

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Interakce brassinosteroidů a fytoekdysteroidů v  
rostlinách**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Vypracovala:	<b>Eliška Krampolová</b>
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	23. 5. 2017

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eliška Krampolová
Název práce	Interakce brassinosteroidů a fytoekdysteroidů v rostlinách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>Předložená bakalářská práce je zaměřena na studium interakce dvou skupin přírodních triterpenoidů, brassinosteroidů a fytoekdysteroidů. Teoretická část obsahuje kapitoly seznamující čtenáře s charakteristikou obou skupin látek, jejich biosyntézou, strukturními a fyziologickými vlastnostmi včetně do současnosti získaných poznatků ohledně jejich vzájemné interakce v rostlinách. V experimentální části se autorka zabývá stanovením obou skupin látek v modelové rostlině řeřicha seté kultivované <i>in vitro</i>, a to nejprve u rostlin, jejichž růst je ovlivněn přítomností vybraného zástupce brassinosteroidů a následně u rostlin kultivovaných na médiu s vybraným fytoekdysteroidem. V kapitole výsledky a diskuze lze nalézt výčet a komentáře získaných experimentálních dat, které jsou přehledně shrnuty a zhodnoceny v kapitole Závěr.</p>
Klíčová slova	brassinosteroidy, fytoekdysteroidy, rostlinné hormony, signální molekuly, řeřicha setá
Počet stran	52
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Eliška Krampolová
Title of thesis	Brassinosteroids and phytoecdysteroids crosstalk <i>in planta</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	M.Sc. Danuše Tarkowská, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	<p>The presented bachelor thesis is focused on the study of the interaction of two groups of natural triterpenoids, brassinosteroids (BRs) and phytoecdysteroids (PEs). The theoretical part of the thesis contains chapters introducing the reader with characteristics of both groups of substances, their biosynthesis, structural and physiological properties, including recent knowledge about their mutual interaction in plants. In the experimental part, the author deals with the determination of both groups of substances in the model plant of garden cress cultivated <i>in vitro</i>, first in plants whose growth is influenced by the presence of a selected representative of BRs and subsequently in plants cultivated on a medium with selected PE. In the results and discussion chapter, the reader can find a list and commentary on the experimental data, which are summarized and reviewed in the Conclusion chapter.</p>
Keywords	brassinosteroids, phytoecdysteroids, plant hormones, signalling molecules, garden cress
Number of pages	52
Language	Czech

## PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že jsem svou předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Danuše Tarkowské, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 30. 4. 2017

.....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Mgr. Danuši Tarkowské, Ph.D. za velkou vstřícnost, trpělivost, podnětné odborné konzultace a vedení bakalářské práce. Děkuji za ochotu a čas, který mi věnovala.

Rovněž děkuji své rodině, rodičům i sestře za podporu při zpracování bakalářské práce, ale i při celém studiu.

Materiální podpora pro experimentální část této práce byla hrazena z grantu IGA\_PrF\_2017\_010 určeného na podporu projektů specifického vysokoškolského výzkumu.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<b>20E</b> .....	20-hydroxyekdyson
<b>24-<i>epi</i>BL</b> .....	24- <i>epi</i> brassinolid
<b>ACN</b> .....	acetonitril
<b>BL</b> .....	brassinolid
<b>BP</b> .....	bakalářská práce
<b>BRs</b> .....	brassinosteroidy
<b>CS</b> .....	kastasteron
<b>D<sub>3</sub>-BL</b> .....	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]brassinolid
<b>D<sub>3</sub>-CS</b> .....	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]kastasteron
<b>D<sub>3</sub>-<i>epi</i>BL</b> .....	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ] <i>epi</i> brassinolid
<b>D<sub>3</sub>-<i>epi</i>CS</b> .....	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ] <i>epi</i> kastasteron
<b>D<sub>3</sub>-<i>nor</i>BL</b> .....	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ] <i>nor</i> brassinolid
<b>D<sub>3</sub>-<i>nor</i>CS</b> .....	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ] <i>nor</i> kastasteron
<b>D<sub>3</sub>-TY</b> .....	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]tyfasterol
<b>DMAPP</b> .....	dimetylallyl difosfát
<b>ECs</b> .....	ekdysteroidy
<b>EtOH</b> .....	etanol
<b>homoBL</b> .....	homobrassinolid
<b>homoCS</b> .....	homokastasteron
<b>IPP</b> .....	izopentenyl difosfát
<b>IS</b> .....	vnitřní standard ( <i>angl.</i> internal standard)
<b>MeOH</b> .....	metanol
<b>MF</b> .....	mobilní fáze
<b>MRM</b> .....	monitorování rozpadu iontu ( <i>angl.</i> multiple reaction monitoring)
<b>MS</b> .....	hmotnostní spektrometrie ( <i>angl.</i> mass spectrometry); Murashige-Skoog médium
<b><i>nor</i>BL</b> .....	28- <i>nor</i> brassinolid
<b><i>nor</i>CS</b> .....	28- <i>nor</i> kastasteron
<b>PEs</b> .....	fytoekdysteroidy
<b>RuBisCo</b> .....	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa
<b>TY</b> .....	tyfasterol
<b>UHPLC</b> .....	ultra účinná kapalinová spektrometrie ( <i>angl.</i> ultra-high pressure liquid chromatography)
<b>UHPLC-MS/MS</b> ...	ultra účinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

# OBSAH

<b>I. ÚVOD</b> .....	- 9 -
<b>II. CÍLE PRÁCE</b> .....	- 10 -
<b>III. TEORETICKÁ A REŠERŠNÍ ČÁST</b> .....	- 11 -
<b>III. 1. BRASSINOSTEROIDY</b> .....	- 11 -
III. 1. 1. Fyziologické funkce brassinosteroidů v rostlinách .....	- 11 -
III. 1. 2. Chemické a fyzikální vlastnosti BRs .....	- 14 -
III. 1. 3. Biosyntéza brassinosteroidů.....	- 16 -
<b>III. 2. ROSTLINNÉ EKDYSTEROIDY (FYTOEKDYSTEROIDY)</b> .....	- 20 -
III. 2. 1. Fyziologické funkce fytoekdysteroidů v rostlinách .....	- 21 -
III. 2. 2. Chemické a fyzikální vlastnosti fytoekdysteroidů .....	- 22 -
III. 2. 3. Biosyntéza fytoekdysteroidů.....	- 23 -
<b>III. 3. INTERAKCE BRASSINOSTEROIDŮ A FYTOEKDYSTEROIDŮ V ROSTLINÁCH</b> .....	- 24 -
<b>IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	- 26 -
<b>IV. 1. POMŮCKY A CHEMIKÁLIE</b> .....	- 26 -
IV. 1. 1. Pomůcky .....	- 26 -
IV. 1. 2. Chemikálie.....	- 26 -
IV. 1. 3. Roztoky .....	- 27 -
<b>IV. 2. ROSTLINNÝ MATERIÁL</b> .....	- 27 -
<b>IV. 3. PŘÍSTROJE</b> .....	- 27 -
<b>IV. 4. POSTUP PRÁCE</b> .....	- 28 -
IV. 4. 1. Příprava kultivačního média .....	- 28 -
IV. 4. 2. Sterilizace semen řeřichy seté.....	- 29 -
IV. 4. 3. Příprava kultivačních desek, výsev semen řeřichy seté za sterilních podmínek-	29 -
IV. 4. 4. Kultivace řeřichy seté a sběr semenáčků .....	- 31 -
IV. 4. 5. Příprava a zpracování vzorků rostlinného materiálu.....	- 32 -
IV. 4. 6. Kvantitativní analýza .....	- 36 -
<b>V. VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	- 38 -
<b>V. 1. STUDIUM MATRIČNÍHO EFEKTU</b> .....	- 38 -
<b>V. 2. VLIV EXOGENNÍHO FYTOEKDYSTEROIDU NA HLADINU ENDOGENNÍCH BRASSINOSTEROIDŮ</b> .....	- 41 -
<b>V. 3. VLIV EXOGENNÍHO BRASSINOSTEROIDU NA HLADINU ENDOGENNÍCH FYTOEKDYSTEROIDŮ</b> .....	- 44 -
<b>VI. ZÁVĚR</b> .....	- 45 -

<b>VII. LITERATURA .....</b>	<b>- 46 -</b>
<b>VIII. SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>- 51 -</b>
<b>IX. ZDROJE OBRÁZKŮ .....</b>	<b>- 52 -</b>



## I. ÚVOD

**Brassinosteroidy i fytoekdysteroidy** patří do skupiny přírodních látek označovaných jako terpenoidy, popř. izoprenoidy. Jedná se o látky, které jsou tvořeny z pětiuhlíkatých stavebních jednotek izoprenu vzájemně spojených způsobem „hlava k patě“. Samotný izopren se ovšem biosyntézy terpenoidů neúčastní, buňky k tomuto účelu používají jeho biologické formy jako je dimetylallyl difosfát (DMAPP) a izopentenyl difosfát (IPP). Tyto izoprenoidní jednotky se slučují v různém počtu za vzniku monoterpenů (2 izopren. jednotky, sloučeniny s 10 uhlíky), seskviterpenů (3 izopren. jednotky, tj. 15 uhlíků), diterpenů (sloučeniny s 20 uhlíky), triterpenů (sloučeniny s 30 uhlíky), tetraterpenů (sloučeniny se 40 uhlíky) a polyterpenů (sloučeniny s více než 40 atomy uhlíku). Pětiuhlíkaté izoprenoidy lze označit jako hemiterpeny. V přírodě se ale vyskytují jen velmi zřídka a to např. ve formě pětiuhlíkatých kyselin jako je např. kyselina  $\alpha$ -lupulová (humulon) a kyselina  $\beta$ -lupulová (lupulon) - kyseliny vyskytující se v plodech chmele otáčivého *Humulus lupulus* a dávající pivu jeho charakteristickou hořkou chuť. Monoterpeny a seskviterpeny jsou většinou součástí různých přírodních silic, významnými diterpeny pak jsou vitamíny A a E, některé alkaloidy (taxadien), rostlinné hormony gibbereliny a součást chlorofylu – fytol. Ke známým přírodním tetraterpenům (8 izopren. jednotek) patří karotenoidy (karoteny, lutein, xantofyl) a některá další lipofilní rostlinná barviva jako je chlorofyl. Z polyterpenů je nejznámější kaučuk (mléčná šťáva z kaučukovníku brazilského – tzv. latex) a gutaperča (zaschlá mléčná šťáva ze stromu perčovníku pravého). Není bez zajímavosti, že na rozdíl od kaučuku, který má *cis* konformaci izoprenoidních jednotek (*cis*-1,4-polyizopren), je gutaperča *trans* izomerem, což se navenek projevuje její menší elasticitou ve srovnání s kaučukem. Z pohledu problematiky řešené v této bakalářské práci je potřeba vyzdvihnout skupinu **triterpenů**, tj. látek vzniklých kondenzací 6 izoprenových jednotek. Zde řadíme lineární uhlovodík skvalen, který je prekurzorem biosyntézy látek se steroidní kostrou a vzniká z kyseliny mevalonové sérií cyklizačních reakcí. Skvalen je prekurzorem biosyntézy steroidů jak v buňkách živočišných (např. cholesterolu), tak rostlinných včetně brassinosteroidů, fytoekdysteroidů a dalších látek steroidní povahy. Cholesterol je důležitý zejména jako součást buněčných membrán, dále jako prekurzor biosyntézy živočišných i rostlinných hormonů a vitamínu D (u obratlovců D<sub>3</sub>, u rostlin D<sub>2</sub>). O významu a vlastnostech brassinosteroidů a fytoekdysteroidů podrobně pojednávají následující kapitoly.

## II. CÍLE PRÁCE

Cíle této bakalářské práce byly stanoveny takto:

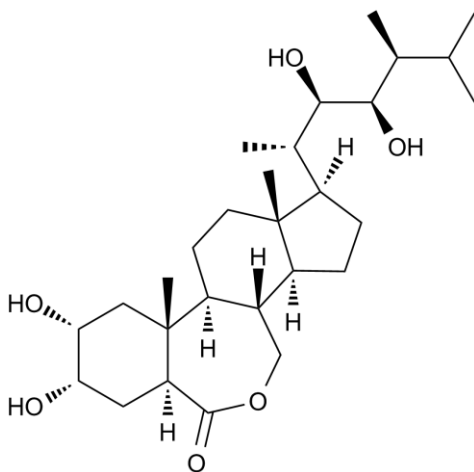
1. vypracovat literární rešerši na téma biosyntézy brassinosteroidů a fytoekdysteroidů a jejich vzájemné interakce v rostlinách
2. pomocí již zavedené metodiky provést kultivaci rostlin řeřichy seté *Lepidium sativum in vitro* za účelem optimalizace navážky tohoto rostlinného druhu pro stanovení obsahu brassinosteroidů a fytoekdysteroidů (studium matričního efektu)
3. provést kultivaci rostlin řeřichy seté *Lepidium sativum in vitro* po dobu 4 dnů s cílem zjistit zda rostlinná pletiva obsahují detekovatelná množství některého z fytoekdysteroidů (analýza pomocí UHPLC-MS/MS)
4. v případě pozitivního výsledku z bodu 3 stanovit jeho/jejich obsah ve 4denních semenáčcích řeřichy seté pěstované na kultivačních médiích obsahujících různé koncentrace vybraného brassinosteroidu
5. provést kultivaci rostlin řeřichy seté *Lepidium sativum in vitro* po dobu 4 dnů za přítomnosti různých koncentrací vybraného fytoekdysteroidu v kultivačním médiu a následně provést kvantifikaci endogenních hladin brassinosteroidů pomocí UHPLC-MS/MS
6. vyhodnotit jednotlivé výsledky, porovnat je s těmi, které byly dosud publikované v odborné literatuře, provést jejich diskuzi a jasně formulovat závěry experimentální práce

### III. TEORETICKÁ A REŠERŠNÍ ČÁST

#### III. 1. BRASSINOSTEROIDY

Brassinosteroidy (BRs) jsou skupinou zhruba 70 přírodních látek steroidní povahy, které jsou strukturně podobné brassinolidu (**Obr. 1**; BL). Přestože se v rostlinném pletivu vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (cca  $10^{-12}$  g/mg), mají pro danou rostlinu celé spektrum významných fyziologických účinků.

BL je prvním objeveným brassinosteroidem a byl izolován z extraktu pylu řepky olejné *Brassica napus* L. sesbíraného včelami (Grove et al. 1979). Bylo zjištěno, že tato látka společně s dalšími svými strukturními analogy objevenými záhy po ní, má jistou biologickou aktivitu ve smyslu vlivu na růst a vývoj rostlin (Maugh 1981) a za tímto účelem byla zavedena řada biotestů (viz kapitola II. 1. 1.). Začátkem 90. let 20. století bylo predikováno, že by látky tohoto typu mohly být použity pro zvýšení výnosu zemědělsky významných plodin (Cutler 1991).

