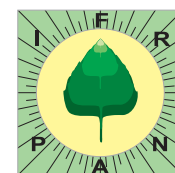




Anna Janeczko, ur. 23.12.1972; dr hab. inż., prof. nadzwyczajny Instytutu Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk. A.J. ukończyła studia wyższe i studia doktoranckie (praca doktorska z wyróżnieniem) na Wydziale Rolniczym Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Od 2001 roku jest pracownikiem Instytutu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie, gdzie prowadzi prace badawcze nad występowaniem i aktywnością regulatorów steroidowych (brasinosteroidy, progesteron, androgeny, estrogeny) w roślinach ze szczególnym uwzględnieniem gatunków uprawnych. Wielokrotnie uzyskiwała wyróżnienie Dyrektora IFR PAN za aktywność w pracy naukowej. Praca habilitacyjna A.J. poświęcona brasinosteroidom została wyróżniona przez Radę Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego UR w Krakowie w 2012 roku. Do roku 2015 A.J. zgromadziła ponad 40 publikacji, z czego około 80% stanowią prace w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Ponadto A.J. interesuje się i uprawia sport, osiągając sukcesy w pływaniu w kategorii masters.

Więcej informacji o A.J. na jej stronie internetowej www.belanna.strefa.pl; kontakt: tel.: 124251833 wew. 108; e-mail: a.janeczko@ifr-pan.edu.pl lub ania@belanna.strefa.pl

Praca habilitacyjna A.J. poświęcona brasinosteroidom została wyróżniona przez Radę Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego UR w Krakowie w 2012 roku. Do roku 2015 A.J. zgromadziła ponad 40 publikacji, z czego około 80% stanowią prace w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Ponadto A.J. interesuje się i uprawia sport, osiągając sukcesy w pływaniu w kategorii masters.



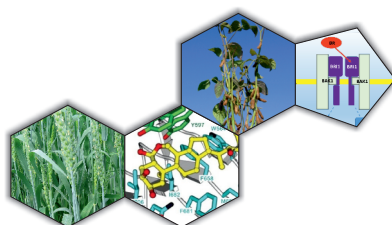
INSTYTUT FIZJOLOGII ROŚLIN
im. Franciszka Górskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

MONOGRAFIE

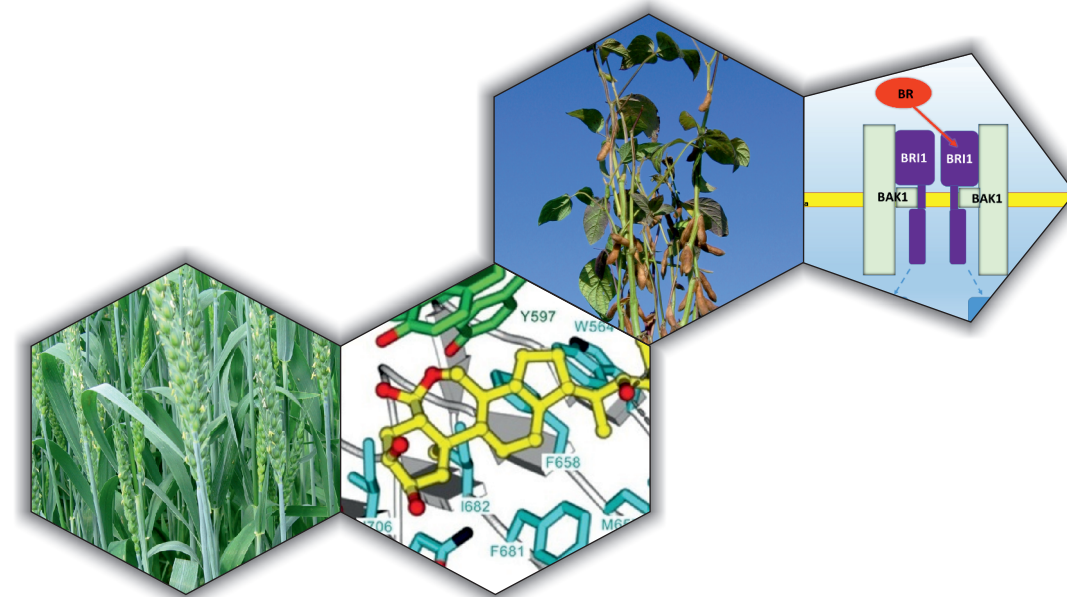
17

**WYSTĘPOWANIE, TRANSPORT I WYBRANE ASPEKTY
AKTYWNOŚCI FIZJOLOGICZNEJ BRASINOSTEROIDÓW
W ROŚLINACH UPRAWNYCH Z RODZIN *POACEAE* I *FABACEAE***

Anna Janeczko



ISBN 978-83-938114-7-2



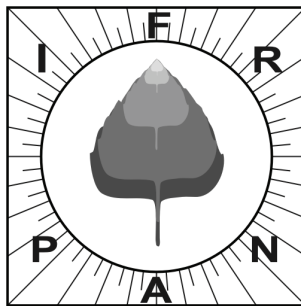
Kraków, 2016

MONOGRAFIE

17

Anna Janeczko

**WYSTĘPOWANIE, TRANSPORT I WYBRANE ASPEKTY
AKTYWNOŚCI FIZJOLOGICZNEJ BRASINOSTEROIDÓW
W ROŚLINACH UPRAWNYCH Z RODZIN *POACEAE* I *FABACEAE***



Recenzenci

Prof. dr hab. Leszek S. Jankiewicz
Dr hab. inż. Franciszek Jankowiak, prof. nadzw. IFR PAN
Dr hab. Andrzej Bajguz, prof. nadzw. UwB

Redaktor edycji **MONOGRAFIE**

Prof. dr hab. inż. Jolanta Biesaga-Kościelniak

Szatę graficzną w monografii opracowała autorka.
Wszystkie fotografie wykorzystane w pracy pochodzą z kolekcji autorki,
chyba, że w podpisie ryciny podano inaczej.
Rysunki wzorów chemicznych autorka wykonała w programie ChemWin3.0.

Skład i łamanie komputerowe

Zbigniew Szpila

ISBN 978-83-938114-7-2

© Copyright by
Instytut Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* PAN
30-239 Kraków, ul. Niezapominajek 21
tel. (12) 425-18-33, fax (12) 425-18-44

Druk i oprawa: Wydawnictwo i Drukarnia DRUKROL
Kraków, ul. Ujastek 9, tel. (12) 412-46-50
Nakład 250 egz.

Od autora

Niniejsza praca podejmuje problematykę występowania i transportu brasinosteroidów w roślinach a także mechanizmów oddziaływania tych związków na plonowanie wybranych gatunków uprawnych. Spośród wielu rodzin roślin uprawnych wybrane i omówione pod tym kątem będą dwie rodziny (Poaceae - wiechlinowate i Fabaceae - bobowate) w skład których wchodzi gatunki o największym znaczeniu ekonomicznym. Opracowanie oparto o analizę literatury światowej z uwzględnieniem prac wykonanych przez autorkę monografii w tym danych niepublikowanych. W podsumowaniu monografii przedyskutowane zostaną możliwości praktycznego zastosowania brasinosteroidów w rolnictwie. Monografia niniejsza jest drugim w Polsce wydawnictwem książkowym dotyczącym zagadnienia brasinosteroidów. W stosunku do poprzedniej pozycji (Bajguz A, Tretyn A. 2003. Brassinosteroidy – hormony roślinne. Wydawnictwo UMK Toruń 2003), koncentruje się przede wszystkim na roślinach uprawnych, znacznie obszerniej ujmuje tematykę transportu brasinosteroidów w roślinach wyższych oraz analizuje podstawy i możliwości praktycznego wykorzystania tych związków w rolnictwie.

Prof. dr hab. Leszek S. Jankiewicz (recenzent 1):

„Hormony steroidowe regulują wiele zjawisk fizjologicznych u człowieka i zwierząt i ta ich rola jest znana od dawna. Badaczy zainteresowało więc, czy u roślin związki steroidowe również grają jakąś regulacyjną rolę. Poszukiwania w tym kierunku doprowadziły do odkrycia brasinosteroidów (BR) w pyłku rzepaku w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku. Przez dłuższy czas prowadzono nad nimi badania fizjologiczne i biochemiczne ale wreszcie, po dokładniejszym zbadaniu ich właściwości i działań regulacyjnych w roślinie zaczęto sprawdzać możliwości zastosowania ich w praktyce. W tym właśnie kierunku poszła autorka i dlatego uważam, że przedstawiona do recenzji praca jest bardzo „na czasie”. Praca autorki dotyczy dwóch najważniejszych rodzin roślin uprawnych: wiechlinowatych i bobowatych. Ważne jest też, że jedna z badanych rodzin należy do jednoliściennych a druga do dwuliściennych.

(...) Niniejsza praca (...) jest napisana łatwym językiem, jest napisana po polsku, więc będzie doskonałym materiałem poglądowym dla szerokiego grona czytelników obejmującego także studentów. Uzupelnia znakomicie pracę Bajguza i Tretyna z r. 2003 nowymi danymi. (...) Praca ta w pełni zasługuje na druk i będzie bardzo cenną pozycją w polskim piśmiennictwie dotyczącym regulatorów rozwoju.”

Dr hab. inż. Franciszek Janowiak, prof. nadzw. IFR PAN (recenzent 2):

„Przedstawiona praca, pomyślana jako monografia w języku polskim, dotycząca brasinosteroidów – względnie nowej grupy regulatorów roślinnych, jest niezwykle cennym uzupełnieniem luki w fachowej literaturze. Ilość publikacji nt. tej grupy związków i ich roli w roślinach gwałtownie wzrosła w ostatnich latach, brak jednak było syntezy aktualnego stanu wiedzy w języku polskim w postaci tematycznej monografii. Praca napisana jest językiem przystępnym, lecz równocześnie wystarczająco głęboko przedstawia współczesny stan wiedzy o brasinosteroidach. Wielką zaletą pracy jest jej przejrzysty format oraz oryginalne graficzne ilustracje, prezentujące w klarowny sposób skomplikowane zależności i mechanizmy działania brasinosteroidów. Monografia będzie więc lekturą nie tylko dla studentów, lecz również dla badaczy biologów chcących wejść w tematykę brasinosteroidów.”

Dr hab. Andrzej Bajguz, prof. nadzw. Uniwersytetu w Białymstoku (recenzent 3):

„Monografia dr hab. inż. Anny Janeczko stanowi bardzo ciekawe studium nad brasinosteroidami – ich występowaniem, aktywnością fizjologiczną w roślinach uprawnych z rodzin Poaceae i Fabaceae. (...) Chciałbym podkreślić oryginalność recenzowanej monografii, która uzupełni publikację Andrzeja Bajguza i Andrzeja Tretyna „Brasinosteroidy – hormony roślinne” (Wyd. UMK, Toruń 2003) (...) i stanie się cenną lekturą dla wszystkich, którzy będą chcieli poszerzyć swoją wiedzę odnośnie brasinosteroidów - hormonów roślinnych.”

Spis treści

| | |
|--|----|
| 1. WPROWADZENIE | 9 |
| 1.1. Związki steroidowe | 9 |
| 1.2. Charakterystyka ogólna brasinosteroidów | 9 |
| 2. WYSTĘPOWANIE I TRANSPORT BRASINOSTEROIDÓW W ROŚLINACH | 18 |
| 2.1. Obecność brasinosteroidów w roślinach | 18 |
| 2.1.1. Występowanie i zmiany zawartości brasinosteroidów w roślinach z rodziny <i>Poaceae</i> (wiechlinowate) | 18 |
| 2.1.2. Występowanie i zmiany zawartości brasinosteroidów w roślinach z rodziny <i>Fabaceae</i> (bobowate) | 25 |
| 2.2. Pobieranie i transport brasinosteroidów w roślinach | 28 |
| 2.2.1. Receptory brasinosteroidów | 28 |
| 2.2.2. Hipoteza transportu brasinosteroidów wytwarzanych w roślinie .. | 30 |
| 2.2.3. Pobieranie i transport egzogennych brasinosteroidów | 31 |
| 2.2.3.1. Stosowanie brasinosteroidów na powierzchnię liści ... | 32 |
| 2.2.3.2. Podawanie brasinosteroidów do apoplastu | 32 |
| 2.2.3.3. Dokorzeniowa aplikacja brasinosteroidów | 33 |
| 2.2.3.4. Podawanie brasinosteroidów poprzez przedsiewne moczenie nasion | 34 |
| 2.2.4. Znaczenie koniugatów brasinosteroidów | 34 |
| 3. AKTYWNOŚĆ FIZJOLOGICZNA BRASINOSTEROIDÓW W ROŚLINACH | 36 |
| 3.1. Stosowanie brasinosteroidów a plonowanie roślin z rodziny <i>Poaceae</i> oraz ważniejsze mechanizmy leżące u podstaw działania tych związków | 36 |
| 3.1.1. Pszenica | 36 |
| 3.1.2. Kukurydza | 41 |
| 3.1.3. Pozostałe gatunki | 44 |
| 3.2. Charakterystyka mutantów i roślin transgenicznych z rodziny <i>Poaceae</i> o zróżnicowanej akumulacji brasinosteroidów i z zaburzeniami w percepcji tych związków | 46 |
| 3.2.1. Ryż | 46 |
| 3.2.2. Jęczmień | 47 |
| 3.2.3. Kukurydza | 51 |

| | |
|--|----|
| 3.3. Stosowanie brasinosteroidów a plonowanie roślin z rodziny <i>Fabaceae</i> oraz ważniejsze mechanizmy leżące u podstaw działania tych związków | 52 |
| 3.4. Charakterystyka mutantów z rodziny <i>Fabaceae</i> o zróżnicowanej akumulacji brasinosteroidów i z zaburzeniami w percepcji tych związków | 56 |
| 3.4.1. Groch | 56 |
| 3.4.2. Bobik | 56 |
| 4. BRASINOSTEROIDY W PRAKTYCE ROLNICZEJ | 58 |
| 4.1. Brasinosteroidy jako składniki preparatów stosowanych w rolnictwie na świecie | 58 |
| 4.2. Perspektywa zastosowania brasinosteroidów w Polsce | 60 |
| 4.2.1. Zagadnienie toksyczności BR dla człowieka i owadów zapyłających | 62 |
| 4.3. Wykorzystanie w rolnictwie mutantów oraz roślin transgenicznych z zaburzeniami biosyntezy lub percepcji BR | 63 |
| 5. SPIS LITERATURY | 65 |

1. WPROWADZENIE

1.1. Związki steroidowe

Steroidy stanowią jedną z najważniejszych grup związków o właściwościach regulatorowych. Są one rozpowszechnione w organizmach żywych, a wiele z nich to hormony o kluczowym znaczeniu dla metabolizmu tych organizmów (ryc. 1). Ciągły postęp badań prowadzi do nowych odkryć i weryfikacji dotychczasowej wiedzy na temat występowania i roli tych związków zarówno u zwierząt jak i u roślin. Pierwszą definicję związków steroidowych zaproponowali w 1936 roku Callow i Young. Zaliczono wówczas do tej grupy: sterole, kwasy żółciowe, „trucizny działające na serce”, saponiny i hormony płciowe człowieka. W miarę postępu metod analitycznych i badań strukturalnych grupa steroidów poszerzyła się o kukurbitacyny, bufadienolidy, witanolidy, alkaloidy steroidowe, ekdysteroidy i brasinosteroidy. Cechą charakterystyczną steroidów jest budowa ich cząsteczek pochodząca od 4-pierścieniowej struktury steranu (przedstawionej w centrum ryc. 1), a liczne modyfikacje w liczbie i rodzaju przyłączonych grup funkcyjnych determinują ich funkcje w organizmach żywych. Występowanie części spośród przedstawionych na rycinie 1 steroidów (kukurbitacyny, alkaloidy steroidowe) może być charakterystyczne jedynie dla określonej rodziny systematycznej lub nawet gatunku. Powszechnie w królestwie zwierząt i roślin występują natomiast sterole, które m.in. wpływają na własności fizyczne błon komórkowych oraz stanowią kluczowe prekursorzy w biosyntezie innych związków w tym hormonów steroidowych. Z kolei hormony steroidowe, do których zalicza się roślinne brasinosteroidy (BR), hormony owadów - ekdysteroidy oraz hormony ssaków (kortykosteroidy, estrogeny, androgeny i progesteron), to związki o podstawowym znaczeniu w regulacji metabolizmu.

1.2. Charakterystyka ogólna brasinosteroidów

Brasinosteroidy odkryto w latach 70-tych ubiegłego wieku (Mitchell i wsp. 1970, Grove i wsp. 1979). Grupa ta liczy ponad 70 związków wykazujących duże zróżnicowanie struktury i związanej z nią aktywności fizjologicznej. Z racji występowania licznych grup hydroksylowych w cząsteczce, BR są niekiedy określane mianem polihydroksysteroidów (ryc. 2). Brasinosteroidy najczęściej oznacza się symbolem BR. Nomenklaturę podobną do tej, jaka obowiązuje w przypadku gibberelin, wprowadził Mandava (1988) a kontynuowali Zullo i Kohout (2004), przyznając brasinosteroidom numery zgodnie z kolejnością ich odkrycia. I tak, przykładami BR są: brasinolid (BR₁, ryc. 3A-B), kastasteron (BR₂, ryc. 1, 3A-B), dolicholid

(BR₃, ryc. 4), tyfasterol (BR₇, ryc. 3B), teasteron (BR₈, ryc. 3B), 28-homokastasteron (BR₁₂, ryc. 3A), 28-norbrasinolid (BR₁₄, ryc. 3A), 28-norkastasteron (BR₁₅, ryc. 3A), 25-metyldolichosteron (BR₁₆, ryc. 4), 28-homobrasinolid (BR₁₇, ryc. 3A), 24-epibrasinolid (BR₂₇, ryc. 3A), 1 β -hydroksykastasteron (BR₂₈, ryc. 4), sekasteron (BR₃₈, ryc. 4), 6-deokso-24-epikastasteron (BR₄₂) i inne. Nomenklatura ta jednak powszechnie się jeszcze nie przyjęła a autorzy powstających publikacji wciąż stosują własne skróty nazw tych związków (np. EBR lub EBL – 24-epibrasinolid, BL – brasinolid, CS – kastasteron, TY – tyfasterol czy TE - teasteron). Wymienione wyżej nazwy zwyczajowe BR są w istocie nazwami skróconymi, najczęściej wywodzącymi się od niektórych chemicznych cech budowy tych związków. Przykładowo przedrostek „epi” występujący w nazwie 24-epibrasinolidu, oznacza, że grupa metylowa przy węglu C-24 w cząsteczce tego związku znajduje się w konfiguracji przeciwnej niż w przypadku brasinolidu, przy czym pełna chemiczna nazwa 24-epibrasinolidu to (22R,23R,24R)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahydroksy-24-metylo-B-homo-7-oxa-5 α -cholestan-6-on. Z kolei występowanie przedrostka „homo” charakteryzuje BR posiadające przy węglu C-24 w cząsteczce grupę etylową (-C₂H₅) (ryc. 2), a przedrostek „nor” oznacza brak podstawników węglowych przy węglu C-24 (ryc. 2). Nazwy BR mogą też pochodzić od gatunku, w którym po raz pierwszy odkryto dany związek np. sekasteron (ryc. 4) – od *Secale cereale* L., dolicholid (ryc. 4) – od *Dolichos lablab* L. czy kastasteron (ryc. 1, 3A-B) od *Aesculus hippocastanum* L.

Naturalne BR mogą występować w formie wolnej, ale także w postaci koniugatów (ryc. 4), zagadnieniu temu będzie poświęcony oddzielny rozdział. Obok naturalnie występujących w przyrodzie brasinosteroidów znane są syntetyczne analogi tych związków jak np. 5F-HCTS, BIOBRAS 6 czy MH5 (ryc. 4).

Jak wynika z ryciny 2 zróżnicowanie budowy cząsteczki poszczególnych BR w największym stopniu zależy od liczby i miejsca położenia podstawników w pierścieniu A i B oraz od struktury łańcucha bocznego przyłączonego do atomu węgla C-17. Brasinosteroidy można podzielić w zależności od liczby atomów węgla w cząsteczce na BR typu C₂₇, C₂₈ i C₂₉ (ryc. 2, 3A). Na podstawie obecnej wiedzy przyjmuje się, że prekursorami w biosyntezie brasinosteroidów są: kampesterol oraz 24 β -metylcholesterol (dla BR C₂₈), cholesterol (dla BR C₂₇) i sitosterol (dla BR C₂₉) (Takatsuto i wsp. 1999, Winter i wsp. 1999, Schaller 2003, Kim i wsp. 2000, Kim i wsp. 2004, Kim i wsp. 2006; ryc. 4A). Na przykładzie biosyntezy brasinolidu (BR typu C₂₈), przedstawionej na rycinie 4B, przyjęto, że metabolitami pośrednimi biosyntezy BR są: katasteron, teasteron, (3-dehydroteasteron), tyfasterol i kastasteron w szlaku tzw. wczesnego utlenienia węgla C-6 oraz 6-deoksokatasteron, 6-deoksoteasteron, (3-dehydro-6-deoksoteasteron), 6-deoksotyfasterol i 6-deoksokastasteron w szlaku tzw. późnego utlenienia węgla C-6 (Fujioka i Yokota 2003). Ze względu na dużą różnorodność strukturalną BR możliwe są także i inne, zmodyfikowane szlaki biosyntezy tych związków. I tak,

24-epibrasinolid może powstawać przez przemiany 24-epikatasteronu, 24-epiteasteronu, 24-epityfasterolu i 24-epikastasteronu, a wymienione metabolity pośrednie wywodzą się z kolei z 24 β -metylcholesterolu (Winter i wsp. 1999, Park i wsp. 2000; ryc. 3A). Badania przeprowadzone przez Joo i wsp. (2015) wskazują, że BR z odrębnych szlaków biosyntezy (charakterystycznych np. dla C₂₈ i C₂₉) mogą podlegać przemianom, jak pokazano na rycinie 3C, przechodząc w siebie nawzajem; przykładowo 28-homokastasteron może podlegać przemianom do kastasteronu.

Zaburzenia w przemianach szlaków biosyntezy BR prowadzą do powstawania mutantów (Bishop 2003). Znane są także inhibitory biosyntezy BR (należące głównie do grupy tzw. triazoli), których przykładem jest najpopularniejszy brasinazol, przedstawiony na rycinie 4 (Asami i Yoshida 1999, Asami i wsp. 2000). Na podstawie obecnej fragmentarycznej wiedzy na temat miejsc syntezy/rozkładu BR w komórce, przyjmuje się, że wszystkie enzymy biosyntezy BR, należące do rodziny Cyt P450 są zlokalizowane w błonie retikulum (Jørgensen i wsp. 2005, Gruszka i Małuszyński 2010). W odniesieniu do katabolizmu BR wiadomo, że białko cytochromowe BAS1, hydroksylujące BR w pozycji C-26 (co jest sygnałem inaktywacji/degradacji), zlokalizowane jest także w systemie endomembran - prawdopodobnie retikulum (na podstawie baz TAIR db i AtPID db, Gruszka, informacja ustna). Bardzo szczegółowe informacje na temat genetycznych podstaw biosyntezy i transdukcji sygnału BR można znaleźć w ogólnodostępnej w Internecie, polskojęzycznej pracy autorstwa Gruszki i Małuszyńskiego (2010). Chemizmowi przemian (w tym rozkładu) BR jest z kolei poświęcona praca przeglądowa autorstwa Bajguza (2007) a także praca Vriet i wsp. (2013).

Brasinosteroidy wykazują istotną aktywność biologiczną. Podstawowym, a zarazem pierwszym odkrytym efektem działania BR jest stymulacja wzrostu komórek (Grove i wsp. 1979). BR mogą także regulować rozwój roślin (Janeczko i wsp. 2003, Janeczko i wsp. 2015) i przyczyniać się do zwiększenia plonu roślin o dużym znaczeniu ekonomicznym jak ryż, ziemniaki, pszenica, orzechy ziemne, fasola i inne (Ramraj i wsp. 1997, Zullo i Adam 2002, Fariduddin i wsp. 2009, Janeczko i wsp. 2010). Brasinosteroidy wpływają także na jakość plonu m.in. zwiększając zawartość białka, tłuszczu czy niektórych witamin (Vardhini i Rao 1998, Vardhini i Rao 2002, Janeczko i wsp. 2009, Janeczko i wsp. 2015). Pozytywny wpływ brasinosteroidów na procesy fizjologiczne i w konsekwencji na plonowanie roślin, został udowodniony w wielu przypadkach dla upraw rosnących w warunkach suszy, zasolenia i innych czynników stresowych (Bajguz i Hayat 2009). BR wykazują bowiem aktywność przeciwstresową zarówno względem czynników biotycznych, jak i abiotycznych (Zullo i Adam 2002, Krishna 2003, Nakashita i wsp. 2003, Janeczko i wsp. 2005).

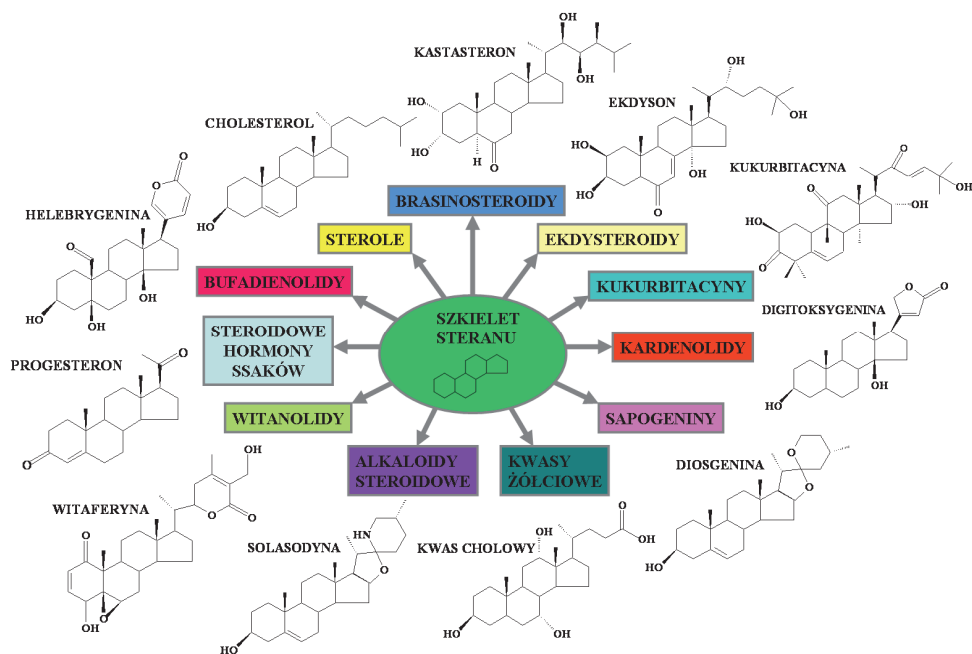
U podstaw fizjologicznej aktywności BR leżą zazwyczaj: wzrost poziomu fotosyntezy netto, wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, ale także re-

duktazy azotanowej i syntetazy glutaminy, wzrost zawartości proliny, chlorofilu, białek rozpuszczalnych, aminokwasów, fenoli i antocyjanów, obniżenie uszkodzeń membran komórkowych, zmiany w gospodarce wodnej (zwiększenie wartości współczynnika względnej zawartości wody (tzw. RWC)), wpływ na aktywność akwaporyn (Sairam 1994 a, b, Xu i wsp. 1994 a, b, Morillon i wsp. 2001, Pustovoi-tova i wsp. 2001, Vardhini i Rao 2003, Fariduddin i wsp. 2009, Farooq i wsp. 2009). Podstaw ochronnego działania BR można upatrywać także w mechanizmie pokazanym przez Dhaubhadel i wsp. (1999, 2002) w badaniach szoku cieplnego. Według Dhaubhadel i wsp. (1999, 2002), 24-epibrasinolid ma zdolność do stymulowania syntezy i utrzymania wysokiego poziomu białek szoku cieplnego (HSP). HSP są powszechnie występującą w roślinach klasą białek, których stężenie wzrasta w organizmie w warunkach działania różnych czynników stresowych. Białka te mają za zadanie ochronę komórkowych białek strukturalnych i funkcjonalnych, w tym enzymów białkowych, przed zniszczeniem struktury w wyniku działania czynników stresowych. Po ustąpieniu czynnika stresowego, rośliny poddane działaniu 24-epibrasinolidu znacznie szybciej regenerują się odzyskując sprawność podstawowych systemów enzymatycznych. Interesujące są także badania Xia i wsp. (2009 b), w których traktowanie roślin ogórka 24-epibrasinolidem stymuluje przejściowo produkcję H_2O_2 , a to z kolei uodparnia roślinę na stres oksydacyjny towarzyszący zwykle innym stresom.

