Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

# Vliv brassinosteroidů na fotosyntetické, morfologické a výnosové parametry různých genotypů kukuřice (*Zea mays* L.)

Jana Bartáková

Praha, 2006

Tato práce byla vypracována na Katedře genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze pod vedením Dr. Olgy Rothové.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

Poděkování

Dr. Olze Rothové, Dr. Daně Holé a Dr. Marii Kočové děkuji za jejich odborné rady, laskavý přístup a neocenitelnou pomoc nejen při vlastních pokusech, ale také při tvorbě této práce.
Monice Benešové děkuji za pomoc při laboratorních pokusech, cenné rady při vypracovávání této práce a za podporu v průběhu celého studia.
Kolektivu pracovníků Genetické zahrady děkuji za péči o pokusný materiál.
Své rodině děkuji za podporu a zázemí.
Lukáši Honnerovi děkuji za pomoc při počítačovém zpracování této práce a trpělivost.

Výzkum byl podporován grantovým projektem č. GAAV B601110611 Grantové agentury Akademie věd.

# The effect of brassinosteroids on photosyntetic, morphological and yield parameters of different genotypes of maize (*Zea mays* L.)

Brassinosteroids are steroid compounds naturally occurring in various plant species. They promote plant growth and yield, and they have also antistress activities. They can be used for agricultural purposes without any negative effect on nature or humans. The main aim of this work was to investigate the effect of two types of brassinosteroids (24-epibrassinolide and a synthetic androstane analogue of castasterone), used in water solutions of four different molar concentrations ($10^{-8}$, $10^{-10}$, $10^{-12}$ and $10^{-14}$ M), on selected photosynthetic and morphological parameters of two maize inbred lines (CE704 and 2023) and their F1 hybrid subjected to chilling. The application of brassinosteroids enhaced photosyntetic characteristics in chilling-stressed plants of CE704 genotype, especially at higher concentrations ($10^{-8}$ M), whereas under optimal growth conditions the enhancement of photosynthesis was observed for 2023 genotype and F1 hybrid after the application of low concentrations ($10^{-14}$ M) of brassinosteroid solution. Brassinosteroids also enhanced the growth of internodes in plants of CE704 genotype during the chilling stress, regardless of the concentration used. This enhancement was pronounced especially during early stages of plant development. There was no significant difference between both brassinosteroids used. The effect of brassinosteroids on selected germination and yield parameters of the same maize genotypes was also studied. Application of brassinosteroids improved the growth of the secondary roots in the germinating caryopses. Several yield parameters were also clearly enhanced by brassinosteroids, mainly in plants of 2023 genotype sprayed with $10^{-12}$ M and $10^{-10}$ M solutions. It can be concluded that the effect of brassinosteroids on maize plants is dependent not only on applied concentration and environmental conditions, but also on the genotype used.

**Keywords**: Brassinosteroids, chilling stress, maize (*Zea mays* L.), genotype, photosynthesis, growth, yield.

**Klíčová slova**: Brassinosteroidy, chladový stres, kukuřice (*Zea mays* L.), genotyp, fotosyntéza, růst, výnos.

# Obsah

1. Úvod ..... 7
2. Přehled literatury ..... 9
2.1. Přirozený výskyt brassinosteroidů ..... 9
2.2. Testovací systémy (biotesty) ..... 10
2.3. Brassinosteoidy a ostatní fytohormony ..... 11
2.4. Syntéza a degradace brassinosteroidů v rostlinách ..... 14
2.4.1. Mutanti ..... 14
2.4.2. Biosyntéza základních sterolů ..... 15
2.4.3. Biosyntéza brassinolidu z campesterolu ..... 16
2.4.4. Regulace ..... 19
2.4.5. Inhibitory biosyntézy ..... 20
2.4.6. Degradace brassinosteroidů v rostlinách ..... 21
2.5. Přenos brassinosteroidového signálu ..... 22
2.6. Závislost struktury a aktivity brassinosteroidů ..... 24
2.7. Vliv brassinosteroidů na rostliny ..... 26
2.7.1. Vliv brassinosteroidů na růst rostlin a diferenciaci pletiv ..... 26
2.7.2. Vliv brassinosteroidů na kořeny ..... 28
2.7.3. Vliv brassinosteroidů na květy a semena ..... 29
2.7.4. Vliv brassinosteroidů na výnos ..... 30
2.7.5. Vliv brassinosteroidů na stárnutí ..... 30
2.7.6. Vliv brassinosteroidů na ostatní procesy v rostlinách ..... 31
2.7.7. Protistresové účinky ..... 33
2.7.7.1. Nízká teplota ..... 33
2.7.7.2. Vysoká teplota ..... 36
2.7.7.3. Sucho a zamokření substrátu ..... 38
2.7.7.4. Patogeny ..... 39
2.7.7.5. Stres zasolením a přítomností těžkých kovů v substrátu ..... 40
3. Materiál a metodika ..... 42
3.1. Materiál ..... 42

3.2. Měření fotosyntetických a morfologických parametrů ..... 44
3.2.1. Pěstování rostlin ..... 44
3.2.2. Měření morfologických charakteristik ..... 44
3.2.3. Odběr a zpracování vzorků ..... 45
3.2.4. Příprava vzorků ..... 46
3.2.5. Metody stanovení aktivity primárních fotosyntetických procesů ..... 47
3.2.5.1. Aktivita Hillovy reakce ..... 47
3.2.5.2. Aktivita PS I ..... 48
3.2.6. Relativní obsah vody v listech ..... 49
3.3. Měření morfologických parametrů klíčících rostlin ..... 49
3.4. Měření výnosových parametrů ..... 49
3.5. Statistická analýza výsledků ..... 50
4. Výsledky ..... 51
4.1. Fotosyntetické pigmenty ..... 51
4.1.1. Chlorofyl a ..... 51
4.1.2. Chlorofyl *b* ..... 57
4.1.3. Celkový obsah chlorofylů ..... 63
4.1.4. Celkový obsah karotenoidů ..... 69
4.1.5. Poměry jednotlivých pigmentů ..... 76
4.2. Aktivita fotosystému I ..... 82
4.3. Aktivita Hillovy reakce ..... 91
4.4. Relativní obsah vody v listu a specifická hmotnost listu ..... 100
4.5. Morfologické parametry rostlin ..... 106
4.5.1. Součty internodií ..... 106
4.5.2. Délka plně vyvinutých listů ..... 111
4.6. Morfologické parametry klíčících rostlin ..... 115
4.7. Výnosové charakteristiky ..... 117
5. Diskuze ..... 122
6. Souhrn ..... 130
7. Přehled citované literatury ..... 132

# 1. Úvod

Kukuřice (*Zea mays* L.) pochází z tropického klimatického pásma a v našem podnebném pásmu může být její růst a vývoj výrazně negativně ovlivněn působením nízkých teplot a dalších stresových faktorů, jako je sucho, nízká a vysoká teplota, patogeny a další, a to zvláště v časných stádiích ontogeneze. V našich podmínkách je jedním z nejčastějších stresorů právě nízká teplota, navíc rostliny nemohou před stresem uniknout a proto musí vyvíjet různé mechanizmy, kterými zvyšují svou odolnost k chladu. Velmi citlivé k chladu jsou chloroplasty, organely v nichž probíhají fotosyntetické procesy. Poškození jednotlivých složek chloroplastového fotosyntetického aparátu, k němuž může v důsledku nízkých teplot dojít (poškození thylakoidních membrán, membránových komplexů a enzymů, nadměrná produkce aktivních forem kyslíku, poškození enzymů Calvinova nebo Hatch-Slackova cyklu, fotoinhibice atd.) ovlivňuje celkovou účinnost fotosyntézy a následně i dalších metabolických procesů.

Brassinosteroidy byly objeveny teprve nedávno a i přes krátkou dobu studia bylo prokázáno, že zvyšují odolnost rostlin k různým typům stresu, zvyšují výnos a kvalitu plodů, stimulují růst buněk a mají v rostlinném organizmu mnoho dalších funkcí. Navíc jsou to přirozeně se vyskytující látky, a pokud jsou aplikovány exogenně na rostliny, je u nich vyloučen jakýkoli negativní dopad na přírodu a člověka. Stále však zůstává nevyjasněno mnoho funkcí brassinosteroidů, například co se týče vlivu brassinosteroidů na růst kořenů. Obecně ze studií však vyplývá, že při velmi nízkých koncentracích brassinosteroidy růst kořenů stimulují a při vyšších koncentracích jejich růst inhibují. Celkový účinek brassinosteroidů však závisí na typu brassinosteroidu, jeho koncentraci, fyziologické kondici a stáří rostliny a zřejmě na mnoha dalších faktorech. Přestože v některých zemích se brassinosteroidy již využívají ke zvýšení výnosu v zemědělské praxi, bude třeba podniknout ještě mnoho výzkumů než bude plně objasněna jejich role v rostlinách.

## Ve své diplomové práci jsem měla stanoveny následující cíle:

**1.** Sledovat vybrané fotosyntetické a morfologické parametry rostlin po aplikaci brassinosteroidů (obsahy pigmentů, aktivita fotosystému I a aktivita Hillovy reakce, relativní obsah vody v listech, specifická hmotnost listu, délka listů a délka internodií)

V rámci tohoto pokusu také:

a)Porovnat reakce rostlin v optimálních podmínkách a rostlin stresovaných chladem

b)Porovnat působení různých koncentrací brassinosteroidů ($10^{-8}$ M, $10^{-10}$ M, $10^{-12}$ M a $10^{-14}$ M)

c)Porovnat, zda se liší vliv brassinosteroidů na dvě rodičovské inbrední linie (2023 a CE704) a jejich F1 kříženec (2023xCE704).

d) Zjistit, jak se tyto charakteristiky liší po ošetření přírodním (24-epibrassinolid) a syntetickým brassinosteroidem (androstanový derivát castasteronu)

**2.** Sledovat vliv ošetření brassinosteroidů na výnosové parametry kukuřice (délka palice, hmotnost palice, počet řad na palici, počet semen v řadě, hmotnost semen na palici, hmotnost vřetene a hmotnost tisíce semen)

V rámci tohoto pokusu také:

a)Porovnat působení různých koncentrací brassinosteroidů ($10^{-8}$ M, $10^{-10}$ M, $10^{-12}$ M a $10^{-14}$ M)

b)Porovnat, zda se liší vliv brassinosteroidů na dvě rodičovské inbrední linie (2023 a CE704) a jejich F1 kříženec (2023xCE704).

c)Zjistit, jak se tyto charakteristiky liší po ošetření přírodním (24-epibrassinolid) a syntetickým brassinosteroidem (androstanový derivát castasteronu)

**3.** Zjistit, jaký má ošetření brassinosteroidy vliv na morfologické parametry klíčících obilek (délka kořenů, délka prýtů)

V rámci tohoto pokusu také:

a)Porovnat působení různých koncentrací brassinosteroidů ($10^{-8}$ M, $10^{-10}$ M, $10^{-12}$ M a $10^{-14}$ M)

b)Porovnat, zda se liší vliv brassinosteroidů na dvě rodičovské inbrední linie (2023 a CE704) a jejich F1 kříženec (2023xCE704).

c)Zjistit, jak se tyto charakteristiky liší po ošetření přírodním (24-epibrassinolid) a syntetickým brassinosteroidem (androstanový derivát castasteronu)

Pokusy jsem provedla v letech 2003-2005 v laboratorních a polních podmínkách.

# 2. Přehled literatury

Objevení brassinosteroidů v rostlinách předcházelo zjištění, že pylové extrakty stimulují růst rostlin. **Mitchel et al., (1970)** sebrali pyl z asi 60ti druhů rostlin a přibližně polovina těchto pylových extraktů podporovala růst fazolových semen. Látka, zlepšující růst, obsažená v pylu byla nazvána brassin. Později se ukázalo, že aktivní látky je v brassinu pouze nepatrné množství. Tato aktivní složka byla izolována vědci z Northern Regional Research Center – Peoria v roce 1979 v množství 4mg ze 40kg pylu řepky (*Brassica napus*) a byla pojmenována brassinolid, podle zdroje pylu. Současně byla krystalografickou analýzou stanovena její struktura (**Yokota, 1999**).

V roce 1982 byl izolován jako druhý ze skupiny brassinosteroidů castasteron z hmyzích hálek kaštanovníku (*Castanea crenata*). Následoval objev dolicholidu a mnoha dalších. Do roku 2000 bylo objeveno 56 přirozených brassinosteroidů a další stále ještě přibývají (**Bajguz & Tretyn, 2003**). Navíc se v dnešní době chemicky připravuje mnoho strukturních analogů brassinolidu. Od doby objevení brassinosteroidů se mnoho vědců zabývá jejich výzkumem, studují jejich chemickou strukturu, syntézu a biologickou aktivitu, molekulární mechanizmy účinku, vliv na rostliny, výskyt v rostlinách, transport a metabolizmus v rostlinách a v neposlední řadě také praktické využití brassinosteroidů v zemědělství (přičemž v některých zemích už byly brassinosteroidy schváleny k polnímu použití, v Číně byl 28-homobrassinolid registrován jako růstový regulátor pro tabák, cukrovou třtinu, čajovník, ovocné stromy a řepku, v Rusku byl 24-epibrassinolid registrován jako růstový regulátor brambor, rajčat, okurek, pepře a ječmene, a i v dalších zemích jsou brassinosteroidy využívány v zemědělství) (**Khripach et al., 1997**).

## 2.1. Přirozený výskyt brassinosteroidů

Brassinosteroidy byly nalezeny ve všech druzích rostlin, u kterých byl proveden podrobnější výzkum (jednoděložných i dvouděložných), a jsou obsaženy ve všech

rostlinných orgánech. Výskyt brassinosteroidů v kořenech byl potvrzen teprve nedávno (0,3 ng/g čerstvé váhy castasteronu) (**Kim et al., 2000a**).

Brassinosteroidy jsou v rostlinách přítomny v extrémně nízkých koncentracích. Vnitrobuněčný obsah brassinosteroidů kolísá v závislosti na typu orgánu, stáří tkáně a druhu rostliny. Mladé tkáně jich obsahují větší množství než zralé tkáně, pyl a semena jsou nejbohatšími zdroji (obsahují nejčastěji 1-100 ng /g čerstvé váhy, zatímco listy a výhonky mají obvykle nižší množství, a to 0,01-0,1 ng /g čerstvé váhy). Dosud nejvyšší koncentrace byla zaznamenaná v pylu cypřiše (*Cupressus arizonica*), a to 6,4 μg 6-deoxotyphasterolu/g čerstvé váhy. Dalším zajímavým místem výskytu jsou hmyzí hálky kaštanovníku nebo hálky v květech u *Distylium racemosum* a barvínku (*Catharanthus roseus*). Tyto hálky obsahují také vyšší koncentrace brassinosteroidů (**Bajguz & Tretyn, 2003**).

Přítomnost brassinosteroidů v nižších rostlinách byla dokázána u zelené řasy (*Hydrodictyon reticulatum*), játrovky (*Marchantia polymorfa*) a přesličky (*Equisetum arvense*). Někdy je množství brassinosteroidů tak malé, že ho nelze určit, postačí tedy když jsou nalezeny enzymy biosyntetické dráhy, která je v nižších rostlinách pravděpodobně stejná jako ve vyšších rostlinách. Mezi brassinosteroidy je u rostlin nejvíce rozšířen castasteron, následován brassinolidem a typhasterolem. Přítomnost různých brassinosteroidů v kukuřici (*Zea mays* L.) byla zkoumána u obilek typu koňského zubu a u cukrové kukuřice. Koňský zub obsahoval 120 ng/g čerstvé váhy castasteronu, 6,6 ng/g čerstvé váhy typhasterolu a 4,1 ng/g čerstvé váhy teasteronu. Obilky cukrové kukuřice obsahovaly 27,2 ng/g čerstvé váhy castasteronu, 18,3 ng/g čerstvé váhy 28-norcastasteronu a 16,9 ng/g čerstvé váhy dolichosteronu (**Bajguz & Tretyn, 2003, Kim et al., 2002**).

## 2.2. Testovací systémy (biotesty)

Počáteční studie brassinosteroidů byly zaměřeny na jejich schopnost stimulovat růst. Byly navrženy specifické testovací systémy citlivé k brassinosteroidům. Hlavními jsou test na druhém fazolovém internodiu (second bean internode test) a test odchylky listu rýže (rice lamina inclination test).

Test na druhém fazolovém internodiu byl vyvinut při první izolaci brassinolidu z pylu řepky. **Yopp et al., (1979)** zjistili, že účinky brassinolidu jsou odlišné od účinků jiných hormonů při testech využívajících stáčení a prodlužovací růst hypokotylů fazolu v testu druhého fazolového internodia. Uřízlá druhá internodia ze sazenic fazolu (*Phaseolus vulgaris*), které byly ošetřeny brassinolidem v lanolinové pastě, se prodlužovala, zakřivovala, bobtnala nebo se rozdělovala. Síla těchto jevů závisela na množství brassinolidu. Při nižších koncentracích brassinolid vyvolal prodlužovací růst, zakřivování a bobtnání internodií a při vyšších koncentracích vyvolával rozdělování internodií (**Yokota, 1999**). Při tomto testu jsou pouze brassinosteroidy schopné vyvolat rozdělení internodia, ostatní rostlinné hormony ho nevyvolají. Některé další zkoušky citlivosti k brassinosteroidům také využívají růstu internodií (**Kohout et al., 1991**).

Test odchylky listu rýže byl původně vyvinut při testování auxinu. Je při něm zjišťováno odklonění čepele listu rýže. Ta se odklání proto, že buňky na adaxiální straně jazýčku listu se selektivně prodlužují jako odpověď na auxin, zatímco ty na abaxiální straně jsou k auxinu méně citlivé. Použitím této metody testování byl zkoumán rozdíl biologické aktivity brassinolidu a auxinu. Úhel odchýlení vyvolaný $5{,}7 \times 10^{-5}$ M auxinem byl shodný s úhlem vyvolaným $2 \times 10^{-9}$ M brassinolidem, což dokazuje, že brassinolid je v tomto testu aktivní v koncentracích 1000krát menších než auxin (**Fujii & Saka, 2001**).

Další vysoce citlivé testy jsou založeny např. na inhibici růstu etiolovaných sazenic hrachu (*Pisum sativum*) (**Kohout et al., 1991**).

## 2.3. Brassinosteoidy a ostatní fytohormony

Dříve byly brassinosteroidy považovány pouze za růstové regulátory spolu s polyaminy, kyselinou jasmonovou, oligosacharidy nebo fenolickými látkami, ale díky objevení brassinosteroidových mutantů huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) a hrachu v roce 1996 a 1997 byly na konferenci v Japonsku v roce 1998 zařazeny mezi fytohormony, vedle již uznávaných pěti skupin hormonů (auxiny, gibereliny, cytokininy, kyselina abscisová a etylen). Mechanizmus jejich působení se od účinku ostatních

fytohormonů liší a není na nich závislý (**Rao et al., 2002**). Interakce mezi hormony je však základem pro koordinaci rostlinného vývoje.

Mnoho vývojových procesů, které jsou ovlivněny brassinosteroidy, je zároveň řízeno i dalším hormonem - auxinem (prodlužování stonku a kořenů, klíčení semen, apikální dominance aj.). Brassinosteroidové a auxinové signální dráhy se sbíhají na úrovni transkripčních regulací cílových genů. Oba hormony mají ale jinou kinetiku působení. U soji (*Glycine max*) např. brassinolid stimuloval prodlužování epikotylu 45 min po aplikaci a tato stimulace dosáhla vrcholu po několika hodinách. Odpověď rostlin na auxin byla naopak relativně rychlá, začala po 10-15 min a gradovala po 30-45min. Podobná kinetika byla také nalezena na úrovni genové regulace u huseníčku. Mutant *axr1-3* (necitlivý k auxinu) byl necitlivý také k působení brassinolidu při prodlužování výhonku. Naopak brassinosteroidoví insenzitivní (*bri1*) a deficitní (*sax1*) mutanti vykazovali zvýšenou inhibici růstu kořenů při reakci na auxin. To naznačuje, že způsob účinku obou hormonů může být odlišný v různých tkáních a možná i mezi rostlinnými druhy. Jiné studie dokázaly, že některé geny, které jsou regulovány auxiny, jsou cílem také pro působení brassinosteroidů. Mnoho genů je regulováno oběma hormony, např. geny rodin *AUX/IAA*, *SAUR* a *GH3*. Spolupůsobení obou hormonů potvrzuje také to, že brassinosteroidy regulují *PIN* geny, které jsou esenciální pro polární transport auxinu, a auxin reguluje expresi genů *BRI*, *BRL2* a *BRL3*, které se účastní signální dráhy brassinosteroidů (**Halliday, 2004**).

Brassinosteroidy jsou závislé na změnách poměru auxinu/cytokininu v rostlinných tkáních. Vzrůst obsahu auxinu v rostlinných buňkách po exogenní aplikaci brassinosteroidů a biosyntetické expresi genů byl následován významným poklesem koncentrace cytokininu nebo zvýšením degradace cytokininu v transformovaných rostlinách tabáku (**Ono et al., 2000**).

Většina prací popisuje stimulaci syntézy etylenu po aplikaci brassinosteroidů, např. u etiolovaných rostlin vigny (*Vigna radiata*). Bylo popsáno i snížení hladiny kyseliny abscisové po aplikaci 24-epibrassinolidu v etiolovaných hypokotylech tykve (**http://chemicke-listy.vscht.cz**). Vliv aplikace exogenních brassinosteroidů na endogenní hladiny kyseliny abscisové je velmi různorodý, na jedné straně po aplikaci

24-epibrassinolidu dochází ke zvýšení hladiny kyseliny abscisové v rostlinách bavlníku (*Gossypium hirsutum*) a v hypokotylech okurky (*Cucumis sativus*), na druhé straně bylo popsáno snížení hladiny kyseliny abscisové po aplikaci 24-epibrassinolidu v etiolovaných hypokotylech tykve (*Cucurbita pepo*). (**Ono et al., 2000**).

Dormance semen a jejich klíčení jsou regulovány kyselinou abscisovou a gibereliny. Tyto dva hormony spolu účinkují antagonisticky. Kyselina abscisová indukuje dormanci semen a inhibuje jejich klíčení. Gibereliny tuto dormanci přerušují. V práci **Stebera & Mc Courta (2001)** je dokázáno, že 24-epibrassinolid obnovil klíčení mnoha giberelinových biosyntetických mutantů (např. *ga1-3*, *ga2-1* aj.) a giberelinového insenzitivního mutanta *sly1*. Autoři také zjistili, že klíčení brassinosteroidového deficitního mutanta huseníčku *det2-1* a insenzitivního mutanta *bri1-1* je silněji inhibováno kyselinou abscisovou, než klíčení divokého typu. Brassinosteroidy stimulují klíčení a jejich signál je nejspíš potřebný při překonávání inhibice, která je vyvolaná kyselinou abscisovou. Částečná kompenzace klíčení v giberelinových mutantech pomocí 24-epibrassinolidu může být ale způsobena stimulací růstu hypokotylu, a tím i růstu embrya v klíčícím semeni. Stále tedy není zodpovězena otázka, zda mají brassinosteroidy esenciální roli při klíčení semen. Pokud ano, tak můžeme očekávat, že bude získán neklíčící fenotyp i mezi brassinosteroidovými mutanty (**Steber & Mc Court, 2001**). Společná aplikace giberelinu a brassinolidu na rostliny begónie (*Tabebuia alba*) snížila koncentraci kyseliny abscisové v postranních pupenech, což vedlo k jejich vývoji. Ošetření begónie giberelinem a následně brassinolidem působilo výrazně pozitivně na růst stonku sazenic, ale ošetření samotným brassinolidem velký vliv nemělo. Aplikace brassinolidu samotného nebo v kombinaci s giberelinem způsobila nárůst tloušťky listové čepele. Giberelin a brassinosteroidy působí na stejné růstové a vývojové procesy, a to zřejmě aditivně (**Ono et al., 2000**). Brassinosteroidy a gibereliny působily aditivně také na růst epikotylů fazolu. Jejich růstově regulační vliv byl pozorován také na odříznutých segmentech hypokotylu okurky, obě látky aditivně podpořily růst (**Müssig, 2005**). Aplikace 24-epibrassinolidu obnovila citlivost huseníčkových hypokotylových buněk ke giberelinu. Nedávné zprávy o deficitních mutantech *dwf4* a *sax1* podaly důkaz, že plně aktivní brassinosteroidová biosyntetická

dráha je potřebná pro plnohodnotnou giberelinovou odpověď (**Werbrouck et al., 2003**).

## 2.4. Syntéza a degradace brassinosteroidů v rostlinách

Biosyntetická dráha brassinolidu byla poprvé objasněna za použití kultury buněk barvínku (*Catharanthus roseus*), u kterého byl dokázán přirozený výskyt intermediátů biosyntetické dráhy a většina kroků byla také určena za pomoci značenných substrátů a identifikací metabolitů. Biosyntetická dráha syntézy brassinolidu může být rozdělena na syntézu základních sterolů (cycloartenol a campesterol), a specifickou dráhu vedoucí od campesterolu k brassinolidu. Rostlinné steroly jako např. campesterol jsou integrální složkou membrán, slouží jako regulátory tekutosti a propustnosti membrán a přímo ovlivňují aktivitu membránových proteinů, včetně enzymů a složek signálních drah. Mutace v genech, kódujících enzymy biosyntetické dráhy sterolů, mohou také výrazně ovlivnit vývoj rostliny (**Clouse, 2002**).

### 2.4.1. Mutanti

Mutanty můžeme rozdělit na mutanty s nedostatkem brassinosteroidů, u kterých je ovlivněn nějaký gen účastnící se biosyntézy brassinosteroidů (deficitní, např. *det2*, *cpd*, *dwf1*, *bas1*, *sax1* atd.), a mutanty necitlivé k působení brassinosteroidů, u kterých je ovlivněna signální dráha (insenzitivní, např. *bri1*, *bin2*, *bes1*, *bzr1* a *bak1*). Většina jich byla objevena u huseníčku, hrachu a rajčete (**Nomura et al., 1997, 1999, Bishop et al., 1999, Clouse & Feldmann, 1999, Koka et al., 2000**).

*Det2* (*deetiolated*), který byl prvním objeveným deficientním mutantem, byl získán jako defektní v regulaci růstu na světle a ve tmě. Rostliny rostoucí ve tmě měly fenotyp rostlin rostoucích na světle a exprimovaly geny regulovatelné světlem. Následně byla zvýšená exprese těchto genů potvrzená i v sazenicích *cpd* (*constitutive photomophogenesis and dwarfism*) mutanta rostoucího ve tmě. *Det2* a *dwf4* (*dwarf4*) mutanti mají defekt v diferenciaci chloroplastů z etioplastů. (**Nagata et al., 2000**).

Necitlivý *bri1* mutant (*brassinosteroid-insensitive*) patří mezi mutanty s nejvíce defekty (**Clouse et al., 1996**).

Brassinosteroidové deficitní a insenzitivní mutanti mají mnoho vývojových defektů, mají sníženou klíčivost semen, jsou zakrslí, mají tmavě zelené zakřivené listy, sníženou fertilitu, zpožděný reproduktivní vývoj a ve tmě rostou jako by rostly na světle (de-etiolovaní) (**Bishop & Koncz, 2002, Wang & He, 2004**). Tyto defekty mohou být kompenzovány přidáním brassinolidu pouze u deficitních mutantů (**Asami & Yoshida, 1999**).

### 2.4.2. Biosyntéza základních sterolů

Základní steroly pro biosyntézu brassinosteroidů jsou syntetizovány in vivo z cykloartenolu a ten vzniká ze squalenu. Cykloartenol je první cyklický prekurzor, který se pak mění na campesterol.

Mutanti huseníčku, jejichž biosyntetická dráha je přerušena v časné fázi syntézy sterolů, mají některé charakteristiky deficitních mutantů v dospělosti, ale mají i specifické defekty v embryogenezi, které nebyly zjištěny u brassinosteroidových mutantů ani u mutantů v pozdějších krocích biosyntézy sterolů. Bylo zjištěno, že mutant *fackel* je alelický k mutantovi *extralong-lifespan*, a *FACKEL* gen kóduje reduktasu katalyzující přeměnu 4α-metyl-5α-ergosta-8,14,24(28)-trien-3β-olu na 4α-metylfecosterol. U *fackel* mutantů jsou výrazně snížené obsahy různých brassinosteroidů, campesterolu a sitosterolu, zatímco substrát sterol C-14 reduktasy se v nich akumuluje desetinásobně (**Jang et al., 2000**).

*Smt* mutant huseníčku má mnoho fenotypových vlastností *fackel* mutanta a je u něj přerušen krok vedoucí od cykloartenolu k 24-metylen cykloartenolu. Gen *SMT* kóduje enzym schopný C-24 alkylace postranního sterolového řetězce v přítomnosti S-adenosylmethioninu. V *smt* mutantech se akumuluje cholesterol na účet sitosterolu, přestože koncentrace ostatních sterolů jsou relativně normální. Mutanti *fackel* a *smt* mají narušenou embryogenezi, embrya zůstávají v globulárním, neorganizovaném stádiu, vyvíjející se sazenice mají často více než dvě dělohy, hypokotyl je jen málo vyvinut. Koncentrace mRNA potvrdily vysokou expresi *FACKEL* a *SMT* genů během

vývoje embrya divokého typu (**Diener et al., 2000**). Přestože *fackel* mutanti mají mnoho rysů brassinosteroidových deficitních mutantů, tak nejsou kompenzováni (změněny fenotypově na divoký typ) ošetřením brassinosteroidy, ale zachovávají si k brassinosteroidům citlivost (**Jang et al., 2000**).

Další krok biosyntézy, pro který jsou dostupní mutanti, zahrnuje zavedení C-5 dvojné vazby do B-kruhu episterolu. Mutant *ste1* akumuluje Δ7 steroly na úkor příslušných Δ5 sterolů. Gen *STE* kóduje $\Delta^7$-C-5-desaturasu. Mutanti *dwf7* jsou aleličtí k *ste1* (**Clouse, 2002**). Huseníčkový *DWF7* gen katalyzuje přeměnu episterolu na 5-dehydroepisterol (**Asami & Yoshida, 1999**). *Ste1/dwf7* mutanti mají rysy deficitních mutantů (i když ne tak výrazně) a mohou být kompenzováni ošetřením brassinosteroidy (**Choe et al., 1999**).

Pro další krok biosyntetické dráhy, přeměnu 5-dehydroepisterolu na 24-metylencholesterol pomocí Δ7 sterol reduktasy, byl nalezen mutant huseníčku *dwf5*, zjištěný stejnými metodami jako *ste1/dwf7* a je také kompenzovatelný exogenní aplikací brassinosteroidů (**Choe et al., 2000**).

Na konci biosyntetické dráhy sterolů je izomerizace a redukce 24-metylencholesterolu na campesterol. S touto reakcí je spojováno více mutantů, *dwf1*, *dim* a *cbb1*, kteří jsou aleličtí pro tuto reakci. Jsou kompenzováni aplikací brasisnosteroidů. *DWF1* gen kóduje oxidoreduktasu (**Clouse 2002**), DWF protein je $Ca^{2+}$/kalmodulin vazebný protein a tato vazba je nezbytná pro jeho funkci. Stačí částečná ztráta této funkce aby způsobila zakrslý fenotyp (**Du & Poovaiah, 2005**).

