



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Vliv syntetických derivátů brassinosteroidů na  
zvýšení tolerance rostlin vůči abiotickým  
stresům**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: **Bc. Jana Kratochvílová**  
Studijní program: N1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.**  
Termín odevzdání práce: 2019

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jana Kratochvílová
Název práce	Vliv syntetických derivátů brassinosteroidů na zvýšení tolerance rostlin vůči abiotickým stresům
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Tato diplomová práce se zabývá studiem biologické aktivity syntetických derivátů brassinosteroidů (deriváty MK259 a MK266). Teoretická část práce obsahuje kapitoly seznamující čtenáře s charakteristikou brassinosteroidů, jejich biosyntézou, signální dráhou, biologickou a cytotoxickou aktivitou. Experimentální část práce se zabývá studiem biologické a cytotoxické aktivity BRs analogů a dále je zaměřena na studium hladin endogenních BRs pomocí UHPLC-MS/MS u rostlin stresovaných suchem a rostoucích za normálních podmínek. Experiment byl proveden na rostlinách hrachu setého</p>

(*Pisum sativum*), které byly ovlivněny testovanými deriváty brassinosteroidů v různých koncentracích.

Klíčová slova	Abiotický stres, brassinosteroidy, biologická a cytotoxická aktivita
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Jana Kratochvílová
Title of thesis	Influence of synthetic brassinosteroid derivatives on abiotic stress tolerance
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>This diploma thesis deals with the biological activity of brassinosteroid synthetic derivatives (MK259 and MK266). The theoretical part of the thesis contains chapters introducing characteristics of brassinosteroids, their biosynthesis, signalling, biological and cytotoxic activity to the reader. The experimental part focuses on study of endogenous BRs levels by UHPLC-MS/MS in plants stressed by drought and plants growing with normal conditions. This experiment was performed on <i>Pisum sativum</i> plants which were influenced by tested derivatives of brassinosteroids at different concentrations. The cytotoxic and biological activity was also determined.</p>

Keywords	Abiotic stress, brassinosteroids, biological and cytotoxic activity
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně  
za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

.....

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Janě Oklešťkové, Ph.D. za vedení této diplomové práce, za její ochotu, čas, vstřícnost, trpělivost a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za pomoc v laboratoři při testování cytotoxicity vybraných látek a doc. Daně Holé, Ph.D. za pomoc při kultivaci rostlin hrachu. Rovněž bych poděkovala Ing. Petře Amakorové za UHPLC-MS/MS měření a následnou pomoc při vyhodnocování získaných výsledků a také všem pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů za ochotu a pomoc při provedení experimentální části této práce.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory interního grantu Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého (č. IGA\_PrF\_2019\_020).

## Obsah

1	Úvod.....	12
2	Teoretická část.....	13
2.1	Brassinosteroidy .....	13
2.1.1	Biotesty .....	14
2.1.2	Biosyntéza.....	16
2.1.3	Signální dráha .....	19
2.1.4	Cytotoxická aktivita.....	22
2.1.5	Účinek brassinosteroidů na růst a vývoj rostlin .....	23
2.1.6	Metody stanovení BRs .....	28
3	Materiál a metody.....	30
3.1	Chemikálie a přístroje .....	30
3.2	Metody práce.....	31
3.2.1	Testování cytotoxicity vybraných derivátů BRs .....	31
3.2.2	Příprava média a vertikálních desek, výsev .....	33
3.2.3	Kultivace rostlin hrachu setého .....	35
3.2.4	Extrakce vzorků pro analýzu BRs .....	35
3.2.5	SPE purifikace.....	35
3.2.6	Imunoafinitní chromatografie .....	36
3.2.7	Analýza vzorků pomocí UHPLC-MS/MS.....	36
4	Výsledky.....	38
4.1	Stanovení cytotoxicity .....	38
4.2	Stanovení biologické aktivity vybraných derivátů BRs.....	39
4.3	Stanovení hladin derivátů BRs v rostlinném materiálu .....	41
5	Diskuze .....	49
6	Závěr.....	53



7	Seznam literatury .....	54
8	Přílohy.....	64

## **Seznam použitých zkratek**

**24-epiBL** – 24-epibrassinolid

**28-HBL** – 28-homobrassinolid

**BAK** – BRI1 asociovaná receptorová kináza 1

**BES1** – bri1-EMS-supresor 1

**BIN2** – BR-insenzitive 2

**BKI1** – inhibitor kinázy 1

**BL** – brassinolid

**BRs** – brassinosteroidy

**BRI1** – mutant brassinosteroid-insenzitive 1

**BRL1** – BRI1-LIKE 1

**BRL3** – BRI1-LIKE 3

**BSA** – hovězí sérový albumin

**BSK** – BR-signalizační kináza

**BZR1** – brassinazol-resistantní 1

**CPD** – CARBOXYPEPTIDÁZA C

**CYP 90D1; 85A1,2** – CYTOCHROM 90D1; 85A1,2

**DET2** – DE-ETIOLED 2

**DMSO** – dimethylsulfoxid

**DWF4** – DWARF4

**GC-MS** – plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

**IAC** – imunoafinitní chromatografie

**IS** – interní standard

**LRR** – extracelulární doména bohatá na leucin

**MS médium** – Murashige-Skoog médium

**PBS** – fosfátový pufr

**PEG-6000** – polyethylenglykol-6000

**PP2A** – protein fosfatáza 2A

**PSI** – fotosystém I

**ROS** – reaktivní formy kyslíku

**SPE** – extrakce na pevné fázi

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

## 1 Úvod

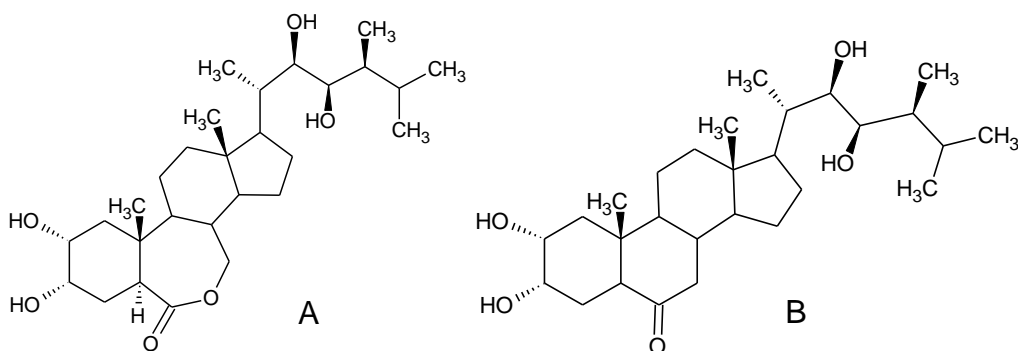
Brassinosteroidy jsou steroidní rostlinné hormony objevené v 70. letech minulého století. První brassinosteroid byl izolován z pylu brukve řepky (*Brassica napus*) a byl pojmenován brassinolid. Brassinosteroidy se v rostlinách nachází ve velmi nízkých koncentracích, nejvyšší obsah je zaznamenán v již zmíněných pylových zrnech, tyčinkách, pestíku nebo semenech. Mezi jejich hlavní účinky patří zvýšení resistance rostlin vůči stresu, vliv na prodlužování buněk, buněčné dělení, reprodukci a senescenci.

Předložená diplomová práce se zabývá syntetickými deriváty brassinosteroidů – MK259 a MK266. U těchto analogů BRs bylo potřeba před samotným testováním na rostlinném materiálu vyloučit jejich cytotoxickou aktivitu. Studie byla provedena na lidských fibroblastech. Následně byla určena jejich biologická aktivita na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* po jejím ovlivnění různými koncentracemi BRs. Pomocí počítačového programu byla změřena délka kořene a hypokotylu, výsledky byly zaznamenány do grafu. V rámci této práce byly také studovány hladiny jednotlivých BRs u rostlin, které byly stresovány suchem a u těch, které rostly za normálních podmínek. Experiment byl proveden na hrachu setém (*Pisum sativum*), který byl ovlivněn hormony 24-epiBL, MK259 a MK266 v různých koncentracích. Po homogenizaci vzorku proběhla extrakce za použití acetonitrilu a extrakce na pevné fázi následovaná imunoafinitní chromatografií. Spojením ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) byly stanoveny endogenní hladiny jednotlivých brassinosteroidů obsažené v hrachu setém v závislosti na růstových podmínkách.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BRs) jsou přírodní látky, které se nachází v pylu, semenech a mladých vegetativních tkáních rostlin. Hrají důležitou roli ve vývojových procesech rostlin zahrnující buněčné dělení, prodlužování buněk, stárnutí listů nebo reakci na stres (Clouse a Sasse 1998). BRs byly poprvé objeveny v roce 1970 skupinou Johna Mitchella (Mitchell *et al.* 1970). Již předem byla vyslovena hypotéza, že pyl by měl mít zvýšenou koncentraci rostlinných hormonů s cílem najít novou skupinu fyziologicky aktivních látek. Screeningu bylo podrobena více než 60 druhů pylu, ale pouze několik vzorků, zejména pyl řepky a olše, vyvolal neobvyklou odpověď – prodloužení. V extraktu z pylu brukve řepky (*Brasica napus L.*) byly identifikovány neznámé sloučeniny mající významný vliv na růst rostliny, které byly následně označeny jako brassiny (Mitchell *et al.* 1970). Brassinosteroidy se vyskytují ve velice nízkých koncentracích, z 227 kg pylu řepky bylo purifikací získáno pouze 10 mg biologicky aktivní látky, která byla nazvána brassinolid (viz obr. 1). Rentgenovou analýzou krystalové struktury a spektroskopií bylo zjištěno, že brassinolid je polyhydroxylovaný steroid podobný steroidním hormonům zvířat (22R,23R,24S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-B-homo-7 $\alpha$ -cholestan-6-on (Grove *et al.* 1979).



Obr. 1: Chemická struktura brassinolidu (A) a castasteronu (B)

Brassinolid je jedním z nejúčinnějších hormonů ze skupiny brassinosteroidů. O několik let později byl z hálek kaštanu (*Castanea spp*) identifikován rýžovým ohybovým testem castasteron (viz obr. 1), jenž je

považovaný za prekurzor brassinolidu. Jeho struktura byla určena spektroskopickou metodou (Yokota *et al.* 1982).

### **2. 1. 1 Biotesty**

Pro izolaci a stanovení biologické aktivity přirozených brassinosteroidů jsou důležité biotesty, které jsou specifické pro BRs.

#### **Biotest na 2. internodu fazole**

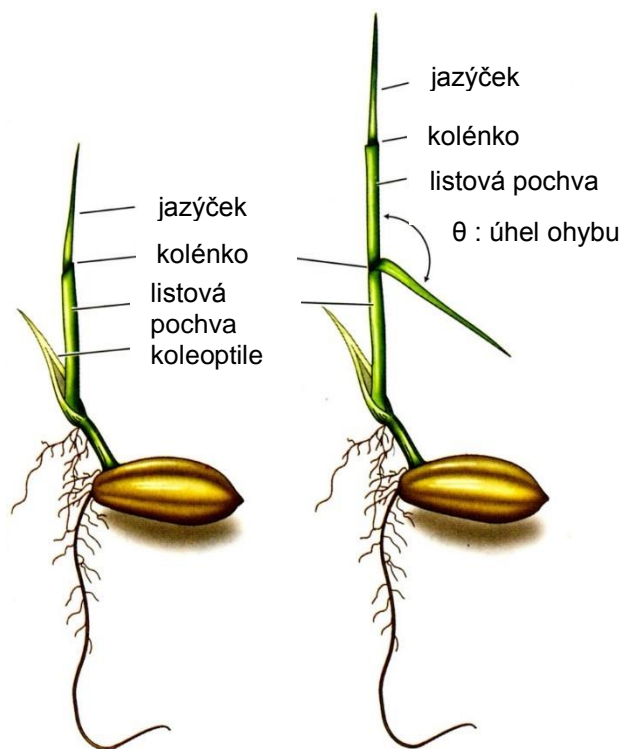
Tímto testem byly poprvé identifikovány brassiny (Mitchell *et al.* 1970) a poté byl použit pro izolaci brassinolidu (Grove *et al.* 1979). Semena fazolí (*Phaseolus vulgaris* L., var Pinto) se nechají naklíčit, vyberou se semena velikostně uniformní a přenesou se do nádoby obsahující perlit a 1/10 ředěného Hoaglandova roztoku. Sazenice jsou pěstovány 6 dní ve fytostronu při teplotě 25 °C–27 °C (světelný režim 16 hodin světlo / 8 hodin tma). Testované brassinosteroidy se rozpustí na požadovanou koncentraci v lanolinu a 2 µl jsou naneseny na druhý internod (jeho maximální velikost nesmí být větší než 2 mm). Kontrolní rostliny jsou ošetřeny samotným lanolinem. Po 4 dnech od aplikace se změří nárůst internodu testované rostliny vůči kontrole. Již při ošetření 0,01 µg BR na rostlinu je pozorováno silné ztluštění a rozštěpení druhého internodu, což je typický jev pouze pro BRs (viz obr. 2) (Strnad a Kohout 2003). Tento test byl původně vyvinut pro gibereliny (Grove 1979), ale bylo zjištěno, že je vysoce citlivý i pro brassinolid a jeho analoga (Thompson *et al.* 1979, 1982).



Obr. 2: Biotest na druhém internodu fazole po aplikaci 24-epibrassinolidu, K-kontrola

### Rýžový ohybový biotest

Tento biotest je nejpoužívanějším testem pro stanovení brassinosteroidů. Byl vytvořen v roce 1965 pro stanovení aktivity jiných hormonů – giberelinů a auxinů (Maeda 1965). Test lze provádět jak na celých rostlinách, tak pouze na segmentech. Měří se změna úhlu mezi stonkem a listem. Biotest je vysoce citlivý pro BL a jeho příbuzné sloučeniny. Vypadá následovně: segmenty, které byly tvořeny jazýčkem (délka 1 cm), kolénkem a pochvou byly vyříznuty ze sedmidenní rostlinky rýže zakrslé (*Oryza sativa* L., cv. Kinmaze), která byla nejprve inkubována v destilované vodě při 30 °C za tmy. Vyříznuté segmenty byly máčeny 1 den v destilované vodě a poté byly inkubovány v 1 ml 2,5 mM roztoku malátu draselného obsahujícího testované množství látky po dobu 48 hodin při teplotě 30 °C za tmy. Po inkubační době byl změřen úhel  $\theta$  mezi jazýčkem a pochvou. Úhel je úměrný množství BR ve vzorku (viz obr. 3) (Wada a Marumo 1981).



Obr. 3: Rýžový ohybový test (převzato a upraveno z *Taiz a Zeiger 2010*)

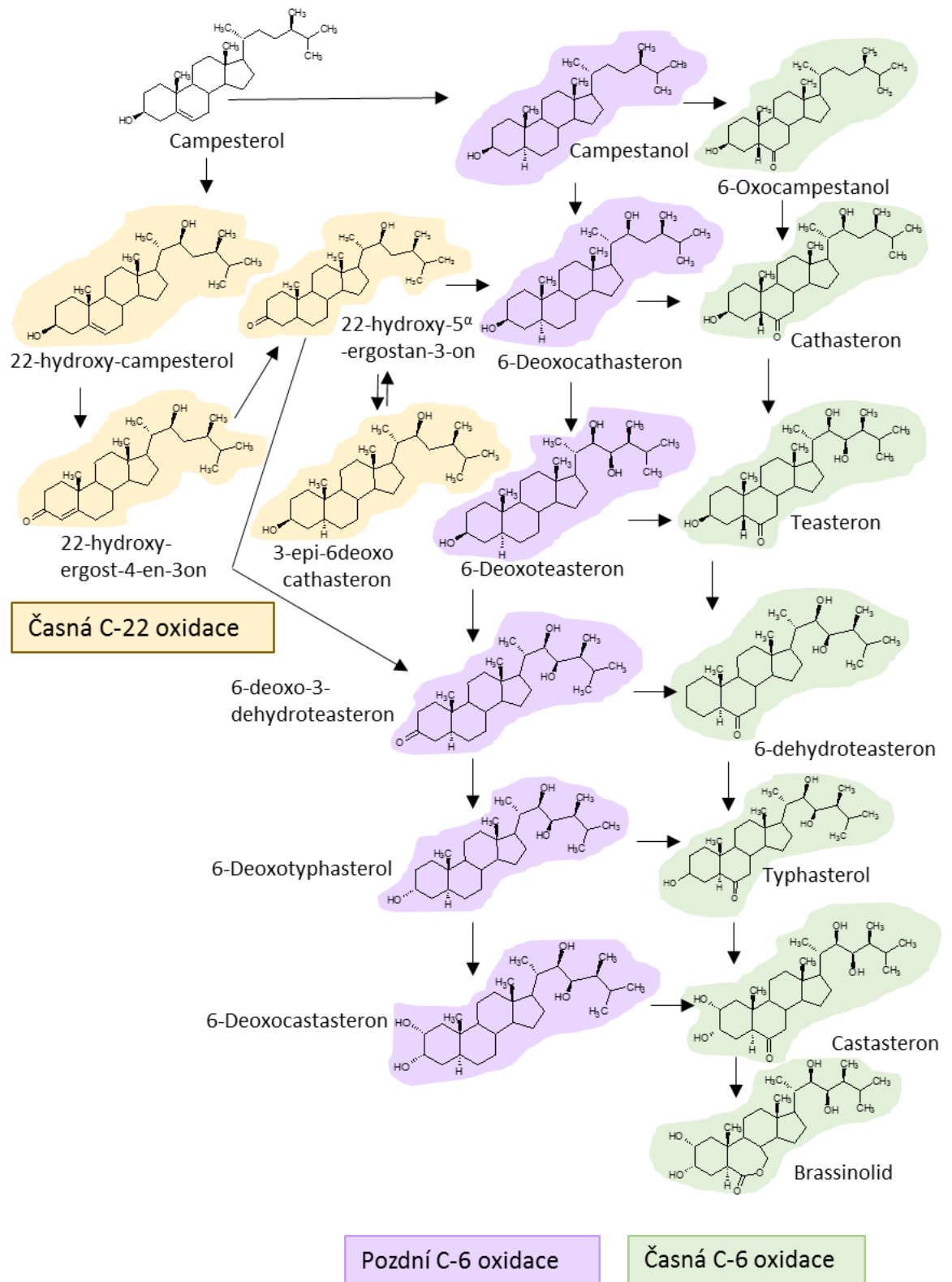
## 2. 1. 2 Biosyntéza

Brassinosteroidy jsou stejně jako gibereliny a kyselina abscisová syntetizovány terpenoidní cestou z campesterolu, sitosterolu a cholesterolu. Zatímco campesterol a sitosterol se v rostlinných membránách vyskytují hojně, cholesterol je syntetizován v menším množství (*Clouse a Sasse 1998*). Pro studie drah biosyntézy byly použity buněčné kultury barvínkovce růžového (*Catharanthus roseus L.*), u kterého jsou BRs přítomny v relativně velkém množství. BRs byly radioaktivně označeny a jejich metabolické deriváty byly identifikovány plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií. Jejich biosyntézu lze rozdělit na dvě části. První část začíná polymerací dvou farnesylových difosfátů za vzniku triterpenu skvalenu a jeho přeměnou na campesterol. Druhá je přímo specifická pro BRs a je potřebná pro vznik aktivních BRs, kdy dochází k přeměně campesterolu na brassinolid (*Fujioka a Sakurai 1997; Sakurai 1999*).