Działanie BR uaktywnia ekspresję genów kojarzonych z odpowiedzią roślin na stresujące warunki środowiskowe. Są to geny kodujące wspomniane już wcześniej białka HSP, białka DNAJ (odpowiedzialne za formowanie 3-wymiarowych struktur białkowych), proteiny PR-1 (związane z reakcjami na patogeny) oraz enzymy należące do grupy detoksyfikujących i antyoksydacyjnych m.in. liazę wodoronadtlenkową (HPL), S-transferazę glutationu (GST), peroksydazę glutationu (GPX), peroksydazę askorbinianu (cAPX), reduktazę monodehydroaskorbinianu (MDAR) i katalazę (CAT) (Xia i wsp. 2009 b).

BR wykazują także wiele innych właściwości dzięki którym znalazły lub znajdują zastosowanie w praktyce. Przykładowo, BR stanowią regulatory stosowane do stymulacji procesów embriogenezy czy organogenezy roślin (Clouse 1998, Sasaki 2002, Azpeitia i wsp. 2003, Pullman i wsp. 2003, Divi i Krishna 2009). Brasinosteroidy przyspieszają także metabolizm pestycydów stosowanych np. w uprawie ogórka, co wpływa na redukcję ich pozostałości w tkankach roślin (Xia i wsp. 2009 a). Przeprowadzono badania nad właściwościami BR na potrzeby farmacji czy medycyny (Bajguz i wsp. 2013, praca przeglądowa). Związki te wykazują np. aktywność antywirusową m.in. przeciw wirusom ludzkiej opryszczki (*Herpes simplex* HSV1) (Wachsman i wsp. 2000). W kulturze zawieszinowej *Taxus chinensis* (Pilg.) Herder, BR stymulują produkcję paklitakselu - alkaloidu stosowanego w terapii nowotworów (Zang i wsp. 2001). Ponadto BR wykazują także działanie przeciwnowotworowe/antyproliferacyjne (Malíková i wsp. 2008) i mają właściwo-

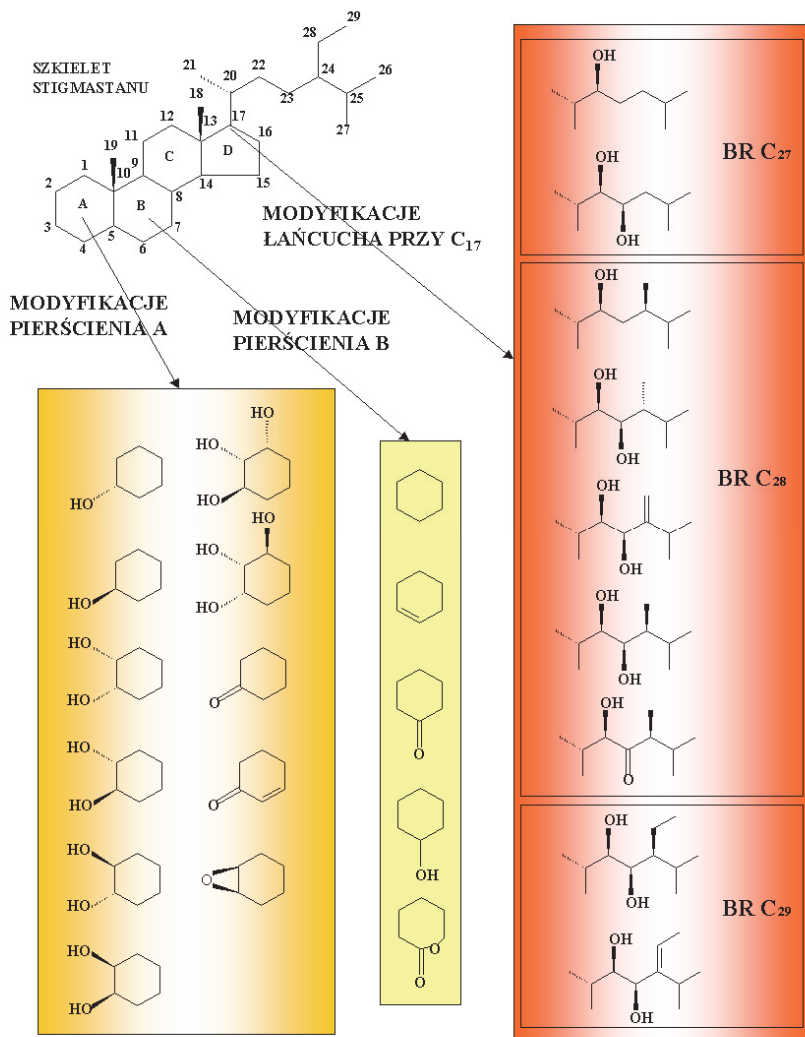
ści anaboliczne (Esposito i wsp. 2011). BR, z racji struktury zbliżonej do steroli, obniżają także poziom cholesterolu we krwi (Zhabinskii i wsp. 2015). Część możliwości praktycznego zastosowania BR zostało już opatentowanych: US Patent 5.071.466. - poprawa walorów smakowych soku jabłkowego i cytrynowego (zwiększanie zawartości cukrów) po opryskach drzew BR; US Patent 6.225.536 - poprawa jakości włókna bawełny przez oprysk plantacji BR.



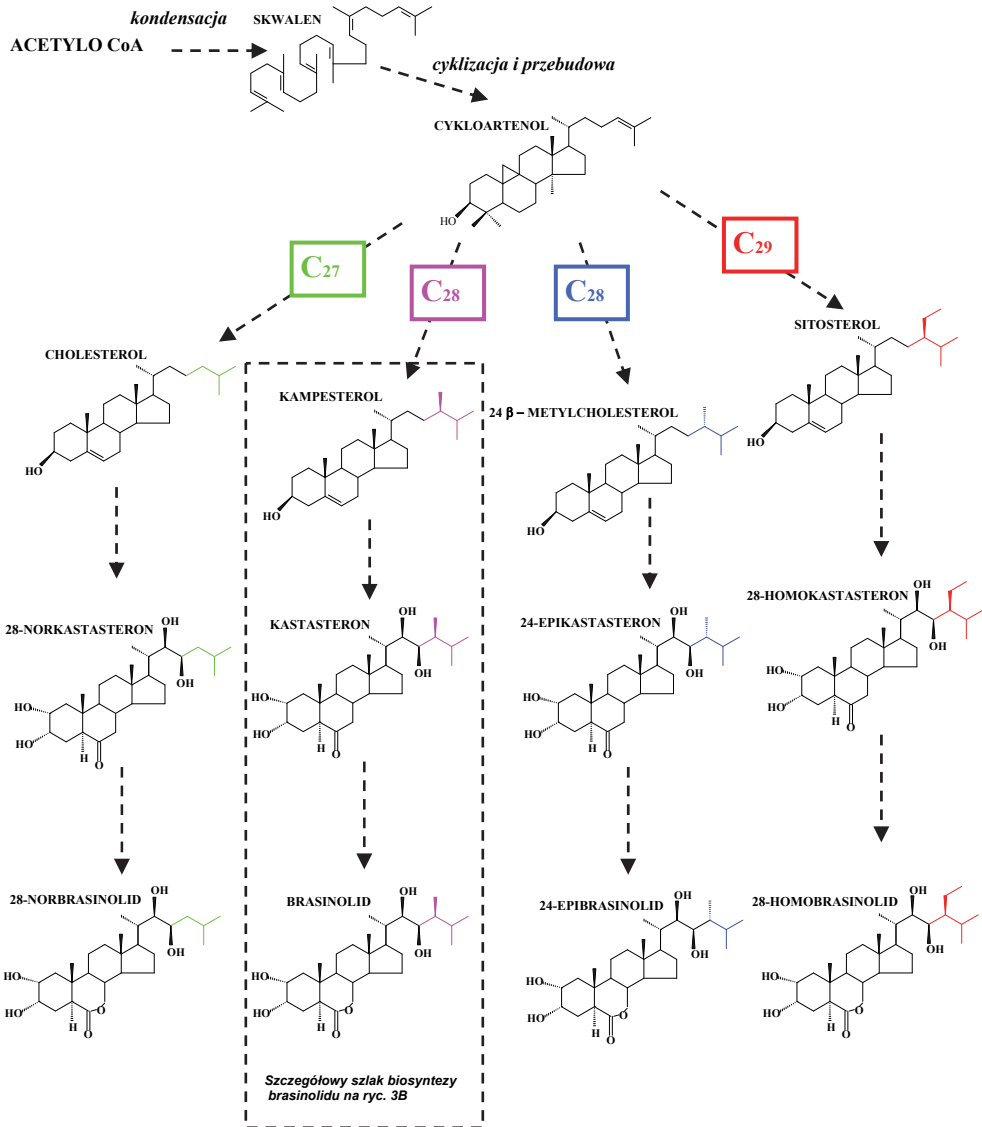
Rycina 1. Struktura steranu oraz związki steroidowe występujące w przyrodzie.

Poszczególne BR różnią się między sobą stopniem aktywności fizjologicznej. Aktywność tą określa się umownie na podstawie testów biologicznych opartych o pomiary stymulacji wzrostu tkanek lub organów ryżu, pomidora, rzodkwi i fasoli (Adam i Marquardt 1986). W oparciu o wyniki testu ryżowego można przyjąć, że spośród naturalnych BR najbardziej aktywny jest brasinolid i 28-homobrasinolid, o połowę niższą aktywność wykazuje kastasteron i 28-homokastasteron a 24-epibrasinolid posiada aktywność dziesięciokrotnie niższą niż brasinolid (Adam i Marquardt 1986). Słabą aktywność biologiczną wykazują brasinosteroidy otwierające szlak biosyntezy BR takie jak kastasteron. Aktywność BR ma bowiem związek z budową ich cząsteczek. Warunkiem wysokiej aktywności jest występowanie w cząsteczce BR grup hydroksylowych w pozycji C-2

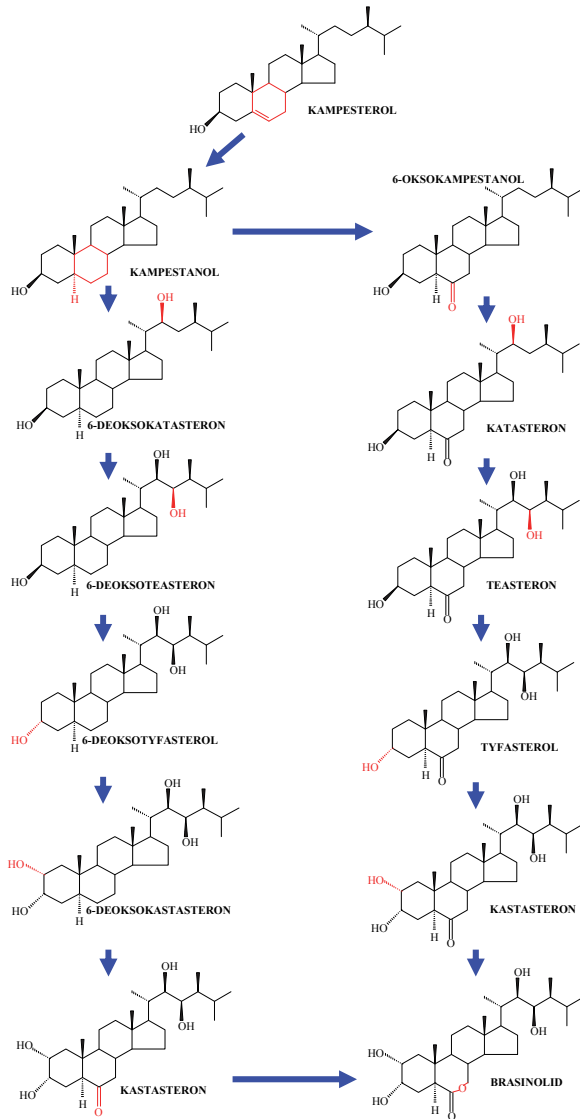
i C-3 (konfiguracja α), grupy metylowej w pozycji C-24 (konfiguracja S) oraz mostka tlenowego w pierścieniu B (Takatsuto i wsp. 1983, Adam i Marquardt 1986).



Rycina 2. Wybrane modyfikacje strukturalne w cząsteczce brasinosteroidów; na podstawie Sasse (1997) - zmienione i uzupełnione. Numeracja szkieletu węglowego dla stigmasteranu wg Chemical Abstracts Service (CAS).



Rycina 3A. Uproszczony model biosyntezy wybranych brasinosteroidów z grup C₂₇, C₂₈ i C₂₉ w roślinach; na podstawie Takatsuto i wsp. 1999, Winter i wsp. 1999, Park i wsp. 2000, Schaller 2003, Kim i wsp. 2004, Kim i wsp. 2006 - zmodyfikowane. W prostokątach podano liczbę atomów węgla w cząsteczce steroidu; kolorem zaznaczono element struktury cząsteczki charakterystyczny dla poszczególnych grup.



Rycina 3B. Szczegółowy model biosyntezy brasinosteroidów na przykładzie brasinolidu; na podstawie Chung i Choe (2013). Kolorem czerwonym zaznaczono zmiany struktury cząsteczki w czasie procesu biosyntezy poprzez szlak późnego utlenienia węgla C-6 (szlak lewy) i wczesnego utlenienia węgla C-6 (szlak prawy).

2. WYSTĘPOWANIE I TRANSPORT BRASINOSTEROIDÓW W ROŚLINACH

2.1. Obecność brasinosteroidów w roślinach

Brasinosteroidy występują powszechnie w świecie roślin w bardzo niskich stężeniach, co stało się jednym z argumentów przemawiających za ich hormonalną naturą. Obecność BR potwierdzono zarówno w roślinach wyższych jedno- i dwuliściennych, jak i u nagozalążkowych, a także w skrzypach i glonach (Bajguz i Tretyn 2003). Wciąż jednak pojawiają się nowe doniesienia o odkryciach BR w kolejnych gatunkach roślin lub o znalezieniu nowych brasinosteroidów o nieznaney dotąd budowie. Uważa się, że BR w największej ilości są obecne w częściach generatywnych roślin np. w pyłku, owocach i w nasionach (Bajguz i Tretyn 2003, Symons i wsp. 2008), lecz w istocie ilość BR waha się znacznie i może zależeć m.in. od gatunku a nawet odmiany. Zdaniem Symons i wsp. (2008) w pewnym uproszczeniu można przyjąć, że zawartość BR w pyłku waha się w granicach 5–1000 ng g⁻¹ świeżej masy (Ś.M.), a w nasionach może dochodzić do 1600 ng g⁻¹ Ś.M.. Zawartość brasinosteroidów w łodygach jest w granicach 0,12 – 2 ng g⁻¹ Ś.M., a w korzeniach znajdują się one w ilości poniżej 0,05 ng g⁻¹ Ś.M. (Symons i wsp. 2008). Jak wspomniano, pomiędzy poszczególnymi rodzinami a także gatunkami roślin mogą występować znaczne różnice w poziomie BR, co zostanie pokazane na przykładzie roślin z rodziny *Poaceae* i *Fabaceae* w dwóch kolejnych rozdziałach.

2.1.1. Występowanie i zmiany zawartości brasinosteroidów w roślinach z rodziny *Poaceae* (wiechlinowate)

U roślin z rodziny *Poaceae* brasinosteroidy znaleziono jak dotychczas u: ryżu, kukurydzy, pszenicy, życie, jęczmieniu a także mozdze kanadyjskiej oraz życicy trwałej. W większości przypadków wykonano oznaczenia jakościowe BR, w kilku pracach dostępna jest analiza ilościowa. Poniżej przedstawiono zestawienie chronologiczne oznaczeń BR u wiechlinowatych.

1984

- **ryż** (*Oryza sativa* L. odm. Arborio J1) *pędy*: kastasteron (13,6 pg g⁻¹ Ś.M.), dolichostron (8,4 pg g⁻¹ Ś.M.) (Abe i wsp. 1984)

1986

- **kukurydza pastewna** (*Zea mays* L.) *pyłek*: kastasteron (120 ng g⁻¹ Ś.M.), tyfasterol (6,6 ng g⁻¹ Ś.M.), teasteron (4,1 ng g⁻¹ Ś.M.) (Suzuki i wsp. 1986)

1990

- **kukurydza cukrowa** (*Zea mays* L.) *pylek*: kastasteron (27,2 ng g⁻¹ ś.M.), 28-norkastasteron (18,3 ng g⁻¹ ś.M.), dolichosteron (16,9 ng g⁻¹ ś.M.) (Gamoh i wsp. 1990)

1993

- **żylica trwała** (*Lolium perenne* L.) *pylek*: 25-metylkastasteron (Taylor i wsp. 1993)

1994

- **pszenica** (*Triticum aestivum* L. odm. Chihoku) *otręby*: kastasteron, 3-dehydroteasteron, teasteron, tyfasterol, 6-deoksokastasteron; *mąka*: kastasteron, teasteron, tyfasterol, 6-deoksokastasteron (Yokota i wsp. 1994)
- **ryż** (*Oryza sativa* L. odm. Tongjinbyeon) *nasiona w stadium dojrzałości mlecznej*: kastasteron, teasteron, 6-deoksokastasteron (Park i wsp. 1994 a)

1995

- **żyto** (*Secale cereale* L.) *nasiona*: sekasteron, kastasteron, 28-homokastasteron, 28-norkastasteron, 6-deoksokastasteron, tyfasterol, teasteron (Schmidt i wsp. 1995)
- **ryż** (*Oryza sativa* L. odm. Koshihikari) *otręby*: 28-homotyfasterol, 28-homoteasteron, 6-deoksokastasteron (Abe i wsp. 1995 a)

1996

- **mozga kanadyjska** (*Phalaris canariensis* L.) *nasiona*: kastasteron (5 ng g⁻¹ nasion), teasteron (0,7 ng g⁻¹ nasion) (Shimada i wsp. 1996)

2003

- **żyto** (*Secale cereale* L. odm. Sorom) *liście 18-dniowych siewek*: sekasteron (52 pg g⁻¹ ś.M.); 2,3-diepisekasteron (20 pg g⁻¹ ś.M.); *korzenie 18-dniowych siewek*: sekasteron (107 pg g⁻¹ ś.M.), 2,3-diepisekasteron (32 pg g⁻¹ ś.M.) (Antonchick i wsp. 2003)
- **żyto** (*Secale cereale* L. odm. Petka) *liście 18-dniowych siewek*: 2,3-diepisekasteron (102 pg g⁻¹ ś.M.); *korzenie 18-dniowych siewek*: 2,3-diepisekasteron (22 pg g⁻¹ ś.M.) (Antonchick i wsp. 2003)

2005

- **żyto** (*Secale cereale* L. odm. Sorom) *nasiona*: kastasteron (574 pg g⁻¹ nasion), 2-epikastasteron 201 pg g⁻¹ nasion), 3-epikastasteron (115 pg g⁻¹ nasion); *liście z 14-dniowych siewek*: kastasteron, 2-epikastasteron, 3-epikastasteron (Antonchick i wsp. 2005)
- **kukurydza cukrowa** (*Zea mays* L. odm. Golden Cross Bantam) *korzenie pierwotne*: 6-deoksokastasteron (0,1 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksoteasteron (1,0 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksotyfasterol (9,0 ng g⁻¹ ś.M.) (Kim i wsp. 2005)

2008

- **ryż** (*Oryza sativa* L., typ dziki) *liście flagowe zebrane po rozpoczęciu kwitnienia roślin*: 6-deoksokatasteron (1,06 ng g⁻¹ ś.M.), 3-epi-6-deoksokatasteron (2,23 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksoteasteron (0,18 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deokso-3-dehydroteasteron (1,18 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksotyfasterol (8,96 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksokastasteron (1,84 ng g⁻¹ ś.M.), teasteron (0,027 ng g⁻¹ ś.M.), tyfasterol (1,47 ng g⁻¹ ś.M.), kastasteron (0,68 ng g⁻¹ ś.M.); *nasiona 15 dni po zakończeniu pylenia roślin*: 6-deoksokatasteron (0,48 ng g⁻¹ ś.M.), 3-epi-6-deoksokatasteron (0,045 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksoteasteron (0,085 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deokso-3-dehydroteasteron (0,075 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksotyfasterol (0,14 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksokastasteron (0,115 ng g⁻¹ ś.M.), teasteron (0,040 ng g⁻¹ ś.M.), tyfasterol (0,08 ng g⁻¹ ś.M.), kastasteron (0,08 ng g⁻¹ ś.M.) (Wu i wsp. 2008). Znane są już także rośliny transgeniczne ryżu produkujące brasinosteroidy w większej ilości niż ich "dzikie" odpowiedniki (Wu i wsp. 2008).

2010

- **pszenica jara** (*Triticum aestivum* L. odm. Cytra) *10-dniowe siewki (pierwszy + drugi liść)*: brasinolid (303* pg g⁻¹ ś.M.), 24-epibrasinolid (258 pg g⁻¹ ś.M.), kastasteron (ilości śladowe**); *trzeci liść (21-dniowe siewki)*: brasinolid (885 pg g⁻¹ ś.M.), kastasteron (785 pg g⁻¹ ś.M.) (Janeczko i Swaczynová 2010).
- **pszenica jara** (*Triticum aestivum* L. odm. Torka) *dojrzałe nasiona*: brasinolid (127 pg g⁻¹ ś.M.), kastasteron (159 pg g⁻¹ ś.M.), 24-epikastasteron (535 pg g⁻¹ ś.M.) (Janeczko wsp. 2010).

2011

- **jęczmień jary** (*Hordeum vulgare* L. odm. Sezam) *liść podflagowy*: brasinolid (700 pg g⁻¹ ś.M.), kastasteron (930 pg g⁻¹ ś.M.), 24-epibrasinolid (ilości śladowe) (Janeczko wsp. 2011 a).

2014

- **jęczmień jary** (*Hordeum vulgare* L. odm. Bowman) *14-dniowe siewki (część nadziemna)*: kastasteron (1245 pg g⁻¹ ś.M.) (Dockter i wsp. 2014)
- **jęczmień jary** (*Hordeum vulgare* L. mutant BW84 z zaburzoną biosyntezą BR) *14-dniowe siewki (część nadziemna)*: kastasteron (167 pg g⁻¹ ś.M.) (Dockter i wsp. 2014).

* oryginalne dane z części publikacji, w tym Janeczko i Swaczynová (2010), Janeczko i wsp. (2010, 2011, 2015), Dockter i wsp. (2014) i Asahina i wsp. (2014), przeliczone z oryginalnych jednostek na pikogramy lub nanogramy na potrzeby niniejszego zestawienia.

** limit detekcji dla BR na aparacie ACQUITY UPLC[®] I-Class System (Waters, Milford, MA, USA) ze spektrometrem masowym XevoTM TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) wynosi około 0.01 pg g⁻¹ ś.M. (J. Oklestkova, informacja ustna).

- **jęczmień jary** (*Hordeum vulgare* L. mutant BW312, zaburzenia w percepcji BR przez receptor BR) 14-dniowe siewki (część nadziemna): kastasteron ($3434 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$) (Dockter i wsp. 2014).
- **ryż** (*Oryza sativa* L. odm. Koshihikari) 7-dniowe siewki (część nadziemna): 6-deoksokatasteron ($605 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 6-deoksoteasteron ($177 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), teasteron ($40 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 6-deokso-3-dehydroteasteron ($549 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 6-deoksotyfasterol ($2897 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), tyfasterol ($463 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 6-deoksokastasteron ($900 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), kastasteron ($329 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$); *korzenie 7-dniowych siewek*: 6-deoksokatasteron ($723 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 6-deoksoteasteron ($288 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), teasteron ($248 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 6-deokso-3-dehydroteasteron ($546 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 6-deoksotyfasterol ($3904 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), tyfasterol ($780 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 6-deoksokastasteron ($142 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), kastasteron ($34 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$) (Asahina i wsp. 2014).

2015

- **pszenica jara** (*Triticum aestivum* L. odm. Katoda) 7-dniowe siewki (część nadziemna): brasinolid ($4 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$), kastasteron ($0,08 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$) (Janeczko i wsp. 2015).

W roślinach wiechlinowatych brasinosteroidy oznaczano w większości przypadków metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC-MS) (Abe i wsp. 1984, Suzuki i wsp. 1986, Yokota i wsp. 1994, Park i wsp. 1994 a, Schmidt i wsp. 1995, Abe i wsp. 1995 a, Antonchick i wsp. 2003, Kim i wsp. 2005). Pojedyncze przypadki dotyczą oznaczeń metodą chromatografii cieczowej z detekcją fluorometryczną (Gamoh i wsp. 1990), a także metodami immunochemicznymi (Taylor i wsp. 1993). Metodę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią masową zastosował Antonchick i wsp. (2005), a wysokosprawnej oraz ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (HPLC lub UHPLC-ESI-MS/MS) zastosowano w pracach Janeczko i Swaczynová (2010), Janeczko i wsp. (2010, 2011, 2015) oraz Dockter i wsp. (2014). Metoda HPLC lub UHPLC-ESI-MS/MS pozwoliła na precyzyjne oznaczenia przy użyciu małej 0,5 – 2 gramowej próbki materiału, w odróżnieniu od próbek stosowanych przy GC-MS, które mogą ważyć nawet do kilkudziesięciu kilogramów (Grove i wsp. 1979).

Obserwowana w tej samej części rośliny obecność brasinosteroidów należących do różnych grup: C₂₇, C₂₈ czy C₂₉, tj. o odmiennej strukturze chemicznej a także innym szlaku biosyntezy (ryc. 3A), może wskazywać, że w roślinie funkcjonuje równocześnie kilka dróg biosyntezy tych związków lub też świadczyć może o przemianach BR z jednej grupy strukturalnej w BR z innych grup (Joo i wsp. 2015; ryc. 3C).

Analiza przedstawionych danych literaturowych pokazuje różnice w ilości akumulowanych BR pomiędzy poszczególnymi gatunkami, odmianami, młodszymi i starszymi liśćmi oraz organami roślinnymi. Kolejnym czynnikiem powodującym zmiany zawartości BR są mutacje. Mutanty z zaburzoną produkcją BR charakteryzuje obniżona zawartość BR, natomiast mutanty z zaburzeniami percepcji BR akumulują więcej tych związków (Dockter i wsp. 2014). Ponadto z prac Janeczko i Swaczynová (2010) oraz Janeczko i wsp. (2010) wynika, że ilość i profil brasinosteroidów naturalnie obecnych np. w pszenicy, może ulegać zmianom w związku ze sposobem traktowania roślin matecznych oraz warunków środowiskowych kiełkowania i wzrostu. Zjawisko to dotyczy zarówno liści jak i nasion. Liście 10-dniowych siewek pszenicy uzyskanych z nasion moczonych przedsięwzię 24 godziny w roztworze wodnym (następnie kiełkujących i rosnących w tym samym roztworze) zawierały cztery brasinosteroidy: 24-epibrasinolid, brasinolid, kastasteron i 28-homobrasinolid (Janeczko i Swaczynová 2010). Natomiast, w przypadku, gdy podkiełkowane na wodzie 3-dniowe siewki przeniesiono do świeżego roztworu wodnego, gdzie kontynuowały wzrost przez kolejne 7 dni, analiza BR w liściach wykazała, że rośliny zawierały 24-epibrasinolid, brasinolid oraz tylko śladowe ilości kastasteronu. Obecności 28-homobrasinolidu wówczas nie stwierdzono. Dodatkowo, zawartość brasinolidu była statystycznie istotnie niższa w tych siewkach niż w pierwszym przypadku (Janeczko i Swaczynová 2010).