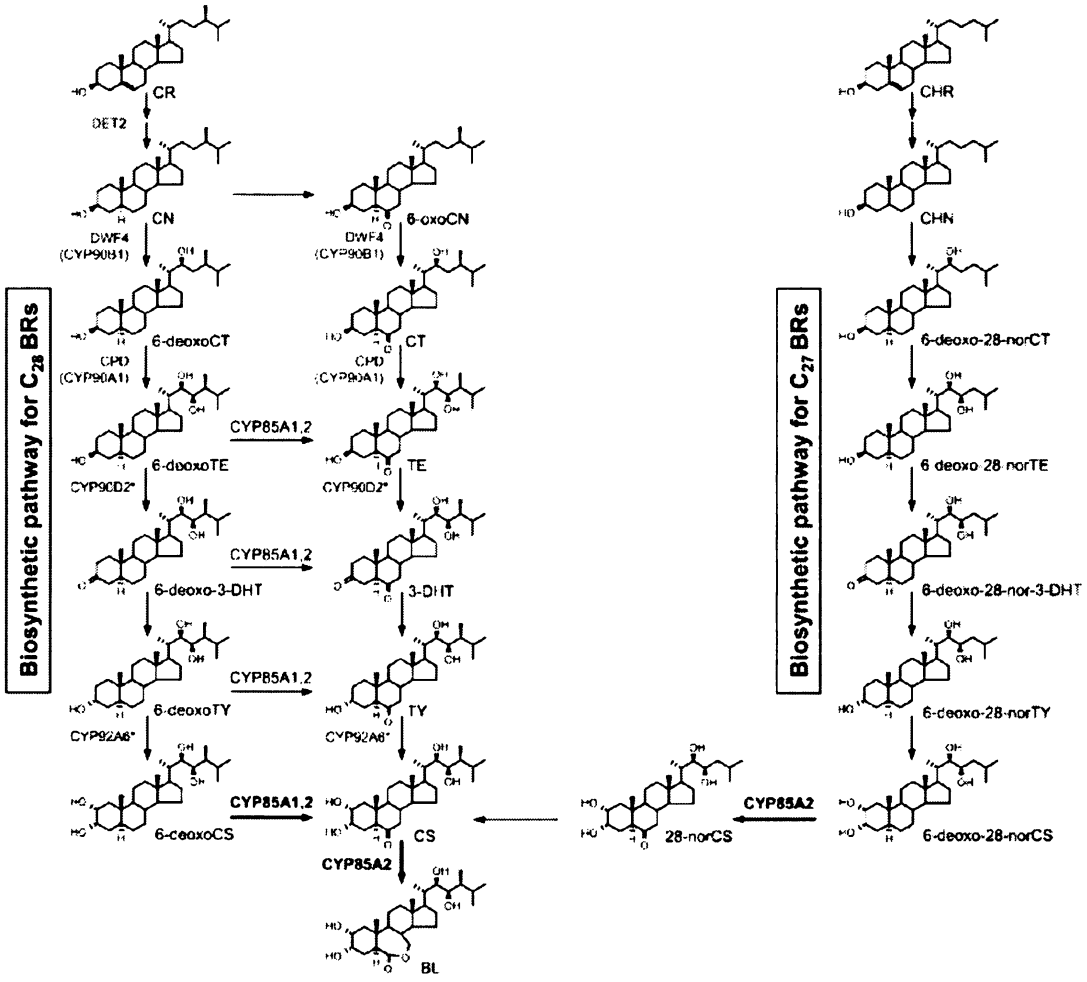
### 2.4.3. Biosyntéza brassinolidu z campesterolu

V rostlinách byly zatím objeveny 3 dráhy biosyntézy brassinolidu. Je to biosyntetická dráha $C_{27}$ brassinosteroidů a dráha syntézy $C_{28}$ brassinosteroidů, která se dělí na časnou a pozdní $C_6$ oxidační dráhu (Obr.1). Dráhy časné a pozdní $C_6$ oxidace mohou u některých rostlinných druhů fungovat všechny společně (např. u huseníčku, kde společný výskyt 6-deoxo a 6-oxo forem brassinolidových prekurzorů naznačil spolupůsobení těchto drah), jinde je některá z nich převládající. Například cathasteron nebyl detekován v rajčeti a rýži, a proto se zdá, že u těchto rostlin je

dominantní pozdní C6 oxidační dráha, zatímco v rajčeti byla zatím dokázána jen pozdní C-6 oxidační dráha (**Kim et al., 2004, 2005**). Navíc se předpokládá, že pozdní C6 oxidační dráha je hlavním zdrojem brassinolidu v sazenicích huseníčku rostoucích na světle, zatímco časná C6 oxidace může být dominantní ve tmě (**Noguchi et al., 2000**).

Přeměna membránového sterolu campesterolu na brassinolid se děje přes sérii redukcí, hydroxylací, epimerizací a oxidací, které byly důkladně studovány u mnoha rostlinných druhů (Obr.1). První 4 reakce vedou k syntéze campestanolu přes redukci dvojné vazby v campesterolu. Mutant huseníčku *det2* je mutantem pro tuto reakci. Gen *DET2* má sekvenční identitu k savčím 5α-steroid reduktasám (**Li et al., 1996**). Aplikace brassinosteroidů může kompenzovat *det2* mutanty a vnitrobuněčná koncentrace campestanolu je u nich snížena v porovnání s divokým typem (**Fujioka et al., 1997**). *Det2* má i typický fenotyp brassinosteroidového mutanta, který ovšem oproti *cpd* a *bri1* nemá tak výrazné defekty, což je zřejmě způsobeno zbytkovým campestanolem přítomným v *det2*. Ten může být vytvářen druhou reduktasou katalyzující stejnou reakci. Podobně jako v případě proteinu DWF7, i DET2 katalyzuje krok přeměny (24R)-24-metylcholest-4-en-3-onu na (24R)-24-metyl-5α-cholestan-3-on (**Noguchi et al., 1999**). Mutant *sax1* může také ovlivnit přeměnu campesterolu na campestanol. *Sax1* má fenotyp brassinosteroidových deficitních mutantů a může být částečně kompenzován ošetřením brassinosteroidy. Nemá ale typický de-etiolovaný fenotyp ve tmě. *Sax1* má blokovanou syntézu brassinolidu v kroku předcházejícím *det2* a hraje roli v nějaké postranní syntetické dráze přeměny campesterolu na 6-deoxocathasteron přes 22-hydroxylované intermediáty (**Ephritikhine et al., 1999**). Role *sax1* v biosyntéze není tedy jasná tak, jako u ostatních brassinosteroid-deficitních mutantů, kteří byli plně charakterizováni. Od campestanolu se dráha dělí na časnou a pozdní C-6 oxidační větev.

Obr.1: Biosyntéza brassinolidu (převzato z **Kim et al., 2005**). Z leva: pozdní $C_6$ oxidační dráha biosyntézy $C_{28}$ brassinosteroidů, časná $C_6$ oxidační dráha biosyntézy $C_{28}$ brassinosteroidů, biosyntéza $C_{27}$ brassinosteroidů. CR=campesterol, CN=campestanol, CT=cathasteron, TE=teasteron, DHT=dehydroteasteron, TY=typhasterol, CS=castasteron, CHR=cholesterol, CHN=cholestanol, BL=brassinolid.




Reakce přeměny campestanolu na 6-deoxocathasteron (pozdní C-6 oxidační dráha) a 6-oxocampestanolu na cathasteron (časná C-6 oxidační dráha) jsou obě katalyzované produktem *DWF4* genu, který kóduje cytochrom P450 se sekvenční homologií k savčím steroid hydroxylasám (**Choe et al., 1998**). *Dwf4* mutant může být kompenzován pouze 22α-hydroxylovanými meziprodukty biosyntézy brassinolidů a syntetickými sloučeninami, jako je 22-hydroxycampesterol. Toto dokazuje, že DWF4 funguje jako C-22 steroid hydroxylasa (**Clouse, 2002**). Nadměrná exprese *DWF4*

genu způsobí nárůst délky hypokotylu (**Müssig, 2005**). Další krok obou větví dráhy také zahrnuje postranní hydroxylaci a je katalyzován produktem *CPD* genu (alelický k *CBB3* a *DWF3*), který kóduje cytochrom P450 a je podobný proteinu DWF4. *Cpd* mutant je extrémě zakrslý a může být kompenzován pouze 23α-hydroxylovanými brassinosteroidy, což dokazuje, že CPD účinkuje jako C-23 steroid hydroxylasa (**Szekeres et al., 1996**). Tedy C-22 a C-23 pozice brassinosteroidů jsou úspěšně hydroxylovány cytochromy P450, kódovanými geny *DWF4* a *CPD*. Jejich funkce a i jejich DNA sekvence jsou podobné (**Asami et al., 2000**).

Mutanti, kteří mají blokované kroky biosyntézy za enzymem CPD a mutanti v biosyntéze $C_{27}$ brassinosteroidů nebyli zatím důkladněji identifikováni. Biosyntéza brassinolidu u huseníčku je pravděpodobně spíš síť než nezávislé lineární dráhy (**Clouse & Feldmann, 1999**).

Je zajímavé, že většina sterol a brassinosteroid-deficitních mutantů byla izolována při výběru mutantů, kteří měli defekty fyziologických procesů (zakrslost, konstitutivní fotomorfogeneze ve tmě) nebo defekty embryogeneze. Teprve po klonování jejich genů se ukázalo, že mají defekt v biosyntéze sterolů nebo brassinosteroidů. Pochopení, jak je vnitrobuněčná koncentrace brassinosteroidů regulována přes syntézu a metabolizmus je důležitou součástí mnoha modelů působení brassinosteroidů (**Clouse, 2002**).

### 2.4.4. Regulace

Regulace se může vyskytnout na úrovni transkripce, stability mRNA, translace, enzymové aktivity a dostupnosti substrátu. Může být ovlivňována i vnějšími signály a vývojovými podněty jako je světlo a ostatní hormony. Transkripce *CPD* genu je specificky regulovaná brassinolidem a citlivost k cykloheximidu naznačuje potřebu de novo syntézy regulačního faktoru (**Mathur et al., 1998**). Množství transkriptů *DWF4* je alostericky regulováno vnitrobuněčným obsahem brassinosteroidů. Jeho exprese je velmi nízká v divokém typu huseníčku, ale výrazně stoupá v deficitních mutantech *dwf1*, *bri1* a *cpd*. To naznačuje, že brassinosteroidové signály jsou potřebné pro snížení exprese *DWF4* genu v divokém typu. Reakce katalyzované produkty genu

*CPD* a *DWF4* genů pravděpodobně limitují rychlost biosyntézy brassinolidu. Dalším limitujícím krokem je reakce přeměny 6-deoxocastasteronu na castasteron. Ve všech případech je substrát přítomen v buňkách v mnohonásobně větším množství než produkt (**Nomura et al., 2001**).

Jiný možný mechanizmus je regulace pomocí transportu brassinosteroidů v rostlinách, který je nejspíš bazipetální, jak je ukázáno ve studiích s brassinosteroidy aplikovanými exogenně (**Li & Chory, 1999**). Také se spekuluje o tom, ve kterých částech rostliny jsou takto hormony syntetizovány. Například exprese *CPD* genu byla detekována pouze v rostoucích listech huseníčku. Na druhé straně *DET2* je exprimován ve všech orgánech a nezávisle na vývojovém stádiu. Je možné, že exprese může probíhat ve všech orgánech a uplatňují se zde alosterické regulace závisející na metabolizmu. Brassinosteroidy jsou zřejmě rychleji metabolizovány v listech a pomaleji v kořenech nebo hypokotylech, kde mohou alostericky inhibovat svou biosyntetickou dráhu (**Shimada et al., 2003**).

### 2.4.5. Inhibitory biosyntézy

Mutanti jsou dobrým objektem pro studium biologických vlivů brassinosteroidů na rostliny. Informace plynoucí z jejich výzkumu jsou však omezené, protože analýza mutantů byla provedena na relativně malém počtu rostlinných druhů. Proto může být specifický inhibitor biosyntézy významným nástrojem pro zkoumání vlivu brassinosteroidů na rostliny v různých stupních vývoje a na buněčné kultury. Inhibitory mohou být použité k doplnění poznatků o mutantech a při vyjasnění a doplnění funkce brassinosteroidů.

KM-01 byl první známý selektivní brassinosteroidový inhibitor, ale pokud byl aplikován samotný, tak nebyl dostatečně aktivní v testech prodlužování hypokotylů ředkvičky (*Raphanus sativus*) nebo v testu odchylky listu rýže. KM-01 má proto omezené použití(**Asami & Yoshida, 1999**).

Dalším nalezeným brassinosteroidovým inhibitorem byl brassinazol (v současné době nejznámější a nejpoužívanější). Jeho struktura je podobná struktuře pacrobutrazolu a uniconazolu (inhibitory biosyntézy giberelinu) a jedním z cílových

míst inhibice je 22-hydroxylační krok přeměny 6-oxocampestanolu na cathasteron a/nebo oxidační krok přeměny cathasteronu na teasteron. Morfologické změny brassinazolem ošetřených rostlin se podobají změnám u *det2* mutantů. Rostliny ošetřené brassinazolem jsou zakrslé, s kadeřavými, tmavě zelenými listy, mají změněnou fotomorfogenezi (exprimují větší množství fotosyntetických proteinů) a ve tmě vyvíjí pravé listy. Stupeň vývoje listů a zkrácení hypokotylu jsou závislé na koncentraci brassinazolu. Ošetření brassinazolem ve tmě indukovalo základní kroky vedoucí k diferenciaci plastidů, a toto zjištění předpovědělo další funkci brassinosteroidů v rostlinách. Brassinazol nemá žádný postranní vliv kromě inhibice biosyntézy brassinosteroidů a je vysoce specifický. Limity v použití brassinazolu však jsou. Například při koncentraci 10 μM nebo větší nemůže být morfologie ošetřených rostlin úplně kompenzována pomocí brassinolidu. Také rostliny větší než huseníček (rajče nebo okurka) potřebují vyšší množství brassinazolu, což může být způsobeno problémy s nasáváním brassinazolu nebo s jeho pohybem v rostlině (**Asami & Yoshida, 1999, Asami et al., 2000, Nagata et al., 2000**).

Brassinazol 2001 a brassinazol 220, jsou další triazolové inhibitory brassinosteroidové biosyntézy, s podobnými, ale silnějšími a specifičtějšími účinky než má brassinazol. Imazalil (fungicid) by mohl být také jedním z brassinosteroidových inhibitorů, ale imazalilem inhibovaný růst hypokotylu je možno plně obnovit pouze aplikací kombinace 24-epibrassinolidu a giberelinu a je také pětkrát méně aktivní než brassinazol (**Werbrouck et al., 2003**).

## 2.4.6. Degradace brassinosteroidů v rostlinách

Metabolizmus brassinosteroidů byl studován na různých rostlinných druzích a mnoho typů metabolitů bylo již bylo identifikováno jako produkty degradace nebo inaktivace (hydroxylací, oxidací, glykosylací, acylací, nebo degradací postranního řetězce). Nejčastějším produktem po ošetření rajčete (*Lycopersicon esculentum*) radioaktivním 24-epibrassinolidem byl 25-hydroxy-24-epibrassinolid a 25-β-D-glukosyloxy-24-epibrassinolid (**Clouse, 2002**). Brassinolid ve fazolových explantátech byl metabolizován na jeho 23-*O*-β-glukosid. V rýžových explantátech a sazenicích byl

exogenně aplikovaný brassinolid metabolizován na neznámé polární ale neglykosidické metabolity. 24-epimery brassinolidu a castasteronu jsou přeměňovány na různé metabolity a jejich konjugáty v suspenzní kultuře buněk rajčete. Mezi metabolity fazolu byl nalezen brassinolid bez 26 a 28-metylových skupin, který byl identifikován jako 26-norbrassinolid. Vzniká pomocí brassinolid demetylasy. U mnohých podobných experimentů ani produkty metabolizmu nebyly přesně určeny (**Kim et al., 2000b**).

## 2.5. Přenos brassinosteroidového signálu

Signální dráhy brassinosteroidů nevyužívají cytoplazmatické steroidové receptory, tak jako je tomu u živočichů a člověka, ale jejich receptor je umístěn v plazmatické membráně, funguje na buněčném povrchu a převádí extracelulární signály do buňky (**Li & Chory, 1997**). Hlavním brassinosteroidovým receptorem je serin/threonin kinasa BRI1, která je lokalizována v plazmatické membráně a je exprimována ve všech orgánech mladých rostlin huseníčku (**Friedrichsen et al., 2000**). BRI1 má N-koncovou extracelulární doménu obsahující 25 leucin-rich-repeats (LRR), transmembránovou doménu a cytoplazmatickou serin/threonin kinázovou doménu. BRI1 interaguje s jinou LRR kinasou, BAK1, a tyto dvě se in vitro navzájem fosforylují (**Wang & He, 2004**).

Pozitivními regulátory brassinosteroidového signálu jsou u huseníčku blízce příbuzné proteiny BZR1 a BES1. V přítomnosti brassinosteroidu aktivují BES1 a BZR1 expresi brassinosteroidy-indukovatelných genů. Přídavné složky brassinosteroidové signální dráhy a mediátory brassinosteroidové odpovědi (zřejmě proteiny jako TRIP-1, BEE1, BEE2, BEE3 a EXO) jsou charakterizovány tím, že koncentrace jejich transkriptů jsou regulovány brassinosteroidy. Např. EXO protein se podílí na přenosu signálů pro růstovou odpověď a jeho nadměrná exprese v divokém typu způsobí zvýšený vegetativní růst. Tento protein upravuje expresi skupiny genů regulovatelných bvrassinosteroidy (*KCS1*, *AGP4*, *EXP5* a *δ-TIP*), které se nejspíš účastní růstových procesů (**Müssig, 2005**). Zvýšená translace proteinu TRIP-1 podpoří růst tabáku a huseníčku. TRIP-1 je podjednotka komplexu eIF3, iniciačního faktoru hrajícího velmi

důležitou roli v iniciaci eukaryotní syntézy proteinů. Další cestou, kterou může přenos signálu přímo ovlivnit translaci, může být fosforylace přímo podjednotek eIF3. Je možné, že BRI1 fosforyluje TRIP-1 a tím zvyšuje jeho schopnost sestavovat eIF3 komplex. Bylo zjištěno, že *in vitro* tato fosforylace probíhá (**Jiang & Clouse, 2001**).

Navíc k těmto signálním složkám v brassinosteroidové signální dráze funguje také negativní regulátor, cytoplazmatická protein kinasa BIN2. Ta reguluje přenos signálu pomocí přímé fosforylace (a tedy inaktivace) BZR1 a BES1, které jsou pak degradovány v proteosomu. Aktivace BRI1-BAK1 receptorových kinas inhibuje neznámým způsobem BIN2, což umožní akumulaci BZR1 a BES1 a následnou regulaci brassinosteroidových genů (**He et al., 2002, Wang & He, 2004**). Brassinosteroidová signální dráha dovoluje značnou komunikaci s ostatními signálními drahami a fytohoromony, a také mnoho genů není regulováno výlučně brassinosteroidy. Brassinosteroidy mohou ovlivnit růst rostlin i pomocí genů, které jsou regulovatelné také auxinem, nebo regulací biosyntetických a signálních genů jiných rostlinných hormonů (**Müssig & Altman, 2003**). Několik genů, účastnících se odezvy na gibereliny je antagonisticky regulováno brassinosteroidy. Brassinosteroidy regulují expresi mnoha genů, které kódují např. xyloglukan endotransglykosylasy a expansiny u soji (*Glycine max*), rajčete a huseníčku, a prokázalo se, že brassinosteroidy stimulují rozvolňování buněčné stěny v epikotylech soji, hypokotylů čínského zelí (*Brassica chinensis*) a tykve (*Cucurbita maxima*). U soji se během dvou hodin po aplikaci brassinosteroidů zvýšilo množství mRNA genu *BRU1*, který kóduje enzym s xyloglukan specifickou transglykosylační funkcí a s homologií ke xyloglukan endotransglykosylase. Tato regulace na post-transkripční úrovni je specifická pro brassinosteroidy. Gen *TCH4* také kóduje xyloglukan endotransglykosylasu podobnou produktu genu *BRU1* a je regulovatelný brassinosteroidy, oba tyto geny mají jen jinou místně-časovou specifitu exprese (*BRU1* ve vnitřních tkáních, *TCH4* ve vyvíjejících se orgánech). Xyloglukan endotransglykosylasy tvoří v huseníčku velkou multi-genovou rodinu, a jen podskupina z nich je regulována brassinosteroidy (**Müssig, 2005**).

## 2.6. Závislost struktury a aktivity brassinosteroidů

Brassinolid je (22R,23R,24S)-2α,3α,22,23-tetrahydroxy-24metyl-B-homo-7-oxa-5αcholestan-6-on, tedy polyhydroxylovaný derivát 5α-cholestanu. Základní strukturou je podobný živočišným hormonům odvozených od cholesterolu (androgeny, estrogeny a kortikoidy obratlovců, ekdyson hmyzu a korýšů). Strukturní variace i aktivita závisí na typu a orientaci funkčních skupin na A a B kruzích a postranním řetězci. Odlišnosti v aktivitě mezi různými brassinosteroidy vychází z rozdílů na C-2 a C-3 v A kruhu, přítomnosti laktonu, ketonu nebo oxo-skupiny na C-6 v B kruhu a prostorovém rozložení hydroxylových skupin na postranním řetězci, přítomnosti nebo nepřítomnosti metylové nebo etylové skupiny na C-24. Optimální struktura pro nejvyšší biologickou aktivitu je struktura brassinolidu (laktonová funkční skupina na C-6/C-7, sousedící cis hydroxyly na C-2 a C-3, R konfigurace hydroxylů na C-22/C-23 a metyl jako substituent na C-24) (**Clouse, 2002**).

Jedna z největších překážek používání brassinosteroidů v širokém měřítku na polích je jejich vyšší cena. Izolace brassinosteroidů z přírodních materiálů je kvůli jejich nepatrnému množství v nich obsažených velice pracná a nákladná a pro praktické účely nepřichází v úvahu. Syntetická příprava brassinolidu je také velmi nákladná, proto byla syntetizována řada analogů brassinosteroidů, které mají podobné účinky. Pokrok v chemické syntéze brassinosteroidů a jejich analogů vedl k ekonomicky použitelným postupům, které umožnily jejich praktickou aplikaci v zemědělství. Předpokládá se, že brassinosteroidy se budou stále častěji používat pro zvyšování výnosů. Všechny brassinosteroidy ovšem nejsou biologicky aktivní, nejčastěji se ve fyziologických studiích používá brassinolid, 24-epibrassinolid a 28-homobrassinolid. Pro široké použití v zemědělství je potřeba najít kompromis mezi fyziologickou aktivitou a cenou, proto je vhodné studovat vliv různých brassinosteroidových analogů na růst a vývoj rostlin a to zejména kulturních plodin (**Rao et al., 2002**).

Na A kruhu má brassinolid sousedící hydroxylové skupiny C-2α a C-3α. Jeho prekurzory jsou brassinosteroidy mající α hydroxyl, β hydroxyl nebo keton na pozici C-3, naopak jeho metabolity mohou být brassinosteroidy s 2α, 3β-, 2β, 3α-, nebo 2β, 3β-

sousedními hydroxyly. Tyto dvě sousedící hydroxylové skupiny 2α a 3α na A kruhu reprezentují hlavní strukturní rys nejaktivnějších brassinosteroidů jako jsou brassinolid a castasteron. Aktivita klesá směrem 2α, 3α > 2α, 3β > 2β, 3α > 2β, 3β, což naznačuje, že α orientovaná hydroxylová skupina na C-2 je esenciální pro větší biologickou aktivitu brassinosteroidů v rostlinách.

Co se týče oxidace B kruhu je směr aktivity zhruba 7-oxolakton > 6-keton > 6-deoxo. Výsledky naznačily, že nahrazení 6-keto skupiny β nebo α hydroxylovou skupinou vedlo k poklesu aktivity a 6-deoxo analog měl jen velmi malou aktivitu, což potvrzuje, že elektronegativní skupina na C-6 je důležitá pro hormonální účinnost. 6α-fluorinovaný analog měl nízkou aktivitu, podobně jako 6-deoxo analogy. Brassinolid a castasteron jsou $C_{28}$ brassinosteroidy nesoucí S-metylovou skupinu na C-24 v postranním řetězci. V C28 sériích klesají bioaktivity v tomto pořadí: C-6 lakton > C-6 keton > C-6 α nebo β hydroxy > C-6 deoxo. Nahrazení 6-keto skupiny β hydroxy skupinou vedlo k podobné bioaktivitě při použití vyšších množství (1000 ng), ale k poklesu v nižších množstvích (1, 10 a 100 ng). Nahrazení α hydroxylem vedlo k poklesu aktivity ve všech dávkách. 6α-fluorinovaný analog vyvolal nízkou aktivitu, podobně jako 6-deoxo analog. 25-fluoro analogy brassinolidu a castasteronu neměly skoro žádnou aktivitu zatímco odpovídající 25-hydroxy analogy měly silnou biologickou aktivitu. 5α-fluoro-28-homocastasteron a 5α-fluoro-28-homotyphasterol měly zvýšenou biologickou aktivitu v porovnání s jejich 5-hydroxy analogy (**Ramírez et al., 2005**).

Na postranním uhlíkovém řetězci můžeme najít různé substituenty na C-23, C-24 a C-25. Přitom nejaktivnější jsou brassinosteroidy s vazbami metylu nebo etylu na C-24 a metylu na C-25 (**Bajguz & Tretyn, 2003**). Aktivní sloučeniny mohou mít 24R namísto 22S metylové skupiny, tak jak je tomu u 24-epibrassinolidu. Androstanové analogy castasteronu bez laktonového B kruhu a 22R, 23R diolu také vykazují vysoké biologické aktivity (**Kohout et al., 2005**).

## 2.7. Vliv brassinosteroidů na rostliny

Brassinosteroidy ovlivňují růstové i reprodukční procesy, stimulují růst i dělení buněk, růst mladých vegetativních pletiv (epikotylu, hypokotylu, koleoptile), indukují kvetení, zrání plodů, klíčení semen, tvorbu a růst kořenů, růst pylových láček, podílejí se na diferenciaci systému vodivých pletiv, hrají spolu s dalšími fytohormony zásadní roli při senescenci, aktivují protonové pumpy v buněčných membránách, ovlivňují fotosyntézu, asimilaci uhlíku a fixaci dusíku, stimulují produkci etylenu, chrání rostlinu proti abiotickým i biotickým stresorům a podílejí se i na dalších procesech v rostlině (**Müssig, 2005**). Vývojové a růstové aktivity jsou hlavně spojeny s ATPázovou aktivitou, syntézou syntetasy 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny změnu v orientaci mikrotubulů, a modifikaci buněčných stěn (**Ono et al., 2000**)

### 2.7.1. Vliv brassinosteroidů na růst rostlin a diferenciaci pletiv

Od doby, kdy byl chemicky syntetizován brassinolid a jeho stereoizomer, 24-epibrassinolid (v roce 1981), mohly začít v širokém měřítku pokusy s aplikací brassinosteroidů na různé tkáně a orgány rostlin, a to ve skleníkových i polních podmínkách. První zpráva o vlivech brassinosteroidů na růst huseníčku se objevila v roce 1991, následována krátce nato popisem výběru mutant u této rostliny (které jsou necitlivé k aplikovaným brassinosteroidům nebo jich syntetizují nedostatečné množství) a pozorováním, že brassinosteroidy u tohoto druhu regulují genovou expresi (**Rao et al., 2002**).

Vliv brassinosteroidů na prodlužovací růst byl potvrzen mnoha pracemi. Velmi účinné jsou při stimulaci růstu mladých vegetativních tkání (obsah a tedy i citlivost je v těchto tkáních vyšší). Bylo pozorováno, že brassinosteroidy stimulovaly růst zelené řasy (*Chlorella vulgaris*) a mycelií *Psilocybe cubensis* a *Gymnopilus purpuratous*. Na druhou stranu však inhibovaly růst nádorových buněk vyvolaný *Agrobacterium tumefaciens*. Aplikace brassinosteroidů tedy většinou růst stimuluje, může ho ale i

inhibovat. Studie na epikotylech soji odhalila schopnost brassinosteroidů stimulovat buněčný růst, a ten byl doprovázen výlevem protonů a hyperpolarizací buněčných membrán. V kultuře mrkvových (*Daucus carota*) buněk vyvolal 24-epibrassinolid pouze zvětšování buněk, aniž by měl jakýkoli vliv na jejich dělení (**Rao et al., 2002**). Podélný prodlužovací růst buněk je v deficitních mutantech huseníčku (*cbb, dwf4, cpd, dim*) velmi snížen. Jak lze předpokládat, je u nich nižší i exprese genů spojených s prodlužovacím růstem buněk. Ukázalo se, že brassinosteroidy ovlivňují rekonfiguraci mikrotubulů do příčného uspořádání, které umožňuje podélný růst. Brassinosteroidy mohou podpořit organizaci mikrotubulů a prodlužovací růst buněk přímo, aniž by vzrostla exprese genů tubulinu, nebo mohou ovlivnit transport vody aquaporiny a aktivitu vakuolární protonové (H+) ATPasy, což je oboje spojeno s prodlužovacím růstem buněk (**Clouse, 2002**, **Morillon et al., 2000**). Brassinosteroidy ovlivňují zřejmě stejnou měrou růst i dělení buněk. Ovlivňují také kinetiku buněčného cyklu v synchronizovaných kulturách buněk tabáku (*Nicotiana tabacum*) a také regulují geny exprimující se v S fázi, včetně histonu H2B a HMG1 proteinu (high mobility group). Stimulující role brassinosteroidů na dělení buněk byla ověřena tím, že ošetření kultury buněk deficitního *det2* mutanta 24-epibrassinolidem zvýšilo množství transkripce genu kódujícího cyklin D3, protein potřebný pro regulaci přechodu G1 a S fáze v buněčném cyklu. 24-epibrassinolid může také účinně nahradit zeatin při růstu kalusu huseníčku a v buněčné suspenzní kultuře (**Clouse, 2002**). Regulace syntézy a aktivity enzymů účastnících se modifikace buněčné stěny (jako jsou xyloglukan endotransglykosylasy, glukanasy, expansiny a další) se stala častým místem působení hormonů regulujících prodlužovací růst buněk. Nanomolární koncentrace brassinolidu stimuluje tvoření tracheid (xylogenezi) v izolovaných mezofylových buňkách ostálky (*Zinnia elegans*). U ní také brassinosteroidy regulují expresi několika genů spojených s utvářením xylému. U huseníčku dokázala mikroskopická analýza mutantů roli brassinosteroidů při cévní diferenciaci. V brassinosteroidovém deficitním *cpd* mutantovi se asymetricky dělí kambium (produkuje nadpočet floémových buněk na úkor buněk xylému). Brassinosteroidy jsou v rostlině mobilní, brassinolid aplikovaný na kořeny mladých intaktních rajčat a ředkviček působil na hypokotyly a epikotyly nebo ošetření bází hypokotylů vigny (*Vigna radiata)* způsobuje prodloužení epikotylů (**Rao et al., 2002**).

Brassinosteroidy regulují expresi mnoha genů, přispívajících k regulaci buněčného dělení a diferenciace, a pomáhají řídit celkové vývojové procesy vedoucí k morfogenezi rostliny. Podílejí se na regulaci fotomorfogeneze, skotomorfogeneze a buněčného růstu v přítomnosti buněčné stěny, která je potenciálním limitem růstu (**Clouse, 2002**).

### 2.7.2. Vliv brassinosteroidů na kořeny

**Kim et al., (2000b)** zjistili přítomnost castasteronu v primárních kořenech kukuřice. Detekované množství castasteronu bylo výrazně nižší než ve výhoncích. **Yokota et al., (2001)** dokázali přítomnost mnoha druhů brassinosteroidů v kořenech rajčete. Koncentrace 28-norcastasteronu a castasteronu jsou ve výhoncích vysoké, ale v kořenech velmi nízké, což naznačuje, že v kořenech je potřeba mnohem nižší množství brassinosteroidů než ve výhoncích a jiných částech rostliny. Vzhledem k tomu, že byly v kořenech nalezeny brassinosteroidy, jsou v kořenech také syntetizovány proteiny potřebné pro biosyntézu brassinosteroidů (DIM, DET2 a některé fytochromy P450), stejně tak jako proteiny potřebné pro přenos brassinosteroidového signálu (BRI1 a BAK1). To naznačuje, že brassinosteroidy jsou důležité regulační sloučeniny také pro růst a vývoj kořenů.

Pokusy, při kterých bylo studováno ovlivnění růstu kořenů brassinosteroidy, prokázaly inhibiční i stimulační účinky na růst kořenů. Bohužel se při těchto pokusech pracovalo jen s kořenovými segmenty a byly tak přerušeny mnohé signalizační dráhy. 24-epibrassinolid měl inhibiční vliv na formaci kořenů u sazenic fazolu, pšenice (*Triticum aestivum*) a kukuřice (*Zea mays*) (**Müssig, 2005**). **Guan & Roddick (1988)** zjistili inhibiční vliv 0,1 μM 24-epibrassinolidu na růst kořenů rajčete, také stejná koncentrace 24-epibrassinolidu silně inhibovala růst kořenů huseníčku. Ale inhibiční vliv brassinosteroidů na růst kořenů odporuje faktu, že mutanti mají redukovaný kořenový systém. **Müssig et al., (2003)** zjistili, že velmi malé koncentrace 24-epibrassinolidu (0,005 nM - 0,1 nM) stimulují růst kořenů huseníčku, zatímco při vyšších koncentracích (>1 nM) byl růst kořenů inhibován. V deficitních mutantech (zde byl použit *cbb3*) je na vyvolání inhibice růstu potřeba vyšší množství brassinosteroidů

(>10 nM), nižší koncentrace růst kořenů stimulují. Lze říct, že nízké koncentrace brassinosteroidů stimulují růst kořenů a brassinosteroidy přejdou na cestu inhibice pokud je překročena hraniční koncentrace brassinosteroidů. Tato hraniční koncentrace je nižší u 24-epibrassinolidu než u 24-epicastasteronu, a vyšší v mutantech necitlivých k brassinosteroidům. Tato hranice závisí na biologické aktivitě aplikovaného brassinosteroidu a genotypu rostliny (**Müssig, 2005**).