Biosyntetická dráha BRs začíná sterolovým progenitorem campesterolem, který vzniká z cykloartenolu a jehož vznik můžeme podrobně popsat takto: mevalonát je přeměněn na  $\Delta^3$ -isopentenyl pyrofosfát, přechází na geranyl pyrofosfát, farnesyl pyrofosfát, preskvalen, skvalen a je přeměněn na cykloartenol. Z něj vzniká episterol, 5-dehydroepisterol, 24-metylencholesterol a následně campesterol (*Clouse 2011*).

Campesterol je přeměněn na castasteron (CS) třemi paralelními biosyntetickými drahami. Tyto dráhy spolu koexistují, jsou spojeny na různých místech a jejich přítomnost pravděpodobně poskytuje výhodu za nepříznivých biologických podmínek. Jsou nazývány jako časná a pozdní C-6 oxidační dráha a časná C-22 oxidační dráha, která byla objevena později a je nezávislá na campestanolu. Na časně dráze C-22 se podílí velmi důležitý enzym DWARF4 (DWF4), který přeměňuje campesterol na 22-hydroxycampesterol a u jiných drah přeměňuje campestanol na 6-deoxocathasteron a 6-oxocampestanol na cathasteron. Mezi další enzymy, které se podílí na biosyntéze, patří CARBOXYPEPTIDÁZA C (CPD), DE-ETIOLED 2 (DET2) a CYTOCHROMY 90D1 a 85A1,2 (CYP 90D1, CYP 85A1,2) (*Clouse 2011*). V časně C-6 oxidační dráze dochází k přeměně 6-oxocampestanolu přes cathasteron na teasteron hydroxylací postranního řetězce, konkrétně na uhlíku C-22 a C-23. Tato dráha byla pozorována nejen u barvínkovce růžového, ale také v semenáčcích tabáku a rýže (*Suzuki et al. 1995*). V pozdní C-6 oxidační dráze se C-6 oxiduje po přidání hydroxylů k postrannímu řetězci a na C-2 kruhu A. Byly identifikovány 6-deoxoteasteron, 6-deoxocastasteron a 6-deoxotyphasterol (viz obr. 4) (*Choi et al. 1996, 1997*). Biosyntéza BRs probíhá v endoplazmatickém retikulu (*Fujioka a Yokota 2003*).



Obr. 4: Biosyntéza BRs (převzato a upraveno dle Clouse 2011)

## Regulace biosyntézy BRs

Hladina aktivních brassinosteroidů je metabolicky regulována negativní zpětnou vazbou přispívající k udržení homeostázy. Mezi nejčastější způsoby inaktivace patří oxidace, hydroxylace, sulfonace, epimerizace nebo konjugace s glukózou či lipidy (*Fujioka a Yokota 2003*). Důležitým deaktivčním krokem je epimerizace 2 $\alpha$ -OH a 3 $\alpha$ -OH skupin. Tato reakce je pozorována nejen u castasteronu, ale i u brassinolidu a jejich 24-epimerů, pravděpodobně prostřednictvím odpovídajících ketonů (*Hai et al. 1996*).

### 2. 1. 3 Signální dráha

Signální drahou rozumíme komunikaci mezi buňkami s cílem regulace vývoje buněk, růstu nebo dělení. Pro takovou komunikaci je nutný receptor umístěný buď na povrchu buňky, na vnitřní membráně anebo v cytoplasmě. *Clouse et al.* v roce 1996 poprvé identifikovali součásti signální dráhy brassinosteroidů v rostlině *Arabidopsis* pomocí mutantů, kteří vykazovali normální prodloužení kořenů i v přítomnosti vysoké koncentrace BL. Tímto způsobem identifikovali mutanta BRI1 (brassinosteroid-insenzitivní 1) (*Clouse et al. 1996*). Při dalších analýzách bylo prokázáno, že všichni BR-senzitivní mutanti mají mutovanou alelu BRI1 (*Li a Chory 1997*). To je důkazem, že BRI1 je nezbytnou složkou signální dráhy BRs. Na BRI1 a jeho dva blízce příbuzné homology BRI1-LIKE 1 (BRL1) a BRI1 LIKE 3 (BRL3) se vysoce specificky váže brassinolid, je tedy receptorem pro BRs (*Kinoshita et al. 2005*). Brassinolid má větší afinitu pro BRL1 díky nepatrné strukturální změně ve vazebném místě (*She et al. 2013*). Receptor BRI1 je lokalizován v plasmatické membráně a je receptorovou proteinkinázou (*Li a Chory 1997*). BRI1 má dvojí specifitu, jednak autofosforyluje serin/threonin (S/T), tak i tyrosinové zbytky. Pro aktivaci BRI1 jsou tyto modifikace nezbytné (*Oh et al. 2009*).

LRR kináza je složena z N-terminální extracelulární domény s tandemem LRR motivů, transmembránové domény a domény cytoplasmatické kinázy se specificitou ke zbytkům serinu, tyrosinu a threoninu (*Kinoshita et al. 2005*). BRI1 obsahuje extracelulární doménu bohatou na leucin opakující se v počtu

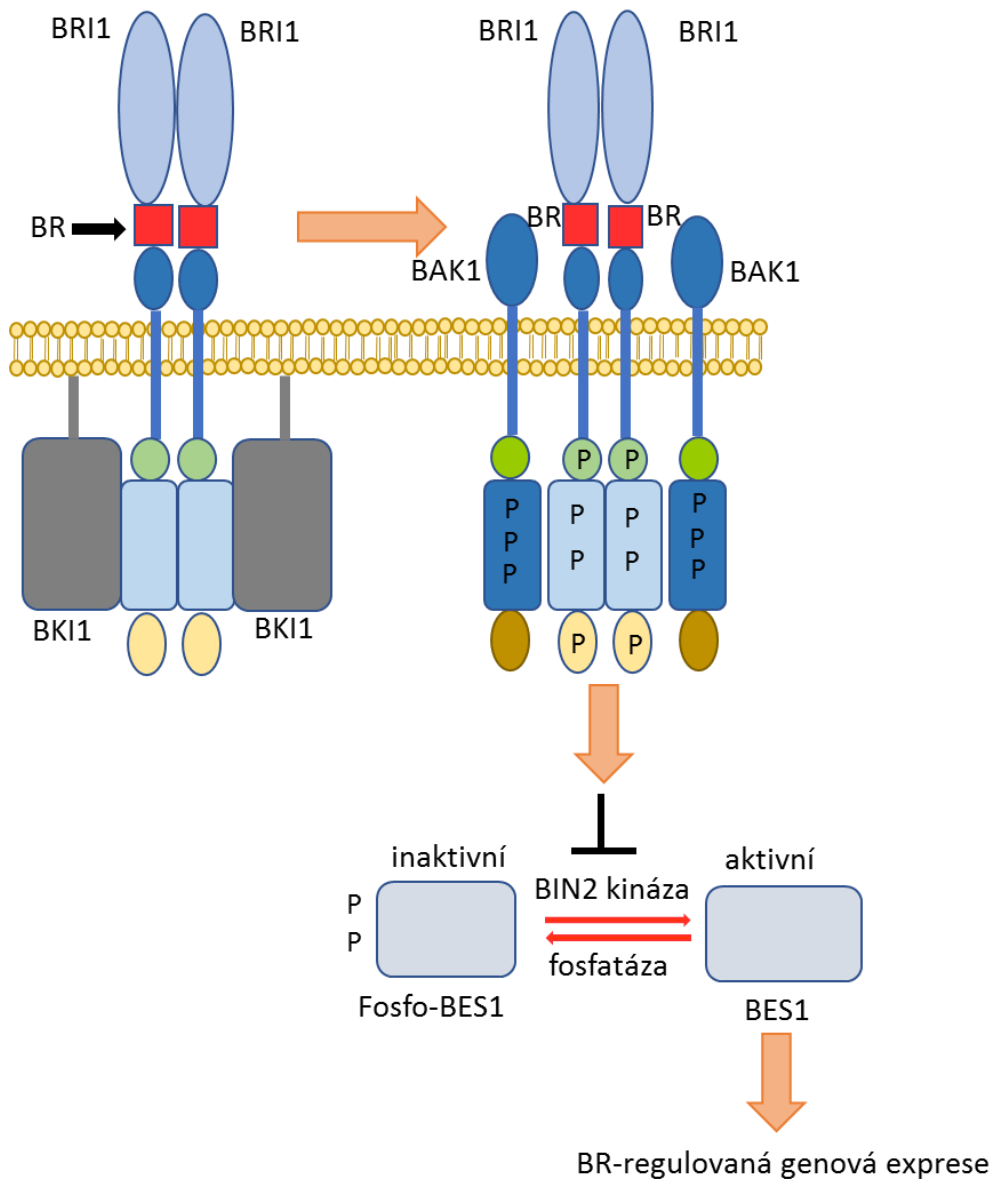
25 (25 LRRs). Spojení BRI1-LRR vytváří šroubovici (She et al. 2011). Pro vazbu je nutný 70-aminokyselinový úsek, tzv. ostrovní doména, která se nachází mezi LRR 21 a 22 a která vytváří vazebné místo pro BRs. Vazba hormonu neovlivňuje celkovou strukturu, ale způsobuje pouze lokální konformační změnu. Vytváří se hydrofobní povrch, který může zprostředkovat vazbu s neznámým proteinem (Wang et al. 2001).

Receptor BRI1 je aktivován navázáním brassinolidu a následnou autofosforylací. BRI1 je fosforylován v juxtamembránové doméně, C-terminálním konci a samotné kináze. Tyto fosforylační místa jsou důležité součásti receptorové aktivity a zároveň kontrolují disociaci inhibitoru BKI1 (inhibitor kinázy 1) z plasmatické membrány a jeho interakce s proteiny BAK1 (BRI1 asociovaná receptorová kináza 1) a BSK (BR-signalizační kináza) (Wang et al. 2005, Wang a Chory 2006, Tang et al. 2008).

Po fosforylaci vytváří BRI1 hetero-oligomer (je složen ze dvou různých monomerů) a dále fosforyluje BAK1, druhou LRR kinázu. BAK1 se aktivuje a transfosforyluje BRI1. Tento fosforylovaný heterodimer BRI1/BAK1 je aktivovanou formou receptoru a je antagonisticky regulován (Jaillais a Vert 2016).

Potlačení BR-indukované genové exprese se účastní represor BIN2 (BR-insenzitive 2). Tento gen kóduje proteinovou kinázu. Pokud není BR přítomen, BIN2 fosforyluje dva proteiny – BES1 (bri1-EMS-supresor 1) a BZR1 (brassinazol-resistentní 1). Tyto proteiny jsou klíčové transkripční faktory nacházející se v jádře. Po krátké době jsou ubikvitinovány a podléhají degradaci v proteasomu 26S (Li et al. 2018). Fosforylace BES1 a BZR1 a asociace s proteiny 14-3-3 reguluje jejich přechod z jádra do cytoplasmy, brání vazbě na cílový promotor a tím blokuje transkripci (Vert a Chory 2006). V přítomnosti BR je iniciována signální kaskáda vedoucí k transkripci genu. BSU1 (BRI1 – supresor 1) defosforyluje BIN2, tím jej inaktivuje a je degradován v proteasomu (Kim et al. 2009). Po inaktivaci jsou BES1 a BZR1 defosforylovány pomocí protein fosfatázy 2A (PP2A), následně disociovány z proteinů 14-3-3, což způsobuje jejich translokaci do jádra, navázání na DNA a regulaci exprese cílových genů (Li et al. 2018). Bylo zjištěno, že BRs zvyšují

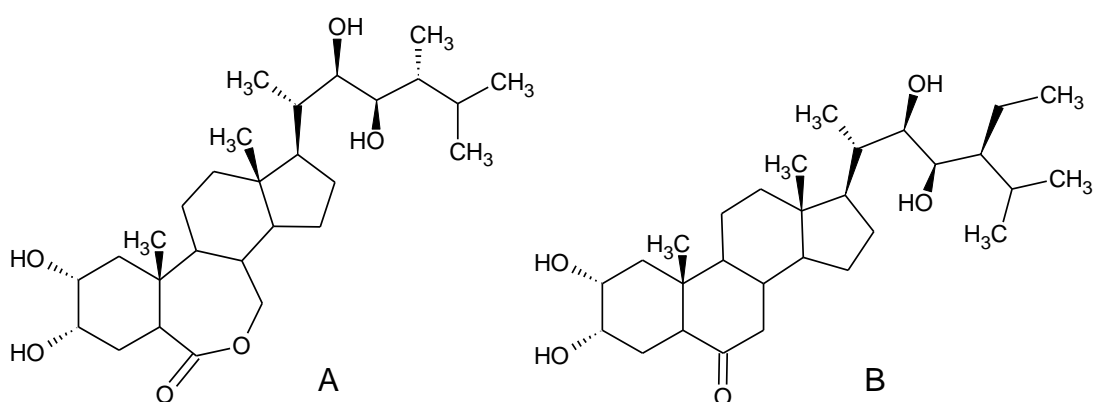
expresi supresoru BRI1 (SBI1), který je pozitivním regulátorem degradace BR1. Methyluje PP2A a kontroluje jeho přemístění, přičemž dojde ke snadnějšímu spojení s aktivovaným BR1, což vede k defosforylaci, degradaci BRI1 a ukončení BR signalizace (*Wu et al. 2011*).



Obr. 5: Signální dráha brassinosteroidů (převzato a upraveno dle *Clouse 2008*)

## 2. 1. 4 Cytotoxická aktivita

Jelikož se brassinosteroidy podobají živočišným hormonům na základě steroidního kruhu, byly zkoumány jejich účinky na lidské normální a rakovinné buňky. Důležitým krokem bylo testování aktivity 24-epibrassinolidu na myších hybridomech. Prokázalo se, že 24-epiBL dokáže zvýšit potenciál mitochondriální membrány a počet buněk v G0 fázi, zároveň dokáže snížit počet buněk v S fázi a hladinu intracelulárních protilátek (Franěk *et al.* 2003). Po tomto objevu vyvstala otázka, zda mohou mít BRs vliv nejen na hybridomové myší buňky, ale i na buňky lidské. Při studii byly zkoumány účinky vybraných BRs na lidské BJ fibroblasty a na linie různých nádorových buněk. Prokázalo se, že některá analoga BRs mají vysokou cytotoxickou aktivitu vůči rakovinným buňkám, a přitom nízkou toxicitu vůči buňkám normálním. Mezi nejúčinnější přirozené BRs patří 28-homocastasteron a 24-epibrassinolid (viz obr. 6). Průtokovou cytometrií bylo zjištěno, že oba brassinosteroidy zastavují buněčný růst v G1 fázi buněčného cyklu a dochází k indukci apoptózy. Tyto hormony byly účinné v mikromolárních koncentracích a do budoucna se BRs a jejich deriváty mohou stát protinádorovými léčivy (Malíková *et al.* 2008, Rárová *et al.* 2016).



Obr. 6: Chemická struktura 24-epibrassinolidu (A) a 28-homocastasteronu (B)

## **2. 1. 5 Účinek brassinosteroidů na růst a vývoj rostlin**

Brassinosteroidy výrazně ovlivňují růst rostlin, prodlužování buněk, buněčné dělení, reprodukci a senescenci a také stresové reakce u rostlin.

### **Vliv BRs na růst rostlin**

Brassinosteroidy mají významný vliv na růst rostlin, který byl potvrzen biotesty na druhém internodu fazole. Pokud je rostlina BR-deficientní, dochází ke sníženému růstu rostlin a také ke snížení počtu buněk. Pokud má rostlina zvýšené hladiny BRs, dochází ke zvětšení velikosti rostliny. Tento účinek je nejzřetelnější u mladých rostoucích tkání (*Mandava 1988*).

Brassinosteroidy mají vliv i na růst kořenů. Pro normální růst kořenů jsou endogenní BRs důležité, avšak exogenně aplikované BRs mohou mít jak stimulační, tak inhibiční účinek v závislosti na koncentraci. Pokud jsou aplikovány exogenní BRs ve velkých koncentracích, má to za následek zkrácení délky kořene. Prahová koncentrace, která kořen inhibuje, závisí především na použitém analogu BRs (*Müssig 2005*).

### **Vliv BRs na diferenciaci buněk**

Brassinosteroidy jsou důležitou součástí při vývoji vaskulárního systému, účastní se především diferenciaci xylému. U BR-deficientních rostlin převažuje floém nad xylémem. Pokusy byly provedeny na mezofylních buňkách ostálky sličné (*Zinnia elegans*), která je používána ke studiu diferenciaci xylému (*Iwasaki a Shibaoka 1991*).

