci a zkrácení doby dormance (Li *et al.*, 2007).

#### 2.1.4.3 Vliv na fotomorfogenezi

Výzkum ukázal, že BRs hrají určitou roli ve světle ovlivňovaných procesech. Gen BAS1, který je v *Arabidopsis* důležitý pro tvorbu odpovědi na světlo, též ovlivňuje hladiny aktivních BRs (Neff *et al.*, 1999). BRs jsou zodpovědné za odpověď rostliny na úbytek modrého a dalece červeného světla (*far-red light*), tedy za reakci listu na stín (Kozuka *et al.*, 2010). Při studiu genů účastnících se BRs biosyntézy bylo zjištěno, že jejich aktivita je působením světelných paprsků tlumena (Ma *et al.*, 2001). Potlačení jejich aktivity je způsobeno kromě paprsků viditelného spektra také UV-B zářením, a to přímou interakcí fotoreceptoru UV-B záření s BES1 (Liang *et al.*, 2018). BES1 ve tmě potlačuje expresi transkripčních faktorů účastnících se biogeneze chloroplastu, tudíž se účastní na negativní regulaci fotosyntézy (Yu *et al.*, 2010).

Důležitou úlohu hrají, jak se zdá, při etiolovaném růstu a fotomorfogenezi. Bylo zjištěno, že pokud rostlina dostane stimul dalece červeným světlem, dochází k akumulaci hydrolasy cytochrom P450 72B1 (CYP72B1), která inaktivuje BRs a pomůže rostlině přejít na fotomorfogenezi (Turk *et al.*, 2003). Předpokládá se totiž, že u rostlin rostoucích za tmy BRs udržují skotomorfogenezi a zabraňují aktivaci genů stimulujících fotomorfogenezi a de-etiolaci, dokud je rostlina stále ve tmě (Szekeres *et al.*, 1996). Nasvědčuje tomu fakt, že rostlinné mutanty s narušenou biosyntézou BRs a rostliny po aplikaci inhibitoru BRs biosyntézy brassinazolu vykazují de-etiolovaný nebo alespoň částečně de-etiolovaný fenotyp (Symons & Reid, 2003b).

Proti tomu stojí molekulárním měřením podložené poznatky, které nasvědčují tomu, že BRs nejsou regulátory de-etiolace. Např. u rostlin hrachu v BR-deficientních mutantech nedochází k expresi genů účastnících se světelné odpovědi ani k de-etiolaci

rostlin ve tmě. Nedochází ani ke snížení endogenních hladin BRs při přechodu ze tmy na světlo, jak bylo předpokládáno, ale hladiny jsou naopak zvýšeny v rostlinách rostoucích na světle. Jde o přímý důkaz toho, že BRs neregulují de-etiolaci rostlin hrachu snížením svých endogenních hladin a že světlo nevede k inaktivaci BRs a potlačení jejich biosyntézy v tomto druhu (Symons *et al.*, 2002). Podobné výsledky byly získány i v experimentech s rýží a *Arabidopsis* (Tamaki *et al.*, 2002; Shimada *et al.*, 2001).

#### 2.1.4.4 Odpověď na stresové faktory

Fytohormony se velmi významně účastní odpovědi na stresové faktory a u BRs je známo, že dokáží zvýšit rezistenci rostliny při růstu v nepříznivých podmínkách. Pomáhají rostlinám bránit se před poškozením způsobeným vysokými nebo nízkými teplotami, suchem, zvýšenou salinitou, ale přispívají i v obraně vůči hmyzu (Bajguz & Hayat, 2009).

Jsou schopny redukovat vliv vysokých a nízkých teplot na rostliny a zvýšit tak jejich toleranci k teplotním výkyvům. Bylo zjištěno, že stimulují tvorbu heat-shock proteinů, které jsou součástí opravných mechanismů, čímž chrání rostlinu před poškozením při teplotním šoku (Wilén *et al.*, 1995; Dhaubhadel *et al.*, 1999). V nepřízni sucha a nízkých teplot ošetření semen BRs navyšuje jejich toleranci a v prostředí se zvýšenou salinitou jim pomáhá překonat stresem vyvolanou inhibici a stimuluje klíčení (Kagale *et al.*, 2007).

Bylo zjištěno, že v případě abiotického stresu BRs pozitivně stimulují stabilitu DELLA proteinů, které se stresem akumulují a vyvolávají produkci ROS-detoxifikačních enzymů, čímž zabraňují nárůstu hladiny ROS molekul (Achari *et al.*, 2008; De Vleeschauwer *et al.*, 2012). Ve stresových podmínkách, při kterých dochází k poškození buněk kořene, BRs stimulují proliferaci quiescentních buněk v kořenové špičce, čímž je obnoven meristéum kořene (Vilarrasa-Blasi *et al.*, 2014). Ovlivněním peroxidase dráhy BRs inhibují syntézu superoxidových aniontů a zabraňují jejich hromadění, které může negativně působit na růst kořene (Lv *et al.*, 2018), a dokáží též rostliny chránit před poškozením způsobeným těžkými kovy tím, že zabraňují vstřebávání a akumulaci toxických kovů v buňkách (Bajguz, 2000; Sharma & Bhardwaj, 2007). Pomocí inhibice průtoku  $K^+$  iontů protonovými pumpami do protoplastů svěřacích buněk BRs inhibují otevírání průduchů a stimulují jejich zavírání, což rostlině může zabránit nadměrným ztrátám vody v suchém období (Haubrick *et al.*, 2006).

### 2.1.5 Cross-talk BRs s ostatními fytohormony

Většina procesů v rostlině je velmi komplexně regulována a bývá výsledkem interakce mnoha různých fytohormonů. Cíle jejich působení se mnohdy překrývají a ve více případech se prolínají i jejich samotné signální dráhy, kde se mohou nepřímo, ale i přímo ovlivňovat (Müssig 2005). Je tedy zřejmé, že aplikací jednoho z fytohormonů lze ovlivnit i dráhy ostatních. Pro tuto práci je důležitá informace, že exogenní aplikace BRs v rostlinách ovlivňuje hladiny ostatních fytohormonů (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2013). Jejich signální molekuly tak činí nejčastěji na úrovni transkripce (Gudesblat & Russinova, 2011).

Je známo, že pro správnou stimulaci genů regulujících růst hypokotylu je důležitá rovnováha přirozených koncentrací BRs a ethylenu v rostlině (Chen *et al.*, 2013). Aplikace exogenních BRs stimuluje v buňkách stonku biosyntézu ethylenu, který inhibuje elongační funkci BRs (Arteca, 1995). Při aplikaci BRs v kombinaci s kyselinou indol-3-octovou (IAA) na květenství *Arabidopsis thaliana* bylo zaznamenáno výrazné navýšení auxiny stimulované biosyntézy ethylenu. Ukázala se tím synergie účinků BRs a auxinů na produkci ethylenu (Arteca & Arteca, 2008). Exogenně aplikované BRs mají na kořen různé účinky v závislosti na aplikované koncentraci, jelikož nízké koncentrace silně redukuje biosyntézu ethylenu a vysoké koncentrace ji naopak navyšují. Transkripční faktory BES1 a BZR1 dokáží přímo interagovat se syntasou 1-aminyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACS), účastníci se biosyntézy ethylenu, a inhibovat její aktivitu. Navýšení biosyntézy ethylenu v kořeni je naopak způsobeno stabilizováním ACS a zvýšením její aktivity. Mutant s narušenou biosyntézou BRs vykazuje v kořeni zvýšenou biosyntézu ethylenu, jeho hromadění v buňkách a tím způsobený zkrácený kořenový růst. (Lv *et al.*, 2018).

Stejný projev lze pozorovat i u rostlin rostoucích za tmy. Exogenně aplikované BRs ve velké koncentraci inhibují dlouhivý růst u etiolovaných rostlin. Je to způsobeno tím, že jejich působením se aktivuje signální dráha vedoucí k produkci ethylenu (Arteca, 1995), který potlačuje růst a u etiolovaných rostlin způsobuje zakrslý, ztloustlý a zkroucený epikotyl. U etiolovaných rostlin tak BRs nepřímo vyvolávají tzv. trojí odezvu, což je odpověď etiolovaných rostlin na nadměrnou produkci ethylenu (Guzmán & Ecker, 1990).

Gravitropický růst u kořene je stimulován ethylenem, a naopak potlačován BRs. K tomu dochází díky působení těchto molekul na geny signální dráhy auxinu (*Vandenbussche et al., 2013*). BRs dokáží geny biosyntézy auxinů a geny zajišťující jejich eflux přímo aktivovat, čímž pravděpodobně dochází k aktivaci buněčného cyklu (*Hacham et al., 2012*). Interakcí BRs se signální dráhou auxinu je, jak už bylo výše zmíněno, stimulován laterální růst kořene (*Bao et al., 2004*). A přestože na vývoji nadzemní části rostliny uplatňují synergický účinek, na kontrole genové exprese, elongace a údržbě kmenových buněk v kořenové špičce BRs pracují s auxiny jako antagonisté. Pro optimální růst kořene je tedy potřeba vyvážených koncentrací obou hormonů (*Chaiwanon & Wang, 2015*).

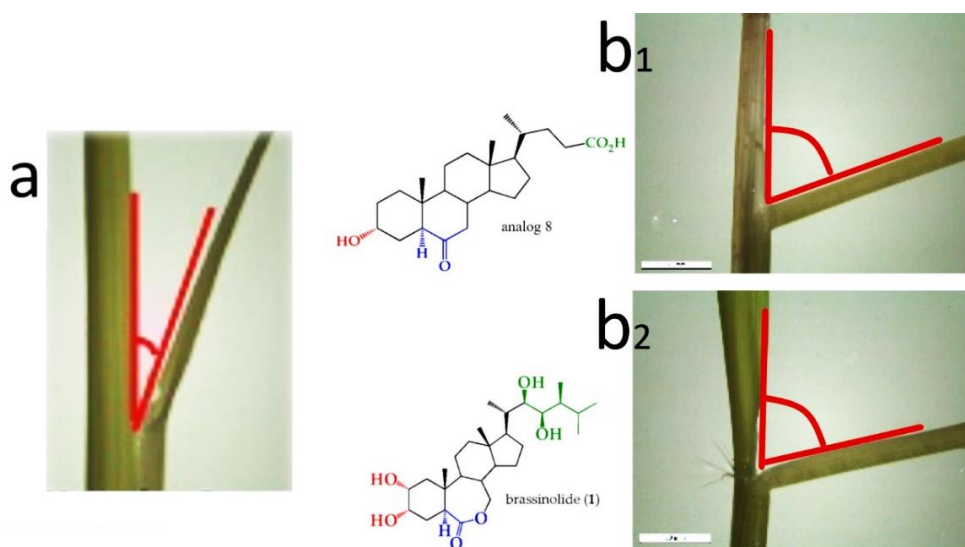
Krátce po vyklíčení se BRs synergicky podílí s gibberelliny (GAs) na růstu hypokotylu (*Stewart Lilley et al., 2013*). V pozdějším vývoji mají BRs aditivní účinek s GAs na stimulaci růstu stonku, a to díky schopnosti BRs regulovat jejich biosyntézu (*Unterholzner et al., 2015*). Bylo zjištěno, že GAs ke své správné funkci potřebují BRs, jelikož podporují expresi genů zodpovědných za GAs odpověď. Transkripční faktor BES1 se ve své defosforylované formě dokáže navázat na jejich geny a zvýšit tak produkci GAs. Vysoká koncentrace GAs indukuje degradaci DELLA proteinů, čímž se aktivuje transkripční faktor BZR1, jehož aktivita byla DELLA proteiny potlačována. To má za následek pozitivní účinek na růst a vývoj rostliny (*Li et al., 2012; Unterholzner et al., 2015*).

Exogenní aplikace BRs na plody rajčete dokáže stimulovat produkci ethylenu a urychlit tím jejich dozrávání (*Zhu et al., 2015*). Cross-talk BRs s GAs a kyselinou salicylovou (SA) napomáhá rostlinám zvýšit rezistenci vůči biotickým stresům (*De Vleeschauwer et al., 2012*). Ke zvýšení tolerance vůči teplotnímu stresu a zvýšenému zasolení využívají protein regulující geny účastníci se SA odpovědi. Naopak kyselina abscisová je pro BRs antagonistou a dokáže inhibovat BRs vyvolanou odpověď na stres (*Divi et al., 2010*). Inhibice probíhá i v opačném směru, jelikož samotný BZR1 se dovede navázat na gen pro transkripční faktor ABI5 (ABA-Insensitive 5) a tím potlačit jeho expresi (*Yang et al., 2016*).

## 2.2 BIOTESTY VYUŽÍVANÉ PŘI STUDIU BRs

Biotesty slouží ke studiu aktivity různých bioaktivních látek testováním jejich vlivu na růst a vývoj organismu. Jde o významnou experimentální metodu velmi často využívanou v rostlinné fyziologii. Existuje řada optimalizovaných biotestů využívaných pro studium vlivu fytohormonů na rostliny a spousta z nich se díky jejich vysoké citlivosti využívá i pro studium BRs.