Sposób traktowania nasion (materiału siewnego) lub rosnących roślin może mieć także dalekosiężne skutki i modyfikować profil BR w nowopowstającym ziarnie (Janeczko i wsp. 2010). Zarówno przedsięwzię moczenie nasion, jak i oprysk roślin w fazie kłoszenia roztworem wodnym zawierającym np. śladowe ilości etanolu podwyższały zawartość 24-epikastasteronu a także brasinolidu (przy niezmiętej ilości kastasteronu) w stosunku do zawartości tych związków w ziarnie roślin kontroli (ziarno z roślin niczym nietraktowanych). Wybrane dane ilustrujące to zjawisko przedstawiono w tabeli 1.

Na ilość i profil brasinosteroidów w roślinie ma wpływ także stosowanie egzogennych brasinosteroidów (Janeczko i Swaczynová 2010, Janeczko i wsp. 2010). W liściach 10-dniowych siewek pszenicy uzyskanych z nasion po 24 godzinnym moczeniu w roztworach 24-epibrasinolidu nie stwierdzono - obecnego w kontroli - 28-homobrasinolidu, natomiast zawartość pozostałych BR nie ulegała zmianom. Z kolei u siewek, które jako 3-dniowe były podlane roztworem 24-epibrasinolidu, stwierdzono znaczny spadek ilości brasinolidu oraz zanik kastasteronu w porównaniu do kontroli (Janeczko i Swaczynová 2010). W doświadczeniu poletkowym opisanym w pracy Janeczko i wsp. (2010) aplikowany egzogenne 24-epibrasinolid nie ulegał akumulacji w ziarnie. Niemniej jednak podanie go w formie oprysku roślin czy przedsięwzię moczenia nasion miało wpływ na zawartość niektórych brasinosteroidów w zebranym ziarnie. Przykładowo-

wo, w nasionach uzyskanych z roślin opryskanych w fazie kłoszenia roztworem 24-epibrasinolidu, zawartość kastasteronu nie zmieniła się, natomiast zmniejszyła się zawartość 24-epikastasteronu (tab. 1). Z kolei u jęczmienia stosowanie 24-epibrasinolidu nie miało wpływu na zawartość innych brasinosteroidów tj. brasinolidu i kastasteronu w liściach (Janeczko i wsp. 2011 a).

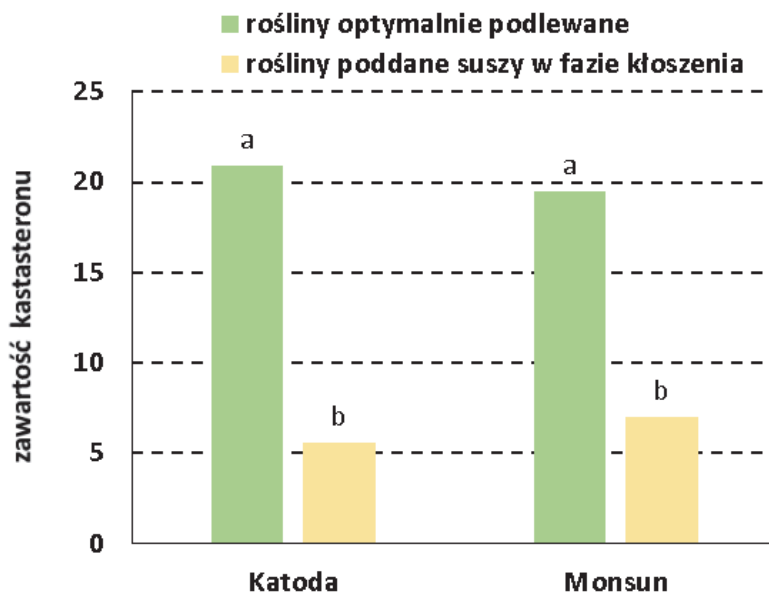
Wpływ egzogenne 24-epibrasinolidu na wahania zawartości innych brasinosteroidów w roślinie, można tłumaczyć przemianami tego związku do innych BR (np. brasinolidu) lub jego wpływem na szlaki biosyntezy BR (np. na zasadzie sprzężenia zwrotnego). Jednym z możliwych szlaków powstania 24-epibrasinolidu w roślinie jest jego synteza z prekursora 24-epikastasteronu. Suplementacja roślin egzogenne 24-epibrasinolidem mogłaby zwrotnie wpływać na ograniczenie biosyntezy jego prekursora (tab. 1).

Tabela 1.

Zmiany zawartości kastasteronu i 24-epikastasteronu [pg g^{-1} s.m.] w nasionach pszenicy jarej opryskanej 24-epibrasinolidem w fazie kłoszenia w warunkach polowych (Janeczko i wsp. 2010). *Wartości średnie \pm SE oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie wg testu Duncana ($P \leq 0.05$); kontrola etanolowa – rośliny opryskane wodą z dodatkiem śladowej ilości etanolu odpowiadającej zawartości tego rozpuszczalnika w roztworze 24-epibrasinolidu.*

| Traktowanie | | kastasteron | 24-epikastasteron |
|---------------------|--|---------------------------|---------------------------|
| Rośliny niepryskane | | 159 \pm 3 ^a | 535 \pm 18 ^b |
| Rośliny pryskane | Kontrola etanolowa | 133 \pm 38 ^a | 631 \pm 58 ^a |
| | 24-epibrasinolid 0,25 [mg dm^{-3}] | 120 \pm 37 ^a | 355 \pm 37 ^c |

Zmiany zawartości BR w roślinach mogą zachodzić także pod wpływem działania czynników stresowych. Przykładowo, czynnik suszy powodował zmiany w ilości poszczególnych brasinosteroidów u dwóch odmian pszenicy jarej – Monsun i Katoda (Janeczko i Oklestkova, projekt 818/N-COST/2010/0). Pomiar BR wykonany metodą UHPLC-ESI-MS/MS wykazał, że w przypadku 21-dniowych siewek, które przeszły okres suszy, zarówno u odmiany Monsun, jak i u odmiany Katoda wzrosła ilość 28-homokastasteronu (obecnego w formie wolnej i skoniugowanej z glikozydami) w porównaniu do kontroli podlewanej. Z kolei w liściach flagowych roślin kłoszących się poddanych stresowi suszy czterokrotnie zmalała ilość formy wolnej kastasteronu u obu badanych odmian (ryc. 5).



Rycina 5. Zmiany zawartości kastasteronu [$\text{ng g}^{-1} \text{ S.M.}$] w liściu flagowym pszenicy odmian Katoda i Monsun optymalnie podlewanych i poddanych stresowi suszy (Janeczko i Oklestkova, projekt 818/N-COST/2010/0). Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie wg testu Duncana ($P \leq 0.05$).

Na zawartość BR w tkankach ma wpływ także temperatura wzrostu roślin (Dockter i wsp. 2014). Jęczmień (genotyp BW885) rosnący w temperaturze 14°C charakteryzuje się zawartością kastasteronu na poziomie $3,5 \text{ ng g}^{-1} \text{ S.M.}$ liści. Podwyższenie temperatury wzrostu roślin do 26°C indukuje istotny wzrost poziomu kastasteronu do $4,8 \text{ ng g}^{-1} \text{ S.M.}$ liścia (Dockter i wsp. 2014). Także w przypadku żyta, w trakcie procesu hartowania w niskiej temperaturze (5°C) przez 3 tygodnie, u dwóch badanych odmian (Dańkowskie Żłote i Stach) zawartość kastasteronu wzrasta (Pociecha i wsp. 2016).

Kolejnym czynnikiem modyfikującym zawartość brasinosteroidów jest obecność lub brak światła oraz jego barwa (Asahina i wsp. 2014). Kierunki zmian stężeń BR pod działaniem światła o różnej barwie są odmienne dla różnych brasinosteroidów. Przykładowo naświetlanie części nadziemnej siewek ryżu światłem niebieskim nie zmienia istotnie ilości 6-deoksotyfasterolu w liściach w porównaniu do siewek rosnących w świetle białym. Stężenie tego BR spada blisko o połowę w siewkach rosnących w warunkach czerwieni, dalekiej czerwieni lub w ciemności. Z kolei zawartość 6-deoksokastasteronu utrzymuje się w liściach na dość zbliżonym poziomie, niezależnie od barwy światła, w którym rosną rośliny. W przy-

padku korzeni badanych siewek, stwierdzono przykładowo, że zawartość 6-deoksofasterolu jest podobna w warunkach światła białego i ciemności lecz podwyższona, gdy siewki rosły na świetle niebieskim, czerwonym i w dalekiej czerwieni. Z kolei zawartość 6-deoksokasteronu jest na podobnym poziomie w korzeniach siewek rosnących w warunkach światła białego, niebieskiego i czerwonego, natomiast w warunkach dalekiej czerwieni i ciemności jest istotnie podwyższona. Zjawiska te mają związek z rolą BR jako czynników regulujących proces fotomorfogenezy. Asahina i wsp. (2014) podkreślają ponadto, że zmiany stężenia BR u ryżu powiązane były z zależną od światła regulacją ekspresji genów enzymów odpowiedzialnych za biosyntezę BR.

Omówione dotychczas zagadnienia na pewno wymagają dalszych badań, m.in. w celu głębszego zrozumienia mechanizmu tych zjawisk, i odpowiedzi na pytanie czy są one wynikiem wzrostu syntezy BR czy także (np. w warunkach stresu) zmian równowagi wolnych BR i ich form skoniugowanych.

2.1.2. Występowanie i zmiany zawartości brasinosteroidów w roślinach z rodziny *Fabaceae* (bobowate)

U roślin z rodziny *Fabaceae* obecność brasinosteroidów stwierdzono na podstawie analizy jakościowej i ilościowej przeprowadzonej na kilku gatunkach: w nasionach, pyłku, pędach i liściach. Poniżej zamieszczono przegląd literatury dotyczący tego zagadnienia (zestawienie chronologiczne, zgodnie z datami odkrycia).

1983/84

- **fasola zwyczajna** (*Phaseolus vulgaris* L. odm. Kentucky Wonder) *niedojrzałe nasiona*: 6-deoksokasteron, 6-deoksodolichosteron, dolicholid, kastasteron (Yokota i wsp. 1983 a)
- **fasolnik egipski** (*Dolichos lablab* L.) *niedojrzałe nasiona*: dolichosteron ($1,47 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 28-homodolichosteron ($0,59 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 28-homodolicholid ($0,35 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$), dolicholid ($4,71 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$) oraz kastasteron, brasinolid, 6-deoksokasteron, 6-deoksodolichosteron (Baba i wsp. 1983, Yokota i wsp. 1983 b, Yokota i wsp. 1984)

1987

- **bób** (*Vicia faba* L.) *niedojrzałe nasiona*: kastasteron, brasinolid (Park i wsp. 1987)
- **fasola zwyczajna** (*Phaseolus vulgaris* L. odm. Kentucky Wonder) *niedojrzałe nasiona*: 25-metylodolichosteron ($0,88 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$) (Kim i wsp. 1987)
- **fasola zwyczajna** (*Phaseolus vulgaris* L. odm. Kentucky Wonder) *niedojrzałe nasiona*: 6-deoksohomodolichosteron, dolichosteron, brasinolid, 6-deoksodolichosteron, 6-deoksokasteron, kastasteron, dolicholid (Yokota i wsp. 1987)

1988

- **bób** (*Vicia faba* L.) *pyłek*: brasinolid ($190 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 24-epibrasinolid ($5 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$), kastasteron, 28-norkastasteron (brasinon) (Ikekawa i wsp. 1988)

1989

- **bób** (*Vicia faba* L.) *pyłek*: brasinolid ($181 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$), kastasteron ($134 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 28-norkastasteron ($628 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$), dolichosteron ($537 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$) (Gamoh i wsp. 1989)

1993

- **seradela siewna** (*Ornithopus sativus* Brot.) *nasiona*: kastasteron, 24-epikastasteron (Schmidt i wsp. 1993)

1994

- **lust głąbigroszek** (*Psophocarpus tetragonolobus* (Stickm.) *nasiona*: brasinolid, kastasteron, 6-deoksokastasteron, 6-deoksodolichosteron (Takatsuto 1994)
- **bób kawowy** (*Cassia tora* L.) *niedojrzałe nasiona*: brasinolid ($18 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), kastasteron ($160 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), tyfasterol ($7 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), teasteron ($40 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$), 28-norkastasteron ($8 \text{ pg g}^{-1} \text{ ś.M.}$) (Park i wsp. 1994 b)

1995

- **robinia akacyjowa** (*Robinia pseudo-acacia* L.) *pyłek*: kastasteron, 6-deoksokastasteron, tyfasterol (Abe i wsp. 1995 b)
- **seradela siewna** (*Ornithopus sativus* Brot.) *pędy 3-tygodniowych roślin*: 6-deokso-24-epikastasteron, 6-deokso-28-norkastasteron, kastasteron, 24-epikastasteron, 6-deoksokastasteron (Spengler i wsp. 1995)

1996

- **groch siewny** (*Pisum sativum* L. odm. Kurumeyutaka) *niedojrzałe (zielone) nasiona*: 2-deoksybrasinolid, brasinolid, kastasteron, tyfasterol, 6-deoksokastasteron (Yokota i wsp. 1996)

2000

- **fasola zwyczajna** (*Phaseolus vulgaris* L. odm. Kentucky Wonder) *niedojrzałe nasiona*: 24-epikastasteron, 3,24-diepi-kastasteron (Park i wsp. 2000)
- **fasola zwyczajna** (*Phaseolus vulgaris* L. odm. Kentucky Wonder) *niedojrzałe nasiona*: teasteron, tyfasterol (Kim i wsp. 2000)

2003

- **groch siewny** (*Pisum sativum* L., odm. Torsdag, linia Horbat 107) *część nadziemna 7 dniowych siewek hodowanych w ciemności*: 6-deoksokastasteron ($0,82\text{-}1,12 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$), kastasteron ($0,12 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$); *część nadziemna 7-dniowych siewek hodowanych w ciemności po 96 godzinach deetiolacji*:

6-deoksokastasteron (2,52 ng g⁻¹ ś.M.), kastasteron (0,11 ng g⁻¹ ś.M.) (Symons i Reid 2003)

2004

- **groch siewny** (*Pisum sativum* L., odm. Torsdag, linia Horbat 107) *pak wierzchołkowy*: kastasteron (0,26 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksokastasteron (5,29 ng g⁻¹ ś.M.), tyfasterol (0,09 ng g⁻¹ ś.M.); *lodyga*: kastasteron (0,21 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksokastasteron (2,97 ng g⁻¹ ś.M.), tyfasterol (0,04 ng g⁻¹ ś.M.); *liście*: kastasteron (0,17 ng g⁻¹ ś.M.), 6-deoksokastasteron (2,06 ng g⁻¹ ś.M.); *korzenie*: 6-deoksokastasteron (0,30 ng g⁻¹ ś.M.) (Symons i Reid 2004). Znane są także oznaczenia BR dla mutantów grochu wykazujących zaburzenia w biosyntezie lub percepcji tych związków, różnią się one zazwyczaj poziomem niektórych BR względem tzw. typów dzikich (Symons i Reid 2004).

2008

- **groch siewny** (*Pisum sativum* L., odm. Torsdag, linia Horbat 107) *trzy najmłodsze liście około 1-miesięcznych siewek*: kastasteron (0,22-0,51 ng g⁻¹ ś.M.); *trzy najmłodsze liście około 1-miesięcznych siewek rosnące w warunkach deficytu wody*: kastasteron (0,33-1,11 ng g⁻¹ ś.M.) (Jager i wsp. 2008)

2011

- **soja** (*Glycine max* L. odm. Aldana) *dojrzałe nasiona*: brasinolid (163 pg g⁻¹ ś.M.), kastasteron (591 pg g⁻¹ ś.M.) (Janeczko i wsp. 2011 b).

Podobnie jak w przypadku oznaczeń wykonywanych u roślin wiechlinowatych większość analiz BR została wykonana metodami GC-MS z wykorzystaniem dużych, nawet kilkudziesięciokilogramowych prób materiału, podczas gdy w pracy Janeczko i wsp. (2011 b), dzięki zastosowaniu techniki UHPLC-ESI-MS/MS, zanalizowano około 1,5 gramowe próbki nasion soi.

Analizy wykonane przez Janeczko i wsp. (2011 b) w dojrzałych nasionach soi 'Aldana' pochodzą z doświadczeń dotyczących wpływu 24-epibrasinolidu na plonowanie soi. Analizy te miały na celu ocenę akumulacji egzogenego 24-epibrasinolidu w nasionach produkowanych przez traktowaną tym związkiem roślinę. Obecności aplikowanego związku w nasionach jednak nie stwierdzono. Wykazano natomiast występowanie dwóch innych istotnych brasinosteroidów – brasinolidu i kastasteronu. Porównując ilości brasinolidu i kastasteronu w nasionach z roślin kontrolnych i traktowanych 24-epibrasinolidem można jednak zauważyć różnicę w ich zawartości, choć suma analizowanych brasinosteroidów (ilość brasinolidu + ilość kastasteronu) jest zbliżona w obu obiektach - traktowanym 24-epibrasinolidem i kontrolnym - i wynosi odpowiednio 846 i 754 pg g⁻¹ ś.M. nasion. W nasionach pozostałych bobowatych, wspomniany kastasteron i brasinolid (obok innych BR) oznaczono w analizie jakościowej u grochu siewnego, fasoli

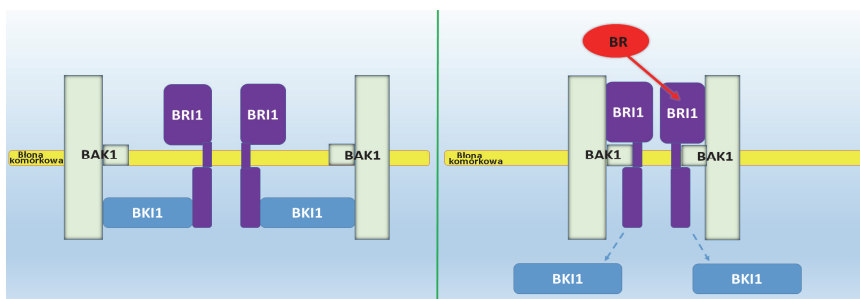
nika egipskiego, fasoli zwyczajnej, bobu, bobu kawowego i łustu głąbigroszka (Park i wsp. 1987, Yokota i wsp. 1987, Takatsuto 1994, Park i wsp. 1994 b, Yokota i wsp. 1996). Jeżeli chodzi o analizę ilościową tych dwóch związków w nasionach roślin z rodziny bobowatych, to stwierdzono ich obecność w niedojrzałych nasionach bobu kawowego (Park i wsp. 1994 b). Oba te związki występują tam w ilości mniejszej niż w dojrzałych nasionach badanej soi; dotyczy to zwłaszcza brasinolidu.

Zagadnienie zmian stężenia BR w roślinach bobowatych w wyniku stresów środowiskowych jest bardzo słabo poznane. Stwierdzono jedynie, że poziom tego związku (forma wolna) nie zmienia się u grochu w warunkach stresu suszy (Jager i wsp. 2008).

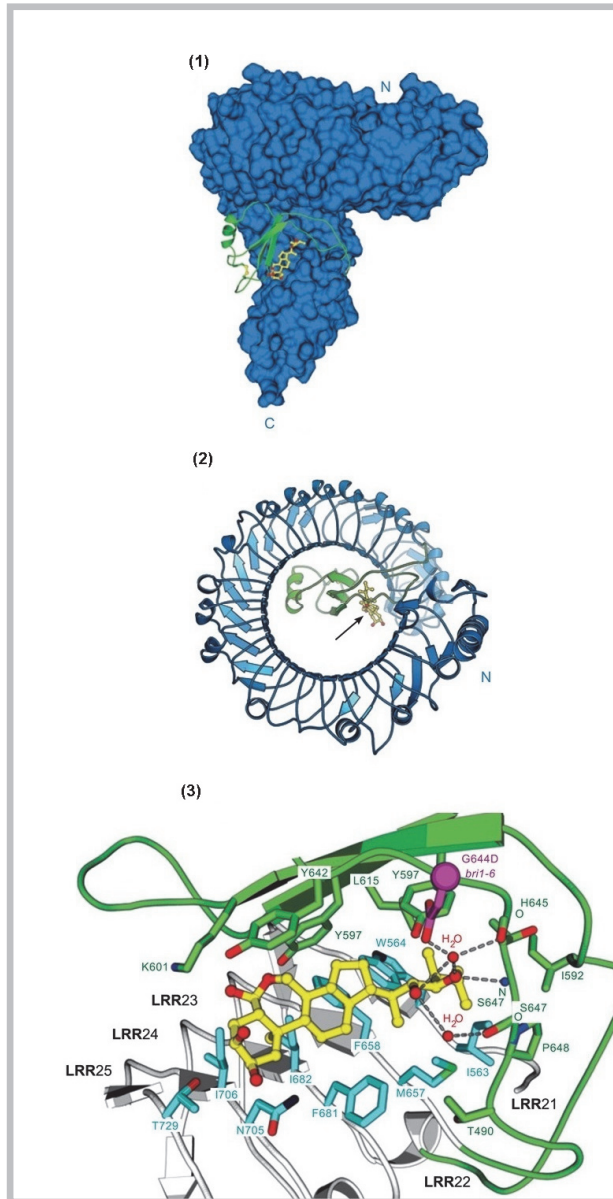
2.2. Pobieranie i transport brasinosteroidów w roślinach

2.2.1. Receptory brasinosteroidów

Dotychczas zlokalizowano i dość dobrze scharakteryzowano receptory brasinosteroidów w błonie zewnętrznej komórek (Wang i wsp. 2001; ryc. 6A). Szczegóły budowy takiego receptora BR za Hothorn i wsp. (2011) przedstawiono na rycinie 6B. Jednak specyficzne wiązanie brasinosteroidów stwierdzono w badaniach z zastosowaniem tzw. radioligandów zarówno we frakcjach membranowych komórki jak i w cytozolu (Xu i wsp. 1994). Wiązanie to było zależne od temperatury (osiągając maksimum przy 4°C) oraz osłabiane przez działanie trypsyny, co wskazuje na białkowy charakter struktur wiążących.



Rycina 6A. Budowa ogólna białkowego receptora brasinosteroidów zlokalizowanego w błonie zewnętrznej komórki roślinnej; na podstawie Saini i wsp. (2015). Po lewej stronie nieaktywny receptor złożony z białka wiążącego ligand (brasinosteroid) - BRI1 i kinazy białkowej - BAK1, połączony z inhibitorem kinazy - BKI1. Po prawej stronie aktywacja receptora przez przyłączenie liganda (brasinosteroidu), czemu towarzyszy odłączenie inhibitora BKI1. Aktywacja receptora uruchamia łańcuch sygnału prowadzący do ekspresji genów regulowanych przez brasinosteroidy.

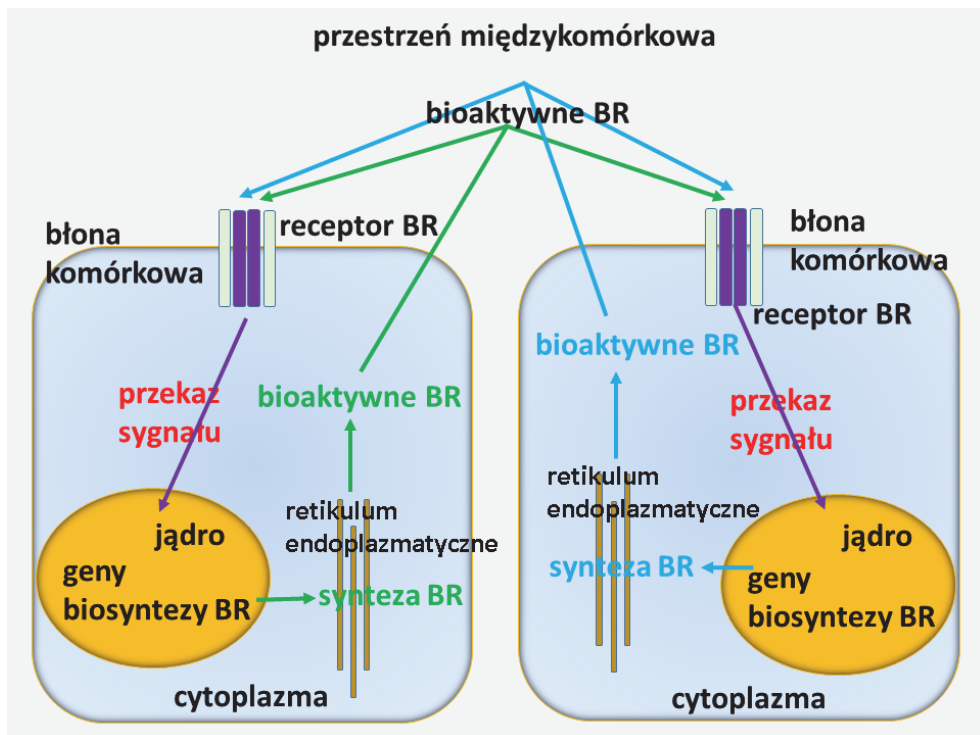


Rycina 6B. Wybrane elementy receptora BR - szczegóły budowy; na podstawie Hothorn i wsp. (2011). (1) Brasinolid (zaznaczony na żółto) wiąże się z powierzchnią utworzoną przez domenę LRR (kolor niebieski) oraz część tzw. domeny wyspowej (oznaczonej kolorem zielonym) receptora brasinosteroidów. (2) Brasinolid w centrum superhelisy BR11. (3) Interakcja białko-hormon w miejscu wiązania brasinosteroidu (zaznaczone na żółto) do BR11. *Przedruk za zgodą Nature Publishing Group, zmienione.*

W przypadku dobrze opisanego receptora BR w błonie zewnętrznej komórki wiadomo, że rozpoznanie i przyłączenie brasinosteroidu wymaga aktywnego kompleksu BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BRI1) i związanej z BRI1 kinazy (BAK1) (Saini i wsp. 2015; ryc. 6A). Rozpoznawane przez zewnątrzkomórkową, bogatą w leucynę domenę BRI1 (LRR, ryc. 6B), brasinosteroidy indukują za pośrednictwem fosforylacji tzw. kaskady sygnałowe skutkujące ekspresją genów regulowanych przez BR (ryc. 6C). Jest to odpowiedź genomowa. Hormony steroidowe generują także odpowiedź niegenomową, która nie wiąże się z koniecznością ekspresji genów. Objawia się ona szybkimi efektami, takimi jak zmiany przepuszczalności membran komórkowych wynikające z oddziaływania steroidu bezpośrednio na kanały wodne lub jonowe zlokalizowane w membranie. Efekty niegenomowe powodowane przez hormony steroidowe są u ssaków bardzo dobrze rozpoznane. U roślin jednak, na obecnym etapie wiedzy, istnienie niegenomowych efektów indukowanych przez BR nie jest jeszcze wyraźnie formułowane, a zagadnienie wymaga badań, choć wyniki niektórych prac sugerują, że zjawisko to może także mieć miejsce (Morillon i wsp. 2001, Skoczowski i wsp. 2011).