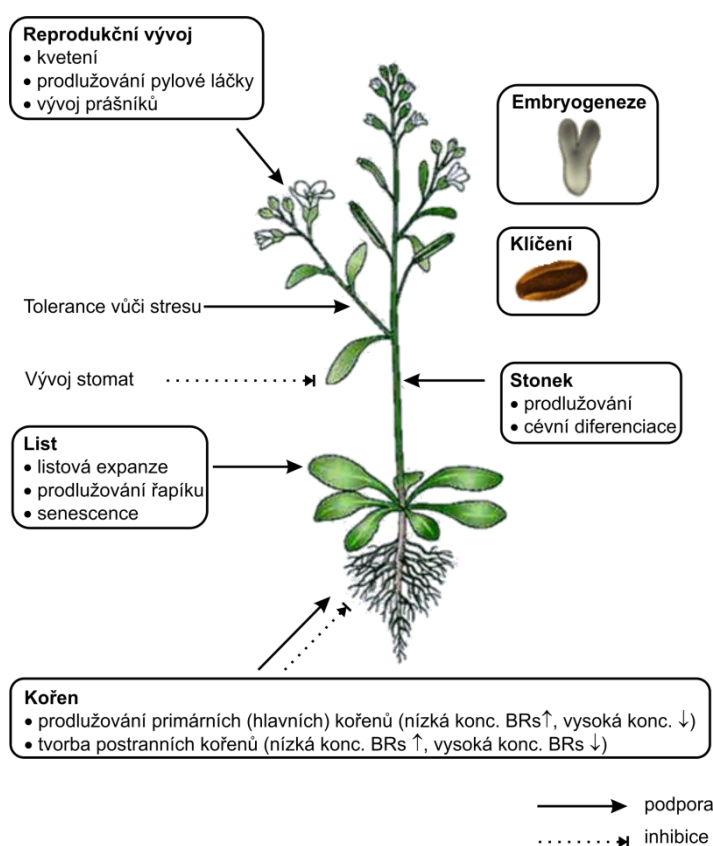


**Obr. 1.** Chemická struktura brassinolidu.

##### III. 1. 1. Fyziologické funkce brassinosteroidů v rostlinách

Brassinosteroidy řadíme mezi rostlinné hormony (fytohormony), a jako takové mají vliv na celou řadu dějů probíhajících v rámci životního cyklu rostliny (**Obr. 2**). Mezi nejvýznamnější účinky BRs patří celkové ovlivnění růstu rostliny, prodlužování a dělení buněk různých druhů jejich pletiv, růst pylové láčky, vliv na biosyntézu etylénu v rostlině, aktivace různých enzymů nebo regulace senescence (Bajguz and Hayat

2009). Další důležitou úlohou BRs v rostlinném organismu je regulace fotosyntézy (Holá 2011). Bylo prokázáno, že exogenní aplikací BRs, především 24-*epi*brassinolidu (*epi*BL), se v testované rostlině zvyšuje výnos fotosyntézy tím, že se zvýší aktivita enzymu RuBisCO (Xia et al. 2009; Yu et al. 2004). Kromě *epi*BL byly studie zaměřené na vliv BRs na fotosyntézu provedeny rovněž s exogenně aplikovaným 28-homobrassinolidem (homoBL) a BL samotným, a to jak v různých koncentracích ( $10^{-4}$  až  $10^{-14}$  M), tak různými způsoby aplikace (na list, namáčení semen, kořenů, listů) a za použití různých rostlinných modelů (nejčastěji okurka, pšenice a brukev). Výsledky jsou velmi různorodé a jsou přehledně shrnuty v Holá 2011.



**Obr. 2.** Schéma fyziologických účinků brassinosteroidů u vyšších rostlin.

Dále bylo zjištěno, že BRs pomáhají rostlině přežít v nepříznivých podmínkách (zvyšují toleranci vůči abiotickému stresu) jako např. při nedostatku vody a živin, při nadbytku solí v půdě, za chladu nebo naopak za zvýšené teploty, popř. v přítomnosti herbicidů (Bajguz a Hayat 2009; Piňol a Simón 2011). Ačkoliv bylo zjištěno, že brassinosteroidy modulovaná zvýšená tolerance rostliny vůči stresu souvisí s regulací metabolismu tzv.

reactive oxygen species (ROS; látkami obsahujícími reaktivní kyslík, např. peroxidy, superoxidy) a se zvýšením antioxidační kapacity díky zvýšenému obsahu kyseliny askorbové, glutationu, karotenoidů, kyseliny abscisové apod., není mechanismus vlivu *epiBL* na fotosyntetický aparát rostlin ještě plně objasněn.

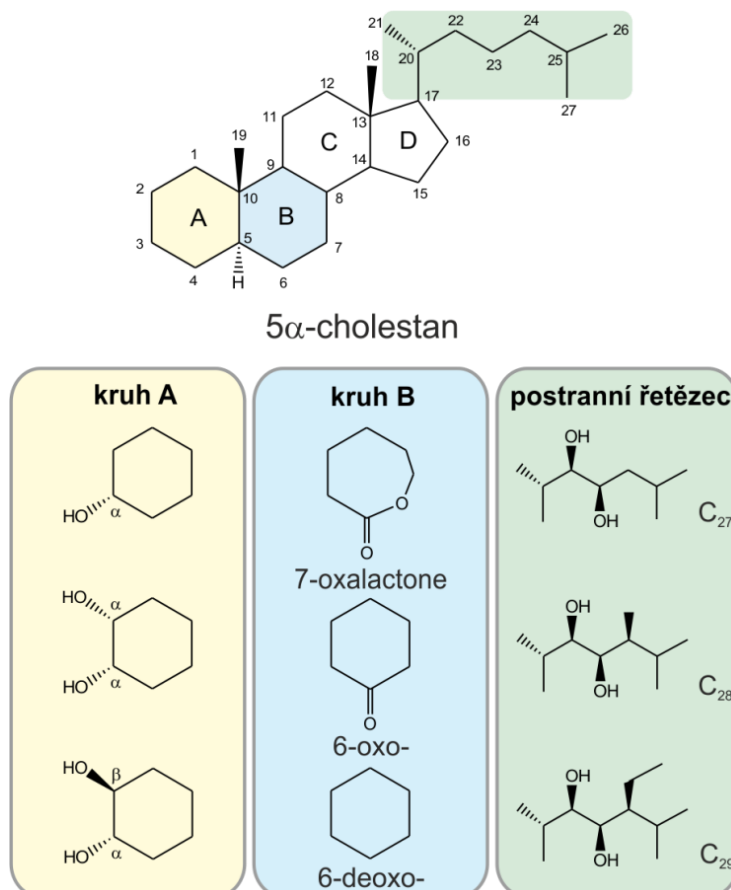
### ***Biotesty***

Pro zjištění biologické aktivity různých látek se používají tzv. biotesty. Na vybranou část experimentální rostliny se ve zvoleném rozpouštědle aplikuje roztok testované látky a po definovaném čase se odečte biologická odezva (tj. např. prodloužení stonku, úhel ohybu apod.). Pro BRs se používá zejména test prodlužování druhého internodia fazolu (Thompson et al. 1981) a test na ohyb jazýčku rýže (Wada et al. 1984). Fytohormon v prvním případě výrazně stimuluje růst i dělení buněk druhého internodia fazolu spolu s dalšími účinky jako je např. ohýbání, nepravidelné ztlušťování a štěpení internodia (Pavlová a Fischer 2011). Ve druhém případě je sledován úhel odklonu mezi čepelí a pochvou listu. Test byl nejdříve zaveden v roce 1965 pro auxiny (kyselina indolyl-3-octová), ale ukázalo se, že pro brassinosteroidy je mnohem citlivější. Ze všech známých BRs má brassinolid podle dosud provedených výzkumů nejvyšší aktivitu. Obecně můžeme říci, že brassinosteroidy s 6,7-laktonovou funkční skupinou (např. BL, struktura viz Obr. 3 v kapitole III. 1. 2.) vykazují vyšší biologickou aktivitu než 6-keto steroidy a BRs bez oxo-skupiny na B-kruhu (Müssig et al. 1999). Z uvedeného vyplývá, že struktura BRs má významný vliv na jejich biologickou aktivitu (Mandava et al. 1988). Principiálně existují základní 3 strukturní podmínky pro zachování biologické aktivity BRs:

1. přítomnost *cis*-vicinálních hydroxy skupin na uhlíku 2 a 3 – absence kterékoli OH skupiny nebo změna její konfigurace vede k okamžité ztrátě aktivity BRs
2. 7-členný kruh B – mírné modifikace kruhu B aktivitu BRs významně snižují, ale nevedou k její úplné ztrátě jak uvedeno výše
3. vedlejší řetězec s OH skupinou na uhlíku C-22 a C-23 -  $\alpha$ -orientace na C-22 a C-23 zaručuje vyšší biologickou aktivitu BRs než odpovídající  $\beta$ -orientace. Hydroxylace v poloze C-22 je sama o sobě důležitá pro biologickou aktivitu (např. 6-oxokampestanol nemá skoro žádnou aktivitu, zatímco jeho C-22 hydroxylovaný biosyntetický produkt katasteron (CT) už je do určité míry bioaktivní – Fujioka et al. 1995).

### III. 1. 2. Chemické a fyzikální vlastnosti BRs

Z chemického hlediska jsou BRs polyhydroxylované triterpenoidy. Základ jejich molekuly tvoří steroidní skelet  $5\alpha$ -cholestan (**Obr. 3**), na který se váží různé další substituenty a tvoří tak rozličné deriváty.

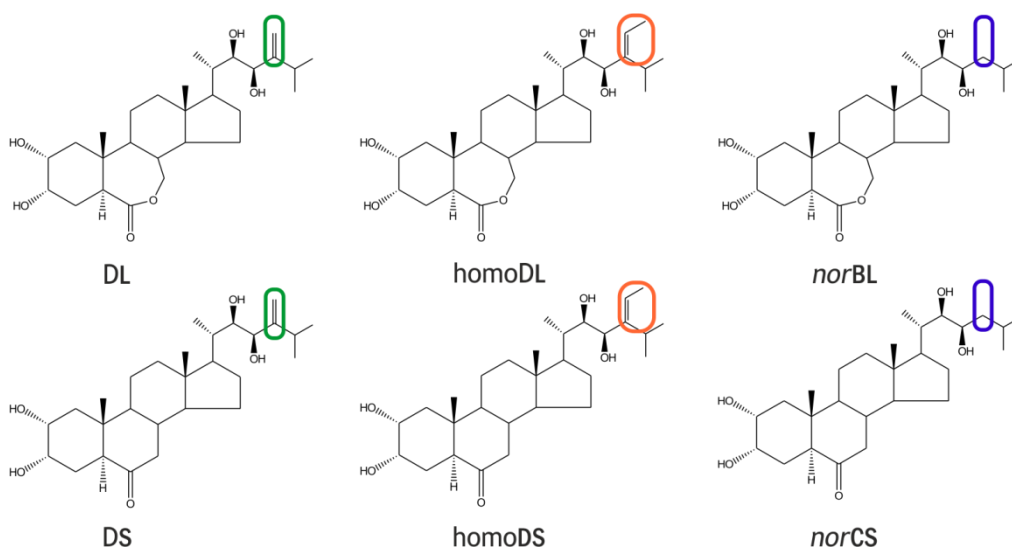


**Obr. 3.** Struktura  $5\alpha$ -cholestanu a různých substituentů na kruhu A a B a na vedlejším řetězci přirozeně se vyskytujících brassinosteroidů (převzato z Tarkowská et al. 2016).

Modifikace  $5\alpha$ -cholestanu jsou výsledkem oxidačních a redukčních reakcí odehrávajících se během biosyntézy BRs v rostlinách (Bajguz 2011). Všechny více než 70 dosud identifikovaných BRs lze rozdělit na BRs volné a BRs konjugované (s glukózou a mastnými kyselinami myristovou a laurovou). Společným strukturálním znakem všech BRs je  $\beta$ -orientace metylových skupin na C-18 a C-19, dále  $\alpha$ -orientace na C-5 (spojení kruhů A a B) a  $\alpha$ -orientace na C-22 a C-23 (vedlejší řetězec).

Na základě délky alkylových substituentů na postranním řetězci v poloze C-24 může být sloučenina klasifikována jako  $C_{27}$ ,  $C_{28}$  nebo  $C_{29}$  (Rao et al. 2002), přičemž v přírodě

jsou nejvíce rozšířené C<sub>28</sub> BRs mezi něž patří rovněž BL s CH<sub>3</sub> skupinou na C-24 (Bajguz 2011). Dolicholid (DL) a dolichosteron (DS) nesou na C-24 skupinu =CH<sub>2</sub> a homodolicholid (homoDL) a homodolichosteron (homoDS) skupinu =CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> (**Obr. 4**). Existují rovněž přirozeně se vyskytující BRs, které na C-24 substituent nemají žádný. Jde např. o 28-norbrassinolid (*norBL*) a 28-norcastasteron (*norCS*) – **Obr. 4**. Základní kostru molekuly BRs tvoří 4 kruhy označené A až D, a postranní řetězec umístěný na C<sub>17</sub>, který je shodný s řetězcem cholesterolu, významného sterolu jak v živočišné, tak i v rostlinné říši.

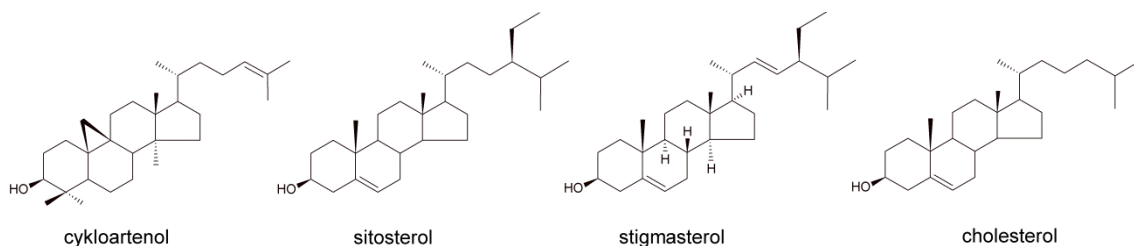


**Obr. 4.** Chemické struktury brassinosteroidů s odlišnými substituenty na C-24. Skupiny =CH<sub>2</sub> označeny zeleným rámečkem, skupiny =CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> oranžovým a chybějící substituenty na C-24 vyznačeny modrým rámečkem.

BRs jsou silně hydrofobní (lipofilní) látky neiontové povahy, což vede k potřebě použití silně hydrofobních organických rozpouštědel k jejich extrakci z rostlinného materiálu a jejich hydrofobicita společně s neiontovým charakterem má rovněž vliv na volbu metod pro jejich izolaci a následnou analýzu pomocí instrumentálních analytických metod (Tarkovská et al. 2016). Struktura BRs neobsahuje žádný chromofor, který by umožňoval absorpci světla z oblasti vlnových délek 200-800 nm (UV VIS).

### III. 1. 3. Biosyntéza brassinosteroidů

Na základě zjištění, že brassinosteroidy (BRs) jsou důležitou součástí regulace životního cyklu rostlin, byla vyvinuta snaha o co nejpřesnější popsání biosyntézy těchto rostlinných sterolů. Pomocí různých biotestů (viz výše) bylo dokázáno, že biologicky nejaktivnějším brassinosteroidem je BL, který hraje významnou roli u mnoha specifických vývojových procesů v rostlině. Z toho důvodu bylo nejdůležitější objasnit biosyntetickou dráhu vedoucí k produkci právě tohoto BR. K tomuto účelu byly vybrány buněčné kultury barvínku růžového (*Catharanthus roseus*) produkující zástupce C<sub>28</sub> BRs jako je právě BL, a dále například CS, tyfasterol (TY), teasteron (TE) a CT (Suzuki et al. 1995). Výhodou tohoto experimentálního modelu bylo, že hladiny těchto BRs v buněčných kulturách *C. roseus* jsou zvýšené a velmi blízké hladinám BRs detekovaných obvykle v pylu a semenech rostlin, tj. v orgánech a pletivech rostlin zodpovědných za její reprodukci. Bylo zjištěno, že biosyntéza BRs zahrnuje tvorbu základních sterolů z kyseliny mevalonové přes skvalen (C<sub>30</sub>; struktura viz níže Obr. 9) na cycloartenol (pro rostliny specifický C<sub>30</sub> sterol odvozený od skvalenu - **Obr. 5**).