Díky citlivosti buněk nodů rýže na změny v hladinách fytohormonů se využívá rýžový ohybový biotest (rice lamina inclination assay). Tento test byl původně popsán při studiu aktivity auxinů, ale dnes se jej využívá i při testování BRs, jelikož též ovlivňují úhel, pod kterým listy rýže rostou (Wada *et al.* 1984). BRs jsou schopny stimulovat elongaci adaxiálních sklerenchymatických buněk v oblasti nodů, čímž zapříčiňují vyšší ohyb listů (viz Obr. 5). Expanze těchto buněk je způsobena zvýšením vodního potenciálu a přísunem protonů do buněk, vyvolaným účinkem aplikovaných BRs (Cao & Chen, 1995). V experimentu se syntetickými analogy BRs bylo stanoveno, že velikost úhlu je závislá na struktuře použité látky, ale i na její koncentraci. Úhel, pod kterým sledovaný list roste, se s rostoucí koncentrací BRs zvyšuje (Duran *et al.*, 2017). Při aplikaci BRs spolu s IAA byla minimální detekovatelná koncentrace BRs snížena na  $1 \cdot 10^{-5}$  ppm na Petriho miskou, a to díky synergickému efektu auxinů a BRs (Han *et al.*, 1997).



Obr. 5: Výsledek rýžového ohybového biotestu na druhém nodu ukazující efekt aplikovaných BRs na semenáčky rýže (*Oryza sativa*) – a) úhel listku u negativní kontroly, b<sub>1</sub>) úhel zvětšený po aplikaci bioaktivního BRs analogu 8 v koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  M a b<sub>2</sub>) po aplikaci brassinolidu (BL) v koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  M – se zobrazením struktury testovaných látek (převzato a upraveno z Duran *et al.*, 2017)

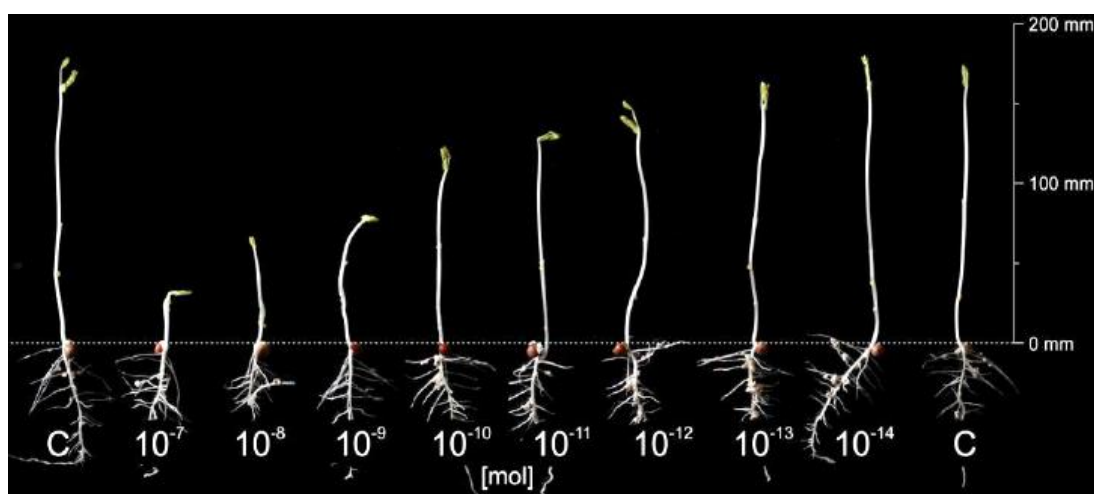
Velice známý je biotest na druhém internodu fazole (bean second internode method). V něm se měří elongace druhého internodu stonku fazole po aplikaci vzorku fytohormonu rovnoměrně rozptýleného v 250  $\mu\text{g}$  lanolinu. Bioaktivní látka se nanáší, když je délka internodu 1 mm a po 4 dnech se porovná prodloužení internodu oproti kontrole (viz Obr. 6). Získané prodloužení je přímo úměrné aplikovanému množství bioaktivní látky. Tento biotest je vhodný pro měření takových látek, které mají vliv na buněčnou expanzi a elongaci (či stimulují buněčné dělení) a je dostatečně citlivý i pro BRs (Mitchell & Livingston, 1968).



Obr. 6: Porovnání délky druhého internodu mladých rostlin fazolí 4 dny po aplikaci fytohormonu; a) délka internodu kontrolní rostliny, b) délka internodu po aplikaci bioaktivní látky (převzato a upraveno z Mitchell & Livingston, 1968).

Biotest na etiolovaných rostlinách hrachu je často využívaný test pro objasnění vztahu aktivity a struktury molekuly. Je založen na schopnosti BRs inhibovat růst etiolovaných rostlin hrachu v míře závislé na jejich koncentraci. Exogenně aplikované BRs jsou u rostlin schopny stimulovat syntézu ethylenu, která u etiolovaných rostlin vyvolává tzv. trojí odpověď, která zahrnuje inhibici dlouhivého růstu, zakřivený epikotyl a jeho laterální expanzi. V rámci této práce byl proveden devítidenní test inhibice etiolovaného růstu pelušky optimalizovaný v diplomové práci Kořínková, 2015. Během něj je aplikována testovaná látka (BRs, v našem případě 24-epiBL, rozpuštěný ve vhodné koncentraci v lanolinu) na obnažené místo etiolovaných rostlin hrachu setého (*Pisum arvense* L.), kde byl odříznut první obalový děložní lístek. Po 4 dnech od

aplikace lze pozorovat změnu fenotypu a vyhodnotit ji. Ovlivněné rostliny se díky zvýšené biosyntéze ethylenu liší od kontrolních rostlin svým fenotypem – neovlivněné rostliny oproti nim vykazují dlouhý rovný epikotyl na konci s apikálním vrcholem, který je typický pro etiolovaný růst (viz Obr. 7). Míra zkrácení je přímo úměrná vyprodukovanému ethylenu, a tím i aplikované koncentraci BRs. Jedná se o jeden z nejcitlivějších biotestů pro měření aktivity BRs, jelikož v něm lze dosáhnout odpovědi už při 100 fmol BRs (Kořínková, 2015; Jiroutová et al., 2019).



Obr. 7: Výsledek devítidenního testu inhibice etiolovaného růstu pelušek (*Pisum arvense* L.) po 4 dnech od aplikace 24-epiBL; na okrajích rostliny kontrolní (C) a mezi nimi rostliny, na které bylo aplikováno látkové množství  $10^{-7}$  až  $10^{-14}$  mol 24-epiBL (převzato a upraveno z Kořínková, 2015).

### 2.3 METODY IZOLACE A STANOVENÍ BRs

BRs jsou hydrofóbní nenabitě netěkavé látky, které se snadno rozpouští v nepolárních rozpouštědlech, jako např. methanol nebo acetonitril. V rostlinném materiálu se vyskytují v nanomolárních až pikomolárních koncentracích (Bajguz, 2011), tudíž je k jejich stanovení třeba využít velmi citlivých metod a pro samotnou analýzu je nutné je ze vzorku nejprve vyextrahovat.

Extrakce látek je většinou pouze neselektivního charakteru, a proto je zapotřebí vyextrahovaný vzorek přefiltrovat. U vzorků rostlinného materiálu je tento krok velmi



důležitý, jelikož dochází k výraznému matričnímu efektu. Kvůli němu dochází při analýze hmotnostní spektrometrií (MS) k vysokému šumu, který snižuje citlivost detekce. Efekt matrice lze vhodným přečištěním a úpravou vzorků před analýzou snížit.

Pro velmi citlivou analýzu bylo vyvinuto více metod úpravy vzorků využívajících extrakci na pevné fázi (SPE), extrakci kapalina-kapalina (LLE) či imunoafinitní chromatografii (IAC). Lze také pro izolaci BRs použít imunomagnetickou mikroextrakci, avšak kombinací SPE a IAC je dosaženo mnohem citlivější purifikace (*Želíková, 2018*). BRs a jejich endogenních hladiny je možné stanovit pouze velmi citlivými chemicko-fyzikálními metodami jako GC-MS, LC-MS nebo dalšími od nich odvozenými metodami. Pro analýzu BRs je současně nejvyužívanější a nejvhodnější metodou UHPLC-MS/MS neboli ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií, která umožňuje velmi účinnou separaci BRs a vykazuje vysokou selektivitu i senzitivitu, díky níž lze kvantifikovat i stopová množství (*Symons & Reid, 2008; Oklešťková et al., 2017*).

Jedna z metod využívá 2-bromopyridin-5-boritou kyselinu pro derivatizaci BRs a ke kvantifikaci kombinaci ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie, ionizace elektrosprejem a trojitého kvadrupólu (UHPLC-ESI-QqQ-MS). Došlo ke zkrácení doby přípravy vzorku a tím se analýza částečně zjednodušila (*Huo et al., 2012*). Také byla ustavena velmi citlivá a rychlá metoda využívající SPE s magnetickým sorbentem (MSPE) spojenou s in-situ derivatizací (ISD), ve které se molekuly BRs adsorbují na duté magnetické mezoporézní křemičité kuličky obalené vrstvou oxidu titaničitého a následně jsou derivatizovány 4-(N,N-dimethylamino)fenylboritou kyselinou. V takto předupravených vzorcích je možno pomocí MS detekovat endogenní hladiny BRs už ve 100 mg čerstvé hmoty (*Ding et al., 2014*).

V této práci byla provedena homogenizace, extrakce acetonitrilem, SPE, IAC a UHPLC-MS/MS. Homogenizací s pomocí kapalného dusíku byla rozrušena buněčná stěna rostlinných buněk a z buněčného obsahu byly poté vyextrahovány analyty rozpustné v acetonitrilu. Extrakt byl přečištěn pomocí SPE kolonek Discovery DPA-6S a následně byla provedena IAC pro izolaci a zakoncentrování analytu. Při IAC byl použit gelový sorbent obsahující monoklonální protilátky s výraznou specifitou a vysokou kapacitou pro zachycení metabolitů BRs. V této práci použitý imunoafinitní gel byl pro získání co nejvyšší kapacity rozdělen do kolonek po 0,5 ml, obsahujících protilátky

v koncentraci 20 mg/ml gelu. Za správných podmínek lze s tímto imunoafinitním gelem dosáhnout až 85% návratnosti při eluci 100% methanolem.

Při UHPLC-MS/MS byla použita UHPLC chromatografická kolona s reverzní fází (Acquity CSH Phenyl-Hexyl, 2,1 mm x 50 mm, 1,7  $\mu$ m). Jako mobilní fáze byl zvolen acetonitril okyselený 10 mM kyselinou mravenčí pro snížení retence analytu. Byla provedena izokratická eluce, při níž nedochází ke změně vlastností mobilní fáze. Následná kvantifikace byla provedena kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Xevo TQ MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) s ionizací elektrosprejem a kolizní celou Scan Wave. Toto spojení zajišťuje velmi citlivou detekci separovaných analytů (Oklešťková *et al.*, 2017).

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 POMŮCKY A MATERIÁLY

##### 3.1.1 Pomůcky

Perlit, skleněná dóza, skleněný exsikátor s proděravělými porcelánovými patry, buničitá vata, špičky, fotografický tác, pinzeta, 2l plastová odměrka, 1l skleněná láhev s plastovým šroubovacím víkem, milimetrový papír, 50ml kónické zkumavky, 2ml mikrozukavky, skalpel, polystyrenová Dewarova nádoba, odměrný válec, odměrné baňky, třecí miska s tloučkem, kovová špachtle, termoska na kapalný dusík, automatické pipety se špičkami (Eppendorf), SPE kolonky (Discovery DPA-6S, 50 mg; Supelco, USA), skleněné zkumavky, ZrO<sub>2</sub> extrakční kuličky, tác, stojan na chromatografické kolonky, kolonky s imunoafinitním gelem (LRR, Oklešťková *et al.*, 2017), kádinky, vialky se šroubovacím víkem se septem, krabička na vialky, skleněné kónické mikroinserty se spodní pružinkou (0,1 ml; Supelco, USA)

##### 3.1.2 Biologický materiál

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

##### 3.1.3 Chemikálie

Hoaglandův živný roztok (KNO<sub>3</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

FeEDTA

Chlorid vápenatý

0,1M kyselina chlorovodíková, 0,1M hydroxid sodný (pro úpravu pH živného roztoku)

Lanolin

24-epibrassinolid (24-epiBL, Olchemim Olomouc)

Kapalný dusík

Směs deuterovaných standardů D<sub>3</sub>-BRs (Olchemim Olomouc)

Acetonitril

Methanol

PBS pufr (0,87 g NaCl, 7,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O na 1 l, pH 7,2)

Redestilovaná voda

Azid sodný

### 3.1.3.1 Příprava vzorků pro aplikaci v biotestu

Pro provádění biotest bylo připraveno osm vzorků o osmi různých koncentracích 24-epiBL rozpuštěného v lanolinu a jeden vzorek samotného lanolinu bez bioaktivní látky pro kontrolu.