2.2.2. Hipoteza transportu brasinosteroidów wytwarzanych w roślinie

W związku z tym, że receptory BR znajdują się w membranach na zewnątrz komórki, należy przyjąć, że w celu połączenia ligand-receptor, związki te muszą być wytransportowane z miejsca syntezy, jakim jest komórka, w przestrzeń międzykomórkową (Symons i wsp. 2008). Jednocześnie jednak nie ma przekonujących dowodów, iż endogenne BR są transportowane na dłuższych odległościach w roślinie np. ze starszych organów do nowo- wykształcanych (Symons i wsp. 2008). W eksperymentach wykonanych na grochu, polegających na szczepieniu mutantów karłowatych z zaburzoną biosyntezą BR i roślin typu dzikiego, wykazano, że rośliny karłowe pozostają karłowe nawet po naszczeniu na podkładkę typu dzikiego. Z kolei zrazy zaszczepione na podkładce karłowego mutantu rosną i rozwijają się prawidłowo (Symons i Reid 2004). Ponadto, u roślin grochu odcięcie wierzchołka pędu (który teoretycznie mógłby być źródłem BR – jak w przypadku auksyn) nie zmienia zawartości BR w łodydze i liściach. Zawartość BR w łodydze i w wierzchołku pozostaje także taka sama u roślin po defoliacji (odcięciu liści), jak przed defoliacją (Symons i Reid 2004). Na podstawie przytoczonych danych, sformułowano hipotezę krótkodystansowego, międzykomórkowego transportu BR (Symons i wsp. 2008; ryc. 6C). Według tej hipotezy BR są transportowane z komórki w przestrzeń międzykomórkową, skąd następnie oddziałują na receptory błonowe jedynie sąsiednich, najbliższych położonych komórek. Na przedstawionym schemacie nieznanym pozostaje sposób przejścia BR z wnętrza komórki przez membranę na zewnątrz komórki. Można jedynie przypuszczać, że BR przenikają przez błonę wskutek wolnej dyfuzji na podobnej zasadzie, jak hormony steroidowe u ssaków (Oren i wsp. 2004).



Ryc. 6C. Model międzykomórkowego transportu brasinosteroidów zaproponowany przez Symons i wsp. (2008).

2.2.3. Pobieranie i transport egzogennych brasinosteroidów

W eksperymentach rolniczych lub biologicznych, gdzie obserwuje się efekty działania BR, związki te aplikowane są zazwyczaj poprzez oprysk roślin (Xu i wsp. 1994 a, b, Ramraj i wsp. 1997, Vardhini i Rao 1999, Fariduddin i wsp. 2004, Upreti i Murti 2004, Gomes i wsp. 2006, Hasan i wsp. 2008), poprzez system korzeniowy (Ali i wsp. 2006, 2008, Hayat i wsp. 2007) czy poprzez przedsięwzięte moczenie nasion (Hayat i Ahmad 2003). Poznanie efektywności pobierania, a zwłaszcza akumulacji BR w różnych częściach rośliny, może mieć znaczenie dla eksperymentów rolniczych, w których bierze się pod uwagę możliwość praktycznego zastosowania BR (Ramraj i wsp. 1997).

2.2.3.1. Stosowanie brasinosteroidów na powierzchnię liści

Brasinosteroidy aplikowane w formie oprysku są słabo transportowane lub w ogóle niemobilne w roślinie. Znakowane ^{14}C brasinosteroidy (24-epibrasinolid, brasinolid i kastasteron), podane na liść siewek ryżu, pszenicy i grochu, nie przemieszczały się do innych liści, choć mogły wnikać do wnętrza tkanek w miejscu podania lub nawet nieznacznie przemieszczać się w obrębie liścia (Yokota i wsp. 1992, Nishikawa i wsp. 1994, Symons i Reid 2004). U ogórka, obserwowano powolny transport do nowych liści zaledwie kilku procent znakowanego 24-epibrasinolidu po 3-7 dniach od aplikacji (Nishikawa i wsp. 1994). Nishikawa i wsp. (1994) sugerują, że ewentualny transport BR może odbywać się przy udziale floemu.

W badaniach przeprowadzonych przez Janeczko i Swaczynową (2010), w przypadku oprysków pierwszego i drugiego liścia 10-dniowych siewek pszenicy 24-epibrasinolidem ($0,1 \mu\text{M}$) nie stwierdzono obecności tego związku w rozwijającym się trzecim liściu. Dopiero po zastosowaniu wyższego stężenia ($2 \mu\text{M}$) 24-epibrasinolid był wykrywany w trzecim liściu w ilościach śladowych. Wspomniane wcześniej dane literaturowe mówią jedynie o aplikacji znakowanych brasinosteroidów w postaci pojedynczych kropli na powierzchnię liści bez podania stężenia związku (jedynie jego radioaktywności). Nie można więc wykluczyć, że transport pewnych ilości BR przy aplikacji dolistnej może być uzależniony od ich stężenia w roztworze aplikacyjnym a podanie większych stężeń związku sprzyja większej efektywności transportu. Niemniej u pszenicy, przy omawianym sposobie aplikacji, efektywność transportu egzogennych BR na dalsze odległości wydaje się znikoma. Dodatkowo, z innych analiz przeprowadzonych w ramach pracy Janeczko i wsp. (2010) wynika, że po oprysku liści pszenicy (w fazie kłoszenia) roztworem zawierającym 24-epibrasinolid, nie stwierdza się obecności tego związku w zebranych ziarnie.

2.2.3.2. Podawanie brasinosteroidów do apoplastu

Istotne znaczenie dla wnikania BR aplikowanych przez oprysk może mieć struktura powierzchni liścia. Problem ten, w badaniach transportu BR, pozwala wyeliminować zastosowanie tzw. infiltracji liści (Janeczko i wsp. 2011 a). Jest to metoda często używana w doświadczeniach wymagających zakażenia roślin bakteriami (Szatmári i wsp. 2006, Janeczko i wsp. 2007). Polega ona na wpompowaniu roztworu pod ciśnieniem przez aparaty szparkowe do wnętrza liścia. Roztwór dostaje się do przestrzeni międzykomórkowych (apoplastu) w bezpośrednie otoczenie komórek. Metodę tą do badania transportu BR zastosowano w pracy Janeczko i wsp. (2011 a). Do apoplastu 12-dniowych siewek jęczmienia posiadających dwa liście wprowadzano 24-epibrasinolid w stężeniu $0,005$ i $0,25 \text{ mg dm}^{-3}$, co pozwoliło na uzyskanie w liściu stężenia tego związku odpowiadającego około 2 ng i 100 ng g^{-1} ś.m. (Janeczko i wsp. 2011 a). Pomiar zawartości BR przeprowadzono 30 dni

po aplikacji w wykształconym siódmym liściu. W liściach roślin kontrolnych znaleziono jedynie ilości śladowe naturalnie występującego 24-epibrasinolidu, natomiast zawartość tego steroidu w liściach roślin traktowanych tym związkiem była podwyższona do stężenia dwóch pozostałych wykrytych brasinosteroidów (Janeczko *wsp.* 2011 a). Można zatem założyć, że następował transport 24-epibrasinolidu do nowych liści. Ponieważ jednak stwierdzono podobną zawartość 24-epibrasinolidu w liściach starszych roślin niezależnie od stężenia roztworu, jaki aplikowano wcześniej siewkom, wydaje się, że transport BR odbywał się pod kontrolą wewnętrznych mechanizmów homeostazy. W wyniku działania tych mechanizmów wystąpiło zjawisko transportu nieproporcjonalnego do podawanego stężenia uniemożliwiające przedostanie się niefizjologicznych stężeń BR do rozwijających się liści.

2.2.3.3. Dokorzeniowa aplikacja brasinosteroidów

Dla pobierania brasinosteroidów najefektywniejsza wydaje się aplikacja dokorzeniowa tych związków. Nishikawa i *wsp.* (1994) stwierdzili, że u pszenicy i ogórka po podaniu znakowanego 24-epibrasinolidu do korzeni radioaktywność była wykrywana w łodyżkach i liściach. Z kolei Yokota i *wsp.* (1992) podają, że u siewek ryżu znakowany brasinolid i kastasteron wnikają przez korzenie a następnie przemieszczają się do liści. Już po 6 godzinach od podania stwierdzono radioaktywność w nadziemnej części roślin, przy czym wykazano, że przeważającą część obecnej tam puli brasinosteroidów stanowiły BR niezmetabolizowane (Yokota i *wsp.* 1992). W kulturze pszenicy rosnącej na szalkach, siewki podlane jednorazowo (w trzecim dniu wegetacji) roztworem zawierającym 24-epibrasinolid akumulowały w liściach podwyższoną ilość tego steroidu tak przy podanym niższym (0,1 μM) jak i wyższym (2 μM) stężeniu (Janeczko i Swaczynová 2010). Podobnie jak w przypadku omawianej wyżej aplikacji BR do apoplastu, także tu stwierdzono nieproporcjonalny do podanego stężenia transport BR. Aplikacja dokorzeniowa 24-epibrasinolidu w stężeniu 0,1 μM powodowała, że ilość wolnego 24-epibrasinolidu w liściach wzrastała dwukrotnie w stosunku do kontroli. Natomiast, w przypadku dokorzeniowej aplikacji dwudziestokrotnie większego stężenia, ilość 24-epibrasinolidu w liściach wzrastała tylko trzykrotnie (Janeczko i Swaczynová 2010).

Efektywny transport BR po aplikacji dokorzeniowej dotyczy jednak kultur hydroponicznych lub zbliżonych do hydroponicznych, gdzie zapewniony jest bezpośredni i stały kontakt roztworu z korzeniem. Nie jest pewne, czy podobnie skutecznie brasinosteroidy byłyby pobierane np. z gleby podlewanej roztworami tych związków.

2.2.3.4. Podawanie brasinosteroidów poprzez przedsięwzięcie moczenie nasion

Efektywność pobierania i transportu brasinosteroidów w przypadku przedsięwzięcia moczenia nasion (ang. *seed priming*) badana była w pracach Janeczko i Swaczynová (2010), Janeczko i wsp. (2010, 2011b). Przy niższym stężeniu 24-epibrasinolidu (0,1 μM) stosowanym do 24 godzinnego przedsięwzięcia moczenia nasion, brak jest zmian zawartości tego steroidu w części nadziemnej u 10-dniowych siewek pszenicy (Janeczko i Swaczynová 2010). W przypadku zastosowania do przedsięwzięcia moczenia nasion wyższego stężenia 24-epibrasinolidu (2 μM), stwierdzono podwyższoną około trzykrotnie zawartość tego związku w częściach nadziemnych pszenicy (Janeczko i Swaczynová 2010). Taki sposób aplikacji 24-epibrasinolidu nie skutkuje akumulacją tego związku w nasionach zawiązywanych przez rośliny pszenicy, a także soi (Janeczko i wsp. 2010, 2011b).

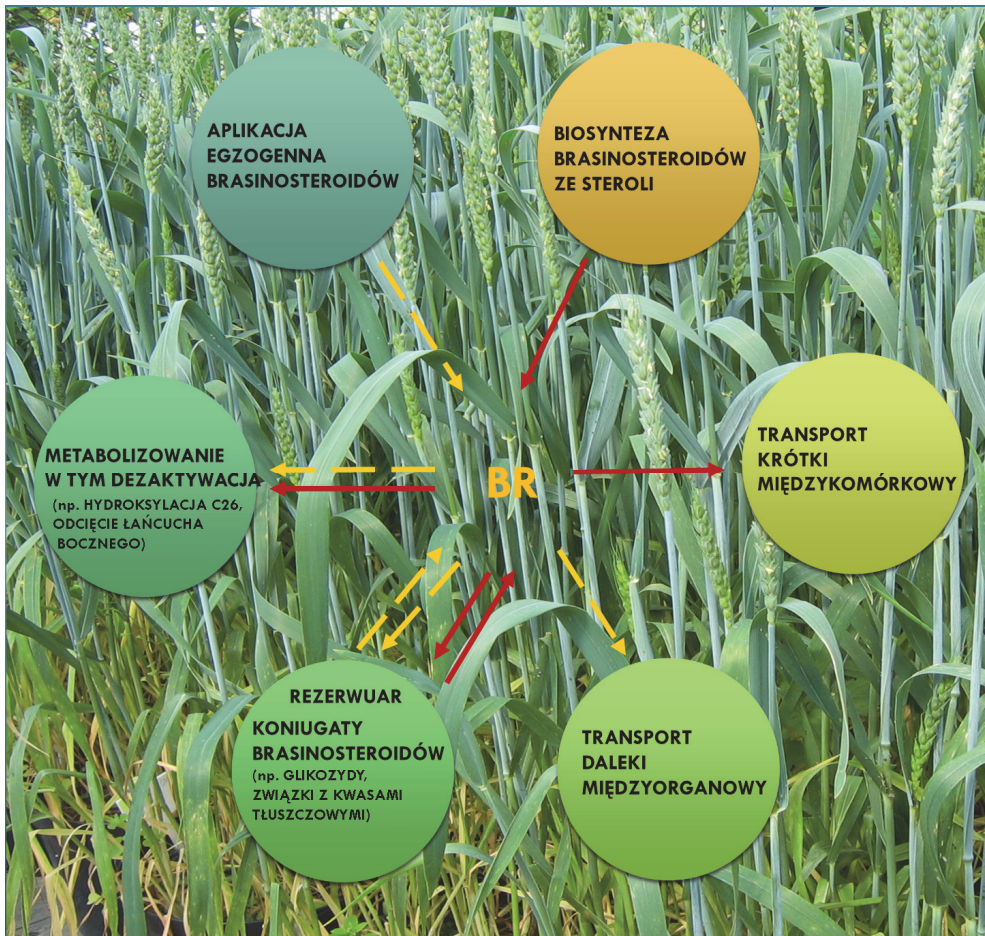
2.2.4. Znaczenie koniugatów brasinosteroidów

Omawiane wyżej prace dotyczyły występowania i transportu BR w formie wolnej. Tymczasem BR są obecne w roślinie nie tylko jako forma wolna lecz także w koniugatach. Znane są dwa główne rodzaje koniugatów – glikozydy i związki z kwasami tłuszczowymi (Sembdner i wsp. 1994, Bajguz 2007; ryc. 4). Najpierw udowodniono ich formowanie się w kulturach zawiesin komórkowych a później wykazano naturalne występowanie w pyłku (Kolbe i wsp. 1995, Asakawa i wsp. 1996, Bajguz 2007). Poza wymienionymi koniugatami teoretycznie mogą występować w roślinie koniugaty nietrwałe – tj. niekowalencyjne związki BR np. z białkiem. Zjawisko takie stwierdzono u organizmów zwierzęcych, gdzie związki hormonów steroidowych z białkami zwanymi SBP (ang. *steroid binding proteins*) stanowią formę rezerwuaru i formę transportową hormonu (Yang i wsp. 2005). W roślinach jednak istnienie białkowych koniugatów BR pozostaje obecnie w sferze przypuszczeń.

Formy skoniugowane brasinosteroidów mogą stanowić rezerwuuar tych steroidów w roślinie i nie można wykluczyć, że mogą być dla nich formą transportową. Wiedza na ten temat jest jednak fragmentaryczna. Yokota i wsp. (1992) stwierdzają, że tylko znikoma część BR po ich egzogennej aplikacji może być znaleziona w izolowanej frakcji wodnej (najprawdopodobniej BR występują tam jako glikozydy). Przeważająca część BR występuje jako brasinosteroidy niezmetabolizowane, obecne we frakcjach izolowanych przy pomocy rozpuszczalników organicznych. Z drugiej strony, dane uzyskane przez Janeczko i Oklestkową (projekt 818/N-COST/2010/0) wskazują na obecność dużych ilości glikozydów brasinosteroidów w stosunku do frakcji wolnych BR w siewkach pszenicy. Analizowano ekstrakty 21-dniowych siewek pszenicy (odm. Katoda i Monsun) pod kątem zawartości brasinosteroidów przed hydrolizą enzymatyczną i po hydrolizie enzymatycznej (z użyciem enzymu glukuronidazy) metodą UHPLC-ESI-MS/MS. Stwierdzono obecność kilku brasinosteroidów w tym 28-homokastasteronu. Zawartość wolnego 28-homokastasteronu (w ekstraktach niehydrolizowanych) wynosiła 9 ng g⁻¹ ś.M.

(Katoda) i $7 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$ (Monsun). W ekstrakcie po hydrolizie ilość 28-homokastasteronu wzrosła do $99 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$ (Katoda) i $95 \text{ ng g}^{-1} \text{ ś.M.}$ (Monsun). Wskazuje to, że glikozydy BR mogą stanowić nawet 90% całkowitej puli endogennych brasinosteroidów u badanej pszenicy.

Podsumowując rozważania zawarte w rozdziale poświęconym występowaniu i transporcie BR oraz dane literaturowe (Fujioka i Yokota 2003, Bajguz 2007), przygotowano poglądowy model przemian BR (ryc. 7).



Rycina 7. Poglądowy model przemian brasinosteroidów w roślinach. Linią ciągłą (czerwoną) zaznaczono szlaki przemian endogennych BR; linią przerywaną (żółtą) zaznaczono przejścia możliwe dla egzogennych BR

3. AKTYWNOŚĆ FIZJOLOGICZNA BRASINOSTEROIDÓW W ROŚLINACH

3.1. Stosowanie brasinosteroidów a plonowanie roślin z rodziny *Poaceae* oraz ważniejsze mechanizmy leżące u podstaw działania tych związków

Spośród znanych brasinosteroidów, w doświadczeniach rolniczych dotyczących głównie plonowania roślin z rodziny *Poaceae* najczęściej wykorzystywany był 28-homobrasinolid i 24-epibrasinolid, rzadziej brasinolid i inne BR. Badania wykonywano głównie dla pszenicy, kukurydzy, ryżu, ale także jęczmienia czy prosa afrykańskiego.

3.1.1. Pszenica

Brasinosteroidy wykazują działanie stymulujące plonowanie pszenicy, choć występuje tu zależność tego efektu od odmiany, stosowanego stężenia oraz warunków wzrostu (w tym wpływ stresu).

28-Homobrasinolid stymulował plonowanie pszenicy w doświadczeniach poletkowych i wazonowych, zarówno w warunkach działania czynników stresowych, jak i w warunkach przyjętych jako optymalne (Sairam 1994 a, b).

W doświadczeniu poletkowym (Indie), gdzie prowadzono kulturę pszenicy w sezonie, w którym zdarzają się częste susze oraz równocześnie uprawiano rośliny sztucznie nawadniane, stwierdzono w obu grupach roślin podwyższenie liczby nasion w kłosie, liczby kłosów na m² i masy 1000 nasion (MTN) pod działaniem 28-homobrasinolidu. Związek aplikowano przez namaczanie nasion (6 godzin przed siewem) i oprysk 25-dniowych siewek 28-homobrasinolidem (0,01 i 0,05 ppm) (Sairam 1994 a). W doświadczeniu lepiej reagowała na 28-homobrasinolid odmiana tolerancyjna na suszę C306 niż wrażliwa HD2329. U C306 w warunkach sztucznego nawadniania liczba nasion zebranych z m² wynosiła 328, podczas gdy u roślin po oprysku 0,05 ppm steroidu uzyskano 456 nasion. Dla roślin rosnących w warunkach suszy było to odpowiednio 262 i 374 nasion zebranych z m² (Sairam 1994 a).

W doświadczeniu wazonowym, w którym badano odmianę C306, po opryskach 28-homobrasinolidem stosowanych na 30-dniowe rośliny (stężenia 1 i 0,1 ppm, dwukrotny oprysk roślin - w dwudniowych odstępach) także stwierdzono wzrost plonu zarówno u roślin podlewanych, jak i tych, które poddano 7-dniowemu stresowi suszy w okresie kłoszenia (Sairam 1994 b). Wzrost plonu związany był ze zwiększeniem liczby kłosów w przeliczeniu na roślinę, liczby nasion w kłosie i MTN.

W szklarni, w warunkach zasolenia, oprysk 24-epibrasinolidem stymulował produkcję biomasy pszenicy i zwiększał powierzchnię liści, lecz finalnie nie powodował wzrostu plonu zarówno u odmiany S-24 odpornej na zasolenie, jak i wrażliwej MH-97 (Shahbaz i wsp. 2008). Dopiero aplikacja tego BR poprzez korzenie skutkowałą wzrostem plonu ogólnego (m.in. poprzez wzrost masy stonasion) u obu badanych odmian pszenicy (Ali i wsp. 2008). Rośliny prowadzono w kulturze hydroponicznej w warunkach zasolenia i kontrolnych. Do roztworów dodano 24-epibrasinolid w stężeniach 0,052, 0,104 i 0,156 μM , przy czym najefektywniejsze działanie na plon uzyskano dla stężenia 0,104 i 0,052 μM (Ali i wsp. 2008).

W trzech kolejnych doświadczeniach polowych (Indie) odmiana pszenicy Lok-1 dawała wyższe plony po zastosowaniu 28-homobrasinolidu (1 i 0,5 mg dm^{-3}) (Ramraj i wsp. 1997). Stosowano jednorazowy oprysk w fazie krzewienia lub w fazie kłoszenia oraz oprysk dwukrotny w obu tych fazach. W kontroli zanotowano średni plon z 3 sezonów 5,70 t/ha, a w przypadku najlepszej kombinacji 28-homobrasinolidu (oprysk w dwóch fazach rozwojowych; stężenie 0,5 mg dm^{-3}) uzyskano średnio 6,70 t/ha (Ramraj i wsp. 1997).

W doświadczeniach prowadzonych w warunkach klimatycznych Europy Środkowo-Wschodniej (Polska) oceniono wpływ 24-epibrasinolidu na masę ziarna i niektóre parametry składu ziarna pszenicy jarej odm. Torka w kulturze wazonowej i polowej (Janeczko i wsp. 2010). 24-Epibrasinolid był podawany poprzez 48 godzinne przedsiewne moczenie nasion (1 mg dm^{-3}) oraz oprysk roślin w fazie kłoszenia (0,25 mg dm^{-3}). W czasie prowadzenia uprawy poletkowej (rok 2006) wystąpiły warunki naturalnej suszy, jak pokazano w tabeli warunków pogodowych zamieszczonej w pracy Janeczko i wsp. (2010). Stwierdzono, że hormon podnosił plon roślin w uprawie poletkowej o około 20%. Podstawą podniesienia plonu był wzrost liczby nasion zawiązywanych przez roślinę. Nie zanotowano natomiast wzrostu plonowania u roślin w kulturze wazonowej (Janeczko i wsp. 2010).

Z kolei Hnilička i wsp. (2007) obserwowali niewielki wzrost plonu nasion i słomy u stresowanych suszą i poddanych działaniu podwyższonej temperatury 33°C (w późnej fazie wzrostu łodygi), sześciu odmian pszenicy opryskanych 24-epibrasinolidem (stężenie 10^{-9} M, warunki szklarniowe).

Skład chemiczny ziarna był zmieniany przez 24-epibrasinolid u roślin w kulturze wazonowej (Janeczko i wsp. 2010). Stwierdzono wzrost zawartości cukrów rozpuszczalnych (o 25% po przedsiewnym moczeniu materiału siewnego), obniżenie zawartości tłuszczów (o 34% po oprysku 24-epibrasinolidem) i obniżenie zawartości wapnia (23-34%) wraz ze wzrostem ilości magnezu (o 25% po oprysku 24-epibrasinolidem). Nie stwierdzono istotnych zmian w zawartości skrobi i protein rozpuszczalnych. Efekt hormonu zależał od sposobu aplikacji i warunków wzrostu, w przypadku bowiem uprawy poletkowej wpływ hormonu na zawartość

węglowodanów, białek, lipidów i minerałów był bardzo nieznaczny (Janeczko i wsp. 2010).

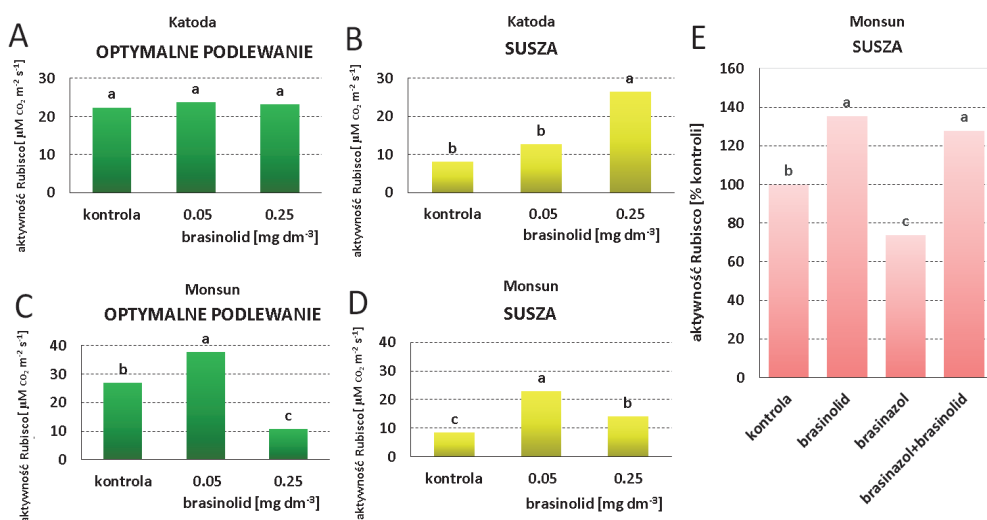
24-Epibrasinolid, stosowany w postaci oprysku w fazie kłoszenia oraz aplikowany poprzez przedsiwne moczenie nasion w w/w stężeniach, nie oddziaływał także na poziom witaminy E, prowitaminy A, i skład steroli nasion pszenicy (odm. Torka oraz Cytra) rosnącej w warunkach polowych (Janeczko i wsp. 2009). Nie-wielkim wahaniom pod wpływem hormonu podlegały jedynie proporcje kwasów tłuszczowych (Janeczko i wsp. 2009).

Słaby, ale w większości przypadków pozytywny wpływ oprysku 24-epibrasinolidem (10^{-9} M) wykonanego z początkiem fazy kwitnienia, na zawartość białka, lipidów i skrobi u sześciu odmian pszenicy, poddanej suszy i temperaturze podwyższonej do 33°C (w późnej fazie wzrostu łodygi), obserwowali w doświadczeniu wazonowym także Hnilička i wsp. (2009). Analiza kalorymetryczna ilości energii akumulowanej w ziarnie (oznaczenia na podstawie spalania próbki ziarna w atmosferze tlenu w naczyniu kalorymetrycznym) wykazała, iż większe jej zasoby zmagazynowały rośliny pozostające pod działaniem 24-epibrasinolidu. Hnilička i wsp. (2009) odnotowali wpływ odmiany na efekty powodowane przez BR.