**Fujii & Saka (2001)** prokázali, že ponoření obilek rýže do roztoku brassinolidu ($2x10^{-7}$ M, $2x10^{-8}$ M, $2x10^{-9}$ M) na 4 dny zvýšilo délku výhonku v každé z pozorovaných koncentrací, ale ovlivňovalo negativně délku hlavního kořene v závislosti na koncentraci (víc při vyšší koncentraci), ošetření pouze prvních 24 hodin pozitivně ovlivnilo délku výhonku i kořene a ošetření pouze čtvrtý den nemělo prokazatelný vliv. Z toho vyplývá, že doba ošetření, koncentrace a vývojové stádium rostliny má i zde velký vliv na působení brassinosteroidů na rostlinu.

Exogenně aplikovaný brassinolid ($10^{-9}$ M a $10^{-5}$ M) zvýšil gravitropické zakřivení v primárních kořenech kukuřice. Takto vyvolané zakřivení bylo velmi zvýrazněno přítomností auxinu ($10^{-8}$ M a $10^{-10}$ M), což ukazuje, že brassinolid spolupracuje s auxinem při gravitropickém zakřivení primárních kořenů kukuřice. Aktivace gravitropického zakřivení pomocí brassinolidu byla plně anulována při aplikaci inhibitoru polárního transportu auxinu (**Kim et al., 2000a**).

### 2.7.3. Vliv brassinosteroidů na květy a semena

Brasisinosteroidy pravděpodobně stimulují růst pylové láčky při prorůstání do bliznou (**Müssig, 2005**).Obsah brassinosteroidů v pylu je oproti jiným částem rostliny velmi vysoký, což naznačuje, že brassinosteroidy mohou mít významnou roli při regulaci reprodukce. Velmi vysoké koncentrace brassinosteroidů byly nalezeny také v semenech (**Bajguz & Tretyn, 2003**). Aplikace brassinolidu zlepšila klíčení řeřichy (*Lepidium sativum*). Podobně ošetření semen eukalyptu (*Eucalyptus camaldulensis*) 24-epibrassinolidem významně zvýšilo procento klíčících semen. Brassinolid, 24-epibrassinolid a 28-homobrassinolid podpořily klíčení semen podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*). Obdobné výsledky byly získány při ošetření semen řepky,

rajčete, tabáku, a dalších (**Rao et al., 2002**). Snížená fertilita nebo samčí sterilita jsou běžné charakteristiky mutantů s nedostatkem brassinosteroidů nebo necitlivých k brassinosteroidům. Například samčí sterilita pozorovaná u *cpd* mutanta závisela na neschopnosti pylu prodlužovat se během klíčení. Ale u *dwf4* mutanta se pyl zdá být životaschopný a sterilitu způsobuje kratší délka nitky prašníku, což způsobí, že pyl je uložen častěji na stěně semeníku, než na povrchu blizny (**Clouse, 2002**). Ukázalo se, že v zásadě brassinosteroidy zlepšují klíčení semen a růst sazenic. Tento vliv může zvýšit výnos, zejména v suboptimálních růstových podmínkách (**Khripach et al., 2000**).

### 2.7.4. Vliv brassinosteroidů na výnos

Ihned po objevení brassinosteroidů byly iniciovány studie možnosti využití brassinosteroidů na zlepšení výnosu zemědělských plodin, a to jak v laboratorních, tak v polních podmínkách. Brassinosteroidy zvýšily výnos pšenice, ječmene, rýže, kukuřice, soji, fazolu, podzemnice olejné, hlávkového salátu, ředkviček, rajčat, mrkve, celeru, cibule, česneku, brambor, špenátu, papriky, bavlníku, čajovníku, kávovníku, jabloní, jahod, citrusů, vodního melounu, cukrové řepy, hořčice, řepky, tabáku, okurky, hroznů, a dalších (**Hayat et al., 2000, Rao et al., 2002, Peng et al., 2003, Müssig, 2005**).

Brassinosteroidy zcela prokazatelně zvyšují výnos mnoha kulturních plodin, zvlášť v suboptimálních podmínkách, jsou pro rostliny zcela přirozené a neškodí životnímu prostředí. Jsou tedy vhodné k široké aplikaci v zemědělství pro zvýšení výnosů a ochranu rostlin (**Khripach et al., 2000**).

### 2.7.5. Vliv brassinosteroidů na stárnutí

Stárnutí rostlin je regulováno fytohormony a i zde hrají brassinosteroidy důležitou roli. Brassinolid zrychlil stárnutí v explantátech řepeně (*Xanthium*) a šťovíku (*Rumex*). Byla popsána schopnost brassinosteroidů vyvolat stárnutí v izolovaných dělohách

okurkových sazenic a listů sazenic fazolu. Brassinosteroidové deficitní mutanti huseníčku vykazovali zpoždění ve stárnutí chloroplastů. Brassinolid zpožďuje odpadnutí listů citrusu (**Rao et al., 2002**).

Mnoho brassinosteroidových mutantů má prodlouženou délku života a zpožděnou senescenci. Zpožděné stárnutí koreluje se sníženou fertilitou, sterilní mutanti jako je *bri1* (brassinosteroidový insenzitivní) mají nejvíc zpožděný vývoj. Předpokládá se, že neschopnost vytvářet signály pro nástup senescence v neplodných mutantech vede k pozorovanému prodloužení délky života rostliny. Toto tvrzení také podpořilo doměnku o roli brassinosteroidů při navozování stárnutí u rostlin (**Clouse, 2002**).

## 2.7.6. Vliv brassinosteroidů na ostatní procesy v rostlinách

Postřik brassinolidem může hrát důležitou roli ve zvyšování komerční hodnoty ovoce litchi (*Litchi chinensis*). Obsah Ca2+ v perikarpu tohoto ovoce stoupl díky postřiku brassinolidem (v koncentracích 0,5 mg/l, 0,75 mg/l a 1 mg/l), hlavně při aplikaci během časných stádií vývoje plodů. Vyšší nárůst byl pozorován při vyšší použité koncentraci. Obsah pektinu v perikarpu ošetřených plodů byl vyšší v časnějších stádiích vývoje než v pozdějších, zatímco zůstal relativně konstantní u kontroly. Během časných stádií vývoje plodů, byly po postřiku brassinolidem zvýšené obsahy pectin metylesterasy a polygalacturonasy. Toto zvýšení bylo závislé na použité koncentraci. Aktivita celulasy byla silně inhibována u ošetřených rostlin v porovnání s kontrolou. Ošetření brassinoslidem také podpořilo růst, produkci plodů a zmírnilo jejich praskání. Postřik na listy tedy výrazně ovlivnil enzymové aktivity, obsah vápníku v perikarpu plodů a snížil praskání plodů. (**Peng et al., 2003**).

Rostliny hořčice (*Brassica juncea*) byly postříkány vodným roztokem 28-homobrassinolidu (v koncentracích $10^{-10}$ M, $10^{-8}$ M a $10^{-6}$ M) 30 dnů po zasetí. Po dalších 30ti dnech byla změřena čerstvá a suchá hmotnost rostlin, koncentrace dusíku, fosforu a draslíku, aktivta karbonátdehydratasy a čistá rychlost fotosyntézy v listech. Výnosové charakteristiky byly zjišťovány po dozrání lusků. Rostliny ošetřené 28-homobrassinolidem měly výrazně vyšší čerstvou a suchou hmotnost listů a měly účinnější fotosyntézu a vyšší aktivitu karbonátdehydratasy v porovnání s kontrolou.

Maximální odpověď byla vyvolána koncentrací $10^{-8}$ M 28-homobrassinolidu. Ošetřené rostliny také produkovaly víc lusků a semen. V koncentracích dusíku, fosfotu a draslíku nebyly zjištěny žádné významné rozdíly. Koncentarce $10^{-6}$ M měla vliv porovnatelný s koncentrací $10^{-8}$ M. (**Hayat et al., 2000**).

Bylo zjištěno, že aplikace brassinosteroidů zvýšila nodulaci a fixaci dusíku v podzemnici olejné (**Rao et al., 2002**).

Ukázalo se, že 24-epibrassinolid přímo ovlivnil rychlost fotosyntézy v listech okurky. Po ošetření 24-epibrassinolidem (0,01 mg/l, 0,1 mg/l a 1 mg/l) byla výrazně zvýšena rychlost asimilace $CO_2$ (nejvíc při ošetření 0,1 mg/l), což bylo spojeno s vyšší rychlostí karboxylace pomocí Rubisco. Aplikace 24-epibrassinolidu také zvýšila kvantový výtěžek přenosu elektronů přes fotosystém II. Tyto vlivy byly nejvýrazněji patrné 3 hodiny po listovém postřiku (**Yu et al., 2004**).

Brassinosteroidy stimulují růst hypokotylů huseníčku na světle, ale inhibují jeho růst za tmy. Nicméně přiměřené koncentrace brassinosteroidů jsou potřebné jak pro růst na světle, tak i ve tmě (mutanti jsou také zakrslí ve tmě i na světle a brassinazol inhibuje růst také i ve tmě i na světle). Bylo zjištěno, že několik de-etiolovaných mutantů izolovaných při výběru rostlin rostoucích ve tmě tak, jako by rostly na světle, má mutace v genech kódujících enzymy biosyntetické dráhy brassinosteroidů. **Neff et al., (1999)** předpokládá, že metabolizmus brassinosteroidů má souvislost s fytochromovou signalizací, **Kang et al., (2001)** dokázal, že tmou indukovatelný a světlem potlačitelný malý G protein Pra2 aktivuje cytochrom P450 C-2 hydroxylasu, která je součástí biosyntézy brassinolidu. Světlo je tedy jedním z regulátorů brassinosteroidové odpovědi. Je možné, že existuje optimální koncentrace brassinosteroidů v sazenicích. Nad tuto prahovou koncentraci, (která může záviset na vnějších podmínkách) brassinosteroidy růst inhibují. Interakce s ostatními fytohormony také může určit stupeň brassinosteroidové odpovědi. (**Müssig, 2005**).

Brassinosteroidy ovlivňují mnoho procesů v rostlině. To, zda toto ovlivnění bude pozitivní nebo negativní velmi záleží na době aplikace brassinosteroidů, koncentraci, stáří a celkové kondici rostliny a na typu aplikovaného brassinosteroidu. Tyto procesy

jsou ovlivněny hlavně přenosem signálu a expresí brassinosteroidy-indukovatelných genů. Přitom nelze zapomínat na interakce s ostatními fytohormony a vliv prostředí.

### 2.7.7. Protistresové účinky

Rostliny nemají motorický aparát, proto nemohou utéct před stresy z okolí. Brassinosteroidy zvyšují odolnost rostlin vůči různým abiotickým i biotickým stresům. Zvyšují odolnost rostlin k vysokým a nízkým teplotám, k vodnímu deficitu nebo zamokření substrátu, nadměrným koncentracím těžkých kovů nebo solí, pesticidům a herbicidům (abiotické stresy) a působení bakterií, virů či hub (biotické stresy). O mechanizmech těchto účinků je zatím známo pouze málo. Mechanizmem, který se může podílet na odolnosti k různým typům stresu je například zvýšená aktivita antioxidantů a jejich vysoký obsah při odpovědi na vysoké a nízké teploty, zasolení, sucho a zraňování a na oxidativní stres, a může hrát hlavní roli při získávání odolnosti rostlin na různé stresy z okolí (**Mazorra et al., 2002**). Byla také zjištěna vyšší exprese heat shock proteinů nebo ATP (**Dhaubhadel et al., 2002**, **Rao et al., 2002**)

#### 2.7.7.1. Nízká teplota

Teplotní změny se v přírodě vyskytují častěji než ostatní druhy stresových faktorů a mnoho fyziologických procesů v rostlině je ovlivněno nízkou teplotou (fotosyntéza, klíčivost, zakořeňování, nasazování květů nebo plodů). Mnoho ekonomicky významných plodin pochází z tropických a subtropických krajin a pro růst potřebují relativně vysoké teploty, takže jsou tyto plodiny v chladnějších zeměpisných šířkách často vystaveny chladovému stresu. Chladová tolerance může být indukována růstovými regulátory. Indukovaná tolerance je ale doprovázená zpožděním růstu po ošetření. Postřik regulátory (jako je triadimefon a metyljasmonát) před ochlazením zvýší endogenní obsah kyseliny abscisové a sníží tak poškození chladem. Podobně také aplikace kyseliny abscisové před stresem chladem sníží poškození mnoha citlivých rostlin. Chladová tolerance je však v mnoha pokusech vyvolaná kyselinou

abscisovou v relativně vysoké koncentraci, což inhibuje růst rostlin a buněk (**Yu et al., 2002**).

**Yu et al., (2002)** zkoumali vliv 24-epibrassinolidu a kyseliny abscisové na sazenice okurky při 2, 4 a 8°C. Okurka byla použita jako pokusný materiál, protože je citlivá k chladu. Sazenice byly pěstovány při optimálních růstových podmínkách (30/20°C) a ve stádiu tří listů byly ošetřeny 24-epibrassinolidem (v koncentracích 0,1 mg/l a 1 mg/l). Den nato byly sazenice na 2-3 dny ochlazeny, a pak vráceny do tepla na dalších 14 dnů. Studium se zaměřilo na zmírnění chladem vyvolané inhibice fotosyntézy. Chladový stres způsobil viditelná poškození listů (skvrny na listech, které byly spočítány a použity na výpočet indexu poškození listů chladem). Byla měřena fluorescence po 15ti minutách zatemění, maximální účinnost fotosystému II a čistá rychlost fotosyntézy. Fotosyntetické procesy jsou často jako první inhibovány chladnou teplotou. Fotoinhibice (naznačená poklesem maximální účinnosti fotosyntézy) se vyskytla při 4 a 2°C, ale ne při 8°C. Předošetření kyselinou abscisovou a 24-epibrassinolidem výrazně zmírnilo poškození chladem, index poškození byl nižší než u kontroly. Fotochemická účinnost nebyla ovlivněna po vystavení 8°C, nepříznivý vliv při 4°C byl pouze mírný, ale účinnost se výrazně snížila po 2-3 dnech ve 2 °C. 24-epibrassinolid výrazně zvýšil účinnost fotosyntézy u rostlin ve 2 a 4 °C. Čistá rychlost fotosyntézy a zdánlivý výtěžek fotosyntézy u neošetřených sazenic chlazených při 4 °C klesl na 40% a 39% oproti nechlazeným rostlinám, zatímco u rostlin předošetřených 24-epibrassinolidem a kyselinou abscisovou zůstaly hodnoty nezměněné v porovnání s nechlazenou kontrolou. Ošetření 24-epibrassinolidem zvýšilo čistou rychlost fotosyntézy ale i u nechlazených rostlin, což může být připisováno schopnosti 24-epibrassinolidu vylepšit fotosyntetické parametry a snížit chladové poničení. Účinnost závisela na koncentraci (vyšší aktivity při koncentraci 24-epibrassinolidu 0,1 mg/l než při koncentraci 1 mg/l) a na teplotě. Navíc vliv byl výraznější při nižších teplotách. Ošetření 24-epibrassinolidem před začátkem působení chladu tedy výrazně zlepšilo odolnost u okurkových sazenic (**Yu et al., 2002**).

V jiné studii aplikovali na sazenice rýže ve stádiu 4 listů 10 ml roztoku brassinolidu, castasteronu a 28-homobrassinolidu v koncentracích $2x10^{-7}$ M a $2x10^{-6}$ M. Po 30ti

dnech byla provedena analýza. Byl zkoumán vliv brassinolidu na růst buněk při rozdílných teplotách (30°C, 20°C a 15°C) pomocí testu odchylky listu rýže. Úhel odchýlení vyvolaný $5{,}7x10^{-5}$ M auxinem byl shodný s úhlem vyvolaným $2x10^{-9}$ M brassinolidem. V kontrolních segmentech klesal úhel téměř lineárně s klesající teplotou. $2x10^{-9}$ M brassinolid byl aktivní nejen při 20 a 30°C (stejně tak i auxin) ale dokonce velmi aktivní i při 15°C (zatímco auxin skoro vůbec). Brassinolid tedy snižoval negativní efekt chladového stresu, potlačující růst buněk jazýčku listu rýže. Vliv brassinolidu a castasteronu na růst buněk byl podobný, aktivita 28-homobrassinolidu byla při 15ti a 20ti °C nižší než brassinolidu a castasteronu. Při tomto pokusu také porovnávali vliv brassinolidu na morfologické parametry rýže při nízké teplotě. Růst kontrolních sazenic byl zjevně potlačený nízkou teplotou, výška rostlin a sušina byla větší po ošetření brassinolidem v optimální i nízké teplotě. Ošetření brassinolidem výrazně prodloužilo délky listové čepele 5. a 6. listů (tyto se rozvíjely v době postřiku), Na délku 4. listu nemělo ošetření výrazný vliv (v době ošetření byl již plně rozvinut) ani na délku 7. listu (v době ošetření nebyl ještě ani viditelný). Vliv brassinolidu byl výraznější při vysoké koncentraci ($2x10^{-6}$ M) (**Fujii & Saka, 2001**).

**He et al., (1991)** popsali, že obsah chlorofylu utvářeného během zelenání etiolovaných listů kukuřice při 18°C byl o 68% nižší než při normální teplotě, zatímco u listů ošetřených brassinolidem jen o cca 40% nižší. Dokonce i při 15°C byl inhibiční efekt nízké teploty na formaci chlorofylu potlačen aplikací této látky. **Katsumi (1991)** prokázal, že brassinolid zmírňuje snížení sušiny a rozklad chlorofylu po působení chladového stresu u sazenic okurky. Okurkové sazenice naklíčené ze semen namočených v roztoku brassinolidu během bobtnání rostly rychleji než kontrolní sazenice (neošetřené brassinosteroidy) v chladných podmínkách (5°C po 3 dny). Obsah chlorofylu byl udržen v ošetřených sazenicích během působení chladu a dokonce dále rostl po vrácení sazenic do optimálních podmínek. V rýži 24 – epibrassinolid zvýšil odolnost k chladovému stresu (1-5°C) a tato tolerance byla spojená se zvýšením hladiny ATP, koncentrace prolinu a aktivity superoxid dismutasy, což poukázalo na to, že brassinosteroidy mohou působit na membránovou stabilitu a osmoregulaci (**Rao et al., 2002**). Rostliny rýže a rajčat ošetřené brassinolidem rostly lépe než kontrolní ve chladových podmínkách. Vliv brassinolidu na růst rýže se lišil při

různých kultivačních teplotách. Na nasazování plodů a houstnutí rajčat měl brassinolid významný pozitivní vliv v zimní sezóně, zatímco v letní sezóně byl rozdíl mezi ošetřenými a neošetřenými rostlinami mnohem nižší. Tedy může být složité odhadnout vliv brassinosteroidů při optimálních podmínkách (**Kamuro & Takatsuto, 1999**)

Brassinosteroidy posilují toleranci rostlin k chladovému stresu, zvyšují účinnost a rychlost fotosyntézy, zvyšují obsah chlorofylu etiolovaných sazenic, stimulují růst buněk a růst biomasy, urychlují a zlepšují růst mladých rostlin, působí na membránovou stabilitu, osmoregulaci a nasazování plodů, celkově tedy zmírňují poničení způsobená chladem a tento vliv je výraznější při nižších teplotách.

### 2.7.7.2. Vysoká teplota

**Mazorra et al., (2002)** zkoumali vliv brassinosteroidů (24-epibrassinolidu a polyhydroxylovaného spirostanového analogu v koncentracích 10,6 nM a 2,12 nM) na aktivitu katalasy, peroxidasy a superoxid dismutasy v discích z listů rajčete při 25 a 40°C. Zjistili, že všechny tyto enzymy byly ovlivněny aplikací brassinosteroidů. Kontrolní disky inkubované 2 hodiny při 40°C měly výrazně nižší peroxidasovou aktivitu než ty ponechané při 25°C, což dokazuje že tento enzym byl ovlivněn teplotním stresem. Aktivita peroxidasy při 25°C nebyla brassinosteroidy ovlivněna, ale výrazně stoupla při 40°C po aplikaci obou sloučenin v porovnání s kontrolními disky. Teplotní stres zvyšuje produkci kyslíkových radikálů v rostlinách. Superoxid dismutasa je klíčový enzym detoxifikace kyslíkových radikálů. Oba brassinosteroidy stimulovaly aktvivitu superoxid dismutasy při 25 i 40°C a nebyl pozorován žádný významný rozdíl mezi použitými koncentracemi. MH5 analogem stimulovaný nárust této enzymové aktivity byl větší. Zvýšená aktivita superoxid dismutasy po ošetření 24-epibrassinolidem při 25°C naznačuje, že toto zvýšení může snižovat možnou toxickou koncentraci škodlivých kyslíkových radikálů. 24-epibrassinolidem vyvolaná zvýšená aktivita superoxid dismutasy při 40°C může být cestou k odstranění přebytku vzniklých kyslíkových radikálů. Aktivita katalasy při vysoké teplotě poklesla, 24-epibrassinolid stimuloval její aktivitu při obou testovaných teplotách, ale jen v koncentraci 10,6 nM,

zatímco MH5 analog měl pozitivní vliv na katalázu pouze při 40°C v obou koncentracích. Tento nárůst může být významný při snižování vlivu $H_2O_2$. Změny v aktivitě katalasy výrazně závisely na struktuře brassinosteroidu, dávce a teplotě. Tyto výsledky naznačují možnou roli obou sloučenin při snižování buněčného poškození vyvolaného teplotním stresem v závislosti na těchto enzymech. Pokud předpokládáme, že 24-epibrassinolidem stimulované aktivity katalasy a superoxid dismutasy vedou ke zvýšení termotolerance disků z rajčatových listů v tomto experimentu, potom mechanizmus 24-epibrassinolidem indukované odolnosti k vysoké teplotě dokazuje, že aktivace těchto enzymů může být přímo nebo nepřímo ovládána brassinosteroidy. V tomto pokusu předpokládali, že velké strukturní rozdíly mezi MH5 analogem a 24-epibrassinolidem mohou vyvolat výrazně odlišné aktivity v testovaných antioxidačních enzymech, ale MH5 vyvolal stejné změny superoxid dismutázové a peroxidázové aktivitě jako 24-epibrassinolid při obou teplotách, což naznačuje, že spirostanická struktura bez běžných postranních řetězců nacházejících se v přírodních brassinosteroidech, vyvolala stejné enzymové antioxidační účinky (**Mazorra et al., 2002**).

**Dhaubhadel et al., (1999, 2002)** zjistili, že ošetření sazenic řepky 24- epibrassinolidem (1 μM) vede k výraznému nárůstu jejich základní termotolerance. 24-epibrassinolid zvýšil akumulaci čtyř hlavních tříd heat-shock proteinů v porovnání s neošetřenými rostlinami během i po skončení působení stresu. Překvapivě tyto studie ukázaly, že zatímco koncentrace heat-shock proteinů jsou výrazně vyšší v ošetřených rostlinách během obnovy, transkripty pro tyto proteiny byly ve větším množství přítomny v neošetřených rostlinách. V pozdější studii se ukázalo, že vyšší množství heat-shock proteinů v 24-epibrassinolidem ošetřených rostlinách je způsobeno jejich vyšší syntézou (dokonce i přestože koncentrace mRNA jsou nižší), a také tím, že mnoho translačních iniciačních a elongačních faktorů je přítomno ve výrazně vyšším množství v ošetřených rostlinách v porovnání s neošetřenými. Syntéza heat-shock proteinů je tedy řízena na posttranskripční úrovni. Tyto výsledky ukázaly, že ošetření 24-epibrassinolidem snižuje ztráty některých složek translačního aparátu během obnovy, což koreluje s rychlejším návratem buněčné protein-syntézy po teplotním šoku a vyšším poměrem rostlin, které přežijí (**Dhaubhadel et al., 2002**).

Vlivy stresu vysokou teplotou byly zkoumány v brassinolidem ošetřených a neošetřených pšeničných listech na úrovni celkové syntézy proteinů a ultrastruktury buněk listů. Syntéza proteinů v ošetřených listech při 43°C byla se držela na stejné úrovni jako při 23°C, zatímco v neošetřených listech klesla při 43°C v porovnání se vzorky v kontrolní teplotě. Dále pozorovali, že heat shock proteiny se v buňkách pšeničných listů shlukují. Průměrný počet shluků a i velikost shluků byly vyšší v brassinosteroidy ošetřených listech oproti neošetřeným (**Kulaeva et al., 1991**).

Ve studii s rostlinami okurky bylo prokázáno, že ošetření brassinolidem zvyšuje odolnost k vysoušení a stresu z vysoké teploty. Obsah volných aminokyselin a amidů v listech ošetřených rostlin byly vyšší v porovnání s neošetřenými (**Krishna, 2003**).

### 2.7.7.3. Sucho a zamokření substrátu

Rostliny řepky byly ošetřeny syntetickými brassinosteroidy (4 varianty) postřikem na list. Jedna skupina byla ošetřena 7 dní před počátkem a druhá 5 dní po počátku stresu sucha a zamokření substrátu. Vliv stresu na rostliny byl sledován změnou sušiny, produkcí etylenu a hladinou kyseliny abscisové. Brassinosteroidy snížily hladinu kyseliny abscisové a produkci etylenu u rostlin stresovaných suchem při aplikaci 5 dní po počátku stresu. Výrazné snížení hladiny kyseliny abscisové bylo zaznamenáno již po 24 hodinách po postřiku, snížení produkce etylenu bylo pozorováno až po 48 hodinách. Tento efekt byl pozorován ještě 7 dní po aplikaci a po 2-3 týdnech vymizel. Vliv ošetření rostlin brassinosteroidy během stresu suchem byl výraznější než vliv ošetření před počátkem stresu. Aplikace brassinosteroidů jak před, tak během působením stresu mírně zvyšovala akumulaci sušiny. Produkce etylenu během stresu zamokřením substrátu u rostlin ošetřených před počátkem stresu nebyla ovlivněna. Při ošetření během stresu se produkce etylenu snížila oproti kontrole. Všechny použité brassinosteroidy měly pozitivní vliv na akumulaci sušiny, snížily na určitou dobu po aplikaci produkci etylenu a také endogenní hladinu kyseliny abscisové. Pozorované změny hladin kyseliny abscisové a etylenu jsou v souladu s předpokladem, že méně stresované rostliny mají nižší endogenní obsah kyseliny abscisové a uvolňují méně etylenu (**http://chemicke-listy.vscht.cz**).

Bylo popsáno, že 24-epibrassinolid při aplikaci postřikem na vyvinuté rostliny zvyšuje růst rostlin a nárůst sušiny kořenů a výhonů při vodním stresu. Postřik na listy i ošetření obilek pšeničných odrůd citlivých nebo tolerantních k suchu 28-homobrassinolidem, mělo stimulační vliv na růst stresovaných rostlin. Přestože byl pozorován pouze malý rozdíl vlivu 28-homobrassinolidu na tyto dvě pšeničné odrůdy, tak celkově odrůda tolerantní k suchu měla silnější odpověď na ošetření 28-homobrassinolidem při působení vodního stresu. Stoupající příjem vody, membránová stabilita a vyšší asimilace $CO_2$ a dusíku v ošetřených stresovaných rostlinách korelovaly se zvýšenou odolností k suchu vyvolanou 28-homobrassinolidem (**Sairam 1994**). Aquaporiny jsou membránové vodní kanály, které hrají hlavní roli v kontrole obsahu vody v buňkách. Měření osmotické permeability protoplastů izolovaných z hypokotylů divokého typu a brassinosteroidového defecientního (*cpd*) a necitlivého (*bri1*) mutanta ukázalo, že ošetření brassinosteroidem vyvolalo zlepšení osmotické permeability protoplastů připravených z *cpd* rostlin. Z toho se dá usoudit, že brassinosteroidy mohou hrát roli v propustnosti pro vodu přes aquaporiny, a že brassinosteroidy neovlivňují přímo plazmatickou membránu v tomto procesu, protože zde nebyl pozorován žádný "rychlý" vliv na osmotickou propustnost protoplastů způsobený brassinosteroidy. Změny v osmotické permeabilitě zde korelovaly s růstem hypokotylu (**Morillon et al., 2001**).

### 2.7.7.4. Patogeny

Brassinosteroidy indukují rezistenci k rostlinným patogenům. V některých výzkumech se brassinosteroidy ukázaly být efektivnější ochranou rostlin než standartní fungicidy (**Krishna, 2003**).

Divoký typ tabáku, ošetřený brassinolidem, byl odolnější k viru tabákové mozaiky, bakteriálnímu patogenu *Pseudomonas syringae* pv. tabaci a houbovému patogenu *Oidium* sp. Brassinolid také vylepšil odolnost rýže k chorobám vyvolaným *Magnaporthe grisea* a *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae. Brassinolid byl aplikován zalitím do půdy a postřikem na listy rostlin tabáku a rýže. Rostliny byly naočkovány patogeny 5 dnů po ošetření. Brassinolidem indukovaná odolnost

nekorelovala se zvýšením obsahu kyseliny salicylové ani s indukcí „pathogenesis-related" genové exprese. Navíc se systémově získanou odolností měla aditivní ochranné účinky proti patogenům, což naznačilo, že mechanizmus, kterým brassinolid vyvolá odolnost, je odlišný od jiných protistresových mechanizmů (**Nakashita et al., 2003**). V jiné studii zkoumali působení 24-epibrassinolidu na infekci *Vericillium dahliae*. Sazenicím rajčat rostoucím 14 dnů v přítomnosti 1 μM 24-epibrassinolidu byly na kořeny naočkováni tito patogeni a příznaky choroby byly hodnoceny 28 dní po inokulaci. 24-epibrassinolidem ošetřené rostliny nevykazovaly žádné příznaky choroby nebo měly nejnižší stupeň rozvoje choroby, zatímco většina neošetřených rostlin měla středně až těžce rozvinutou chorobu. Jednodenní vystavení sazenic působení 24-epibrassinolidu před inokulací *Vericillium dahliae* nesnížilo příznaky choroby. Rostliny brambor postříkané roztokem brassinosteroidu měly menší výskyt infekce *Phytophthora infestans*. Zlepšení odolnosti brassinosteroidem ošetřených hlíz bylo spojeno se zvýšením koncentrace kyseliny abscisové a etylenu a přítomnosti fenolických a terpenoidních sloučenin. Brassinosteroidy tedy působí i jako fungicidy. Ale některé koncentrace a aplikace brassinosteroidů v určitých stádiích vývoje mohou růst hub a rozvoj choroby stimulovat. Správná koncentrace, načasování a způsob aplikace jsou tedy důležité předpoklady pokud mají být brassinosteroidy vyvinuty a používány jako fungicidy (**Krishna, 2003**).

### 2.7.7.5. Stres zasolením a přítomností těžkých kovů v substrátu

Brassinosteroidy odvrací také negativní účinky zasolení na rostliny. 24-epibrassinolid a 28-homobrassinolid snížily inhibiční vliv soli na klíčení a na růst sazenic rýže. Obilky byly ponořeny do vody nebo roztoku NaCl za přítomnosti nebo bez brassinosteroidů. Podpora klíčení a růstu sazenic při podmínkách stresu zasolením pomocí brassinosteroidů zde byla spojená se zvýšenými koncentracemi nukleových kyselin a rozpustných proteinů (**Rao et al., 2002**). Klíčení semen eukalyptu v roztoku 24-epibrassinolidu bylo zrychlené jen mírně, zatímco za přítomnosti soli bylo výrazně posíleno 24-epibrassinolidem (**Sasse, 1999**). Vliv brassinosteroidů na ultrastrukturu buněk listů ječmene byl zkoumán při stresu

zasolením. Listové segmenty byly preinkubovány v roztoku brassinosteroidů a/nebo ve vodě a pak inkubovány ve slaném roztoku za přítomnosti (nebo bez) brassinosteroidu. Brassinosteroid neměl vliv na buněčnou ultrastrukturu listů v normálních podmínkách, ale výrazně snížil poškození jader a chloroplastů způsobené stresem zasolením (**Krishna, 2003**). Byla zaznamenána schopnost brassinosteroidů rušit inhibiční účinky zasolení na růst sazenic podzemnice olejné (*Arachis hypogaea*) (**Rao et al., 2002**).