24-epiBL byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l rozpouštědla, což byla směs isopropanolu a methylenchloridu v poměru 1:1 (v/v). Takto připravený roztok byl pro usnadnění aplikace převeden do lanolinu, kterým byly výsledné vzorky naředěny na koncentrace:  $2 \cdot 10^{-2}$  M,  $2 \cdot 10^{-3}$  M,  $2 \cdot 10^{-4}$  M,  $2 \cdot 10^{-5}$  M,  $2 \cdot 10^{-6}$  M,  $2 \cdot 10^{-7}$  M,  $2 \cdot 10^{-8}$  M a  $2 \cdot 10^{-9}$  M (Koščířková, 2015).

### 3.1.4 Přístrojová technika

Vzduchovací motorek (Maxima, Germany)

lampa se zeleným světlem

Kultivační fyto komora (Convion, Canada)

Magnetická míchačka (VELP, Itálie)

pH metr (Eutech Instruments, Nizozemsko)

termoblok na mikrozkuhavky (Grant, UK)

Analytické váhy (Kern, Germany)

Oscilační mlýn (RETSCH, Germany)

Ultrazvuk (Elma, Česká republika)

Rotátor (Stuart, UK)

Centrifuga (Trigon plus, Česká republika)

Vakuový manifold (Supelco, USA)

Třepačka (BIOSAN, GRANT Instruments, Velká Británie)

Vakuová odparka (CentriVap®, LABCONCO, USA)

Tandemový hmotnostní spektrometr (Xevo® TQ MS, Waters MS Technologies, Anglie)

Ultra-účinný kapalinový chromatograf (Acquity UPLC™, Waters, USA)

## 3.2 METODY PRÁCE

### 3.2.1 Příprava etiolovaných rostlin – Biotest

Byl proveden inhibiční biotest na etiolovaných rostlinách hrachu setého – pelušky (*Kořínková, 2015*). Celý biotest byl prováděn pouze za zeleného světla o nízké intenzitě, aby nebyl přerušen etiolovaný růst rostlin.

První den byla semena hrachu setého (*Pisum arvense L.*) vložena do skleněné dózy s vodou a za úplné tmy byla nechána 12-24 hodin bobtnat.

Druhý den byla tato semena připravena k vyklíčení. Do spodní části exsikátoru byla nalita destilovaná voda a na 2 porcelánová patra byla pokladena vrstva buničité vaty, která byla smočena destilovanou vodou a špičkou proděravěna dle děr v deskách patra. Vhodně vybraná nabobtnaná semena byla pokladena na díry pólem dolů. Do exsikátoru byl vložen vzduchovací aparát tak, aby byl ponořen, exsikátor byl uzavřen víkem. Exsikátor byl uložen na temné místo a semena byla v těchto podmínkách nechána klíčit po dobu dvou dnů.

Poté byla klíčící semena přesazena a byl připraven živný roztok pro správný růst klíčenců. Do 2 l odměrné nádoby byly přidány 2 ml roztoku FeEDTA, 6 ml roztoku chloridu vápenatého a 20 ml Hoaglandova živného roztoku a roztok byl doplněn destilovanou vodou do objemu 2 l. PH roztoku bylo upraveno na 5,8. Následně byl fotografický tác naplněn ze  $\frac{3}{4}$  perlitem, zalit připraveným živným roztokem a promíchán pinzetou, aby byl rovnoměrně namočený. Naklíčená semena byla opatrně pokladena do pinzetou utvořených jamek v perlitu kořínkem dolů. Takto byla vysazena s pravidelnými rozestupy v 10 řadách po 8. Tác byl přenesen do temné fotokomory, kde byly klíčky nechány 1 den růst.

Pátý den byla na rostliny aplikována testovaná látka. Pomocí skalpelu byl s velkou opatrností odříznut obalový děložní lístek každé naklíčené rostlinky tak, aby nebyl poškozen apikální meristém. Vzorky koncentrační řady 24-epiBL rozpuštěné v lanolinu a samotný lanolin byly nahřáty pro snadnější aplikaci. Na místo, ze kterého byl u rostlinek odstraněn lístek, bylo aplikováno 5  $\mu$ l testované látky o dané koncentraci (v každé řadě jedna koncentrace). Krajní řady sloužily jako kontroly – na rostliny bylo aplikováno pouze 5  $\mu$ l lanolinu. Naklíčené rostliny s aplikovanými bioaktivními látkami byly opět nechány růst v temné fotokomoře po dobu 4 dnů.

Devátý den byly rostliny opatrně vytaženy z perlitu a pomocí milimetrového papíru byly změřeny délky epikotylů. První čtyři pelušky z každé řady byly vloženy do popsaných falkon celé a další 4 rostlinky řady byly pomocí skalpelu rozděleny na epikotyly, kotyledony a kořenovou část a ty byly do popsaných falkon uloženy zvlášť (4 vzorky pro každou řadu). Falkony se vzorky a proděravělými víky byly okamžitě vloženy do kapalného dusíku a pro delší uchování nechány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2 Homogenizace rostlinného materiálu

Jednotlivé rostlinné vzorky byly v třecí misce zality kapalným dusíkem a pomocí tloučku rozdrčeny na prášek. Z každého vzorku byly následně vytvořeny tetraplikáty. Do čtyřech popsaných mikrozkušavek bylo naváženo přibližně 20 mg homogenizovaného materiálu a zbytek homogenizátu byl přesunut do páté uzavíratelné zkumavky. Všechny nově připravené vzorky byly okamžitě uloženy v kapalném dusíku a později skladovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Extrakce

Do mikrozkušavek s rostlinným materiálem bylo napipetováno 1,5 ml extrakčního činidla – 60% acetonitrilu – a bylo přidáno 3-5 extrakčních kuliček ( $\text{ZrO}_2$ , průměr 2,5 mm). Vzorky byly vloženy do extrakčního kulového mlýnku na  $2 \times 5$  minut při 27 Hz a poté byly nechány 3 minuty v ultrazvukové lázni. Nakonec byly vzorky vloženy do rotátoru (17 rpm), kde přes noc při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  probíhala extrakce.

### 3.2.4 SPE purifikace

Před SPE purifikací bylo třeba ze vzorků odstranit větší nečistoty a pevné zbytky. Vzorky z rotátoru byly proto centrifugovány 10 minut při 15000 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté byl z každé mikrozkušavky přepipetován supernatant do čisté zkumavky a k odebraným supernatantům bylo připipetováno 2,5  $\mu\text{l}$  (25 pmol) směsi deuterovaných standardů  $\text{D}_3$ -BRs.

Následně byl připraven vakuový manifold s kolonkami. Pro extrakci na pevné fázi byly použity kolonky Discovery DPA-6S (50 mg), které byly aktivovány napipetováním 1 ml 100% methanolu a ekvilibrovány 1 ml 60% acetonitrilem (extrakční činidlo). Po prokapání acetonitrilu byly pod kolonky vloženy čisté označené zkumavky a na kolonky byly jednotlivě nanесeny vzorky. Přečištěné vzorky byly vloženy do vakuové odparky a nechány odpařit do sucha. Vzorky byly před dalším použitím skladovány při -20 °C.

### 3.2.5 Imunoafinitní chromatografie

Kolonky s fritou a imunoafinitním gelem (*Oklešťková et al., 2017*) byly zregenerovány nanесením postupně 3 ml PBS pufru, 3 ml redestilované vody, 3 ml 70% acetonitrilu, opět 3 ml redestilované vody a 3 ml PBS pufru. Mezitím bylo k odpařeným vzorkům připipetováno 75 µl 100% methanolu a 925 µl PBS pufru a vzorky byly vloženy na 3 minuty do ultrazvukové lázně.

Po dokončení regenerace byl na kolonky nanесen vzorek, který byl zachycován do stejné zkumavky. Každý vzorek byl takto nanесen na kolonku v sedmi opakováních pro zvýšení výtěžnosti. Poté byly kolonky 3x promyty 3 ml redestilované vody a po úplném odkapání vody následovala eluce. Do kolonek byly napipetovány 3 ml elučního činidla – 100% methanolu – a analyt byl jímán do čistých zkumavek. Eluáty byly odpařeny do sucha na vakuové odparce. Odpařené vzorky byly skladovány při -20 °C.

Imunoafinitní kolonky byly po eluci promyty 3 ml redestilované vody a opět byla provedena jejich regenerace – do kolonek byly přidány 3 ml PBS pufru, 3 ml redestilované vody, 3 ml 70% acetonitrilu, 3 ml redestilované vody a nakonec 3 ml PBS pufru s rozpuštěným azidem sodným pro zabránění kontaminace při skladování. Kolonky byly uchovávány při 4° C.

### 3.2.6 Příprava vzorků na UHPLC-MS/MS analýzu

Vzorky byly rozpuštěny ve 40  $\mu$ l 100% methanolu a byly vloženy na 3 minuty do ultrazvukové lázně. Následně byly pečlivě promíchány pomocí vortexu a přepipetovány do 0,1ml skleněných insertů v popsaných vialkách. Ihned po napipetování byly vialky zavíčkované a před samotnou analýzou byly vzorky uchovány při -80 °C.

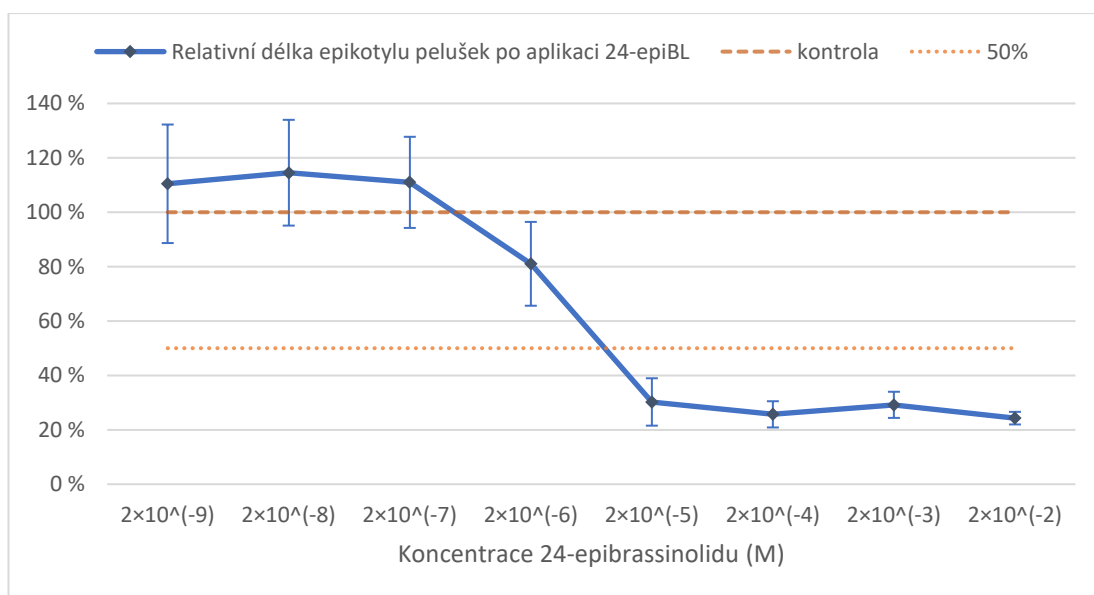
Vzorky byly analyzovány pomocí metody UHPLC-MS/MS popsané v publikaci Oklešťková et al., 2017. Výsledky získané analýzou byly zpracovány pomocí programů MassLynx<sup>TM</sup> a TargetLynx<sup>TM</sup>.



## 4 VÝSLEDKY

Po exogenní aplikaci testovaných koncentrací 24-epiBL došlo k různým změnám v růstu etiolovaných rostlin. Pozorovány byly změny růstu epikotylů pelušek ovlivněných testovanou látkou v rozmezí koncentrací od  $2 \cdot 10^{-9}$  do  $2 \cdot 10^{-2}$  M. Při aplikaci velmi nízkých koncentrací ( $2 \cdot 10^{-9}$  M,  $2 \cdot 10^{-8}$  M a  $2 \cdot 10^{-7}$  M) bylo pozorováno mírné prodloužení epikotylů oproti kontrole. Byly zde ale rovněž pozorovány větší odchylky v růstu. U vyšších koncentrací bylo zaznamenáno zkrácení průměrné délky epikotylů a po překročení koncentrace  $2 \cdot 10^{-6}$  M testovaná látka způsobila radikální zkrácení epikotylů etiolovaných rostlin. Epikotyly pelušek ovlivněných koncentracemi  $2 \cdot 10^{-5}$  až  $2 \cdot 10^{-2}$  M měly nejvíce inhibovaný růst a dosahovaly pouze 30 % délky kontrolních rostlin, byly oproti ostatním ztloustlé a měly zakřivenou apikální část. Tyto výsledky korelovaly s výsledky získanými při optimalizaci biotestu (Kořínková, 2015).