### **Vliv BRs na reprodukci a klíčivost semen**

Nejvyšší obsah brassinosteroidů je udáván v pylových zrnech, tyčinkách nebo semenech, a proto jsou velmi důležité pro plodnost rostlin. Množství BRs

může být sníženo a to ve výsledku způsobuje nižší plodnost nebo úplnou samčí sterilitu. Mutantní *Arabidopsis thaliana* CPD je sterilní z důvodu neschopnosti tvorby pylové láčky, zatímco mutant DWF4 má pouze zkrácenou délku tyčinek. Při klíčení semen jsou důležitými hormony kyselina giberelinová a abscisová, které působí navzájem opačným efektem. Pro správnou klíčivost je nutná kyselina giberelinová – pokud je jí nedostatek, BRs se podílí na správné klíčivosti semen. Pokud je v rostlině nadbytek kyseliny abscisové, brassinosteroidy jsou důležité k překonání tohoto inhibičního účinku (Choe et al. 2000, Steber a McCourt 2001).

### **Reakce na stresové podmínky**

Rostliny jsou nepohyblivé organismy, u nichž musely být vyvinuty obranné mechanismy k ochraně a adaptaci vůči okolnímu prostředí. V důsledku působení abiotického stresu dochází k výrazným ztrátám zemědělské produkce po celém světě (Boyer 1982). Abiotickým stresem rozumíme chemické a fyzikální faktory, mezi něž se řadí nedostatek nebo nadbytek vody, světla, minerálů a vysoká či nízká teplota. Tyto podněty vedou k morfologickým a fyziologickým změnám, dochází k aktivaci podobných signalizačních drah s cílem ochrany buněk rostlin při aktuálních nepříznivých podmínkách. Podstatou je koordinovaná regulace s následnou produkcí ethylenu, kyseliny jasmonové nebo salicylové a tvorba reaktivních kyslíkových radikálů (Bajguz a Hayat 2009).

Stresové podmínky jsou intenzivně zkoumány, v přírodě jsou ale rostliny vystavovány kombinaci různých abiotických stresů (Mittler 2006). Velká část studií je prováděna za kontrolovaných podmínek v laboratoři a díky tomu nelze vytvořit takové podmínky, jakých by bylo dosaženo v přírodě. To je důvodem, proč některé z transgenních rostlin vyvinutých v laboratoři se zvýšenou tolerancí vůči určitému stresu neprokazují tytéž podmínky při vysazení do půdy (Gao et al. 2000). Aklimatizace rostlin na druh abiotického stresu vyžaduje specifickou reakci, která je přizpůsobena přesným podmínkám prostředí. Kombinace dvou nebo více druhů vyžaduje odpověď, která je jedinečná (Mittler 2006). Takovými reakcemi jsou genetické modifikace, které jsou



vyústěním přirozeného výběru po mnoho generací a fenotypová plasticita. Fenotypová plasticita je schopnost genotypu produkovat jinou fenotypovou odpověď v závislosti na změně abiotických podmínek. Dvě rostliny se stejným genotypem se tedy liší v různých znacích v závislosti na tom, v jakých podmínkách rostly (*Gianoli 2004*). Účinek brassinosteroidů při nepříznivých podmínkách je zkoumán především v zemědělství s cílem zvýšit výnos rostlin.

#### Oxidační stres

Za normálních růstových podmínek je produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) velmi nízká. Při působení stresu a narušení buněčné homeostázy dochází ke zvýšené produkci ROS – především superoxidového radikálu  $\bullet\text{O}_2^-$ , hydroxylového radikálu  $\bullet\text{HO}_2$  nebo peroxidu vodíku  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Bylo prokázáno, že při exogenní aplikaci brassinosteroidů dochází k modifikaci antioxidačních enzymů a k jejich zvýšené aktivitě. Po ošetření semenáčků kukuřice seté (*Zea mays*), jenž byla vystavena vodnímu stresu, došlo ke zvýšení aktivity superoxidodismutázy, katalázy, kyseliny askorbové a karotenoidů. Podobného výsledku bylo dosaženo u sazenice rýže nebo u řasy chlorella (*Bajguz a Hayat 2009*).

#### Osmotický stres

Z široké škály látek, které rostliny potřebují ke svému růstu a správnému fungování, patří voda k nejdůležitějším, ale nejvíce limitujícím faktorům. Dostupnost vody závisí především na podmínkách prostředí. Rostliny absorbují vodu v obrovském množství kořeny, 97 % této vody se transportuje napříč rostlinou apoplastickou cestou a odpaří se procesem zvaným transpirace. Malé množství vody zůstává v rostlině a je využito při biochemických reakcích a u metabolických procesů. Při nedostatku vody v půdě dochází k negativnímu ovlivnění základních fyziologických funkcí. Dochází ke snížení buněčného turgoru, objemu a pH, přítomné ionty jsou více koncentrované a mohou působit cytotoxicky (*Taiz a Zeiger 2010*). Negativní účinek má kromě nedostatku vody také její přebytek. Příliš mnoho vody v půdě vede ke snížené dostupnosti kyslíku do buněk, dochází k anoxii a tím ke snížení výnosů. Procesy pro snazší pronikání kyslíku z půdy jsou řízeny dalšími rostlinnými hormony, především ethylenem nebo kyselinou

abscisovou (*Bailey-Serres a Voeselek 2008*). Rostliny při osmotickém stresu syntetizují tzv. osmoprotektanty, mezi které patří prolin, manitol nebo trehalóza. Jsou to malé organické molekuly s nízkou toxicitou, jenž působí jako osmolyty (*Bajguz a Hayat 2009*).

Při oxidativním stresu hrají BRs velkou roli, dochází k prodloužení buněk, udržování integrity membrány, syntéze sacharózy a celulózy (*Clouse 2011*). Při aplikaci exogenních 24-epiBL a 28-HBL došlo u kajanu indického (*Cajanus cajan*), který byl vystaven osmotickému stresu vyvolanému polyethylglykogenem-6000 (PEG-6000), ke zlepšení klíčivosti a růstu semen díky zvýšené akumulaci kyseliny abscisové, glycinu a prolinu (*Shahana et al. 2015*). Podobných výsledků bylo dosaženo již dříve, kdy namočení semen ředkvičky do roztoku obsahujícího 24-epiBL nebo 28-HBL spolu s PEG-6000 vedlo mimo jiné k inhibici peroxidace lipidů (*Mahesh et al. 2013*). U rajčat postřikovaných roztokem s 24-epiBL došlo také ke snížení aktivity lipooxygenázy a ke zvýšení celkového obsahu sacharidů (*Behnamnia 2015*).

#### Toxické kovy

Nejenže těžké kovy způsobují ztráty plodin, ale je ohrožena i bezpečnost potravin. Kovy mohou v rostlinách inhibovat fotosyntézu, biosyntézu chlorofylu a aktivitu různých enzymů; dochází k nadprodukci reaktivních kyslíkových radikálů, které poškozují lipidy, proteiny a nukleové kyseliny (*Ahmed et al. 2015*). Aplikace exogenních BRs snižuje akumulaci toxických kovů a dochází ke zmírnění stresu. Mungo fazole (*Vigna radiata*) ošetřená 24-epiBL vykazovala v důsledku toxicity niklu zvýšení obsahu sacharidů a leghemoglobinu, což vedlo ke zlepšení růstu a výtěžnosti semen (*Yusuf et al. 2012*). Při aplikaci 24-epiBL nebo 28-HBL na rostlinu rajčete bylo pozorováno výrazné zlepšení fotosyntetické aktivity, i když rostla v půdě kontaminované kadmíem (*Hasan et al. 2011*). Je zajímavé, že při exogenní aplikaci brassinosteroidů na rostliny *Chlorella vulgaris* vystavené stresu z těžkých kovů nebyly zaznamenány výrazné rozdíly mezi hladinami endogenních brassinosteroidů (*Bajguz 2012*). Na druhé straně u *Brassica juncea* byla zaznamenána zvýšená syntéza čtyř různých BRs: 24-epibrassinolidu, castasteronu, dolicholidu a typhasterolu (*Kanwar et al. 2012*). Ačkoliv mnohé

studie jasně prokazují pozitivní vliv BRs na rostlinu vystavenou stresu, byly také zaznamenány naprosto odlišné výsledky. U *Arabidopsis thaliana* došlo při exogenní aplikaci 24-epiBL k synergické reakci s kadmíem a ke zvýšení inhibice růstu kořenů. To bylo pravděpodobně zapříčiněno druhovým rozdílem, fází růstu a způsobem aplikace BRs (Villiers et al. 2012).

### Slanost půdy

Slanost půdy je přirozená (vysoká slanost poblíž pobřeží) anebo zapříčiněna nevhodným hospodařením s vodou. K rostlinnému stresu vedou vysoké koncentrace solí ( $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$ ), toxických iontů (As a Cd) a nízké koncentrace esenciálních minerálních živin ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , N, P) (Epstein a Bloom 2005). Na slanost půdy reagují rostliny ve dvou krocích. Prvním krokem je rychlá osmotická fáze, při které je zabráněno růstu mladých listů. Druhým krokem je pomalejší iontová fáze, při níž se akumulují toxické ionty a dochází k senescenci zralých listů. Dochází také ke zhoršení struktury půdy, především se snižuje pórovitost a propustnost vody. Rostliny se na slanost adaptovaly tolerancí na osmotický stres, vyloučením sodných kationtů nebo chloridových aniontů a tolerancí rostlinné tkáně na akumulované ionty (Munns a Tester 2008).

U semen kukuřice, která byla vystavena vysoké koncentraci chloridu sodného a ošetřena 28-HBL, byl pozorován výrazný účinek – snížilo se poškození membrány a hladiny peroxidu vodíku a došlo ke zvýšení aktivity antioxidantních enzymů (Anusha et al. 2016). Při aplikaci 24-epiBL na rostliny hrachu se udržela optimální koncentrace organických a anorganických osmolytů a celkový stav vody, což vedlo ke zlepšení výnosu semen (Shadid et al. 2015).

### Teplotní stres

Teplota je pro rostliny nesmírně důležitý faktor. Každá rostlina má své teplotní optimum a jakékoliv vychýlení ji může poškodit. Vysoká teplota je nejvíce škodlivá pro rostoucí buňky a tkáně, které jsou dehydratovány. Dochází ke změně struktury membrány (zvýšení tekutosti), která může způsobit únik iontů do okolního prostředí a také se narušuje správná struktura

a aktivita enzymů. Jedním z nejškodlivějších účinků je inhibice fotosyntézy a respirace. Pokud teplota klesne pod teplotní optimum, dojde ke zpomalení růstu a ke změně barvy listů. Kořeny přestanou absorbovat vodu, sníží se fluidita membrány a inhibují se biochemické a metabolické procesy v rostlině (Taiz a Zeiger 2010). Při snížení teploty až pod bod mrazu dochází k nevratnému poškození membrány z důvodu tvorby ledových krystalů (Uemura et al. 2006).

U rostlin vystavených nízké teplotě je omezen růst, vývoj a dochází k narušení fotosyntetických procesů. Exogenní aplikace BRs stimuluje odolnost rostlin vůči těmto nepříznivým podmínkám zvýšením obsahu chlorofylu, tvorbou antioxidantních enzymů nebo snížením obsahu toxických iontů. Toto bylo potvrzeno u rajčete (Shu et al. 2016), okurky (Wei et al. 2015) nebo pepře (Jie et al. 2015), u něhož exogenní aplikace brassinosteroidů zvýšila hladinu endogenní kyseliny salicylové, jasmonové a stimulovala biosyntetickou dráhu ethylenu (Li et al. 2015, Eremina et al. 2016).

I vysoká teplota má nežádoucí vliv na fotosyntézu. Exogenní aplikace 24-epibrassinolidu zmírnila inhibici fotosyntézy indukovanou vysokou teplotou, která byla doprovázena zvýšenou aktivitou antioxidantních enzymů a sníženou peroxidací lipidů u rajčat. (Ogweno et al. 2008). Také významně zlepšila fotosyntetickou rychlost, stomátální vodivost, zvýšila regulaci obsahu fotosyntetického pigmentu a fotochemickou aktivitu PSI (Zhang et al. 2013). U baklažánu exogenní aplikace 24-epiBL výrazně minimalizovala škodlivé hladiny ROS indukované teplem a zvýšila snížený obsah askorbátu, redukovaný glutathion a prolin (Wu et al. 2014).

## **2. 1. 6 Metody stanovení BRs**

Brassinosteroidy jsou netěkavé, vysoce hydrofobní hormony, které se v rostlinném materiálu nachází ve velmi malém množství a spolu s velkým množstvím interferujících látek, proto musely být vyvinuty specifické metody pro jejich úspěšné stanovení (Tarkovská et al. 2016). První publikovanou

metodou pro analýzu brassinosteroidů byla plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Tato metoda měla ale značné nevýhody, BRs musely být derivatizovány a nedocházelo ke kvantifikaci některých analogů z důvodu odlišné chemické struktury (*Takatsuto et al. 1982*). V dnešní době se dává přednost kapalinové chromatografii s hmotnostní spektrometrií. Zmražená rostlinná tkáň je homogenizována a rozvážena do zkumavek. Pro extrakci se používají organická rozpouštědla, především metanol a acetonitril, která obsahují různá množství vody (0–70 %). Mezi nejvíce interferující látky, které způsobují přílišný šum pozadí, patří rostlinné pigmenty a fenolické látky. Účinnou metodou pro jejich minimalizaci je extrakce na pevné fázi (SPE). SPE kolony (Supelco Discovery®) obsahují pryskyřici na bázi polyamidu, která adsorbuje polární sloučeniny s hydroxylovými skupinami. Dochází k reakci mezi amidovými skupinami pryskyřice a hydroxylovými skupinami balastních látek. Tímto způsobem je odstraněna část látek, které ruší analýzu samotných brassinosteroidů (*Tarkovská et al. 2016*). Dalším krokem zvyšujícím citlivost analýzy je imunoafinitní chromatografie (IAC). Používá se imunoafinitní sorbent s navázanou monoklonální protilátkou proti BR – (20S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-7-oxa-7 $\alpha$ -homo-5 $\alpha$ -pregnan-6-on-20-karboxylová kyselina (BR4812), která specificky váže brassinosteroidy obsahující 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -diol na kruhu A. Použití imunoafinitní chromatografie před analýzou BRs zlepšuje poměr signál/šum a snižuje matricový efekt. Pro kvantifikaci endogenních BRs se používá ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie spojená s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem. Ke každému vzorku je nezbytné přidat před SPE a IAC interní izotopicky značený standard (IS). Vzorek je poté injektován na chromatografickou kolonu a izokraticky eluován. Analyt je kvantifikován po ionizaci elektrosprejem v pozitivním iontovém módu (*Oklešťková et al. 2017*).

### **3 Materiál a metody**

#### **3. 1 Chemikálie a přístroje**

##### **Chemikálie**

Acetonitril, Affigel 10 (BioRad, Německo), azid sodný (Sigma-Aldrich, USA), DMSO, ethanol (VWR chemicals, ČR), fytoagar (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), hydrogenuhličitan sodný (Lachema, ČR), hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR), kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR), kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, USA), methanol (Lach-Ner, ČR), Murashige & Skoog médium (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), sacharóza (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), síran amonný (Lach-Ner, ČR), Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA), 24-epiBL, MK259, MK266 nasyntetizovány v Laboratoři růstových regulátorů ÚEB AVČR, směs izotopicky značených interních standardů BRs (Olchemim, ČR), látky [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-MK259, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-MK266 nasyntetizovány v Laboratoři růstových regulátorů ÚEB AVČR, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-brassinolid, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-epibrassinolid, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-castasteron, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-epicastasteron, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-typhasterol, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-MK259, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-MK266 - zásobní roztok stabilně izotopicky značených interních standardů rozpuštěných v methanolu na koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

##### **Biologický materiál**

Hrách setý (Karlova Univerzita), *Arabidopsis thaliana* col-0 ekotyp, kožní fibroblasty (banka ATCC).

##### **Složení roztoků**

PBS pufr: 0,87 g NaCl, 7,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O na 1 litr destilované vody; pH 7,2.