**Bajguz (2000a, b)** zkoumal vliv 24-epibrassinolidu na akumulaci těžkých kovů (měď, olovo, kadmium, zinek) v buňkách zelené řasy *Chlorella vulgaris*. Z první studie zjistil, že 24-epibrassinolid měl pozitivní vliv na růst a dělení buněk zelené řasy po 36ti hodinové kultivaci, především v koncentraci $10^{-8}$ M. Růst buněk byl spojen se zvýšenou sekrecí protonů. Vliv brassinosteroidů na sekreci protonů byl spojen s hyperpolarizací transmembránového elektrického potenciálu a byl také stimulován přítomností K+ iontů v médiu. V druhé studii klesala toxicita kovů s klesajícím pH. Výsledky ukázaly, že 24-epibrassinolid blokoval akumulaci těžkých kovů v této řase. Dokonce po blokaci akumulace těžkých kovů buňky *Chlorella vulgaris* rostly. U rajčete, ředkvičky, a ječmene (*Hordeum vulgare*) také aplikace 24-epibrassinoslidu výrazně snížila adsorpci kovů.

Z předchozího textu je jasné, že pozitivní vliv brassinosteroidů na růst a výnos je nápadnější za stresových podmínek v porovnání s optimálními. Brassinosteroidy zlepšují fotosyntetické vlastnosti rostlin a i dalšími mechanizmy výrazně přispívají ke zvýšené odolnosti rostlin k různým stresům. Přitom také spolupracují s ostatními fytohormony a obrannými mechanizmy rostlin. Jak je vidět při odpovědi na patogeny, je i zde důležitá koncentrace a načasování při použití brassinosteroidů.

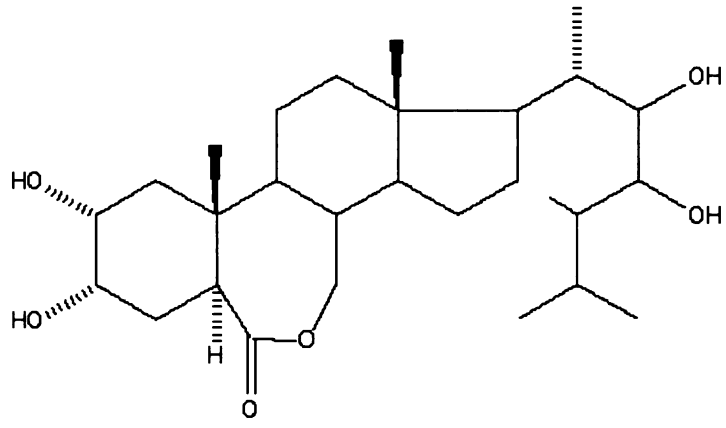
# 3. Materiál a metodika

## 3.1. Materiál

Pokusná rostlina, s kterou jsem v mé práci pracovala, byla kukuřice (*Zea mays* L.), inbrední rodičovské linie 2023 (23) a CE704 (704) a jejich kříženci první dceřinné generace (F1) 2023xCE704 (linie 23 jako mateřský genotyp). Materiál jsem získala ze šlechtitelské stanice CEZEA v Čejči u Hodonína. V letech 2004 a 2005 jsem hodnotila na rostlinách rostoucích ve skleníku fotosyntetické a morfologické charakteristiky, v letech 2003 a 2004 výnosové parametry rostlin rostoucích v polních podmínkách a v roce 2004 jsem provedla pokus na klíčících rostlinách, při kterém jsem pracovala s genotypy F1 a 704, a u genotypu 704 jsem použila stará a nová semena.

Oba brassinosteroidy, přírodní 24-epibrassinolid (E) (**Kohout, 1994**) a syntetický androstanový derivát castasteronu (TO) (**Kohout et al., 2005**) (Obr. 2), které byly v experimentech používány, byly syntetizovány pracovníky z Oddělení steroidů Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Tyto látky byly uchovávány v chladu a pro pokusy byly připraveny jejich vodné roztoky o koncentracích $10^{-8}$ M, $10^{-10}$ M, $10^{-12}$ M a $10^{-14}$ M.

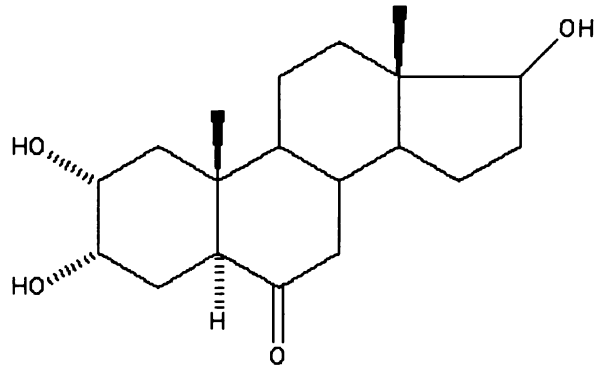
Obr. 2: Struktura 24-epibrassinolidu (nahoře) a syntetického derivátu castasteronu (dole)




$C_{28}H_{48}O_6$
Mol. Wt.: 480.68

(22R,23R,24S)-2α,3α,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-7-oxa-7a-homo-5α-cholestan-6-one

(24-epibrassinolide)




$C_{19}H_{30}O_4$
Mol. Wt.: 322.44

2α,3α,17β-trihydroxy-5α-androstan-6-one

## 3.2. Měření fotosyntetických a morfologických parametrů

### 3.2.1. Pěstování rostlin

Obilky kukuřice jsem vysela do sadbovačů s kompostovou zeminou a umístila do vyhřívaného skleníku, kde byly 11 dní předpěstovány (při každém pokusu bylo zaseto zhruba 500 obilek každého genotypu). Dvanáctý den jsem sadbovače s každým genotypem rozdělila do tří skupin a rostliny v tomto stádiu (2 plně vyvinuté listy - tj. takové, které byly odchlíplé, byl u nich plně vyvinutý jazýček a dále nerostly, a 3-4 viditelné listy) jsem po skupinách natřela roztoky brassinosteroidů a kontrolu vodou (Tab.1) pomocí vaty na tyčince a kapátka, přitom jsem dbala na to, aby na každé rostlině zůstala kapička roztoku v listovém trychtýři na apikálním vrcholu. Z takto ošetřených rostlin jsem vždy větší část (zhruba 10:7) přenesla do chladu (nevyhřívaný skleník) a menší část ponechala i nadále v teple při optimálních podmínkách. Tam rostliny zůstaly až do konce pěstování. 14 dní po natírání jsem provedla postřik rostlin (stejným brassinosteroidem a koncentrací, kterou byly natírány, resp. vodou) pomocí ručního rozprašovače, a to 1 střik na rostlinu. Po dalších 11ti dnech jsem provedla odběry a měření fotosyntetických charakteristik ve čtyřech opakováních. V těchto dnech jsem také odebrala vzorky na měření sušiny a relativního obsahu vody v listu.

Po celou dobu pěstování byly rostliny pravidelně zalévány, nebylo použito žádné umělé osvětlení. Průměrná teplota vzduchu se ve vyhřívaném skleníku pohybovala v rozmezí 21 – 25 / 17 – 22 °C (den / noc), v nevyhřívaném skleníku 13 – 18 /8 – 10 °C (den/noc). Průměrná relativní vlhkost vzduchu se ve sklenících pohybovala okolo 60 / 80 % (den / noc).

### 3.2.2. Měření morfologických charakteristik

Během pěstování jsem sledovala vzhled rostlin. Měřila jsem délky všech internodií a plně vyvinutých listů na rostlině pro zjištění rychlosti vývoje rostlin. Tyto růstové parametry jsem měřila každých 7 dnů po dobu 8 týdnů stále u stejných náhodně

vybraných rostlin pro každou kombinaci genotyp/ošetření (dál jen kombinace). Poprvé jsem rostliny měřila při natírání rostlin (tj. 11 dnů po zasetí).

### 3.2.3. Odběr a zpracování vzorků

Jednotlivé fotosyntetické charakteristiky jsem měřila během čtyř po sobě jdoucích dnů na rostlinách starých 36 – 39 dní. Listové pletivo jsem odebírala vždy 1,5 – 2 hodiny po začátku světelné periody. Každá kombinace byla zastoupena cca 12ti listy (Tab. 1). Odebírala jsem dospělé, plně vyvinuté listy, které již dále nerostly.

Tab.1.: Uspořádání pokusů ovlivnění genotypů kukuřice brassinosteroidy při působeni chladového stresu (Pozn.: Odebírané listy=Listy odebírané pro měření fotosyntetických parametrů, počítáno od báze k vrcholu)

| koncentrace brassinosteroidů | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| výsev | 12.9.2005 | 13.9.2004 | 9.2.2004 | 28.2.2005 |
| ošetření a přesun do chladu | 23.9.2005 | 24.9.2004 | 20.2.2004 | 11.3.2005 |
| postřik | 7.10.2005 | 8.10.2004 | 4.3.2004 | 25.3.2005 |
| odběr pro pokusy | 18-21.10.05 | 19-22.10.04 | 13-16.3.04 | 5-8.4.05 |
| odebírané listy | v teple čtvrté, v chladu třetí | druhé | druhé | třetí |
| počet listů | 12 | 12 | 9-12 dle genotypu | 12 |
| stanovení pigmentů | 3x6 terčíků d=8mm | 3x4 terčíky d=5mm | 3x4 terčíky d=5mm | 3x4 terčíky d=6mm |
| stanovení SpHm | 3x6 terčíků d=8mm | 4x3 terčíky d=5mm | 4x3 terčíky d=5mm | 4x3 terčíky d=6mm |
| odlišnosti | 19.10 problémy s PS I | 22.10 odebrány třetí listy | od 16.3 na pigmenty a Sp Hm odebrány první listy, 18.3 u 704 v teple odebrány třetí listy | u 23 v teple odebírány terčíky d=5mm |

Ihned po odběru listů jsem ze střední části jejich čepele vysekala kruhové terčíky o průměru 5, 6 nebo 8mm (Tab. 1). Od každé kombinace jsem použila 4 vzorky obsahující 3 terčíky (v posledním pokusu 3 vzorky po 6ti terčících) pro stanovení specifické hmotnosti listu (SpHm) a další tři vzorky po čtyřech (šesti) terčících jsem použila pro stanovení obsahů fotosyntetických pigmentů, chlorofylů *a* (Chl a), *b* (Chl b) a celkových karotenoidů (Kar) v každém pokusném dni. Vzorky pro stanovení

specifické hmotnosti listu jsem usušila při 80 °C a po zvážení (torzní váhy Sartorius, Německo) jsem jejich průměrnou hmotnost přepočetla na jednotku listové plochy.

Specifická hmotnost listu (SpHm) je určena jako hmotnost sušiny použitých terčíků přepočtená na jednotku plochy. Výsledné hodnoty uvádím v jednotkách SI, v $g/m^3$.

Terčíky pro stanovení obsahu pigmentů jsem nechala extrahovat v 10 $cm^3$ N,N-dimetylformamidu v chladu a temnu po dobu sedmi dnů. Vzorky jsem během extrakce průběžně pravidelně promíchávala. Potom jsem spektrofotometricky (Anthelie Advanced 2, Secomam, Francie) při vlnových délkách 664 nm, 647 nm, 480 nm a 710 nm (A664, A647, A480 a A710) stanovila obsahy pigmentů. Pro jednotlivé pigmenty byly počítány podle těchto rovnic (**Porra et al. 1989**):

**Chl a = 11,65 . (A664-A710) - 2,69 . (A647-A710)** *[mg/ml]*

**Chl b = 20,81 . (A647-A710) - 4,53 . (A664-A710)** *[mg/ml]*

**Kar = 1000 . [(A480-A710) - 0,89 . Chl a - 52,02 . Chl b] / 245** *[mg/ml]*

Výsledné množství pigmentů, které se vyluhovalo z celkové plochy terčíků, jsem pro další přepočty vynásobila 10ti (používáme 10 ml roztoku). Výsledky jsem přepočetla na jednotku listové plochy (LP) a hmotnost sušiny (S).

### 3.2.4. Příprava vzorků

Z listů jsem odstranila střední žebro, špičku a bázi. Přibližně 1,2 g listového pletiva nastříhaného na malé kousky jsem homogenizovala ve 40 $cm^3$ izolačního média (0,4 M sacharosa, 0,05 M $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0) 18 s homogenizátorem Thurmix 302 (MPW, Polsko) při maximálních otáčkách. Získaný homogenát jsem přefiltrovala přes osm vrstev gázy a centrifugovala na centrifuze K23 (VEB MLW Medizintechnik Leipzig, Německo) 10 min při 1000× g. Takto získaný sediment jsem resuspendovala v 0,6 – 1,5 $cm^3$ resuspendačního média (0,4 M sacharosa, 6 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl, 40 % glycerol, pH 7,0) pomocí skleněné tyčinky obalené vatou. V průběhu

izolace chloroplastů a následného měření jejich fotochemické aktivity jsem vzorky uchovávala ve tmě a chladu při teplotě 0 – 4 °C (**Holá et al., 2003**).

## 3.2.5. Metody stanovení aktivity primárních fotosyntetických procesů

V suspenzích izolovaných chloroplastů jsem nejdříve stanovila obsah chlorofylu, a to v 80% vodném roztoku acetonu na spektrofotometru (Anthelie Advanced 2, Secomam, Francie) při vlnových délkách 663nm, 710nm a 645nm (A663, A710, A645). Do 5 ml acetonu jsem napipetovala 50 μl vzorku, každý vzorek byl nejméně dvakrát opakován. Obsah chlorofylu byl vypočten podle vzorce (**Porra et al. 1989**):

$$\mathbf{Chl = 8{,}02\ (A_{663} - A_{710}) + 20{,}2\ (A_{645} - A_{710})}$$

### 3.2.5.1. Aktivita Hillovy reakce

Fotochemickou aktivitu izolovaných chloroplastů jsem měřila jako aktivitu Hillovy reakce (AHR) a aktivitu fotosystému I (PS I). AHR jsem měřila polarograficky kyslíkovou elektrodou Clarkova typu (Theta´90, Česká republika) jako produkci kyslíku v suspenzích chloroplastů během dvou minut osvětlení „bílým světlem" (170 W . $m^{-2}$ FAR) v přítomnosti umělého akceptoru elektronů (ferrikyanid draselný). V expoziční komůrce (**Bartoš et al. 1975**) byla udržována konstantní teplota 25°C a suspenze chloroplastů byly neustále promíchávány magnetickým míchadlem. Reakční médium bylo shodné s izolačním. Po přidání 50 μl suspenze chloroplastů do komůrky s reakčním médiem jsem sytila dusíkem (až se hladina kyslíku přiblížila nulové hladině), přidali 200 μl roztoku ferrikyanidu draselného (konečná koncentrace v komůrce 7 mM), komůrku uzavřeli a nechali ve tmě. Poté jsem vzorek osvětlila a po ustálení měřila po dobu dvou minut změny koncentrace kyslíku v komůrce spojené s fotochemickou aktivitou chloroplastů (AHR) (**Holá et al., 2003**).

### 3.2.5.2. Aktivita PS I

Aktivitu PS I jsem měřila obdobným způsobem jako AHR, ale jako spotřebu kyslíku izolovanými chloroplasty po jejich osvětlení v přítomnosti umělých akceptorů a donorů elektronů. Složení reakčního média bylo odlišné od média izolačního (0,4 M sacharosa, 50 mM fosfátový pufr, pH 6,5). Jako umělý akceptor elektronů byl použit methylviologen (konečná koncentrace v komůrce 0,1 mM), donorem elektronů byl 2,6-dichlorofenolindofenol (DCPIP, konečná koncentrace 0,15 mM) redukovaný askorbátem sodným. Blokátor elektronového transportu z PS I představovala 3-(3´,4´-dichlorofenyl)-1,1-dimethylmočovina (DCMU, konečná koncentrace 0,1 mM). Dále byl do reakční směsi přidán chlorid amonný ($NH_4Cl$, konečná koncentrace 0,1 mM), který zabraňoval návaznosti fotofosforylace na elektronový transport. Přítomnost malého množství katalasy v reakční směsi bránilo škodlivým oxidačním účinkům $H_2O_2$. Do měřící komůrky nebylo v tomto případě přidáváno 50 $mm^3$ suspenze chloroplastů, ale takový objem, který u každého vzorku odpovídal 7 μg chlorofylu. (**Holá et al., 2003**)

Měření vzorků pro zjištění aktivity PS I a AHR jsem opakovala nejméně dvakrát. Fotochemické hodnoty aktivity PS I a AHR byly vyjádřeny jako množství spotřebovaného/vyprodukovaného kyslíku za sekundu v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu (Chl), (LP) nebo (S). Vypočítány byly podle těchto vzorců:

$$\textbf{AHR (chl)} = \textbf{0,258 . a . } 10^6 \textbf{ / b . c . 120}\ [mmol\ O_2 \,.\, kg^{-1}\ chl \,.\, s^{-1}]$$

$$\textbf{PS I (chl)} = \textbf{50 . 0,258 . a . } 10^6 \textbf{ / V . b . c . 120}\ [mmol\ O_2 \,.\, kg^{-1}\ chl \,.\, s^{-1}]$$

$$\textbf{AHR/PS I (LP) = AHR (PS I) (Chl) . Chl (a+b)}\ [\mu mol\ O_2 \,.\, m^{-2} \,.\, s^{-1}]$$

$$\textbf{AHR/PS I (S) = AHR (PSA I) (LP) / SpHm}\ [\mu mol\ O_2 \,.\, g^{-1} \,.\, s^{-1}]$$

0,258=konstanta rozpustnosti kyslíku při normálním tlaku a teplotě 25 °C $[mol\ O_2 \,.\, m^{-3}]$
a=počet dílků odečtených na stupnici zapisovače během dvou minut měření při osvětlení suspenze chloroplastů
b=počet dílků odečtených na stupnici zapisovače při kalibraci systému (použita byla vždy průměrná hodnota z počáteční a konečné kalibrace)
c=koncentrace chl (a+b) v expoziční komůrce $[g \,.\, m^{-3}]$
V=objem přidávané suspenze chloroplastů

### 3.2.6. Relativní obsah vody v listech

Během každého pokusného dne byly u všech kombinací odebírány plně vyvinuté listy jedné rostliny pro určení relativního obsahu vody v listech (RWC). RWC byl procentuelně stanoven jako podíl hmotnosti vody v listu ihned po jeho ustřižení z rostliny (okamžitá hmotnost - sušina listu) a při jeho plném nasycení vodou, kdy byl list ponechán 5 hod v nádobě s vodou (nasycená hmotnost - sušina listu).

## 3.3. Měření morfologických parametrů klíčících rostlin

Pro zjištění vlivu brassinosteroidů na morfologické parametry klíčících rostlin jsem použila semena genotypů F1 (50 ks/kombinace), 704 (50 ks/kombinace) a stará semena (5 let) genotypu 704 (48 ks/kombinace). Semena jsem na Petriho miskách (o průměru 18 cm) narovnala na 2 vrstvy filtračního papíru a sytila je roztoky brassinosteroidů ve všech čtyřech sledovaných koncentracích a destilovanou vodou jako kontrolou (30 ml na každou misku). Poté jsem misky s jednotlivými kombinacemi přiklopila a ponechala ve tmě v konstantních podmínkách růst. Sedmý až devátý den po umístění semen na Petriho misky jsem měřila délku prýtů a všech kořenů (přitom jsem rozlišovala hlavní kořen). Každý genotyp byl měřen v jiný den. Pokus proběhl 31.5. - 9.6. 2004.

## 3.4. Měření výnosových parametrů

Kukuřici určenou pro polní pokusy jsem vysela v dubnu 2003 a 2004 do sadbovačů s kompostovou zeminou, umístěných v pařeništi. Měsíc nato jsem rostliny přesadila na pokusné pozemky Genetické zahrady Univerzity Karlovy ve sponu 50 x 70 cm (vzdálenost mezi rostlinami v řádku x vzdálenost mezi řádky). 14 dní po přesazení na pole jsem rostliny ošetřila roztoky brassinosteroidů ve všech testovaných koncentracích (jeden střik z ručního rozprašovače na vrchol každé rostliny). Každá

řada (14 rostlin) reprezentovala jednu kombinaci. Kontrolní rostliny byly postříkány vodou.

Po dozrání palic jsem palice sklidila (v roce 2003 jsem z technických důvodů nehodnotila palice u většiny ošetření TO), klasy napadené snětí jsem do měření nezahrnula.

Po vyschnutí palic jsem zaznamenala u každé jednotlivé palice její délku a hmotnost, počet řad, počet semen v řadě, hmotnost semen a hmotnost vřetene. Z těchto údajů jsem dopočetla počet všech semen na palici, hmotnost 1000 semen (HTS) a poměr hmotnosti palice a délky vřetene.

## 3.5. Statistická analýza výsledků

Výsledky polních a fotosyntetických pokusů jsem statisticky zhodnotila analýzou variance a Tukey-Kramerovými testy (hladina průkaznosti p=0,05) pomocí počítačového programu CoStat Version 6.204 (CoHort Software, Monterey, USA). Pro statistické zhodnocení fotosyntetických charakteristik jsem jako výchozí údaje použila průměrné hodnoty měření v každém pokusném dni. Zjišťovala jsem průkaznost rozdílů mezi genotypy (také odlišnost mezi F1 generací a průměrem rodičů), mezi pěstováním (teplo x chlad) a mezi jednotlivými ošetřeními (brassinosteroid TO, 24-epibrassinolid, kontrola). Při hodnocení výnosových charakteristik získaných z polních pokusů jsem hodnotila opět rozdíly mezi genotypy, mezi ošetřeními a mezi jednotlivými koncentracemi použitých brassinosteroidů.

# 4. Výsledky

## 4.1. Fotosyntetické pigmenty

### 4.1.1. Chlorofyl a

Při porovnávání statisticky průkazných rozdílů v hodnotách obsahu chlorofylu *a* (Chl *a* (LP), Chl *a* (S)) mezi rostlinami jednotlivých genotypů (dále jen genotypů) (Tab. 2. a 6.) jsem v mnoha případech zjistila průkazný rozdíl mezi genotypy 704 a 23, u genotypu 704 byly naměřeny vyšší hodnoty obsahu Chl *a* při obou přepočtech. Výjimkou byla koncentrace $10^{-8}$ M, kdy byly v případě ošetření TO a E v teple u obou přepočtů významně vyšší hodnoty obsahu Chl *a* u kříženců F1 generace než u obou rodičů. V některých případech se vyskytl i průkazný rozdíl mezi hodnotami F1 generace a průměrem obou rodičů, konkrétně po ošetření koncentrací $10^{-8}$ M TO a E v teple a při koncentraci $10^{-10}$ M při ošetření E v teple i chladu (Tab.3. a 7.). U ošetření koncentraci $10^{-12}$ M v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny jsem zjistila prokazatelný rozdíl v hodnotách obsahu Chl *a* mezi F1 generací a průměrem rodičů u TO, E i kontroly (K) v teple a K i v chladu, zatímco při přepočtu na jednotku plochy listové čepele byl tento rozdíl průkazný pouze u K v chladu a při použití koncentrace obou brassinosteroidů $10^{-14}$ M u K v teple. Rozdíl v obsahu Chl *a* mezi pěstováním v teple a chladu byl patrný skoro vždy, pouze s některými výjimkami (koncentrace $10^{-10}$ M) (Tab. 5. a 9.).

Při porovnávání rozdílů mezi způsoby ošetření (Tab. 4. a 8.) jsem zjistila po aplikaci $10^{-8}$ M TO výrazně vyšší hodnoty obsahu Chl *a* u genotypu 704 pěstovaného v chladu než u kontroly (Obr. 3. a 7.). Po ošetření $10^{-10}$ M E poklesly významně hodnoty obsahu Chl *a* oproti kontrole u F1 křížence v teple (Obr. 4. a 8.) a při koncentraci $10^{-12}$ M byla zvýšena hodnota obsahu Chl *a* u genotypu 704 po ošetření E v chladu a hodnota Chl *a* (S) u F1 křížence po ošetření TO v teple v porovnání s kontrolou (Obr. 5. a 9.). Významně snížena byla po ošetření $10^{-12}$ M TO hodnota obsahu Chl *a* (LP) u F1 křížence oproti kontrole (Obr. 5.). Při použití koncentrace $10^{-14}$ M TO jsem zaznamenala výrazně vyšší hodnoty obsahu Chl *a* oproti kontrole u

genotypu 23 v teple i chladu a u F1 křížence v teple (Obr. 6. a 10.). Vyšší hodnoty obsahu Chl *a* oproti kontrole jsem naměřila také u genotypu 704 pěstovaného v chladu a ošetřeného $10^{-8}$ M E a u genotypů 23 a F1 ošetřených $10^{-14}$ M E při pěstování v teple. Naměřené hodnoty však u nich vykazovaly velký rozptyl hodnot mezi opakováními, proto bylo toto zvýšení neprůkazné. Stejně tomu bylo i u hodnoty obsahu Chl *a* (LP) u genotypu 23 v teple po ošetření $10^{-10}$ M TO (Obr. 4.) a Chl *a* (S) u genotypu 704 v chladu po ošetření $10^{-12}$ M TO. Naopak výrazně nižší oproti kontrole byly hodnoty obsahu Chl *a* u F1 křížence při ošetření $10^{-10}$ M E a také Chl *a* (LP) u F1 křížence ošetřeného TO koncentrací $10^{-12}$ M při pěstování v chladu. Při použití koncentrace $10^{-14}$ M u genotypu 704 v teple byly výrazně vyšší hodnoty obsahu Chl *a* (LP) při ošetření TO než při ošetření E (Obr. 7.). Tendenci k nižším hodnotám obsahu Chl *a* (i když neprůkazně pro velkou střední chybu průměru) vykazoval kříženec F1 generace v chladu při ošetření $10^{-12}$ M TO (Obr. 9.). Nižší než kontrola (ale pouze o 12% a neprůkazně) byla také hodnota obsahu tohoto pigmentu u genotypu 23 v chladu při ošetření $10^{-12}$ M E (Obr. 5.).

Hodnoty obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku plochy i hmotnosti sušiny byly ve většině případů po aplikaci brassinosteroidů zvýšeny oproti kontrole, zejména při použití koncentrace $10^{-14}$ M, naopak nejvíc snížených hodnot obsahu tohoto pigmentu jsem naměřila po ošetření rostlin koncentrací $10^{-12}$ M. Genotypy 23 a F1 reagovaly na aplikaci brassinosteroidů většinou odlišně než genotyp 704, reakce těchto genotypů se odlišovaly i při pěstování v chladu oproti pěstování v teple.

Tab. 2.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku listové plochy mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0393 | 0,0225 | 0,0744 | 0,1696 |
| E teplo | 0,0478 | 0,0000 | 0,0042 | 0,0919 |
| K teplo | 0,6105 | 0,0114 | 0,0438 | 0,0114 |
| TO chlad | 0,7998 | 0,1637 | 0,0144 | 0,6475 |
| E chlad | 0,4341 | 0,0073 | 0,0000 | 0,0140 |
| K chlad | 0,1580 | 0,4764 | 0,0000 | 0,0321 |

Tab. 3.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku listové plochy mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0336 | 0,0974 | 0,1093 | 0,1232 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,0095 | 0,0005 | 0,0808 | 0,2957 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,4385 | 0,4300 | 0,1887 | 0,0314 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,5994 | 0,2715 | 0,9165 | 0,5867 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,4763 | 0,0321 | 0,1215 | 0,8714 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,3223 | 0,8768 | 0,0004 | 0,3989 |

Tab. 4.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku listové plochy mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,3095 | 0,3835 | 0,9882 | 0,0121 |
| 23 chlad | 0,6715 | 0,9814 | 0,1494 | 0,0002 |
| 704 teplo | 0,0862 | 0,9928 | 0,8935 | 0,0334 |
| 704 chlad | 0,0180 | 0,3767 | 0,0290 | 0,4969 |
| F1 teplo | 0,1754 | 0,0093 | 0,9175 | 0,0158 |
| F1 chlad | 0,8931 | 0,5054 | 0,0298 | 0,7480 |

Tab. 5.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku listové plochy mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0068 | 0,2597 | 0,0002 | 0,0001 |
| 23 E | 0,0206 | 0,0195 | 0,0000 | 0,0001 |
| 23 K | 0,0009 | 0,0556 | 0,0000 | 0,0163 |
| 704 TO | 0,0024 | 0,2240 | 0,0000 | 0,0001 |
| 704 E | 0,0019 | 0,0019 | 0,0000 | 0,0010 |
| 704 K | 0,0002 | 0,6269 | 0,0001 | 0,0012 |
| F1 TO | 0,0008 | 0,3390 | 0,0000 | 0,0035 |
| F1 E | 0,0216 | 0,0028 | 0,0000 | 0,0008 |
| F1 K | 0,0539 | 0,0436 | 0,0000 | 0,1903 |

Tab. 6.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0051 | 0,1897 | 0,0396 | 0,6648 |
| E teplo | 0,0127 | 0,0004 | 0,0001 | 0,0404 |
| K teplo | 0,1775 | 0,0321 | 0,0054 | 0,0094 |
| TO chlad | 0,2576 | 0,1091 | 0,0066 | 0,8610 |
| E chlad | 0,1989 | 0,0134 | 0,0000 | 0,0106 |
| K chlad | 0,2000 | 0,1332 | 0,0012 | 0,0079 |

Tab. 7.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0053 | 0,9909 | 0,0069 | 0,8900 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,0018 | 0,0048 | 0,0051 | 0,2681 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,4357 | 0,5187 | 0,0119 | 0,1946 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,2661 | 0,5138 | 0,8189 | 0,8886 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,4099 | 0,0336 | 0,5643 | 0,7608 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,3340 | 0,6915 | 0,0036 | 0,2664 |

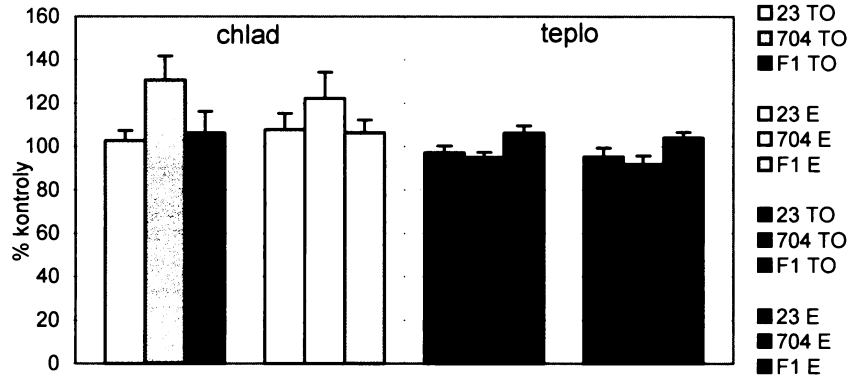
Tab. 8.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,6748 | 0,7615 | 0,3092 | 0,0060 |
| 23 chlad | 0,1953 | 0,3672 | 0,1655 | 0,0008 |
| 704 teplo | 0,0823 | 0,4374 | 0,0895 | 0,7059 |
| 704 chlad | 0,0335 | 0,7202 | 0,0084 | 0,6067 |
| F1 teplo | 0,0670 | 0,0096 | 0,0034 | 0,0299 |
| F1 chlad | 0,8240 | 0,5225 | 0,1850 | 0,9130 |

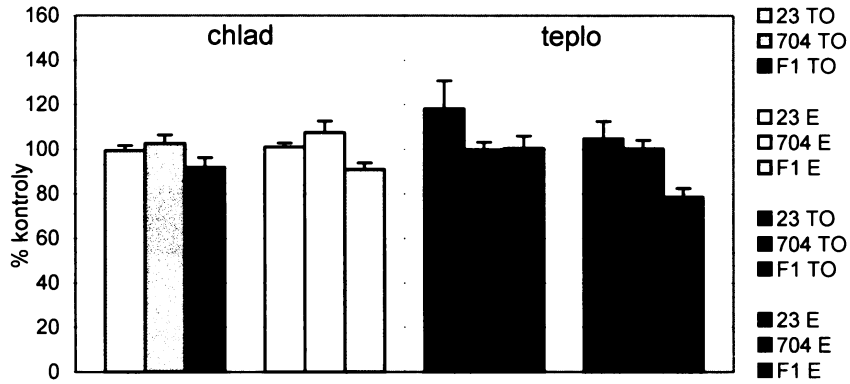
Tab. 9.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0000 | 0,0339 | 0,0002 | 0,0000 |
| 23 E | 0,0002 | 0,1525 | 0,0000 | 0,0000 |
| 23 K | 0,0000 | 0,1543 | 0,0000 | 0,0009 |
| 704 TO | 0,0001 | 0,0011 | 0,0000 | 0,0000 |
| 704 E | 0,0000 | 0,0012 | 0,0000 | 0,0000 |
| 704 K | 0,0000 | 0,0032 | 0,0000 | 0,0000 |
| F1 TO | 0,0000 | 0,0294 | 0,0000 | 0,0002 |
| F1 E | 0,0001 | 0,6304 | 0,0000 | 0,0000 |
| F1 K | 0,0008 | 0,0122 | 0,0000 | 0,0005 |