**Obr. 5.** Strukturní vzorce cykloartenolu, sitosterolu, stigmasterolu a cholesterolu.

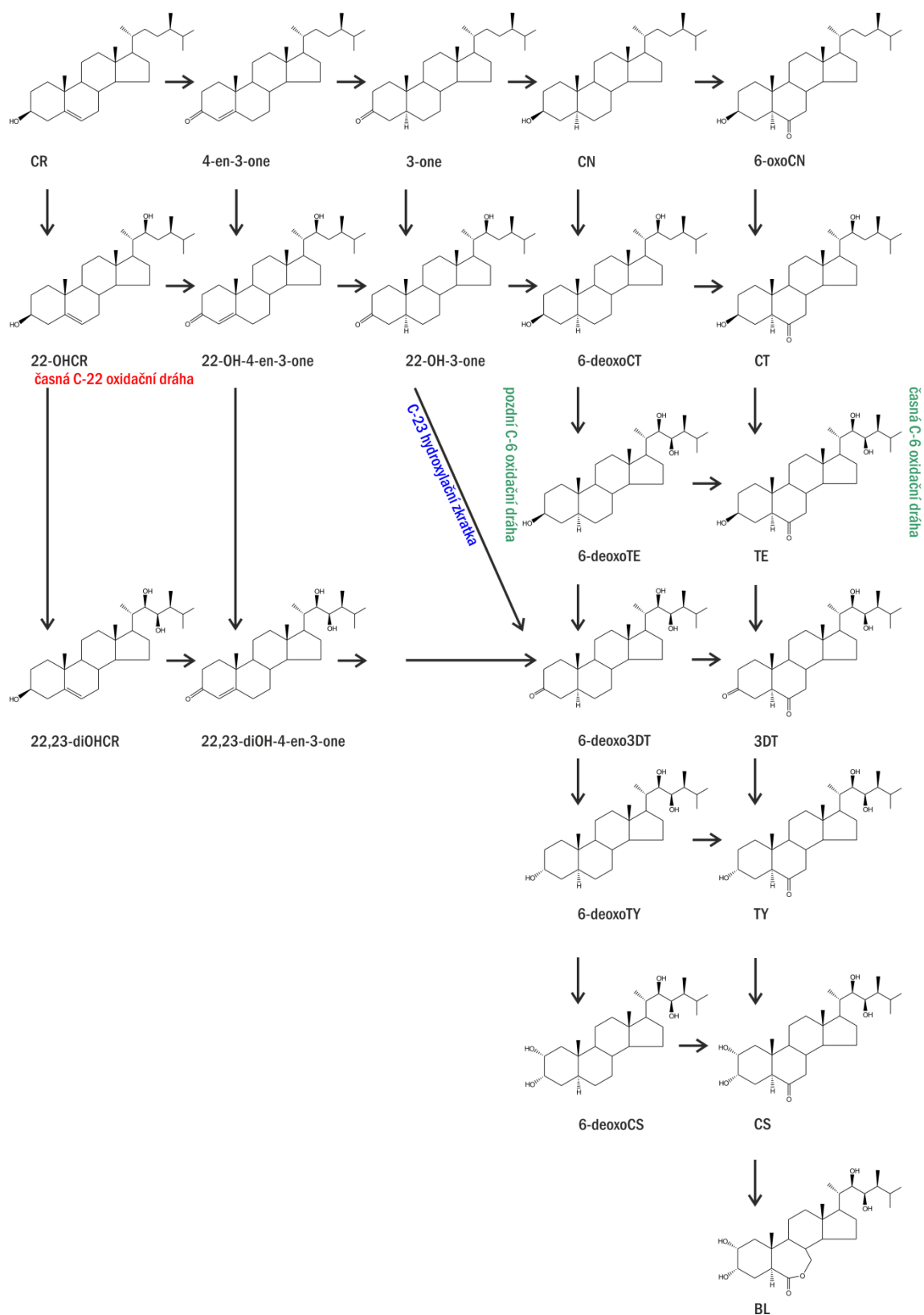
Na rozdíl od živočichů jsou rostlinné steroly metylovány jednou nebo dvakrát za vzniku směsi sterolů obsahující sitosterol (C<sub>29</sub>), stigmasterol ( $\Delta^{22}$  sitosterol), kampesterol (CR; C<sub>28</sub>) a cholesterol (C<sub>27</sub>; Fujioka a Yokota 2003). Zatímco sitosterol a cholesterol jsou prekurzory C<sub>27</sub> a C<sub>29</sub> BRs, CR je prekurzorem C<sub>28</sub> BRs (viz Obr. 3 výše). CR je následně ve dvou krocích oxidován na kampestanol (CN). Tento biosyntetický meziprodukt BRs se dále může přeměňovat až na CS dvěma cestami, a to buď tzv. *časnou C6 oxidací* nebo tzv. *pozdní C6 oxidací* (Fujioka a Sakurai 1997). Časná C6 oxidační dráha (**Obr. 6**) zahrnuje oxidaci CN v poloze C-6 za vzniku 6-oxoCN, který dále podléhá oxidaci na C-22 vedoucí ke CT. Další reakční kroky zahrnují oxidaci CT v poloze C-23 za vzniku TE (OH skupina na uhlíku 3 v  $\beta$ -orientaci), jenž je s jedním



mezikrokem epimerován v poloze C-3 na TY (OH skupina na C-3 v  $\alpha$ -orientaci; Abe et al. 1994). Oxidací v poloze C-2 následně z TY vzniká CS jako poslední krok časně C6 oxidační biosyntetické dráhy BRs. Není bez zajímavosti, že biologická aktivita biosyntetických prekurzorů vzrůstá v pořadí jejich tvorby v této dráze (CT < TE < TY < CS) - Fujioka et al. 1995.

Pozdní C6 oxidační dráze (**Obr. 6**) nebyla zpočátku věnována velká pozornost, protože 6-deoxo BRs vykazují nejmenší biologickou aktivitu ze všech BRs (biotest na ohyb jazýčku rýže; Fujioka et al. 1995). Brzy bylo ale zjištěno, že tato dráha probíhá v mnoha rostlinných druzích (Yokota et al. 1994; Abe et al. 1995; Griffiths et al. 1995; Spengler et al. 1995) a do té doby známá biosyntetická dráha zahrnující pouze na časnou C6 oxidaci musela být reevaluována. Pomocí osvědčeného modelu s buněčnými kulturami *C. roseus* byl identifikován 6-deoxoTE, 6-deoxoTY a 6-deoxoCS (Choi et al. 1996, 1997). Za použití experimentů s deuteriem značenými prekurzory bylo zjištěno, že 6-deoxoTE se přeměňuje na 6-deoxoTY a podobně 6-deoxo-3-dehydroTE (6-deoxo3DT) dává vznik 6-deoxoTY. Nakonec byla celá pozdní C6 oxidační dráha popsána tak, že začíná přeměnou CN na 6-deoxoCT (oxidace na C-22) následovanou oxidací na C-23 za vzniku 6-deoxoTE. Ten je s mezikrokem zahrnujícím oxidaci na C-3 (6-deoxo3DT) epimerován na 6-deoxoTY (Choi et al. 1997) podobně jako je TE epimerován na TY v časně C6 oxidační dráze (viz výše). Oxidací v poloze C-2 dochází ke vzniku 6-deoxoCS, jehož další oxidací v poloze C-6 vzniká CS (Choi et al. 1996).

V posledním kroku biosyntézy BRs je pak CS s šestičlenným kruhem B, vyprodukovaný ať už časnou nebo pozdní C6 oxidační drahou, oxidován na koncový produkt BL obsahující sedmičlenný kruh B (Abe et al. 1996; Choi et al. 1996). Na základě provedených výzkumů bylo později prokázáno, že časná i pozdní C6 oxidace spolu v rostlinné říši běžně koexistují (Fujioka et al. 1996; Fujioka a Sakurai 1997). U některých rostlin může být nicméně jedna z těchto drah převládající. Například u rajčete nebo tabáku se ukázalo, že pozdní C6 oxidace je dominantní drahou biosyntézy, neboť v těchto rostlinách byly nalezeny pouze produkty pozdní C6 oxidační dráhy (Bishop et al. 1999; Koka et al. 2000; Yokota et al. 2001).

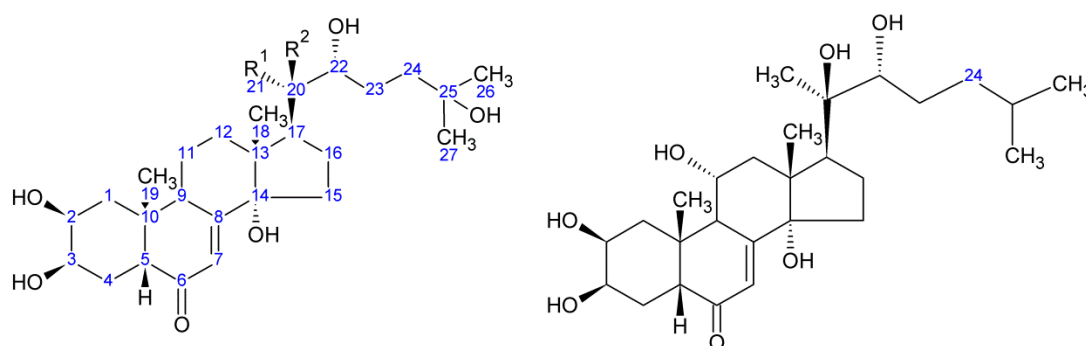


**Obr. 6.** Schéma biosyntézy brassinosteroidů v rostlinách. Převzato a upraveno z Tarkowská et al. 2016. 3DT – 3-dehydroteasteron; 6-deoxo3DT – 6-deoxo-3-dehydroteasteron.

Významnou úlohu v objasnění biosyntézy a funkce BRs sehráli rovněž tzv. brassinosteroidní biosyntetiční mutanti (BRs mutanti). Spousta genů kódujících enzymy potřebné k biosyntéze BRs byla naklonována pomocí BRs mutantů *Arabidopsis*, hrachu, rajčete a rýže (Fujioka a Yokota 2003). Jedná se o rostliny s narušenou biosyntézou BRs, proto tyto mutanty označujeme jako BRs deficientní. Mezi základní fenotypové rozlišovací znaky těchto rostlin patří malé kulaté tmavě zelené listy, zakrslý vzrůst, omezená fertilita až sterilita. Malý vzrůst rostliny je způsobený potlačením buněčné expanze a proliferace v důsledku nedostatku BRs. Tyto rostliny mají sníženou klíčivost semen, vykazují výrazně delší vývoj a různou míru de-etiolizace. Při růstu na světle jsou tyto mutanti malého vzrůstu, se zkroucenými listy, mají redukovanou apikální dominanci, redukovanou fertilitu a zpožděnou senescenci. Tyto vývojové defekty mohou být kompenzovány exogenním přídatkem BRs. BRs deficitní mutanti hrachu jsou zakrslí, ale na rozdíl od mutantů *Arabidopsis thaliana*, nemají zakroucené listy ani tmavě zelený fenotyp. BRs deficitní mutanti rajčete jsou při růstu ve tmě malého vzrůstu, ale mají uzavřené děložní lístky, zatímco při růstu na světle jsou menšího vzrůstu, mají redukované axilární větvení stonku a abnormálně pozměněnou morfologii listů. BRs deficitní mutanti rýže jsou de-etiolovaného fenotypu s omezeným růstem mezokotylu a internodií společně s aberantní morfologií listů (popsanou výše). Fenotyp BRs deficitních mutantů se může lišit v závislosti na druhu rostliny (Fujioka a Yokota 2003). BRs mutanti byli objeveni pouze u velmi mála rostlinných druhů, k výzkumu nám mohou podobně sloužit i inhibitory biosyntézy BRs (struktury nejsou uvedeny). Triazoly, jako je například uniconazol a paclobutrazol, jsou známými inhibitory biosyntézy giberelinů (skupina fytohormonů povahy diterpenoidních karboxylových kyselin). Nicméně uniconazol nepůsobí inhibičně specificky u giberelinů, ale zabraňuje také biosyntéze BRs v buňkách ostálky (*Zinnia*) – Iwasaki a Shibaoka 1991. Modifikací uniconazolu byl syntetizován brassinazol, účinnější inhibitor biosyntézy BRs. Semena *Arabidopsis* po treatmentu brassinazolem vykazovaly fenotyp typický pro BRs deficitní mutanty (Nagata et al. 2000). Stejný efekt byl pozorován u semen řechy, rajčete, hrachu a tabáku. Brassinazol se váže na C-22  $\alpha$ -hydroxylázu (DWF4), kde blokuje hydroxylaci na C-22 $\alpha$  a zamezuje tím vzniku BRs z CN a 6-oxoCN (Asami et al. 2000). Později byly syntetizovány rovněž další, specifičtější inhibitory biosyntézy BRs, které mohou mít potenciální využití jako komerčně dostupné regulátory růstu rostlin (Fujioka a Yokota 2003).

### III. 2. ROSTLINNÉ EKDYSTEROIDY (FYTOEKDYSTEROIDY)

Ekdysteroidy (ECs) jsou látky steroidní povahy, které byly původně objeveny v tělech hmyzu (Butenandt a Karlson 1954), kde plní funkci hormonů regulujících jeho metamorfózu (ekdyzi) – Dinan 2001. Sloučeniny ekdysteroidní povahy byly ale později objeveny také v rostlinné říši v pletivech nižších i vyšších suchozemských rostlin a začaly být označovány jako fytoekdysteroidy (PEs) pro jejich odlišení od ekdysteroidů izolovaných z živočišných zdrojů. Některé ekdysteroidy se ale mohou vyskytovat jak u hmyzu, tak i u rostlin (např. ekdyson, 20-hydroxyekdyson nebo ajugasteron C; **Obr. 7**) – Tarkowská a Strnad 2016.



**ekdyson (E)**,  $R^1 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$

**20-hydroxyekdyson (20E)**,  $R^1 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{OH}$

**ajugasteron C (ajuC)**

**Obr. 7.** Struktura některých ekdysteroidů s vyznačením číslování atomů.

Fytoekdysteroidy byly nalezeny u 5-6 % testovaných suchozemských rostlin, v některých případech dokonce ve velmi vysokých koncentracích (Imai et al. 1969).

V dnešní době už známe zhruba 300 látek ekdysteroidní povahy, které byly detekovány ve více než 100 druzích suchozemských rostlin, přičemž nejrozšířenějším stále zůstává 20-hydroxyekdyson (20E; Lafont et al. 2002). Bylo zjištěno, že množství (koncentrace) a distribuce PEs v těle rostliny závisí na jejím druhu, ale zároveň i na jejím stáří. Dinan et al. 2009 např. zjistili, že v rostlině špenátu dochází k biosyntéze PEs především ve starších listech, ty jsou následně transportovány do mladších listů, kde se nejsou schopny samy syntetizovat. Pomocí molekulárně-biologických metod bylo dále nalezeno, že většina testovaných rostlin obsahuje geny, kódující enzymy potřebné k biosyntéze fytoekdysteroidů, ale tyto geny bývají často potlačeny nebo blokovány (Dinan et al. 2009).