##### **Přístroje**

Analytické váhy – CPA225D, Sartorius, Německo

Centrifuga – Heraeus Biofuge Stratos, Trigon plus, Česká republika

Fluorescenční reader pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Acsent – Thermo Labsystem

Mikroskop – Nikon TMS

Kolona Acquity CSH™ C<sub>18</sub>; 2,1 x 50 mm, 1,7 μm – Waters, Irsko

Kulový mlýnek – HM 301, Retsch, Česká republika

Laminární flowbox – Heto-Holten, Dánsko

pH metr – Eutech Instruments, Nizozemsko

Tandemový hmotnostní spektrometr Xevo® TQ MS – Waters MS Technologies, Anglie

Ultra-účinný kapalinový chromatograf Acquity UPLC™ – Waters, USA

Ultrazvuk – Elmasonic S10, Elma, Česká republika

Vakuový manifold – Visiprep, Supelco, USA

Vortex – Velp Scantifica, Chemos, Česká republika

## **3. 2 Metody práce**

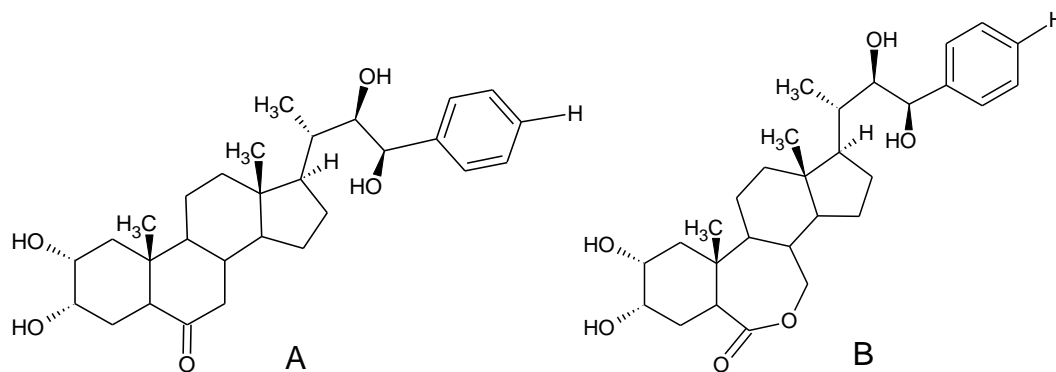
### **3. 2. 1 Testování cytotoxicity vybraných derivátů BRs**

Testování cytotoxicity probíhalo ve sterilních podmínkách ve flowboxu s laminárním prouděním vzduchu, aby došlo k minimalizaci možné kontaminace z okolního prostředí. Pro pěstování buněk je důležité správné složení kultivačního média a vlastnosti okolního prostředí, které zajišťuje inkubátor. Lidské buňky se kultivují při teplotě okolo 37 °C, tak jako je teplota lidského těla. Okolní atmosféra byla obohacena o oxid uhličitý, který se spolupodílí na udržení pH média. Relativní vlhkost atmosféry se udržuje kolem 90 %, aby nedošlo k odpaření vody z média a tím ke změně koncentrace složek v něm obsažených. Kultivační médium má své přesné složení pro zajištění správného růstu kultivovaných buněk. Hodnota pH je blízká 7,4,

podobně jako je pH krve a dalších tělesných tekutin. Jako zdroj energie slouží glukosa a L-glutamin. Mezi další látky, které jsou obsaženy v médiu, patří anorganické soli, vitamíny, růstové faktory, peptidy, lipidy a stopové prvky. Aby nedocházelo ke kontaminaci bakteriemi, přidává se do média také malé množství antibiotik, nejčastěji penicilinu nebo streptomycinu. Buňky se poté množí exponenciálně a při kontaktní inhibici se musí kultura naředit a nasadit do nových kultivačních nádob (Vejražka 2007).

Byla testována tři analoga brassinosteroidů – 24-epibrassinolid, MK259 a MK266 (viz obr. 7). Syntetické deriváty MK259 a MK266 byly syntetizovány v Laboratoři růstových regulátorů (Kvasnica et al. 2016). Testy byly provedeny na lidských fibroblastech BJ-36.p. pocházející z americké buněčné banky ATCC. Z narostlé kultivační nádoby se trypsinizací uvolnily buňky, jejichž počet byl stanoven pomocí Bürkerovy komůrky. Bylo vypočítáno, že v 5 ml se nachází 2 100 000 buněk. Toto množství bylo potřeba přepočítat tak, aby se v 80  $\mu$ l média nacházelo 5000 buněk (952  $\mu$ l buněčné suspenze a 5448  $\mu$ l média). Buněčná kultura byla napipetována do 96-jamkové desky vyjma krajních jamek, kde se nacházelo pouze médium a deska byla inkubována 24 hodin při 37 °C. Po uplynutí 24 hodin se k buněčné kultuře přidaly testované látky. Sloupec 2 sloužil jako kontrola, byla zde pouze buněčná kultura. Ve sloupci 3-5 byla látka MK259, ve sloupci 6-8 MK266 a ve sloupci 9-11 24-epibrassinolid. Jejich zásobní koncentrace byla 7,5 mM. Každá látka se v mikrotitrační destičce nacházela v 6 různých koncentracích ve třech opakování (viz obr. 8). Po 72 hodinové inkubaci byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem a nabarveny trypanovou modří. Inkubace trvala 3 hodiny, poté byly buňky vizuálně zkontrolovány pod mikroskopem na základě změny barvy a pomocí fluorescenčního readeru byla změřena míra fluorescence při 544/590 nm (excitace/emise).





Obr. 7: Chemická struktura MK259 (A) a MK266 (B)

	médium b. kultura		MK259 $\mu\text{l}/\text{jamka}$			MK266 $\mu\text{l}/\text{jamka}$			24-epiBL $\mu\text{l}/\text{jamka}$			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		kontrola	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
C		kontrola	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	
D		kontrola	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	
E		kontrola	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	
F		kontrola	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	
G		kontrola	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
H												

Obr. 8: Schéma 96-jamkové desky pro určení cytotoxicity analogů BRs

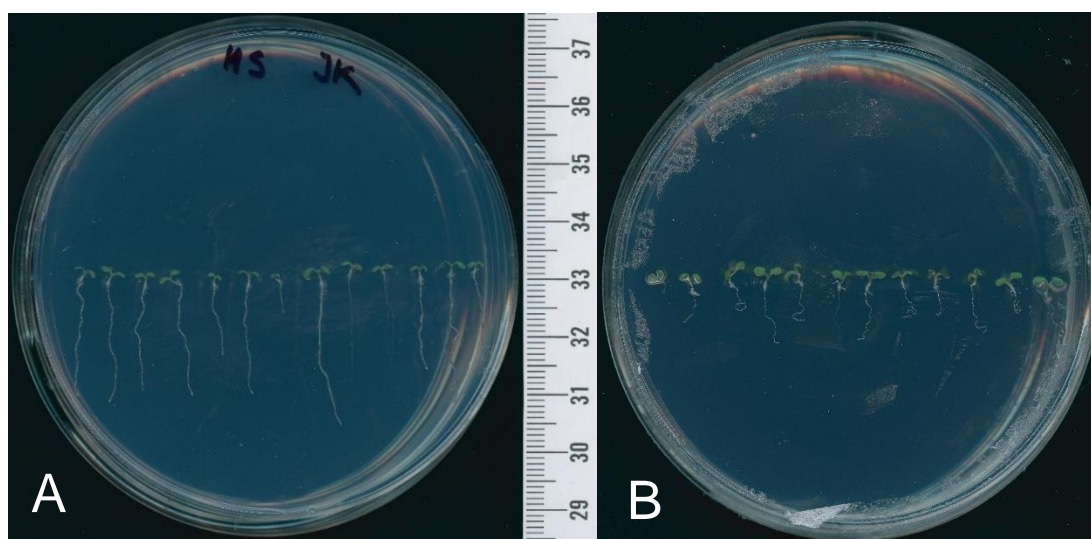
### 3. 2. 2 Příprava média a vertikálních desek, výsev

Pro studium biologické aktivity vybraných BRs byla použita modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* a biotest založený na inhibici růstu kořene. Rostliny byly kultivovány v *in vitro* podmínkách na vertikálních deskách. Na přípravu kultivačního média bylo naváženo 0,66 g Murashige&Skoog média (MS) a 3 g sacharózy. Látky byly rozpuštěny v redestilované vodě, pH bylo upraveno hydroxidem sodným o koncentraci 0,1 M na pH 5,7 a objem byl doplněn na 300 ml. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 2,1 g fytoagaru a následně zalito připraveným roztokem. Baňka byla překryta alobalem s páskou pro kontrolu sterilizace. Médium, Petriho miska s filtračním papírem, špičky, párátka a destilovaná voda byly sterilizovány v autoklávu. Po sterilizaci bylo ve flowboxu nalito do sterilní zkumavky 20 ml média. K němu

bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  DMSO anebo 20  $\mu\text{l}$  testované látky o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  –  $1 \cdot 10^{-7}$  M. Zkumavka s médiem byla několikrát promíchána pomalým a opakovaným převrácením, poté bylo médium nalito na desku a necháno ztuhnout.

Před výsevem na desku musela být semínka *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia-0 (col-0) vysterilizována pro zabránění nežádoucí kontaminace. Do mikrozskumavky bylo odsypáno malé množství semínek, ke kterým bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  sterilizačního roztoku (70% ethanol (v/v), 0,1% Tween 20). Mikrozskumavka byla uzavřena a míchána po dobu 5 minut při 4 °C. Po uplynutí této doby bylo ve flowboxu odstraněno přebytečné množství sterilizačního roztoku a semínka přenesena na filtrační papír v Petriho misce.

Vysterilizovaná semínka byla vysévána pomocí párátka v množství asi 15 kusů na jednu kultivační desku. Desky s vysetými semínky byly uzavřeny a zataženy páskou Softpore z netkaného textilu. Poté byly zabaleny do alobalu a vloženy do lednice dnem dolů (den č. 0) kvůli synchronizaci klíčení. Za dva dny od vysetí (den č. 2) byly desky přeneseny do fytotronu a uloženy vertikálně do stojanů (fotoperioda 16 hodin světlo / 8 hodin tma, teplota 23 °C). V den č. 7 byly desky oskenovány (viz obr. 9) a byla změřena délka kořene a hypokotylu v programu ImageJ.



Obr. 9: Týdenní semenáčky *Arabidopsis thaliana* – A: bez ovlivnění hormony, B: ovlivněné 100 nM 24epiBL

### **3. 2. 3 Kultivace rostlin hrachu setého**

Pro analýzu brassinosteroidů byly kultivovány rostliny hrachu setého (*Pisum sativum*) rostoucí za normálních a stresových podmínek. Experiment byl prováděn ve spolupráci s Laboratoří genetiky rostlin (Katedra genetiky a mikrobiologie PŘF UK v Praze). Rostliny byly pěstovány ve skleníku za přirozených světelných podmínek. Po 3 týdnech růstu byly na rostliny aplikovány studované látky formou postřiku, který byl opakován po dobu 7 dnů. U kontrolních rostlin byl postřik proveden pouze destilovanou vodou. Další 3 týdny byla část rostlin vystavena stresu suchem, druhá část rostlin byla nadále zalévána. Po ukončení pokusu byla u studovaných rostlin stanovena hmotnost sušiny. Studované BRs byly testovány v 7 koncentracích ( $10^{-5}$ - $10^{-11}$  M) a minimálně 20 biologických opakováních/koncentraci. Část rostlin byla po ukončení pokusu zamražena a použita pro analýzu endogenních hladin BRs.

### **3. 2. 4 Extrakce vzorků pro analýzu BRs**

Vzorky hrachu byly homogenizovány pod tekutým dusíkem, rozváženy do mikrozkuvek po 100 mg a uchovány při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ke každému vzorku byly přidány 2 extrakční kuličky a 1,5 ml extrakčního činidla - 60% acetonitrilu (v/v). Vzorky byly homogenizovány v extrakčním mlýnu po dobu 6 minut a frekvenci 27 Hz, 3 minuty v sonikační lázni a extrakce následně probíhala po dobu 12 hod. při  $4^{\circ}\text{C}$ . Po uplynutí této doby byly vzorky centrifugovány (10 minut při 17 000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ), supernatan byl odebrán a ke každému vzorku byla přidána směs deuterovaných standardů  $\text{D}_3/\text{D}_6$  – BRs (25 pmol/vzorek).

### **3. 2. 5 SPE purifikace**

Pro SPE purifikaci byly použity kolony Discovery DPA – 6S (Supelco) 250 mg. Kolony byly aktivovány promytím 3 ml 100% methanolu a ekvilibrovány 3 ml 60% acetonitrilu (v/v). Na takto připravené kolony byl nanesen vzorek a frakce

byla sbírána do připravených zkumavek. Vzorky byly odpařeny na rotační vakuové odparce.

### **3. 2. 6 Imunoafinitní chromatografie**

Imunoafinitní gel (*Oklešťková et al. 2017*) o objemu 500  $\mu\text{l}$  v kolonkách s fritou byl zregenerován takto: 3 ml PBS pufru, 3 ml destilované vody, 3 ml acetonitrilu, 3 ml destilované vody a 3 ml PBS pufru. Vzorky byly rozpuštěny v 75  $\mu\text{l}$  100% methanolu a 925  $\mu\text{l}$  PBS pufru, poté byly vloženy do ultrazvuku na 3 minuty. Po rozpuštění byly vzorky naneseny na kolonku a jímány do stejné zkumavky. Celý proces byl 7x zopakován pro zvýšení výtěžnosti. Potřebný analyt se navázal na imunoafinitní gel a kolona byla promyta 9 ml destilované vody pro odstranění nečistot. Analyty byly eluovány 3 ml 100% methanolu, jímány do skleněné zkumavky a odpařeny do sucha na TurboVap dusíkové odparce.

### **3. 2. 7 Analýza vzorků pomocí UHPLC-MS/MS**

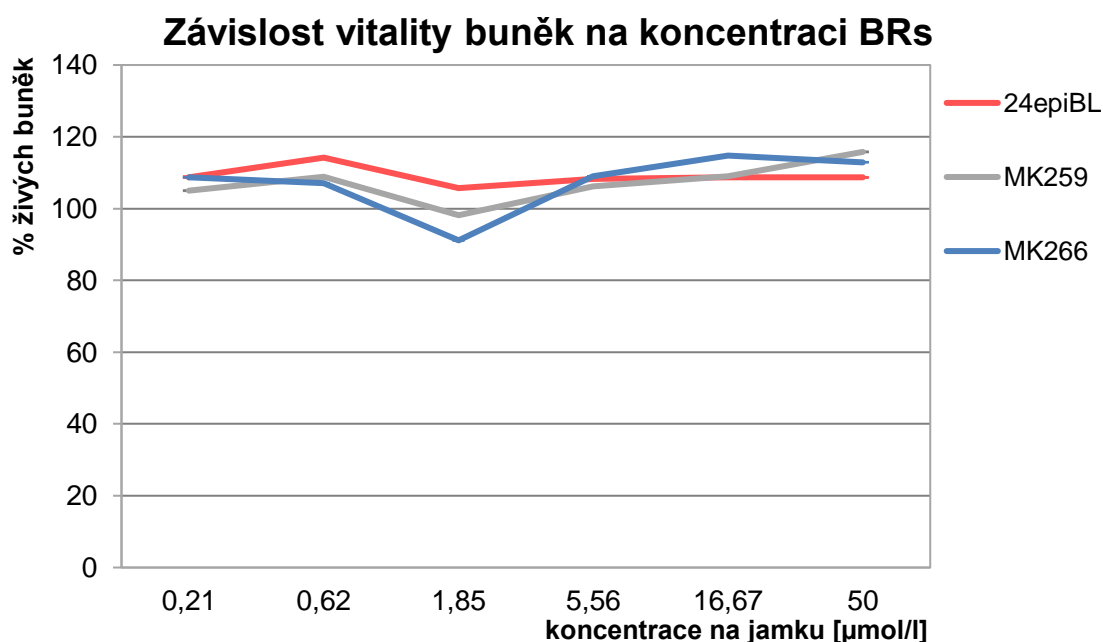
Po imunoafinitní chromatografii byly vzorky rozpuštěny v 50  $\mu\text{l}$  100% methanolu, 3 minuty sonifikovány a přeneseny do vialek a inzertů. Z každého vzorku bylo injektováno 5  $\mu\text{l}$  na UHPLC chromatografickou kolonu s reverzní fází (Acquity CSH Phenyl-Hexyl, 2,1 mm x 50 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ). Kolona byla temperována na 40 °C. Mobilní fází byl acetonitril (A) okyselený 10 mM kyselinou mravenčí (B). BRs byly izokraticky eluovány během 1,5 minuty. Pro následnou kvantifikaci byl použit kvadrupólový hmotnostní spektrometr Xevo TQ MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) s ionizací elektrosprejem a kolizní celou Scan Wave. Brassinosteroidy byly analyzovány v pozitivním iontovém módu (ESI+). Hmotnostní spektrometr byl nastaven takto: napětí na kapiláře 3,0 kV, napětí na kóně 20 V, teplota zdroje 120 °C, teplota desolvatačního plynu 550 °C, průtok plynu na kóně 70 L h<sup>-1</sup> a průtok desolvatačního plynu 600 L h<sup>-1</sup> (*Oklešťková et al. 2017*). Následné

vyhodnocení jednotlivých analytů proběhlo pomocí programů MassLynx™ a TargetLynx™. Kvantifikace BRs v analyzovaných rostlinných vzorcích byla provedena s využitím metody izotopického ředění.

## 4 Výsledky

### 4.1 Stanovení cytotoxicity

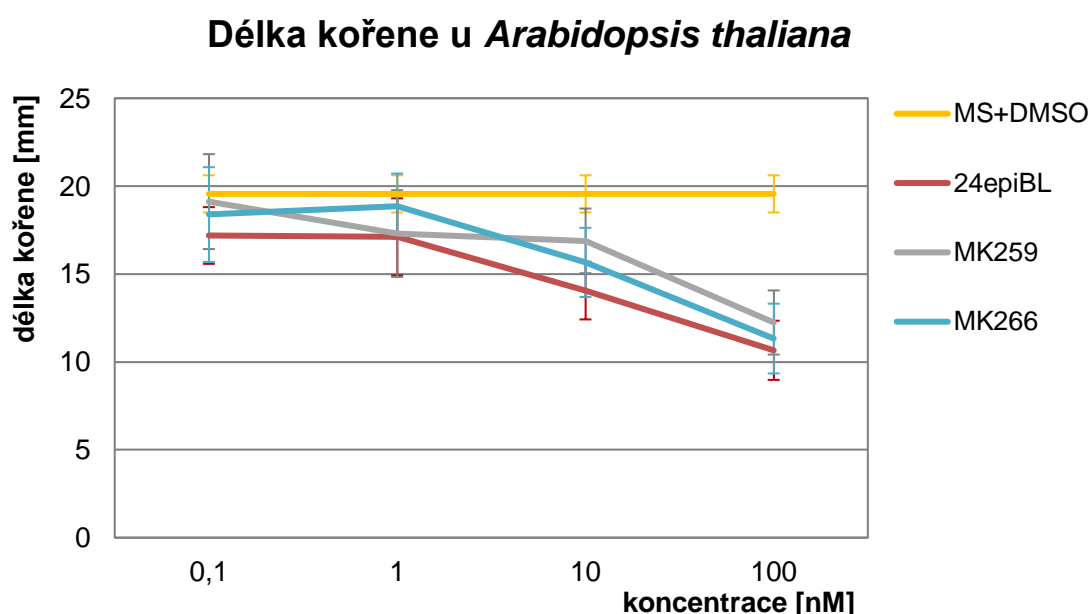
Pro použití syntetických derivátů rostlinných hormonů v zemědělství je nutné nejprve určit jejich cytotoxickou aktivitu. V případě toxicity je nelze použít z důvodu bezpečnosti pro člověka. Při testování cytotoxické aktivity tří analogů BRs (24epiBL, MK259, MK266) na lidských fibroblastech bylo potvrzeno, že nejsou pro živé buňky toxické (viz graf 1), téměř 100 % buněk zůstalo po ošetření BRs vitálními. Pokud by toxické byly, došlo by u mrtvých buněk k porušení plazmatické membrány a barvivo, s nímž byly buňky inkubovány, by volně vtékalo do buňky a zbarvilo ji modře. U živých buněk barvivo do buňky nevtéká a zůstávají bezbarvé.