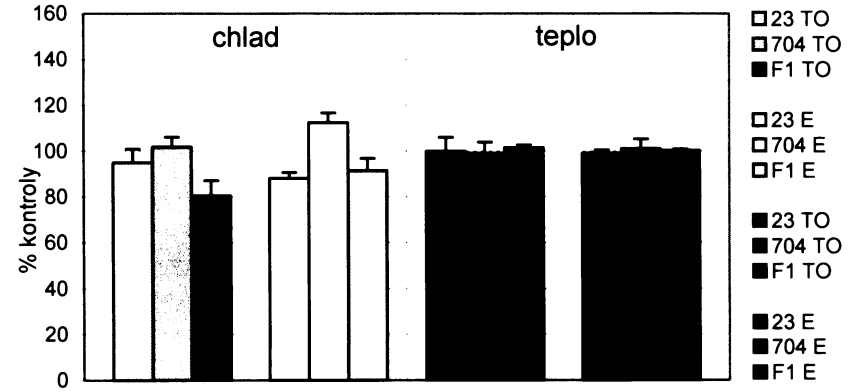
Obr. 3.: Hodnoty obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



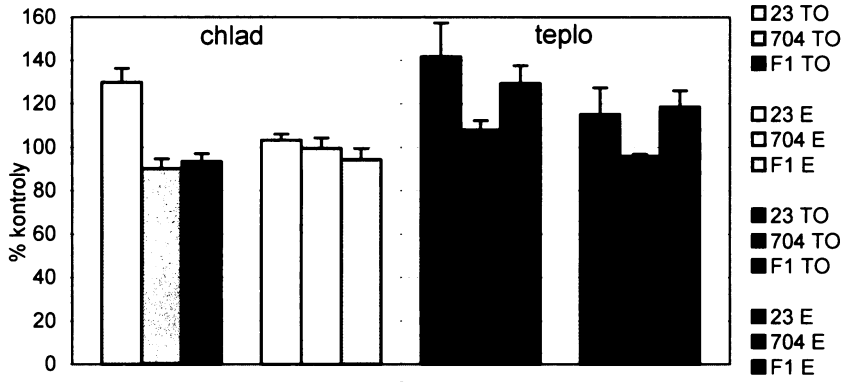

Obr. 4.: Hodnoty obsah chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



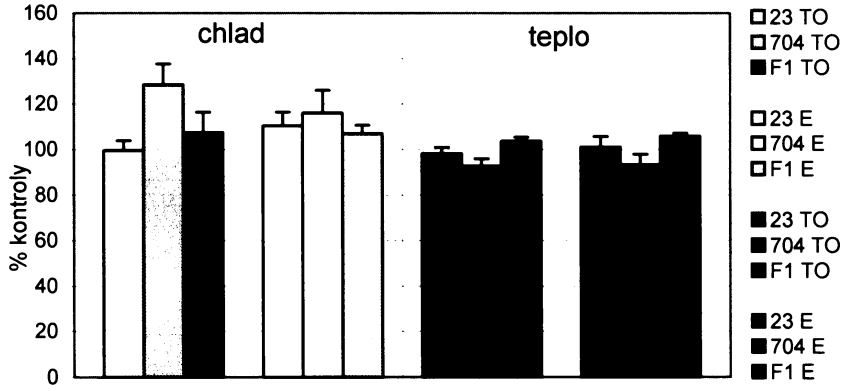

Obr. 5.: Hodnoty obsah chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



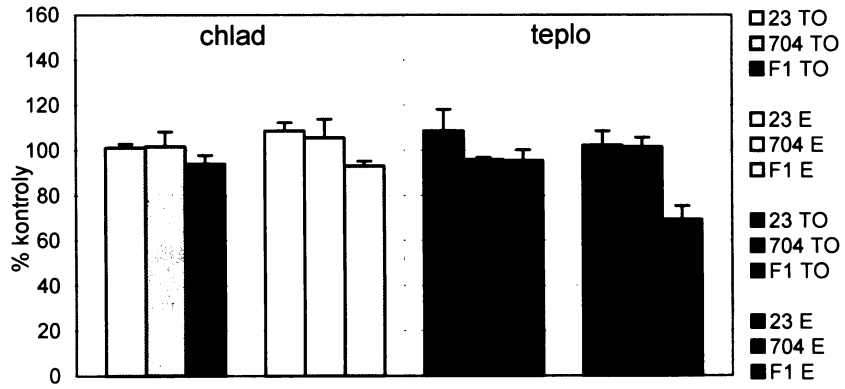
Obr. 6.: Hodnoty obsah chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



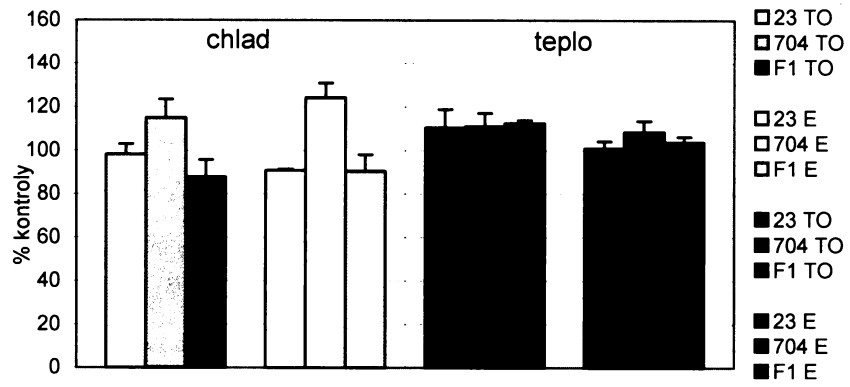

Obr. 7.: Hodnoty obsah chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



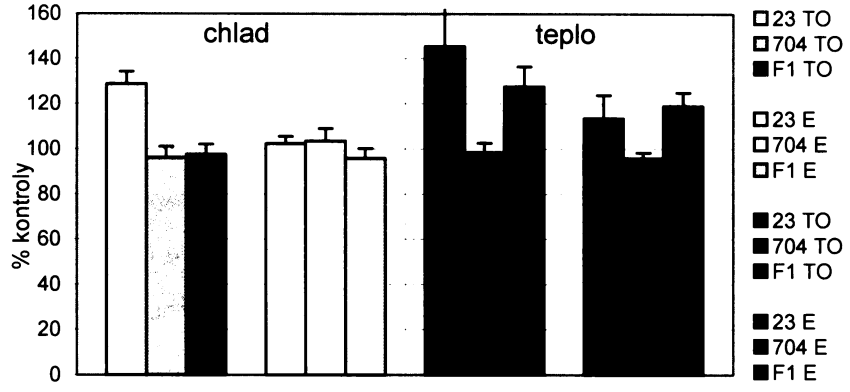

Obr. 8.: Hodnoty obsah chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



Obr. 9.: Hodnoty obsah chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 10.: Hodnoty obsah chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




## 4.1.2. Chlorofyl *b*

Výsledky statistiky prokázaly, že i v případě hodnot obsahu Chl *b* (LP) a Chl *b* (S) dosahoval při ošetření brassinosteroidy nejvyšších hodnot genotyp 704 (pouze při ošetření $10^{-8}$ M převyšují hodnoty naměřené u F1 generace hodnoty u obou rodičovských genotypů), nejnižších pak genotyp 23 (Tab. 10. a 14.). Významný rozdíl v hodnotách obsahu Chl *b* mezi křížencem a průměrem rodičů byl patrný při ošetření E i TO v teple při koncentraci $10^{-8}$ M, při použití koncentrace $10^{-10}$ M E v teple (při přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny také u TO v teple) a u koncentrace $10^{-12}$ M pouze při přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření E v teple a K v chladu.

pouze při přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření E v teple a K v chladu. Po ošetření koncentrací brassinosteroidů $10^{-14}$ M nebyl rozdíl hodnot obsahu Chl *b* mezi průměrem rodičů a F1 generací statisticky významný (Tab. 11. a 15.). Rozdíly mezi způsoby pěstování byly průkazné vždy, kromě hodnoty obsahu Chl *b* (LP) při ošetření koncentrací brassinosteroidů $10^{-10}$ M (Tab. 13. a 17.).

Při porovnávání odlišností mezi způsoby ošetření se také vyskytlo několik průkazných rozdílů mezi ošetřenými a neošetřenými genotypy (Tab. 12. a 16.). Při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M byly významně zvýšeny hodnoty obsahu Chl *b* po ošetření genotypu 704 TO v chladu oproti kontrole (Obr. 11. a 15.). U koncentrace $10^{-10}$ M bylo zaznamnenáno snížení hodnoty obsahu Chl *b* u F1 křížence ošetřeného E při pěstování v chladu a zvýšení oproti kontrole (pro velký rozptyl hodnot neprůkazné) u 23 TO v teple (Obr. 12. a 16.). Hodnoty obsahu Chl *b* (LP) se u všech genotypů po ošetření koncentrací obou brassinosteroidů $10^{-12}$ M výrazně nelišily od hodnot naměřených u kontroly (Obr. 13.), zatímco hodnoty obsahu Chl *b* (S) byly oproti kontrole výrazně zvýšeny po ošetření genotypu 704 E v chladu. Mírně vyšší hodnoty obsahu Chl *b* oproti kontrole (o 13%) jsem naměřila také u F1 křížence ošetřeného koncentrací $10^{-12}$ M TO v teple (Obr. 17.). Koncentrace $10^{-14}$ M nejvíc ovlivnila hodnoty obsahu Chl *b*, bez ohledu na přepočty byly významně vyšší oproti kontrolním hodnotám u genotypu 23 po ošetření TO v chladu, u genotypů 23 a F1 ošetřených TO v teple a ošetření E při pěstování v teple mírně zvětšilo množství Chl *b* u genotypů 23 a 704 oproti kontrole (o 15, resp. 20%) (Obr. 14. a 18.).

Množství chlorofylu *b* bylo ovlivněno aplikací brassinosteroidů méně často než množství chlorofylu *a*, i zde se však nejvíce hodnot vyšších než u kontroly vyskytlo po ošetření $10^{-14}$ M. Navíc i při porovnávání hodnot obsahu chlorofylu *b* se genotyp 704 choval odlišně než genotypy 23 a F1.

Tab. 10.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku listové plochy mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0153 | 0,0125 | 0,2777 | 0,6449 |
| E teplo | 0,1435 | 0,0000 | 0,0400 | 0,1119 |
| K teplo | 0,5828 | 0,0358 | 0,1256 | 0,0061 |
| TO chlad | 0,2878 | 0,1129 | 0,0284 | 0,5537 |
| E chlad | 0,5643 | 0,0178 | 0,0010 | 0,0125 |
| K chlad | 0,4301 | 0,2122 | 0,0071 | 0,0141 |

Tab. 11.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku listové plochy mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0130 | 0,0390 | 0,3910 | 0,4935 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,0262 | 0,0000 | 0,3393 | 0,6234 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,4781 | 0,7952 | 0,5365 | 0,0550 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,5917 | 0,3312 | 0,8211 | 0,4629 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,4159 | 0,1007 | 0,7456 | 0,6989 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,3968 | 0,9774 | 0,0775 | 0,3550 |

Tab. 12.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku listové plochy mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,3077 | 0,0579 | 0,9474 | 0,0082 |
| 23 chlad | 0,7532 | 0,9990 | 0,6140 | 0,0002 |
| 704 teplo | 0,1549 | 0,3254 | 0,9140 | 0,2881 |
| 704 chlad | 0,0206 | 0,4277 | 0,2515 | 0,7050 |
| F1 teplo | 0,1231 | 0,0048 | 0,9263 | 0,0293 |
| F1 chlad | 0,8437 | 0,4576 | 0,2249 | 0,6476 |

Tab. 13.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku listové plochy mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0018 | 0,2081 | 0,0014 | 0,0008 |
| 23 E | 0,0256 | 0,4735 | 0,0000 | 0,0001 |
| 23 K | 0,0016 | 0,5904 | 0,0000 | 0,0016 |
| 704 TO | 0,0065 | 0,0954 | 0,0003 | 0,0002 |
| 704 E | 0,0055 | 0,3484 | 0,0001 | 0,0023 |
| 704 K | 0,0003 | 0,7972 | 0,0007 | 0,0189 |
| F1 TO | 0,0003 | 0,5312 | 0,0001 | 0,0049 |
| F1 E | 0,0242 | 0,1208 | 0,0002 | 0,0039 |
| F1 K | 0,0436 | 0,6178 | 0,0001 | 0,2402 |

Tab. 14.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0050 | 0,2847 | 0,1399 | 0,7730 |
| E teplo | 0,0265 | 0,0000 | 0,0001 | 0,0217 |
| K teplo | 0,2217 | 0,0542 | 0,0506 | 0,0053 |
| TO chlad | 0,0279 | 0,0632 | 0,0079 | 0,1158 |
| E chlad | 0,3754 | 0,0191 | 0,0018 | 0,0078 |
| K chlad | 0,5500 | 0,0730 | 0,0027 | 0,0050 |

Tab. 15.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0087 | 0,7924 | 0,1117 | 0,7191 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,0019 | 0,0004 | 0,0203 | 0,2133 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,5421 | 0,2667 | 0,1559 | 0,3022 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,2372 | 0,5565 | 0,5481 | 0,7169 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,3476 | 0,1288 | 0,7022 | 0,6298 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,4276 | 0,7084 | 0,0161 | 0,2481 |

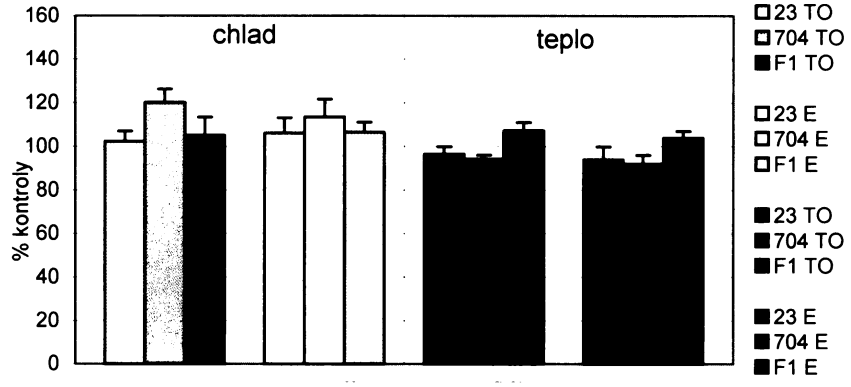
Tab. 16.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,7650 | 0,1651 | 0,4216 | 0,0047 |
| 23 chlad | 0,2322 | 0,7698 | 0,8983 | 0,0005 |
| 704 teplo | 0,1212 | 0,8043 | 0,2413 | 0,9163 |
| 704 chlad | 0,0327 | 0,6998 | 0,0259 | 0,9573 |
| F1 teplo | 0,1562 | 0,0028 | 0,0956 | 0,0447 |
| F1 chlad | 0,7654 | 0,4692 | 0,5135 | 0,8525 |

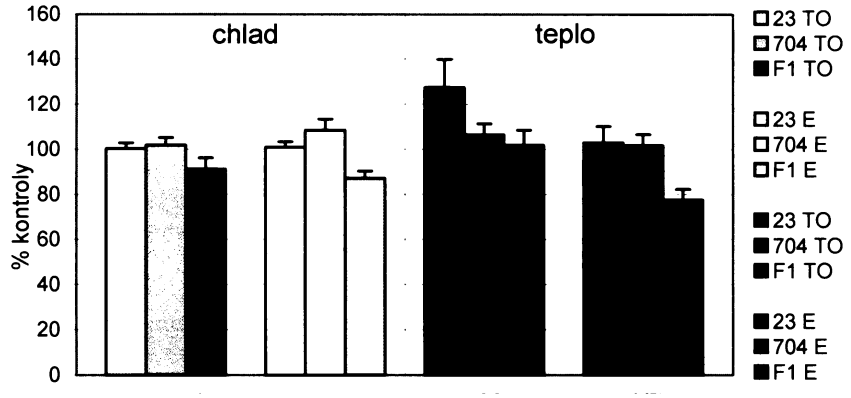
Tab. 17.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0000 | 0,0013 | 0,0007 | 0,0002 |
| 23 E | 0,0003 | 0,0032 | 0,0000 | 0,0000 |
| 23 K | 0,0000 | 0,0296 | 0,0000 | 0,0000 |
| 704 TO | 0,0001 | 0,0000 | 0,0001 | 0,0000 |
| 704 E | 0,0001 | 0,0004 | 0,0000 | 0,0001 |
| 704 K | 0,0000 | 0,0046 | 0,0000 | 0,0002 |
| F1 TO | 0,0000 | 0,0035 | 0,0000 | 0,0004 |
| F1 E | 0,0001 | 0,2324 | 0,0000 | 0,0000 |
| F1 K | 0,0005 | 0,0018 | 0,0000 | 0,0006 |

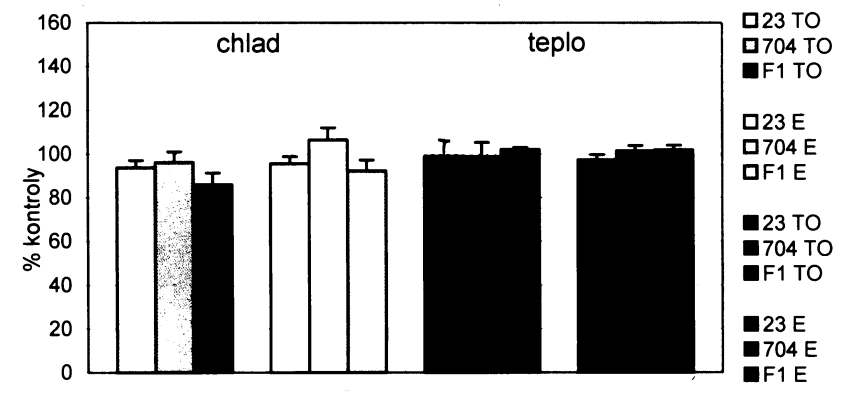
Obr. 11.: Hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



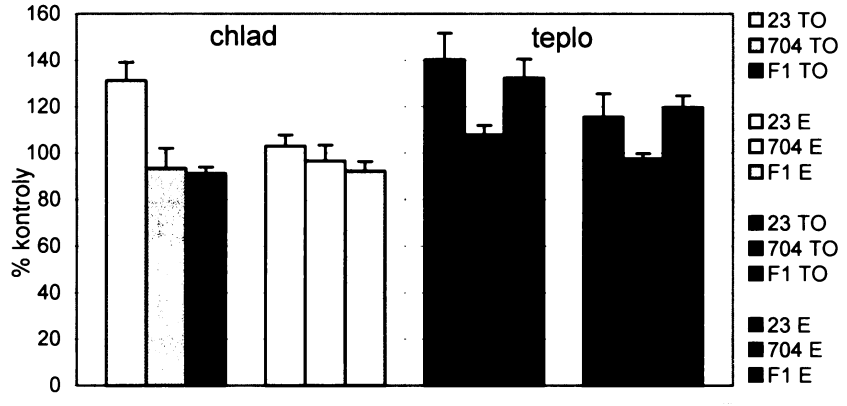

Obr. 12.: Hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



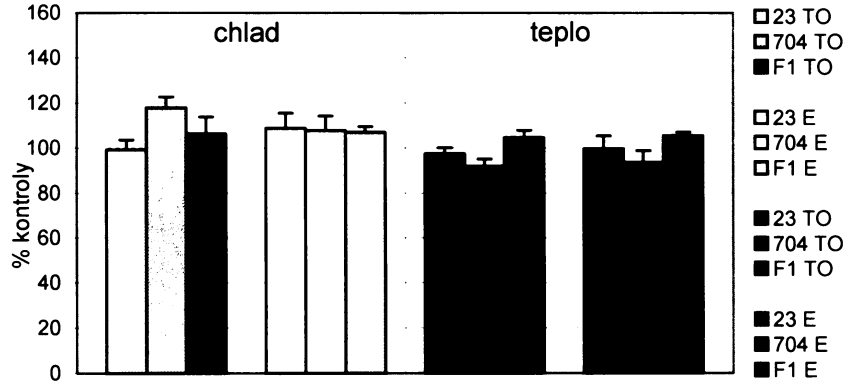

Obr. 13.: Hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



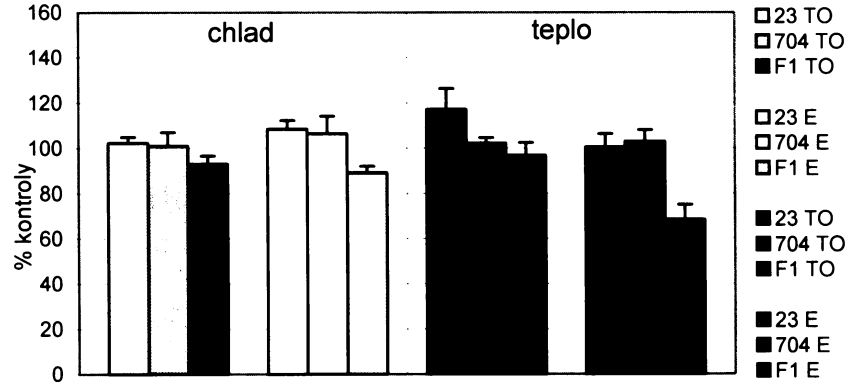
Obr. 14.: Hodnoty obsahu chlorofylu *b* v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



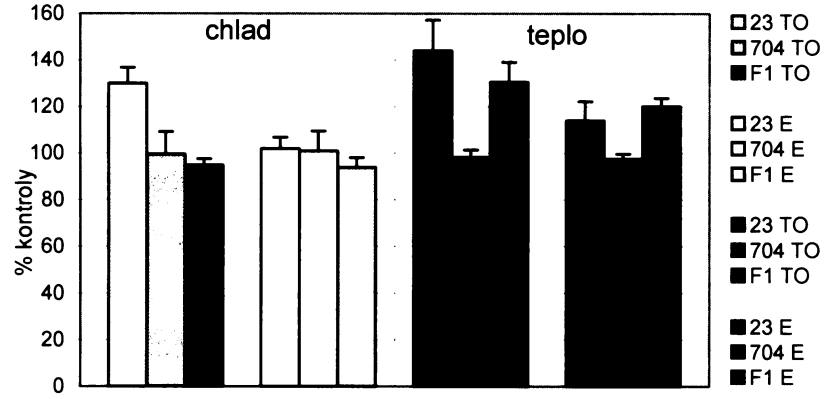

Obr. 15.: Hodnoty obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



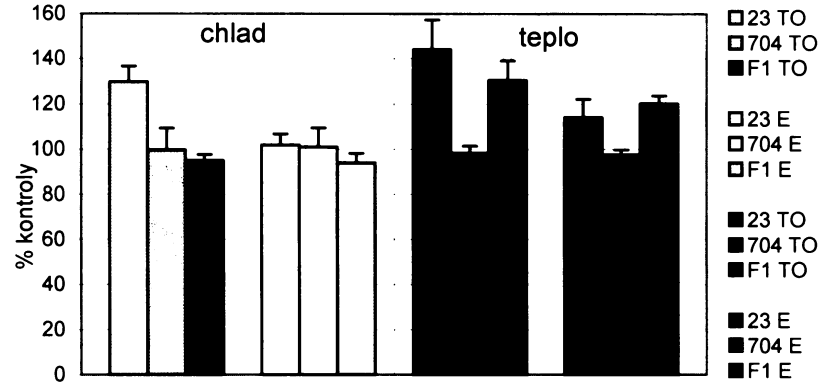

Obr. 16.: Hodnoty obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



Obr. 17.: Hodnoty obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 18.: Hodnoty obsahu chlorofylu *a* v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




## 4.1.3. Celkový obsah chlorofylů

Při porovnávání hodnoty celkového obsahu chlorofylů (Chl (*a+b*)) v přepočtu na jednotku listové plochy a hmotnosti sušiny mezi genotypy se potvrdilo, že největší hodnoty obsahu Chl (*a+b*) obsahují listy genotypu 704, nejméně je jich v listech genotypu 23. Pouze při ošetření koncentrací brassinosteroidů $10^{-8}$ M obsahoval nejvíce Chl (*a+b*) Kříženec F1 generace (Tab. 18. a 22.). Rozdíl mezi průměrem rodičovských genotypů a F1 byl průkazný po ošetření koncentrací $10^{-8}$ M TO a E v teple, a po ošetření $10^{-10}$M E v teple i chladu, kdy nezáleželo na přepočtu. Při přepočtu na jednotku plochy listové čepele byl rozdíl v hodnotách obsahu Chl (*a+b*)

přepočtu na jednotku plochy listové čepele byl rozdíl v hodnotách obsahu Chl (*a+b*) mezi F1 generací a průměrem rodičů významný také u K v chladu ($10^{-12}$ M) a K v teple ($10^{-14}$ M). Po přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny byl tento rozdíl významný u TO, E i K v teple a K v chladu pro koncentraci ošetření $10^{-12}$ M (Tab. 18. a 23.). Rozdíly mezi teplem a chladem byly průkazné ve většině případů (Tab. 20.a 25.).

Při porovnávání rozdílů mezi způsoby ošetření (Tab. 20. a 24.) jsem zjistila při koncentraci $10^{-8}$ M výrazný nárůst hodnot obsahu Chl (*a+b*) u genotypu 704 ošetřeného TO v chladu oproti kontrole, vyšší (o 20%) byly také hodnoty u 704 E v chladu (Obr. 19. a 23.). Při koncentraci brassinosteroidů $10^{-10}$ M klesla výrazně hodnota obsahu Chl (*a+b*) u F1 křížence po ošetření E v teple. Mírně zvýšené byly při ošetření touto koncentrací hodnoty obsahu Chl (*a+b*) (LP) u genotypu 23 TO v teple (neprůkazně kvůli velkému rozptylu hodnot mezi opakováními) ve vztahu ke kontrole. Při použití koncentrace brassinosteroidů $10^{-12}$ M byly v porovnání s kontrolou u ošetřených genotypů naměřeny nižší hodnoty obsahu Chl (*a+b*) (LP) u F1 TO v chladu. U genotypu 704 v chladu byly statisticky významně vyšší hodnoty obsahu Chl (*a+b*) (LP) i (S) oproti kontrole a u F1 křížence ošetřeného TO v teple byly vyšší než u kontroly hodnoty obsahu Chl (*a+b*) (S). Vyšší než u kontroly byla také naměřená hodnota celkového Chl (*a+b*) (S) u genotypu 23 ošetřeného TO v teple (dokonce o 110%), kvůli výraznému rozptylu však neprůkazně (Obr. 21. a 25.). Při pěstování v chladu a při použití koncentrace $10^{-14}$ M byly výrazně vyšší hodnoty obsahu Chl (*a+b*) u genotypu 23 po ošetření TO, v teple byly výrazně vyšší hodnoty naměřeny u genotypu 23 a F1 křížence po ošetření TO a mírně vyšší také u genotypů 23 a F1 po ošetření E oproti kontrole (o 15, resp. 19%) (Obr. 22. a 26.).

Hodnoty procent kontroly obsahu chlorofylů *a* i *b* v listech měly velmi podobné tendence, což potvrdily i hodnoty celkového obsahu chlorofylů (od tohoto trendu se pouze mírně odlišovaly hodnoty naměřené pro množství chlorofylu *b* při pěstování v chladu). Souhrnně lze říct, že brassinosteroidy ovlivňovaly podobným způsobem hodnoty obsahu Chl *a* i Chl *b*. Výrazný pokles hodnot obsahu chlorofylů oproti kontrolním hodnotám jsem naměřila pouze u genotypu 23 (při ošetření $10^{-10}$ M E v teple (Obr. 20. a 24.), a při koncentraci $10^{-12}$ M TO v chladu (Obr. 21.). Nejvíce

zvýšených hodnot oproti kontrolám bylo naměřeno při použití koncentrace $10^{-14}$ M (Obr. 22. a 26).