### III. 2. 1. Fyziologické funkce fytoekdysteroidů v rostlinách

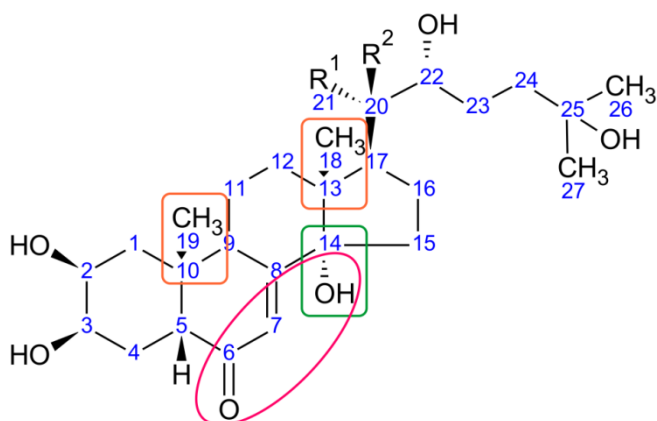
Funkce PEs stále ještě není plně objasněna a je předmětem probíhajících výzkumů. Vzhledem k tomu, že výskyt PEs v rostlinách není univerzální, jejich koncentrace v PEs-pozitivních rostlinách je vždy mnohem vyšší než hladiny fytohormonů a nebyl dosud objeven jejich případný receptor, předpokládá se, že v rostlinách neplní PEs funkci hormonu. To potvrzují i výsledky některých biotestů (Macháčková et al. 1995). Většina vědecké komunity se přiklání k názoru, že PEs mohou rostliny používat jako alelochemikálie (látky uvolňované rostlinou do půdy a ovlivňující růst a vývoj okolních organismů) a jako obranu proti herbivornímu hmyzu (po požití rostliny způsobují u hmyzu endokrinní disrupci až smrt) – Soriano et al. 2004. Na základě sledování vzájemné interakce PEs s ostatními fytohormony přítomnými v rostlinách (Macháčková et al. 1995) se dále zdá, že PEs mohou vytvářet pro rostlinu výhodnější růstové podmínky, ale neúčastní se přímé regulace rostlinného růstu. Ačkoli tedy fytoekdysteroidy nemůžeme řadit mezi rostlinné hormony, podílí se ale přesto na několika významných fyziologických pochodech v rostlinách a bývají v některých literárních zdrojích označovány jako sekundární metabolity rostlin, neboť jsou syntetizovány z produktů primárního metabolismu a plní hlavně ekologické funkce (ochrana proti predátorům, mezidruhová kompetice apod.).

U PEs-pozitivních rostlin byla jejich největší koncentrace nalezena v mladých listech a reprodukčních orgánech rostlin (květy, semena, prašníky), menší pak ve stonku a v kořenech (Dinan et al. 2001). Z tohoto zjištění bychom mohli odvodit, že nejvyšší koncentrace PEs se vyskytují v částech rostliny, které jsou nezbytné pro její přežití, rozmnožení a zachování důležitých znaků pro potomstvo. V souladu s tímto je tedy výše zmíněná teorie, že PEs mají v rostlině nejspíše funkci obrannou.

Bylo zjištěno, že fytoekdysteroidy (konkrétně 20E) přidané exogenně rostlině v nízkých koncentracích ovlivňují fotosyntézu v jejich pletivech, podobně jako brassinosteroidy (viz kapitola II. 1. 1.), ale nejspíše jiným mechanismem. Je pravděpodobné, že při tomto fyziologickém procesu si spolu tyto dvě skupiny steroidních látek nějakým způsobem konkurují (Rothová et al. 2014).

### III. 2. 2. Chemické a fyzikální vlastnosti fytoekdysteroidů

Strukturální vzorce fytoekdysteroidů (Obr. 7, 8) jsou odvozeny biosynteticky od cholesterolu, případně od latosterolu ( $5\alpha$ -cholest-7-en- $3\beta$ -olu) – Obr. 9.

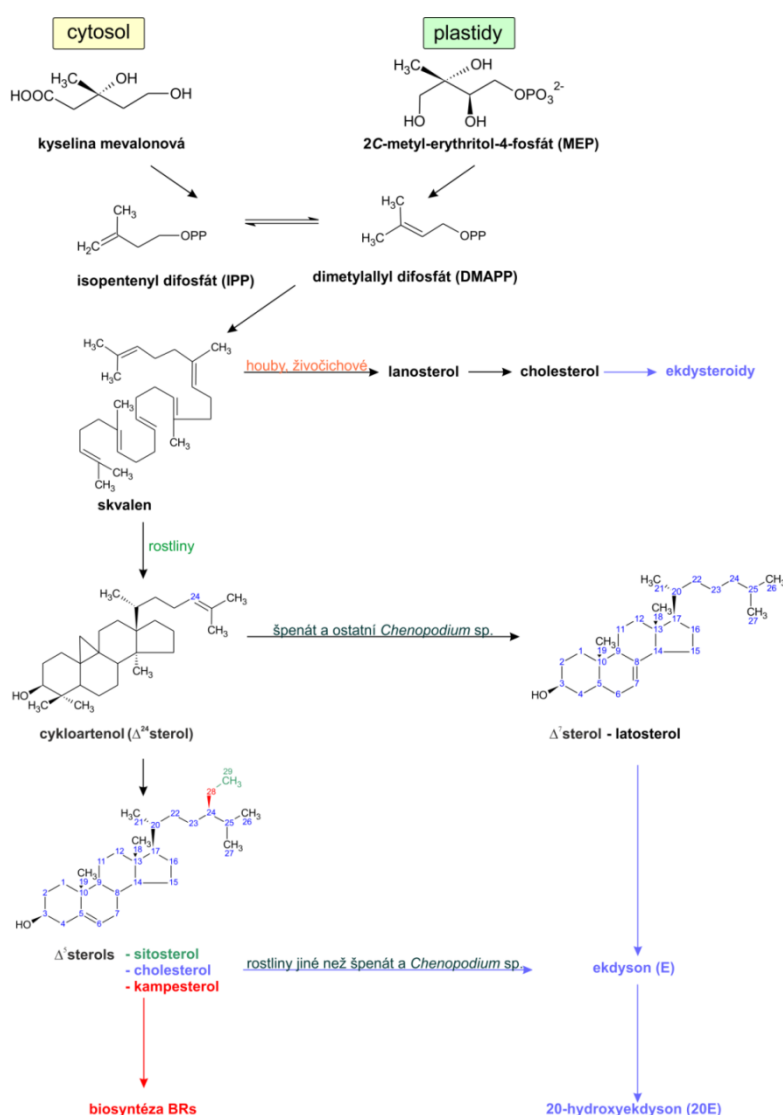


**Obr. 8.** Struktura typického ekdysteroidu (20E) s barevným vyznačením společných strukturálních znaků. OH skupina na C-14 je vyznačena zeleným rámečkem, CH<sub>3</sub> skupiny na C-10 a C-13 oranžovým rámečkem a  $14\alpha$ -hydroxy-7-en-6-on chromofor červeným oválem.

Základní kostru molekuly tvoří typicky 4 kruhy cholest-7-en-6-onu, což je struktura o 27 atomech uhlíků (C<sub>27</sub>) – Obr. 8. Některé PEs jsou ale odvozeny od jiných rostlinných sterolů (fytosterolů) a obsahují 28 (C<sub>28</sub>) nebo 29 uhlíků (C<sub>29</sub>) s alkylovým řetězcem v poloze C-24. Všechny přirozeně se vyskytující PEs mají  $\beta$ -konfiguraci metylových skupin na C-10 a C-13 (oranžový rámeček v Obr. 8; Dinan 2001). Spojení kruhů B/C a C/D má vždy orientaci *trans* zatímco spojení kruhů A/B je obvykle *cis* ( $5\beta$ -H) a jen zřídka *trans* ( $5\alpha$ -H). Většina PEs obsahuje hydroxylovou skupinu v pozici  $14\alpha$ . Chromofor  $14\alpha$ -hydroxy-7-en-6-on poskytuje charakteristickou absorpci PEs s  $\lambda_{\max}$  při 242 nm (v metanolu). Tímto fyzikálně-chemickým znakem se PEs významně liší od BRs, které nemají žádný chromofor a v UV VIS oblasti tudíž vůbec neabsorbují (viz kapitola III. 1. 2.).

### III. 2. 3. Biosyntéza fytoekdysteroidů

Ačkoli bylo vynaloženo mnoho úsilí na studie zaměřené na popis biosyntetické dráhy pro vznik ekdysteroidů u hmyzu, poznatky týkající se jejich biosyntézy v rostlinách jsou mnohem skromnější. Zatím nevíme, zda k tvorbě PEs dochází pouze ve specializovaných buňkách nebo ve všech buňkách dané rostliny. Doposud byl purifikován pouze jediný enzym účastnící se biosyntézy PEs, a to ekdyson 20-monooxygenasa, která katalyzuje oxidaci ekdysonu na 20-hydroxyekdyson (**Obr. 8**; Grebenok et al. 1996; Canals et al. 2005).



**Obr. 9.** Zjednodušené schéma biosyntézy PEs zahrnující vztah k jiným rostlinným sterolům včetně brassinosteroidů. Převzato a upraveno z Tarkowská a Strnad 2016.

### III. 3. INTERAKCE BRASSINOSTEROIDŮ A FYTOEKDYSTEROIDŮ V ROSTLINÁCH

Zdánlivá strukturní podobnost fytoekdysteroidů a brassinosteroidů se ovšem neprojevuje jejich obdobnou biologickou aktivitou. Např. u hmyzu bylo prokázáno, že BRs zde působí jako slabí ekdysteroidní antagonisté (Dinan a Hormann 2005). Chemicky obě tyto skupiny triterpenoidních látek patří mezi C<sub>27</sub> až C<sub>29</sub> polyhydroxysteroidy s oxygenovaným B-kruhem. Nicméně B-kruh v BRs často nese karbonylovou skupinu na C-6 a může být rozšířen do formy laktonu (v brassinolidu a jeho analogích), zatímco ECs jsou charakteristické 14 $\alpha$ -hydroxy-7-en-6-on skupinou. Hydroxylové skupiny na C-2, C-3 a C-22 se vyskytují u obou skupin steroidů, ale mohou se lišit svou orientací a umístěním dalších hydroxylů na řetězci. Dalším rozdílem je, že spojení A a B kruhů je v *cis*-orientaci v základní struktuře ECs, zatímco u BRs jsou kruhy spojeny v *trans*-konfiguraci.

Na základě výše uvedených strukturních rozdílů obou skupin steroidních látek nejsou BR receptory schopny rozpoznat ECs a naopak EC receptory nejsou schopny rozpoznat BRs. Rostlinné BRs a hmyzí EC receptory vykazují vysokou specifitu, čímž se vysvětluje, proč PEs nenarušují BR signální dráhy v rostlinách, kde tyto dvě skupiny látek koexistují. Bylo dokázáno, že ECs vykazují jen velmi slabou nebo žádnou aktivitu v BR-citlivých rostlinných biotestech (Dreier a Towers 1988; Macháčková et al. 1995). Velmi podobně také BRs neinterferují s EC signálními drahami u hmyzu (v případě, že ano, pak by i velmi nízké koncentrace endogenních BRs ovlivnily život hmyzích býložravců (Tarkowská a Strnad 2016).

Některé PEs (zejména 20E) mohou ovlivnit různé procesy spojené s fotosyntézou, podobně jako některé BRs (přínejmenším *epiBL*). Například v rostlině hrachu exogenní *epiBL* vyvolává změny v termodynamických parametrech fotosyntetických membrán, reorganizaci hlavních pigmento-proteinových komplexů a částečné neskládání se thylakoidních membrán na sebe do thylakoidního disku (Dobrikova et al. 2014). Citovaní autoři tvrdí, že BR-indukované změny ve fotosyntetických membránách jsou pravděpodobně zahrnuty ve stresové toleranci rostlin. *epiBL* může také navýšit fotosyntetické výnosy už při koncentracích nižších než by byly koncentrace PEs potřebné k témuž ovlivnění aktivity RuBisCO (Rothová et al. 2014). Bylo zjištěno, že exogenně aplikovaný *epiBL* navíc indukuje změny v obsahu EC v témže rostlinném pletivu (špenát setý) a tyto změny lze detekovat už několik hodin od aplikace BRs (Kamlar et al. 2015). Výsledky ukazují, že pozitivní/negativní charakter odezvy obsahu



ECs závisí na koncentraci aplikovaného BRs a vývojové fázi ošetřených listů rostliny. V kontrolních rostlinách mají mladé listy cca 7krát vyšší obsah hlavních ECs než starší listy. Ošetření *epiBL* o koncentraci  $10^{-6}$  M vedlo k redukci obsahu endogenního 20E v mladých i starých listech, zatímco *epiBL* o koncentraci  $10^{-8}$  M způsobil navýšení hladin 20E. Toto navýšení bylo u starších listů významně menší v porovnání s listy mladými.

## IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### IV. 1. POMŮCKY A CHEMIKÁLIE

#### IV. 1. 1. Pomůcky

- Automatické pipety a plastové špičky Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Plastové mikrozkuhavky Eppendorf (2 ml)
- Skleněné zkuhavky z borosilikátového skla 12x75 mm (FisherBrand, USA)
- Stojan na mikrozkuhavky
- Pinzeta
- Skleněná tyčinka
- Odměrný válec (100 ml)
- Odměrný válec (250 ml)
- 2x Erlenmeyerova baňka (1000 ml)
- 2x kádinka (800 ml)
- Kádinka (50 ml)
- Milimetrový papír
- Nůžky
- Kultivační desky plastové (120 x 120 x 17 mm, P-LAB)
- Stojan na kultivační desky
- Parafilm
- LC vialky 2 ml, 9 mm ID (Sigma-Aldrich, USA)
- Inserty s kónickým dnem (200  $\mu$ l, Supelco, USA)
- Porcelánová třecí miska s tloučkem
- SPE kolonky:
  - 50 mg Discovery DPA<sup>®</sup>-6S (kat. č. 52624-U, Supelco, USA)
  - 100 mg Isolute<sup>®</sup> C4 (kat. č. 321-0010-A, Biotage, Švédsko)

#### IV. 1. 2. Chemikálie

- 24-*epi*brassinolid (OlChemIm s.r.o., Česká republika)
- 20-hydroxyekdyson (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- Murashige-Skoog sůl včetně vitamínů (Dutchefa Biochemie, Holandsko)
- Agar (Dutchefa Biochemie, Holandsko)

- Sacharosa (Dutchefa Biochemie, Holandsko)
- Acetonitril (Merck KGaA, Německo)
- Metanol (Merck KGaA, Německo)
- Ethanol (PENTA s.r.o., Česká republika)
- Tekutý dusík
- Destilovaná voda

#### **IV. 1. 3. Roztoky**

- 70 % EtOH + 0.1 % Tween
- 95 % EtOH
- 100 % ACN
- 60 % ACN
- Milli-Q H<sub>2</sub>O
- 100 % MeOH
- 10 % MeOH
- směs interních standardů BRs (D<sub>3</sub>-BL, D<sub>3</sub>-*epi*BL, D<sub>3</sub>-CS, D<sub>3</sub>-*epi*CS, D<sub>3</sub>-TY, D<sub>3</sub>-*nor*BL a D<sub>3</sub>-*nor*CS)

#### **IV. 2. ROSTLINNÝ MATERIÁL**

- Semena řechy seté *Lepidium sativum* (Nohel Garden a.s., Česká republika)