Działanie BR u pszenicy opiera się głównie na regulacji procesów związanych z efektywnością fotosyntezy i poprawą odporności na stres. Odziaływanie brasinosteroidów na fotosyntezę u pszenicy przejawia się podniesieniem zawartości chlorofilu, co jest istotne z punktu widzenia efektywności absorpcji energii słonecznej w ramach fazy jasnej fotosyntezy (Sairam 1994 a, b). W przypadku fazy ciemnej notowano wzrost aktywności enzymu wiążącego CO_2 - Rubisco (karboksylazy-oksigenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu) i fotosyntezy netto (Braun i Wild 1984, Sairam 1994 a i b, Hnilička i wsp. 2008, Janeczko i Pocięcha, projekt 818/N-COST/2010/0). Zależną od stężenia i warunków wzrostu (brak stresu/stres suszy) stymulację aktywności Rubisco, indukowaną przez brasinolid, stwierdzono w przypadku 21-dniowych siewek dwóch odmian pszenicy Monsun i Katoda (oprysk roślin wykonano w 10 dniu wegetacji, stężenie 0,05 i 0,25 mg dm^{-3} ; Janeczko i Pocięcha, projekt 818/N-COST/2010/0). W przypadku siewek podlewanych optymalnie, w 21-dniu wegetacji efekt działania brasinolidu na Rubisco był mniej widoczny i bardziej zależny od odmiany, a także stosowanego stężenia (np. u odmiany Monsun większe stężenie w warunkach optymalnego podlewania wręcz hamowało aktywność Rubisco) (ryc. 8 A i C). Nawet ponad dwukrotne zwiększenie aktywności tego enzymu pod wpływem brasinolidu występowało u 21-dniowych siewek pszenicy poddanych suszy (między 11 a 21 dniem wegetacji) w porównaniu do roślin nietraktowanych brasinolidem (ryc. 8 B i D). W innym doświadczeniu stwierdzono dodatkowo, że dokorzeniowa aplikacja (w kulturze hydroponicznej) inhibitora produkcji brasinosteroidów (brasinazol, stężenie 0,25 mg dm^{-3}) u siewek odmiany Monsun, wysadzonych następnie do gleby i pod-

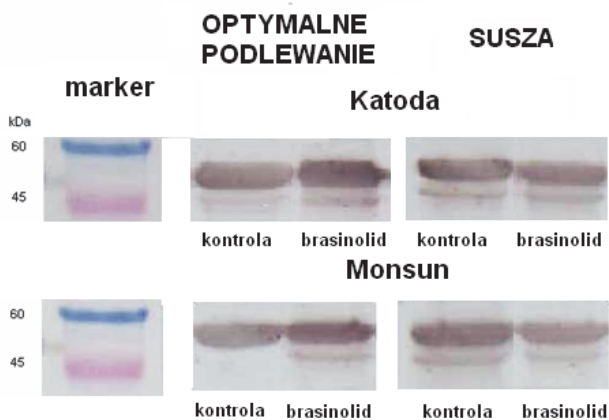
danych suszy glebowej, obniża aktywność Rubisco (Janeczko i Pocięcha, projekt 818/N-COST/2010/0; ryc. 8 E). Efekt ten jest jednak odwracany przez jednoczesne uzupełnienie niedoboru BR podaniem brasinolidu (stężenie $0,125 \text{ mg dm}^{-3}$) (ryc. 8 E). Wyniki te świadczą o regulacyjnej roli brasinosteroidów w przebiegu procesu wiązania CO_2 u roślin pszenicy.

Na podstawie analizy akumulacji podjednostki większej enzymu Rubisco (ryc. 8F), można wnioskować, że akumulacja białka Rubisco jest stymulowana przez brasinolid u obu odmian w warunkach optymalnego podlewania. W warunkach suszy brasinolid powoduje w liściach niewielki spadek ilości Rubisco (ryc. 8F), co jednak jest związane z większą aktywnością tego enzymu, jak pokazano na ryc. 8 B i D.

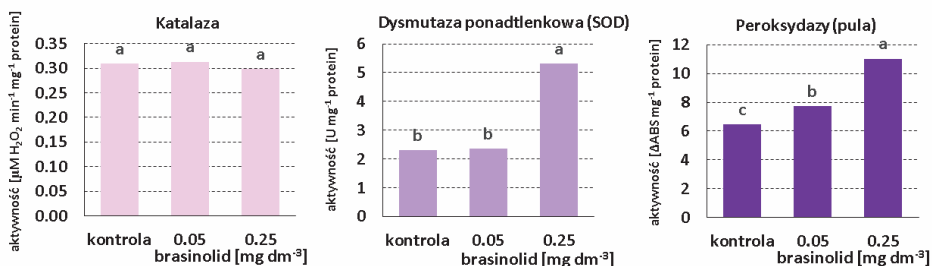


Rycina 8 A-E. Zmiany aktywności enzymu Rubisco w liściach optymalnie podlewanych i podanych działaniu suszy siewek pszenicy jarej (odm. Katoda i Monsun) pod wpływem brasinolidu (A-D) (Janeczko i Pocięcha, projekt 818/N-COST/2010/0). Hamowanie aktywności Rubisco po zastosowaniu inhibitora produkcji brasinosteroidów (brasinazolu) oraz znoszenie tego efektu przez jednoczesne podanie brasinolidu (E) (Janeczko i Pocięcha, projekt 818/N-COST/2010/0). *Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie wg testu Duncana ($P \leq 0.05$).*

Reakcje fazy jasnej fotosyntezy, obok swej podstawowej funkcji polegającej na przemianach energii świetlnej w energię wiązań chemicznych, są również jednym ze źródeł reaktywnych form tlenu powstających np. w reakcji Mehlera - przekazania elektronów z PSI na tlen (Gururani i wsp. 2015). Czynniki stresowe dodatkowo wzmagają zjawisko generowania reaktywnych form tlenu w komórce (Gururani i wsp. 2015). Powstające w komórce reaktywne formy tlenu, takie jak anionorodnik ponadtlenny czy nadtlenek wodoru stanowią zagrożenie dla struktury i funkcji komórkowych lipidów, białek czy kwasów nukleinowych, z którymi mogą reagować. Dezaktywacja reaktywnych form tlenu w komórce następuje poprzez działanie enzymów antyoksydacyjnych takich jak katalaza, dysmutazy anionorodnika ponadtlennego (SOD) czy peroksydazy. Stymulację aktywności enzymów antyoksydacyjnych przez BR stwierdzono w badaniach na różnych gatunkach. W przypadku pszenicy, badania były prowadzone na poddanych stresowi suszy i opryskanych brasinolidem ($0,25 \text{ mg dm}^{-3}$) odmianach Monsun i Katoda. W siewkach stwierdzono wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, szczególnie z grupy SOD i peroksydaz (nawet o 30-50%) w porównaniu do roślin nie-traktowanych brasinolidem (Janeczko i Pocięcha, projekt 818/N-COST/2010/0; ryc. 9).



Rycina 8 F. Identyfikacja podjednostki większej Rubisco (RbcL) w liściach siewek pszenicy odmiany Katoda i Monsun optymalnie podlewanych i poddanych działaniu suszy – wpływ oprysku roztworem brasinolidu w stężeniu $0,05 \text{ mg dm}^{-3}$ (Janeczko i Hura, projekt 818/N-COST/2010/0). Analiza wykonana metodą elektroforezy w warunkach denaturujących.



Rycina 9. Wpływ brasinolidu na zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (katalazy, SOD, puli peroksydaz) w liściach siewek pszenicy jarej odmiany Monsun poddanej działaniu suszy (Janeczko i Pocięcha, projekt 818/N-COST/2010/0). *Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie wg testu Duncana ($P \leq 0.05$).*

Badania nad wybranymi mechanizmami działania BR u pszenicy prowadzili również (Sairam 1994 a, b). Autorzy ci stwierdzili, że 28-homobrasinolid u pszenicy stymulował także aktywność enzymów związanych z przemianami azotu: reduktazy azotanowej i syntetazy glutaminianowej. Związek ten zmniejszał również powodowane stresem suszy zmiany przepuszczalności membran komórkowych.

3.1.2. Kukurydza

Badania polowe dotyczące wpływu brasinosteroidów – 24-epibrasinolidu oraz jednego z syntetycznych analogów kastasteronu ($2\alpha,3\alpha,17\beta$ -trihydroksy-5 α -androstan-6-onu) – zostały przeprowadzone dla trzech linii kukurydzy w Stacji Hodowli Kukurydzy w Czechach (Holá i wsp. 2010). BR stosowano w fazie rozwojowej V3/4 oraz V6/7 (tj. 41 i 55 dni od wysiewu) w zakresie stężeń 10^{-8} – 10^{-14} M. BR nie wpłynęły istotnie na końcową wysokość roślin, lecz w krótkim czasie po zabiegach oprysków notowano przejściowe efekty zwiększenia długości liści nr 7 do 10 (rośliny po opryskach w V3/4) lub zahamowaniem wzrostu liści (po opryskach w fazie V6/7). Oprysk w fazie V3/4 opóźnił dojrzewanie i wysypywanie się pyłku (*anthesis*) oraz moment pojawienia się kwiatów żeńskich, natomiast oprysk w fazie V6/7 działał na te procesy przyspieszająco. Na marginesie warto podkreślić, że fakt udziału BR w rozwoju i regulacji procesu determinacji płci stwierdzono w badaniach mutantów kukurydzy (Hartwig i wsp. 2011). W doświadczeniach Holá i wsp. (2010) BR wpływały także korzystnie na liczbę wytworzonych kolb, ale tylko u roślin opryskanych w fazie V3/4 najniższymi stężeniami obu związków. Rośliny opryskane w fazie V6/7 zawiązywały mniej kolb w przeliczeniu na roślinę. Prace przeprowadzone przez czeskich badaczy zwracają uwagę na fakt, że stosowanie BR w uprawie polowej kukurydzy wymaga dokładnego rozpoznania nie tylko typu stosowanego BR i jego stężeń, ale także uwzględnienia

specyfikacji linii/odmiany i starannego wyboru najdogodniejszej do aplikacji fazy rozwojowej rośliny.

Próby wykorzystania BR do łagodzenia u kukurydzy skutków stresów: chłodowego, solnego, związanego z wysoką zawartością manganu w podłożu oraz z działaniem Na_2CO_3 , pozwoliły opisać niektóre podstawy fizjologiczno-biochemiczne działania BR.

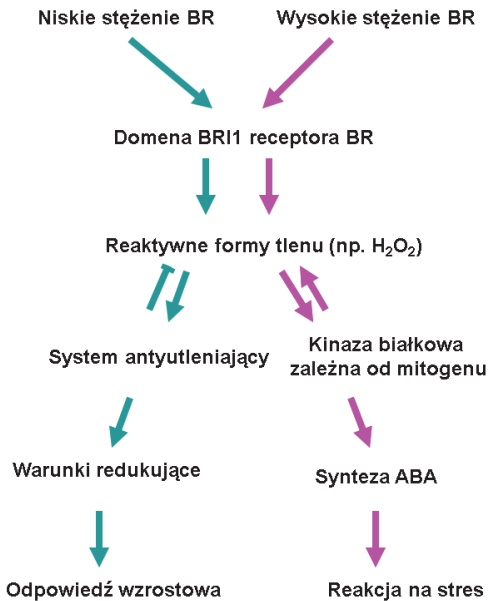
U kukurydzy w warunkach optymalnych dla wzrostu nie zanotowano pozytywnego działania oprysków 24-epibrasinolidem oraz analogiem kastasteronu na wydajność PSI (Honnerová i wsp. 2010). Stwierdzono jednak korzystny wpływ badanych BR na akumulację barwników fotosyntetycznych i efektywność PSII w tym działanie centrów rozkładu wody (tzw. OEC) (Honnerová i wsp. 2010, Rothová i wsp. 2014). Jednocześnie badane BR nie wpływały na intensywność wymiany gazowej kukurydzy w warunkach optymalnych dla wzrostu (Rothová i wsp. 2014). U roślin poddanych stresowi chłodu analog kastasteronu (stężenie 10^{-14} M) zwiększała u kukurydzy zawartość chlorofilu, nie zanotowano jednak pozytywnego działania ani tego steroidu, ani 24-epibrasinolidu na wydajność PSI (Honnerová i wsp. 2010).

Inny brasinosteroid (28-homobrasinolid) aplikowany poprzez przedświecne moczenie nasion (12h, stężenie 10^{-4} - 10^{-8} M) zwiększał w liściach 30-dniowej kukurydzy (odmiana Partap-1) rosnącej w warunkach polowych (Indie, sezon czerwiec-sierpień) aktywność enzymów antyoksydacyjnych (m.in. SOD, katalazy, peroksydazy askorbinianowej), a także zawartość białka, zmniejszając jednocześnie stopień peroksydacji lipidów komórkowych (mierzony wskaźnikiem MDA) (Arora i wsp. 2008). U roślin podlewanych roztworem NaCl (25, 50 i 75 mM) obserwowano dalsze pogłębienie wymienionych zmian i zwiększenie tolerancji roślin na zasolenie w porównaniu do kontroli nietraktowanej BR.

Obok zmian w wydajności systemu antyoksydacyjnego, BR regulują gospodarkę hormonalną kukurydzy w warunkach stresu zasolenia. Brasinolid stosowany do moczenia nasion i oprysku roślin (0,25 ppm) znosił niekorzystny wpływ zasolenia na produkcję hormonów roślinnych (IAA, GA_3 , zeatyny) (El-Khallal i wsp. 2009).

U roślin kukurydzy poddanych działaniu stresu związanego z wysoką koncentracją manganu w glebie (150 - 750 mg kg^{-1} , zjawisko szczególnie niebezpieczne na glebach kwaśnych) oprysk roztworem 24-epibrasinolidu o stężeniu $0,1$ mg dm^{-3} redukował niekorzystne zmiany fizjologiczne wywołane przez nadmiar manganu (Wang i wsp. 2009). Objawiało się to wzrostem akumulacji suchej masy, intensywności fotosyntezy netto i zawartości chlorofilu. U roślin zaobserwowano zmniejszoną akumulację H_2O_2 przy zwiększonej aktywności enzymów antyoksydacyjnych (m.in. SOD, katalazy, peroksydazy askorbinianowej i reduktazy glutationowej).

Doświadczenia przeprowadzone przez Zhang i wsp. (2010, 2011, 2013), Zhu i wsp. (2013), oraz Yan i wsp. (2015) przybliżają niektóre mechanizmy molekularne omówionych zmian. Analiza transkryptomu kukurydzy na wczesnym etapie stresu spowodowanego działaniem Na_2CO_3 (będącego kombinacją stresu Na^+ , wysokiego pH i CO_3^{2-}) wskazuje na zwiększoną ekspresję genów związanych z biosyntezą brasinosteroidów (Zhang i wsp. 2013). Według Yan i wsp. (2015) traktowanie kukurydzy BR prowadzi do wzrostu koncentracji cytozolowego Ca^{+2} oraz indukuje wzrost ekspresji *ZmCCaMK* i zwiększa aktywność białka *ZmCCaMK* (obecna w kukurydzy kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny). To współdziałanie kinazy oraz Ca^{+2} potrzebne jest do indukcji systemu antyoksydacyjnego przez BR u kukurydzy. Na potwierdzenie tej hipotezy, autorzy przytaczają wyniki z doświadczenia przeprowadzonego na mutantach ryżu z zaburzeniami funkcji kinazy białkowej zależnej od wapnia i kalmoduliny. Traktowanie BR nie indukowało odpowiedzi antyoksydacyjnej u tych mutantów. Z kolei zdaniem Zhang i wsp. (2010) indukowana przez BR akumulacja nadtlenu wodoru w apoplacie aktywuje *ZmMPK5* (kinazę białkową aktywowaną mitogenem). Kinaza ta jest zaangażowana w produkcję i rozprzestrzenianie sygnału H_2O_2 poprzez regulację ekspresji oksydazy NADPH, a to wpływa na indukcję systemu antyoksydacyjnego. Zjawisko to, jeśli występuje w warunkach bezstresowych (co obserwował np. Arora i wsp. 2008), sprzyja niejako uodpornieniu rośliny (przygotowaniu jej) na nadchodzący stres oksydacyjny. Według Zhu i wsp. (2013) w indukowanej brasinosteroidami aktywacji systemu antyoksydacyjnego u kukurydzy udział bierze także *ZmMAP65-1a* (białko o masie 65kDa związane z mikrotubulami u kukurydzy) uczestniczące w rozprzestrzenianiu H_2O_2 . Model działania BR na system antyoksydacyjny komórki, porządkujący niektóre z omówionych mechanizmów, przedstawiono syntetycznie na rycinie 10. Według tego modelu aktywacja receptora BR prowadzi do produkcji reaktywnych form tlenu - RFT (np. H_2O_2), jednakże czasowe i przestrzenne zmiany poziomu RFT zależą od stężenia BR (Xia i wsp. 2015). Niski poziom BR wywołuje przejściowy wzrost stężenia RFT, które stymulują system antyutleniający komórki, co ostatecznie prowadzi do przesunięcia równowagi redoks komórki w stronę procesów redukujących. Działa to jako sygnał np. dla stymulacji procesu fotosyntezy i regulacji procesów wzrostowych. Wysoki poziom BR powoduje natomiast długotrwałą akumulację RFT, co z kolei wywołuje kaskadę fosforylacji kinazy aktywowanej miogenem. W tym przypadku RFT i kinaza stymulują biosyntezę ABA, podstawowego hormonu związanego z indukcją tolerancji na stres. Jeszcze inny mechanizm stymulacji biosyntezy ABA przez BR u kukurydzy proponują Zhang i wsp. (2011). Według tych badaczy BR indukuje produkcję tlenu azotu, i dopiero NO stymuluje biosyntezę ABA i tolerancję na stres (susza) u tego gatunku.



Rycina 10. Model odpowiedzi wzrostowej i stresowej roślin, zależnej od stężenia brasinosteroidów, według Xia i wsp. (2015), zmodyfikowane.

3.1.3. Pozostałe gatunki

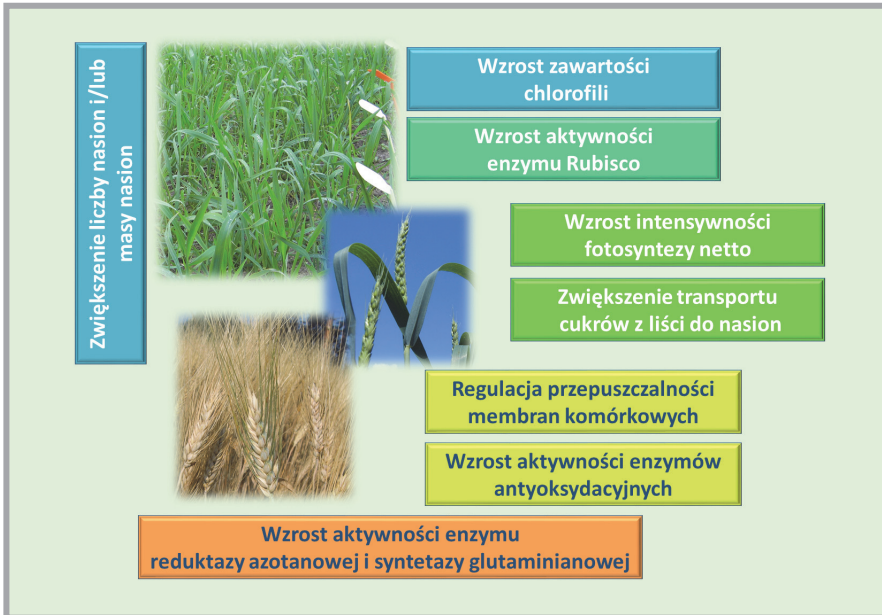
Spośród innych roślin wiechlinowatych, egzogenne BR wykazują działanie także u ryżu (Ramraj i wsp. 1997, Fujii i Saka 2001). Wzrost plonu stwierdzono w doświadczeniu polowym (Indie) po zastosowaniu 28-homobrasinolidu. Najefektywniej działał dwukrotny oprysk tym BR w stężeniu 1 mg dm^{-3} ; w kontroli zebrano plon 4,90 t/ha, a z roślin po traktowaniu 28-homobrasinolidem 6,27 t/ha (Ramraj i wsp. 1997). Jedną z podstaw wzrostu plonu było zwiększenie liczby wiech na metr kwadratowy.

U ryżu traktowanie BR poprawia gospodarkę wodną liści i asymilację CO_2 , co pozwala lepiej funkcjonować roślinie w warunkach deficytu wody (Farooq i wsp. 2009). Z kolei z badań Fujii i Saka (2001) wynika, że brasinolid sprzyja obniżaniu zawartości skrobi w liściach ryżu, a równocześnie zwiększa koncentrację skrobi i sacharozy w formowanych nasionach (hodowla szklarniowa, rośliny poddane stresowi chłodu). Zdaniem Fujii i Saka (2001) BR oddziałuje więc na transport i akumulację asymilatów w ziarnie. U ryżu rosnącego w warunkach zasolenia BR zapobiega redukcji chlorofilu i podnosi aktywność reduktazy azotanowej (Anuradha i Rao 2003). Związek ten zwiększa ponadto zawartość osmoprotektanta proliny, białek oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych, jednocześnie redukując uszkodzenia membran komórkowych (Sharma i wsp. 2013). Zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych u ryżu rosnącego w warunkach stresu solnego pod wpływem jednego z analogów BR (BB-16) stwierdzili także Núñez i wsp. (2003).

W przypadku badań prowadzonych na jęczmieniu, nie stwierdzono korzystnego wpływu BR na plonowanie (Janeczko i wsp. 2011 a). Należy to najprawdopodobniej przypisać zastosowaniu dość inwazyjnego sposobu aplikacji 24-epibrasinolidu, jakim było wpompowanie do apoplastu liści 12-dniowych siewek roztworu tego steroidu w stężeniu 0,005 i 0,25 mg dm⁻³ (Janeczko i wsp. 2011 a). Rośliny poddane były następnie stresowi wysokotemperaturowemu. Mimo jednak początkowo pozytywnego oddziaływania 24-epibrasinolidu na sprawność fotosyntezy (wydajność PSII) mierzoną tuż po zakończeniu działania czynnika stresowego, jego następczy wpływ na metabolizm liści starszych roślin a zwłaszcza na plonowanie - był niezauważalny (dla stężenia 0.005 mg dm⁻³) lub niekorzystny (w przypadku stężenia 0,25 mg dm⁻³).

Z mniej znanych roślin wiechlinowatych działanie BR przetestowano także u *Eleusine coracana* L. (proso afrykańskie). U roślin, którym przedświecie podano BR poprzez 8 godzinne moczenie nasion (0,1 ppm) stwierdzono wzrost plonu z 1636 kg/ha (kontrola) do 1990 kg/ha (Nithila i wsp. 2007).

Ogólny schemat zmian fizjologiczno-biochemicznych, które mogą stanowić podstawę poprawy plonowania roślin wiechlinowatych przez brasinosteroidy, przedstawia rycina 11. Większość spośród tych zmian metabolicznych ujawnia się w szczególności w warunkach, kiedy na roślinę działają czynniki stresowe.



Rycina 11. Ważniejsze zmiany fizjologiczno-biochemiczne indukowane po zastosowaniu brasinosteroidów u roślin z rodziny wiechlinowatych.

3.2. Charakterystyka mutantów i roślin transgenicznych z rodziny *Poaceae* o zróżnicowanej akumulacji brasinosteroidów i z zaburzeniami w percepcji tych związków

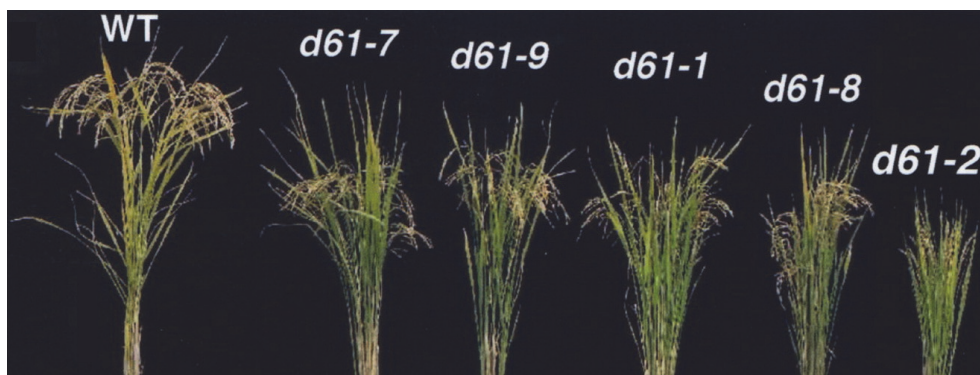
Omówione w poprzednim rozdziale eksperymenty, w których badano efekty działania BR podawanych roślinom egzogenicznie dają ogólny pogląd na funkcje fizjologiczne tych związków. W ostatnim czasie znacząco rośnie jednak liczba prac, w których stosowane są modele badawcze z użyciem mutantów biosyntezy i percepcji BR. Wykorzystanie roślin z zaburzeniami produkcji/percepcji BR stanowi bowiem dogodniejsze narzędzie w pracach badawczych mających na celu poznanie bardzo szczegółowych mechanizmów działania BR. Jednocześnie mutanty te (w szczególności mutanty roślin uprawnych) mogą zostać wykorzystane w praktyce rolniczej np. bezpośrednio do stworzenia nowych odmian lub pośrednio do krzyżowań z innymi liniami. Do mutantów brasinosteroidowych z grupy jednoliściennych należą obecnie mutanty ryżu (Bishop 2003, Wu i wsp. 2008), jęczmienia (Chono i wsp. 2003; Gruszka i wsp. 2011a i b; Ali i wsp. 2014) i kukurydzy (Makarevitch i wsp. 2012).

3.2.1. Ryż

Fenotyp karłowego mutantu ryżu *d61* wynika z utraty funkcji genu *OsBR11* (mutacja receptora BR) (Morinaka i wsp. 2006). Zidentyfikowane allele tego genu ponumerowano od 1 do 9. Z mutacją tą wiąże się występowanie cechy karłowatości i wzniesionych pionowo liści (ryc. 12), które to cechy są pożądane w uprawie ryżu. Karłowatość zmniejsza możliwość wylegania roślin a wzniesione liście mają zwiększać w łanie wychwytywanie światła koniecznego dla fotosyntezy (Morinaka i wsp. 2006). Autorzy porównali produkcję biomasy i ziaren typu dzikiego i mutantu ryżu *d61-7*. Biomasa typu dzikiego była 38% wyższa niż *d61-7* przy konwencjonalnej gęstości sadzenia lecz biomasa *d61-7* była 35% wyższa niż typu dzikiego przy dużej gęstości sadzenia. Niestety mały rozmiar ziarna *d61-7* nie pozwalał na uzyskanie plonu wyższego niż w przypadku typu dzikiego. Autorzy stworzyli więc ryż transgeniczny z częściowo tłumioną ekspresją endogennego *OsBR11* uzyskując fenotyp ze wzniesionymi liśćmi bez straty plonu ziarna.

Z kolei zdaniem Wu i wsp. (2008) geny kontrolujące produkcję brasinosteroidów w roślinie mogą być wykorzystane w celu podwyższenia plonu ryżu. Autorzy otrzymali transgeniczny ryż ze zwiększoną ekspresją hydroksylazy C-22, która kontroluje poziom brasinosteroidów uczestnicząc w hydroksylacji kampestanolu, z którego powstaje 6-deoksokatasteron (ryc. 3B). Transgeniczne rośliny produkowały w związku z tym zwiększone ilości intermediatów BR pojawiających się na szlaku biosyntezy BR (ryc. 3B), w tym samego kastasteronu. Te zmiany spowodowały 15-44% wzrost plonu ziarna ryżu transgenicznego w stosunku do roślin typu dzikiego zarówno w warunkach szklarniowych, jak i polowych. Zdaniem autorów

rośliny transgeniczne cechowała zwiększona asymilacja CO₂, zwiększona ilość glukozy w liściach flagowych i zwiększona przemiana glukozy na skrobię w nasionach, co wskazuje na rolę BR w przepływie asymilatów w kierunku ziarna. Badania te potwierdzają wszystkie wyniki uzyskiwane wcześniej w doświadczeniach z zastosowaniem u ryżu egzogennych brasinosteroidów przez Ramraj i wsp. (1997), Farooq i wsp. (2009) oraz Fujii i Saka (2001).