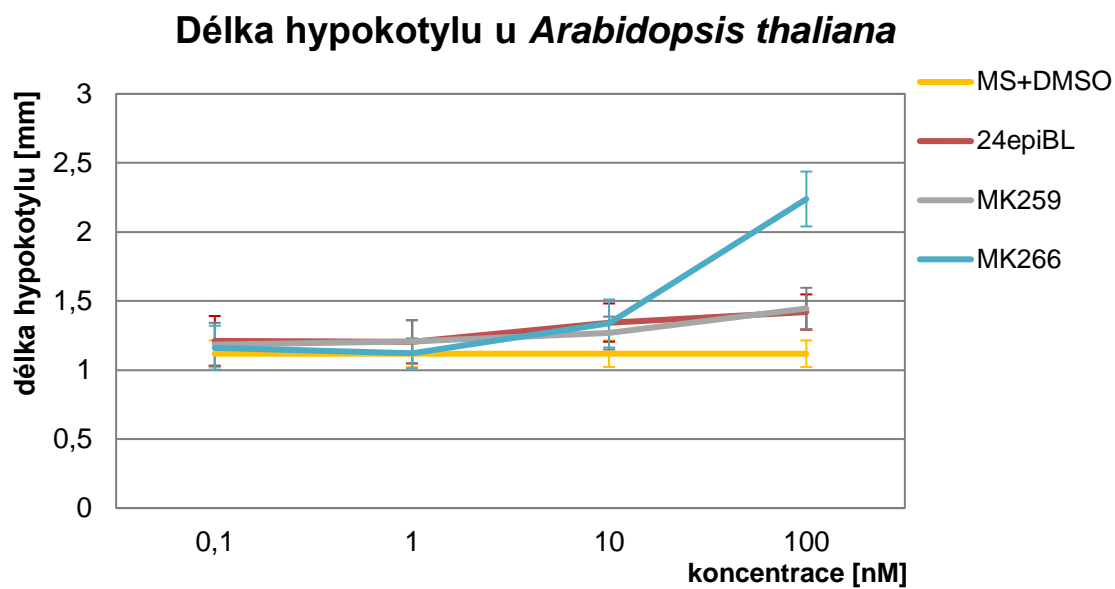
Graf 1: Závislost životaschopnosti buněk na koncentraci 24epiBL, MK259 a MK266

## 4. 2 Stanovení biologické aktivity vybraných derivátů BRs

Deriváty (MK259, MK266) syntetizované v Laboratoři růstových regulátorů byly na základě počítačového modelování (*Kvasnica et al. 2016*) vybrány ke stanovení biologické aktivity spolu s 24-epibrassinolidem (pozitivní kontrola) na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* rostoucí v kultivačních deskách ve fytotronu. Jedna miska byla kontrolní a obsahovala pouze MS, další kultivační miska obsahovala MS s 20  $\mu$ l DMSO, který byl použit jako rozpouštědlo pro zkoumané látky a mohl by na rostliny působit inhibičně. V dalších miskách byly v médiu obsaženy i testované hormony v koncentracích  $10^{-4}$  až  $10^{-7}$  M. Týdenní rostlinky byly oskenovány a následně změřeny v programu ImageJ. Měřila se jak délka kořene, tak délka hypokotylu. Bylo zjištěno, že vysoké koncentrace 24epiBL, MK259 a MK266 inhibují růst kořene a stimuluje růst hypokotylu. Růst hypokotylu nejvíce stimulovala látka MK266. Biologická aktivita syntetických derivátů MK259 a MK266 byla srovnatelná s 24-epibrassinolidem.



Graf 2: Studium vlivu hormonů 24epiBL, MK259 a MK266 na délku kořene modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*



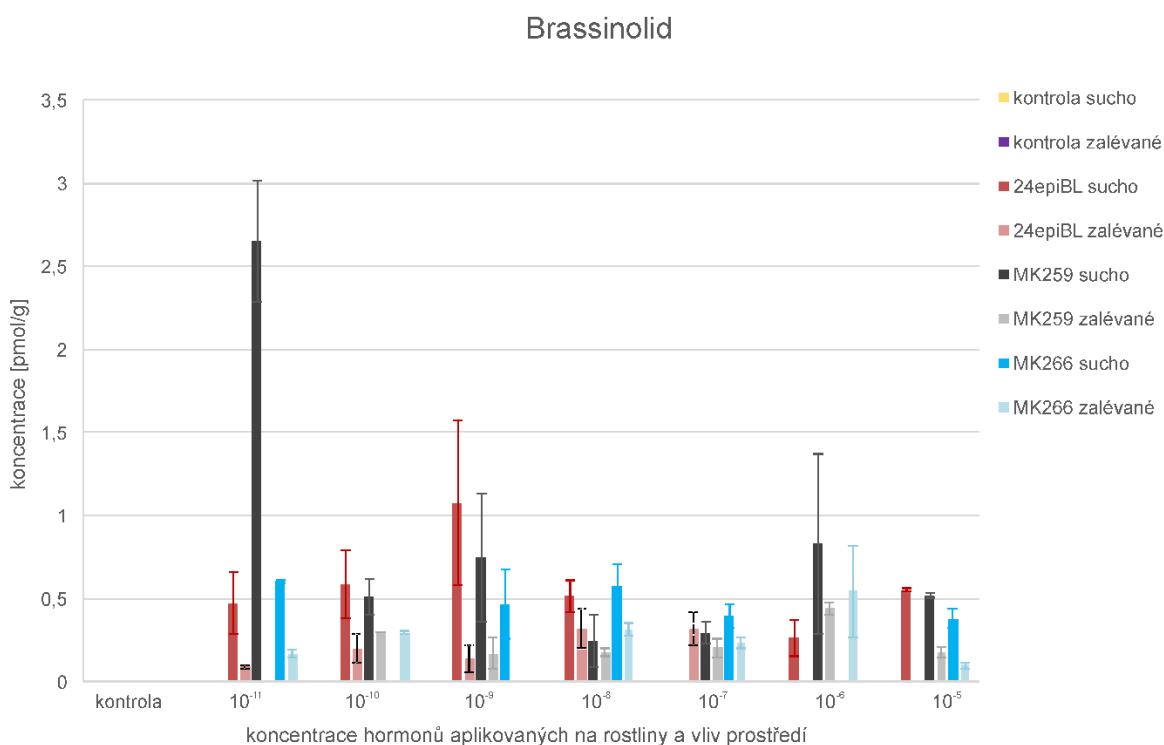
Graf 3: Studium vlivu hormonů 24epiBL, MK259 a MK266 na délku hypokotylu modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*



### 4. 3 Stanovení hladin derivátů BRs v rostlinném materiálu

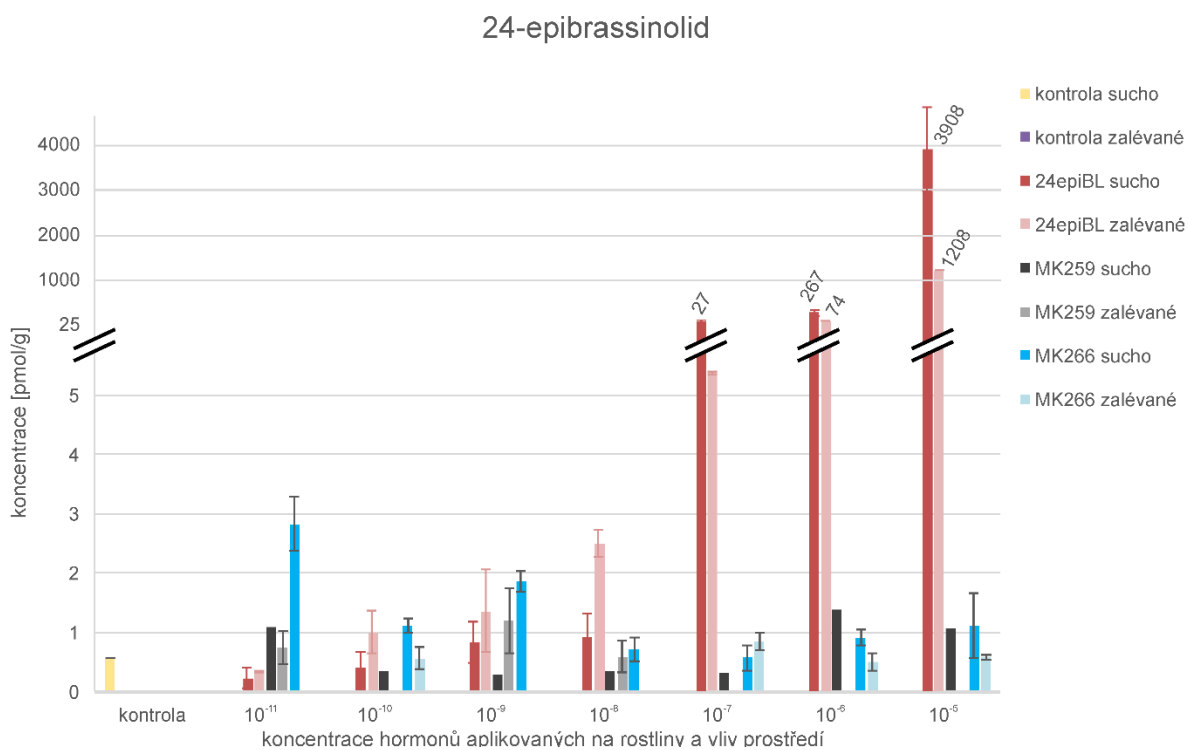
Hladiny derivátů BRs byly stanoveny u rostlin hrachu setého, na něž byly aplikovány studované látky formou postřiku a které rostly za normálních a stresových podmínek. Hladiny jednotlivých BRs byly analyzovány systémem UHPLC-MS/MS a vyhodnoceny v programech MassLynx™ a TargetLynx™.

Hormon brassinolid se nacházel v nejvyšší koncentraci u rostliny rostoucí za stresových podmínek, která byla postřikována roztokem s MK259 o koncentraci  $10^{-11}$  M, jeho hodnota byla 2,64 pmol/g. Hodnoty brassinolidu u rostlin postřikovaných dalšími hormony v různých koncentracích byly podobné. U kontrolní rostliny rostoucí v normálních a stresových podmínkách byla hodnota brassinolidu mimo detekční limit (viz graf 4).



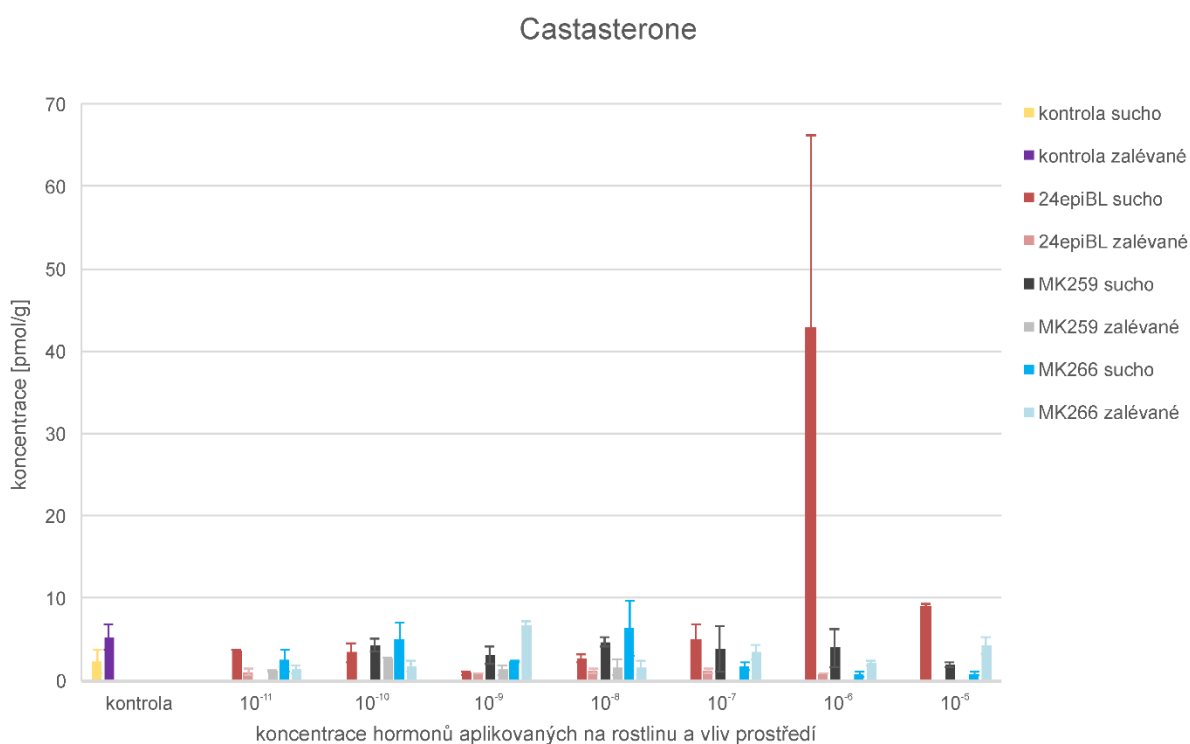
Graf 4: Koncentrace brassinolidu v rostlinném materiálu v závislosti na aplikaci různých hormonů a podmínek prostředí

Hormon 24-epibrassinolid se nacházel v nejvyšším množství u rostlin postřikovaných 24-epiBL v koncentracích  $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  M. Celkově ale detekované hladiny nebyly tak vysoké, jako hladiny MK259 a MK266 u rostlin, které byly postřikovány roztoky s MK259 a MK266 (viz graf 10 a 11). U kontrolní rostliny byl 24-epiBL detekován pouze při růstu za stresových podmínek (viz graf 5).



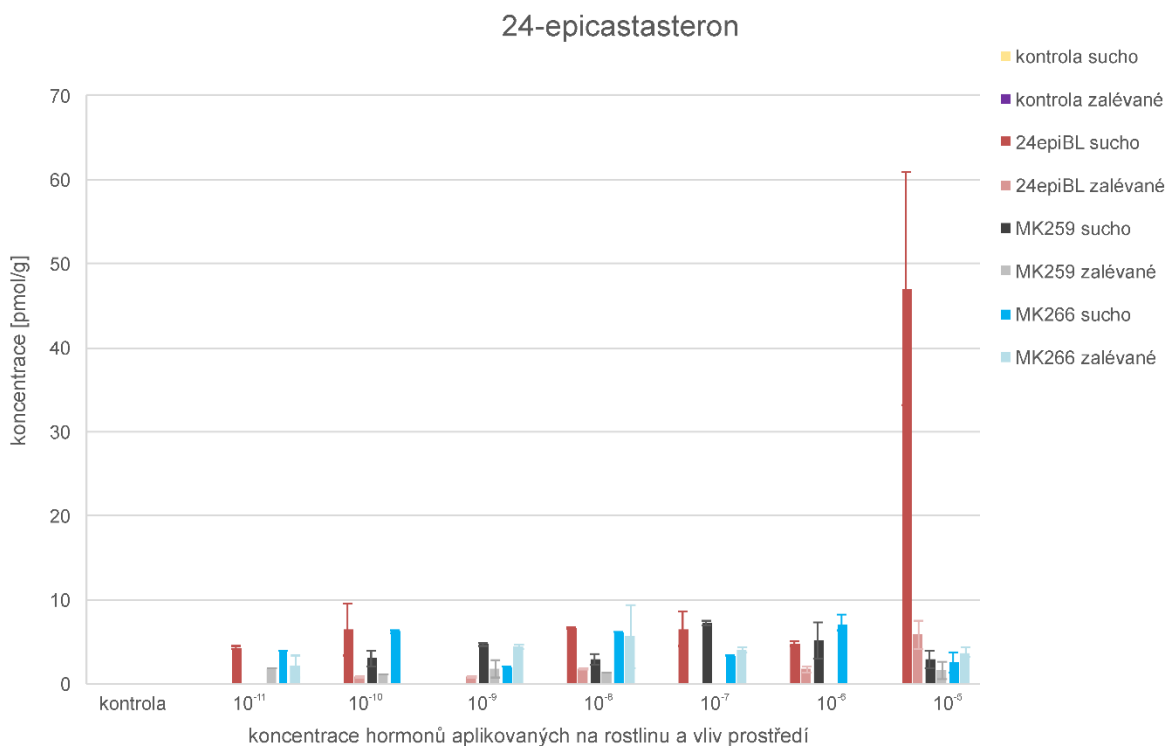
Graf 5: Koncentrace 24-epibrassinolidu v rostlinném materiálu v závislosti na aplikaci různých hormonů a podmínek prostředí

Hladiny hormonu castasteronu byly detekovány jak u kontrolní rostliny, tak u dalších vzorků. Jeho koncentrace byla při postřiku 24epiBL, MK259 a MK266 u všech rostlin velmi podobná. Výrazný nárůst byl pozorován pouze u rostliny rostoucí ve stresových podmínkách a postřikované roztokem s 24-epibrassinolidem o koncentraci  $10^{-6}$  M – jeho hodnota byla téměř 43 pmol/g (viz graf 6).