Od koncentrace  $2 \cdot 10^{-5}$  M už nebylo pozorováno žádné další radikální zkrácení. Délka epikotylů byla v řádcích s nejvyššími použitými koncentracemi testované látky přibližně stejná, tudíž se lze domnívat, že existuje maximální koncentrace dané testované látky, kterou rostlina dokáže přijmout a vyšší už ji neovlivní. Podle výsledků provedeného biotestu by tato koncentrace mohla ležet okolo hodnoty  $2 \cdot 10^{-5}$  M (viz Graf 1).



Graf 1: Relativní závislost délky epikotylu etiolovaných rostlin hrachu setého (*Pisum arvense* L.) na koncentraci exogenně aplikovaného 24-epiBL. (Průměr  $\pm$  SD; n = 8, počet rostlin v 1 koncentraci)

Testované rostliny byly dále využity pro UHPLC-MS/MS analýzu, aby mohla být dána do souvislosti korelace délky epikotylů s koncentrací endogenních hladin BRs v daných rostlinách.

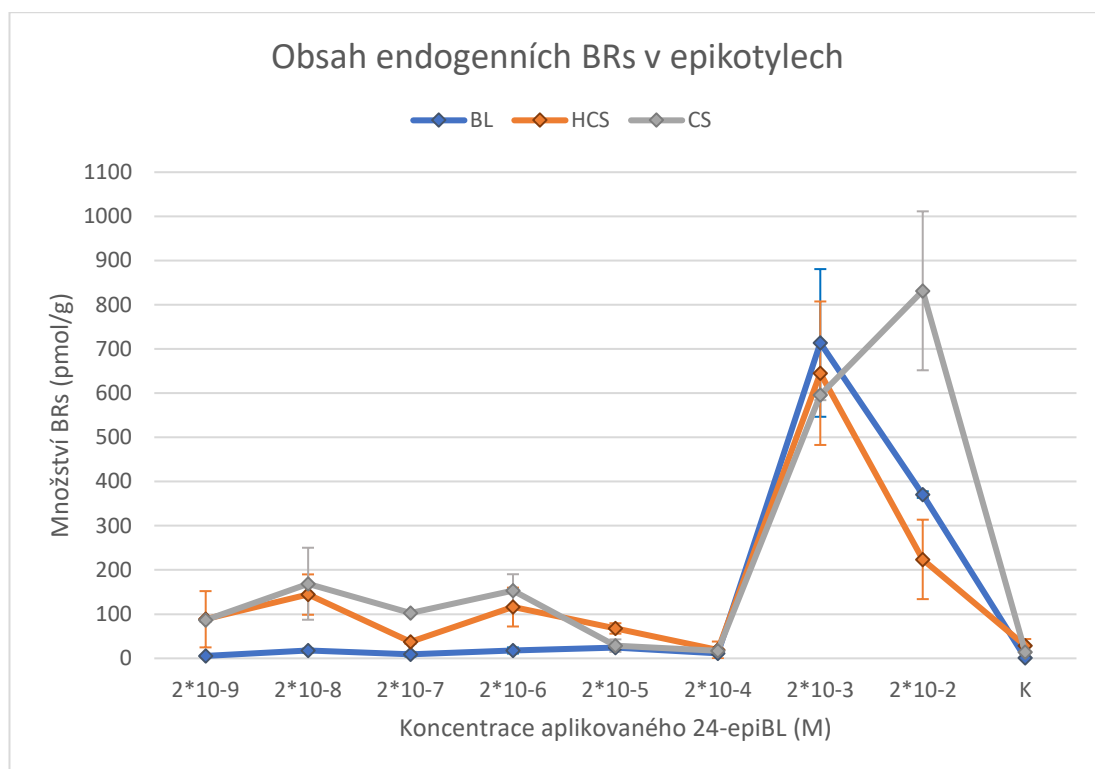
BRs byly vyextrahovány z rostlinného materiálu a následně byly vzorky přečištěny pomocí SPE a imunoafinitní chromatografie. Takto přečištěné vzorky byly zanalyzovány – pomocí UHPLC-MS/MS byla získána hmotnostní spektra, z kterých byly po zpracování v programech MassLynx™ a TargetLynx™ odečteny koncentrace endogenních BRs ve vzorcích. V etiolovaných rostlinách pelušky se podařilo kvantifikovat tyto endogenní BRs: brassinolid (BL), 28-homocasteron (HCS) a castasteron (CS). Vyhodnocením získaných dat byla stanovena jejich koncentrace v epikotylech, kořincích a kotyledonech rostlin ovlivněných aplikací 24-epiBL (viz Tab P1). Naměřené hodnoty 24-epiBL nebyly do vyhodnocení zařazeny, jelikož byl použit ke značení rostlin v biotestu a jeho koncentrace tudíž byly velmi vysoké.

Pro každou část rostliny byl pozorován stejný trend – u nižších aplikovaných koncentrací 24-epiBL ( $2 \cdot 10^{-9}$  až  $2 \cdot 10^{-4}$  M) naměřené koncentrace endogenních BRs oscilovaly na nízkých hodnotách a v některých případech se téměř rovnaly koncentracím kontrolního vzorku. U vzorků ovlivněných koncentrací  $2 \cdot 10^{-3}$  a  $2 \cdot 10^{-2}$  M byly téměř ve většině případů zjištěny násobně vyšší koncentrace.

V epikotylech pelušek ovlivněných  $2 \cdot 10^{-9}$  až  $2 \cdot 10^{-4}$  M 24-epiBL byly zjištěny nízké koncentrace všech tří BRs, které nepřesáhly 170 pmol/g. Množství BL se pohybovalo pouze od 5,67 do 24,6 pmol/g. Větší koncentrace byly zjištěny u HCS, kdy ve dvou případech (při koncentraci  $2 \cdot 10^{-8}$  a  $2 \cdot 10^{-6}$  M) hladiny dosáhly 144,3 a 116 pmol/g. Množství CS ve čtyřech nejnižších testovaných koncentracích kolísalo od 86,42 ke 168,81 pmol/g, a poté při ovlivnění  $2 \cdot 10^{-5}$  jeho koncentrace klesla na 28,79 pmol/g. Pelušky ovlivněné koncentrací  $2 \cdot 10^{-4}$  M 24-epiBL obsahovaly v epikotylech množství sledovaných látek pouze mírně se lišící od hodnot naměřených v kontrolních vzorcích – 10,95 pmol/g BL, 19,1 pmol/g HCS a 17,35 pmol/g CS oproti hodnotám 0,93 pmol/g, 28,77 pmol/g a 14,13 pmol/g ve vzorcích kontrol.

Při ovlivnění koncentrací  $2 \cdot 10^{-3}$  M byl u všech sledovaných látek sledován nárůst jejich endogenní koncentrace. Pro BL a HCS bylo při tomto ovlivnění naměřeno maximální množství ve vzorcích epikotylů (713,65 pmol/g BL a 645,19 pmol/g HCS), jelikož po ovlivnění o řád vyšší koncentrací 24-epiBL se jejich hodnoty opět snížily, a

to cca na polovinu naměřené maximální hodnoty. Koncentrace CS se ve vzorku epikotylů ovlivněných koncentrací  $2 \cdot 10^{-2}$  M ještě zvýšila, tudíž bylo nejvyšší množství CS (831,6 pmol/g) naměřeno v epikotylech ovlivněných nejvyšší testovanou koncentrací 24-epiBL (viz Graf 2).

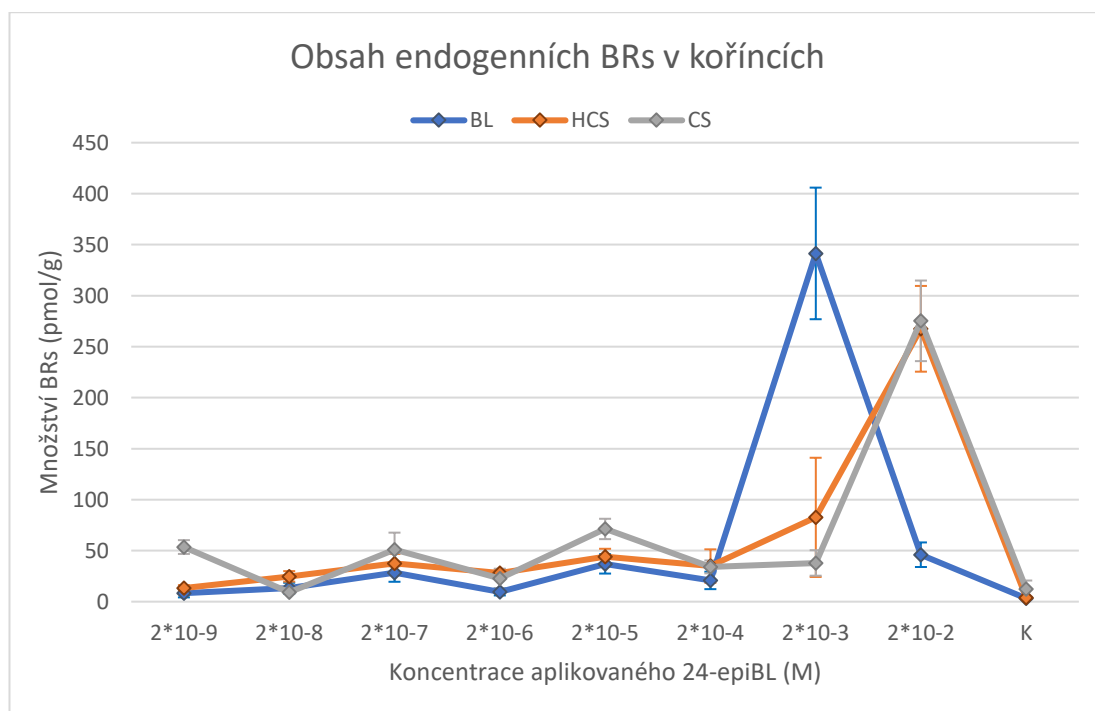


Graf 2: Koncentrace endogenních BRs – brassinolidu (BL), 28-homocastasteronu (HCS) a castasteronu (CS) – naměřené v epikotylech pelušek (*Pisum arvense* L.) ovlivněných koncentrační řadou 24-epiBL pomocí UHPLC-MS/MS analýzy. (Průměr  $\pm$  SD; n = 4, počet replikátů vzorků)

V kořincích pelušek ovlivněných  $2 \cdot 10^{-9}$  až  $2 \cdot 10^{-4}$  M 24-epiBL naměřené hladiny všech tří sledovaných látek kolísaly na nízkých hodnotách a v žádném vzorku nepřesáhly 72 pmol/g čerstvé hmoty. Ve vzorcích ovlivněných  $2 \cdot 10^{-3}$  M byla pozorována výrazně navýšená endogenní koncentrace u BL a mírně zvýšená hladina HCS. Při tomto ovlivnění bylo naměřeno nejvyšší množství BL ve vzorcích kořínků, 341,42 pmol/g. Koncentrace CS v kořincích nejevila změnu od hodnot naměřených při nižších koncentracích.

U HCS a CS byl vyzpozorován nárůst a změřena nejvyšší koncentrace až u rostlin ovlivněných nejvyšší testovanou koncentrací  $2 \cdot 10^{-2}$  M. Jejich hodnoty naměřené při

tomto ovlivnění dosáhly 267,52 pmol/g u HCS a 275,33 pmol/g u CS. Naopak množství BL změřené v kořincích ovlivněných nejvyšší testovanou koncentrací se oproti maximální hodnotě v kořincích výrazně snížilo, a to až na hodnotu 46,02 pmol/g (viz Graf 3).