Rycina 12. Pokrój ryżu typu dzikiego (WT) oraz mutantów typu *d61* z mutacją receptora brasinosteroidów (Morinaka i wsp. 2006). *Przedruk zdjęcia za zgodą autorów oraz redakcji Plant Physiology.*

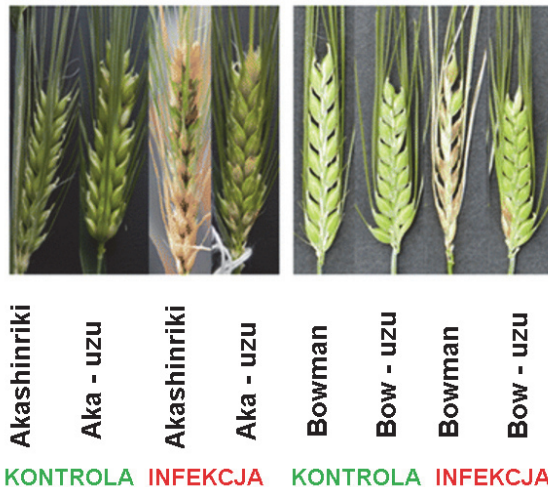
3.2.2. Jęczmień

U jęczmienia, jako pierwsze, znane były pół-karłowe mutanty (uzu). Za fenotyp mutantu odpowiada jednogenowa, recesywna mutacja genu kodującego transmembranowy receptor BR *HvBR11* (*Uzu1*). W ostatnim czasie zidentyfikowano u mutantów jęczmienia indukowanych przez chemiczną i fizyczną mutagenezę nowe allele genu *Uzu1*, co pozwoliło na bardziej szczegółowe analizy funkcjonalne genu i kodowanego receptora BR. Wszystkie mutacje są mutacjami ‘zmiany sensu’ i skutkują podstawieniami aminokwasów w różnych domenach receptora BR (Gruszka i wsp. 2011a, Dockter i wsp. 2014).

Mutanty typu ‘uzu’ (Aka-uzu i Bow-uzu) mają (nieoczekiwanie) zwiększoną odporność na niektóre patogeny (*Pyrenophora teres f. sp. teres*, *Fusarium culmorum*; ryc. 13A), wynikającą ze skomplikowanego mechanizmu regulacyjnego, w którym uczestniczą elementy składowe łańcucha transdukcji sygnału z wadliwie działającego receptora BR (Ali i wsp. 2014, Goddard i wsp. 2014).

U jęczmienia uzyskano także mutanty z zaburzeniami biosyntezy BR. W badaniach Janeczko i wsp. (2016) wykorzystano jęczmień odmiany Delisa (typ dziki/forma wyjściowa z prawidłową biosyntezą BR) i dwa indukowane chemicznie pół-karłowe mutanty 522DK i 527DK ze zbiorów Uniwersytetu Śląskiego (Gruszka i wsp. 2011b; ryc. 13B). Mutanty mają podstawienia zmiany sensu w różnych

fragmentach sekwencji *HvDWARF* (Gruszka i wsp. 2011b), które skutkują obniżoną zawartością brasinosteroidów (kastasteronu), wynikającą z zaburzeń aktywności enzymu C6-oksydazy działającego w szlaku biosyntezy BR. W pracy Janeczko i wsp. (2016) wykonano fizjologiczno-biochemiczną charakterystykę obu wspomnianych mutantów na tle Delisy. Celem pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy/jak zaburzenia w produkcji brasinosteroidów u jęczmienia wpływają na metabolizm oraz rozwój roślin w warunkach optymalnego podlewania i suszy. Do analizy wybrano parametry fizjologiczno-biochemiczne wykorzystywane zwykle do charakteryzowania reakcji roślin na suszę w eksperymentach z zastosowaniem egzogennych brasinosteroidów. U roślin z zaburzoną produkcją BR występowało obok karłowatości także opóźnienie rozwoju - potrzebny był dłuższy czas do wejścia roślin w fazę kłoszenia. Zarówno w warunkach optymalnego podlewania jak i suszy zaburzeniom syntezy BR towarzyszył spadek produkcji innych hormonów roślinnych (ABA oraz cytokinin), co wskazywałoby na udział BR w regulacji sieci hormonalnej rośliny. Efektu tego nie obserwowano jednak w przypadku auksyn. Mutanty produkowały ponadto mniej osmoprotektanta - proliny, a efekt ten był szczególnie wyraźny w warunkach suszy.



Rycina 13A. Formy dzikie jęczmienia (Akashinriki i Bowman) oraz ich mutanty typu ‘uzu’ infekowane *Fusarium culmorum* (Ali i wsp. 2014). Przedruk zdjęcia z *BMC Plant Biology* na podstawie *Creative Commons Attribution License*.

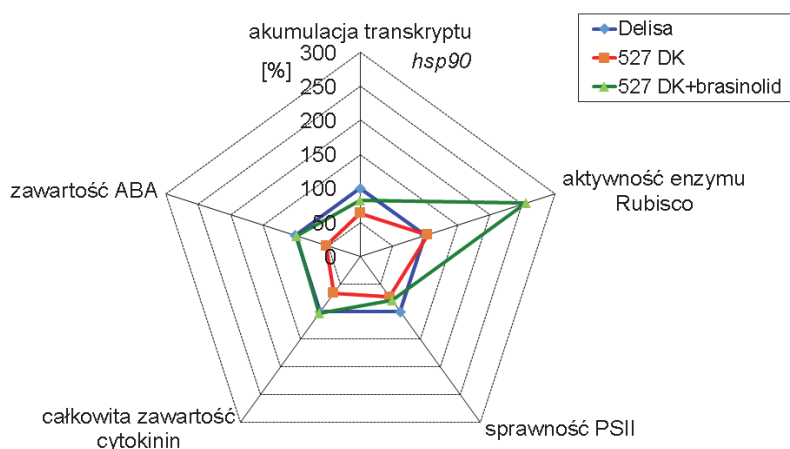


Rycina 13B. Jęczmień odmiany Delisa (typ dziki) oraz dwa mutanty z obniżoną produkcją brasinosteroidów 522 DK i 527 DK w różnych fazach rozwojowych. *Fotografia roślin w fazie dojrzałości pełnej dzięki uprzejmości D. Gruszka z Uniwersytetu Śląskiego.*

U mutantów zarówno w warunkach optymalnego podlewania, jak i suszy, obserwowano niekorzystne zmiany w asymilacji CO₂ oraz niższą akumulację sacharozy towarzyszącą zaburzeniom produkcji innych cukrów rozpuszczalnych. Obniżona akumulacja kestozy (jednego z fruktanów uważanych za czynnik stabili-

zujący membrany komórkowe), ujawniała się u mutantów w warunkach suszy. Ekspresja wybranych genów związanych z odpowiedzią na stres (np. *hsp 90*) była jednak wyraźniej obniżona u mutantów w warunkach optymalnego podlewania niż w warunkach suszy. Z kolei, jedynie w warunkach suszy występowała u mutantów niższa wydajność PSII, mimo, że zawartość chlorofilu była obniżona jedynie w warunkach optymalnego podlewania. Praca Janeczko i wsp. (2016) przyczynia się więc do wyjaśniania znaczenia BR w metabolizmie roślin z rodziny *Poaceae* z uwzględnieniem zależności działania BR od warunków środowiskowych.

W eksperymencie przeprowadzonym równolegle do doświadczenia z publikacji Janeczko i wsp. (2016), sprawdzono możliwość odwracania fizjologiczno-biochemicznych skutków niedoboru BR u mutantów jęczmienia przy pomocy suplementacji roślin BR. Zastosowano dokorzeniowo brasinolid, który w szlaku biosyntezy powstaje bezpośrednio z deficytowego u mutantów kastasteronu (ryc. 3B). Stopień odwracania skutków deficytu BR z pewnością uzależniony jest od stężenia aplikowanego BR. W opisywanym doświadczeniu zastosowano tylko jedno stężenie: $0,25\text{mg dm}^{-3}$ (podlanie doniczki z 10 roślinami $0,25\text{ dm}^3$ roztworu). Potwierdzono jednak wzrost poziomu hormonów, zwiększenie akumulacji transkryptu *hsp90* i sprawności PSII przede wszystkim u mutantów poddanych stresowi suszy (Janeczko i wsp., dane niepublikowane; ryc. 14).



Rycina 14. Odwracanie niektórych skutków deficytu brasinosteroidów u rosnącego w warunkach suszy mutantu jęczmienia 527 DK przez podanie brasinolidu; na podstawie Janeczko i wsp. (2016) oraz Janeczko i wsp., dane niepublikowane. Wartości na wykresie przedstawiono w procentach, przyjmując za 100% wartości charakteryzujące ekspozowane na suszę rośliny odm. Delisa (typ dziki); sprawność PSII oszacowano w oparciu o tzw. performance index (P.I./ABS).

Wartości tych parametrów zbliżyły się do wartości notowanych u typu dzikiego (Delisa). Na uwagę zasługuje fakt, że aktywność enzymu wiążącego CO₂ (Rubisco), która nie była w warunkach suszy zmniejszona u mutantów w porównaniu do kontrolnych roślin typu dzikiego (Janeczko i wsp. 2016), uległa dodatkowej stymulacji u mutantów traktowanych brasinolidem (ryc. 14). Zjawisko to obserwowano wcześniej u innych roślin zbożowych (Braun i Wild 1984).

3.2.3. Kukurydza

Kukurydza z mutacją genu *Brd1* kodującego oksydazę C-6, kluczowy enzym odpowiedzialny za przemiany BR w końcowych etapach ich biosyntezy została scharakteryzowana w pracy Makarevitch i wsp. (2012). Rośliny z mutacją tego genu charakteryzują się bardzo silną karłowatością oraz zaburzeniami w morfologii liści i kwiatów (ryc. 15).



Rycina 15. Karłowaty mutant kukurydzy z niedoborem brasinosteroidów (po prawej) obok typu dzikiego (Makarevitch i wsp. 2012). *Przedruk zdjęcia za zgodą autorów oraz redakcji PLOS ONE.*

W podsumowaniu rozdziału poświęconego badaniom na mutantach warto podkreślić, że w przypadku roślin zbożowych badania te przyniosły potwierdzenie przeważającej części funkcji fizjologicznych BR uprzednio sygnalizowanych w pracach, w których wykorzystywano BR egzogenne. Wymienić można choćby udział BR w regulacji asymilacji CO₂, produkcji proliny i cukrów, ochronne dzia-

łanie na kompleks PSII (w warunkach stresu), czy udział w skomplikowanej sieci powiązań z innymi hormonami roślinnymi.

3.3. Stosowanie brasinosteroidów a plonowanie roślin z rodziny *Fabaceae* oraz ważniejsze mechanizmy leżące u podstaw działania tych związków

Podobnie jak w przypadku roślin wiechlinowatych, spośród znanych brasinosteroidów, w doświadczeniach rolniczych na roślinach bobowatych, najczęściej wykorzystywano 28-homobrasinolid i 24-epibrasinolid, ale stosowano także brasinolid. Badano m.in. gatunki charakterystyczne dla strefy europejskiej (fasola, groch) a także gatunki bardziej egzotyczne (orzeczki ziemne).

24-Epibrasinolid i 28-homobrasinolid (oprysk w stężeniu 5 μM , kultura wazonowa) podnoszą plon fasoli (*Phaseolus vulgaris* L. odm. Arka Suvidha) zarówno u roślin poddanych stresowi suszy (4-8 dni), jak i u rosnących w warunkach optymalnego nawodnienia (Upreti i Murti 2004). W warunkach optymalnego nawodnienia wzrost plonu wynosi około 18% dla 24-epibrasinolidu i 8% dla 28-homobrasinolidu. U roślin poddanych stresowi suszy przez 4 dni w okresie kwitnienia 24-epibrasinolid poprawia plonowanie o 62% a 28-homobrasinolid o 41%. BR wpływają u fasoli na zawiązywanie brodawek korzeniowych, powodują wzrost zawartości cytokininy (rybozydu trans-zeatyny) oraz aktywności enzymu nitrogenazy, co łączy się z poprawą wiązania azotu (Upreti i Murti 2004).

W doświadczeniu dwuletnim w uprawie polowej uzyskano wzrost plonu orzeszków ziemnych (*Arachis hypogaea* L. odm. JL24) z 1,67 t/ha do około 2 ton po opryskach roślin 28-homobrasinolidem w okresie kwitnienia (Ramraj i wsp. 1997). Brasinolid i 24-epibrasinolid w uprawie szklarniowej także wpływają na podwyższenie plonu orzeszków ziemnych (odm. ICG 87128), jednocześnie zwiększając zawartość tłuszczów i węglowodanów w nasionach (Vardhini i Rao 1998). 24-Epibrasinolid, 28-homobrasinolid i brasinolid w stężeniu 0,5 oraz 1 i 3 μM u orzeszków ziemnych zwiększają aktywność nitrogenazy (poprawiając wiązanie azotu) oraz zawiązywanie brodawek korzeniowych, zwiększając ich liczbę z 8 do nawet 27 (Vardhini i Rao 1999).

W uprawie polowej soczewicy (*Lens culinaris* L. odm. Pusa-6) 28-homobrasinolid aplikowany poprzez namaczanie nasion (4, 8 i 12 godz.; stężenia 10^{-6} , 10^{-8} i 10^{-10} M) powoduje wzrost plonu (Hayat i Ahmad 2003). Plon nasion zebranych z hektara wzrasta z 1520 do 1702 kg po stosowaniu stężenia 10^{-8} i czasu namaczania materiału siewnego 12 godzin. Zwyżkom plonu soczewicy towarzyszy wzrost aktywności reduktazy azotanowej, lecz jednocześnie akurat u tej odmiany

obserwowano obniżenie długości korzeni i liczby wytwarzanych brodawek korzeniowych (Hayat i Ahmad 2003).

W kulturze wazonowej fasoli mung (*Vigna radiata* L. Wilczek odm. T-44) przedświecne moczenie nasion w roztworze 28-homobrasinolidu przez 4 do 12 godzin (stężenie 10^{-8} , 10^{-6} i 10^{-4} M) poprawia plonowanie, podnosząc masę nasion z 3,8 do nawet 4,7 g na roślinę w kulturze wazonowej (Fariduddin i wsp. 2003). 28-Homobrasinolid zwiększa intensywność fotosyntezy netto, podnosi zawartość chlorofilu i aktywność anhydryzy węglanowej katalizującej odwracalną reakcję przemian nieorganicznych form węgla (CO_2 i HCO_3^-) w komórkach (Fariduddin i wsp. 2003). Pozytywnie działają także opryski 28-homobrasinolidem u tej rośliny prowadzonej w kulturze wazonowej (Fariduddin i wsp. 2004, 2008) oraz podwójna aplikacja poprzez namaczanie nasion i oprysk roślin (Fariduddin i wsp. 2008). Podstawą wzrostu plonu fasoli mung jest wzrost liczby zawiązywanych przez roślinę strąków (Fariduddin i wsp. 2004, 2008).

W kulturze wazonowej ciecierzycy (*Cicer arietinum* L. odm. Uday) 28-homobrasinolid stymuluje plonowanie nie tylko w warunkach optymalnych dla wzrostu, ale także w warunkach skażenia kadmem (Hasan i wsp. 2008). 28-Homobrasinolid podnosi m.in. aktywność enzymów antyoksydacyjnych - katalazy, peroksydazy i dysmutazy ponadtlenkowej a także zawartość proliny. Zarówno u roślin kontrolnych traktowanych 28-homobrasinolidem, jak i u roślin dodatkowo stresowanych zanotowano także wzrost zawartości chlorofilu w liściach oraz zwiększoną ilość azotu w brodawkach korzeniowych towarzyszącą zwiększeniu aktywności nitrogenazy (enzymu katalizującego przemianę azotu atmosferycznego do jonu amonowego (NH_4^+)) i ilości leghemoglobiny wiążącej tlen i zapewniającej warunki beztlenowe do pracy nitrogenazy (Hasan i wsp. 2008). Pod wpływem 28-homobrasinolidu zwiększa się transport węglowodanów do brodawek, co może wzmacniać aktywność bakterii brodawkowych (Hasan i wsp. 2008). Wpływ BR na regulację transportu cukrów w roślinach *Fabaceae* potwierdzają także prace z zastosowaniem ^{14}C -sachrozy (Petzold i wsp. 1992).

U robinii akacjowej, brasinolid po aplikacji dokorzeniowej - polegającej na moczeniu korzeni przed wysadzeniem siewek do gleby - stymuluje aktywność enzymów antyoksydacyjnych, podnosi zawartość proliny i cukrów oraz sprzyja zatrzymywaniu wody w liściach w czasie suszy (Li i wsp. 2008). U siewek tego gatunku obserwowano także spadek transpiracji i przewodnictwa szparkowego oraz obniżenie poziomu peroksydacji lipidów (Li i wsp. 2008).

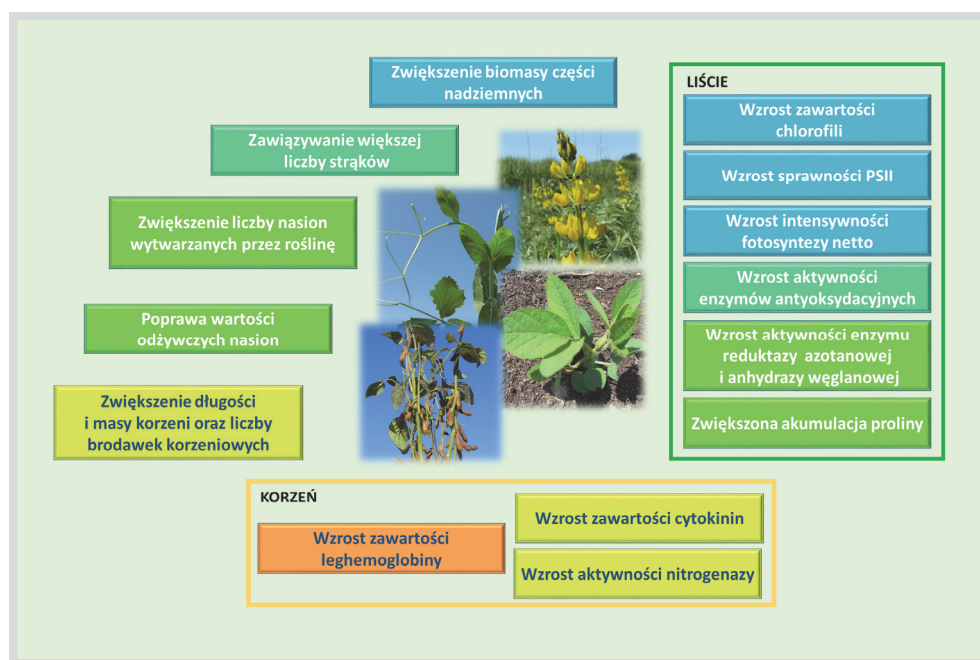
W doświadczeniach prowadzonych w Polsce badano oddziaływanie 24-epibrasinolidu na plonowanie, skład chemiczny nasion (zawartość białek, cukrów, fitoestrogenów, składników mineralnych, witamin z grupy E, prowitaminy

A, składu procentowego steroli i kwasów tłuszczowych) oraz odporność na suszę uprawianej w Polsce soi odmiany Aldana i Augusta (Janeczko i wsp. 2009, Janeczko i wsp. 2011 b). Eksperymenty wykonano w warunkach szklarniowych i poletkowych. Brasinosteroid aplikowano poprzez przedsiewne moczenie nasion ($0,25 \text{ mg dm}^{-3}$) i oprysk roślin (1 mg dm^{-3}). W doświadczeniu poletkowym stwierdzono, że 24-epibrasinolid wpływał na wzrost masy nasion w przeliczeniu na jedną roślinę (od 27-73%) ale efekt ten był zależny od odmiany oraz warunków wegetacji (wystąpienie lub brak czynnika suszy w okresie zawiązywania nasion; Janeczko i wsp. 2011 b). 24-Epibrasinolid nie wpływał na poziom białek i cukrów rozpuszczalnych w nasionach, ale zwiększał zawartość fitoestrogenu genisteiny (Aldana) oraz zmniejszał poziom potasu (Augusta) i wapnia (Aldana). Stwierdzono niewielki, statystycznie nieistotny wzrost poziomu witamin z grupy E, ale znaczący wzrost ilości prowitaminy A w nasionach soi (nawet do 50% w przypadku zastosowania oprysku 24-epibrasinolidem; Janeczko i wsp. 2009). Stosowanie BR zmieniało skład procentowy steroli w sposób silnie zależny od odmiany, lecz nie od sposobu aplikacji 24-epibrasinolidu. U Aldana zmniejszał się udział procentowy kampesterolu i sitosterolu w puli steroli a rósł udział stigmasterolu. Odwrotne zjawisko występowało w nasionach Augusty. Niewielkie zmiany po zastosowaniu 24-epibrasinolidu obserwowano w przypadku składu procentowego kwasów tłuszczowych u badanej soi (Janeczko i wsp. 2009). W doświadczeniu przeprowadzonym w szklarni, 24-epibrasinolid wykazywał działanie na proces fotosyntezy zachodzący w liściach soi odmiany Augusta rosnącej w warunkach suszy. 24-Epibrasinolid powodował wzrost intensywności asymilacji CO_2 i sprawności PSII (Janeczko i wsp. 2011 b). Zjawiska tego nie zaobserwowano jednak dla odmiany Aldana.

Działanie 24-epibrasinolidu testowano w warunkach polskich także u grochu i łubinu. Doświadczenia przeprowadzono w sezonie wegetacyjnym 2011, podając 24-epibrasinolid ($0,25-0,5 \text{ mg dm}^{-3}$) poprzez przedsiewne moczenie nasion (24 godziny) oraz oprysk roślin i podlewanie systemu korzeniowego w stadium kwitnienia roślin. Doświadczenia prowadzono w tunelu foliowym i na poletkach doświadczalnych. U grochu i łubinu wpływ 24-epibrasinolidu na wysokość plonu był słabo zaznaczony (dane niepublikowane) lecz istotnie zmieniał się skład chemiczny nasion (Biesaga-Kościelniak i wsp. 2014, Janeczko i wsp. 2015). Stwierdzono zmiany zawartości białka (zależne od odmiany i warunków wzrostu roślin) oraz wzrost ilości tłuszczów ogólnych w nasionach. Udokumentowano także wzrost zawartości witamin głównie z grupy E, a także witaminy C i prowitaminy A.

W przypadku roślin bobowatych uważa się, że pozytywne efekty stosowania regulatorów wzrostu dla osiągnięcia poprawy plonowania ze względu na ich wielokierunkowy wpływ na roślinę oraz zależność od gatunku a nawet odmiany niekoniecznie są powtarzalne w latach (Prusiński i Borowska 2002). Zależą one także od wieku rośliny, jej stanu fizjologicznego, warunków siedliskowych itd. (Prusiński i Borowska 2002). Stanowisko to znajduje potwierdzenie także w przedstawionych wynikach badań dotyczących soi, grochu i łubinu.

Ogólny schemat zmian fizjologiczno-biochemicznych obserwowanych po zastosowaniu brasinosteroidów u roślin bobowatych przedstawia rycina 16. Część ze zmian metabolicznych ujawnia się w szczególności w warunkach działania czynników stresowych.



Rycina 16. Ważniejsze zmiany fizjologiczno-biochemiczne indukowane po zastosowaniu brasinosteroidów u roślin z rodziny bobowatych.

3.4. Charakterystyka mutantów z rodziny *Fabaceae* o zróżnicowanej akumulacji brasinosteroidów i z zaburzeniami w percepcji tych związków

Wśród uprawnych roślin z rodziny bobowatych scharakteryzowano mutanty grochu z zaburzoną biosyntezą i percepcją brasinosteroidów (Bishop 2003) oraz mutanty bobiku z zaburzeniami biosyntezy BR (Fukuta i wsp. 2006).

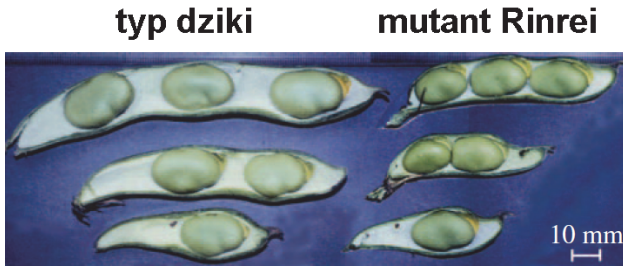
3.4.1. Groch

Mutant grochu (*lka* i *lkb*) charakteryzują się karłowatością. Mutant *lka* jest mutantem o zaburzonej percepcji BR i zwiększonej w związku z tym akumulacji kastasteronu (Nomura i wsp. 1999). Mutant *lkb* jest mutantem z zaburzoną biosyntezą brasinosteroidów (Nomura i wsp. 1999). Zaburzenie to występuje na bardzo wczesnym etapie biosyntezy BR i jest związane jeszcze z przemianą steroli tj. zablokowaniem przemiany 24-metylenecholesterolu do kampesterolu – głównego sterolowego prekursora BR (Vriet i wsp. 2013). U mutantu tego występuje jednak także równoległe zablokowanie syntezy sitosterolu z izofukosterolu (Nomura i wsp. 1999). W pracy Nomura i wsp. (1999), przeprowadzono szczegółową analizę składu sterolowego, celem ustalenia znaczenia badanych mutacji *lka* i *lkb* dla metabolizmu steroli u grochu. Badano i porównywano z typem dzikim skład sterolowy nasion, części nadziemnej siewek oraz poszczególnych frakcji komórkowych obu mutantów. Wykazano, że mutant *lka* ma skład sterolowy, który nie różni się od typu dzikiego. Drastyczne zmiany w składzie steroli występują natomiast u mutantu *lkb*. Zawartość głównych steroli u typu dzikiego i mutantu *lka* (sitosterolu, stigmasterolu i kampesterolu) jest u *lkb* zredukowana średnio kilkadziesiąt razy a dominującym steroidem w łodygach i nasionach jest izofukosterol. Szczegółowa analiza dystrybucji steroli pomiędzy frakcje komórkowe (cytoplazmatyczną i membranową) wykazała, że zjawisko to kumuluje się w membranach komórkowych,

a pozostaje niezauważalne we frakcji cytoplazmatycznej. Fakt ten, zdaniem Nomura i wsp. (1999), może mieć wpływ na funkcjonalność membran komórkowych, zwłaszcza w warunkach stresu. Jednak oba mutanty i typ dziki nie różniły się znacząco parametrami fizjologiczno-biochemicznymi w doświadczeniach, w których poddano je stresowi suszy (Jager i wsp. 2008). Pod wpływem suszy parametry wzrostowe (wysokość, długość liści czy obwód łodygi) i stężenie hormonu stresu (ABA) zmieniały się w podobny sposób u mutantów i typu dzikiego (Jager i wsp. 2008). Skłoniło to Jager i wsp. do zakwestionowania znaczenia BR w procesach związanych z odpowiedzią na stres suszy u grochu. W powyższej pracy nie analizowano jednak wysokości plonu omawianych mutantów.

3.4.2. Bobik

Mutant bobiku z zaburzeniami w biosyntezie brasinosteroidów został pozyskany przez naświetlanie siewek promieniowaniem gamma. Jako punkt odniesienia dla mutantu przyjęto rośliny odmiany Mild Green (typ dziki) (Fukuta i wsp. 2006). Zaburzenie w produkcji BR niekorzystnie wpłynęło na plon nasion bobiku (*Vicia faba*). Mutant (nazwany Rinrei) w stosunku do typu dzikiego tego gatunku charakteryzuje występowanie mniejszych nasion, co jest skorelowane z redukcją wielkości strąka w przypadku strąków zawierających 2-3 nasiona (ryc. 17). W przypadku strąków z jednym nasionem efekt ten nie występuje, co skłoniło autorów do postawienia hipotezy, że utrudnieniem dla wypełniania nasion jest słabszy wzrost okrywy strąków i fizyczne ograniczenie przestrzeni wzrostowej dla nasion. Zjawisko to jest częściowo znoszone przez podanie egzogenego brasinolidu (Fukuta i wsp. 2006).