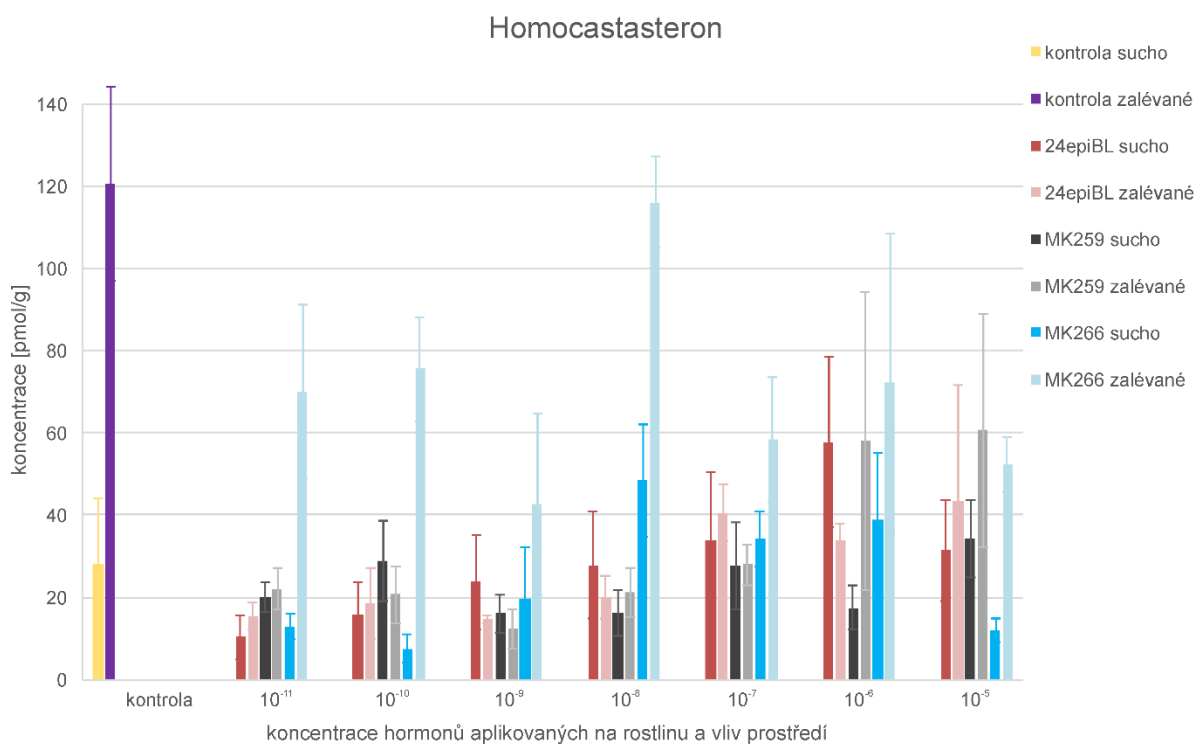
Graf 6: Koncentrace castasteronu v rostlinném materiálu v závislosti na aplikaci různých hormonů a podmínek prostředí

Hormon 24-epicastasteron se u kontrolní rostliny našel pod limitem detekce, jeho nejvyšší hodnota byla stanovena u rostliny stresované suchem postříkované roztokem s 24-epibrassinolidem o koncentraci  $10^{-5}$  M – 47 pmol/g. U dalších rostlin rostoucích za normálních a stresových podmínek byla hodnota tohoto hormonu velmi podobná (viz graf 7).



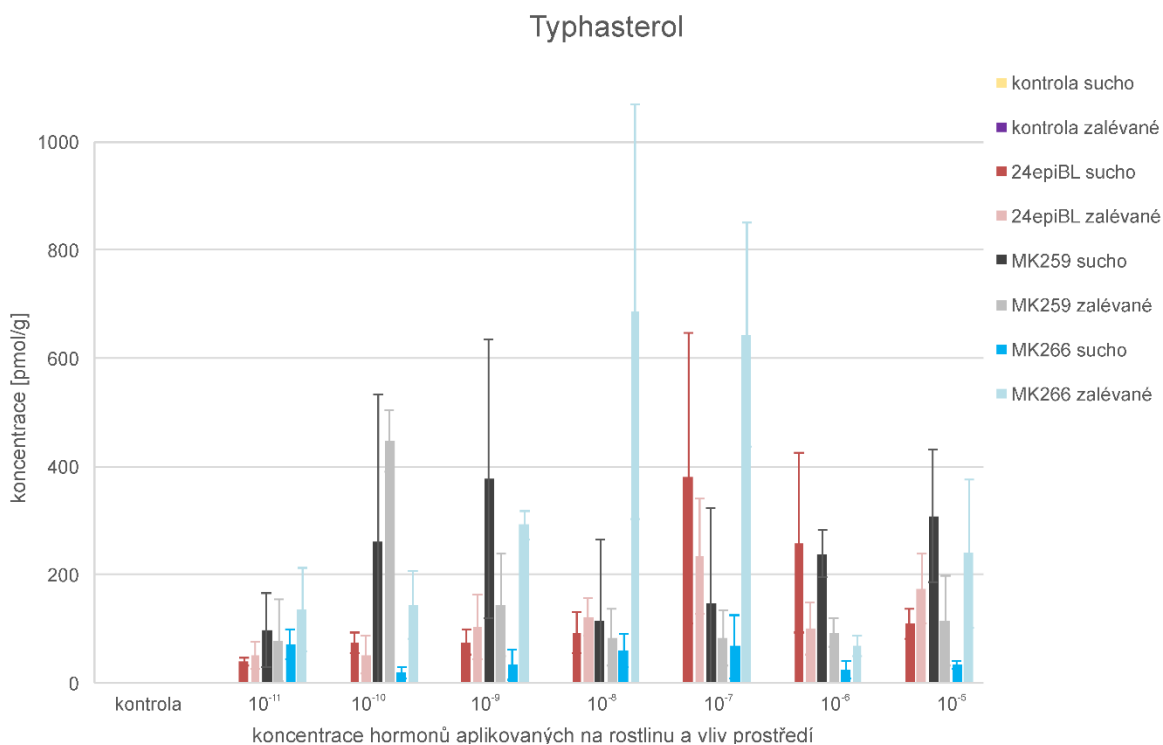
Graf 7: Koncentrace 24-epicastasteronu v rostlinném materiálu v závislosti na aplikaci různých hormonů a podmínek prostředí

Nejvyšší hladina hormonu homocastasteronu byla zaznamenána u kontrolní rostliny rostoucí za normálních podmínek – 120 pmol/g. Vysoké hladiny byly také zaznamenány u zalévaných rostlin, které byly postříkovány roztokem s MK266 ve všech studovaných koncentracích. Hormon homocastasteron byl ale jinak detekován u všech rostlin postříkovaných všemi studovanými koncentracemi v podobném množství (viz graf 8).



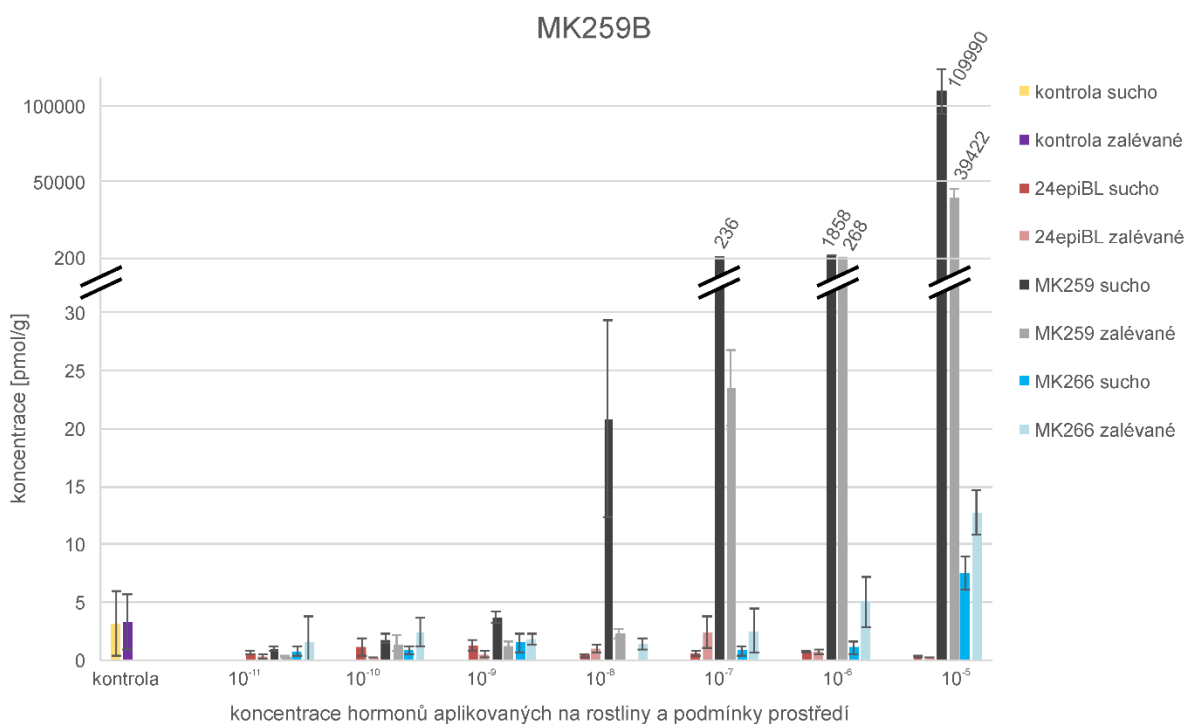
Graf 8: Koncentrace homocastasteronu v rostlinném materiálu v závislosti na aplikaci různých hormonů a podmínek prostředí

Nejvyšší hladiny typhasterolu byly detekovány u rostlin rostoucích za normálních podmínek, které byly postříkovány roztokem s MK266. U kontrolní rostliny nebyla hladina typhasterolu detekována (viz graf 9).



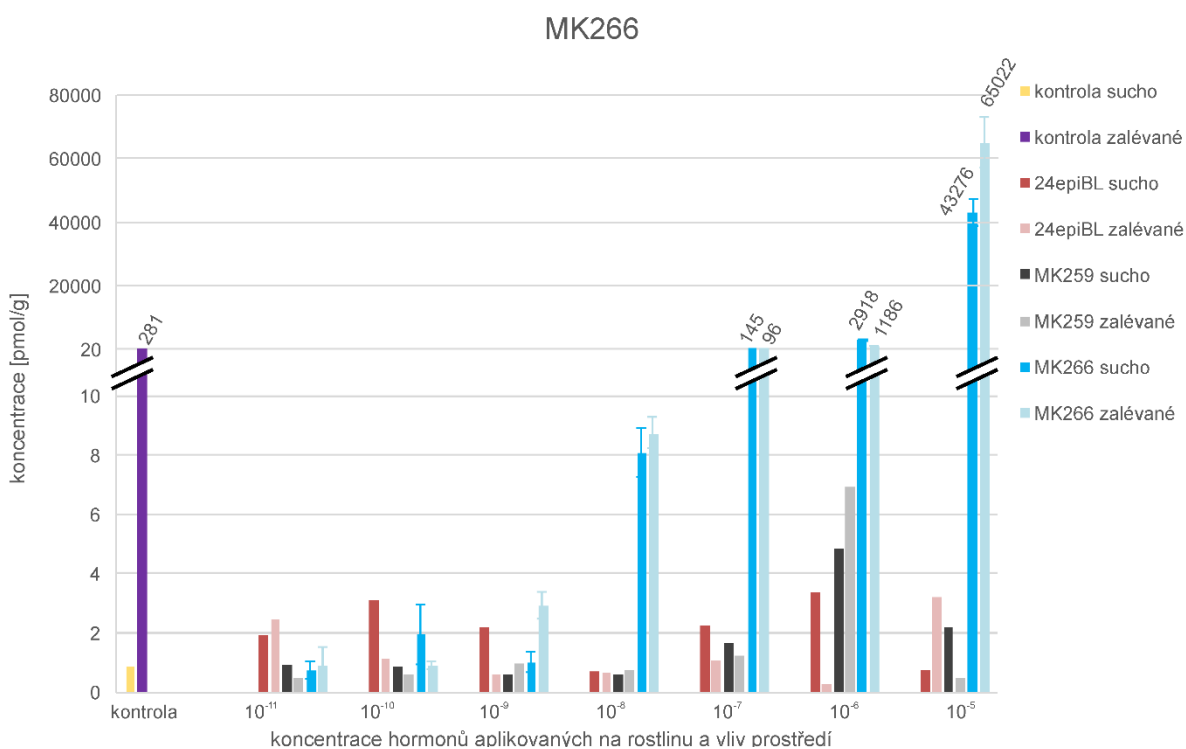
Graf 9: Koncentrace typhasterolu v rostlinném materiálu v závislosti na aplikaci různých hormonů a podmínek prostředí

Látka MK259 je syntetický derivát brassinosteroidů a jako taková by se neměla vyskytovat jako endogenní BR u rostlin. Zjištěná koncentrace u kontrolních rostlin je nejspíše způsobena kontaminací těchto rostlin při postřiku. Nízká hladina této látky byla detekována u rostlin postřikovaných roztoky v rozmezí koncentrací  $10^{-11}$ – $10^{-9}$  M. Nejvyšších hladin bylo dosaženo u postřikovaných rostlin roztokem s MK259 o koncentraci  $10^{-5}$  M rostoucích za stresových podmínek – až 109 990 pmol/g. Nízké hladiny MK259 u rostlin, na které byla aplikována látka MK266 rovněž ukazují na možnou kontaminaci při postřiku (viz graf 10).



Graf 10: Koncentrace MK259 v rostlinném materiálu v závislosti na aplikaci různých hormonů a podmínek prostředí

Detekce látky MK266 ve větším množství u kontrolních rostlin opět ukazuje na možnost kontaminace těchto rostlin při postřiku testované látky. Nejvyšších hladin bylo dosaženo u rostlin postřikovaných roztokem s MK266 o koncentraci  $10^{-5}$  M, které rostly za normálních podmínek – až 65 022 pmol/g. Zjištěná koncentrace MK266 u rostlin, na které byla aplikována pouze látka MK259, mohou být způsobeny opět kontaminací při postřiku nebo u rostlin může docházet k metabolické přeměně látky MK259 na látku MK266 (obdobu biosyntetické přeměny castasteronu na brassinolid katalyzované pomocí enzymu CYP85A2) (viz graf 11).



Graf 11: Koncentrace MK266 v rostlinném materiálu v závislosti na aplikaci různých hormonů a podmínek prostředí



## 5 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo objasnit, zda mají dva syntetické deriváty brassinosteroidů – MK259 a MK266 vliv na zvýšení tolerance rostlin vůči abiotickým stresům. Testování bylo započato zjištěním, zda jsou studované deriváty toxické vůči živým buňkám. *In vitro* studie provedená na lidských fibroblastech jasně prokázala, že MK259 a MK266 nevykazují cytotoxickou aktivitu vůči normálním lidským buňkám a lze je bezpečně použít u rostlin, aniž by došlo k ohrožení bezpečnosti člověka. Při koncentracích v rozmezí 0,21  $\mu\text{mol/l}$  až 50  $\mu\text{mol/l}$  se procento živých buněk pohybovalo kolem 100 %. Ale i brassinosteroidy mohou působit cytotoxicky v závislosti na typu buněk, jak bylo potvrzeno například u buněk rakoviny prsu - 24-epiBL a 28-HBL zastavily buněčný cyklus v G1 fázi a způsobily apoptózu (Steigerová *et al.* 2010) a nebo u nádorových buněk prostaty – tyto hormony významně snížily počet rakovinných buněk (Steigerová *et al.* 2012) a mohly by být v budoucnu použity k vývoji nových typů léčiv.

Po ověření, že syntetické deriváty lze použít, byl zkoumán jejich vliv na biologickou aktivitu u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Tato rostlina byla vysazena do kultivačních desek obsahující MS médium s DMSO a testované látky MK259, MK266 a 24epiBL v koncentracích  $10^{-4}$  až  $10^{-7}$  M. Týdenní rostliny byly oskenovány a v počítačovém programu ImageJ byla změřena délka kořene a hypokotylu. Výsledné hodnoty odpovídaly očekávání – s rostoucí koncentrací hormonů se snižovala délka kořene. *Arabidopsis thaliana* je modelovou rostlinou, na níž byly BRs testovány dříve a bylo dosaženo obdobných účinků. Nízké hladiny exogenních BRs stimulovaly růst kořenů, zatímco 24-epibrassinolid o koncentraci  $\geq 1\text{nM}$  jejich růst výrazně inhiboval (Müssig *et al.* 2003). Opačný vliv byl pozorován u hypokotylu, s rostoucí koncentrací se zvyšovala jeho délka, nejvýraznější vliv byl pozorován u hormonu MK266. Tyto výsledky byly opět očekávané, elongace hypokotylu vlivem různých derivátů BRs byla již potvrzena (Nakamura *et al.* 2017).