#### **IV. 3. PŘÍSTROJE**

- Analytické laboratorní váhy (Sartorius CPA225D (Sartorius Weighing Technology GmbH, Německo)
- pH metr pH 700 (Eutech Instruments, Singapur)
- Magnetické míchadlo (Laboratorní přístroje MM2A, Česká republika)
- Parní sterilizátor (autokláv) (Sanyo, Japonsko)
- Flowbox (Holten, typ HH 1.2, Dánsko)
- Kultivační komora PSI na pracovišti VÚRV, v.v.i. (Photon Systems Instruments spol. s.r.o., Česká republika; ozáření 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

- Centrifuga Beckman Avanti™ 30 (Beckman Coulter, Inc., USA)
- Vakuový koncentrátor Acid Resistant Centrivap (Labconco, USA)
- Ultrazvuková lázeň Transsonic 310 (Elma Schmidbauer GmbH, Německo)
- Infrared Vortex Mixer - WIZARD – přístroj pro míchání vzorků (VELP Scientifica, Itálie)
- Laboratorní kulový mlýnek MM 301 (Retsch GmbH & Co. KG, Německo) a kuličky z ZrO<sub>2</sub> o průměru 2 mm (Next Advance Inc., USA)
- Vakuová komůrka (Supelco, USA), čerpadlo (F. Novotný, Kovovýroba Česká republika)
- Laboratorní rotátor Stuart SB3 (Bibby Scientific Ltd., Anglie)
- Millipore Simplicity 185 – zařízení na přípravu ultračisté vody (Millipore, USA)
- Ultra-účinný kapalinový chromatograf Acquity UPLC™ (Waters, USA)
- Kolona Acquity CSH™ C<sub>18</sub>; 2,1x50 mm, 1,7μm (Waters, Irsko)
- Tandemový hmotnostní spektrometr Xevo® TQ MS (Waters MS Technologies, Anglie)

## IV. 4. POSTUP PRÁCE

### IV. 4. 1. Příprava kultivačního média

Pro přípravu 1 litru média byly připraveny dvě kádinky (à 800 ml), z nichž každá byla naplněna 500 ml deionizované vody. Na analytických vahách bylo jednotlivě naváženo 4.4 g MS soli a 30 g sacharózy a vsypáno společně do jedné z kádinek. Pomocí magnetického míchadla byl vzniklý roztok dobře promíchán a pomocí předem nakalibrovaného pH metru bylo jeho pH upraveno na hodnotu pH 5.6 přidávkem roztoku koncentrovaného KOH.

Ve druhé kádince bylo v 500 ml deionizované vody rozmícháno 5.5 g agaru a pro jeho úplné rozpuštění byl roztok zahříván po dobu cca 8-10 minut v mikrovlnné troubě do chvíle než došlo k jeho úplnému vyčeření, tj. ke vzniku homogenního roztoku.

Roztoky z obou kádinek byly spojeny v jedné z Erlenmeyerových baněk (1000 ml) a promíchány do úplné homogenity pomocí skleněné tyčinky. Následně bylo vzniklé

kultivační médium rozděleno do dvou baněk po cca 500 ml a sterilizováno po dobu 2 h v autoklávu společně s ostatními pomůckami potřebnými k výsevu semen řechy za sterilních podmínek (odměrný válec o objemu 100 a 250 ml, pinzeta).

#### **IV. 4. 2. Sterilizace semen řechy seté**

Při sterilizaci semen je nutno pracovat v laminárním boxu (flowboxu) pro rostlinné tkáňové kultury (horizontální proudění vzduchu). Semena byla nasypána do 2 ml-ové plastové mikrozkušavky typu Eppendorf a následně byl přidán 1 ml sterilizačního roztoku sestávajícího ze 70 % etanolu s obsahem 0.1 % detergentu Tween. Mikrozkušavka byla uzavřena víčkem a její obsah byl protřepáván manuálně po dobu cca 3-4 minut. Poté byl sterilizační roztok ze zkušavky odstraněn automatickou pipetou a byl přidán 1 ml 95 % etanolu. Směs ve zkušavce byla opět velice krátce promíchána (30 s) a tekutina z něj ihned odstraněna pipetou. Sterilní semena byla nakonec vysušena ve flowboxu v otevřené mikrozkušavce v proudu vzduchu přes noc. Semena byla poté buď přímo použita ke sterilnímu výsevu na pevné agarové MS médium (viz kapitola II. 4. 3.) nebo uzavřena, zaizolována parafilmem a uskladněna v lednici při 4°C do doby jejich potřeby.

#### **IV. 4. 3. Příprava kultivačních desek, výsev semen řechy seté za sterilních podmínek**

##### *Příprava média pro kultivaci rostlin s ovlivněním růstu pomocí vybraného fytoekdysteroidu*

Cílem této části experimentu bylo studium vlivu vybraného fytoekdysteroidu (20E) na biosyntézu endogenních brassinosteroidů v semenáčcích řechy seté kultivované na pevném médiu obsahujícím 20E ve finální koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$  a  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l.

Ve flowboxu bylo připraveno 9 sterilních plastových kultivačních desek s tím, že 3 desky byly určeny pro výsev sterilních semen řechy na MS médium o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l, 3 desky pro výsev na médium o koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l a zbývající 3 desky pro médium s 20E o koncentraci  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l.

Kultivační médium s přísadkou 20E o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l bylo připraveno přísadkou 210  $\mu$ l zásobního roztoku 20E v metanolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  M do 210 ml

tekutého sterilního MS média s agarem v odměrném válci. Roztok byl dobře promíchán sterilní skleněnou tyčinkou a pomocí odměrného válce byl v objemu 70 ml nalit na každou ze tří připravených kultivačních desek. Podobným postupem bylo připraveno rovněž kultivační médium obsahující 20E o koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l, tj. ke 210 ml sterilního MS média s agarem bylo přidáno 210  $\mu$ l zásobního roztoku 20E v metanolu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Na každou ze tří kultivačních desek pak bylo nalito 70 ml tohoto média. Analogicky byly připraveny v poslední řadě i 3 desky s kultivačním médiem obsahujícím  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l 20E (přídavek 210  $\mu$ l zásobního roztoku 20E o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v metanolu ke 210 ml sterilního MS média s agarem).

Desky pro kultivaci semenáčků řeřichy seté (otevřené, bez víček) byly ponechány cca 60 minut v zapnutém laminárním boxu, aby bylo dosaženo ztuhnutí agarového média. Poté byly použity k výsevu sterilních semen řeřichy ve flowboxu (viz popis postupu níže), zakryty příslušnými víčky, jejich kraje zaizolovány parafilmem a přemístěny do kultivační místnosti na dobu 4 dnů (kultivační podmínky viz kapitola IV. 4. 4.).

#### ***Příprava média pro kultivaci rostlin s ovlivněním růstu pomocí brassinosteroidu***

Cílem této druhé části experimentu bylo studium ovlivnění biosyntézy endogenních fytoekdysteroidů vybraným zástupcem brassinosteroidů (*epiBL*). Při přípravě kultivačních médií bylo postupováno zcela stejně jako při přípravě agarových médií obsahujících 20E. Ve zkratce: byly připraveny 3 řady kultivačních desek o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$  a  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l *epiBL* (210  $\mu$ l zásobního roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v metanolu do 210 ml sterilního agarového média) v počtu 3 desky pro každou uvedenou koncentraci *epiBL* v médiu.

#### ***Příprava média pro kultivaci kontrolních rostlin***

Příprava kultivačního média s agarem byla provedena tak, že do 210 ml tekutého MS média po sterilizaci bylo ve flowboxu přidáno 210  $\mu$ l 100 % metanolu a 70 ml média tohoto složení bylo pak nadávkováno na každou ze tří připravených kultivačních desek určených pro kultivaci kontrolních rostlin v každé z obou částí experimentu (20E treatment a *epiBL* treatment - viz výše).

### *Výsev semen řeřichy seté na kultivační médium*

Výsev sterilních semen řeřichy seté (viz kapitola IV. 4. 2.) byl proveden pomocí sterilní pinzety, a to umístěním 10 semen řeřichy do dvou řad (**Obr. 10**) na každou z připravených kultivačních desek (viz výše). Jako pomůcka pro rovnoměrný výsev s přesně definovanými rozestupy (1 cm) byl použit milimetrový papír.



**Obr. 10.** Výsev sterilních semen řeřichy seté.

### **IV. 4. 4. Kultivace řeřichy seté a sběr semenáčků**

Plastové kultivační desky s agarovým MS médiem a semeny řeřichy byly umístěny do plastového stojanu (**Obr. 11**) a přeneseny do fytotronu. Podmínky růstu rostlin zde byly nastaveny světelný režim 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Teplota byla udržována za světla na 23°C a za tmy na 18°C. Po 4 dnech kultivace za uvedených podmínek byly semenáčky sklizeny, a to tak, že byly odejmuty z kultivačních desek, vloženy do plastových nádobek typu Falcon o objemu 15 ml, uzavřeny víčkem a prudce zmraženy v Dewarově nádobě s tekutým dusíkem. Takto zmrazený rostlinný materiál byl poté uskladněn v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C do doby dalšího zpracování (extrakce, purifikace, analýza – viz kapitoly IV. 4. 5. a IV. 4. 6.).



**Obr. 11.** Plastové kultivační desky s agarovým MS médiem umístěné ve stojanu.

#### **IV. 4. 5. Příprava a zpracování vzorků rostlinného materiálu**

Rostlinný materiál získaný kultivací za podmínek uvedených v kapitole IV. 4. 3. a IV. 4. 4. byl ve všech případech homogenizován v třecí misce s tekutým dusíkem pomocí tloučku a takto pulverizovaný byl následně vážen v množství potřebném pro danou analýzu (viz níže).

##### ***Příprava vzorků pro studium matričního efektu***

Na analytických vahách bylo s přesností na 2 desetinná místa naváženo 10 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg a 100 mg čerstvé hmoty (FW z *angl.* fresh weight) pletiv rostlin řechy kultivovaných po dobu 4 dnů na kontrolním médiu, tj. bez přídavku *epiBL* nebo 20E (6 technických replikátů pro každou navážku, tj. 6krát 10 mg FW pletiva, 6krát 25 mg FW pletiva, 6krát 50 mg FW pletiva, 6krát 75 mg FW pletiva a nakonec 6krát 100 mg FW pletiva semenáčků). Celkem tedy bylo připraveno 30 vzorků rostlinného pletiva.

Ke každému vzorku byl přidán 1 ml extrakčního činidla (60 % ACN), 50  $\mu$ l směsi interních standardů (IS) brassinosteroidů (BRs) a 2 kuličky z  $ZrO_2$  o průměru 2 mm. Zkumavky byly uzavřeny a jejich obsah homogenizován 3 minuty pomocí kulového mlýnku MM 301. Hrubé extrakty pletiv, které tímto postupem vznikly, byly dále sonifikovány po dobu 5 minut (ultrazvuková lázeň) pro zvýšení účinnosti extrakce studovaných látek z rostlinných pletiv. Vzorky byly následně ponechány přes noc na laboratorním rotátoru pracujícím s frekvencí 17 rpm při 4 °C. Následující den byly



hrubé extrakty pletiv centrifugovány při 20 000 rpm, 4 °C po dobu 10 minut. Supernatanty byly z každého vzorku odebrány pomocí automatické pipety a přečištěny pomocí kolonek pro extrakci na tuhé fázi (SPE) typu Discovery DPA®-6S (50 mg sorbentu/1 ml objemu kartridže) následovně:

1. Aktivace sorbentu 1 ml 100 % ACN
2. Ekvilibrace sorbentu 1 ml 60 % ACN
3. Nanosení vzorku supernatantu 1 ml vzorku při průtoku cca 0.75 ml/min
4. Jímání frakce procházející kolonkou po nanosení supernatantu do čisté borosilikátové zkumavky (steroidy nejsou sorbentem kolonky zadržovány; sorbent zajišťuje pouze retenci rostlinných barviv a fenolů)

Extrakty pletiv přečištěné výše uvedeným způsobem byly odpařeny k suchu pomocí vakuového koncentrátoru. Následující den byla polovina vzorků (tj. 3krát 10 mg FW pletiva, 3krát 25 mg FW pletiva, 3krát 50 mg FW pletiva, 3krát 75 mg FW pletiva a nakonec 3krát 100 mg FW pletiva semenáčků), celkem tedy 15 vzorků rostlinného pletiva připraveno k dalšímu přečištění. Vzorky byly rekonstruovány v objemu 100 µl MeOH, byly sonifikovány po dobu 5 minut v ultrazvukové lázni, byly dále promíchány pomocí vortexu. Po přidání 900 µl Milli-Q H<sub>2</sub>O byly vzorky přečištěny pomocí SPE kolonek typu Isolute® C4 (100 mg sorbentu/1 ml objemu kartridže) následovně:

1. Aktivace sorbentu 1 ml 100 % MeOH
2. Ekvilibrace sorbentu 1 ml 10 % MeOH ředěný v Milli-Q H<sub>2</sub>O
3. Nanosení vzorku supernatantu 1 ml vzorku při průtoku cca 1-2 ml/min
4. Promytí 1 ml 10 % MeOH ředěný v Milli-Q H<sub>2</sub>O
5. Eluce 1 ml 100 % MeOH (do čisté borosilikátové zkumavky)

Extrakty pletiv přečištěné výše uvedeným způsobem byly odpařeny k suchu pomocí vakuového koncentrátoru. Vzniklý odparek vzorku v každé zkumavce byl rekonstruován v objemu 50 µl 100 % MeOH, přefiltrován pomocí centrifugačního filtru a přepipetován do vialky s kónickým insertem odkud byl v objemu 5 µl nastříknut na UHPLC-MS/MS systém za účelem kvantitativní analýzy BRs.

### ***Příprava vzorků pro kvantifikaci brassinosteroidů***

Na analytických vahách bylo s přesností na 2 desetinná místa naváženo 10 mg FW pletiva rostlin kultivovaných po dobu 4 dnů na médiu obsahujícím různé koncentrace 20E (3 technické replikáty pro každou koncentraci 20E, tj. 3krát 10 mg FW pletiva získaného kultivací na médiu s 20E o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l, 3krát 10 mg FW pletiva kultivovaného na  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l 20E a nakonec 3krát 10 mg FW pletiva semenáčků rostoucích na médiu s 20E o koncentraci  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l. Celkem tedy bylo naváženo 9 vzorků pletiv plus 3 technické replikáty kontrolního pletiva (bez přídatku 20E), tj. dohromady zde bylo připraveno 12 vzorků rostlinného pletiva.

Ke každému vzorku byl přidán 1 ml extrakčního činidla (60 % ACN), 50  $\mu$ l směsi interních standardů (IS) brassinosteroidů (BRs) a 2 kuličky z ZrO<sub>2</sub> o průměru 2 mm. Zkumavky byly uzavřeny víčkem a jejich obsah homogenizován 3 minuty pomocí kulového mlýnku MM 301 při frekvenci 27 Hz. Hrubé extrakty pletiv, které tímto postupem vznikly, byly dále sonifikovány po dobu 5 minut (ultrazvuková lázeň) pro zvýšení účinnosti extrakce studovaných látek z rostlinných pletiv. Vzorky byly následně ponechány přes noc na laboratorním rotátoru pracujícím s frekvencí 17 rpm při 4 °C. Následující den byly hrubé extrakty pletiv centrifugovány při 20 000 rpm a 4 °C po dobu 10 minut. Supernatanty byly z každého vzorku odebrány pomocí automatické pipety a přečištěny pomocí SPE kolonek typu Discovery DPA®-6S (50 mg sorbentu/ 1 ml objemu kartridže) následovně:

1. Aktivace sorbentu 1 ml 100 % ACN
2. Ekvilibrace sorbentu 1 ml 60 % ACN
3. Nanesení vzorku supernatantu 1 ml vzorku při průtoku cca 0.75 ml/min
4. Jímání frakce procházející kolonkou po nanesení supernatantu do čisté borosilikátové zkumavky

Extrakty pletiv přečištěné výše uvedeným způsobem byly odpařeny k suchu pomocí vakuového koncentrátoru. Vzniklý odparek vzorku v každé zkumavce byl rekonstruován v objemu 50  $\mu$ l 100 % MeOH, přefiltrován pomocí centrifugačního filtru a přepipetován do vialky s kónickým insertem odkud byl v objemu 5  $\mu$ l nastříknut na UHPLC-MS/MS systém za účelem kvantitativní analýzy BRs.