Rycina 17. Strąki bobiku typu dzikiego oraz mutantu z zaburzeniami biosyntezy brasinosteroidów (Fukuta i wsp. 2006). Przedruk zdjęcia za zgodą *Annals of Botany i Oxford University Press*.

4. BRASINOSTEROIDY W PRAKTYCE ROLNICZEJ

Zastosowanie regulatorów wzrostu i rozwoju w uprawie roślin jest rozpowszechnione na całym świecie. Szczególnie duże znaczenie zyskały regulatory przeciwdziałające np. wyleganiu roślin wiechlinowatych czy regulatory stosowane w ochronie roślin przed patogenami. Mimo znacznego postępu metod inżynierii genetycznej i coraz częstszego włączania ich w programy hodowli nowych ulepszonych odmian, badania nad nowymi egzogennymi regulatorami wzrostu roślin, które mogą mieć znaczenie dla rolnictwa, są kontynuowane. Szczególnie interesujące mogą być regulatory tzw. „ekologiczne”, przez które należałoby rozumieć związki o naturalnym pochodzeniu, mogące znaleźć zastosowanie w preparatach do ochrony roślin przed stresem i poprawiające plonowanie w uprawach narażonych na niekorzystne/trudno przewidywalne zmiany środowiskowe w czasie wegetacji. Istotnymi czynnikami stresowymi obniżającymi plonowanie roślin uprawnych są coraz częściej występujące susze, zasolenie gleb, nagle zmiany temperatury, czy lokalne podtopienia. W takich przypadkach możliwość zastosowania w uprawie regulatora wzrostu roślin o działaniu przeciwstresowym nabiera istotnego znaczenia. Do tego typu związków, dość intensywnie badanych, należy od kilku lat np. osmoprotektant glicyna-betaina (Ashraf i Foolad 2007, Iqbal i wsp. 2009), zeaxalenon (Kościelniak i wsp. 2009) czy hormony steroidowe - brasinosteroidy (Sasse 2003, Bajguz i Hayat 2009). Jest to tym istotniejsze, że postęp nauki w pracach nad organizmami modyfikowanymi genetycznie (tzw. GMO), spowodował, że choć rośliny te są już faktem we współczesnym rolnictwie, są one jednocześnie przedmiotem publicznej debaty i wielu obaw.

4.1. Brasinosteroidy jako składniki preparatów w rolnictwie na świecie

W wyniku postępu badań nad aktywnością brasinosteroidów u roślin, związki te dołączyły do grupy regulatorów o działaniu przeciwstresowym/plonotwórczym. Eksperymentalnie wykazano, że egzogenna aplikacja BR indukuje odporność na czynniki stresowe u wielu gatunków, sprzyjając przyrostom biomasy i plonowaniu. Powoduje to, że związki te stały się atrakcyjne jako składniki agrochemikaliów i w niektórych regionach świata są obecnie stosowane w uprawie. Na Kubie wykorzystywane są syntetyczne analogi brasinosteroidów (BIOBRAS-6, ryc. 4; BIOBRAS-16). Są one zalecane jako środki do zastosowania w uprawach warzywnych, gdyż stymulują plonowanie m.in. cebuli, pomidorów, sałaty (Núñez i wsp. 1998, Terry i wsp. 2001, Alfonso i wsp. 2011; ryc. 18).



Rycina 18. Preparat BIOBRAS-16 jest stosowany na Kubie w uprawach warzywnych.

Brasinosteroidy wprowadzono do uprawy także na Białorusi, w Rosji i Chinach. Na Białorusi i w Rosji od 1992 roku stosowany jest w praktyce rolniczej preparat zawierający 24-epibrasinolid pod nazwą EPIN (Khripach i wsp. 2010). Autorzy przedstawiają wyniki pozytywnego działania tego preparatu na kilkunastu gatunkach w tym zbożach. Do ciekawszych należą wyniki świadczące o poprawie plonowania roślin przy zmniejszonym nawożeniu NPK a także zmniejszeniu pobierania przez rośliny z gleby radioaktywnego cezu i strontu (Khripach i wsp. 2010). Z kolei w Chinach zarejestrowano następujące preparaty zawierające jako substancję aktywną brasinosteroidy: BR-120 (zawiera 28-homobrasinolid), Nong Le Li (zawiera 24-epibrasinolid), Bao Min Feng (zawiera syntetyczny analog BR – TNZ303). Do ciekawszych przykładów należy preparat Tian Feng Su zawierający mieszaninę 24-epibrasinolidu i 3-epibrasinolidu zarejestrowany przez *Jiangmen Agricultural Pesticide Chemical Industry Factory* (Zhao i Chen 2010). Wiadomo bowiem, że brasinosteroidy wykazują ochronne działanie na rośliny poddane opryskom pestycydami (Xia i wsp. 2009 a). Istnieje również szansa na wykorzystanie BR do zapobiegania chorobom roślin. BR wzmagają naturalne mechanizmy obrony roślin przed chorobą, a więc działają inaczej niż większość znanych preparatów mających działanie *stricte* bakteriobójcze lub grzybobójcze (Nakashita i wsp. 2003, Skoczowski i wsp. 2011). Inne możliwości praktycznego wykorzystania BR m.in. w sadownictwie zostały omówione w książce pt.: „Fizjologia Roślin Sadowniczych Strefy Umiarkowanej” pod redakcją Jankiewicza (2011).

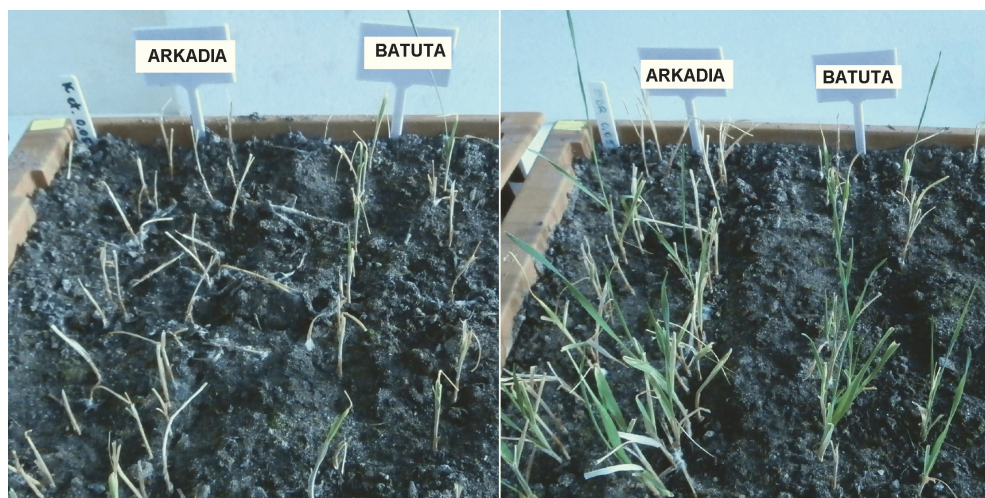
4.2. Perspektywa zastosowania brasinosteroidów w Polsce

W Polsce najbardziej interesująca wydaje się perspektywa zastosowania BR jako regulatorów minimalizujących skutki wpływu stresów środowiskowych na plon. Z doświadczeń polowych przeprowadzonych w polskich warunkach klimatycznych wynika, że brasinosteroidy mają pozytywny wpływ na wysokość plonu w przypadkach wystąpienia suszy glebowej (Janeczko i wsp. 2010, Janeczko i wsp. 2011b). Z kolei doświadczenia szklarniowe pokazały, że brasinosteroidy poprawiają przeżywalność zbóż w warunkach niskiej temperatury (mróz), regulując gospodarkę cukrami oraz wspomagając poststresową regenerację roślin (Pociecha i wsp. 2016, Janeczko - projekt NCN 2013/09/B/NZ9/01653; ryc. 19 A i B).

Stan badań nad BR w Polsce jest obecnie na takim etapie, że stanowi punkt wyjścia do opracowania metod uprawy z użyciem brasinosteroidów do zastosowania w praktyce. Konieczne są jeszcze wieloletnie (3-5 letnie) eksperymenty polowe z wykorzystaniem większej liczby odmian danego gatunku w celu ustalenia znaczenia odmiany i jej interakcji ze zmieniającymi się rokrocznie warunkami środowiska dla stabilności wybranych efektów wywoływanych przez BR. Ponadto w przypadku tworzenia preparatów zawierających BR należy wziąć pod uwagę fakt niekorzystnych efektów fizjologicznych wynikających z oddziaływania na komórki roślinne rozpuszczalnika BR, jakim w dotychczasowych doświadczeniach zwykle był etanol lub metanol (problem bliżej omówiony jest w pracy Janeczko (2011)). Etanol powodując uszkodzenia membran komórkowych, może osłabiać odporność roślin na stres biotyczny lub niską temperaturę. W razie wprowadzania preparatów zawierających BR należałoby więc udowodnić, że korzyści wynikające z zastosowania BR niwelują niekorzystne skutki działania rozpuszczalnika lub podjąć próby zastosowania innego rozpuszczalnika o mniejszym wpływie na procesy fizjologiczne rośliny. Trudno pominąć także względy ekonomiczne stosowania BR. Obecnie koszt zarówno dostępnych komercyjnie brasinosteroidów jak i synteza chemiczna BR prowadzona przez laboratoria zagraniczne jest wysoki (10 mg BR to koszt około 1000 PLN). Mimo niewielkiej ilości (np. $0,25\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) w jakiej BR wykazują udokumentowaną aktywność fizjologiczną przy podaniu egzogennym, opryskanie jednego hektara (roztwór w 300 dm^3 wody) pochłonęłoby 75 mg związku. Na rynku chińskim dostępne są wprawdzie tanie preparaty sprzedawane pod nazwą brasinolidu lub brasinosteroidu, trudno jednak wypowiedać się na temat ich składu chemicznego. Pozostaje mieć nadzieję, że w przyszłości uda się opracować tańsze metody produkcji BR.



Rycina 19 A. Przeżywalność żyta w temperaturze -17°C (24 godziny) po zastosowaniu jednego z brasinosteroidów (Pociecha i wsp. 2016). Po lewej kontrola a po prawej żyto po oprysku 24-epibrasinolidem, który wykonano dzień przed ekspozycją na mróz. Zdjęcie dzięki uprzejmości E. Pociecha, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie.



Rycina 19 B. Przeżywalność pszenicy ozimej w temperaturze -12°C (24 godziny) po zastosowaniu jednego z brasinosteroidów (Janeczko, projekt NCN 2013/09/B/NZ9/01653). Po lewej kontrola a po prawej pszenica po oprysku jednym z brasinosteroidów, który wykonano przed ekspozycją na mróz.

4.2.1. Zagadnienie toksyczności BR dla człowieka i owadów zapylających

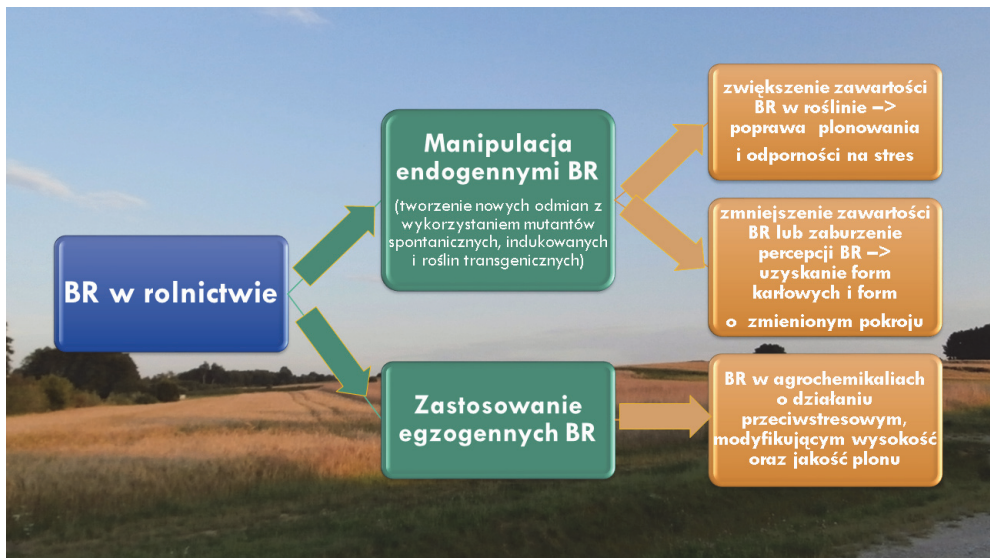
Zawsze w przypadku traktowania roślin uprawnych różnego typu egzogennymi regulatorami pojawia się pytanie o bezpieczeństwo konsumenta produktów roślinnych. W przypadku BR należy przypomnieć, że zarówno człowiek jak i zwierzęta (spożywające produkty pochodzenia roślinnego) a także owady zbierające pyłek lub odżywiające się materiałem roślinnym, stykają się z BR występującymi w naturze w bardzo różnych ilościach zależnych od gatunku, fazy rozwojowej rośliny czy warunków w jakich wyrosła itd..

Egzogennie stosowane brasinosteroidy nie powinny stanowić zagrożenia dla zdrowia człowieka ze względu na bardzo niskie dawki polowe oraz przemiany, jakim podlegają w roślinach po włączeniu w metabolizm (Ramraj i wsp. 1997, Bajguz i Tretyn 2003). Specjalistyczne badania pokazują, że LD₅₀ dla 24-epibrasinolidu wynosi przy podaniu doustnym ponad 1000 mg na kilogram masy ciała myszy i ponad 2000 mg na kilogram masy szczura Bajguz i wsp. (2013). Tymczasem w przypadku aplikacji polowej dawka stosowanych BR byłaby rzędu 75 mg na cały hektar. BR nie wykazują działania mutagennego, nie wywołują także podrażnienia oczu w testach na królikach (24-epibrasinolid, 0,01%) i nie mają działania teratogennego u szczurów nawet w dawce 1000 mg na kilogram masy ciała (Bajguz i wsp. 2013). Należy podkreślić ponadto że, egzogenne BR nie są akumulowane w zawiązywanych nasionach (Janeczko i wsp. 2010; Janeczko i wsp. 2011b), a ich pobieranie/transport w roślinie po egzogennej aplikacji, jeśli zachodzi, to dotyczy ilości pozostających w granicach norm fizjologicznych (Janeczko i Swaczynová 2010, Janeczko i wsp. 2011a). Nie obserwowano pobierania/transportu egzogennych BR w ilości np. 1000 razy przekraczających naturalny poziom.

Sprawa szkodliwości BR w przypadku ich egzogennego stosowania na rośliny jest istotna także dla owadów zapylających. W przypadku zbóż nie ma to znaczenia, natomiast w przypadku obcopylnych roślin dwuliściennych być może warto zwrócić uwagę na fazę rozwojową rośliny, w której BR byłby stosowany. Oprysk w fazie kwitnienia teoretycznie mógłby być niekorzystny dla owadów zapylających ze względu na to, że niektórzy autorzy stwierdzili antyekdysteroidowe (ekdysteroidy regulują rozwój owadów) działanie BR (Lehmann i wsp. 1988), z drugiej jednak strony według innych badań efekty takie nie występują (Dinan i wsp. 2001).

4.3. Wykorzystanie w rolnictwie mutantów oraz roślin transgenicznych z zaburzeniami biosyntezy lub percepcji BR

Mimo korzystnych efektów stosowania BR w uprawie, niektórzy badacze wyliczają wady egzogenego stosowania tych związków, takie jak: zależność efektów od dawki, fazy rozwojowej rośliny, warunków pogodowych czy sposobu aplikacji (Holá i wsp. 2010). Wielu badaczy dostrzega większe szanse wykorzystania właściwości brasinosteroidów w rolnictwie poprzez tworzenie odmian o zmodyfikowanej (zwykle zwiększonej) zawartości tych steroidów lub odmian z niewielkimi zaburzeniami percepcji BR (Divi i Kriszna 2009, Vriet i wsp. 2012, Zhang i wsp. 2014).



Rycina 20. Kierunki działań związane z wykorzystaniem potencjału brasinosteroidów w rolnictwie.

W Japonii i Korei pierwsze pół-karłowe mutanty jęczmienia (*uzu*) już w latach trzydziestych stanowiły odpowiednio 70% i ponad 30% areалу uprawy jęczmienia (Saisho i wsp. 2004). Mutanty te charakteryzują się sztywną łodygą i są niższe od tzw. formy dzikiej o 20% (Saisho i wsp. 2004). W latach 1960-1970 jedna z linii *uzu* (Chibadamai) o wysokości roślin nieprzekraczającej 60 cm uprawiana była na 200 000 ha w Chinach. Rozwój technik genetyki molekularnej po-

zwolnił stosunkowo niedawno ustalić, że mutanty *uzu* mają zaburzenia właśnie w percepcji brasinosteroidów.

Z kolei zdaniem Zhang i wsp. (2014), wykorzystanie metod inżynierii genetycznej w celu modulowania poziomu brasinosteroidów w roślinie lub zmian w szlakach transdukcji sygnału pochodzącego od receptora BR jest bardzo obiecujące dla tzw. molekularnej hodowli ryżu. Można w ten sposób uzyskać odmiany charakteryzujące się zwiększonym plonowaniem, korzystnymi z punktu widzenia produkcji zmianami w pokroju roślin (kąt ustawienia liści) czy karłowatością.

Na rycinie 20 przedstawiono możliwe kierunki działań związane z wykorzystaniem potencjału brasinosteroidów w rolnictwie. Niezależnie od tego, który kierunek zwycięży już obecnie brasinosteroidy są przez niektórych autorów określane mianem regulatorów 21 wieku (Khripach i wsp. 2000, Hayat i wsp. 2010).

5. SPIS LITERATUREY

- Abe H., Nakamura K., Morishita T., Uchiyama M., Takatsuto S., Ikekawa N. 1984. Endogenous brassinosteroids of the rice plant: castasterone and dolichosterone. *Agric. Biol. Chem.* 48: 1103-1104.
- Abe H., Takatsuto S., Nakayama M., Yokota T. 1995 a. 28-Homotyphasterol, a new natural brassinosteroid from rice (*Oryza sativa* L.) bran. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 176-178.
- Abe H., Takatsuto S., Okuda R., Yokota T. 1995 b. Identification of castasterone, 6-deoxocastasterone, and typhasterol in the pollen of *Robinia pseudo-acacia* L. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 309-310.
- Adam G., Marquardt V. 1986. Brassinosteroids. *Phytochemistry* 25: 1787-1799.
- Ali B., Hayat S., Hasan A.S., Ahmad A. 2006. Effect of root applied 28-homobrassinolide on the performance of *Lycopersicon esculentum*. *Sci. Hort.* 110: 267-273.
- Ali Q., Athar H., Ashraf M. 2008. Modulation of growth, photosynthetic capacity and water relations in salt stressed wheat plants by exogenously applied 24-epibrassinolide. *Plant Growth Regul.* 56: 107-116.
- Ali S.S., Gunupuru L.R., Kumar G.B.S., Khan M., Scofield S., Nicholson P., Doohan F.M. 2014. Plant disease resistance is augmented in uzu barley lines modified in the brassinosteroid receptor BRI1. *BMC Plant Biol.* 14: 227-241.
- Alfonso, E.T., Padrón J.R., Peraza T.T., Escobar I.R., Díaz de Armas M.M. 2011. Respuesta del cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) a la aplicación de diferentes productos bioactivos. *Cult. Tropic.* 32: 77-82.
- Antonchick A., Svatos A., Schneider B., Konstantinova O.V., Zhabinskii V.N., Khripach V.A. 2005. 2,3-Epoxybrassinosteroids are intermediates in the biosynthesis of castasterone in seedlings of *Secale cereale*. *Phytochemistry* 66: 65-72.
- Antonchick A.P., Schneider B., Zhabinskii V.N., Konstantinova O.V., Khripach V.A. 2003. Biosynthesis of 2,3-epoxybrassinosteroids in seedlings of *Secale cereale*. *Phytochemistry* 63: 771-776.
- Anuradha S., Rao S.S.R. 2003. Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. *Plant Growth Reg.* 40: 29-32.
- Arora N., Bhardwaj R., Sharma P., Arora H.K. 2008. 28-Homobrassinolide alleviates oxidative stress in salt treated maize (*Zea mays* L.) plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 20:153-157.
- Asahina M., Tamaki Y., Sakamoto T., Shibata K., Nomura T., Yokota T. 2014. Blue light-promoted rice leaf bending and unrolling are due to up-regulated brassinosteroid biosynthesis genes accompanied by accumulation of castasterone. *Phytochemistry* 104: 21-29.
- Asakawa S., Abe H., Nishikawa N., Natsume M., Koshioka M. 1996. Purification and identification of new acyl-conjugated teasterones in lily pollen. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1416-1420.
- Asami T., Yoshida S. 1999. Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends Plant Sci.* 4: 348-353.

- Asami T., Min Y.K., 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: 93-100.
- Ashraf M., Foolad M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59: 206-216.
- Azpeitia A., Chan J.L., Saenz L., Oropeza C. 2003. Effect of 22(S),23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. *J. Hort. Sci. Biotech.* 78: 591-596.
- Baba J., Yokota T., Takahashi N. 1983. Brassinolide-related new bioactive steroids from *Dolichos lablab* seed. *Agric. Biol. Chem.* 47: 659-661.
- Bajguz A., Tretyn A. 2003. Brassinosteroidy – hormony roślinne. Wydawnictwo UMK Toruń 2003.
- Bajguz A. 2007. Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 95-107.
- Bajguz A., Hayat S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 1-8.
- Bajguz A., Bajguz A.J., Tryniszewska E.A. 2013. Recent advanced in medicinal applications of brassinosteroids, a group of plant hormones. Rozdział w książce “Studies in Natural Products Chemistry” (ed. Atta-ur-Rahman F.R.S.), Wydawnictwo Elsevier.
- Biesaga-Kościelniak J., Dziurka M., Ostrowska A., Mirek M., Kościelniak J., Janeczko A. 2014. Brassinosteroid improves content of antioxidants in seeds of selected leguminous plants. *Austral. J. Crop Sci.* 8: 378-388.
- Bishop G.J. Brassinosteroid mutants of crops. 2003. *J. Plant Growth Regul.* 22: 325-335.
- Braun P., Wild A. 1984. The influence of brassinosteroid on growth and parameters of photosynthesis of wheat and mustard plants. *J. Plant Physiol.* 116: 189-196.
- Callow R.K., Young F.G. 1936. Relations between optical rotatory power and constitution in the steroids. *Proc. Royal Society A* 157 (890): 194-212.
- Chono M., Honda I., Zeniya H., Yoneyama K., Saisho D., Takeda K., Takatsuto S., Hoshino T., Watanabe Y. 2003. A semi-dwarf phenotype of barley uzu results from a nucleotide substitution in the gene encoding a putative brassinosteroid receptor. *Plant Physiol.* 133: 1209-1219.
- Chung Y., Choe S. 2013. The regulation of brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Critical Rev. Plant Sci.* 32: 396-410.
- Clouse S.D. 1998. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 427-451.
- Dhaubhadel S., Browning K.S., Gallie D.R., Krishna P. 2002. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant J.* 29: 681-691.
- Dhaubhadel S., Chaudhary S., Dobinson K. F., Krishna P. 1999. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Mol. Biol.* 40: 333-342.
- Dinan L., Bourne P.C., Meng Y., Sarker S.D., Tolentino R.B., Whiting P. 2001. Assessment of natural products in the *Drosophila melanogaster* BII cell bioassay for ecdysteroid agonist and antagonist activities. *Cel. Mol. Life Sci.* 58: 321-342.
- Divi U.K., Krishna P. 2009. Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotechnol.* 26: 131-136.

- Dockter C., Gruszka D., Braumann I., Druka A. Druka I., Franckowiak J., Gough S. P., Janeczko A., Kurowska M., Lundqvist J., Lundqvist U., Marzec M., Matyszczyk I., Müller A. H., Oklešťková J., Schulz B., Zakhrebekova S., Hansson M. 2014. Induced variations in brassinosteroid genes define barley height and sturdiness, and expand the "Green Revolution" genetic toolkit. *Plant Physiol.* 166: 1912-1927.
- El-Khallal S.M., Hathout T.A., Ashour, A.R.A., Kerrit A.A. 2009. Brassinolide and salicylic acid induced growth, biochemical activities and productivity of maize plants grown under salt stress. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 5: 380-390.
- Esposito D., Komarnytsky S., Shapses S., Raskin I. 2011. Anabolic effect of plant brassinosteroid. *FASEB J.* 25:3708-371.
- Fariduddin Q., Ahmad A., Hayat S. 2003. Photosynthetic response of *Vigna radiata* to pre-sowing seed treatment with 28-homobrassinolide. *Photosynthetica* 41: 307-310.
- Fariduddin Q., Ahmad A., Hayat, S. 2004. Response of *Vigna radiata* to foliar application of 28-homobrassinolide and kinetin. *Biol. Plant.* 48: 465-468.
- Fariduddin Q., Hasan S.A., Ali B., Hayat S., Ahmad A. 2008. Effect of modes of application of 28-homobrassinolide on mung bean. *Turk. J. Biol.* 32: 17-21.
- Fariduddin Q., Khanam S., Hasan S.A., Ali B., Hayat S., Ahmad A. 2009. Effect of 28-homobrassinolide on the drought stress-induced changes in photosynthesis and antioxidant system of *Brassica juncea* L. *Acta Physiol. Plant* 31: 889-897.
- Farooq M., Wahid A., Basra S.M.A., Islam-ud-Din 2009. Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress. *J. Agron. Crop Sci.* 195: 262-269.
- Fujii S., Saka H. 2001. Distribution of assimilates to each organ in rice plants exposed to a low temperature at the ripening stage, and the effect of brassinolide on the distribution. *Plant Prod. Sci.* 4: 136-144.
- Fujioka S., Yokota T. 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 137-164.
- Fukuta N., Fukuzono K., Kawaide H., Abe H., Nakayama M. 2006. Physical restriction of pods causes seed size reduction of a brassinosteroid-deficient faba bean (*Vicia faba*). *Ann Bot.* 97: 65-69.
- Gamoh K., Okamoto N., Takatsuto, S. Tejima I. 1990. Determination of traces of natural brassinosteroids as dansylaminophenylboronates by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta* 228: 101-105, za: Bajguz A., Tretyn A. 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 62: 1027-1046.
- Gamoh K., Omote K., Okamoto N., Takatsuto S. 1989. High-performance liquid chromatography of brassinosteroids in plants with derivatization using 9-phenanthreneboronic acid. *J. Chromatogr.* 469: 424-428, za: Bajguz A., Tretyn A. 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 62: 1027-1046.
- Goddard R., Peraldi A., Ridout C., Nicholson P. 2014. Enhanced disease resistance caused by BR11 mutation is conserved between *Brachypodium distachyon* and Barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Plant Microbe Interact.* 27:1095-1106.
- Gomes M.M.A., Campostrini E., Leal N.R., Viana A.P., Ferraz T.M., Siqueira L.N., Rosa R.C.C., Netto A. T., Nuñez-Vázquez M., Zullo M.A.T. 2006. Brassinosteroid analogue effects on the yield of yellow passion fruit plants (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). *Sci. Hort.* 110: 235-240.