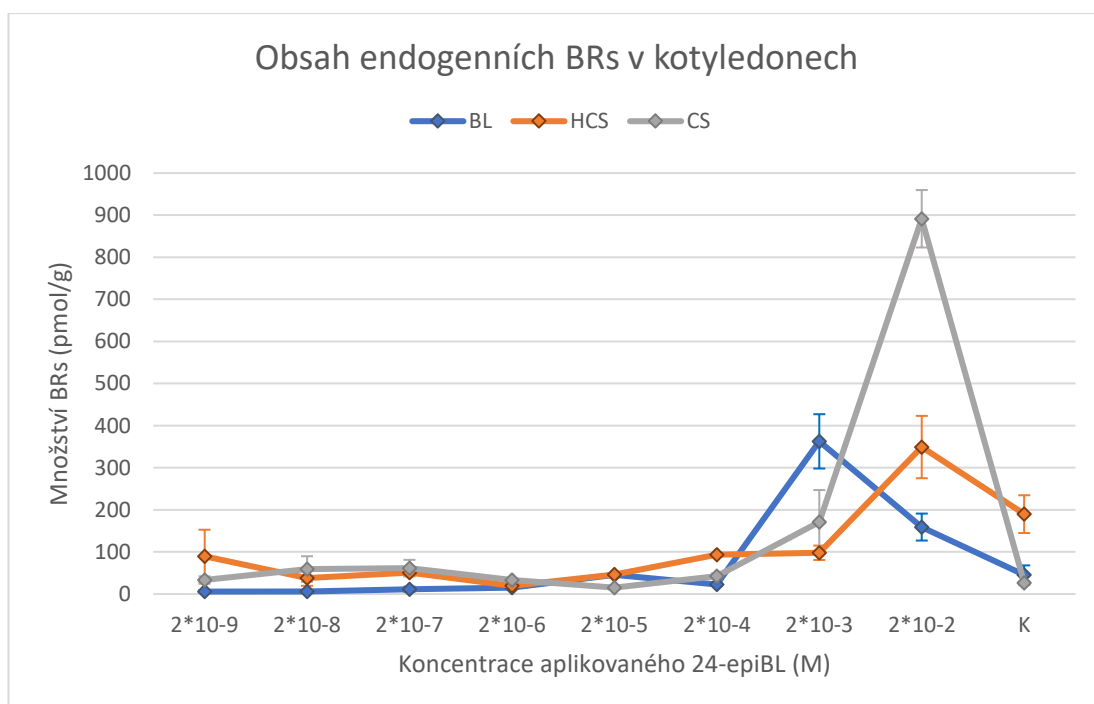
Graf 3: Koncentrace endogenních BRs – brassinolidu (BL), 28-homocastasteronu (HCS) a castasteronu (CS) – naměřené v kořincích pelušek (*Pisum arvense L.*) ovlivněných koncentrační řadou 24-epiBL pomocí UHPLC-MS/MS analýzy. (Průměr ± SD; n = 4, počet replikátů vzorků)

Ve vzorcích kotyledonů ovlivněných  $2 \cdot 10^{-9}$  až  $2 \cdot 10^{-4}$  M 24-epiBL byla pozorována podobná situace, jako u vzorků kořínků a epikotylů. Naměřené hladiny všech tří BRs se pohybovaly téměř rovnoměrně v hodnotách nepřesahujících 100 pmol/g. Menší změna byla zaznamenána na hladině  $2 \cdot 10^{-3}$  M – naměřená koncentrace BL v kotyledonech byla oproti ostatním vyšší a dosáhla 362,61 pmol/g. Také u CS bylo zaznamenáno mírné zvýšení koncentrace (z 42,54 na 171,07 pmol/g). Naměřené množství HCS bylo oproti o řád nižší hladině ovlivnění téměř beze změny.

Nejvyšší koncentrace HCS v kotyledonech byla zjištěna v peluškách ovlivněných nejvyšší testovanou koncentrací 24-epiBL, kdy bylo naměřeno 349,05 pmol/g HCS. Nejvýraznější pík patřil hormonu CS, jehož endogenní koncentrace se ve vzorcích kotyledonů pelušek ovlivněných nejvyšší koncentrací násobně zvýšila až na

891,42 pmol/g. Hladina BL byla při tomto ovlivnění nízká – oproti vzorkům ovlivněných o řád nižší koncentrací 24-epiBL množství BL kleslo na méně než polovinu.

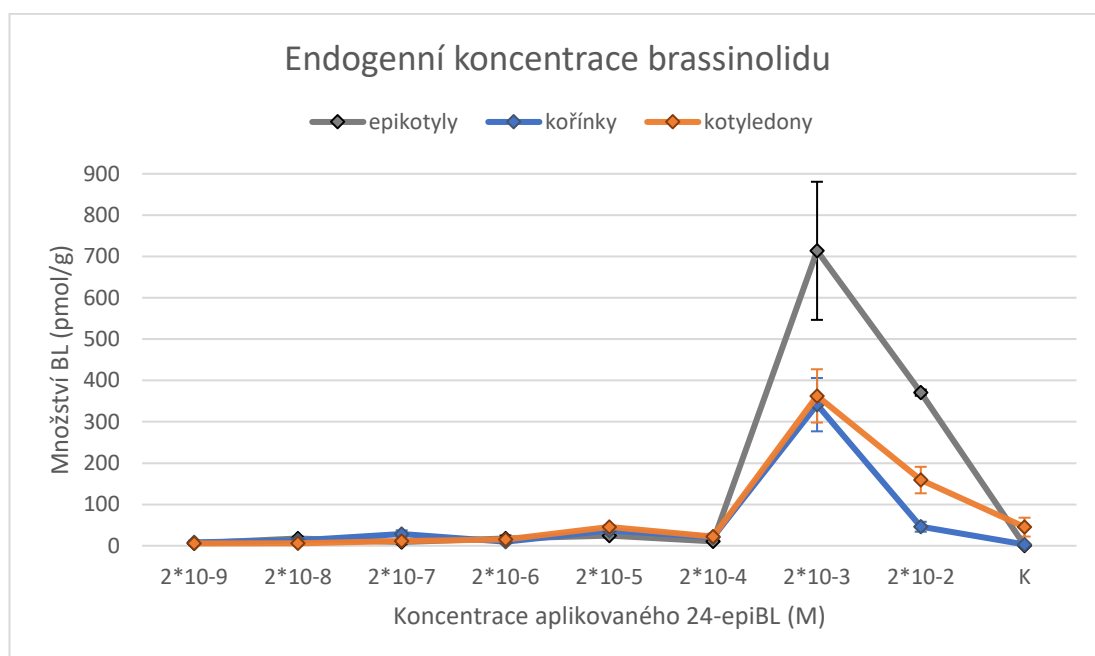
Kotyledony obsahovaly relativně vysoké koncentrace u vzorků kontrolních rostlin. Naměřených 45,14 pmol/g BL a 189,71 pmol/g HCS (viz Graf 4) několikanásobně převyšovalo koncentrace těchto látek stanovených v kontrolních vzorcích epikotylů a kořínků (viz Graf 2 a 3), což je pravděpodobně způsobeno faktem, že v semenech, reprodukčních orgánech a při klíčení se v rostlině obecně nachází větší množství BRs (Bajguz, 2011).



Graf 4: Koncentrace endogenních BRs – brassinolidu (BL), 28-homocastasteronu (HCS) a castasteronu (CS) – naměřené v kotyledonech pelušek (*Pisum arvense L.*) ovlivněných koncentrační řadou 24-epiBL pomocí UHPLC-MS/MS analýzy. (Průměr ± SD; n = 4, počet replikátů vzorků)

Kromě toho, že endogenní hladiny sledovaných BRs naměřené v tomto experimentu se odlišovaly mezi sebou, a v závislosti na tom, jakou koncentrací 24-epiBL byly rostlinné vzorky ovlivněny, též byly pozorovány rozdíly naměřených hodnot jednotlivých endogenních BRs ve vzorcích s epikotyly, kořínky a kotyledony. Rozdíly koncentrací sledovaných látek v odlišných rostlinných částech jsou zvýrazněny v následujících grafech (Graf 5, 6 a 7).

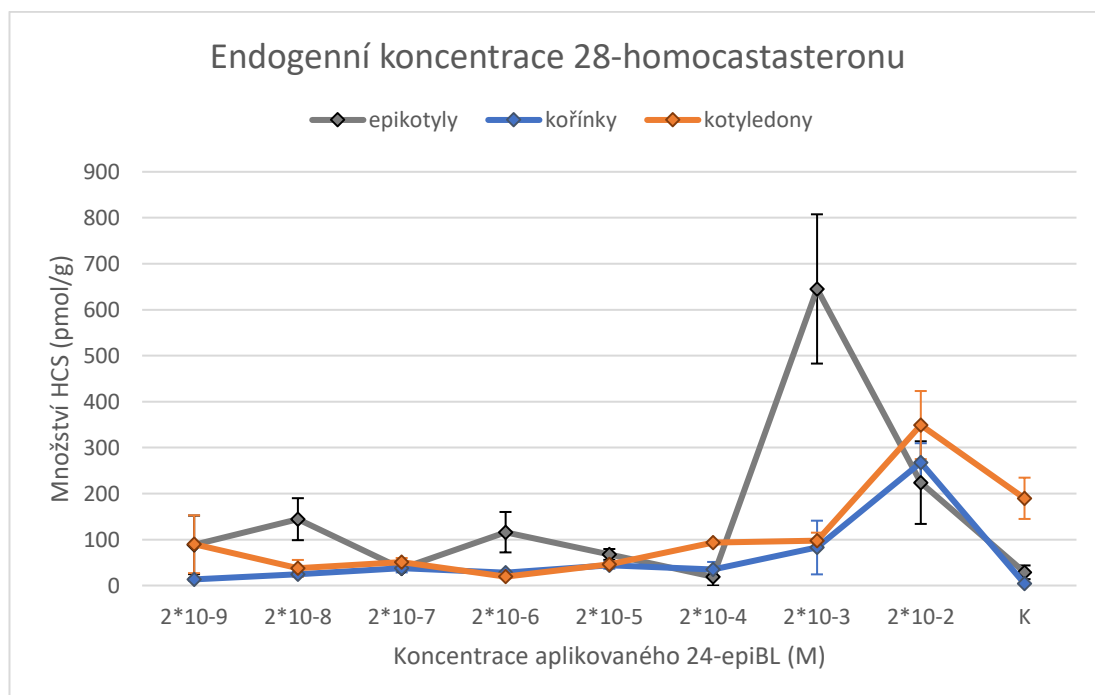
Hladiny BL ve vzorcích ovlivněných nízkými koncentracemi 24-epiBL ( $2 \cdot 10^{-9}$  až  $2 \cdot 10^{-4}$  M) byly ve všech částech nízké a v mnoha případech nepřevyšovaly hodnoty naměřené v kontrolních vzorcích. Maximální obsažené množství endogenního BL bylo vždy ve vzorcích ovlivněných koncentrací  $2 \cdot 10^{-3}$  M a nejvíce v epikotylech, kde byla v takto ovlivněných vzorcích naměřena koncentrace 713,65 pmol/g BL. Tato koncentrace byla až dvojnásobná oproti koncentracím stanovených v koříncích a kotyledonech (341,42 a 362,61 pmol/g). Při nejvyšší hladině ovlivnění měly získané hodnoty tendenci opět klesat – v epikotylech a kotyledonech byly hodnoty nižší cca o polovinu a v koříncích hodnota klesla až na hladinu srovnatelnou s koncentracemi naměřenými ve vzorcích ovlivněných nízkými koncentracemi 24-epiBL (viz Graf 5).



Graf 5: Endogenní koncentrace brassinolidu (BL) naměřené pomocí UHPLC-MS/MS analýzy ve vzorcích pelušek (*Pisum arvense* L.) v biotestu ovlivněných koncentrační řadou 24-epiBL a v kontrolních rostlinách (K) – v epikotylech (šedá), koříncích (modrá) a kotyledonech (oranžová). (Průměr  $\pm$  SD; n = 4, počet replikátů vzorků)

Hladiny endogenního HCS při ovlivnění nízkými koncentracemi 24-epiBL (od  $2 \cdot 10^{-9}$  do  $2 \cdot 10^{-4}$  M) kolísaly na nízkých hodnotách a nejvýše vystoupaly při koncentraci  $2 \cdot 10^{-8}$  M na 144,3 pmol/g v epikotylech. Při ovlivnění  $2 \cdot 10^{-4}$  M 24-epiBL naopak hladina v epikotylech klesla na 19,01 pmol/g a množství v kotyledonech mírně vzrostlo na 93,69 pmol/g.

Ve vzorcích ovlivněných vysokými koncentracemi 24-epiBL byl pozorován značný rozdíl mezi hodnotami naměřenými ve vzorcích epikotyly a hodnotami v ostatních částech rostlin. Nejvyšší naměřená koncentrace HCS, 645,19 pmol/g, byla stanovena v epikotylech ve vzorku ovlivněném  $2 \cdot 10^{-3}$  M 24-epiBL. Tato koncentrace byla výrazně vyšší než hodnoty naměřené v kořenech a kotyledonech, které nevykazovaly téměř žádné navýšení. Při ovlivnění nejvyšší koncentrací 24-epiBL bylo stanovené množství endogenních BRs ve všech rostlinných částech podobné, s tím rozdílem, že v epikotyly se jednalo o snížení maximální naměřené koncentrace BL cca na 1/3 (223,87 pmol/g) a ve vzorcích kotyledonů a kořínků bylo naopak naměřeno největší množství HCS z celé testované koncentrační řady (349,05 pmol/g v kotyledonech, 267,52 pmol/g v koříncích, viz Graf 6).