### ***Příprava vzorků pro kvantifikaci fytoekdysteroidů***

Příprava této sady čítající 12 vzorků byla provedena zcela analogicky jako sada pro kvantifikaci brassinosteroidů., tato sada vzorků byla ale ovlivněná růstem na médiu s přísávkem *epiBL*.

Na analytických vahách bylo s přesností na 2 desetinná místa naváženo 10 mg čerstvé hmoty pletiva rostlin kultivovaných po dobu 4 dnů na médiu obsahujícím různé koncentrace *epiBL* (3 technické replikáty pro každou koncentraci *epiBL*, tj. 3krát 10 mg FW pletiva získaného kultivací na médiu s *epiBL* o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l, 3krát 10 mg FW pletiva kultivovaného na  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l *epiBL* a nakonec 3krát 10 mg FW pletiva semenáčků rostoucích na médiu s *epiBL* o koncentraci  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l. Celkem tedy bylo naváženo 9 vzorků pletiv plus 3 technické replikáty kontrolního pletiva (bez přísávkem *epiBL*), tj. dohromady zde bylo připraveno 12 vzorků rostlinného pletiva.

Ke každému vzorku byl přidán 1 ml extrakčního činidla (80 % MeOH) a 2 kuličky z ZrO<sub>2</sub> o průměru 2 mm. Směs interních standardů PEs nebyla v tomto případě k vzorkům pro svou nedostupnost přidávána (pracovalo se metodou externí kalibrace). Zkumavky byly uzavřeny a jejich obsah homogenizován 3 minuty pomocí kulového mlýnku MM 301 při frekvenci 27 Hz. Následně byly vzorky sonifikovány po dobu 5 minut (ultrazvuková lázeň) a extrahovány přes noc při 4 °C na laboratorním rotátoru pracujícím s frekvencí 17 rpm. Následující den byly hrubé extrakty pletiv centrifugovány při 20 000 rpm, 4 °C po dobu 10 minut. Supernatanty byly z každého vzorku odebrány pomocí automatické pipety a přečištěny pomocí SPE kolonek typu Discovery DPA®-6S (50 mg sorbentu/1 ml objemu kartridže) analogicky jako vzorky pro kvantifikaci brassinosteroidů (viz výše).

Přečištěné extrakty pletiv byly odpařeny k suchu pomocí vakuového koncentrátoru a vzniklý odparek byl v každé zkumavce rekonstruován analogicky jako při přípravě vzorků pro kvantifikaci BRs, tj. v objemu 50 µl 100 % MeOH, přefiltrován pomocí centrifugačního filtru a přepipetován do vialky s kónickým insertem odkud byl v objemu 2 µl nastříknut na UHPLC-MS/MS systém za účelem kvantitativní analýzy PEs.

## **IV. 4. 6. Kvantitativní analýza**

### **IV. 4. 6. 1. Kvantitativní analýza brassinosteroidů**

Kvantitativní analýza byla provedena pomocí UHPLC-MS/MS dle Tarkowská et al. 2016. Stručně shrnuto, pomocí UHPLC bylo separováno 15 BRs za použití kolony Acquity CSH<sup>®</sup> C<sub>18</sub>; 2.1×50 mm, 1.7μm, 100 % ACN jako mobilní fáze A (MF A) a 10 mM kyselina mravenčí jako mobilní fáze B (MF B), přičemž BRs byly z kolony eluovány gradientově při průtoku MF 0.3 ml/min. Před každým měřením byla kolona kondicionována na počáteční podmínky gradientové eluce (35 % A/65 % B) po dobu 30 min. Objem nástřiku standardu a vzorku byl optimalizován na 5 μl. PEs vycházející z UHPLC kolony byly ionizovány v iontovém zdroji pracujícím na principu elektrospreje v pozitivním módu a jejich detekce probíhala v tandemovém hmotnostním spektrometru na bázi trojitého kvadrupólu pracujícího v režimu monitorování rozpadu iontu (MRM).

### **IV. 4. 6. 2. Kvantitativní analýza fytoekdysteroidů**

Kvantitativní analýza PEs byla zaměřena na nejabundantnější přirozeně se vyskytující PEs, a to 20E (Obr. 6). Tato látka byla analyzována pomocí UHPLC (Acquity<sup>™</sup> UPLC) a detekována za použití tandemové hmotnostní spektrometrie (Xevo<sup>®</sup> TQ MS) za použití kolony Acquity CSH<sup>®</sup> C<sub>18</sub>; 2.1×50 mm, 1.7μm, 100 % ACN jako MF A a 10 mM kyselina mravenčí jako MF B. Objem nástřiku standardu a vzorku byl optimalizován na 2 μl. 20E vycházející z UHPLC kolony byl ionizován v iontovém zdroji pracujícím na principu elektrospreje v pozitivním módu a jeho detekce probíhala v tandemovém hmotnostním spektrometru na bázi trojitého kvadrupólu pracujícího v režimu monitorování rozpadu iontu (MRM).

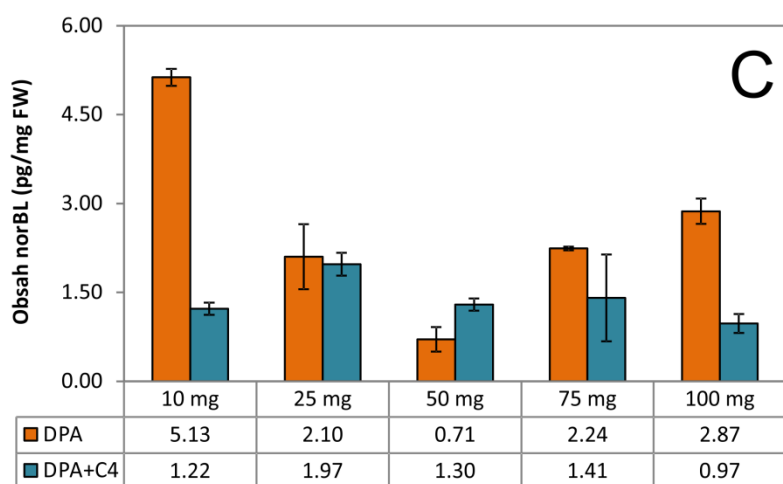
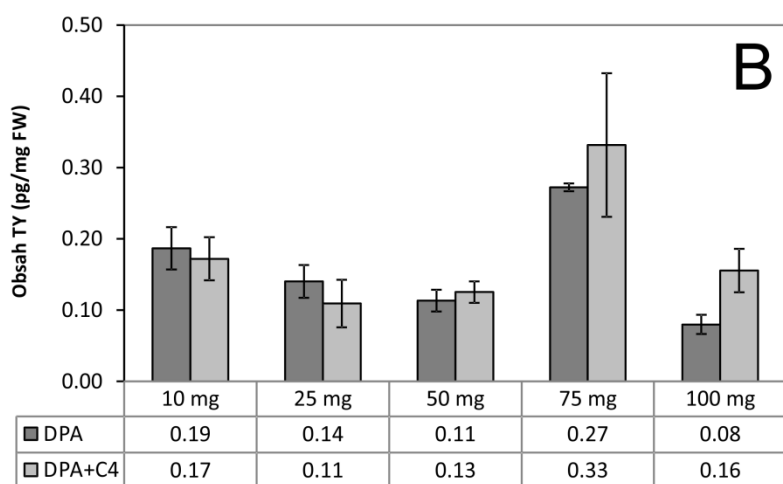
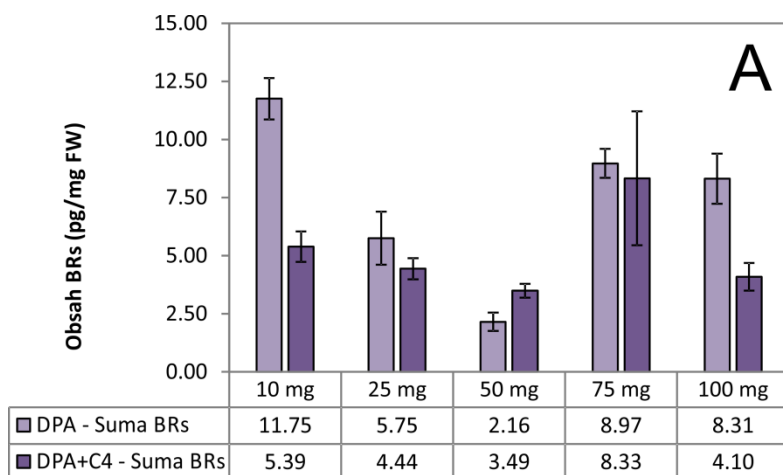
#### **IV. 5. Vyhodnocení experimentálních dat**

Chromatogramy získané pomocí UHPLC-MS/MS byly integrovány pomocí softwaru MassLynx, verze 4.1 a dále zpracovány pomocí programu Microsoft Excel. Stanovení hladin BRs bylo provedeno metodou vnitřní kalibrace v rozsahu 0,01 až 1 pmol/1 pmol IS/ 5  $\mu$ L nástřiku. Vzhledem k nedostupnosti vnitřního standardu žádného z analyzovaných PES bylo nutné provést kvantifikaci PES na základě vnější kalibrace. Za tímto účelem byla připravena řada kalibračních roztoků sestávající ze směsi pěti PES v rozsahu 0.01 až 5 pmol PE/2  $\mu$ L nástřiku.

## V. VÝSLEDKY A DISKUZE

### V. 1. STUDIUM MATRIČNÍHO EFEKTU

V MS analýze biologicky významných látek nacházející se přirozeně v nižších koncentracích je matriční efekt (ME) všeobecně známým fenoménem, který způsobuje změny účinnosti ionizace analytu v iontovém zdroji v důsledku přítomnosti interferenčních látek pocházejících z biologické matrice vzorku (Matuszewski et al. 2003; Klapková et al. 2011). Protože ME může přímo ovlivnit výsledky kvantitativní analýzy, bylo studium ME zařazeno i do koncepce této bakalářské práce. Cílem experimentu bylo tedy zjistit, jaká je ideální navážka biologického materiálu (rostlinného pletiva) pro stanovení BRs, tj. jaké je optimální množství pletiva vedoucí k uspokojivé odezvě jednotlivých BRs minimálně ovlivněné interferenčními látkami z pletiva (matrice). Ztráty analytů (BRs) během izolace z pletiv byly zohledněny přidávkem směsi IS, které zároveň zajišťují přesnost kvantifikace, neboť jsou ME ovlivněny přibližně stejnou měrou jako endogenní BRs. Pro experiment byla použita pletiva 4denních semenáčků řeřichy seté o navážkách 10 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg a 100 mg FW. Každá navážka byla připravena v 6 opakováních, přičemž 3 vzorky od každé navážky byly extrahovány a přečištěny pouze přes SPE kolonku typu DPA a další 3 vzorky pak dvoukrokově přes DPA a následně ještě přes reverzně fází sorbent C4 (viz kapitola IV. 4. 5.). Teoreticky by se mohlo zdát, že čím více rostlinného materiálu navážíme, tím více BRs budeme detekovat. Při provedeném pokusu bylo ale zjištěno, že při nižší navážce pletiva se uplatňuje nižší ME, což se projevuje detekcí zdánlivě vyšších hladin endogenních BRs (**Obr. 12**).



**Obr. 12.** Vliv množství rostlinné matrice na celkový obsah BRs (A), na obsah tyfasterolu (TY ; B) a 28-norbrassinolidu (*norBL*; C).

Jako optimální se podle získaných výsledků (hladiny BRs po jedнокrokové purifikaci pomocí DPA) jeví navážka 10 mg FW, která u sumy všech detekovaných BRs (BL, CS, *norBL*, *norCS*, homoBL, homoCS a TY) umožňuje jejich nejcitlivější detekci

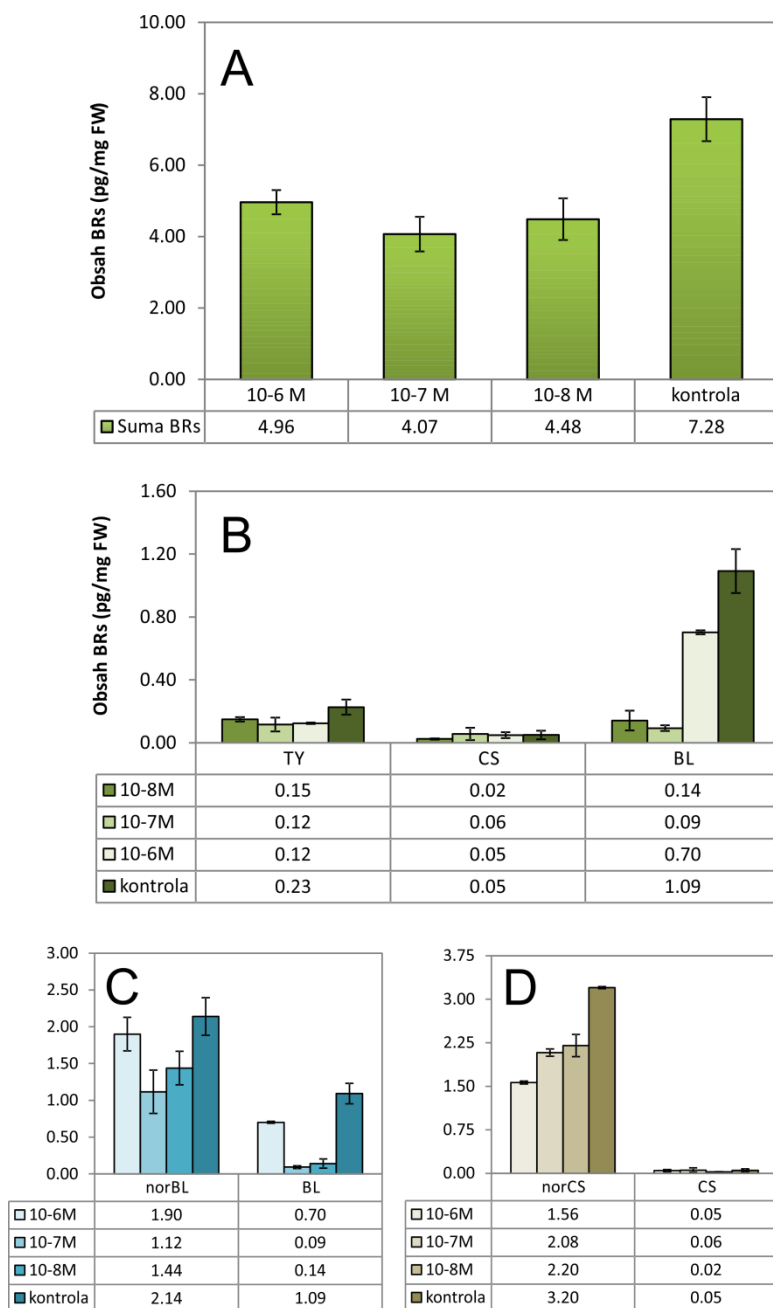
s minimálním vlivem ME (11.75 pg/mg FW) – **Obr. 12A**. Celkové množství BRs detekované v pletivu řeřichy klesá s rostoucí navázkou až k 50 mg FW (2.16 pg/mg FW) a u navážky 75 mg a 100 mg opět narůstá na cca 8 pg/mg FW. Při bližší analýze výsledků se ukazuje, že pokud jde o hydrofóbnější BRs reprezentované tyfasterolem, s rostoucí navázkou postupně klesá jeho detekovatelné množství od 10 mg do 100 mg (s výjimkou navážky 75 mg) – **Obr. 12B**. U hydrofilnějších BRs reprezentovaných 28-*norbrassinolidem* je situace podobná s tím, že u navážky 75 a 100 mg je pozorován opětovný nárůst – **Obr. 12C**. Tento nárůst ovšem dosahuje u navážky 100 mg jen cca 56 % množství *norBL* detekovaného u navážky 10 mg. Pro 4denní semenáčky řeřichy seté kultivované *in vitro* je tedy navážka 10 mg za účelem stanovení endogenních hladin různě hydrofobních BRs optimální s tím, že vyhovuje více těm hydrofóbnějším v porovnání s BRs méně hydrofobními. Na tomto místě je ale potřeba zdůraznit, že optimalizaci navážky rostlinného pletiva je potřeba učinit u každého rostlinného druhu, popř. typu pletiva, stáří dané rostliny a způsobu její kultivace, neboť skladba sekundárních metabolitů a látek interferujících s detekcí BRs pomocí MS je u různých rostlinných druhů, popř. druhů analyzovaných pletiv, jejich stáří a způsobu kultivace odlišná.