- Grove M.D., Spencer G.F., Rohwedder W.K., Mandava N., Worley J.F., Warthen J.D., Steffens G.L., Flippen-Anderson J.L., Cook J.C. 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281: 216-217.
- Gruszka D., Małuszyński M. 2010. Brasinosteroidy – struktura chemiczna, genetyczne podstawy biosyntezy i transdukcji sygnału oraz funkcje fizjologiczne. *Post. Biol. Kom.* 37: 381-407.
- Gruszka D., Szarejko I., Maluszynski M. 2011 a. New allele of HvBRI1 gene encoding brassinosteroid receptor in barley. *J. Appl. Gen.* 52: 257-268.
- Gruszka D., Szarejko I., Maluszynski M. 2011 b. Identification of barley DWARF gene involved in brassinosteroid synthesis. *Plant Growth Regul.* 65: 343-358.
- Gururani M.A., Venkatesh J., Tran L.S.P. 2015. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Mol. Plant* 8: 1304 - 1320.
- Hartwig T., Chuck G.S., Fujioka S., Klempien A., Weizbauer R., Potluri D.P.V., Choe S., Johal G.S., Schulz B. 2011. Brassinosteroid control of sex determination in maize. *PNAS* 108: 19814-19819.
- Hasan S.A., Hayat S., Ali B., Ahmad A. 2008. 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. *Environ. Pollut.* 151: 60-66.
- Hayat S., Ahmad A. 2003. Soaking seeds of *Lens culinaris* with 28-homobrassinolide increased nitrate reductase activity and grain yield in the field in India. *Ann. Appl. Biol.* 143: 121-124.
- Hayat S., Ali B., Hasan S.A., Ahmad A. 2007. Effect of 28-homobrassinolide on salinity-induced changes in *Brassica juncea*. *Turk. J. Biol.* 31: 141-146.
- Hayat S., Ahmad A., Fariduddin Q. 2010. Brassinosteroids: a regulator of 21st century. IN: *Brassinosteroids – Bioactivity and Crop Productivity 2010* by Hayat S and Ahmad A. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London; pp 189-230.
- Hnilička F., Hniličková H., Martinková J., Bláha L. 2007. The influence of drought and the application of 24-epibrassinolide on the formation of dry matter and yield in wheat. *Cereal Res. Comm.* 35: 457-460.
- Hnilička F., Hniličková H., Bláha L. 2008. The effect of 24-epibrassinolide on gases exchange of wheat. *Ital. J. Agron./Riv. Agron.* 3 Suppl.:451-452.
- Hnilička F., Hniličková H., Martinková J., Bláha L., Kadlec P. 2009. Impact of 24-epibrassinolide on chemical structure and energy content in wheat grain. *ISSN 1648-116X LŽUU MOKSLO DARBAI.* 83 (36) BIOMEDICINOS MOKSLAI pp: 17-22.
- Holá D., Rothová O., Kočová M., Kohout L., Kvasnica M. 2010. The effect of brassinosteroids on the morphology, development and yield of field-grown maize. *Plant Growth Regul.* 61:29-43.
- Honnerová J., Rothová O., Holá D., Kočová M., Kohout L., Kvasnica M. 2010. The Exogenous Application of Brassinosteroids to *Zea mays* (L.) Stressed by Long-Term Chilling Does Not Affect the Activities of Photosystem 1 or 2. *J Plant Growth Regul.* 29: 500-505.
- Hothorn M., Belkhadir Y., Dreux M., Dabi T., Noel J.P., Wilson I.A., Chory J. 2011. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature.* 474: 467-471.
- Ikekawa N., Nishiyama F., Fujimoto Y. 1988. Identification of 24-epibrassinolide in bee pollen of the broad bean, *Vicia faba* L. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 405-407.

- Iqbal N., Ashraf M., Ashraf M.Y. 2009. Influence of exogenous glycine betaine on gas exchange and biomass production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under water limited conditions. *J. Agron. Crop Sci.* 195: 420-426.
- Jager C.E., Symons G.M., Ross J.J., Reid J.B. 2008. Do brassinosteroids mediate the water stress response? *Physiol. Plant.* 133: 417-425.
- Janezko A. 2011. The significance of ethanol as a hormone solvent in experiments on the physiological activity of brassinosteroids. W "Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone" (Hayat S., Ahmad A. (Ed)) Springer Science (Netherlands)+Business Media B.V., chapter 13, pp.: 361-374.
- Janezko A., Biesaga-Kościelniak J., Dziurka M. 2009. 24-Epibrassinolide modifies seed composition in soybean, oilseed rape and wheat. *Seed Sci. Technol.* 37: 625-637.
- Janezko A., Oklešťková J., Pocięcha E., Kościelniak J., Mirek M. 2011 a. Physiological effects and transport of 24-epibrassinolide in heat-stressed barley. *Acta Physiol. Plant.* (33:1249-1259).
- Janezko A., Biesaga-Kościelniak J., Dziurka M., Oklešťková J., Kocurek M., Szarek-Lukaszewska G., Janezko Z. 2011 b. Response of Polish cultivars of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) to brassinosteroid application. *Acta Scient. Pol. (Agricultura)* 10: 33-50.
- Janezko A., Biesaga-Kościelniak J., Oklešťková J., Filek M., Dziurka M., Szarek-Lukaszewska G., Kościelniak J. 2010. Role of 24-epibrassinolide in wheat production: physiological effects and uptake. *J. Agron. Crop Sci.* 196: 311-321.
- Janezko A., Filek W., Biesaga-Kościelniak J., Marcińska I., Janezko Z. 2003. The influence of animal sex hormones on the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison with the effect of 24-epibrassinolide. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72: 147-151.
- Janezko A., Gullner G., Skoczowski A., Dubert F., Barna B. 2007. Effects of brassinosteroid infiltration prior to cold treatment on ion leakage and pigment contents in rape leaves. *Biol. Plant.* 51: 355-358.
- Janezko A., Kościelniak J., Pilipowicz M., Szarek-Lukaszewska G., Skoczowski A. 2005. Protection of winter rape photosystem II by 24 - epibrassinolide under cadmium stress. *Photosynthetica* 43: 293-298.
- Janezko A., Swaczynová J. 2010. Endogenous brassinosteroids in wheat treated with 24-epibrassinolide. *Biologia Plant.* 54: 477-482.
- Janezko A., Dziurka M., Ostrowska A., Biesaga-Kościelniak J., Kościelniak J. 2015. Improving vitamin content and nutritional value of legume yield through water and hormonal seed priming. *Legume Res.* 38: 185-193.
- Janezko A., Gruszka D., Pocięcha E., Dziurka M., Filek M., Jurczyk B., Kalaji H.M., Kocurek M., Waligórski P. 2016. Physiological and biochemical characterisation of watered and drought-stressed barley mutants in the HvDWARF gene encoding C6-oxidase involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 99: 126-141.
- Jørgensen K., Rasmussen A.V., Morant M., Nielsen A.H., Bjarnholt N., Zagrobelny M., Bak S., Møller B.L. 2005. Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 280-291.
- Jankiewicz L.S, Lipecki J. 2011. *Fizjologia Roślin Sadowniczych Strefy Umiarkowanej* PWN Warszawa 2011.

- Joo S.H., Jang M.S., Kim M.K., Lee J.E., Kim S.K. 2015. Biosynthetic relationship between C₂₈-brassinosteroids and C₂₉-brassinosteroids in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Phytochemistry* 111:84-90.
- Khripach N.B. 2010. New practical aspects of brassinosteroids and results of their ten-year agricultural use in Russia and Belarus. IN: *Brassinosteroids – Bioactivity and Crop Productivity 2010* by Hayat S and Ahmad A. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London; pp 189-230
- Khripach V.A., Zhabinskii V.N., De Groot A. 2000 *Annals of Botany* 86: 441-447, Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century.
- Kim S.K., Yokota T., Takahashi N. 1987. 25-Methyldolichosterone, a new brassinosteroid with a tertiary butyl group from immature seed of *Phaseolus vulgaris*. *Agric. Biol. Chem.* 51: 2303-2305.
- Kim T.W., Chang S.C., Lee J.S., Takatsuto S., Yokota T., Kim S.K. 2004. Novel biosynthetic pathway of castasterone from cholesterol in tomato. *Plant Physiol.* 135: 1231-1242.
- Kim T.W., Park S.H., Han K.S., Choo J., Lee J.S., Hwang S., Kim S.K. 2000. Occurrence of teasterone and typhasterol, and their enzymatic conversion in *Phaseolus vulgaris*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 21: 373-374.
- Kim Y.S., Joo S.H., Hwang J.Y., Park C.H., Kim S.K. 2006. Characterization of C₂₉-brassinosteroids and their biosynthetic precursors in immature seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 27: 1117-1118.
- Kim Y.S., Kim T.W., Kim S.K. 2005. Brassinosteroids are inherently biosynthesized in the primary roots of maize, *Zea mays* L. *Phytochemistry* 66: 1000-1006.
- Kolbe A., Schneider B., Porzel A., Schmidt J., Adam G. 1995. Acyl-conjugated metabolites of brassinosteroids in cell suspension cultures of *Ornithopus sativus*. *Phytochemistry* 38: 633-636.
- Kościelniak J., Biesaga-Kościelniak J., Janeczko A., Filek W., Kalaji H.M. 2009. Can the *Giberella zea* toxin zearalenone affect the photosynthetic productivity and increase yield formation in spring wheat and soybean plants? *Photosynthetica* 47: 586-594.
- Krishna P. 2003. Brassinosteroid-mediated stress responses. *J Plant Growth Regul.* 22: 289-297.
- Lehmann M., Vorbrodth H-M, Adam G., Koolman J. 1988. Anticdysteroid activity of brassinosteroids. *Experientia* 44: 355-356
- Li K.R., Wang H.H., Han G., Wang Q.J., Fan J. 2008. Effects of brassinolide on the survival, growth and drought resistance of *Robinia pseudoacacia* seedlings under water-stress. *New For.* 35: 255-266.
- Makarevitch I., Thompson A., Muehlbauer G.J., Springer N.M. 2012. Brd1 gene in maize encodes a brassinosteroid C-6 oxidase. *PLoS ONE* 7: e30798.
- Malíková J., Swaczynová J., Kolár Z., Strnad M. 2008. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* 69: 418-426.
- Mandava N.B. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 23-52.
- Mazorra L. M., Nuñez M., Napoles M. C., Yoshida S., Robaina C., Coll F., Asami T. 2004. Effects of structural analogs of brassinosteroids on the recovery of growth inhibition by a specific brassinosteroids biosynthesis inhibitor. *Plant Growth Regul.* 44: 183-185.

- 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.
- Morillon R., Catterou M., Sangwan R.S., Sangwan B.S., Lassalles J.P. 2001. Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 212: 199-204.
- Morinaka Y., Sakamoto T., Inukai Y., Agetsuma M., Kitano H., Ashikari M., Matsuoka M. 2006. Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice. *Plant Physiol.* 141: 924-931.
- Nakashita H., Yasuda M., Nitta T., Asami T., Fujioka S., Arai Y., Sekimata K., Takatsuto S., Yamaguchi I., Yoshida S. 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.* 33: 887-898.
- Nishikawa N., Toyama S., Shida A., Futatsuya F. 1994. The uptake and the transport of ¹⁴C-labeled epibrassinolide in intact seedlings of cucumber and wheat. *J. Plant Res.* 107: 125-130.
- Nithila S., Amutha R., Muthulaksmi S., Baby Rani W., Indira K., Mareeswari P. 2007. Influence of seed treatment on growth and yield of finger millet (*Eleusine coracana* L.). *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3: 252-254.
- Nomura T., Kitasaka Y., Takatsuto S., Reid J.B., Fukami M., Yokota T. 1999. Brassinosteroid/sterol synthesis and plant growth as affected by *lka* and *lkb* mutations of pea. *Plant Physiol.* 119: 1517-1526.
- Núñez M., Sosa J.L., Alfonso J.L., Coll F. 1998. Influencia de dos nuevos biorreguladores cubanos en el rendimiento de plantas de cebolla (*Allium cepa*) cv. *Red Creaole*. *Cult. Tropic.* 19: 21-24.
- Núñez M., Mazzafera P., Mazorra L.M., Siqueira W.J., Zullo M.A.T. 2003. Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. *Biol. Plant.* 47: 67-70.
- Oren I., Fleishman S.J., Kessel A., Ben-Tal N. 2004. Free diffusion of steroid hormones across biomembranes: a simplex search with implicit solvent model calculations. *Biophys. J.* 87: 768-779.
- Park K.H., Park J.D., Hyun K.H., Nakayama M., Yokota T. 1994 a. Brassinosteroids and monoglycerides with brassinosteroidlike activity in immature seeds of *Oryza sativa* and *Perilla frutescens* and in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 2241-2243.
- Park K.H., Park J.D., Hyun K.H., Nakayama M., Yokota T. 1994 b. Brassinosteroids and monoglycerides in immature seeds of *Cassia tora* as the active principles in the rice lamina inclination bioassay. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1343-1344.
- Park K.H., Yokota T., Sakurai A., Takahashi N. 1987. Occurrence of castasterone, brassinolide and methyl 4-chloroindole 3-acetate in immature *Vicia faba* seeds. *Agric. Biol. Chem.* 54: 3081-3086.
- Park S.C., Kim T.W., Kim S.K. 2000. Identification of brassinosteroids with 24R-methyl in immature seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 21: 1274-1276.
- Petzold U., Peschel S., Dahse I., Adam G. 1992. Stimulation of source-applied ¹⁴C-sucrose export in *Vicia faba* plants by brassinosteroids, GA₃ and IAA. *Acta Bot. Neerl.* 41: 469-479.
- Pociecha E., Dziurka M., Oklestkova J., Janeczko A. 2016. Brassinosteroids increase winter survival of winter rye (*Secale cereale* L.) by affecting photosynthetic capacity and

- carbohydrate metabolism during the cold acclimation process. *Plant Growth Regul.*, w druku (DOI 10.1007/s10725-016-0149-z).
- Prusiński J., Borowska M. 2002. Potencjał biologiczny roślin strączkowych i jego wykorzystanie. Cz. I. Zastosowanie regulatorów wzrostu w uprawie roślin strączkowych. *Hod. Rośl. i Nas.* 2: 2-7.
- Pullman G.S., Zhang Y., Phan B.H. 2003. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Rep.* 22: 96-104.
- Pustovoitova T.N., Zhdanova N.E., Zholkevich V.N. 2001. Epibrassinolide increases plant drought resistance. *Dokl Biochem. Biophys.* 376: 36-38.
- Ramraj V.M., Vyas B.N., Godrej N.B., Mistry K.B., Swami B.N., Singh N. 1997. Effects of 28-homobrassinolide on yields of wheat, rice, groundnut, mustard, potato and cotton. *J. Agricult. Sci.* 128: 405-413.
- 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.
- Saini S., Sharma I., Pati P.K. 2015. Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homeostasis, signaling and crosstalks. *Front. Plant Sci.* 6:950.
- Sairam R.K. 1994 a. Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties. *Plant Growth Regul.* 14: 173-181.
- Sairam R.K. 1994 b. Effect of homobrassinolide application on metabolic activity and grain yield of wheat under normal and water-stress condition. *J. Agron. Crop Sci.* 173: 11-16.
- Saisho D., Tanno K., Chono M., Honda I., Kitano H., Takeda K. 2004. Spontaneous brassinolide-insensitive barley mutants "uzu" adapted to East Asia. *Breed. Sci.* 54: 409-416.
- Sasaki H. 2002. Brassinolide promotes adventitious shoot regeneration from cauliflower hypocotyl segments. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71: 111-116.
- Sasse J.M. 1997. Recent progress in brassinosteroid research. *Physiol. Plant.* 100: 696-701.
- Sasse J.M. 2003. Physiological actions of brassinosteroids: an update. *J. Plant Growth Regul.* 22: 276-288.
- Schaefer S., Medeiro S. A., Ramirez J. A., Galagovsky L. R., Pereira-netto A. B. 2002. Brassinosteroid-driven enhancement of the in vitro multiplication rate for the marubakaido apple rootstock [*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh]. *Plant Cell Rep.* 20: 1093-1097.
- Schaller H. 2003. The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid Res.* 42: 163-175.
- Schmidt J., Spengler B., Yokota T., Adam G. 1993. The cooccurrence of 24-epicastasterone and castasterone in seeds of *Ornithopus sativus*. *Phytochemistry* 32: 1614-1615.
- Schmidt J., Spengler B., Yokota T., Nakayama M., Takatsuto S., Voigt B., Adam G. 1995. Secasterone, the first naturally occurring 2,3-epoxybrassinosteroid from *Secale cereale*. *Phytochemistry* 38: 1095-1097.
- Sembdner G., Atzorn R., Schneider G. 1994. Plant hormone conjugation. *Plant Mol. Biol.* 26: 1459-1481.

- Shahbaz M., Ashraf M., Athar H. 2008. Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induced growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.)? *Plant Growth Regul.* 55: 51-64.
- Sharma I., Ching E., Saini S., Bhardwaj R., Pati P.K. 2013. Exogenous application of brassinosteroid offers tolerance to salinity by altering stress responses in rice variety Pusa Basmati-1. *Plant Physiol. Biochem.* 69:17-26.
- Shimada K., Abe H., Takatsuto S., Nakayama M., Yokota T. 1996. Identification of castasterone and teasterone from seeds of canary grass (*Phalaris canariensis*). *Rec. Res. Dev. Chem. Pharm. Sci.* 1: 1-5, za: Bajguz A., Tretyn A. 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 62: 1027-1046.
- Skoczowski A., Janeczko A., Gullner G., Tobias I., Kornas A., Barna B. 2011. Response of brassinosteroid-treated oilseed rape cotyledons to infection with the wild type and HR-mutant of *Pseudomonas syringae* or with *P. fluorescence*. *J Therm Anal Calorim* 104:131-139.
- 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.
- Suzuki Y., Yamaguchi I., Yokota T., Takahashi N. 1986. Identification of castasterone, typhasterol and teasterone from the pollen of *Zea mays*. *Agric. Biol. Chem.* 50: 3133-3138.
- Symons G.M., Davies C., Shavrukov Y., Dry I.B., Reid J.B., Thomas M.R. 2006. Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol.* 140: 150-158.
- Symons G.M., Reid J.B. 2003. Hormone levels and response during de-etiolation in pea. *Planta* 216: 422-431.
- Symons G.M., Reid J.B. 2004. Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. *Plant Physiol.* 135: 2196-2206.
- Symons G.M., Ross J.J., Jager C.E., Reid J.B. 2008. Brassinosteroid transport. *J. Exp. Bot.* 59:17-24.
- Szatmári A., Ott P.G., Varga G.J., Besenyi E., Czelleng A., Klement Z., Bozsó Z. 2006. Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco. *Plant Cell Rep.* 25: 728-740.
- Takatsuto S. 1994. Brassinosteroids: distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 658: 3-15, za: Bajguz A., Tretyn A. 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 62: 1027-1046.
- Takatsuto S., Kosuga N., Abe B., Noguchi T., Fujioka S. Yokota T. 1999. Occurrence of potential brassinosteroid precursor steroids in seeds of wheat and foxtail millet. *J. Plant Res.* 112: 27-33.
- Takatsuto S., Yazawa N., Ikekawa N., Takematsu T., Takeuchi Y., Koguchi M. 1983. Structure-activity relationship of brassinosteroids. *Phytochemistry* 22: 2437-2441.
- Taylor P.E., Spuck K., Smith P.M., Sasse J.M., Yokota T., Griffiths P.G., Cameron D.W. 1993. Detection of brassinosteroids in pollen of *Lolium perenne* L. by immunocytochemistry. *Planta* 189: 91-100.

- Terry E, Núñez M, Pino M, Medina N. 2001. Efectividad de la combinación biofertilizantes analogo de brasinosteroides en la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Cult. Tropic. 22: 59-65.
- Upreti K.K., Murti G.S.R. 2004. Effects of brassinosteroids on growth, nodulation, phytohormone content and nitrogenase activity in French bean under water stress. Biol. Plant. 48: 407-411.
- Vardhini A.V., Rao S.S.R. 2003. Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. Plant Growth Regul. 41: 25-31.
- Vardhini B.V., Rao S.S.R. 1998. Effect of brassinosteroids on growth, metabolite content and yield of *Arachis hypogaea*. Phytochemistry 48: 927-930.
- Vardhini B.V., Rao S.S.R. 1999. Effect of brassinosteroids on nodulation and nitrogenase activity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Growth Regul. 28: 165-167.
- Vardhini B.V., Rao S.S.R. 2002. Acceleration of ripening of tomato pericarp discs by brassinosteroids. Phytochemistry 61: 843-847.
- Vriet C., Russinova E., Reuzeau C. 2012. The Plant Cell 24: 842-857 Boosting crop yields with plant steroids.
- Vriet C., Russinova E., Reuzeau C. 2013. From squalene to brassinolide: the steroid metabolic and signaling pathways across the plant kingdom. Mol. Plant 6: 1738-1757.
- Wachsman M.B., López E.M., Ramirez J.A., Galagovsky L.R., Coto C.E. 2000. Antiviral effect of brassinosteroids against herpes virus and arenaviruses. Antivir. Chem. Chemother. 11: 71-77.
- 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 H., Feng T., Peng X., Yan M., Zhou P., Tang X. 2009. Ameliorative effects of brassinosteroid on excess manganese-induced oxidative stress in *Zea mays* L. leaves. Agric. Sci. China 8: 1063-1074.
- Winter J., Schneider B., Meyenburg S., Starck D., Adam G. 1999. Monitoring brassinosteroid biosynthetic enzymes by fluorescent tagging and HPLC analysis of their substrates and products. Phytochemistry 51: 237-242.
- Wu C., Trieu A., Radhakrishnan P., Kwok S.F., Harris S., Zhang K., Wang J., Wan J., Zhai H., Takatsuto S., Matsumoto S., Fujioka S., Feldmann K.A., Pennell R.I. 2008. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. Plant Cell 20: 2130-2145.
- Zhabinskii V.N., Khripach N.B., Khripach V.A. 2015. Steroid plant hormones: effects outside plant kingdom. Steroids 97:87-97.
- Xia X.J., Zhang Y., Wu J.X., Wang J.T., Zhou Y.H., Shi K., Yu Y.L., Yu J.Q. 2009 a. Brassinosteroids promote metabolism of pesticides in cucumber. J. Agric. Food Chem. 57: 8406-8413.
- Xia X.J., Wang Y.J., Zhou Y.H., Tao Y., Mao W.H., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J.Q. 2009 b. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. Plant Physiol. 150: 801-814.
- Xia X-J., Zhou Y-H., Shi K., Zhou J., Foyer C.H., Yu J-Q. 2015. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. J. Exp. Bot. 66: 2839-2856.

- Xu H.I., Shida A., Futatsuya F., Kumura A. 1994 a. Effects of epibrassinolide and abscisic acid on sorghum plants growing under soil water deficit. I. Effects on growth and survival. *Jpn. J. Crop Sci.* 63: 671-675.
- Xu H.I., Shida A., Futatsuya F., Kumura A. 1994 b. Effect of epibrassinolide and abscisic acid on sorghum plants growing under soil water deficit. II. Physiological basis for drought resistance induced by exogenous epibrassinolide and abscisic acid. *Jpn. J. Crop. Sci.* 63: 676-681.
- Xu R.J., He Y.J., Wang Y.Q., Zhao Y.J. 1994. Preliminary study of brassinosterone binding sites from mung bean epicotyls. *Acta Phytophysiol. Sin.* 20: 298-302.
- Yan J., Guan L., Sun Y., Zhu Y., Liu L., Lu R., Jiang M., Tan M., Zhang A. 2015. Calcium and ZmCCaMK are involved in brassinosteroid-induced antioxidant defense in maize leaves. *Plant Cell Physiol.* 56: 883-896.
- Yang X.H., Xu Z.H., Xue H.W. 2005. Arabidopsis membrane steroid binding protein 1 is involved in inhibition of cell elongation. *Plant Cell* 17: 116-131.
- Yokota T., Baba J., Koba S., Takahashi N. 1984. Purification and separation of eight steroidal plant-growth regulators from *Dolichos lablab* seed. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2529-2534.
- Yokota T., Higuchi K., Kosaka Y., Takahashi N. 1992. Transport and metabolism of brassinosteroids in rice. W: "Progress in plant growth regulation."; Karszen C.M., van Loon L.C., Vreugdenhil D. (edytoryz); Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp: 298-305.
- Yokota T., Koba S., Kim S.K., Takatsuto S., Ikekawa N., Sakakibara M., Okada K., Mori K., Takahashi N. 1987. Diverse structural variations of the brassinosteroids in *Phaseolus vulgaris* seed. *Agric. Biol. Chem.* 51: 1625-1631.
- Yokota T., Matsuoka T., Koarai T., Nakayama M. 1996. 2-Deoxybrassinolide, a brassinosteroid from *Pisum sativum* seed. *Phytochemistry* 42: 509-511.
- Yokota T., Morita M., Takahashi N. 1983 a. 6-Deoxocastasterone and 6-deoxodolichosterone: putative precursors for brassinolide related steroids from *Phaseolus vulgaris*. *Agric. Biol. Chem.* 47: 2149-2151.
- Yokota T., Nakayama M., Wakisaka T., Schmidt J., Adam G. 1994. 3-Dehydroteasterone, a 3,6-diketobrasinosteroid as a possible biosynthetic intermediate of brassinolide from wheat grain. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1183-1185.
- Yokota T., Baba J., Takahashi N. 1983 b. Brassinolide-related bioactive sterols in *Dolichos lablab*: brassinolide, castasterone and a new analog, homodolicholide. *Agric. Biol. Chem.* 47: 1409-1411.
- Zang X., Mei X.G., Zhang C.H., Lu C.T., Ke T. 2001. Improved paclitaxel accumulation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* by brassinolide. *Biotechnol. Lett.* 23: 1047-1049.
- Zhao Y.J., Chen J. 2010. Studies on physiological action and application of 24-epibrassinolide in agriculture. 2010. In: : Brassinosteroids – Bioactivity and Crop Productivity 2010 by Hayat S and Ahmad A. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston/London; pp 159-170.
- Zhang C., Bai M., Chong K. 2014. Brassinosteroid-mediated regulation of agronomic traits in rice. *Plant Cell Rep.* 33:683-696

- Zhang A., Zhang J., Ye N., Cao J., Tan M., Zhang J., Jiang M. 2010. ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H₂O₂ in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize. *J. Exp. Bot.* 61: 4399-4411.
- Zhang A., Zhang J., Zhang J., Ye N., Zhang H., Tan M., Jiang M. 2011. Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced ABA biosynthesis involved in oxidative stress tolerance in maize leaves. *Plant Cell Physiol.* 52:181-92.
- Zhang L-M., Liu X-G., Qu X-N., Yu Y., Han S-P., Dou Y., Xu Y-Y., Jing H-C., Hao D-Y. 2013. Early transcriptomic adaptation to Na₂CO₃ stress altered the expression of a quarter of the total genes in the maize genome and exhibited shared and distinctive profiles with NaCl and high pH stresses. *J. Int. Plant Biol.* 55: 1147-1165.
- Zhu Y., Zuo M., Liang Y., Jiang M., Zhang J., Scheller H.V., Tan M., Zhang A. 2013. MAP65-1a positively regulates H₂O₂ amplification and enhances brassinosteroid-induced antioxidant defence in maize. *J. Exp. Bot.* 64: 3787-3802.
- Zullo M.A.T., Adam G. 2002. Brassinosteroid phytohormones - structure, bioactivity and applications. *Braz. J. Plant Physiol.* 14: 143-181.
- Zullo M.A.T., Kohout L. 2004. Semisystematic nomenclature of brassinosteroids. *Plant Growth Regul.* 42: 15-28.
- Zullo M.A.T., Kohout L., DE Azevedo M. B. M. 2003. Some notes on the terminology of brassinosteroids. *Plant Growth Regul.* 39: 1-11.

Cytowanie monografii:

- w literaturze polskojęzycznej:

Janeczko A. (2016) *Występowanie, transport i wybrane aspekty aktywności fizjologicznej brasinosteroidów w roślinach uprawnych z rodzin Poaceae i Fabaceae. Monografia nr 17 Instytutu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie, 1-75 stron.*

- w literaturze anglojęzycznej:

Janeczko A. (2016) *Presence, transport and physiological activity of brassinosteroids in crop plants from Poaceae and Fabaceae family. 17 Monograph published by Institute of Plant Physiology Polish Academy of Sciences in Krakow; pp 1-75.*