Ve spolupráci s Laboratoří genetiky rostlin (PřF UK v Praze) byl studován vliv testovaných derivátů na endogenní hladiny BRs u rostlin rostoucích za normálních a stresových podmínek. Rostliny hrachu setého (*Pisum sativum*) byly pěstovány po dobu tří týdnů. Po uplynutí této doby byly na rostliny formou postřiku aplikovány studované látky v 7 koncentracích ( $10^{-5}$ - $10^{-11}$  M). Poté byla část rostlin kultivována za normálních podmínek a část byla vystavena stresu suchem. U obou variant byla následně stanovena hmotnost sušiny nadzemních částí (viz přílohy tab. 1), která byla u rostlin stresovaných suchem o něco menší než u těch, které rostly za normálních podmínek. Po homogenizaci vzorku, přidání deuterovaných standardů, SPE purifikaci a imunoafinitní chromatografii byly pomocí UHPLC-MS/MS stanoveny endogenní hladiny jednotlivých BRs. První použitou metodou pro stanovení BRs byla plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). BRs ale nejsou těkavé látky, proto musely být před analýzou derivatizovány, nejčastěji kyselinou metanboronovou nebo trimetylsilanem (Takatsuto et al. 1982). Pro snazší stanovení byla vyvinuta vysoce citlivá metoda, který spočívá v přečištění vzorků pomocí SPE s iontoměniči – výměnou aniontů a kationtů, následovanou UHPLC-MS/MS. Tato metoda ale kvantifikovala pouze čtyři bioaktivní BRs (brassinolid, castasteron, typhasterol a teasteron) (Xin et al. 2013). Je potvrzeno, že exogenní aplikace brassinosteroidů zlepšuje u rostlin odolnost vůči suchu. Studie se ale liší v závislosti na druhu rostlin, jejich kultivaci, vývojovém stádiu a také je obvykle zkoumán pouze jeden genotyp. V předešlých studiích je osmotický stres u rostlin vyvolán PEG, který působí velmi rychle a silně, v přírodě je ale tento proces většinou pomalejší a postupnější a získané laboratorní výsledky proto nemusí korespondovat se suchem, které se vyskytuje v přírodě (Tůmová et al. 2018). U rostlin hrachu vystavených suchu byl již zkoumán vliv BRs – byl hodnocen vliv bioaktivního castasteronu. Bylo zjištěno pouze nepatrné zvýšení tohoto hormonu, což nasvědčuje tomu, že rostlina hrachu nereaguje na osmotický stres změnami endogenních BRs (Jäger et al. 2008). Další studie stanovovala obsah endogenních BRs u dvou genotypů kukuřice. Jeden genotyp byl rezistentní vůči suchu a druhý citlivý (Tůmová et al. 2018). Předpokladem bylo zvýšení hladin BRs u rezistentního genotypu kukuřice. Nejvíce zastoupenými BRs byly typhasterol, norbrassinolid a

homocastasteron, které byly podle očekávání ve větším množství u rezistentního genotypu. U tohoto genotypu se norbrassinolid nacházel přibližně v 15krát větším množství, než bylo publikováno dříve u běžného kultivaru kukuřice dle *Oklešťková et al. 2017 (Tůmová et al. 2018)*.

V této diplomové práci se spojením SPE s IAC podařilo identifikovat brassinolid, 24-epibrassinolid, castasteron, 24-epicastasteron, homocastasteron, typhasterol, deriváty MK259 a MK266. Kvůli nízké koncentraci a polaritě je detekce BRs velmi obtížná, proto byla pro purifikaci použita imunoafinitní chromatografie s navázanou monoklonální protilátkou specifickou pro BRs. Tato metoda výrazně zlepšuje následnou detekci BRs pomocí UHPLC-MS/MS zvláště u složitějších rostlinných maticí (*Oklešťková et al. 2017*).

Hormon brassinolid se u testovaných rostlin nacházel v rozmezí koncentrací 0-1 pmol/g. Jeho nejvyšší hladina byla detekována u rostlin postřikovaných roztokem MK259 o koncentraci  $10^{-11}$  M, které rostly za stresových podmínek (2,64 pmol/g). Hormon castasteron se u rostlin nacházel v rozmezí koncentrací 0–10 pmol/g, jen u rostliny stresované suchem a postřikované roztokem s 24-epiBL došlo k nárůstu hladiny endogenního castasteronu – téměř 43 pmol/g. Podobných výsledků bylo dosaženo i u 24-epicastasteronu. Hladiny tohoto hormonu u rostlin dosahovaly koncentrace mezi 0–8 pmol/g, pouze u rostliny vystavené stresu suchem a postřikované roztokem 24-epiBL o koncentraci  $10^{-5}$  M došlo k výraznému nárůstu hladiny – 47 pmol/g. Tyto výrazné vychýlené hodnoty mohly být ale také způsobeny chybou (kontaminací) v průběhu kultivace rostlin nebo při purifikaci vzorku. Dalším stanovovaným derivátem BRs byl homocastasteron. Tento hormon lze u rostlin detekovat téměř vždy, což se potvrdilo i v tomto experimentu. Vysoké hladiny byly detekovány nejen u kontrolních, ale i u ostatních rostlin. Hladiny se pohybovaly v rozmezí 7–116 pmol/g. Ve větším množství byl u rostlin detekován hormon typhasterol, nejvyšší hladina byla detekována u rostliny postřikované roztokem MK266 a rostoucí za normálních podmínek – hladina typhasterolu byla téměř 690 pmol/g. Rostliny byly postřikovány roztoky s deriváty BRs – 24-epibrassinolidem, MK259 a MK266, proto byly očekávány vyšší hladiny těchto látek při stanovení, což se potvrdilo. U rostlin, které byly

ošetřeny 24-epiBL v koncentracích  $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M, byly detekovány vysoké hladiny tohoto hormonu jak u rostlin stresovaných, tak rostoucích za normálních podmínek. Nejvyšší hladiny bylo dosaženo při koncentraci roztoku  $10^{-5}$  M u rostliny vystavené suchu – 3908 pmol/g. Tato koncentrace je nižší než u látek MK259 a MK266 z důvodu metabolizace 24-epiBL na jiné látky. Látka MK259 byla v největší míře detekována u rostlin postříkovaných roztokem MK259 v rozmezí koncentrací  $10^{-8}$ – $10^{-5}$  M. Hladiny byly velmi vysoké, při koncentraci roztoku  $10^{-5}$  M dosahovaly téměř k 110 nmol/g. Hladiny MK259 by mohly být ještě vyšší, tato látka se ale pravděpodobně metabolizuje na MK266, která zde byla také detekována. A co se týče látky MK266, její hladiny byly vysoké u rostlin postříkovaných roztokem MK266 v rozmezí koncentrací  $10^{-8}$ – $10^{-5}$  M – jak u rostlin rostoucích za normálních podmínek, tak u stresovaných, dosahovaly téměř 66 nmol/g. U těchto vzorků byla ale viditelná kontaminace látkou MK259, která v rostlinách neměla být vůbec detekována. Závěrem ale nelze říci, že by byla prokázána souvislost s exogenní aplikací BRs a zlepšením tolerance vůči stresu suchem, protože není znatelný rozdíl mezi kontrolní rostlinou a rostlinou, na níž byl aplikován hormon. Výsledky nelze generalizovat, jelikož jsme použili specifickou rostlinu a specifický stres. Při použití jiného druhu stresu nebo jiného rostlinného druhu by pravděpodobně hladiny brassinosteroidů mohly být úplně odlišné.

## 6 Závěr

V rámci diplomové práce byla otestována cytotoxická aktivita dvou syntetických derivátů BRs – MK259 a MK266 spolu s 24-epibrassinolidem, který sloužil jako kontrola. Bylo potvrzeno, že tyto brassinosteroidy nejsou toxické vůči lidským fibroblastům a proto je lze bezpečně použít v zemědělství. Další experiment byl zaměřen na studium biologické aktivity těchto hormonů, přičemž bylo zjištěno, že vysoké koncentrace exogenních BRs inhibují růst kořene, a naopak stimulují růst hypokotylu. K testování biologické aktivity byla vybrána modelová rostlina *Arabidopsis thaliana*. Součástí této práce bylo také studium vlivu testovaných látek na endogenní hladiny brassinosteroidů u hrachu setého (*Pisum sativum*) rostoucího za normálních a stresových podmínek. Endogenní hladiny BRs byly stanoveny pomocí UHPLC-MS/MS. U endogenních hladin brassinolidu, castasteronu a jejich 24-epimerů dochází k mírnému nárůstu u rostlin stresovaných suchem oproti rostlinám rostoucím za normálních podmínek. Ale např. u homocastasteronu a typhasterolu nebyl tento trend pozorován. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány u těchto hormonů, kterými byly rostliny postřikovány, zejména v rozmezí koncentrací  $10^{-8}$ – $10^{-5}$  M a opět byly nalezeny vyšší koncentrace u rostlin rostoucích za stresových podmínek. V závěru ale nutno říci, že nebyla prokázána přímá souvislost mezi exogenní aplikací testovaných BRs a zlepšením tolerance rostlin hrachu vůči stresu suchem, jelikož nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi rostlinami kontrolními a stresovanými. Interpretace výsledků byla rovněž znesnadněna kontaminacemi kontrolních rostlin testovanými látkami způsobenými zřejmě formou aplikace (postřikem) na rostliny hrachu.

Výsledky této studie budou prezentovány v rámci konference G4G v červnu 2020.

## 7 Seznam literatury

- Ahammed G.J., Xia X.J., Li X., Shi K., Yu J.Q., Zhou Y.H. (2015). Role of brassinosteroid in plant adaptation to abiotic stresses and its interplay with other hormones. *Current Protein & Peptide Science* **16**: 462-73.
- Anusha P., Shahana T., Sujatha E. (2016). Germination, growth and oxidative responses of maize seedlings to salt and/or cadmium stress: mechanism of toxicity amelioration by 28-homobrassinolide. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **4**: 442-453.
- Bailey-Serres J., Voeselek L.A. (2008). Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 313-339.
- Bajguz A., Hayat S (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 1-8.
- Bajguz A. (2012). Origin of brassinosteroids and their role in oxidative stress plants. In *phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*, Khan N.A., Nazar R., Iqbal N., Anjum N.A.: Eds. Springer Berlin Heidelberg: 169-183.
- Behnamnia M. (2015). Protective roles of brassinolide on tomato seedlings under drought stress. *International Journal of Agricultural Science* **8**: 552-559.
- Boyer J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448.
- Clouse S.D., Langford M., McMorris T.C. (1996). A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology* **111**: 671-678.
- Clouse S.D., Sasse J.M. (1998). Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 427-51.
- Clouse S.D. (2008). The molecular intersection of brassinosteroid-regulated growth and flowering in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**: 7345-7346.
- Clouse S.D. (2011). Brassinosteroids. *The Arabidopsis book* **9**: e0151.

Epstein E., Bloom A.J. (2005). Mineral nutrition of plants. Principles and Perspectives, 2nd edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

Eremina M., Unterholzner S.J., Rathnayake A.I., Castellanos M., Khan M., Kugler K.G., May S.T., Mayer K.F., Rozhon W., Poppenberger B. (2016). Brassinosteroids participate in the control of basal and acquired freezing tolerance of plants. Proceedings of the National Academy of Sciences USA **113**: E5982-E5991.

Franěk F., Eckschlager T., Kohout L. (2003). 24-Epibrassinolide at subnanomolar concentrations modulates growth and production characteristics of a mouse hybridoma. Collection of Czechoslovak Chemical Communications **68**: 2190-2200.

Fujioka S., Sakurai A. (1997). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. Physiologia Plantarum **100**: 710-715.

Fujioka S., Yokota T. (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. Annual Review of Plant Biology **54**: 137-164.

Gao A.G., Hakimi S.K., Mittanck C.A., Wu Y., Woerner B.M., Stark D.M., Shah D.M., Liang J., Rommens C.M. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. National Biotechnology **18**: 1307-1310.

Gianoli E. (2004). Plasticity of traits and correlations in two populations of *Convolvulus arvensis* (*Convolvulaceae*) differing in environmental heterogeneity. International Journal of Plant Sciences **165**: 825-832.

Grove M.D., Spencer G.F., Rohwedder W.K., Mandava N., Worley J.F., Steffens G.L., Cook J.C., Warthen J.D., Flippenanderson J.L. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. Nature **281**: 216-217.

Hai T., Schneider B., Porzel A., Adam G. (1996). Metabolism of 24-epicastasterone in cell suspension cultures of *Lycopersicon esculentum*. Phytochemistry **41**: 197-201.

Hasan S.A., Hayat S., Ahmad A. (2011). Brassinosteroids protect photosynthetic machinery against the cadmium induced oxidative stress in two tomato cultivars. *Chemosphere* **84**: 1446-1451.

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

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.

Choi Y.H., Fujioka S., Nomura T., Harada A., Yokota T., Takatsuto S., Sakurai A. (1997). An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C-6 oxidation. *Phytochemistry* **44**: 609-613.

Iwasaki T., Shibaoka H. (1991). Brassinosteroids act as regulators of tracheary-element differentiation in isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Plant and Cell Physiology* **32**: 1007-1014.

Jaillais Y., Vert G. (2016). Brassinosteroid signaling and BRI1 dynamics went underground. *Current Opinion in Plant Biology* **33**: 92-100.

Jäger C.E., Symons G.M., Ross J.J., Reid J.B. (2008). Do brassinosteroids mediate the water-stress response? *Physiologia Plantarum* **133**: 417-425.

Jie L.I., Yang P., Xie J., Jihua Y.U., University G.A. (2015). Effects of 24-epibrassinolide on growth and antioxidant enzymes system in Pepper roots under chilling stress. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences* **29**: 1001-1008.

Kanwar M.K., Bhardwaj R., Arora P. Chowdhary S.P. Sharma P., Kumar S. (2012). Plant steroid hormones produced under Ni stress are involved in the regulation of metal uptake and oxidative stress in *Brassica juncea* L. *Chemosphere* **86**: 41-49.

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. *Nature Cell Biology* **11**: 1254-1260.

Kinoshita T., Caño-Delgado A., Seto H., Hiranuma S., Fujioka S., Yoshida S., Chory J. (2005). Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* **433**: 167-171.

Kvasnica M., Oklešťková J., Bazgier V., Rárová L., Kořínková P., Mikulík J., Budešinský M., Béres T., Berka K., Lu Q., Russinová E., Strnad M. (2016). Design, synthesis and biological activities of new brassinosteroid analogues with a phenyl group. *Organic & Biomolecular Chemistry* **14**.

Li J., Chory J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**: 929-938.

Li J., Yang P., Gan Y., Yu J., Xie J. (2015). Brassinosteroid alleviates chilling-induced oxidative stress in pepper by enhancing antioxidation systems and maintenance of photosystem II. *Acta Physiologiae Plantarum* **37**:22.

Li Q.F., Lu J., Yu J.W., Zhang C.Q., He J.X., Liu Q.Q. (2018). The brassinosteroid-regulated transcription factors BZR1/BES1 function as a coordinator in multisignal-regulated plant growth. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms* **1861**:561-571.

Maeda E. (1965). Rate of lamina inclination excised rice leaves. *Physiologia Plantarum* **18**: 813-827.

Mahesh K., Balaraju P., Ramakrishna B., Rao S.S. (2013). Effect of brassinosteroids on germination and seedling growth of radish (*Raphanus sativus* L.) under PEG-6000 induced water stress. *American Journal of Plant Sciences* **4**: 2305-2313.

Malíková J., Swaczynová J., Kolář Z., Strnad M. (2008). Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* **69**: 418-426.

Mandava N.B. (1988). Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Molecular Biology* **39**: 23-52.

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.

Mittler R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**: 15-19.

Munns R., Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651-681.

Müssig C., Shin G.H., Altmann T. (2003). Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**: 1261-1271.

Nakamura A., Tochio N., Fujioka S., Ito S., Kiyawa T., Shimada Y., Matsuoka M., Yoshida S., Kinoshita T., Asami T., Seto H., Nakano T. (2017). Molecular actions of two synthetic brassinosteroids, iso-carbaBL and 6-deoxoBL, which cause altered physiological activities between *Arabidopsis* and rice. *PLoS One* **12**: e0174015.

Ogweno J.O., Song X.S., Shi K., Hu W.H., Mao W.H., Zhou Y.H., Yu J.Q., Nogues S. (2008). Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant system in *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Plant Growth Regulation* **27**: 49-57.

Oh M.H., Wang X., Kota U., Goshe M.B., Clouse S.D., Huber S.C. (2009). Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**: 658-663.

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**: 432-470.

Rárová L., Steigerová J., Kvasnica M., Bartůněk P., Chodounská H., Kolář Z., Sedlák D., Oklešťková J., Strnad M. (2016). Structure activity relationship

studies on cytotoxicity and the effects on steroid receptors of AB-functionalized cholestanes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **159**: 154-169.

Sakurai A. (1999). Brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 351-361.

Shadid M.A., Balal R.M., Pervez M.A., Abbas T., Aqeel M.A., Riaz A., Mattson N.S. (2015). Exogenous 24-epibrassinolide elevates the salt tolerance potential of pea (*Pisum sativum* L.) by improving osmotic adjustment capacity and leaf water relations. *Journal of Plant Nutrition* **38**: 1050-1072.

Shahana T., Rao P.A., Ram S.S., Sujatha E. (2015). Mitigation of drought stress by 24-epibrassinolide and 28-homobrassinolide in *pigeon pea* seedlings. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research* **3**: 904-911.

She J., Han Z., Kim T.W., Wang J., Cheng W., Chang J., Shi S., Wang J., Wang Z.Y., Chai J. (2011). Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* **474**: 472-476.

She J., Han Z., Zhou B., Chai J. (2013). Structural basis for differential recognition of brassinolide by its receptors. *Protein Cell* **4**: 475-482.

Shu S., Tang Y., Yuan Y., Sun J., Zhong M., Guo S. (2016). The role of 24-epibrassinolide in the regulation of photosynthetic characteristics and nitrogen metabolism of tomato seedlings under a combined low temperature and weak light stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **107**: 344-353.

Steber C.M., McCourt P. (2001). A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **125**: 763-769.

Steigerová J., Oklešťková J., Levková M., Rárová L., Kolář Z., Strnad M. (2010). Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* **188**: 487-496.

Steigerová J., Rárová L., Oklešťková J., Křížová K., Levková M., Šváchová M., Kolář Z., Strnad M. (2012). Mechanisms of natural brassinosteroid-induced

apoptosis of prostate cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* **50**: 4068-4076.

Strnad M., Kohout L. (2003). A simple brassinolide analogue 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-17 $\beta$ -(3-methyl-butyryloxy)-7-oxa-B-homo-5 $\alpha$ -androstan-6-one which induces bean second internode splitting. *Plant Growth Regulation* **40**: 39-47.

Suzuki H., Fujioka S., Takatsuto S., Yokota T., Murofushi N., Sakurai A. (1995). Biosynthesis of brassinosteroids in seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum*, and *Oryza sativa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **59**: 168-172.

Taiz L., Zeiger E. (2010). *Plant physiology*, Fifth Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA, 699-718.