Tab. 18.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových chlorofylů v přepočtu na jednotku listové plochy mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0301 | 0,0164 | 0,1043 | 0,2580 |
| E teplo | 0,0582 | 0,0000 | 0,0066 | 0,0789 |
| K teplo | 0,6022 | 0,0141 | 0,0507 | 0,0080 |
| TO chlad | 0,7247 | 0,1437 | 0,0144 | 0,7407 |
| E chlad | 0,4794 | 0,0079 | 0,0000 | 0,0124 |
| K chlad | 0,1960 | 0,3807 | 0,0000 | 0,0229 |

Tab. 19.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových chlorofylů v přepočtu na jednotku listové plochy mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0258 | 0,0732 | 0,1609 | 0,1884 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,0105 | 0,0002 | 0,1258 | 0,3272 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,4436 | 0,4979 | 0,2402 | 0,0296 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,5971 | 0,2772 | 0,9854 | 0,5587 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,4632 | 0,0388 | 0,1842 | 0,8117 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,3349 | 0,8985 | 0,0004 | 0,3793 |

Tab. 20.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových chlorofylů v přepočtu na jednotku listové plochy mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,2884 | 0,2561 | 0,9794 | 0,0090 |
| 23 chlad | 0,6844 | 0,9892 | 0,2206 | 0,0002 |
| 704 teplo | 0,0972 | 0,9399 | 0,8894 | 0,0539 |
| 704 chlad | 0,0181 | 0,3650 | 0,0328 | 0,5528 |
| F1 teplo | 0,1546 | 0,0068 | 0,9243 | 0,0172 |
| F1 chlad | 0,8843 | 0,4793 | 0,0395 | 0,7188 |

Tab. 21.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových chlorofylů v přepočtu na jednotku listové plochy mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0053 | 0,5664 | 0,0003 | 0,0002 |
| 23 E | 0,0194 | 0,0372 | 0,0000 | 0,0001 |
| 23 K | 0,0010 | 0,0994 | 0,0000 | 0,0101 |
| 704 TO | 0,0029 | 0,4587 | 0,0000 | 0,0001 |
| 704 E | 0,0023 | 0,0072 | 0,0000 | 0,0012 |
| 704 K | 0,0002 | 0,7646 | 0,0001 | 0,0023 |
| F1 TO | 0,0006 | 0,5246 | 0,0000 | 0,0038 |
| F1 E | 0,0219 | 0,0053 | 0,0000 | 0,0009 |
| F1 K | 0,0515 | 0,0789 | 0,0000 | 0,1935 |

Tab. 22.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových chlorofylů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0047 | 0,1928 | 0,0489 | 0,7216 |
| E teplo | 0,0121 | 0,0002 | 0,0000 | 0,0262 |
| K teplo | 0,1819 | 0,0353 | 0,0076 | 0,0065 |
| TO chlad | 0,1803 | 0,0860 | 0,0054 | 0,6515 |
| E chlad | 0,2321 | 0,0107 | 0,0000 | 0,0091 |
| K chlad | 0,2521 | 0,1050 | 0,0006 | 0,0058 |

Tab. 23.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových chlorofylů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0057 | 0,9499 | 0,0138 | 0,9937 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,0013 | 0,0028 | 0,0023 | 0,2098 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,4551 | 0,4453 | 0,0230 | 0,1984 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,2562 | 0,5114 | 0,7466 | 0,8468 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,3959 | 0,0392 | 0,7736 | 0,7235 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,3495 | 0,6925 | 0,0021 | 0,2495 |

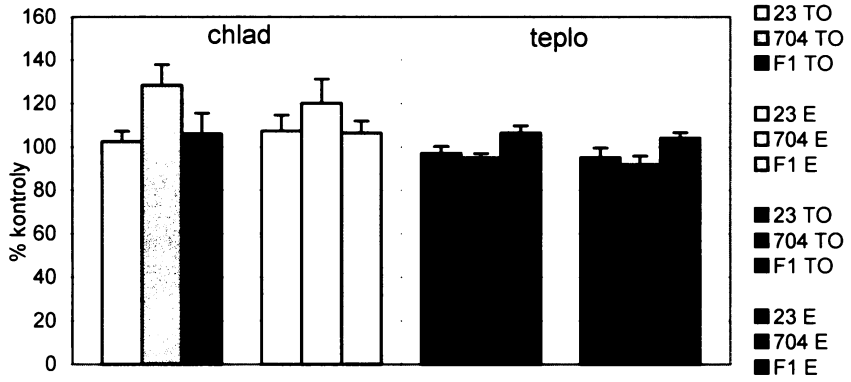
Tab. 24.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových chlorofylů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,6898 | 0,5952 | 0,3224 | 0,0044 |
| 23 chlad | 0,1961 | 0,4544 | 0,2794 | 0,0006 |
| 704 teplo | 0,0879 | 0,5669 | 0,0829 | 0,7657 |
| 704 chlad | 0,0333 | 0,7061 | 0,0052 | 0,7114 |
| F1 teplo | 0,0757 | 0,0069 | 0,0070 | 0,0309 |
| F1 chlad | 0,8129 | 0,4853 | 0,2226 | 0,8980 |

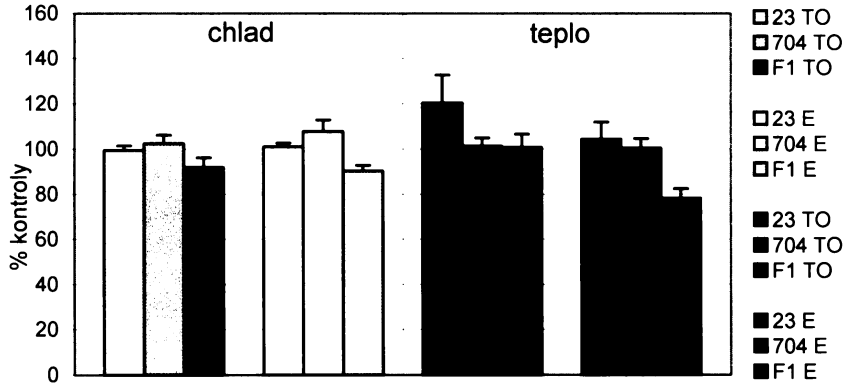
Tab. 25.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových chlorofylů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0000 | 0,0119 | 0,0002 | 0,0000 |
| 23 E | 0,0001 | 0,0494 | 0,0000 | 0,0000 |
| 23 K | 0,0000 | 0,0985 | 0,0000 | 0,0004 |
| 704 TO | 0,0001 | 0,0004 | 0,0000 | 0,0000 |
| 704 E | 0,0000 | 0,0007 | 0,0000 | 0,0001 |
| 704 K | 0,0000 | 0,0034 | 0,0000 | 0,0000 |
| F1 TO | 0,0000 | 0,0169 | 0,0000 | 0,0003 |
| F1 E | 0,0001 | 0,9353 | 0,0000 | 0,0000 |
| F1 K | 0,0007 | 0,0069 | 0,0000 | 0,0005 |

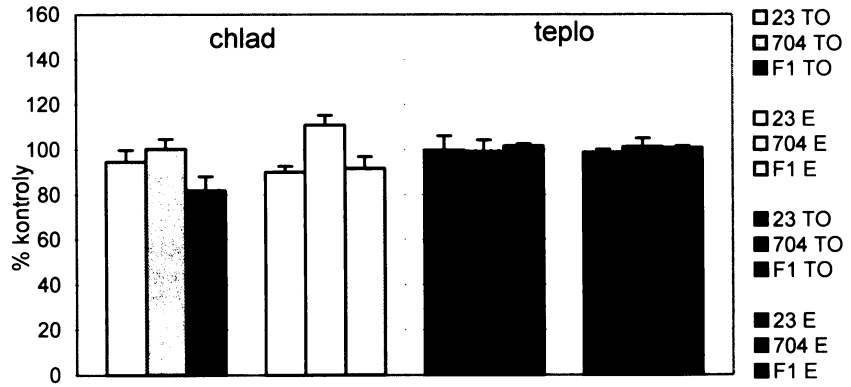
Obr. 19.: Hodnoty celkového obsahu chlorofylů v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



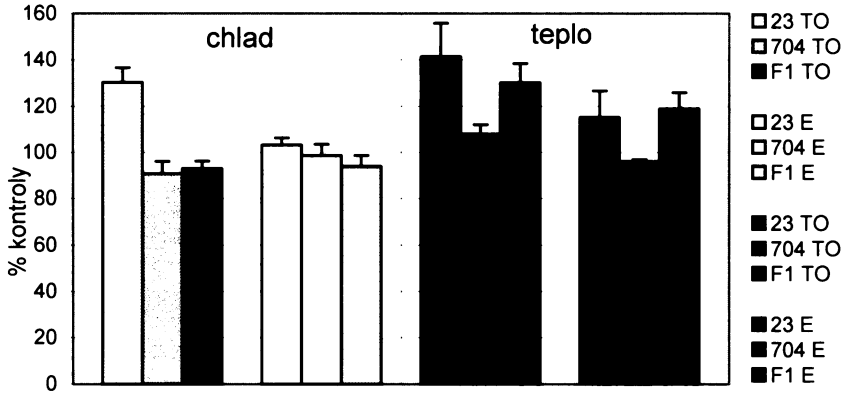

Obr. 20.: Hodnoty celkového obsahu chlorofylů v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



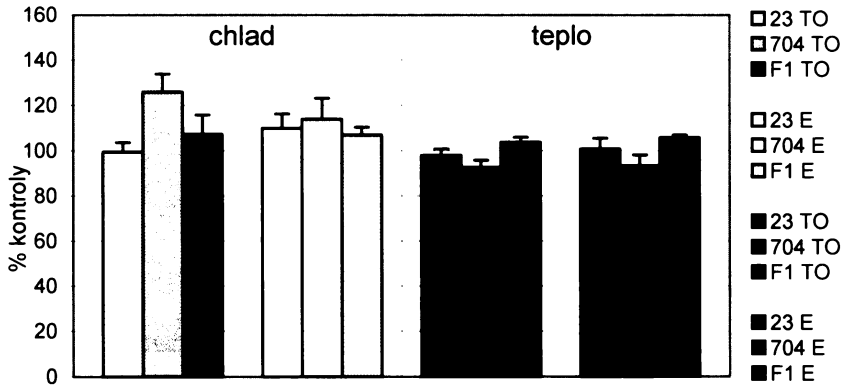

Obr. 21.: Hodnoty celkového obsahu chlorofylů v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



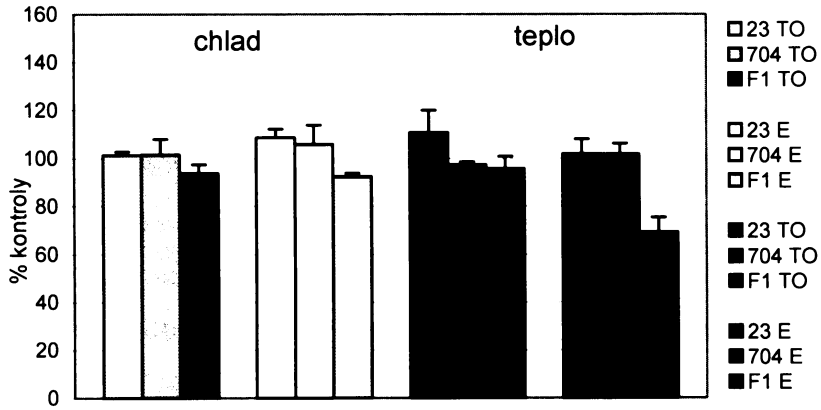
Obr. 22.: Hodnoty celkového obsahu chlorofylů v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



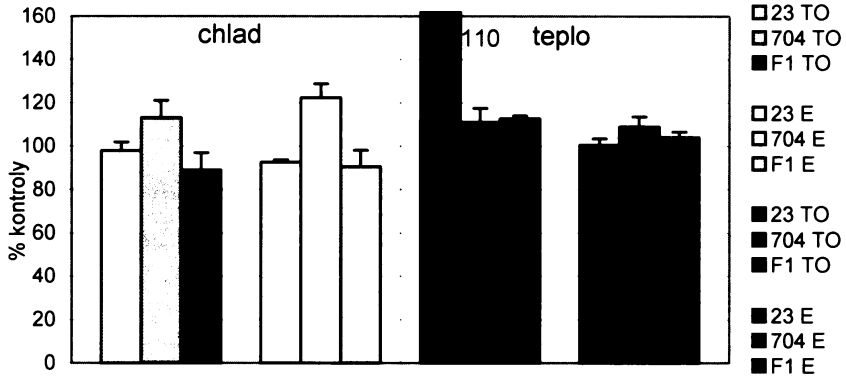

Obr. 23.: Hodnoty celkového obsahu chlorofylů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



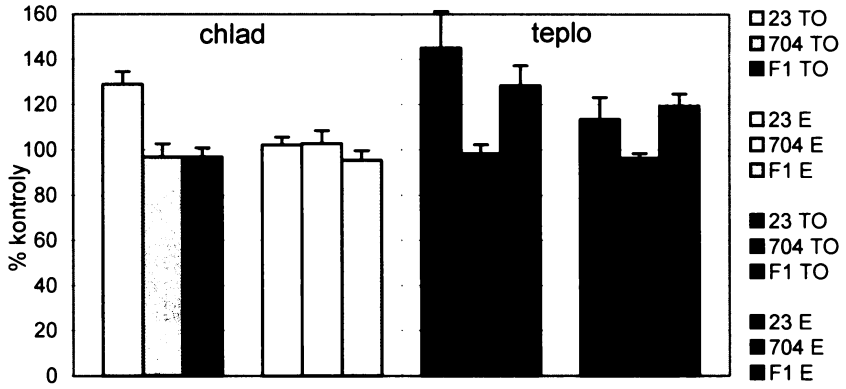

Obr. 24.: Hodnoty celkového obsahu chlorofylů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



Obr. 25.: Hodnoty celkového obsahu chlorofylů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 26.: Hodnoty celkového obsahu chlorofylů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




## 4.1.4. Celkový obsah karotenoidů

Hodnoty obsahu celkových karotenoidů (Kar) byly většinou statisticky významně vyšší po ošetření brassinosteroidy u genotypu 704, nižší u genotypu 23. Pouze při ošetření $10^{-8}$ M byly zjištěny nejvyšší hodnoty obsahu Kar u F1 křížence (Tab. 26. a 30.). Rozdíl hodnot obsahu Kar u F1 křížence a průměru rodičů byl významný pro ošetření E v teple pro většinu koncentrací (vyjma $10^{-14}$ M), také po ošetření TO a pěstování v teple při koncentraci brassinosteroidů $10^{-8}$ M a při ošetření $10^{-10}$ M TO v chladu (Tab. 27. a 31.). Hodnoty obsahu Kar (LP) byly vyšší u křížence oproti rodičům také po ošetření E koncentrací $10^{-10}$ M v chladu (Tab. 27.) a obsah Kar (S) u rostlin

ošetřených TO koncentrací $10^{-12}$ M v teple (Tab. 31.). Při porovnávání rozdílů v hodnotách obsahu Kar při pěstování v chladu oproti pěstování v teple byly často patrné rozdíly, pouze u obsahu Kar (LP) při koncentraci $10^{-14}$ M a $10^{-8}$ M a u hodnot obsahu Kar (S) při koncentraci $10^{-10}$ M se významné rozdíly mezi pěstováním v teple a chladu vyskytly pouze zřídka (Tab. 29. a 33.).

Po ošetření brassinosteroidy také v několika případech významně klesly nebo stouply hodnoty obsahu Kar (LP) nebo obsahu Kar (S) oproti kontrole (Tab. 28. a 32.). Hodnoty obsahu Kar (LP) při použití koncentrace $10^{-8}$ M byly u genotypu 704 v chladu výrazně vyšší než u neošetřené kontroly, po přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny bylo toto zvýšení pouze mírné (o 16%) a statisticky se neprokázalo (Obr. 27. a 31.). Výrazně zvýšen byl při této koncentraci také obsah Kar (S) u F1 křížence E v teple (Obr. 31.). Při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M dosahovaly hodnoty obsahu Kar výrazně nižších hodnot než u neošetřené kontroly u F1 křížence po ošetření E v teple, byly naměřeny také mírně vyšší hodnoty obsahu Kar (LP) oproti kontrole u genotypu 23 TO v teple (o 13%) (Obr. 28. a 32.). Ošetření koncentrací $10^{-12}$ M TO způsobilo mírný pokles hodnoty obsahu Kar (LP) u F1 křížence při pěstování v chladu v porovnání s neošetřenou kontrolou (o 15%), obsah Kar (S) byl významně zvýšen u genotypů 704 po aplikaci TO a E v této koncentraci oproti kontrole (Obr. 29. a 33.). Při aplikaci koncentrace $10^{-14}$ M na rostliny nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v hodnotách obsahu Kar mezi ošetřenými a neošetřenými genotypy, mírně zvýšeny oproti kontrole však byly hodnoty obsahu Kar v teple u genotypu 23 po ošetření TO (o 17-20%) a u F1 křížence po ošetření TO (o 11-13%) a u F1 křížence po aplikaci E v teple (o 12%). Pouze neprůkazně nižší byla hodnota obsahu Kar (LP) u F1 křížence ošetřeného TO v chladu (o 11%) oproti kontrole (Obr. 30. a 34.).

Hodnoty celkového obsahu karotenoidů byly v několika případech vyšší u ošetřených genotypů oproti neošetřeným [obsah Kar (LP) u genotypu 704 TO $10^{-8}$ M v chladu (Obr. 27.), obsah Kar (S) u F1 křížence ošetřeného E $10^{-8}$ M v teple (Obr. 31.), obsah Kar (S) u genotypu 704 E i TO $10^{-12}$ M v chladu (Obr.33.)], nižší než kontrola byl obsah celkových karotenoidů pouze u F1 křížence ošetřeného $10^{-10}$ M E při pěstování v teple (Obr. 28. a 32.). Nejvyšší hodnoty dosáhl obsah celkových

karotenoidů (S) u genotypu 23 ošetřeného koncentrací $10^{-14}$ M TO v teple (120 % kontroly) ovšem s výraznou střední chybou průměru, proto neprůkazně, nejnižší hodnoty obsahu karotenoidů jsem naměřila u F1 křížence po ošetření $10^{-10}$ M E v teple (71 % kontroly) (Obr. 32.).

Tab. 26.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku listové plochy mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0590 | 0,0015 | 0,2188 | 0,0300 |
| E teplo | 0,0475 | 0,0001 | 0,0025 | 0,1153 |
| K teplo | 0,4706 | 0,0005 | 0,0165 | 0,0644 |
| TO chlad | 0,4918 | 0,0024 | 0,3547 | 0,2346 |
| E chlad | 0,5672 | 0,0002 | 0,1359 | 0,0353 |
| K chlad | 0,1225 | 0,0457 | 0,6339 | 0,1067 |

Tab. 27.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku listové plochy mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0280 | 0,1009 | 0,2185 | 0,0648 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,0131 | 0,0008 | 0,0343 | 0,8718 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,5772 | 0,6858 | 0,2133 | 0,1068 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,6425 | 0,0248 | 0,2664 | 0,1331 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,4466 | 0,0070 | 0,9800 | 0,9767 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,1765 | 0,2381 | 0,4187 | 0,4754 |

Tab. 28.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku listové plochy mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,2892 | 0,3790 | 0,9592 | 0,1907 |
| 23 chlad | 0,6397 | 0,9678 | 0,5705 | 0,0975 |
| 704 teplo | 0,1243 | 0,8030 | 0,3983 | 0,2115 |
| 704 chlad | 0,0104 | 0,1983 | 0,4857 | 0,5038 |
| F1 teplo | 0,1337 | 0,0063 | 0,9277 | 0,1027 |
| F1 chlad | 0,9820 | 0,4702 | 0,2284 | 0,3049 |

Tab. 29.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku listové plochy mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,3541 | 0,0004 | 0,1882 | 0,0027 |
| 23 E | 0,4070 | 0,0004 | 0,0001 | 0,0877 |
| 23 K | 0,1857 | 0,0006 | 0,0030 | 0,3987 |
| 704 TO | 0,8648 | 0,0006 | 0,0004 | 0,0088 |
| 704 E | 0,3307 | 0,0002 | 0,0002 | 0,3864 |
| 704 K | 0,0046 | 0,0024 | 0,0021 | 0,2784 |
| F1 TO | 0,1645 | 0,0133 | 0,0054 | 0,0393 |
| F1 E | 0,7005 | 0,0001 | 0,0009 | 0,3842 |
| F1 K | 0,9445 | 0,0017 | 0,0032 | 0,2301 |

Tab. 30.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0027 | 0,0122 | 0,0689 | 0,9561 |
| E teplo | 0,0388 | 0,0006 | 0,0001 | 0,0158 |
| K teplo | 0,0360 | 0,0019 | 0,0145 | 0,0210 |
| TO chlad | 0,0410 | 0,0005 | 0,3801 | 0,0510 |
| E chlad | 0,3107 | 0,0225 | 0,1611 | 0,0153 |
| K chlad | 0,2286 | 0,0090 | 0,1912 | 0,0341 |

Tab. 31.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0031 | 0,7163 | 0,0112 | 0,7977 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,0116 | 0,0076 | 0,0042 | 0,1411 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,3658 | 0,1938 | 0,0597 | 0,4835 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,1748 | 0,0311 | 0,2746 | 0,3652 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,3921 | 0,0758 | 0,4149 | 0,8648 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,1958 | 0,6871 | 0,1648 | 0,3416 |

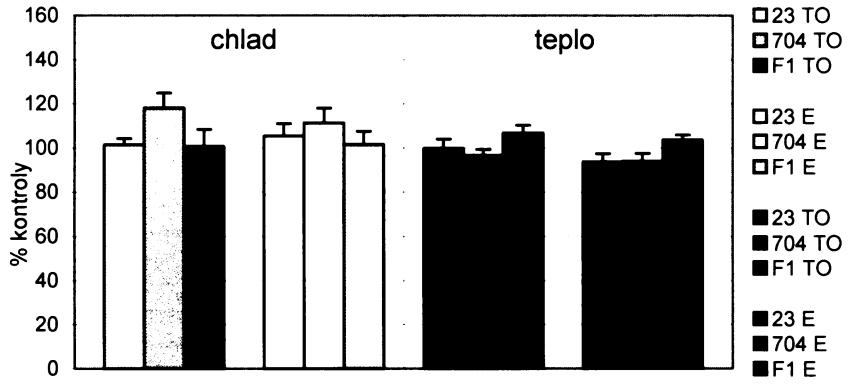
Tab. 32.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,9599 | 0,6986 | 0,3198 | 0,0724 |
| 23 chlad | 0,2250 | 0,0837 | 0,3786 | 0,2707 |
| 704 teplo | 0,1729 | 0,1880 | 0,2179 | 0,5529 |
| 704 chlad | 0,0569 | 0,6056 | 0,0124 | 0,3941 |
| F1 teplo | 0,0457 | 0,0079 | 0,0359 | 0,0997 |
| F1 chlad | 0,9680 | 0,5188 | 0,6195 | 0,6313 |

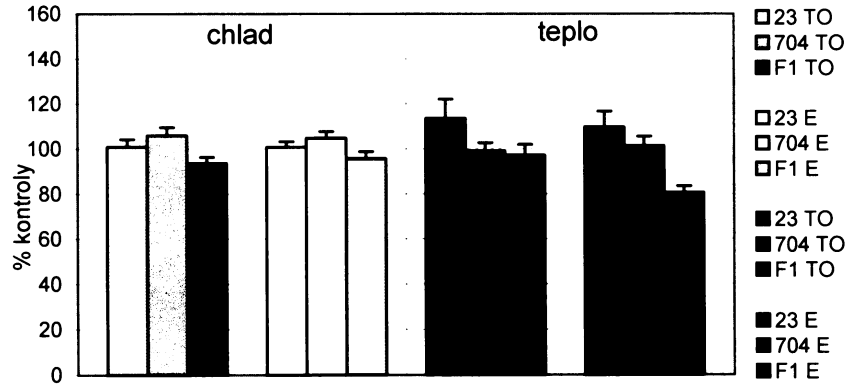
Tab. 33.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0001 | 0,8584 | 0,0114 | 0,0001 |
| 23 E | 0,0417 | 0,7393 | 0,0001 | 0,0002 |
| 23 K | 0,0002 | 0,9511 | 0,0002 | 0,0016 |
| 704 TO | 0,0006 | 0,0723 | 0,0000 | 0,0000 |
| 704 E | 0,0004 | 0,0180 | 0,0000 | 0,0000 |
| 704 K | 0,0002 | 0,0047 | 0,0001 | 0,0001 |
| F1 TO | 0,0000 | 0,0637 | 0,0001 | 0,0002 |
| F1 E | 0,0001 | 0,0969 | 0,0001 | 0,0003 |
| F1 K | 0,0037 | 0,0207 | 0,0002 | 0,0003 |

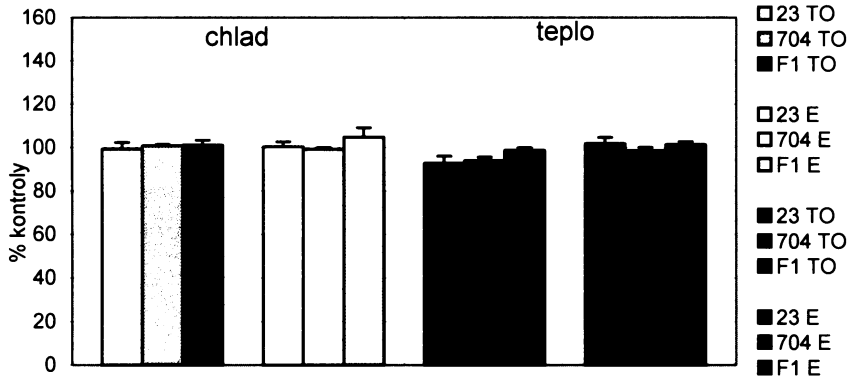
Obr. 27.: Hodnoty obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



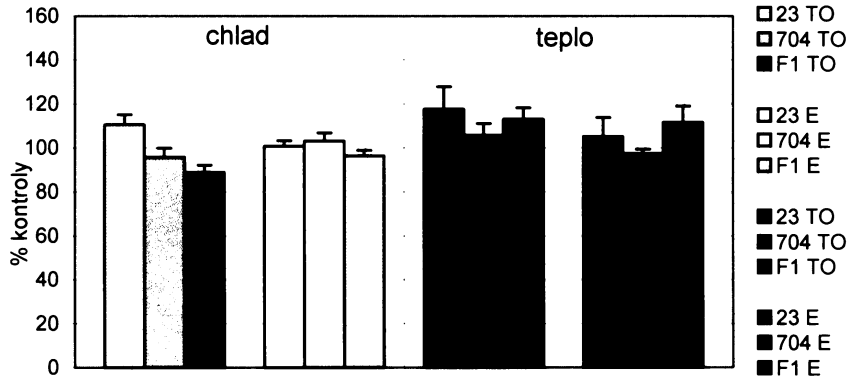

Obr. 28.: Hodnoty obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



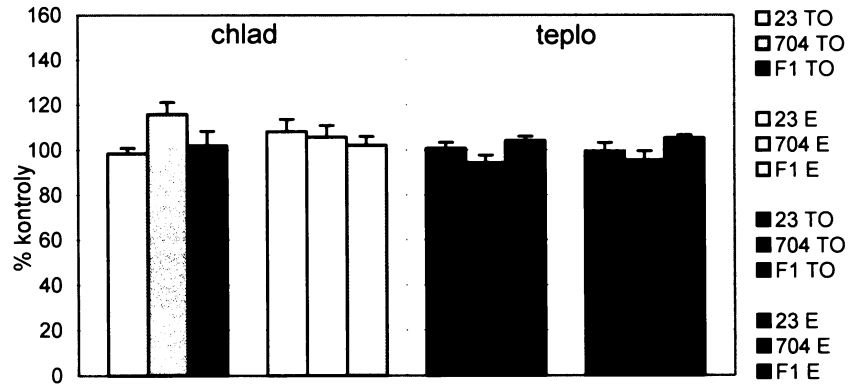
Obr. 29.: Hodnoty obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



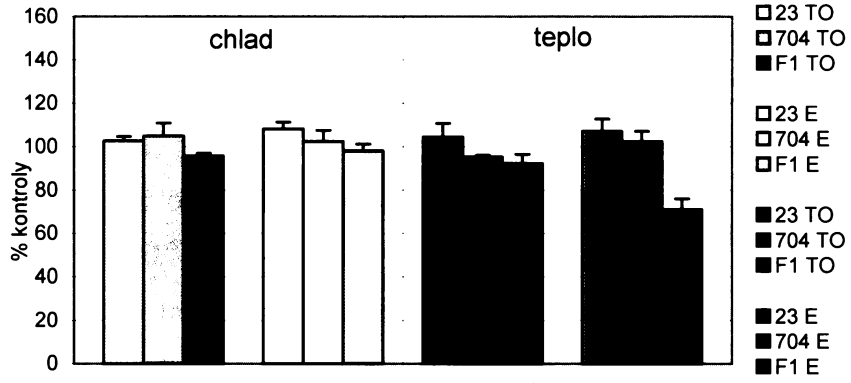

Obr. 30.: Hodnoty obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



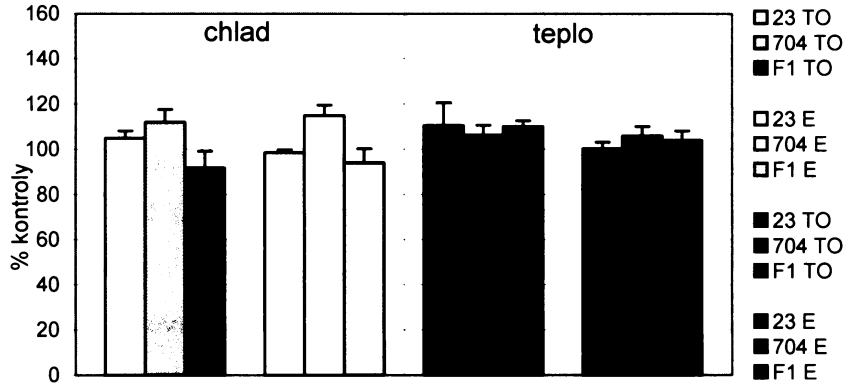

Obr. 31.: Hodnoty obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



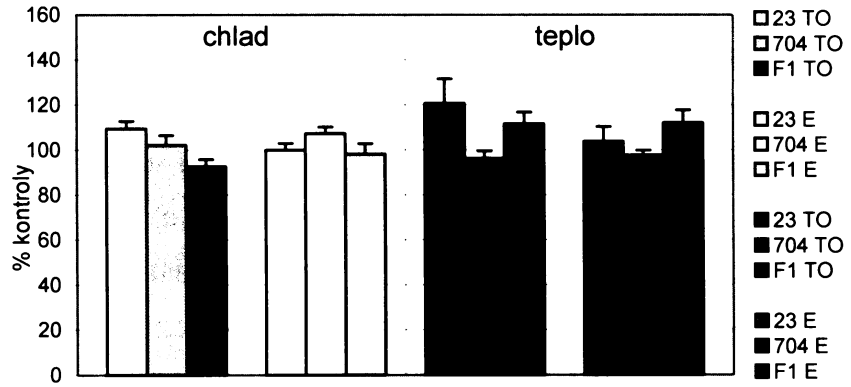
Obr. 32.: Hodnoty obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 33.: Hodnoty obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 34.: Hodnoty obsahu celkových karotenoidů v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



### 4.1.5. Poměry jednotlivých pigmentů

Při porovnání poměrů chlorofylu *a*/chlorofylu *b* (Chl *a*/*b*), jsem zjistila jen v minimu případů statisticky významné rozdíly mezi genotypy (pouze u $10^{-8}$ M E a K v chladu a u $10^{-14}$ M TO v chladu, genotyp 23 dosáhl vyšších hodnot než 704) (Tab. 34.), mezi průměrem rodičů a F1 generací (Tab. 35.) a mezi způsoby ošetření (pouze u 704 v chladu při ošetření $10^{-8}$ M ošetření TO převyšovalo kontrolní hodnoty) (Tab. 36.), prokazatelné rozdíly v poměru Chl *a*/*b* mezi pěstováním v chladu oproti pěstování v teple se však vyskytly, při ošetření oběma brassinosteroidy v koncentracích $10^{-8}$ M se tento poměr lišil u genotypu 704, pro koncentrace $10^{-10}$ M byly většinou rozdíly významné (s výjimkou 704 E a 704 K), při použití koncentrace $10^{-12}$ M byly rozdíly patrné u 23 TO, E i K, 704 K a F1 TO. Po ošetření brassinosteroidy koncentrací $10^{-14}$ M nebyly rozdíly mezi pěstováním v teple a chladu statisticky významné (Tab. 37.).

Poměr obsahu celkových chlorofylů/celkovému obsahu karotenoidů (Chl/Kar) se mezi genotypy statistcky významně odlišoval častěji, při vyšších použitých koncentracích ($10^{-12}$ M a $10^{-14}$ M) byl tento poměr vyšší u genotypu 704 a nižší u genotypu 23, při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M byl naopak významně vyšší tento poměr u genotypu 23 v porovnání se zbylými dvěma (Tab. 38.). Hodnoty Chl/Kar se u průměru rodičů odlišovaly od F1 generace významně pouze při koncentraci 10-12 M TO v chladu a K v chladu (Tab. 39.). Rozdíly mezi pěstováním v teple a chladu byly však významné bez výjimky vždy (Tab. 41.).

Poměry Chl *a*/*b* a Chl/Kar nebyly výrazně ovlivněny aplikací brassinosteroidů (Tab. 36. a 40.), hodnoty těchto poměrů po ošetření byly přibližně shodné jako u kontroly. Významné zvýšení Chl *a*/*b* jsem zjistila jen u ošetření $10^{-8}$ M TO, a to u genotypu 704 při pěstování v chladu. Poměr Chl/Kar byl také u této kombinace vyšší, ale pouze statisticky neprůkazně (o 8%). Výrazně byl zvýšen pouze při koncentraci $10^{-14}$ M TO, a to u genotypů 23 v teple i chladu a F1 v teple, mírné zvýšení tohoto poměru jsem zaznamenala u stejné koncentrace u genotypu 23 E v teple (o 8%). Výrazné snížení obou poměrů nenastalo ani u jednoho měřeného vzorku.

Poměry chlorofylu *a*/chlorofylu *b* a celkových chlorofylů/celkovým karotenoidům nebyly nijak výrazně po aplikaci brassinosteroidů ovlivněny (pouze poměr celkových chlorofylů/celkovým karotenoidům u genotypu 23 a F1 křížence byl výrazně zvýšen při aplikaci koncentrací $10^{-14}$ M TO v porovnání s kontrolou), rozdíly mezi genotypy byly patrné také pouze zřídka. Poměr celkových chlorofylů/celkovým karotenoidům byl však velmi výrazně ovlivněn působením chladu při všech pokusných sériích.