Graf 6: Endogenní koncentrace 28-homocastasteronu (HCS) naměřené pomocí UHPLC-MS/MS analýzy ve vzorcích pelušek (*Pisum arvense L.*) v biotestu ovlivněných koncentrační řadou 24-epiBL a v kontrolních rostlinách (K) – v epikotylech (šedá), koříncích (modrá) a kotyledonech (oranžová). (Průměr  $\pm$  SD; n = 4, počet replikátů vzorků)

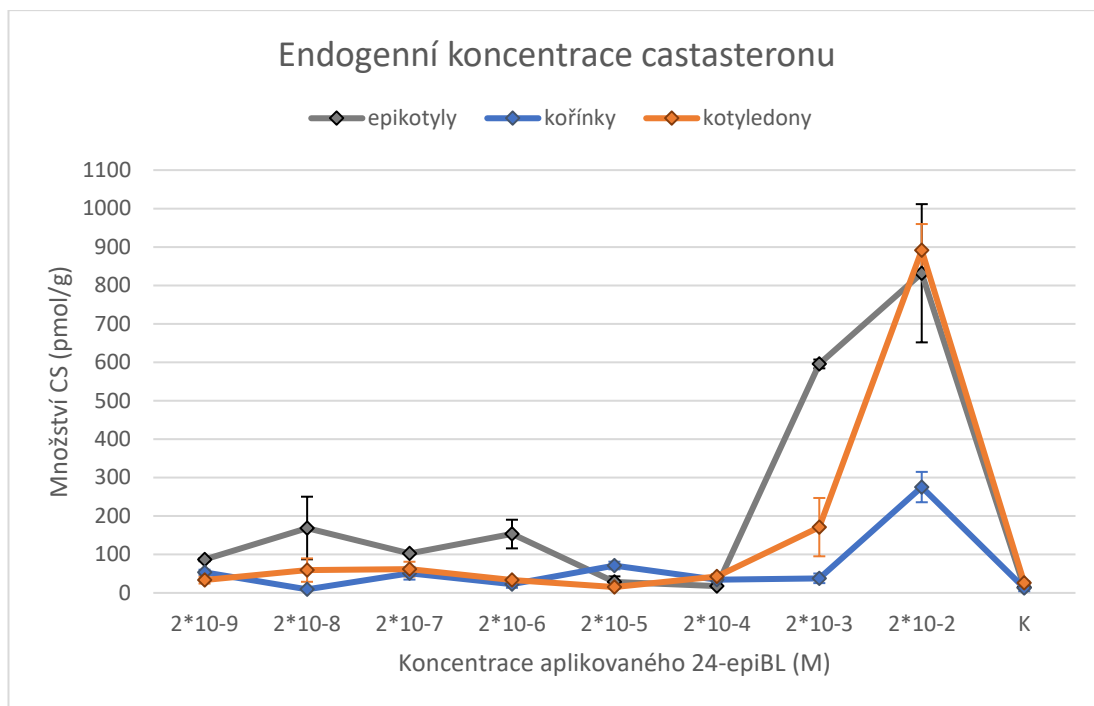
V kontrolním vzorku kotyledonu byla naměřena relativně vysoká koncentrace HCS (189,71 pmol/g), která převyšovala jeho koncentrace v kontrolních vzorcích epikotylů a kořínků (až několikanásobně) i koncentrace HCS naměřené u vzorků pelušek ovlivněných  $2 \cdot 10^{-9}$  až  $2 \cdot 10^{-4}$  M 24-epiBL (viz Graf 6).

Naměřené koncentrace endogenního CS vykazovaly ve vzorcích ovlivněných nízkými koncentracemi 24-epiBL (od  $2 \cdot 10^{-9}$  do  $2 \cdot 10^{-4}$  M) podobné hladiny, jako tomu bylo u předchozích látek. Relativně vyšší se zdály být hodnoty naměřené v epikotylech, ale nejednalo se o významně zvýšené koncentrace. Lze zmínit 168,81 pmol/g při druhé nejnižší koncentraci,  $2 \cdot 10^{-8}$  M, a 153,09 pmol/g ve vzorcích epikotylů ovlivněných o dva řády vyšší koncentrací 24-epiBL.

Ve vzorcích ovlivněných nevyššími koncentracemi 24-epiBL ( $2 \cdot 10^{-3}$  a  $2 \cdot 10^{-2}$  M) byly pozorovány značné rozdíly naměřených hodnot mezi jednotlivými částmi rostlin. V epikotylech bylo pozorováno výrazné zvýšení při obou hladinách. Ve vzorcích ovlivněných hladinou  $2 \cdot 10^{-3}$  M byla naměřena koncentrace CS 595,66 pmol/g, která převyšovala hladiny naměřené v kořenech i kotyledonech, a při ovlivnění  $2 \cdot 10^{-2}$  M byla odečtena maximální stanovená koncentrace CS v epikotylech – 831,6 pmol/g čerstvé hmoty. Hodnoty naměřené v kotyledonech při ovlivnění  $2 \cdot 10^{-3}$  M byly pouze mírně zvýšené oproti hodnotám v kontrolním vzorku a při nejvyšší hladině ovlivnění byla naměřena nejvyšší koncentrace CS v kotyledonech – 891,42 pmol/g čerstvé hmoty. Tato hodnota byla nejvyšší stanovenou koncentrací a maximální množství CS bylo na rozdíl od předchozích dvou sledovaných látek naměřeno ve vzorku kotyledonu.

Hladina CS v koříncích se zdála nejméně ovlivněná a její zvýšení bylo pozorováno až ve vzorcích ovlivněných nejvyšší testovanou koncentrací 24-epiBL, šlo ale pouze o mírnou změnu v porovnání s ostatními koncentracemi CS v koříncích a se svými 275,33 pmol/g se jednalo, oproti hodnotám naměřeným v epikotylech a kotyledonech, o nízký pík (viz Graf 7).





Graf 7: Endogenní koncentrace castasteronu (CS) naměřené pomocí UHPLC-MS/MS analýzy ve vzorcích pelušek (*Pisum arvense L.*) v biotestu ovlivněných koncentrační řadou 24-epiBL a v kontrolních rostlinách (K) – v epikotylech (šedá), koříncích (modrá) a kotyledonech (oranžová). (Průměr ± SD; n = 4, počet replikátů vzorků)

## 5 DISKUZE

Pro ovlivnění rostlin pelušek (*Pisum arvense* L.) koncentrační řadou 24-epiBL byl v této práci zvolen devítidenní biotest inhibice etiolovaného růstu. Aby bylo dosaženo dostatečného rozptylu působících koncentrací, byl zvolen rozsah od  $2 \cdot 10^{-9}$  do  $2 \cdot 10^{-2}$  M 24-epiBL. Provedený biotest umožnil porovnat a zhodnotit vliv jednotlivých koncentrací 24-epiBL na etiolované rostliny. V biotestu byla pozorována částečná inhibice etiolovaného růstu při koncentraci  $2 \cdot 10^{-6}$  M a výrazné zkrácení epikotylů pelušek (cca na třetinu délky kontrolního vzorku) při koncentracích  $2 \cdot 10^{-5}$  až  $2 \cdot 10^{-2}$  M 24-epiBL (viz Graf 1), což bylo v souladu se známými výsledky (Kořínková, 2015; Kořínková et al., 2017).

Zkrácené rostliny vykazovaly projevy tzv. trojí odezvy, které nasvědčovaly tomu, že exogenní aplikací BRs byla vyvolána biosyntéza ethylenu. Tento prokázaný fenotypový projev vázající se na vztah BRs a ethylenu byl popsán v předešlých studiích (Guzmán & Ecker, 1990) a během optimalizace prováděného biotestu bylo ukázáno, že množství produkovaného ethylenu koreluje se stupněm zkrácení epikotylu pelušek. Pozměněný fenotyp, který byl pozorován 4 dny od aplikace 24-epiBL, byl tedy následkem zvýšení produkce ethylenu vyvolané exogenní aplikací BRs (Kořínková, 2015).

Ovlivněné rostliny byly dále použity k analýze, jejíž cílem bylo stanovit endogenní hladiny BRs a porovnat, zda se naměřené hodnoty liší mezi jednotlivými koncentracemi aplikovaného 24-epiBL, a zjistit, jestli aplikace exogenního BRs způsobí stimulaci jejich biosyntézy. Extrakcí, izolací a přečištěním BRs provedením SPE a IAC a následnou UHPLC-MS/MS analýzou bylo stanoveno endogenní množství BRs ve vzorcích pelušek ovlivněných v biotestu. Zvolené metody byly vybrány především kvůli jejich vysoké citlivosti, specifitě, vysoké separační schopnosti a možnosti kvantifikovat i velmi nízké koncentrace (v řádech pmol/g čerstvé hmoty).

Předpokladem bylo, že u vzorků, u nichž aplikovaná koncentrace způsobila zkrácení epikotylu a byla tedy stimulována produkce ethylenu, by mohly být pozorovány i zvýšené vnitřní hladiny BRs. Navýšení endogenní hladiny prekurzorů BRs oproti kontrole by znamenalo, že došlo ke stimulaci biosyntézy BRs. Endogenní koncentrace je regulována působením na biosyntézu a metabolismus BRs (Fujioka & Yokota, 2003) a je známo, že vnější aplikací biologicky aktivního BRs na rostlinu dochází k navýšení

defosforylace BES1 (*Kvasnica et al., 2016*). Zvýšené množství defosforylovaných transkripčních faktorů poté stimuluje silnější odezvu na BRs (*Yin et al., 2002*).

V etiolovaných rostlinách byl detekován bioaktivní BL a jeho prekurzory CS a HCS. Koncentrace 24-epiBL byla též v rostlinách naměřena, avšak hladina tohoto fytohormonu v rostlinách pravděpodobně obsahovala i část z aplikovaného množství, které rostlina přijala a nebylo zmetabolizováno, tudíž se nejednalo o čistě endogenní koncentraci. Kvůli tomu nemohl být jeho obsah srovnán s ostatními detekovanými BRs a jeho hodnoty nebyly zahrnuty ve vyhodnocení.

Při srovnání endogenních hladin BRs naměřených v kontrolních rostlinách si lze všimnout, že kotyledony obsahovaly násobně vyšší koncentrace BL, CS i HCS než epikotyle a kořínky. V předchozích studiích byly naměřeny koncentrace <18 pmol/g BL a 110 až 270 pmol/g CS v rostlinách neovlivněných, rostoucích 10 dní za tmy (*Symons et al., 2002*). V této práci byla v kotyledonech přítomna vyšší koncentrace BL (45,14 pmol/g), ale naopak koncentrace CS, které byly stanoveny, byly o řád nižší. Jeho přítomnost v kotyledonech také nebyla o tolik výraznější než v epikotylech a kořincích jako tomu bylo u BL a HCS. Tyto výsledky se ale mohou lišit kvůli použití jiné odrůdy rostlin hrachu. Nejvíce však obsahovaly kontrolní rostliny hormon HCS, jehož bylo v kotyledonech naměřeno 181,71 pmol/g. Podobně zvýšená koncentrace byla naměřena též v práci *Kratochvílová, 2019*.

Výsledky analýzy ukázaly, že ke zvýšení endogenních hladin BL, CS a HCS došlo působením vysokých koncentrací exogenního 24-epiBL ( $2 \cdot 10^{-3}$  a  $2 \cdot 10^{-2}$  M). Žádné z nižších koncentrací aplikovaného 24-epiBL tedy nevyvolaly v rostlinách intenzivnější biosyntézu BRs. Největší nárůst koncentrací byl naměřen v epikotylech, kde vzrostly hladiny přibližně dvakrát více než v ostatních částech rostlin, s výjimkou hormonu CS, u něhož byl pozorován podobný nárůst v epikotylech i kotyledonech (obě hodnoty až trojnásobně převyšovaly pík naměřený v kořincích).

Z výsledných hodnot vyplývá, že nejvyšší koncentrace endogenních BRs byly stanoveny ve vzorcích epikotylů pelušek ovlivněných  $2 \cdot 10^{-3}$  M 24-epiBL (713,65 pmol/g BL a 645,19 pmol/g HCS) a ve vzorcích kotyledonů a epikotylů pelušek ovlivněných  $2 \cdot 10^{-2}$  M 24-epiBL (pro CS). Celkově nejvyšší naměřené koncentrace patřily CS, jehož množství ve vzorcích kotyledonů a epikotylů pelušek ovlivněných  $2 \cdot 10^{-2}$  M 24-epiBL (831,6 pmol/g v epikotylech a 891,42 pmol/g v kotyledonech) převyšovalo

naměřené koncentrace BL a HCS (v kotyledonech nejvýrazněji). Naopak nejnižší koncentrace endogenních BRs byly obecně naměřeny v kořincích pelušek, kde bylo nejvíce stanoveno 341,42 pmol/g BL ve vzorku ovlivněném  $2 \cdot 10^{-3}$  M 24-epiBL.

Lze konstatovat, že výrazné navýšení endogenních hladin BRs bylo indukováno aplikováním velmi vysokých koncentrací exogenního 24-epiBL. Jednalo se o dvě nejvyšší koncentrace použité v biotestu:  $2 \cdot 10^{-3}$  a  $2 \cdot 10^{-2}$  M 24-epiBL. K pozorovanému navýšení endogenních hladin byly tedy zapotřebí koncentrace až o dva řády větší než koncentrace, při které byl pozorován znatelně pozměněný fenotyp pelušek v biotestu.