Takatsuto S., Ying B., Morisaki M., Ikekawa N. (1982). Microanalysis of brassinolide and its analogues by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **239**: 233-241.

Tang W., Kim T.W., Oses-Prieto J.A., Sun Y., Deng Z., Zhu S., Wang R., Burlingame A.L., Wang Z.Y. (2008). BSK mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science* **321**: 557-560.

Tarkowská D., Novák O., Oklešťková J., Strnad M. (2016). The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC-ESI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408**: 6799-812.

Thompson M.J., Mandava N.B., Filippen-Anderson J.L., Worley J.F., Dutky S.R., Robbins W.E., Lusby W. (1979). Synthesis of brassinosteroids. New plant-growth-promoting steroids. *The Journal of Organic Chemistry* **44**: 5002–5004.

Thompson M.J., Meudt W.J., Mandawa N.B., Dutky S.R., Lusby W.R., Spaulding D.W. (1982). Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting steroids. *Steroids* **39**: 89–105.

Tůmová L., Tarkovská D., Řehořová K., Marková H., Kočová M., Rothová O., Čečetka P., Holá D. (2018). Drought-tolerant and drought-sensitive genotypes of maize (*Zea mays* L.) differ in contents of endogenous brassinosteroids and their drought-induced changes. *PLoS ONE* **13**: e0197870.

Uemura M., Tominaga Y., Nakagawara C., Shigematsu S., Minami A. (2006). Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum* **126**: 81-89.

Vert G., Chory J. (2006). Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* **441**: 96-100.

Villiers F., Jourdain A., Bastien O., Leonhardt N., Fujioka S., Tichtincký G., Parcy F., Bourguignon J., Hugouvieux V. (2012). Evidence for functional interaction between brassinosteroids and cadmium response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1185-1200.

Wada K., Marumo S. (1981). Synthesis and plant growth-promoting activity of brassinolide analogues. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**: 2579-2585.

Wang Z.Y., Seto H., Fujioka S., Yoshida S., Chory J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma membrane receptor for plant steroids. *Nature* **410**: 380-383.

Wang X., Li X., Meisenhelder J., Hunter T., Yoshida S., Asami T., Chory J. (2005). Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Developmental cell* **8**: 855-865.

Wang X., Chory J. (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* **313**: 1118-1122.

Wei L.J., Deng X.G., Zhu T., Zheng T., Li P.X., Wu J.Q., Zhang D.W., Lin H.H. (2015). Ethylene is involved in brassinosteroids induced alternative respiratory pathway in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings response to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* **6**: 982.

Wu G., Wang X., Li X., Kamiya Y., Otegui M.S. (2011). Methylation of a phosphatase specifies dephosphorylation and degradation of activated brassinosteroid receptors. *Science Signaling* **4**: 1-25.

Wu X.X., Yao X.F., Chen J.L., Zhu Z.W., Zhang H., Zha D.S. (2014). Brassinosteroids protect photosynthesis and antioxidant system of eggplant seedlings from high-temperature stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**: 251-261.

Xin P., Yan J., Fan J., Chu J., Yan C. (2013). An improved simplified high-sensitivity quantification method for determining brassinosteroids in different tissues of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **162**: 2056-2066.

Yokota T., Arima M., Takahashi N. (1982). Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall. *Tetrahedron Letters* **23**: 1275-1278.

Yusuf M., Fariduddin Q., Ahmad A. (2012). 24-Epibrassinolide modulates growth, nodulation, antioxidant system, and osmolyte in tolerant and sensitive varieties of *Vigna radiata* under different levels of nickel; a shotgun approach. *Plant Physiology and Biochemistry* **57**: 143-153.

Zhang Y.P., Zhu X.H., Ding H.D., Yang S.J., Chen Y.Y. (2013). Foliar application of 24-epibrassinolide alleviates high-temperature-induced inhibition of photosynthesis in seedlings of two melon cultivars. *Photosynthetica* **51**: 341-349.

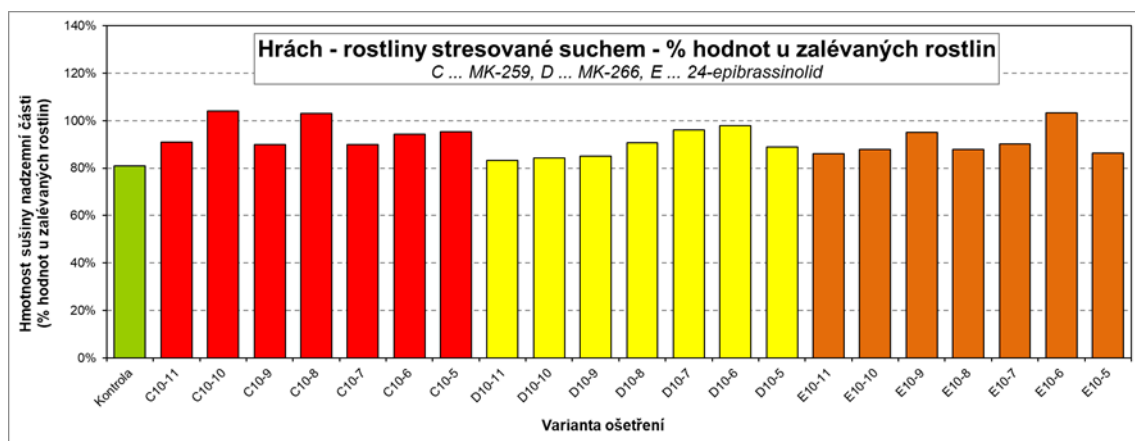
## Internetové zdroje

Program ImageJ – volně ke stažení: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>

Vejražka M. (2007). Buněčné kultury (online), Univerzita Karlova, Praha.  
<http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf> (staženo 10. 9. 2018)

## 8 Přílohy

Tabulka P1: Procentuální poměr hmotnosti sušiny nadzemních částí rostlin hrachu setého u rostlin stresovaných suchem a rostoucích za normálních podmínek





Tabulka P2: Kvantifikace BRs systémem UHPLC-MS/MS

	Brassinolide	24-epibrassinolide	Castasterone	24-apicastasteron	Homocastasterone	Typhasterol	MK266	MK2595
	Průměr, SD pmol/g	Průměr, SD pmol/g	Průměr, SD pmol/g	Průměr, SD pmol/g	Průměr, SD pmol/g	Průměr, SD pmol/g	Průměr, SD pmol/g	Průměr, SD pmol/g
24epi sucho 10-11	0.47302 ± 0.18255	0.23252 ± 0.16441	3.66515 ± 1.03000	4.23199 ± 0.21000	10.37089 ± 5.32163	93.63166 ± 7.60506	1.91313 ± 0.14302	0.64274 ± 0.14774
24epi sucho 10-10	0.58617 ± 0.20262	0.40904 ± 0.27196	3.41600 ± 1.11289	6.57636 ± 3.10000	15.94593 ± 7.69022	75.30040 ± 18.88293	3.10751 ± 1.70565	1.16356 ± 0.71358
24epi sucho 10-9	1.07590 ± 0.34935	0.83543 ± 0.34930	0.87000 ± 0.21000	<LOD	23.75789 ± 11.44439	75.71456 ± 22.91385	2.21076 ± 2.21698	0.49492 ± 0.49492
24epi sucho 10-8	0.51528 ± 0.09089	0.92000 ± 0.38189	2.75330 ± 0.48316	6.64725 ± 0.18000	27.72975 ± 13.04477	92.75388 ± 38.79515	0.67418 ± 0.71071	0.92721 ± 0.14076
24epi sucho 10-7	<LOD	27.7956 ± 6.22691	4.91933 ± 1.80768	6.53000 ± 2.00000	33.96042 ± 16.41833	379.38867 ± 268.83602	2.22145 ± 0.45333	0.57088 ± 0.15942
24epi sucho 10-6	0.26000 ± 0.11000	267.666 ± 54.86345	42.9707 ± 23.31261	4.84014 ± 0.30000	57.78115 ± 20.55623	258.83667 ± 165.67381	3.34039 ± 1.65895	0.71422 ± 0.11000
24epi sucho 10-5	0.55000 ± 0.01000	3908.44 ± 937.40011	90.00000 ± 0.33000	47.0000 ± 13.91814	31.39209 ± 12.20374	108.99000 ± 27.31075	0.76281 ± 0.27641	0.32775 ± 0.03470
24epi zelevané 10-11	0.08792 ± 0.01100	0.34000 ± 0.025000	0.99233 ± 0.40085	<LOD	15.52639 ± 3.30595	49.71102 ± 24.95613	2.46506 ± 0.43318	0.29457 ± 0.18162
24epi zelevané 10-10	0.20061 ± 0.08737	1.01500 ± 0.36000	<LOD	0.77514 ± 0.11000	18.66911 ± 8.64301	51.58616 ± 34.79734	1.10316 ± 0.93373	0.23447 ± 0.04554
24epi zelevané 10-9	0.14013 ± 0.08000	1.36000 ± 0.7000	0.89433 ± 0.05479	1.93000 ± 0.08900	14.61062 ± 0.82448	103.49764 ± 58.46626	0.57793 ± 0.21725	0.51767 ± 0.32403
24epi zelevané 10-8	0.31796 ± 0.11724	2.50000 ± 0.23000	1.18830 ± 0.30841	1.79960 ± 0.15180	20.21293 ± 5.16688	121.62063 ± 35.09539	0.66498 ± 0.08395	1.02897 ± 0.35418
24epi zelevané 10-7	0.32020 ± 0.10000	5.37000 ± 0.02940	1.16702 ± 0.29179	<LOD	40.50988 ± 6.90508	233.79948 ± 106.20588	1.06485 ± 0.63325	2.40950 ± 1.35069
24epi zelevané 10-6	<LOD	74.3100 ± 0.20778	0.85085 ± 0.03992	<LOD	34.02587 ± 3.96388	99.99169 ± 48.05829	0.26040 ± 0.08285	0.75417 ± 0.24224
24epi zelevané 10-5	<LOD	1208.17 ± 2.28805	<LOD	5.85441 ± 1.67316	43.46533 ± 27.99654	174.60257 ± 63.10989	3.18111 ± 2.89175	0.29000 ± 0.021000
MK259 sucho 10-11	2.64895 ± 0.36856	1.07908 ± 0.61822	4.30844 ± 0.79669	3.00142 ± 0.88813	19.94482 ± 3.65919	98.44624 ± 68.70639	0.93772 ± 0.15000	0.96556 ± 0.20825
MK259 sucho 10-10	0.51018 ± 0.11000	0.32590 ± 0.28315	3.00375 ± 1.03573	4.69791 ± 0.17188	16.05000 ± 4.50628	376.65754 ± 256.47756	0.58006 ± 0.21000	3.70978 ± 0.47644
MK259 sucho 10-9	0.74535 ± 0.38509	0.28954 ± 0.06234	6.66249 ± 0.55472	2.85019 ± 0.67000	16.26680 ± 5.64176	113.82340 ± 150.30227	0.57117 ± 0.32346	20.87506 ± 8.49866
MK259 sucho 10-8	0.24291 ± 0.16000	0.33285 ± 0.12106	4.66249 ± 0.55472	2.85019 ± 0.67000	16.26680 ± 5.64176	113.82340 ± 150.30227	0.57117 ± 0.32346	20.87506 ± 8.49866
MK259 sucho 10-7	0.29578 ± 0.07000	0.31354 ± 0.07126	3.87154 ± 2.74329	7.23763 ± 0.32000	27.57322 ± 10.51560	147.65053 ± 177.04896	1.64067 ± 0.15993	236.19021 ± 46.97487
MK259 sucho 10-6	0.83003 ± 0.54110	1.38089 ± 1.11431	3.94000 ± 2.31000	5.15964 ± 2.19900	17.36212 ± 5.39829	238.39337 ± 43.77697	4.82762 ± 3.42289	1857.85347 ± 173.05264
MK259 sucho 10-5	0.52000 ± 0.01000	1.05059 ± 0.55211	1.88086 ± 0.26821	2.89206 ± 1.10100	34.21220 ± 9.57185	308.13646 ± 123.09316	2.16619 ± 0.23650	108990.04140 ± 14430.17336
MK259 zelevané 10-11	<LOD	0.74080 ± 0.2734	1.19672 ± 0.06032	1.84000 ± 0.43000	22.13288 ± 5.10499	76.01567 ± 75.03852	0.49933 ± 0.04758	0.29332 ± 0.06815
MK259 zelevané 10-10	0.29822 ± 0.09475	<LOD	2.71811 ± 0.91000	1.13132 ± 0.04129	20.75158 ± 6.90841	447.17647 ± 57.50907	0.59738 ± 0.03500	1.44944 ± 0.68738
MK259 zelevané 10-9	0.16942 ± 0.02500	1.19105 ± 0.55838	1.26388 ± 0.65462	1.82000 ± 1.02220	12.29651 ± 4.78082	144.85479 ± 93.98901	0.94757 ± 0.40352	1.21000 ± 0.45929
MK259 zelevané 10-8	0.17473 ± 0.05591	0.58532 ± 0.27139	1.60763 ± 0.94488	1.32000 ± 0.09000	21.04883 ± 5.97654	83.96833 ± 52.79215	0.75750 ± 0.23259	2.30206 ± 0.38588
MK259 zelevané 10-7	0.20403 ± 0.03915	<LOD	<LOD	<LOD	28.06103 ± 5.00328	82.89131 ± 52.03554	1.23418 ± 0.40683	23.53983 ± 3.24011
MK259 zelevané 10-6	0.44121 ± 0.03300	<LOD	<LOD	<LOD	58.09571 ± 36.35475	92.38621 ± 26.77136	6.92235 ± 0.12474	268.17509 ± 38.98999
MK259 zelevané 10-5	0.17588 ± 0.06394	<LOD	<LOD	<LOD	60.54410 ± 28.36541	114.75004 ± 83.91537	0.50127 ± 0.23160	39422.24193 ± 5434.70524
MK266 sucho 10-11	0.60277 ± 0.01000	2.83000 ± 0.44928	2.40942 ± 1.29496	3.89117 ± 0.71000	12.92084 ± 2.92283	71.75799 ± 27.10637	0.75406 ± 0.29561	0.75151 ± 0.42808
MK266 sucho 10-10	<LOD	1.10970 ± 0.11399	4.89935 ± 2.10000	6.24000 ± 0.10000	7.46250 ± 3.46330	18.58501 ± 10.32234	1.96217 ± 1.00791	0.87941 ± 0.29860
MK266 sucho 10-9	0.46562 ± 0.21000	1.85006 ± 0.17435	2.32126 ± 0.15000	2.01814 ± 0.23342	19.79309 ± 12.27580	33.00251 ± 28.09834	1.01000 ± 0.32981	1.49370 ± 0.82092
MK266 sucho 10-8	0.57292 ± 0.13000	0.70000 ± 0.2000	6.35189 ± 3.38501	6.15756 ± 0.27000	48.42262 ± 13.60396	59.32377 ± 31.30169	8.08015 ± 0.83528	<LOD
MK266 sucho 10-7	0.39298 ± 0.07068	0.57093 ± 0.21132	1.75248 ± 0.52409	3.31859 ± 1.31485	34.29292 ± 6.67733	68.16399 ± 58.11558	144.93163 ± 13.99467	0.79338 ± 0.36963
MK266 sucho 10-6	<LOD	0.91000 ± 0.1300	0.80486 ± 0.31000	0.86687 ± 0.17000	38.67547 ± 16.54614	236.64939 ± 16.12073	2918.38279 ± 110.81111	1.06720 ± 0.58718
MK266 sucho 10-5	0.38144 ± 0.06000	1.12270 ± 0.54891	0.86687 ± 0.17000	2.57148 ± 0.07077	12.06094 ± 2.93283	33.51582 ± 8.30942	4327.585117 ± 4226.86596	7.53390 ± 1.46589
MK266 zelevané 10-11	0.16731 ± 0.02000	<LOD	1.33146 ± 0.45447	2.06437 ± 1.25605	69.93725 ± 21.08846	135.29518 ± 77.00000	0.88613 ± 0.64928	1.51403 ± 2.29138
MK266 zelevané 10-10	0.29510 ± 0.00734	0.56539 ± 0.18535	1.19183 ± 0.66124	<LOD	75.52874 ± 12.64402	144.55422 ± 63.00000	0.92839 ± 0.12410	2.42297 ± 1.21592
MK266 zelevané 10-9	<LOD	<LOD	6.74687 ± 0.54000	4.40186 ± 0.25000	42.70697 ± 22.16567	291.44262 ± 26.87662	2.93517 ± 0.47018	1.81768 ± 0.46816
MK266 zelevané 10-8	0.31352 ± 0.03863	<LOD	1.52769 ± 0.78000	5.65549 ± 3.75889	116.11035 ± 11.27542	686.67834 ± 382.50624	8.73848 ± 0.52815	1.36175 ± 0.49760
MK266 zelevané 10-7	0.23430 ± 0.03000	0.85052 ± 0.15060	3.52440 ± 0.86424	4.03868 ± 0.33000	58.49881 ± 15.10158	64.37532 ± 206.51214	96.26178 ± 14.58131	2.54009 ± 1.43263
MK266 zelevané 10-6	0.54407 ± 0.27356	0.49806 ± 0.13645	2.05865 ± 0.28334	<LOD	72.32989 ± 36.04670	68.46821 ± 20.20465	1185.72959 ± 110.42414	5.03999 ± 2.21617
MK266 zelevané 10-5	0.10049 ± 0.01800	0.58342 ± 0.04081	4.24736 ± 1.01000	3.73533 ± 0.49894	52.29157 ± 6.85175	239.86214 ± 137.60207	65021.91323 ± 7902.61481	12.74123 ± 1.89238
kontrola sucho	<LOD	<LOD	2.27300 ± 1.39580	<LOD	27.99000 ± 16.12185	<LOD	0.86900 ± 0.29295	3.15000 ± 2.75383
kontrola zelevané	<LOD	<LOD	5.26891 ± 1.56441	<LOD	120.66224 ± 23.59697	<LOD	280.70376 ± 58.81262	3.28050 ± 2.40773