Porovnáním způsobu izolace BRs lze dojít k závěru, že použití jednokrokového postupu využívajícím pouze SPE kolonku Discovery DPA je dostačující a umožňuje u většiny navážek detekovatelnost většího množství BRs ve srovnání s dvoukrokovým postupem pomocí kolonky DPA následované izolací BRs pomocí sorbentu C4 (**Obr. 12A**). Výjimku tvoří pouze situace u navážky 50 mg FW, kde bylo celkové množství BRs nalezeno o cca 62 % vyšší u postupu DPA+C4 než u izolace pouze pomocí kolonky DPA samotné. U dvoukrokového postupu se lze domnívat, že ve druhém kroku (C4) pravděpodobně dochází ke snížení návratnosti izolovaných BRs v důsledku nadbytečných fyzikálně-mechanických operací se vzorkem (odpařování, nedokonalé rozpouštění BRs ve vzorku před C4 apod.).



## V. 2. VLIV EXOGENNÍHO FYTOEKDYSTEROIDU NA HLADINU ENDOGENNÍCH BRASSINOSTEROIDŮ

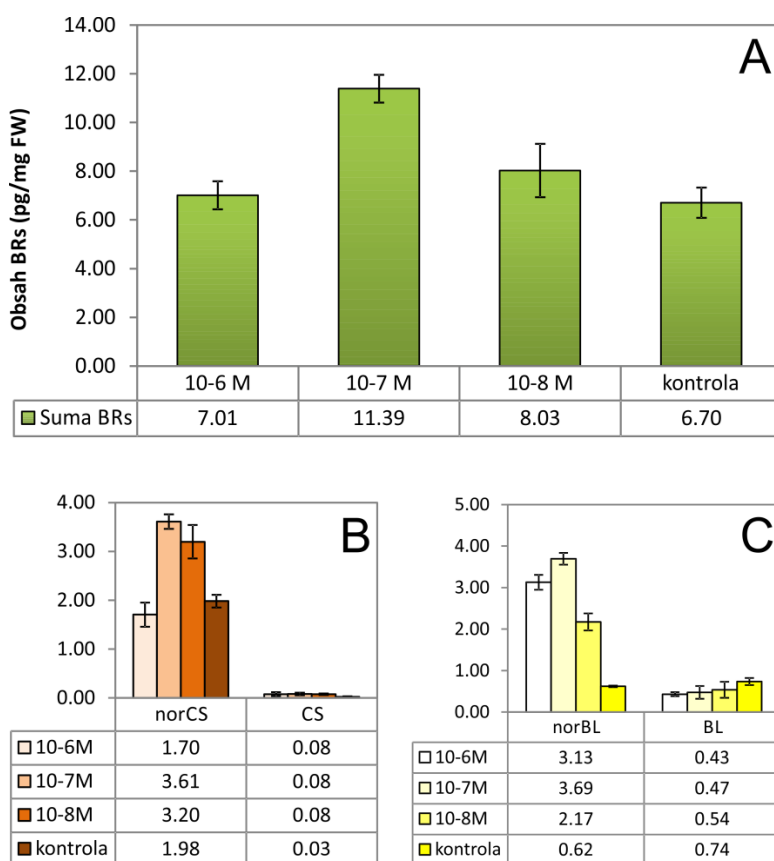
Pro studium vlivu fytoekdysteroidů na hladiny brassinosteroidů byl vybrán 20E o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$  a  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l v médiu pro kultivaci řeřichy *in vitro*. Stanovením hladin (navážka 10 mg FW) přirozeně se vyskytujících BRs v semenáčcích řeřichy kultivovaných na médiích s 20E o uvedených koncentracích bylo zjištěno, že tento PE působí všeobecně snížení hladin endogenních BRs, a to v průměru o 38 % ve srovnání s rostlinami kontrolními (**Obr. 13A**). Největší vliv má 20E o koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l, kdy nastává redukce celkové hladiny BRs o 44 % oproti kontrole, tj. semenáčkům řeřichy rostoucí na médiu bez 20E. Pokud bychom vyšli z poznatků o tom, že ECs působí jako adaptogeny (zvyšují odolnost organismu vůči stresu; Tarkovská a Strnad 2016), pak je snížení hladin BRs reakcí na to, že rostlina je v přítomnosti EC před stresem chráněna a není pro ni důvod udržovat zvýšené hladiny BRs, které jinak dosahují vysokých hodnot právě v období stresu rostliny (Fujioka a Sakurai 1997). Analýzou profilu zejména BRs vznikajících na konci časné C6 oxidační biosyntetické dráhy (TY → CS → BL) zjišťujeme, že největší vliv má 20E na hladinu biologicky nejaktivnějšího BRs brassinolidu (**Obr. 13B**), který je koncovým produktem biosyntézy všech BRs. Jeho analog chudší o  $\text{CH}_3$  na uhlíku 28 (*norBL*) je druhým nejabundantnějším BRs ze všech detekovaných endogenních BRs v řeřiše seté (tvoří 31.7 % všech BRs; **Obr. 13C**) a trend v jeho hladinách přesně kopíruje situaci popsanou pro sumu všech BRs ve studovaném pletivu (**Obr. 13A**) a shoduje se i s trendem v hladinách BL (**Obr. 13C**). Nejvyšší hladina byla ovšem stanovena u *norCS* (tvoří 43.5 % všech BRs), klesá s rostoucí koncentrací 20E v kultivačním médiu, čímž dosahuje 68.8 % až 48.8 % obsahu *norCS* v kontrolních rostlinách neošetřených 20E (**Obr. 13D**).



**Obr. 13.** Vliv vybraného fytoekdysteroidu (20-hydroxyekdysonu) o různých koncentracích na celkovou hladinu BRs (A), na hladiny TY, CS a BL (B), na hladiny BL vs *norBL* (C) a na hladiny CS vs *norCS* (D) ve 4denních semenáčcích řeřichy seté *Lepidium sativum*.

Pro zajímavost byly hladiny BRs kvantifikovány rovněž v semenáčcích řeřichy kultivované na jednom z BRs (*epiBL*) o stejných koncentracích jako v případě 20E, tj. na  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$  a  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l v médiu. Bylo zjištěno, že *epiBL* působí na hladiny endogenních BRs přesně opačně ve srovnání s vlivem 20E. *epiBL* hladiny BRs zvyšuje

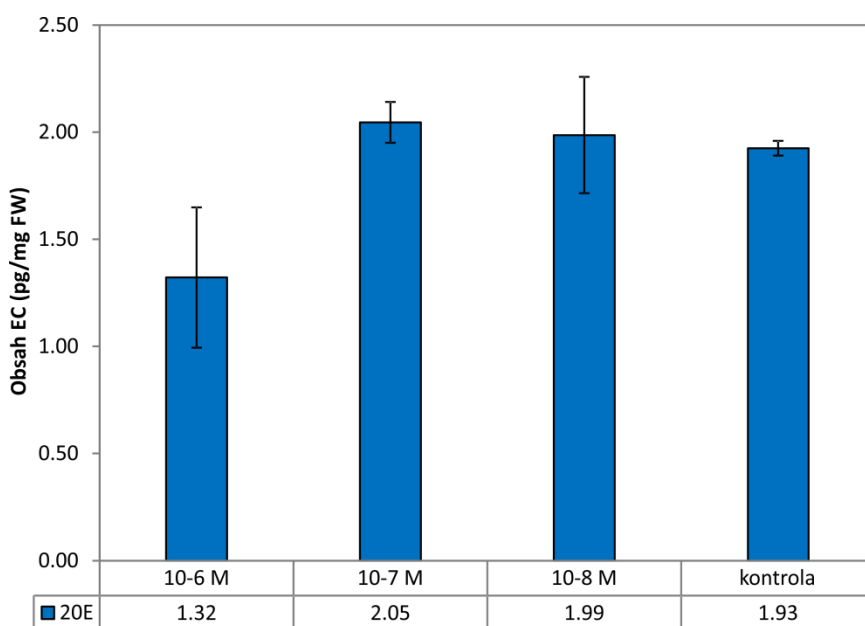
a to v průměru o 32 % (**Obr. 14A**). Největší vliv pak má na hladiny BRs v koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l, kdy dochází k nárůstu celkového množství BRs v pletivu řechy až o 69.9 % oproti kontrole. U koncentrace *epiBL*  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l je tento nárůst 4.6 % a u nejnižší koncentrace *epiBL*  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l pak 19.8 %. Analýzou profilu BRs bylo zjištěno, že ze všech detekovaných BRs vykazuje nejvyšší hladiny opět *norCS* (**Obr. 14B**) následovaný *norBL* (**Obr. 14C**), což je ve shodě s daty získanými u experimentu s kultivací rostlin řechy na médiu s 20E (Obr. 13). Trend hladin *norCS* napříč exogenními koncentracemi *epiBL* aplikovanými v kultivačních médiích řechy odpovídá trendu pro sumu všech BRs (Obr. 14B vs. Obr. 14A). Z výše uvedeného vyplývá, že PE a BRs v pletivu řechy působí antagonisticky a exogenně aplikovaný BRs má na biosyntézu BRs mnohem větší vliv než PE ve stejné koncentraci (viz níže). To může souviset s přítomností BRs receptoru, který přenáší signál exogenního BR mnohem citlivěji než je tomu u PE, který v rostlinách receptor nemá.



**Obr. 14.** Vliv exogenního *epiBL* o různých koncentracích na celkovou hladinu BRs (A), na hladiny CS vs *norCS* (B) a na hladiny BL vs *norBL* (C) ve 4denních semenáčcích řechy seté *Lepidium sativum*.

### IV. 3. VLIV EXOGENNÍHO BRASSINOSTEROIDU NA HLADINU ENDOGENNÍCH FYTOEKDYSTEROIDŮ

Jak bylo uvedeno v kapitole IV. 4. 6. 2., pro sledování vlivu exogenního BR byl z dostupných PEs kvantifikován pouze 20E, který byl jako jediný pozitivně detekován ve 4denních pletivech řěřichy seté. Jak ukazuje **Obr. 15**, *epiBL* o koncentraci  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  mol/l nemá signifikantní vliv na obsah 20E v pletivech řěřichy. U koncentrace *epiBL*  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l je možné pozorovat cca 31.4 % pokles obsahu 20E proti kontrole v pletivech studovaného rostlinného modelu. Tento výsledek je ve shodě s daty publikovanými pro rostliny špenátu (Kamlar et al. 2015), kde bylo zjištěno, že *epiBL* o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l způsobuje snížení obsahu 20E u rostlin špenátu setého *Spinacia oleracea*. Na rozdíl od výsledků nalezených pro řěřichu, u špenátu bylo zjištěno, že koncentrace *epiBL*  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l naopak indukuje nárůst hladin 20E.



**Obr. 15.** Vliv exogenního *epiBL* o různých koncentracích na obsah 20E ve 4denních semenáčcích řěřichy seté *Lepidium sativum*.

## VI. ZÁVĚR

Brassinosteroidy a fytoekdysteroidy jsou přírodní látky charakteru triterpenoidů. V rámci této bakalářské práce byl studován matriční efekt při kvantifikaci BRs jako látek vyskytujících se v rostlinných pletivech ve stopových množstvích. Bylo zjištěno, že optimální množství rostlinného pletiva je 10 mg FW, kdy je stanovení BRs nejméně negativně ovlivněné působením interferenčních látek z matrice. Zároveň bylo zjištěno, že tato navážka rostlinného pletiva reprezentovaná 4denními semenáčky řeřichy seté kultivované *in vitro* je výhodnější pro detekci hydrofóbnějších BRs jako je například TY v porovnání s méně hydrofobními BRs zastoupenými *norBL*.

Dalším předmětem zájmu bylo studium biosyntézy BRs v semenáčcích řeřichy seté za přítomnosti různých koncentrací PEs (20E) v raném stádiu jejího vývoje. Experimenty vedly k závěru, že přítomnost fytoekdysteroidů obecně snižuje hladiny endogenních BRs. Největší pokles sumy BRs byl pozorován na médiu s 20E o koncentraci  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l, přičemž největší vliv má přítomnost exogenního 20E na hladinu biologicky neaktivnějšího BRs brassinolidu. Je známo, že PEs zvyšují odolnost rostlin vůči stresu různého původu. Z tohoto pohledu je snížení hladin BRs pravděpodobně reakcí rostliny na to, že v přítomnosti exogenního PE je rostlina před stresem chráněna a není proto pro ni důvod udržovat relativně vysoké hladiny BRs (ty dosahují nejvyšších hodnot právě za stresových podmínek). Z výše uvedeného vyplývá, že BRs a PE v pletivu řeřichy působí antagonisticky.

Posledním cílem této práce bylo naopak posouzení vlivu exogenně aplikovaného brassinosteroidu (*epiBL*) na biosyntézu PEs u stejného rostlinného modelu (řeřicha setá) ve stejném vývojovém stádiu (4denní rostliny kultivované *in vitro*). Dle získaných výsledků lze vytvořit závěr, že exogenně aplikovaný *epiBL* pouze o nejvyšší testované koncentraci v médiu, tj.  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l, má signifikantní vliv na množství 20E v pletivu rostliny. U této koncentrace BR v médiu je možné pozorovat cca 31.4 % pokles obsahu 20E ve srovnání s kontrolními rostlinami, tj. rostlinami kultivovanými na médiu bez přídavku *epiBL*. *epiBL* v koncentraci nižší než  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l nemá na hladiny ECs v rostlině významný vliv (hladina 20E je srovnatelná s hladinami v kontrolních rostlinách).