Tab. 34.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v poměrech obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,2512 | 0,4581 | 0,9576 | 0,4267 |
| E teplo | 0,5669 | 0,8038 | 0,6996 | 0,7603 |
| K teplo | 0,8066 | 0,1683 | 0,7312 | 0,8756 |
| TO chlad | 0,0596 | 0,2763 | 0,5565 | 0,0008 |
| E chlad | 0,0094 | 0,2289 | 0,0777 | 0,0914 |
| K chlad | 0,0032 | 0,1667 | 0,3528 | 0,1086 |

Tab. 35.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v poměrech obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,2159 | 0,6073 | 0,9324 | 0,2621 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,7968 | 0,5977 | 0,9851 | 0,7173 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,9865 | 0,2668 | 0,5259 | 0,6827 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,7184 | 0,9045 | 0,5674 | 0,6558 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,7872 | 0,6293 | 0,2328 | 0,5653 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,1664 | 0,6928 | 0,2313 | 0,5235 |

Tab. 36.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v poměrech obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,7693 | 0,2278 | 0,8905 | 0,9687 |
| 23 chlad | 0,7607 | 0,9855 | 0,2119 | 0,8631 |
| 704 teplo | 0,6810 | 0,1308 | 0,9541 | 0,8353 |
| 704 chlad | 0,0404 | 0,9223 | 0,5367 | 0,4227 |
| F1 teplo | 0,7135 | 0,8030 | 0,9191 | 0,8220 |
| F1 chlad | 0,8636 | 0,6817 | 0,4680 | 0,8312 |

Tab. 37.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v poměrech obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,8663 | 0,0071 | 0,0291 | 0,4203 |
| 23 E | 0,9442 | 0,0289 | 0,0034 | 0,1638 |
| 23 K | 0,9865 | 0,0148 | 0,0184 | 0,5227 |
| 704 TO | 0,0033 | 0,0084 | 0,2383 | 0,0621 |
| 704 E | 0,0319 | 0,2156 | 0,1768 | 0,8913 |
| 704 K | 0,0069 | 0,1359 | 0,0454 | 0,3851 |
| F1 TO | 0,8180 | 0,0075 | 0,0161 | 0,2758 |
| F1 E | 0,1277 | 0,0389 | 0,2726 | 0,7512 |
| F1 K | 0,2873 | 0,0078 | 0,2201 | 0,6755 |

Tab. 38.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v poměru obsahu celkových chlorofylů a celkových karotenoidů mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,2607 | 0,0020 | 0,0907 | 0,3105 |
| E teplo | 0,0563 | 0,3103 | 0,7372 | 0,6820 |
| K teplo | 0,4806 | 0,2383 | 0,9053 | 0,0911 |
| TO chlad | 0,8987 | 0,7277 | 0,0001 | 0,2735 |
| E chlad | 0,7176 | 0,5048 | 0,0000 | 0,1823 |
| K chlad | 0,2894 | 0,6584 | 0,0005 | 0,0229 |

Tab. 39.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v poměru obsahu celkových chlorofylů a celkových karotenoidů mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,3850 | 0,0601 | 0,4666 | 0,6743 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,8511 | 0,1727 | 0,9661 | 0,4398 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,8221 | 0,3947 | 0,7333 | 0,2570 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,7499 | 0,4750 | 0,0350 | 0,4787 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,7277 | 0,4588 | 0,0561 | 0,5204 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,8421 | 0,4376 | 0,0325 | 0,4302 |

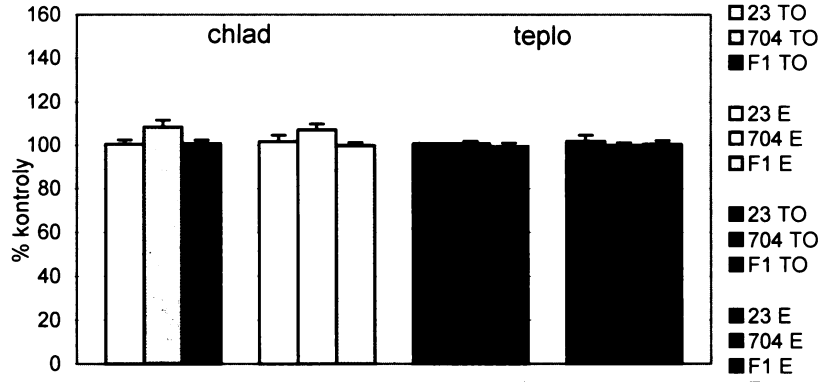
Tab. 40.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v poměru obsahu celkových chlorofylů a celkových karotenoidů mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,3281 | 0,0141 | 0,9937 | 0,0037 |
| 23 chlad | 0,9463 | 0,9790 | 0,1557 | 0,0075 |
| 704 teplo | 0,3548 | 0,5348 | 0,2451 | 0,5879 |
| 704 chlad | 0,1959 | 0,2667 | 0,1409 | 0,3966 |
| F1 teplo | 0,9247 | 0,1058 | 0,5434 | 0,0301 |
| F1 chlad | 0,5084 | 0,4636 | 0,7160 | 0,3296 |

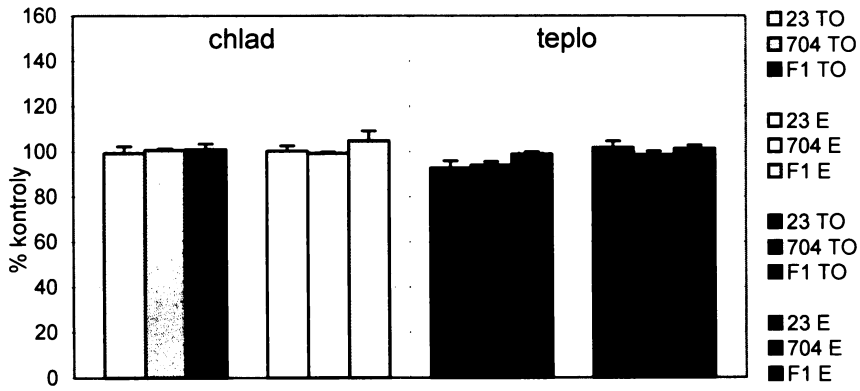
Tab. 41.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v poměru obsahu celkových chlorofylů a celkových karotenoidů mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0012 | 0,0016 | 0,0000 | 0,0001 |
| 23 E | 0,0003 | 0,0083 | 0,0000 | 0,0000 |
| 23 K | 0,0010 | 0,0088 | 0,0000 | 0,0004 |
| 704 TO | 0,0003 | 0,0007 | 0,0000 | 0,0001 |
| 704 E | 0,0004 | 0,0061 | 0,0000 | 0,0003 |
| 704 K | 0,0002 | 0,0053 | 0,0000 | 0,0003 |
| F1 TO | 0,0001 | 0,0031 | 0,0001 | 0,0006 |
| F1 E | 0,0020 | 0,0146 | 0,0000 | 0,0001 |
| F1 K | 0,0003 | 0,0353 | 0,0002 | 0,0081 |

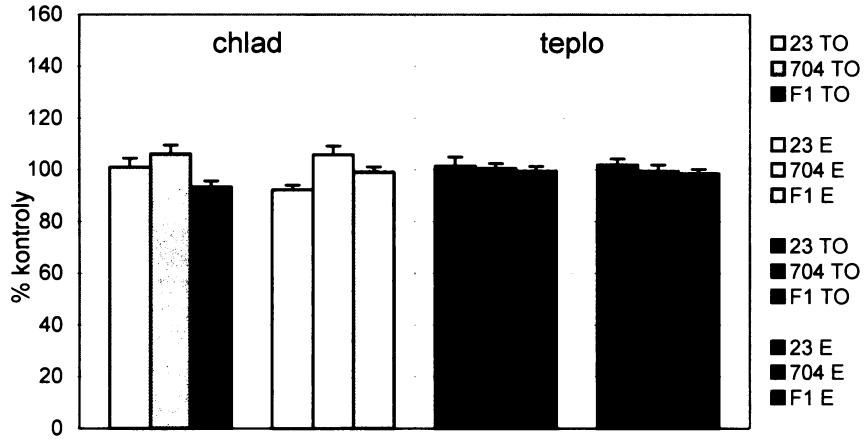
Obr. 35.: Poměr hodnot obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



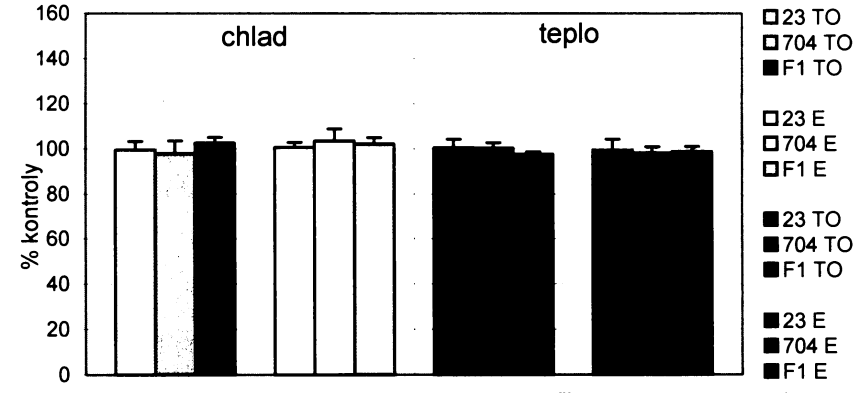

Obr. 36.: Poměr hodnot obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



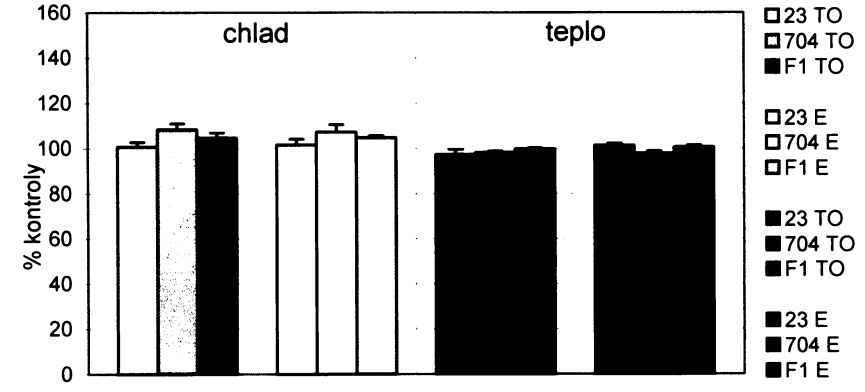
Obr. 37.: Poměr hodnot obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



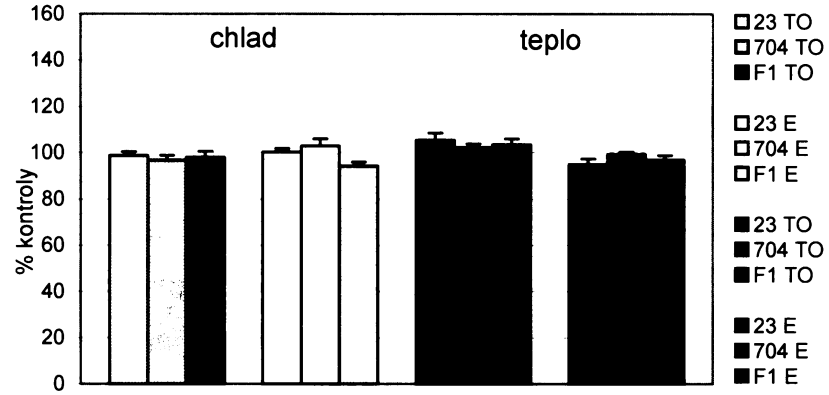

Obr. 38.: Poměr hodnot obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



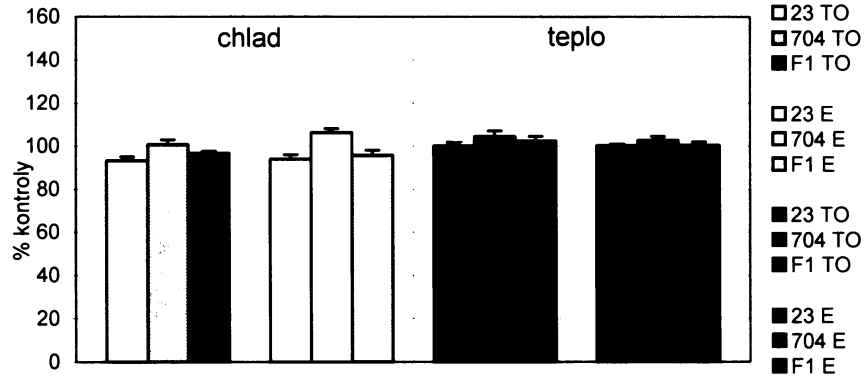

Obr. 39.: Poměr hodnot obsahu celkových chlorofylů a celkových karotenoidů při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



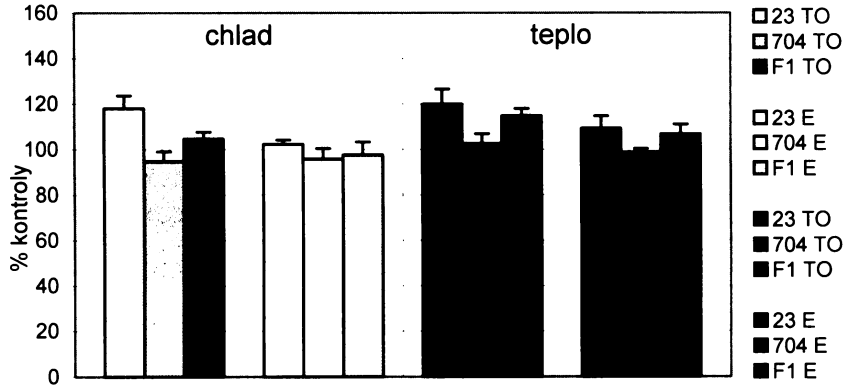
Obr. 40.: Poměr hodnot obsahu celkových chlorofylů a celkových karotenoidů při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 41.: Poměr hodnot obsahu celkových chlorofylů a celkových karotenoidů při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 42.: Poměr hodnot obsahu celkových chlorofylů a celkových karotenoidů při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



## 4.2. Aktivita fotosystému I

Při porovnávání rozdílů mezi genotypy jsem zjistila, že tam, kde se hodnoty aktivity PS I výrazně liší, má genotyp 704 většinou nižší aktivitu PS I než genotyp 23 (Tab. 42., 46. a 50.). Rozdíl průměru rodičů od F1 křížence byl patrný v několika případech, pro hodnoty aktivity PS I (LP) a (S) při pěstování v chladu a ošetřní koncentrací $10^{-8}$ M TO, při ošetření $10^{-12}$ M TO v teple pro všechny přepočty nebo u hodnot aktivity PS I (S) po ošetření koncentracemi E $10^{-10}$ M a $10^{-12}$ M v teple (Tab. 43., 47. a 51). Rozdíly mezi způsoby pěstování (teplo a chlad) byly většinou významné, pouze u hodnot aktivity PS I (S) při koncentraci $10^{-10}$ M a PS I (Chl) při koncentracích $10^{-8}$ M a $10^{-12}$ M nevykazovaly tak významné rozdíly (Tab. 45., 49. a 53.). Hodnoty aktivity PS I jsem kvůli nedostatečnému množství vzorku neměřila u genotypu 704 ošetřeného E a kontroly v chladu v pokusu s koncentracemi $10^{-12}$ M.

Při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M byly zvýšeny hodnoty aktivity PS I oproti kontrolním u genotypu 704 TO v chladu (po přepočtu na jednotkové množství chlorofylu nebyl tento rozdíl průkazný, hodnota aktivity PS I (Chl) byla zvýšena pouze o 11%), v teple byla významně vyšší hodnot aktivity PS I u F1 křížence ošetřeného TO pro všechny přepočty (Obr. 43., 47. a 51.). Neprůkazně, pro velký rozptyl hodnot v jednotlivých měřeních, byly při této koncentraci zvýšeny hodnoty aktivity PS I (LP) a PS I (S) u genotypu 704 po ošetření E v chladu (o 28, resp. 21% podle přepočtu), a sníženy u genotypu 704 ošetřeného E v teple (o 14% ) (Obr. 43. a 47.). Po aplikaci koncentrace brassinosteroidů $10^{-10}$ M byly naměřeny nižší hodnoty aktivity PS I (LP) a PS I (S) u F1 křížence ošetřeného E v porovnání s kontrolou v teple (o 22, resp. 31% podle přepočtu) i v chladu (o 15, resp. 13% podle přepočtu) (Obr. 44. a 48.), ale pouze u PS I (S) v teple bylo toto snížení průkazné (Obr. 48.). Vyšší byly při této koncentraci hodnoty aktivity PS I (LP) a PS I (S) u genotypu 23 TO v teple (o 25, resp. 15% podle přepočtu), pro velký rozptyl hodnot mezi měřeními však neprůkazně (Obr. 44. a 48.). Po přepočtu na jednotkové množství chlorofylu nebyly hodnoty aktivity PS I při této koncentraci změněny v porovnání s neošetřenou kontrolou (Obr. 52.). Po ošetření koncentracemi brassinosteroidů $10^{-12}$ M jsem naměřila výrazný pokles hodnot aktivity PS I u F1 křížence ošetřeného TO v chladu oproti kontrole, nejvíce tato hodnota

poklesla při přepočtu na jednotku listové plochy (Obr. 45.), při přepočtu na hmotnost sušiny a jednotkové množství chlorofylu byl tento pokles mírnější (o 28, resp. 20% podle přepočtu) a statisticky se neprokázal (Obr. 49. a 53.). Hodnoty aktivity PS I (S) byly oproti kontrole mírně vyšší u F1 křížence ošetřeného TO v teple (o 25%) (Obr. 49.). Při ošetření touto koncentrací nebylo možné pro nedostatek vzorku udělat analýzu hodnot aktivity PS I u genotypu 704 v chladu. Koncentrace brassinosteroidů $10^{-14}$ M způsobila významné zvýšení hodnot aktivity PS I (LP) a PS I (S) u genotypu 23 ošetřeného TO v chladu (Obr. 46. a 50.). Prokazatelně zvýšeny byly také hodnoty aktivity PS I (Chl) u genotypu 23 po ošetření E (Obr. 54.), po přepočtu na jednotku listové plochy a hmotnost sušiny bylo toto zvýšení také patrné, ale pouze o 18% a tedy se neprokázalo být významné (Obr. 46. a 50.). Tendenci dosahovat po ošetření brassinosteroidy vyšších aktivit PS I (LP) i PS I (S) měly při této koncentraci genotypy 23 a F1 v teple (o 13-33%), pro velký rozptyl se však tato tendence statisticky neprokázala (Obr. 46. a 50.). Neprůkazné bylo také mírné snížení (o 17%) hodnot aktivity PS I (S) u genotypu 704 ošetřeného TO v chladu (Obr. 46).

Hodnoty aktivity fotosystému I byly nejvíce snížené oproti kontrole při použití koncentrace brassinosteroidů $10^{-12}$ M v chladu, nejvíce zvýšených hodnot se vyskytlo při koncentraci $10^{-14}$ M v teple a $10^{-8}$ M v chladu v porovnání s kontrolou. Nejméně změn po ošetření brassinosteroidy jsem zaznamenala při aplikaci obou brassinosteroidů v koncentraci $10^{-10}$ M. Po přepočtu na jednotkové množství chlorofylu nebyly zaznamenány tak četné změny jako při přepočtu na jednotku listové plochy a hmotnost sušiny. Zvýšené a snížené hodnoty aktivity PS I (LP) přibližně odpovídaly tendencím u PS I (S).

Tab. 42.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotku listové plochy mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0839 | 0,3399 | 0,0405 | 0,6082 |
| E teplo | 0,0075 | 0,0024 | 0,0219 | 0,3890 |
| K teplo | 0,2852 | 0,0893 | 0,0992 | 0,0218 |
| TO chlad | 0,0105 | 0,9920 | 0,5047 | 0,0535 |
| E chlad | 0,3144 | 0,1184 | 0,3278 | 0,4443 |
| K chlad | 0,0216 | 0,4726 | 0,1015 | 0,2576 |

Tab. 43.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotku listové plochy mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0602 | 0,2195 | 0,0189 | 0,3884 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,3318 | 0,0026 | 0,1246 | 0,0717 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,1569 | 0,3862 | 0,5368 | 0,0255 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,0234 | 0,9673 | 0,4007 | 0,1676 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,2687 | 0,1672 | | 0,2533 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,1217 | 0,4200 | | 0,6211 |

Tab. 44.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotku listové plochy mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,8022 | 0,3389 | 0,4962 | 0,1058 |
| 23 chlad | 0,4509 | 0,8898 | 0,5994 | 0,0157 |
| 704 teplo | 0,1870 | 0,5533 | 0,5294 | 0,2637 |
| 704 chlad | 0,0131 | 0,2758 | | 0,2727 |
| F1 teplo | 0,0155 | 0,0316 | 0,4838 | 0,0696 |
| F1 chlad | 0,8830 | 0,4803 | 0,0438 | 0,4900 |

Tab. 45.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotku listové plochy mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0157 | 0,0163 | 0,0035 | 0,0349 |
| 23 E | 0,0403 | 0,0032 | 0,0001 | 0,0283 |
| 23 K | 0,0241 | 0,0060 | 0,0000 | 0,0276 |
| 704 TO | 0,3516 | 0,0083 | 0,0000 | 0,0036 |
| 704 E | 0,2225 | 0,0000 | | 0,1518 |
| 704 K | 0,0049 | 0,0033 | | 0,0596 |
| F1 TO | 0,0388 | 0,0590 | 0,0000 | 0,0143 |
| F1 E | 0,4554 | 0,0008 | 0,0053 | 0,0212 |
| F1 K | 0,8981 | 0,0005 | 0,0058 | 0,9077 |

Tab. 46.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0056 | 0,9505 | 0,0142 | 0,5971 |
| E teplo | 0,0111 | 0,0060 | 0,0062 | 0,9933 |
| K teplo | 0,4739 | 0,2362 | 0,0310 | 0,0372 |
| TO chlad | 0,0038 | 0,8736 | 0,6074 | 0,2681 |
| E chlad | 0,1938 | 0,3193 | 0,4752 | 0,4433 |
| K chlad | 0,0287 | 0,1265 | 0,1738 | 0,1403 |

Tab. 47.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0056 | 0,9176 | 0,0048 | 0,9105 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,2142 | 0,0096 | 0,0358 | 0,8822 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,2478 | 0,7875 | 0,1356 | 0,1845 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,0101 | 0,7513 | 0,4548 | 0,3903 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,2214 | 0,3106 | | 0,4356 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,1287 | 0,2105 | | 0,4839 |

Tab. 48.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,5431 | 0,6523 | 0,9965 | 0,0850 |
| 23 chlad | 0,1872 | 0,6916 | 0,6906 | 0,0394 |
| 704 teplo | 0,1404 | 0,6545 | 0,1867 | 0,5754 |
| 704 chlad | 0,0171 | 0,4219 | | 0,3474 |
| F1 teplo | 0,0054 | 0,0251 | 0,0515 | 0,0993 |
| F1 chlad | 0,7827 | 0,4934 | 0,1023 | 0,6285 |

Tab. 49.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0004 | 0,7686 | 0,0013 | 0,0013 |
| 23 E | 0,0018 | 0,4008 | 0,0000 | 0,0004 |
| 23 K | 0,0011 | 0,6651 | 0,0000 | 0,0006 |
| 704 TO | 0,0026 | 0,4889 | 0,0000 | 0,0004 |
| 704 E | 0,0026 | 0,6483 | | 0,0040 |
| 704 K | 0,0011 | 0,7615 | | 0,0002 |
| F1 TO | 0,0001 | 0,9069 | 0,0000 | 0,0006 |
| F1 E | 0,0030 | 0,0175 | 0,0006 | 0,0001 |
| F1 K | 0,0287 | 0,3754 | 0,0008 | 0,0076 |

Tab. 50.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,2398 | 0,1138 | 0,0120 | 0,8275 |
| E teplo | 0,0023 | 0,0019 | 0,0005 | 0,0071 |
| K teplo | 0,2733 | 0,2883 | 0,0001 | 0,1200 |
| TO chlad | 0,1871 | 0,1048 | 0,0002 | 0,0031 |
| E chlad | 0,5210 | 0,0106 | 0,1203 | 0,0000 |
| K chlad | 0,0954 | 0,4506 | 0,2536 | 0,1769 |

Tab. 51.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,2265 | 0,7686 | 0,0138 | 0,8490 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,1999 | 0,5900 | 0,2211 | 0,1669 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,1778 | 0,3633 | 0,6517 | 0,6956 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,1269 | 0,3509 | 0,0434 | 0,1262 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,3380 | 0,1063 | | 0,0013 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,1860 | 0,3653 | | 0,5723 |

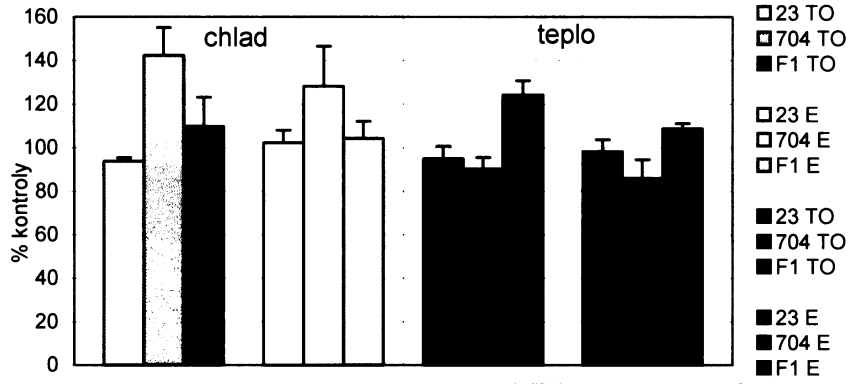
Tab. 52.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,7716 | 0,6064 | 0,1838 | 0,1224 |
| 23 chlad | 0,5244 | 0,4472 | 0,5593 | 0,0063 |
| 704 teplo | 0,4961 | 0,3551 | 0,2137 | 0,6442 |
| 704 chlad | 0,5319 | 0,2693 | | 0,2126 |
| F1 teplo | 0,0268 | 0,6631 | 0,3194 | 0,5240 |
| F1 chlad | 0,6596 | 0,6901 | 0,1052 | 0,3738 |

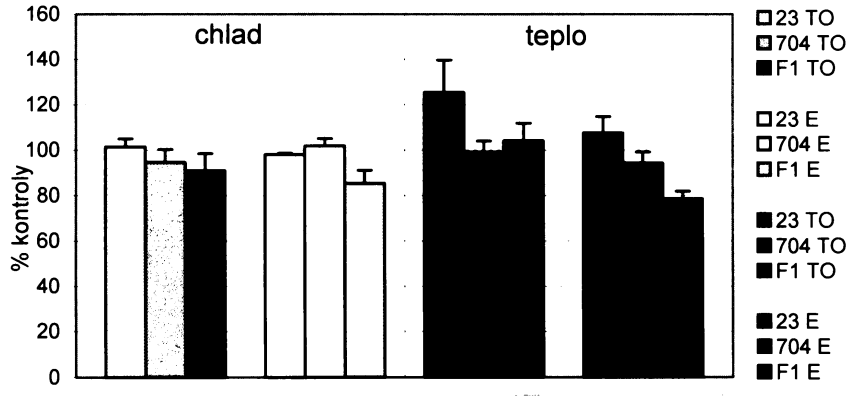
Tab. 53.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v naměřených hodnotách aktivity PS I v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,8962 | 0,0030 | 0,0630 | 0,0048 |
| 23 E | 0,5148 | 0,0001 | 0,1194 | 0,0001 |
| 23 K | 0,5844 | 0,0001 | 0,0873 | 0,0096 |
| 704 TO | 0,0873 | 0,0020 | 0,9009 | 0,2090 |
| 704 E | 0,1852 | 0,0000 | | 0,0122 |
| 704 K | 0,8092 | 0,0068 | | 0,0124 |
| F1 TO | 0,1139 | 0,0099 | 0,0148 | 0,0656 |
| F1 E | 0,0307 | 0,0000 | 0,7328 | 0,0024 |
| F1 K | 0,0044 | 0,0013 | 0,1385 | 0,0661 |

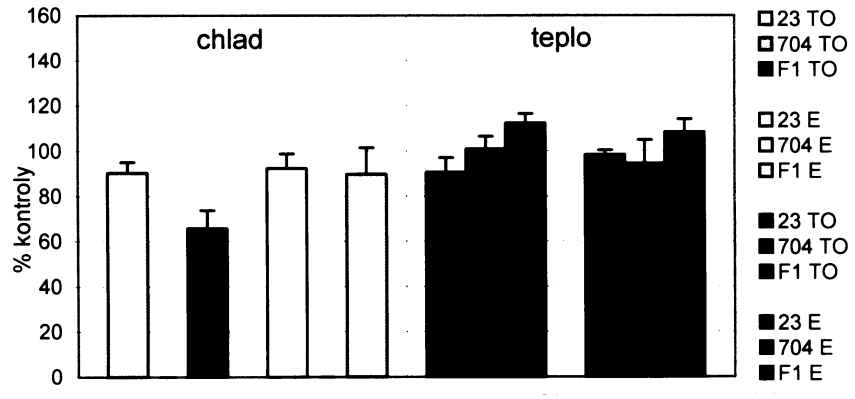
Obr. 43.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



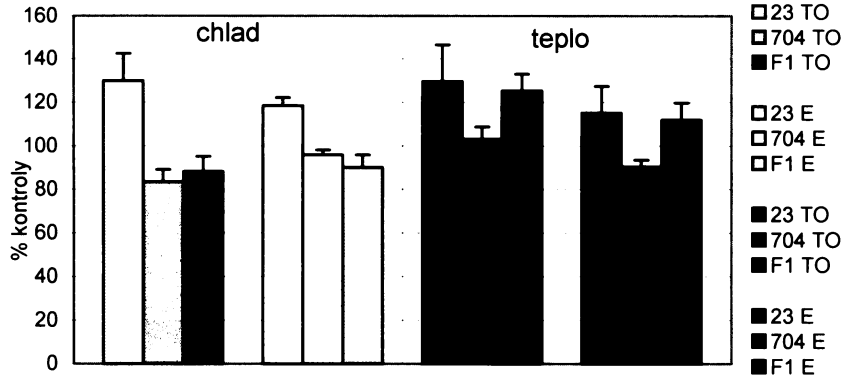

Obr. 44.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



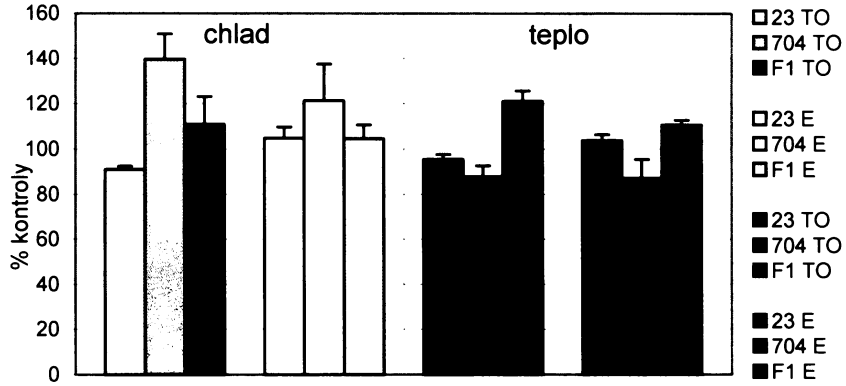

Obr. 45.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



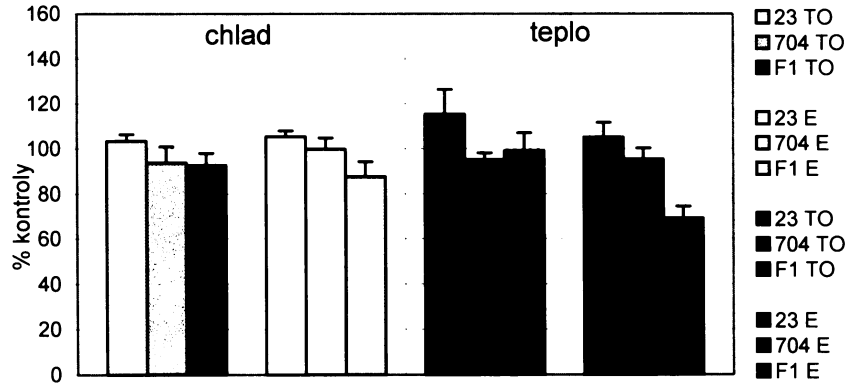
Obr. 46.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