Všechny tyto údaje byly stanoveny pro etiolované rostliny. U rostlin de-etiolovaných, rostoucích při světle, je možné, že se endogenní koncentrace budou lišit. Výzkum naznačuje, že de-etiolované rostliny obsahují vyšší endogenní hladiny BRs než ty rostoucí ve tmě (*Symons et al., 2002*). Také bylo zjištěno, že rostliny, které rostou za stálého osvětlení, pravděpodobně reagují na exogenně aplikované BRs více, než ty rostoucí za tmy (*Symons & Reid, 2003a*). Proto by bylo vhodné provést podobný experiment i s rostlinami rostoucími na světle, aby bylo možné ověřit získané poznatky i na de-etiolovaných rostlinách a prozkoumat, jakým způsobem fotomorfogeneze ovlivní výsledky tohoto experimentu. Pro další výzkum by bylo též přínosné otestovat vliv exogenních BRs na jejich endogenní hladiny i u dalších druhů rostlin, pro případné porovnání nebo nalezení podobných výsledků.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo otestovat na etiolovaných rostlinách hrachu setého (*Pisum arvense L.*), jaký má vliv exogenně aplikovaný 24-epiBL na hladiny endogenních BRs. K tomu byl využit devítidenní biotest inhibice etiolovaného růstu pelušek (Košínková, 2015) s následným extrahováním a izolováním BRs ze vzorků pomocí SPE a IAC. Ke stanovení endogenních BRs byla použita UHPLC-MS/MS analýza (Oklešťková et al., 2017).

V provedeném biotestu bylo ověřeno, že aplikace exogenního 24-epiBL o koncentracích  $2 \cdot 10^{-5}$  až  $2 \cdot 10^{-2}$  M způsobují silnou inhibici etiolovaného růstu, díky zvýšené produkci ethylenu. Tyto epikotyly byly 3-4x kratší než epikotyly rostlin neovlivněných BRs. Naopak epikotyly ovlivněné nízkými koncentracemi 24-epiBL ( $2 \cdot 10^{-9}$  až  $2 \cdot 10^{-7}$  M) byly v průměru mírně delší než kontrola. Endogenní hladiny BRs byly ale zaznamenány až při koncentracích  $2 \cdot 10^{-3}$  a  $2 \cdot 10^{-2}$  M 24-epiBL.

V etiolovaných rostlinách byly detekovány endogenní hladiny BL, CS a HCS. U naměřených hodnot byl pozorován výrazný nárůst koncentrace těchto hormonů po aplikaci  $2 \cdot 10^{-3}$  a  $2 \cdot 10^{-2}$  M 24-epiBL, nejvyšší koncentrace byly naměřeny obecně v epikotylech a pro CS též v kotyledonech, zatímco kontrolní rostliny obsahovaly největší množství BRs v kotyledonech. Zvýšení endogenních hladin BRs bylo stimulováno o dva řády vyšší koncentrací 24-epiBL, než bylo zapotřebí k inhibici etiolovaného růstu pelušek.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Achard P., Renou J. P., Berthomé R., Harberd N. P., Genschik, P. (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol* **18**(9), 656-660.
- Arteca R. N. (1995) Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology (Davies P. J., ed.), pp. 206–213, Dordrecht, Netherlands
- Arteca R. N., Arteca J. M. (2008) Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of experimental botany* **59**(11), 3019-3026.
- Bajguz A. (2000) Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide. *Plant Physiol Biochem* **38**, 797–801.
- Bajguz A., Tretyn A. (2003) The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* **62**, 1027-1046.
- Bajguz A, Hayat S (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Biochem* **47**, 1–8.
- Bajguz A. (2011) Brassinosteroids – occurrence and chemical structures in plants. In *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone* (Hayat S., Ahmad A., eds.), pp. 1–27, Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Bajguz A., Piotrowska-Niczyporuk A. (2013) Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (*Trebouxiophyceae*). *Plant Physiol Biochem* **71**, 290–297.
- 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.
- Campbell P., Braam J. (1999) Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends Plant Sci* **4**(9), 361-366.
- Cao H., Chen S. (1995) Brassinosteroid-induced rice lamina joint inclination and its relation to indole-3-acetic acid and ethylene. *Plant Growth Regul* **16**, 189–196.
- Clouse S. D. (2011) Brassinosteroid Signal Transduction: From Receptor Kinase Activation to Transcriptional Networks Regulating Plant Development. *Plant Cell* **23**, 1219–1230.
- Clouse S. D., Sasse J. M. (1998) BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 427-451.
- Cutler H. G. (1991) Brassinosteroids through the looking glass. In *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, & Applications*, (Cutler H. G., Yokota T., Adam G., eds.), pp. 334-345, American Chemical Society, Washington, D.C.

- Dhaubhadel S., Chaudhary S., Dobinson K. F., Krishna P. (1999) Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Mol Biol* **40**, 333–342.
- Ding J., Wu J. H., Liu J. F., Yuan B. F., Feng Y. Q. (2014) Improved methodology for assaying brassinosteroids in plant tissues using magnetic hydrophilic material for both extraction and derivatization. *Plant Methods* **10**(1), 39.
- Divi U. K., Rahman T., Krishna P. (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol* **10**(1), 151.
- Duran M. I., González C., Acosta A., Olea A. F., Díaz K., Espinoza L. (2017) Synthesis of Five Known Brassinosteroid Analogs from Hyodeoxycholic Acid and Their Activities as Plant-Growth Regulators. *Int J Mol Sci* **18**(3), 516.
- Esposito D., Komarnytsky S., Shapses S., Raskin I. (2011) Anabolic effect of plant brassinosteroid. *FASEB J* **25**, 3708-3719.
- Fujioka S., Yokota T. (2003) Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Ann Rev Plant Biol* **54**, 137–164.
- Fujita S., Ohnishi T., Watanabe B., Yokota T., Takatsuto S., Fujioka S., Yoshida S., Sakata K., Mizutani M. (2006) Arabidopsis CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols. *Plant J* **45**(5), 765-774.
- Gampala S. S., Kim T. W., He J. X., Tang W., Deng Z., Bai M.-Y., Guan S., Lalonde S., Sun Y., Gendron J. M. (2007) An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Dev Cell* **13**, 177-189.
- Gendron J. M., Liu J. S., Fan M., Bai M. Y., Wenkel S., Springer P. S., Barton M. K., Wang, Z. Y. (2012) Brassinosteroids regulate organ boundary formation in the shoot apical meristem of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **109**(51), 21152-21157.
- González-García M. P., Vilarrasa-Blasi J., Zhiponova M., Divol F., Mora-García S., Rusinova E., Caño-Delgado A. I. (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* **138**(5), 849-859.
- Grove M. D., Spencer G. F., Rohwedder W. K., Mandava N., Worley J. F., Warthen Jr. J. D., Steffens G. L., Flippen-Anderson J. L., Cook Jr. J. C. (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from brassica napus pollen. *Nature* **281**, 216-217.
- Gudesblat G. E., Rusinova E. (2011) Plants grow on brassinosteroids. *Curr Opin Plant Biol* **14**(5), 530-537.
- Guzman P., Ecker J. R. (1990) Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *The Plant Cell* **2**(6), 513-523.

- Hacham Y., Sela A., Friedlander L., Savaldi-Goldstein S. (2012) BRI1 activity in the root meristem involves post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *Plant Signal Behav* **7**, 68–70.
- Han K. S., Ko K. W., Nam S. J., Park S. H., Kim S. K. (1997) Optimization of a rice lamina inclination assay for detection of brassinosteroids: I. effect of phytohormones on the inclination activity. *J Plant Biol* **40**, 240–244.
- Haubrick L. L., Torsethaugen G., Assmann S. M. (2006) Effect of brassinolide, alone and in concert with abscisic acid, on control of stomatal aperture and potassium currents of *Vicia faba* guard cell protoplasts. *Physiologia Plantarum* **128**(1), 134-143.
- Huang H. Y., Jiang W. B., Hu Y. W., Wu P., Zhu J. Y., Liang W. Q., Wang Z. Y., Lin W. H. (2013) BR signal influences Arabidopsis ovule and seed number through regulating related genes expression by BZR1. *Mol Plant* **6**(2), 456–469.
- Huo F., Wang X., Han Y., Bai Y., Zhang W., Yuan H., Liu H. (2012) A new derivatization approach for the rapid and sensitive analysis of brassinosteroids by using ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta* **99**, 420-425.
- Chaiwanon J., Wang Z. Y. (2015) Spatiotemporal brassinosteroid signaling and antagonism with auxin pattern stem cell dynamics in Arabidopsis roots. *Curr Biol* **25**(8), 1031-1042.
- Chen I. J., Lo W. S., Chuang J. Y., Cheuh C. M., Fan Y. S., Lin L. C., Wu S. J., Wang L. C. (2013) A chemical genetics approach reveals a role of brassinolide and cellulose synthase in hypocotyl elongation of etiolated Arabidopsis seedlings. *Plant Sci* **209**, 46–57.
- Chung Y., Choe S. (2013) The regulation of brassinosteroid biosynthesis in Arabidopsis. *Crit Rev Plant Sci* **32**(6), 396-410.
- Ismaili J., Boisvert M., Longpre F., Carange J., Le Gall C., Martinoli M. G., Daoust B. (2012) Brassinosteroids and analogs as neuroprotectors: synthesis and structure-activity relationships. *Steroids* **77**(1), 91–99.
- Jiroutová P., Mikulík J., Novák O., Strnad M., Oklešťková J. (2019) Brassinosteroids Induce Strong, Dose-Dependent Inhibition of Etiolated Pea Seedling Growth Correlated with Ethylene Production. *Biomolecules* **9**(12), 849.
- Kagale S., Divi U. K., Krochko J. E., Keller W. A., Krishna P. (2007) Brassinosteroid confers tolerance in Arabidopsis thaliana and Brassica napus to a range of abiotic stresses. *Planta* **225**(2), 353-364.
- Khripach V., Zhabinskii V., de Groot A. (2000) Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann Bot* **86** (3), 441–447.



- Kim T. W., Guan S., Sun Y., Deng Z., Tang W., Shang J. X., Sun Y., Burlingame A. L., Wang Z. Y. (2009) Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol* **11**(10), 1254-1260.
- Kořínková P. (2015) Vliv brassinosteroidů a vybraných růstových regulátorů na etiolované rostliny pelušky (*Pisum arvense* L.) - biotest. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Kořínková P., Bazgier V., Oklešťková J., Rárová L., Strnad M., Kvasnica M. (2017) Synthesis of novel aryl brassinosteroids through alkene cross-metathesis and preliminary biological study. *Steroids* **127**, 46-55.
- Kozuka T., Kobayashi J., Horiguchi G., Demura T., Sakakibara H., Tsukaya H., Nagatani A. (2010) Involvement of auxin and brassinosteroid in the regulation of petiole elongation under the shade. *Plant Physiol* **153**, 1608–1618.
- Kratochvílová J. (2019) Vliv syntetických derivátů brassinosteroidů na zvýšení tolerance rostlin vůči abiotickým stresům. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Kvasnica M., Oklešťková J., Bazgier V., Rárová L., Kořínková P., Mikulík J., Budesinsky M., Béres T., Berka K., Lu Q., Russinova, E., Strnad M. (2016) Design, synthesis and biological activities of new brassinosteroid analogues with a phenyl group in the side chain. *Org Biomol Chem* **14**(37), 8691-8701.
- Li F., Asami T., Wu X., Tsang E. W. T., Cutler A. J. (2007) A putative hydroxysteroid dehydrogenase involved in regulating plant growth and development. *Plant Physiol* **145**, 87–97.
- Li J., Lease K. A., Tax F. E., Walker J. C. (2001) BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(10), 5916–5921.
- Li J., Wen J., Lease K. A., Doke J. T., Tax F. E., Walker J. C. (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**(2), 213-222.
- Li Q. F., Wang C., Jiang L., Li S., Sun S. S., He J. X. (2012) An interaction between BZR1 and DELLAs mediates direct signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis*. *Sci Signal* **5**(244), ra72.
- Liang T., Mei S., Shi C., Yang Y., Peng Y., Ma L., Wang F., Li X., Huang X., Yin Y., Liu H. (2018) UVR8 interacts with BES1 and BIM1 to regulate transcription and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental cell* **44**(4), 512-523.
- Lv B., Tian H., Zhang F., Liu J., Lu S., Bai M., Li C., Ding Z. (2018) Brassinosteroids regulate root growth by controlling reactive oxygen species homeostasis and dual effect on ethylene synthesis in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **14**, e1007144.