## VII. LITERATURA

- Abe H, Honjo C, Kyokawa Y, Asakawa S, Natsume M, Namshima M** (1994) 3-Oxoteasterone and the epimerization of teasterone: Identification in lily anthers and *Distylium racemosum* leaves and its biotransformation into typhasterol. *Biosci Biotech Biochem* 58:986–989.
- Abe H, Takatsuto S, Okuda R, Yokota T** (1995) Identification of castasterone, 6-deoxocastasterone, and typhasterol in the pollen of *Robinia pseudo-acacia* L. *Biosci Biotech Biochem* 59:309–310.
- Asami T, Min YK, Nagata N, Yamagishi K, Takatsuto S, Fujioka S, Murofushi N, Yamaguchi I, Yoshida S** (2000) Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol* 123:93–99. doi: [10.1104/pp.123.1.93](https://doi.org/10.1104/pp.123.1.93)
- Bajguz A** (2011) *Brassinosteroids – occurrence and chemical structures in plants*. In: Hayat S, Ahmad A (eds) *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormones*. Springer, Germany, pp 1–28. doi: [10.10007/978-94-007-0189-2](https://doi.org/10.10007/978-94-007-0189-2)
- Bajguz, A, Hayat S** (2009) *Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses*. *Plant Physiol Biochem* 47:1–8. doi: [10.1016/j.plaphy.2008.10.002](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002)
- Bishop GJ, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones JD, Kamiya Y** (1999) The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96:1761–1766. doi: [10.1073/pnas.96.4.1761](https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1761)
- Butenandt A, Karlson P** (1954) *Über die Isolierung eines Metamorphose-hormons der Insekten in kristallisierter Form*. *Z Naturforsch* 9B:389–391.
- Canals D, Irurre-Santilari J, Casas J** (2005) *The first cytochrome P450 in ferns*. *FEBS J* 272:4817–4825. doi: [10.1111/j.1742-4658.2005.04897.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04897.x)
- Cutler HG** (1991) *Brassinosteroids through the looking glass*. In: Cutler HG, Yokota T, Adam G (eds) *Brassinosteroids. Chemistry, bioactivity, and application*. ACS Symposium Series, 474. Washington: American Chemical Society, 334–345.
- Dinan L** (2001) *Phytoecdysteroids: biological aspects*. *Phytochemistry* 57:325–339. doi: [10.1016/S0031-9422\(01\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00078-4)

- Dinan L, Hormann R** (2005) *Ecdysteroid agonists and antagonists*. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S (eds) *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 3, Elsevier, Amsterdam, pp 197–242.
- Dinan L, Savcenko T, Whiting P** (2001) *On the distribution of phytoecdysteroids in plants*. *Cell Mol Life Sci* 58:121–1132. doi:[10.1007/PL00000926](https://doi.org/10.1007/PL00000926)
- Dinan L, Harmatha J, Volodin V, Lafont R** (2009) *Phytoecdysteroids: diversity, biosynthesis and distribution*. In: Smagghe G (ed) *Ecdysone: structures and functions*. Springer, Berlin, pp 3–45. doi:[10.1007/978-1-4020-9112-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9112-4_1)
- Dobrikova AG, Vladkova RS, Rashkov GD, Todinova SJ, Krumova SB, Apostolova EL** (2014) *Effects of exogenous 24-epibrassinolide on the photosynthetic membranes under non-stress conditions*. *Plant Physiol Biochem* 80:75–82. doi: [10.1016/j.plaphy.2014.03.022](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.022)
- Dreier SI, Towers GHN** (1988) *Activity of ecdysterone in selected plant growth bioassays*. *J Plant Physiol* 132:509–512. doi: [10.1016/S0176-1617\(88\)80073-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(88)80073-7)
- Iwasaki T, Shibaoka H** (1991) *Brassinosteroids act as regulators of tracheary-element differentiation in isolated Zinnia mesophyll cells*. *Plant Cell Physiol* 32:1007–1014.
- Fujioka S, Inoue T, Takatsuto S, Yanagisawa T, Yokota T, Sakurai A** (1995) *Biological activities of biosynthetically-related congeners of brassinolide*. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:1973–1975.
- Fujioka S, Choi Y-H, Takatsuto S, Yokota T, Li J, Chory J, Sakurai A** (1996) *Identification of castasterone, 6-deoxocastasterone, typhasterol and 6-deoxotyphasterol from the shoots of Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 37:1201–1203.
- Fujioka S, Sakurai A** (1997) *Brassinosteroids*. *Nat Prod Rep* 14:1–10. doi:[10.1039/NP9971400001](https://doi.org/10.1039/NP9971400001)
- Fujioka S, Yokota T** (2003) *Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids*. *Annu Rev Plant Biol* 54:137–167. doi: [10.1146/annurev.arplant.54.031902.134921](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134921)
- Grebenok RJ, Galbraith DW, Benveniste I, Feyereisen R** (1996) *Ecdysone 20-monooxygenase, a cytochrome P450 enzyme from spinach, Spinacia oleracea*. *Phytochemistry* 420:927–933. doi:[10.1016/0031-9422\(96\)00094-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00094-5)
- Griffiths PG, Sasse JM, Yokota T, Cameron DW** (1995) *6-Deoxotyphasterol and 3-dehydro-6-deoxoteasterone, possible precursors to brassinosteroids in the pollen of Cupressus arizonica*. *Biosci Biotech Biochem* 59:956–959.

- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC** (1979) *Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen*. *Nature* 281:216–217. doi: [10.1038/281216a0](https://doi.org/10.1038/281216a0)
- Holá D** (2011) *Brassinosteroids and photosynthesis*. In: Hayat S, Ahmad A (eds) *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormones*. Springer, Germany, pp 143–192. doi [10.1007/978-94-007-0189-2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0189-2)
- Choi Y-H, Fujioka S, Harada A, Yokota T, Takatsuto S, Sakurai A** (1996) *A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone*. *Phytochemistry* 43:593–596. doi: [10.1016/0031-9422\(96\)00342-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00342-1)
- Choi Y-H, Fujioka S, Nomura T, Harada A, Yokota T, Takatsuto S, Sakurai A** (1997) *An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C6-oxidation*. *Phytochemistry* 44:609–613.
- Imai S, Toyosato T, Sakai M, Sato Y, Fujioka S, Murata E, Goto M** (1969) *Screening results of plants for phytoecdysones*. *Chem Pharm Bull* 17:335–339.
- Kamlar M, Rothova O, Salajkova S, Tarkowska D, Drasar P, Kocova M, Harmatha J, Hala D, Kohout L, Macek T** (2015) *The effect of exogenous 24-epibrassinolide on the ecdysteroid content in the leaves of Spinacia oleracea L*. *Steroids* 97:107–112. doi: [10.1016/j.steroids.2014.12.024](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.024)
- Klapková E, Uřinová R, Pruša R** (2011) *Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií*. *Klinická biochemie a metabolismus* 19:5–8.
- Koka CV, Cerny RE, Gardner RG, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Clouse SD** (2000) *A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response*. *Plant Physiol* 122:85–98. doi: [10.1104/pp.122.1.85](https://doi.org/10.1104/pp.122.1.85)
- Lafont R, Harmatha J, Marion-Poll F, Dinan L** (2002) *Ecdybase—the ecdysone handbook*, 3rd edn. Cybersales, Praha. <http://ecdybase.org>
- Macháčková I, Vágner M, Sláma K** (1995) *Comparison between the effects of 20-hydroxyecdysone and phytohormones on growth and development in plants*. *Eur J Entomol* 92:309–316.
- Mandava NB** (1988) *Plant growth promoting brassinosteroids*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:23–52.



- Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM** (2003) *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. Anal Chem 75:3019–3030. doi: [10.1021/ac020361s](https://doi.org/10.1021/ac020361s)
- Maugh TH** (1981) *New chemicals promise larger crops*. Science 212:33–34.
- Müssig C, Altmann T** (1999) *Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids*. Plant Physiol Biochem 37:363–372. doi: [10.1016/S0981-9428\(99\)80042-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(99)80042-4)
- Nagata N, Min YK, Nakano T, Asami T, Yoshida S** (2000) *Treatment of dark-grown Arabidopsis thaliana with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinazole, induces some characteristics of light-grown plants*. Planta 211:781–790. doi: [10.1007/s004250000351](https://doi.org/10.1007/s004250000351)
- Pavlová L, Fischer L**: *Růst a vývoj rostlin*. Praha: Karolinum, 2011.
- Piñol R, Simón E** (2011) *Protective effects of brassinosteroids against herbicides*. In: Hayat S, Ahmad A (eds) *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormones*. Springer, Germany, pp 143–192. doi: [10.10007/978-94-007-0189-2](https://doi.org/10.10007/978-94-007-0189-2)
- Rao SSR, Vardhini BV, Sujatha E, Anuradha S** (2002) *Brassinosteroids – a new class of phytohormones*. Curr Sci 82:1239–1245.
- Rothová O, Holá D, Kočová M, Tůmová L, Hnilička F, Hniličková H, Kamlar M, Macek T** (2014) *24-Epibrassinolide and 20-hydroxyecdysone affect photosynthesis differently in maize and spinach*. Steroids 85:44–57. doi: [10.1016/j.steroids.2014.04.006](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.04.006)
- Soriano IR, Riley IT, Potter MJ, Bowers WS** (2004) *Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic nematodes*. J Chem Ecol 30:651–654. doi: [10.1023/B:JOEC.0000045584.56515.11](https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000045584.56515.11)
- Spengler B, Schmidt J, Voigt B, Adam G** (1995) *6-Deoxo-28-norcastasterone and 6-deoxo-24-epicastasterone – two new brassinosteroids from Ornithopus sativus*. Phytochemistry 40:907–910. doi: [10.1016/0031-9422\(95\)98170-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)98170-L)
- Suzuki H, Inoue X, Fujioka S, Saito X, Xakatsuto S, Yokota X, Murofushi N, Yanagisawa X, Sakurai A** (1995) *Conversion of 24-methylcholesterol to 6-oxo-24-methylcholestanol, a putative intermediate of the biosynthesis of brassinosteroids, in cultured cells of Catharanthus roseus*. Phytochemistry 40:1391–1397. doi: [10.1016/0031-9422\(95\)00579-V](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00579-V)

- Tarkowská D, Strnad M** (2016) *Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones*. *Planta* 244:545–555. doi:[10.1007/s00425-016-2561-z](https://doi.org/10.1007/s00425-016-2561-z)
- Tarkowská D, Novák O, Oklestkova J, Strnad M** (2016) *The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC–ESI–MS/MS*. *Anal Biochem Chem* 408:6799–6812. doi: [10.1007/s00216-016-9807-2](https://doi.org/10.1007/s00216-016-9807-2)
- Thompson MJ, Mandava NB, Meudt WJ, Lusby WR, Spaulding DW** (1981) *Synthesis and biological activity of brassinolide and its 22 $\beta$ , 23 $\beta$ -isomer: Novel plant growth-promoting steroids*. *Steroids* 38:567–580.
- Wada K, Marumo S, Abe H, Morishita T, Nakamura K, Uchiyama M, Mori K** (1984) *A rice lamina inclination test - A micro-quantitative bioassay for brassinosteroids*. *Agric Biol Chem* 48:719–726.
- Xia XJ, Huang LF, Zhou YH, Mao WH, Shi K, Wu JX, Asami T, Chen Z, Yu JQ** (2009) *Brassinosteroids promote photosynthesis and growth by enhancing activation of Rubisco and expression of photosynthetic genes in Cucumis sativus*. *Planta* 230:1185–1196. doi: [10.1007/s00425-009-1016-1](https://doi.org/10.1007/s00425-009-1016-1)
- Yokota X, Nakayama M, Wakisaka X, Schmidt T, Adam G** (1994) *3-Dehydroteasterone, a 3,6-diketobrassinosteroid as a possible biosynthetic intermediate of brassinolide from wheat grain*. *Biosci Biotech Biochem* 58:1183–1185. doi: [10.1271/bbb.58.1183](https://doi.org/10.1271/bbb.58.1183)
- Yokota X, Sato T, Takeuchi Y, Nomura T, Uno K, Watanabe T, Takatsuto S** (2001) *Roots and shoots of tomato produce 6-deoxo-28-norcastasterone, 6-deoxo-28-nortyphasterol and 6-deoxo-28-norcastasterone, possible precursors of 28-norcastasterone*. *Phytochemistry* 58:233–238. doi: [10.1016/S0031-9422\(01\)00237-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00237-0)
- Yu JQ, Huang LF, Hu WH, Zhou YH, Mao WH, Ye SF, Nogués S** (2004) *A role for brassinosteroids in the regulation of photosynthesis in Cucumis sativus*. *J Exp Bot* 55:1135–1143. doi: [10.1093/jxb/erh124](https://doi.org/10.1093/jxb/erh124)

*HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie).*

Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>, staženo dne: 8.7.2016

## VIII. SEZNAM OBRÁZKŮ

- OBRÁZEK 1 Chemická struktura brassinolidu.
- OBRÁZEK 2 Schéma fyziologických účinků brassinosteroidů u vyšších rostlin.
- OBRÁZEK 3 Struktura 5 $\alpha$ -cholestanu a různých substituentů na kruhu A a B a na vedlejším řetězci přirozeně se vyskytujících brassinosteroidů.
- OBRÁZEK 4 Chemické struktury brassinosteroidů s odlišnými substituenty na C-24.
- OBRÁZEK 5 Strukturní vzorce cykloartenolu, sitosterolu, stigmasterolu a cholesterolu.
- OBRÁZEK 6 Schéma biosyntézy brassinosteroidů v rostlinách.
- OBRÁZEK 7 Struktura některých ekdysteroidů s vyznačením číslování atomů.
- OBRÁZEK 8 Struktura typického ekdysteroidu (20E) s barevným vyznačením společných strukturních znaků.
- OBRÁZEK 9 Zjednodušené schéma biosyntézy PEs zahrnující vztah k jiným rostlinným sterolům včetně brassinosteroidů.
- OBRÁZEK 10 Výsev sterilních semen řechy seté.
- OBRÁZEK 11 Plastové kultivační desky s agarovým MS médiem umístěné ve stojanu.
- OBRÁZEK 12 Vliv množství rostlinné matrice na celkový obsah BRs (A), na obsah tyfasterolu (TY; B) a 28-*nor*brassinolidu (*nor*BL; C).
- OBRÁZEK 13 Vliv vybraného fytoekdysteroidu (20-hydroxyekdysonu) o různých koncentracích na celkovou hladinu BRs (A), na hladiny TY, CS a BL (B), na hladiny BL vs *nor*BL (C) a na hladiny CS vs *nor*CS (D) ve 4denních semenáčcích řechy seté *Lepidium sativum*.
- OBRÁZEK 14 Vliv exogenního *epi*BL o různých koncentracích na celkovou hladinu BRs (A), na hladiny CS vs *nor*CS (B) a na hladiny BL vs *nor*BL (C) ve 4denních semenáčcích řechy seté *Lepidium sativum*.
- OBRÁZEK 15 Vliv exogenního *epi*BL o různých koncentracích na obsah 20E ve 4denních semenáčcích řechy seté *Lepidium sativum*.

## IX. ZDROJE OBRÁZKŮ

1. **Tarkowská D, Novák O, Oklestkova J, Strnad M** (2016) *The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC–ESI–MS/MS*. Anal Biochem Chem 408:6799–6812. doi: [10.1007/s00216-016-9807-2](https://doi.org/10.1007/s00216-016-9807-2)
2. **Tarkowská D, Strnad M** (2016) *Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones*. Planta 244:545–555. doi:[10.1007/s00425-016-2561-z](https://doi.org/10.1007/s00425-016-2561-z)