- Ma L., Li J., Qu L., Harger J., Chen Z., Zhao H., Deng X. W. (2001) Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* **13**, 2589–2607.
- Malíková J., Swaczynová J., Kolář Z., Strnad M. (2008) Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* **69**(2), 418-426.
- Michelini F. M., Ramírez J. A., Berra A., Galagovsky L. R., Alché L. E. (2004) In vitro and in vivo antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues. *Steroids* **69**(11/12), 713-720.
- Michelini F. M., Berra A., Alché L. E. (2008) The in vitro immunomodulatory activity of a synthetic brassinosteroid analogue would account for the improvement of herpetic stromal keratitis in mice. *J Ster Biochem Mol Biol* **108**, 164–170.
- Mitchell J. W., Livingston G. A. (1968) Methods of studying plant hormones and growth regulating substances, pp. 26-28, Agriculture Handbook. No. 336. U.S. Dept. of Agriculture Government Printing Office, Washington D. C., USA.
- Mitchell J. W., Mandava N. B., Worley J. F., Plimmer J. R., Smith M. V. (1970) Brassins: a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* **225**, 1065-1066.
- Mori K., Sakakibara M., Ichikawa Y., Ueda H., Okada K., Umemura T., Yabuta G., Kuwahara S., Kondo M., Minobe M., Sogabe A. (1982) Synthesis of (22S, 23S)-homobrassinolide and brassinolide from stigmaterol. *Tetrahedron* **38**(14), 2099-2109.
- Müssig C., Shin G.-H., Altmann T. (2003) Brassinosteroids promote root growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* **133**, 1261–1271.
- Müssig C. (2005) Brassinosteroid-promoted growth. *Plant Biol* **7**, 110–117.
- Nakaya M., Tsukaya H., Murakami N., Kato M. (2002) Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **43**, 239-244.
- Neff M. M., Nguyen S. M., Malanchruvil E. J., Fujioka S., Noguchi T., Seto H., Tsubuki M., Honda T., Takatsuto S., Yoshida S., Chory J. (1999) BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **96**(26), 15316-15323.
- Nomura T., Sato T., Bishop G. J., Kamiya Y., Yokota T. (2001) Accumulation of 6-deoxocastasterone and 6-deoxocastasterone in Arabidopsis, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis. *Phytochemistry* **57**, 171–178.
- Ohnishi T., Szatmari A. M., Watanabe B., Fujita S., Bancos S., Koncz C., Lafos M., Shibata K., Yokota T., Sakata K., Szekeres M., Mizutania M. (2006) C-23 hydroxylation by Arabidopsis CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **18**, 3275–3288.
- Oklešťková J., Tarkowská D., Eyer L., Elbert T., Marek A., Smržová Z., Novák O., Fránek M., Zhabinskii V.N., Strnad M. (2017) Immunoaffinity chromatography combined with

tandem mass spectrometry: A new tool for the selective capture and analysis of brassinosteroid plant hormones. *Talanta* **170**, 432-440.

- Rárová L., Zahler S., Liebl J., Kryštof V., Sedlák D., Bartůněk P., Kohout L., Strnad M. (2012) Brassinosteroids inhibit *in vitro* angiogenesis in human endothelial cells. *Steroids* **77**(13), 1502-1509.
- Sasse J. M. (1999) Physiological actions of brassinosteroids. In *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones* (Sakurai A., Yokota T., Clouse S. D., ed.), pp. 137-161, Springer-Verlag, Tokyo, Japan.
- Sharma P., Bhardwaj R. (2007) Effect of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth and heavy metal uptake in *Brassica juncea* L. *Gen Appl Plant Physiol* **33**, 59-73.
- Shimada Y., Goda H., Miyauchi N., Nagata N., Asami T., Fujioka S., Yoshida S. (2001) Light regulation of brassinosteroid-biosynthetic genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **42**, 77.
- Singh A. P., Savaldi-Goldstein S. (2015) Growth control: brassinosteroid activity gets context. *J Exp Bot* **66**(4), 1123-1132.
- Statsenko E. A., Korolevich M. P., Seregkina T. V., Paramonova N. A., Ostapenko V. A., Ryibkina I. L. (2008) Methods of correction of lipid metabolism in athletes. *Voennaya Medicina [Military Medicine]* **9**, 102-104.
- Steber C. M., McCourt P. (2001) A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **125**, 763-769.
- Stewart Lilley J. L., Gan Y., Graham I. A., Nemhauser J. L. (2013) The effects of DELLAs on growth change with developmental stage and brassinosteroid levels. *Plant J* **76**, 165-173.
- Symons G. M., Schultz L., Kerckhoffs L. H. J., Davies N. W., Gregory D., Reid J. B. (2002) Uncoupling brassinosteroid levels and de-etiolation in pea. *Physiologia Plantarum* **115**(2), 311-319.
- Symons G. M., Reid J. B. (2003a) Hormone levels and response during de-etiolation in pea. *Planta* **216**(3), 422-431.
- Symons G. M., Reid J. B. (2003b) Interactions between light and plant hormones during de-etiolation. *J Plant Growth Regul* **22**(1), 3-14.
- Symons G. M., Reid, J. B. (2008) Brassinosteroids, de-etiolation and the re-emerging art of plant hormone quantification. *Plant Signal Behav* **3**(10), 868-870.
- Szekeres M., Németh K., Koncz-Kálmán Z., Mathur J., Kauschmann A., Altmann T., Rédei G., 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**(2), 171-182.

- Tamaki Y., Takeuchi K., Nomura T., Yoneyama K., Takeuchi Y., Nyunoya H., Matsushita Y., Takatsuto S., Bishop G. J., Yokota T. (2002) Effect of light quality on the level of endogenous brassinosteroids in rice, and the rice DWARF gene. *Plant Cell Physiol* **43**, 185.
- Tang W., Yuan M., Wang R., Yang Y., Wang C., Oses-Prieto J. A., Kim T. W., Zhou H. W., Deng Z., Gampala S. S., Gendron J. M., Jonassen E. M., Lillo C., DeLong A., Burlingame A. L., Sun Y., Wang Z. Y. (2011) PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* **13**, 124-131.
- Thompson M. J., Mandava N., Flippen-Anderson J. L., Worley J. F., Dutky S. R., Robbins W. E., Lusby W. (1979) Synthesis of brassino steroids: new plant-growth-promoting steroids. *J Org Chem* **44**(26), 5002-5004.
- Turk E. M., Fujioka S., Seto H., Shimada Y., Takatsuto S., Yoshida S., Denzel M. A., Torres Q. I., Neff M. M. (2003) CYP72B1 inactivates brassinosteroid hormones: An intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction. *Plant Physiol* **133**, 1643–1653.
- Unterholzner S. J., Rozhon W., Papacek M., Ciomas J., Lange T., Kugler K. G., Mayer K. F., Sieberer T., Poppenberger B. (2015) Brassinosteroids are master regulators of gibberellin biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **27**(8), 2261-2272.
- Vandenbussche F., Callebert P., Zadnikova P., Benkova E., Van Der Straeten D. (2013) Brassinosteroid control of shoot gravitropism interacts with ethylene and depends on auxin signaling components. *Am J Bot* **100**, 215–225.
- Vilarrasa-Blasi J., Gonzalez-Garcia M. P., Frigola D., Fàbregas N., Alexiou K. G., López-Bigas N., Rivas S., Jauneau A., Lohmann J. U., Benfey P. N., Ibañes M., Caño-Delgado A. I. (2014) Regulation of plant stem cell quiescence by a brassinosteroid signaling module. *Developmental Cell* **30**, 36–47.
- Vitvitskaya L. V., Nikonorov S. I., Tikhomirov A. M., Zagriichuk V. P., Abtakhi B., Vorob'eva E. I. (1997) Effect of some toxicants on the behaviour of Russian sturgeon fingerlings and toxicoprotector effects of biologically active substances. *Dokl Akad Nauk* **352**, 842-844.
- De Vleeschauwer D., Van Buyten E., Satoh K., Balidion J., Mauleon R., Choi I. R., Vera-Cruz C., Kikuchi S., Höfte M. (2012) Brassinosteroids antagonize gibberellin-and salicylate-mediated root immunity in rice. *Plant Physiol* **158**(4), 1833-1846.
- Vogler F., Schmalzl C., Enghart M., Bircheneder M., Sprunck S. (2014) Brassinosteroids promote Arabidopsis pollen germination and growth. *Plant Reprod* **27**(3), 153–167.
- Vriet C., Russinova E., Reuzeau C. (2012) Boosting Crop Yields with Plant Steroids. *Plant Cell* **24**, 842–857.

- Wada K., Marumo S., Abe H., Morishita T., Nakamura K., Uchiyama M., Mori K. (1984) A rice lamina inclination test-amicro-quantitative bioassay for brassinosteroids. *Agric Biol Chem* **48**, 719–726.
- Wachsmann M. B., López E., Ramírez J. A., Galagovsky L. R., Coto C. E. (2000) Antiviral effect of brassinosteroids against herpes virus and arenaviruses. *Antiviral Chem Chemother* **11**, 71-77.
- Wachsmann M. B., Ramirez J. A., Talarico L. B., Galagovsky L. R., Coto C. E. (2004) Antiviral activity of natural and synthetic brassinosteroids. *Curr Med Chem Anti Infective Agents* **3**(2), 163-179.
- Wang Z. Y., Nakano T., Gendron J., He J., Chen M., Vafeados D., Yang Y., Fujioka S., Yoshida S., Asami T., Chory J. (2002) Nuclear-Localized BZR1 Mediates Brassinosteroid-Induced Growth and Feedback Suppression of Brassinosteroid Biosynthesis, *Developmental Cell* **2**(4), 505-513.
- Wang X., Chory J. (2006) Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* **313**, 1118-1122.
- Wilen R. W., Sacco M., Gusta L.V., Krishna P. (1995) Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (*Bromus inermis*) cell cultures. *Physiol Plant* **95**, 195–202.
- Yamamoto R., Demura T., Fujuda H. (1997) Brassinosteroid induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells. *Plant Cell Physiol* **38**, 980–983.
- Yang C. J., Zhang C., Lu Y. N., Jin J. Q., Wang X. L. (2011) The mechanisms of brassinosteroids action: from signal transduction to plant development. *Mol Plant* **4**, 588–600.
- Yang X., Bai Y., Shang J., Xin R., Tang W. (2016) The antagonistic regulation of abscisic acid-inhibited root growth by brassinosteroids is partially mediated via direct suppression of ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 expression by BRASSINAZOLE RESISTANT 1. *Plant Cell Environ* **39**, 1994–2003.
- 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* **107**(13), 6100–6105.
- Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J. (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**(2), 181-191.
- Yokota T., Arima M., Takahashi N. (1982) Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Lett* **23**, 1275-1278.

- Yu X., Li L., Zola J., Aluru M., Ye H., Foudree A., Guo H., Anderson S., Aluru S., Liu P., Rodermel S., Yin Y. (2011) A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **65**(4), 634-646.
- Zhiponova M. K., Vanhoutte I., Boudolf, V., Betti C., Dhondt S., Coppens F., Mylle E., Maes S., González-García M.-P., Caño-Delgado A. I., Beemster G. T. S., De Veylder L., Russinova E., Inzé, D. (2013) Brassinosteroid production and signaling differentially control cell division and expansion in the leaf. *New Phytol* **197**(2), 490-502.
- Zhu T., Tan W. R., Deng X. G., Zheng T., Zhang D. W., Lin H. H. (2015) Effects of brassinosteroids on quality attributes and ethylene synthesis in postharvest tomato fruit. *Postharvest Biol Technol* **100**, 196–204.
- Želíková I. (2018) Imunomagnetická mikroextrakcia brassinosteroidov. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc.

## PŘÍLOHA 1

Tab P1: Koncentrace (pmol/g čerstvé hmoty) endogenních BRs – brassinolidu (BL), 28-homocasteronu (HCS) a castasteronu (CS) – ve vzorcích epikotylů, kořínků a kotyledonů etiolovaných pelušek (*Pisum arvense L.*) ovlivněných koncentrační řadou 24-epiBL a v kontrolních rostlinách (K) stanovené pomocí UHPLC-MS/MS analýzy; hodnoty jsou průměrem z 4 měření (n = 4), ± směrodatná odchylka (smdoch).

epikotyly	$2 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-2}$	K	
(pmol/g FW)	BL	5,67	17,46	9,17	17,81	24,6	10,95	713,65	370,57	0,93
	smdoch	1,19	4,32	5,41	6,95	4,83	2,11	167,06	7,43	0,21
	HCS	88,45	144,3	37,25	116	67,63	19,01	645,19	223,87	28,77
	smdoch	63,67	45,66	4,21	43,96	11,78	19,01	162,35	89,88	14,93
	CS	86,42	168,81	102,88	153,09	28,79	17,35	595,66	831,6	14,13
	smdoch	3,91	81,45	1,06	37,24	14,14	2,2	11,48	179,84	2,23
kořínky	$2 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-2}$	K	
(pmol/g FW)	BL	8,23	13,2	28,39	9,71	37,03	20,79	341,42	46,02	3,18
	smdoch	4,04	5,32	8,9	3,63	9,49	8,521	64,505	12,05	0,75
	HCS	13,36	24,78	37,61	28,19	44,21	34,9	82,65	267,52	3,98
	smdoch	2,83	5,13	9,14	3,07	7,63	16,4	58,44	42,04	0,91
	CS	53,55	9,21	51,12	22,78	71,26	34,08	37,94	275,33	12,51
	smdoch	6,75	0,16	16,53	9,53	9,99	6,36	12,49	39,51	8,2
kotyledony	$2 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-2}$	K	
(pmol/g FW)	BL	5,68	6,09	11,39	15,084	45,48	22,37	362,61	159	45,14
	smdoch	3,59	3,19	6,047	1,05	4,22	2,49	64,505	32,04	22,83
	HCS	89,84	37,52	50,81	19,32	46,15	93,69	97,88	349,05	189,71
	smdoch	62,85	18,13	9,04	3,54	3,69	1,55	17,08	74,07	44,89
	CS	33,14	59,29	61,75	33,13	15,15	42,54	171,07	891,42	26,24
	smdoch	8,85	30,42	19,32	3,02	4,47	6,42	75,86	68,25	3,79