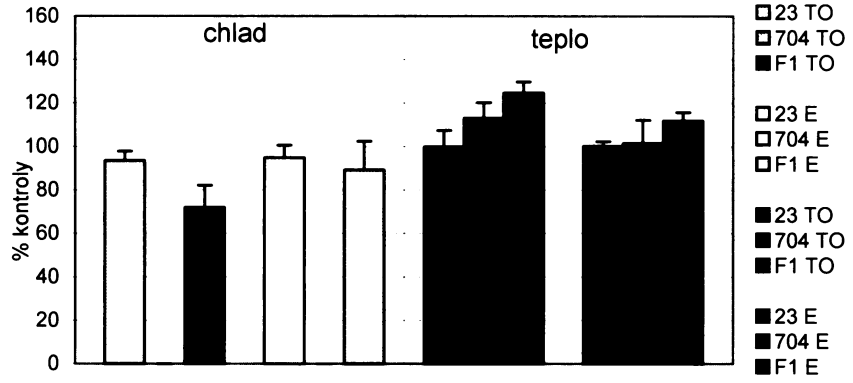

Obr. 47.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



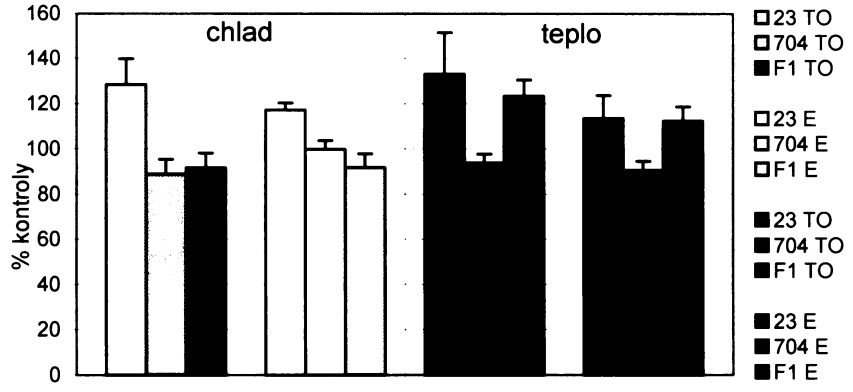

Obr. 48.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



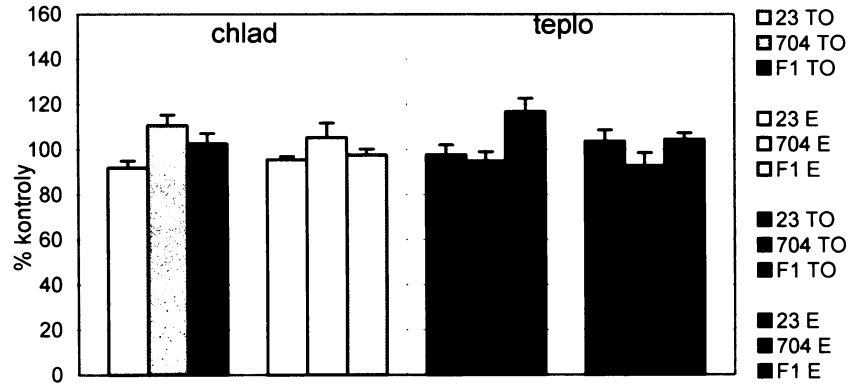
Obr. 49.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



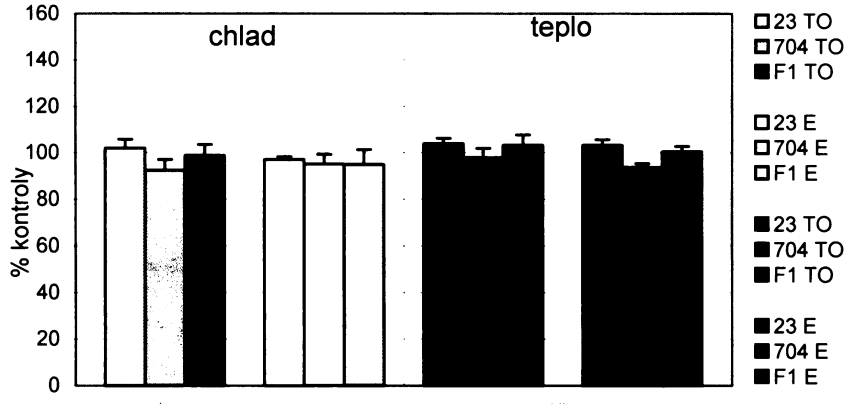

Obr. 50.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



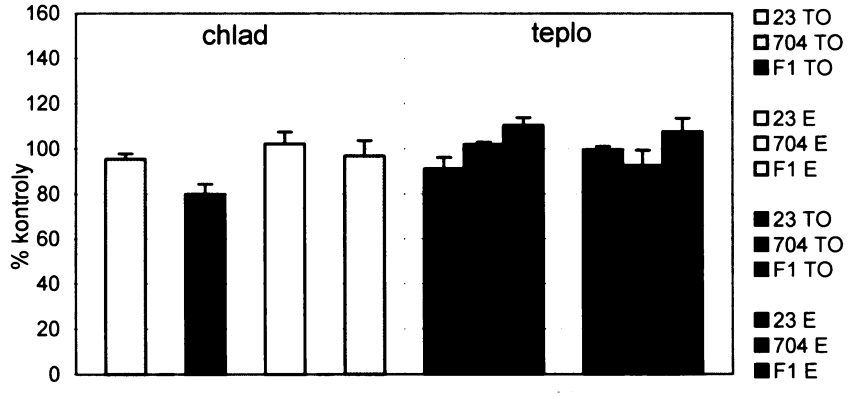

Obr. 51.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



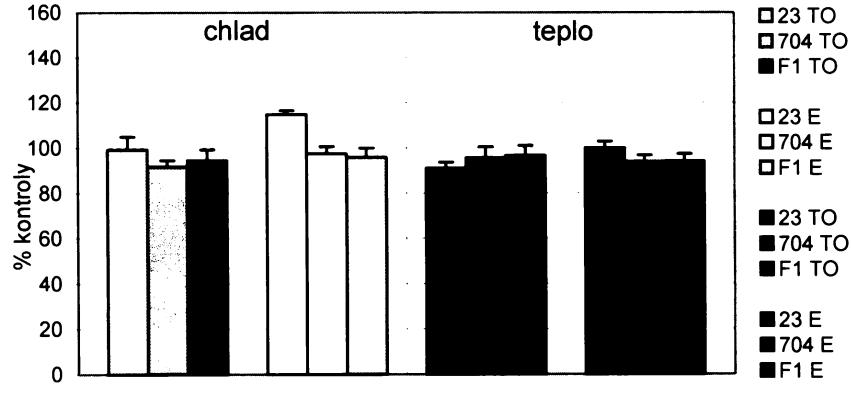
Obr. 52.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 53.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 54.: Hodnoty aktivity fotosystému I v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



## 4.3. Aktivita Hillovy reakce

Hodnoty aktivity Hillovy reakce (AHR) jsem pro nedostatek vzorku neměřila u genotypu 704 ošetřeného E a K v chladu v pokusu s koncentracemi $10^{-12}$ M. V těchto podmínkách také genotyp 704 (TO) vykazoval vyšší hodnoty AHR než genotyp 23 při přepočtu na jednotku plochy a hmotnost sušiny listové čepele, při ostatních koncentracích dosahoval nejvyšších hodnot aktivity genotyp 23 a nejnižších naopak 704 (Tab. 54., 58. a 62.). Průměr rodičů se od F1 generace odlišoval v naměřených hodnotách AHR (LP) a AHR (S) průkazně pouze pro koncentraci $10^{-8}$ M E v teple, a po ošetření $10^{-8}$ M TO a E v teple (Tab. 55., 59. a 63.). Významné rozdíly v hodnotách AHR mezi pěstováním v teple a chladu se objevily častěji při přepočtu na jednotku listové plochy a hmotnost sušiny, po přepočtu na jednotkové množství chlorofylu byly tyto rozdíly výrazné téměř výhradně při ošetření $10^{-12}$ M. Po ošetření brassinosteroidy v koncentracích $10^{-10}$ M nebyly průkazné rozdíly v naměřených hodnotách AHR mezi pěstováním v teple a chladu při žádném z přepočtů (Tab. 57., 61. a 65.).

Při porovnávání vlivů jednotlivých způsobů ošetření (Tab. 56., 60. a 64.), jsem zjistila, že mnoho hodnot AHR je změněno v porovnání s kontrolou, ale statisticky průkazných rozdílů jsem naměřila pouze málo, a to kvůli velkému rozptylu mezi jednotlivými opakováními. Při koncentraci $10^{-8}$ M a pěstování v chladu byla většina naměřených hodnot AHR po ošetření vyšší než u neošetřených (při přepočtu na jednotkové množství chlorofylu nebyly tyto rozdíly tak výrazné), nejvíce zvýšeny byly hodnoty AHR u genotypu 704 (až o 50%), v teple většinou AHR ovlivněna nebyla (Obr. 55., 59. a 63.). Při použití koncentrace $10^{-10}$ M byly velmi sníženy naměřené hodnoty AHR u F1 křížence po ošetření E v teple oproti kontrole (AHR (LP) až o 35%), zvýšené byly hodnoty aktivity u genotypu 23 ošetřeného E v chladu (o 19-30%, podle přepočtu) a v teple u genotypu 23 po ošetření E (o 11-17%, podle přepočtu) a u F1 křížence po aplikaci TO (o 10-16% podle přepočtu) (Obr. 56., 60. a 64.). Při použitých koncentracích ošetření $10^{-12}$ M klesly hodnoty AHR (LP) a AHR (S) oproti kontrole u F1 křížence v chladu (o 20% po ošetření E a o 40, resp. 44% po ošetření TO, což už bylo zaznamenáno jako statisticky průkazné snížení) (Obr. 57. a 61.). Po přepočtu na jednotkové množství chlorofylu nebyly tyto rozdíly tak výrazné (Obr. 65.).

V teple po ošetření touto koncentrací pouze velmi mírně poklesly hodnoty AHR (LP) a AHR (Chl) u genotypu 704 ošetřeného TO (o 16%) (Obr. 57. a 61.). Mírně výšena byla hodnota AHR (Chl) u F1 křížence ošetřeného E v chladu (o 14% oproti neošetřeným F1 křížencům) (Obr. 65.). Při použití koncentrace brassinosteroidů $10^{-14}$ M se hodnoty AHR velmi odlišovaly od kontrolních hodnot, velké střední chyby průměru však prozradily velký rozptyl naměřených hodnot v jednotlivých opakováních a proto nebyly tyto změny statisticky významné. Snížené hodnoty aktivity jsem zaznamenala pouze u genotypu 704 TO v chladu (až o 45%, přesto neprůkazně opět pro velký rozptyl). Zvýšení hodnot AHR (LP) jsem naměřila v mnoha případech, u genotypu 23 po ošetření TO (v teple i chladu) i po ošetření E (v teple), u F1 křížence po ošetření TO (v chladu) i po ošetření E (v teple i chladu) a u genotypu 704 po ošetření E v chladu a TO v teple, opět se pro velký rozptyl tyto tendence statisticky neprokázaly. Stejné tendence se vyskytly i po přepočtu na hmotnost sušiny, pouze u genotypu 704 ošetřeného TO v teple byly naměřené hodnoty srovnatelné s kontrolními. Po přepočtu na jednotkové množství chlorofylu byly v teple hodnoty AHR po ošetření téměř srovnatelné s kontrolami, přesto i zde bylo znát mírné zvýšení hodnoty AHR (Chl) u genotypů 23 a F1 po ošetření TO i E (o 12-16%). V chladu byly zvýšené hodnoty AHR pouze u genotypů 704 a F1 po ošetření E (Obr. 58., 62. a 66.).

Hodnoty aktivity Hillovy reakce byly ovlivněny brassinosteroidy, i když většinou ne statisticky významně. Většina hodnot při použití koncentrace $10^{-8}$ M v chladu a $10^{-14}$ M byla zvýšena, při koncentraci $10^{-12}$ M byly hodnot aktivity po ošetření nižší nebo stejné v porovnání s kontrolou. Kromě různého vlivu použitých koncentrací se ukázal být důležitý také genotyp, jak je nejlépe vidět při koncentracích $10^{-14}$ M, kdy genotyp 704 většinou nebyl při pěstování v teple ovlivněn (zatímco genotypy 23 a F1 dosahovaly vyšších hodnot při obou ošetřeních), v chladu po ošetření TO byly u něj hodnoty aktivity Hillovy reakce většinou nižší nebo stejné jako u kontroly, po ošetření E naopak vyšší.

Tab. 54.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotku listové plochy mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0014 | 0,8907 | 0,4191 | 0,3415 |
| E teplo | 0,0154 | 0,3012 | 0,2123 | 0,3830 |
| K teplo | 0,0250 | 0,6383 | 0,0591 | 0,2439 |
| TO chlad | 0,3976 | 0,8422 | 0,7501 | 0,2606 |
| E chlad | 0,0430 | 0,6733 | 0,0718 | 0,2657 |
| K chlad | 0,0065 | 0,8992 | 0,0004 | 0,8819 |

Tab. 55.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotku listové plochy mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,1848 | 0,8942 | 0,3523 | 0,4816 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,0372 | 0,2109 | 0,6487 | 0,4049 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,8066 | 0,7231 | 0,6475 | 0,1036 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,8028 | 0,8730 | 0,8596 | 0,7668 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,5127 | 0,7131 | | 0,3672 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,3615 | 0,8643 | | 0,8160 |

Tab. 56.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotku listové plochy mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,1340 | 0,8346 | 0,7033 | 0,1640 |
| 23 chlad | 0,5827 | 0,9117 | 0,9862 | 0,4231 |
| 704 teplo | 0,5023 | 0,9236 | 0,2476 | 0,6666 |
| 704 chlad | 0,1117 | 0,9962 | | 0,1450 |
| F1 teplo | 0,6086 | 0,4270 | 0,9519 | 0,3452 |
| F1 chlad | 0,2331 | 0,9607 | 0,0209 | 0,8696 |

Tab. 57.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotku listové plochy mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0170 | 0,2356 | 0,0000 | 0,0065 |
| 23 E | 0,4942 | 0,1352 | 0,0000 | 0,0039 |
| 23 K | 0,0145 | 0,1755 | 0,0000 | 0,0228 |
| 704 TO | 0,2489 | 0,7535 | 0,0001 | 0,0036 |
| 704 E | 0,0258 | 0,7156 | | 0,0311 |
| 704 K | 0,0011 | 0,6396 | | 0,0195 |
| F1 TO | 0,0133 | 0,4932 | 0,0001 | 0,0487 |
| F1 E | 0,0639 | 0,1247 | 0,0000 | 0,0359 |
| F1 K | 0,0176 | 0,1933 | 0,0000 | 0,1005 |

Tab. 58.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotku hmotnosti sušiny mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0001 | 0,9036 | 0,1599 | 0,3174 |
| E teplo | 0,0121 | 0,3062 | 0,0120 | 0,5971 |
| K teplo | 0,0254 | 0,8256 | 0,0281 | 0,3201 |
| TO chlad | 0,5604 | 0,8592 | 0,6995 | 0,3161 |
| E chlad | 0,0193 | 0,6313 | 0,1406 | 0,1406 |
| K chlad | 0,0130 | 0,9154 | 0,0001 | 0,8642 |

Tab. 59.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotku hmotnosti sušiny mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,0103 | 0,8535 | 0,1536 | 0,6895 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,0319 | 0,2187 | 0,1857 | 0,6163 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,7342 | 0,9595 | 0,5945 | 0,1309 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,6282 | 0,9629 | 0,9044 | 0,9190 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,5012 | 0,7781 | | 0,3822 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,4432 | 0,7737 | | 0,7868 |

Tab. 60.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,4848 | 0,9192 | 0,6731 | 0,0786 |
| 23 chlad | 0,3607 | 0,8470 | 0,9722 | 0,4053 |
| 704 teplo | 0,5450 | 0,9322 | 0,5690 | 0,9121 |
| 704 chlad | 0,1737 | 0,9996 | | 0,1063 |
| F1 teplo | 0,3829 | 0,3251 | 0,3751 | 0,3454 |
| F1 chlad | 0,1593 | 0,9681 | 0,0365 | 0,9258 |

Tab. 61.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotku hmotnosti sušiny mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0002 | 0,5866 | 0,0000 | 0,0007 |
| 23 E | 0,0183 | 0,4176 | 0,0000 | 0,0007 |
| 23 K | 0,0008 | 0,6346 | 0,0000 | 0,0053 |
| 704 TO | 0,0329 | 0,7417 | 0,0000 | 0,0009 |
| 704 E | 0,0009 | 0,6230 | | 0,0020 |
| 704 K | 0,0002 | 0,7863 | | 0,0038 |
| F1 TO | 0,0001 | 0,8898 | 0,0000 | 0,0253 |
| F1 E | 0,0008 | 0,3400 | 0,0000 | 0,0057 |
| F1 K | 0,0007 | 0,7372 | 0,0000 | 0,0109 |

Tab. 62.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotkové množství chlorofylu mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,0012 | 0,9538 | 0,7061 | 0,3832 |
| E teplo | 0,0273 | 0,7581 | 0,8285 | 0,1849 |
| K teplo | 0,0113 | 0,9080 | 0,0662 | 0,2261 |
| TO chlad | 0,1280 | 0,6601 | 0,0943 | 0,1862 |
| E chlad | 0,0168 | 0,4990 | 0,8245 | 0,4911 |
| K chlad | 0,0945 | 0,7433 | 0,0420 | 0,4848 |

Tab. 63.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotkové množství chlorofylu mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,9425 | 0,7995 | 0,9266 | 0,6195 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,2021 | 0,6410 | 0,6086 | 0,4603 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,9827 | 0,9045 | 0,0737 | 0,2603 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,9991 | 0,9777 | 0,9773 | 0,8136 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,8166 | 0,9385 | | 0,2092 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,9335 | 0,8341 | | 0,4956 |

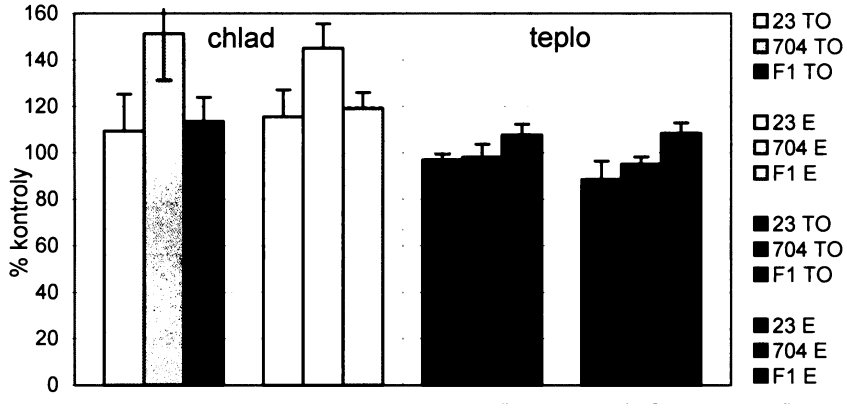
Tab. 64.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotkové množství chlorofylu mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,1601 | 0,8944 | 0,6908 | 0,6676 |
| 23 chlad | 0,8549 | 0,8909 | 0,4903 | 0,9404 |
| 704 teplo | 0,8790 | 0,9533 | 0,0674 | 0,9309 |
| 704 chlad | 0,5510 | 0,9994 | | 0,0894 |
| F1 teplo | 0,8272 | 0,8349 | 0,8532 | 0,8008 |
| F1 chlad | 0,5331 | 0,9983 | 0,0748 | 0,7040 |

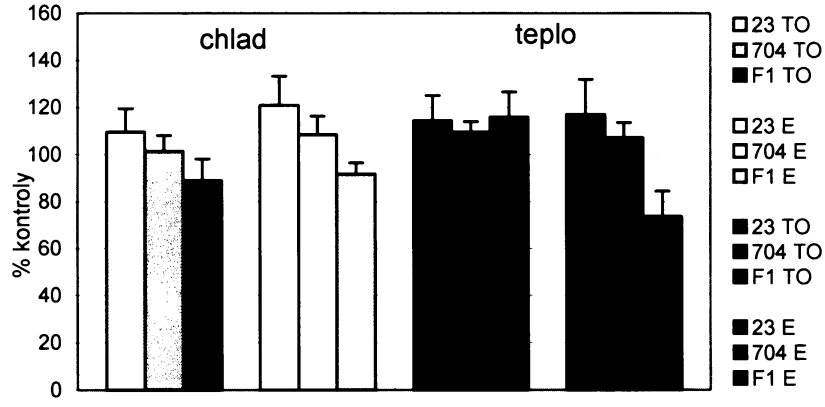
Tab. 65.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách aktivity Hillovy reakce přepočtené na jednotkové množství chlorofylu mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,9625 | 0,2624 | 0,0011 | 0,0574 |
| 23 E | 0,1076 | 0,2631 | 0,0006 | 0,0182 |
| 23 K | 0,8693 | 0,3517 | 0,0002 | 0,0254 |
| 704 TO | nelze | 0,8576 | 0,0001 | 0,0186 |
| 704 E | 0,8430 | 0,8517 | | 0,2620 |
| 704 K | 0,4242 | 0,7383 | | 0,0859 |
| F1 TO | 0,9451 | 0,6048 | 0,0032 | 0,1223 |
| F1 E | 0,8122 | 0,3048 | 0,0025 | 0,1410 |
| F1 K | 0,6254 | 0,3242 | 0,0018 | 0,1610 |

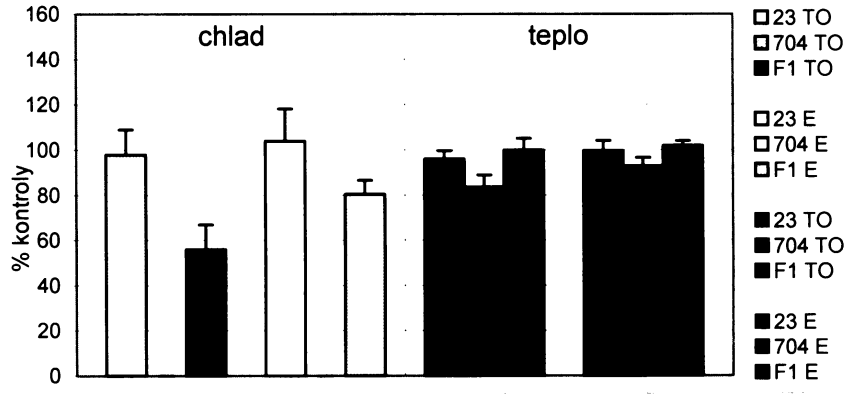
Obr. 55.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



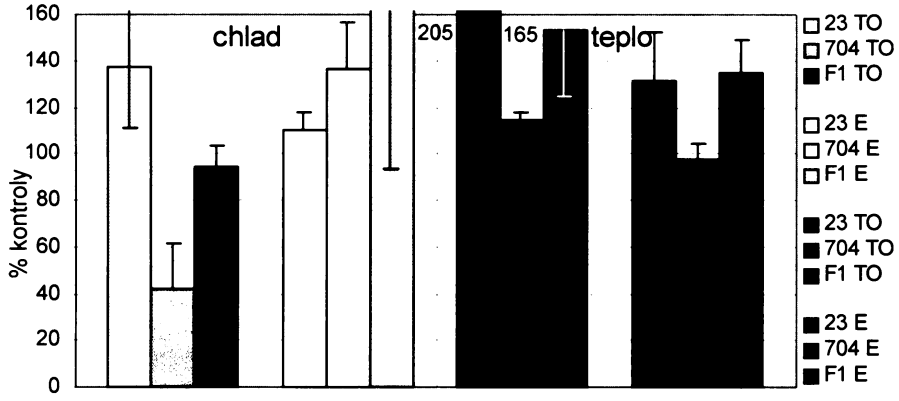

Obr. 56.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



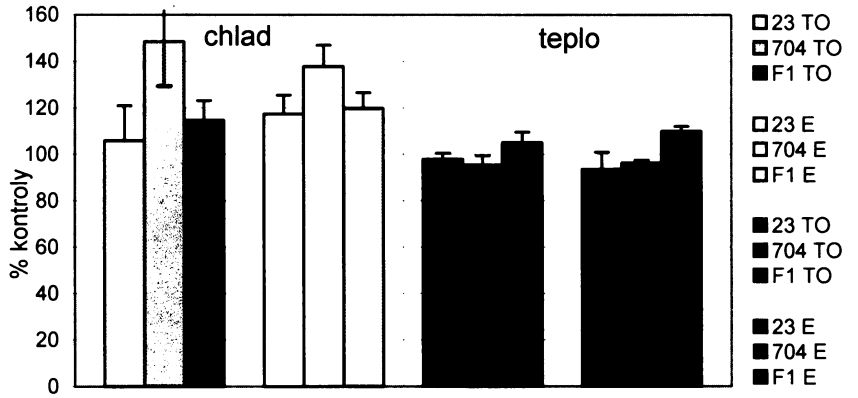

Obr. 57.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



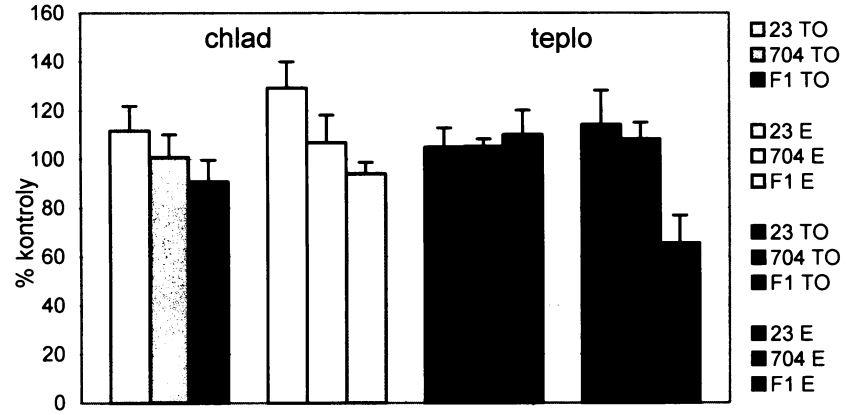
Obr. 58.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotku listové plochy při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



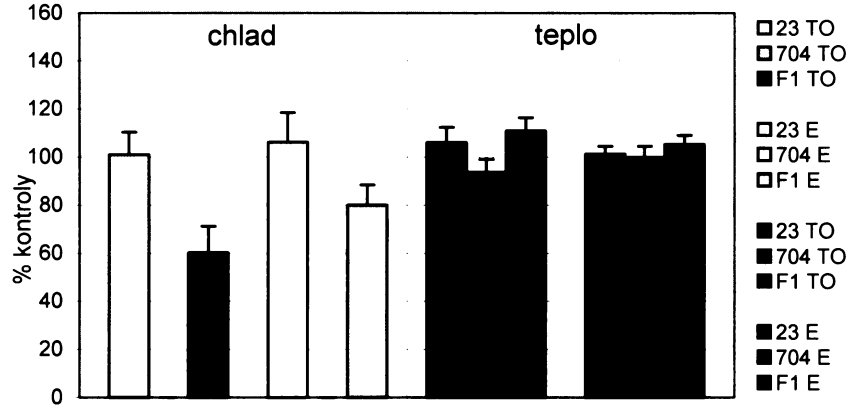

Obr. 59.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



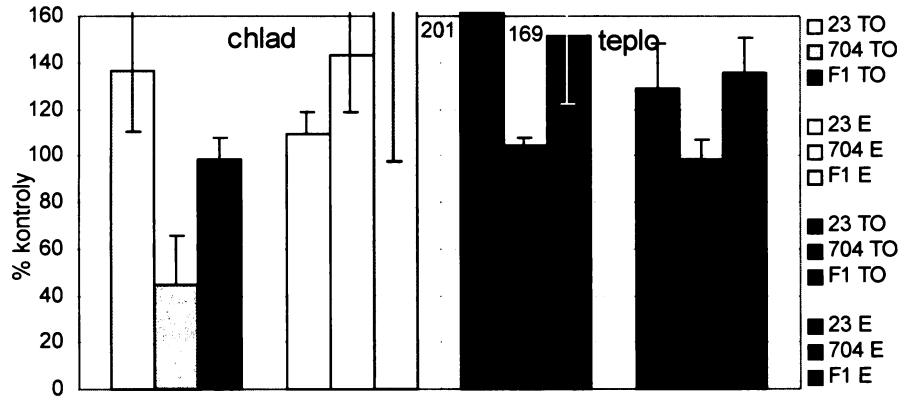

Obr. 60.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



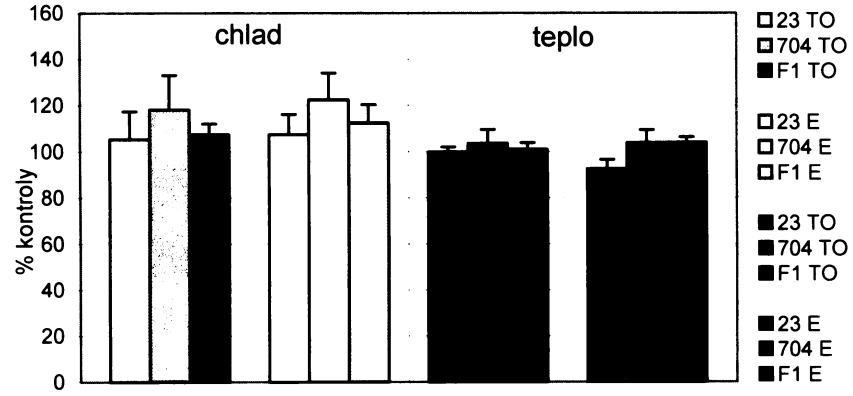
Obr. 61.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



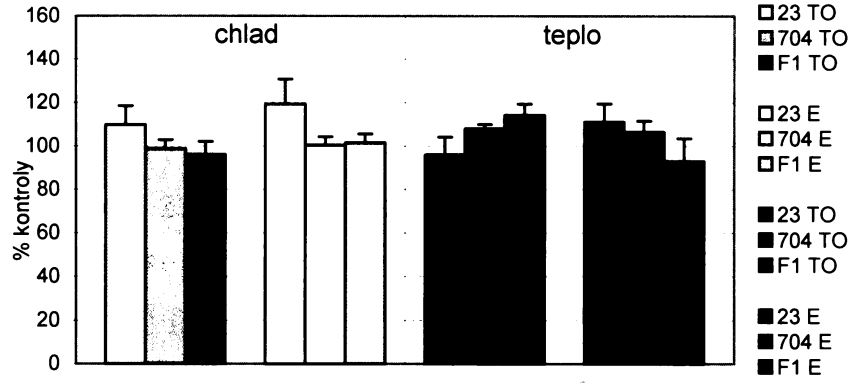

Obr. 62.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



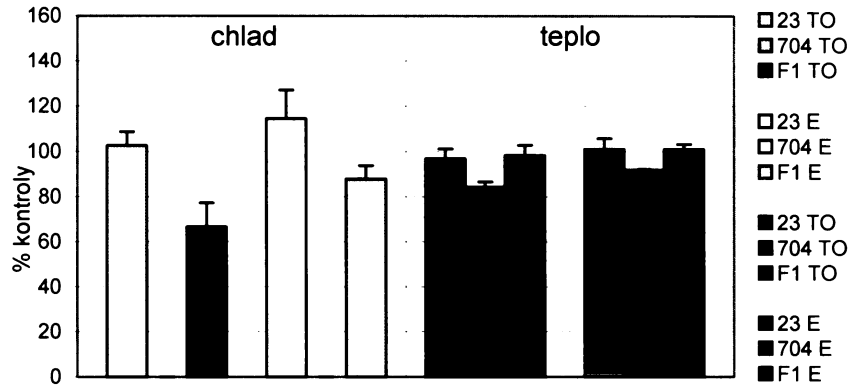

Obr. 63.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



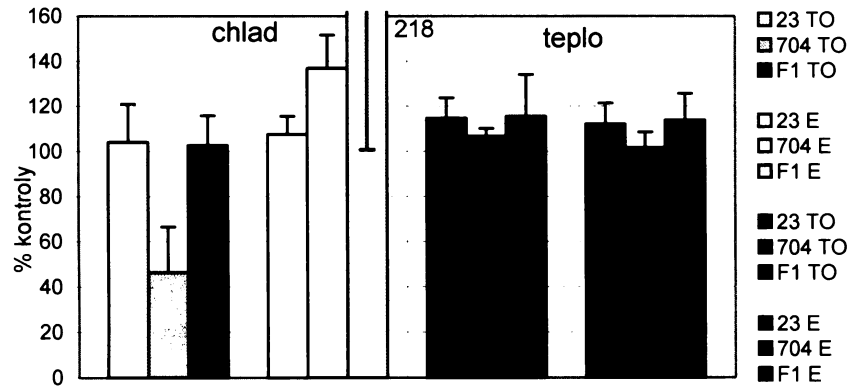
Obr. 64.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 65.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 66.: Hodnoty aktivity Hillovy reakce v přepočtu na jednotkové množství chlorofylu při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



## 4.4. Relativní obsah vody v listu a specifická hmotnost listu

Při porovnávání hodnot relativního obsahu vody (RWC) jsem zjistila významné rozdíly mezi genotypy u $10^{-8}$ M a $10^{-12}$ M K v teple (u genotypu 704 a F1 byly naměřeny vyšší hodnoty RWC než u genotypu 23) a po ošetření koncentrací $10^{-12}$ M E v chladu (u genotypu 23 byly naměřeny vyšší hodnoty RWC než u genotypu 704) (Tab. 66.). Rozdíl mezi F1 generací a průměrem rodičů byl patrný u ošetření TO v teple a K v chladu při použitých koncentracích brassinosteroidů $10^{-12}$ M (Tab. 67.). Rozdíly mezi pěstováním v teple a chladu se projevily téměř výhradně při koncentraci $10^{-12}$ M (Tab. 69.).

Výsledky statistické analýzy specifické hmotnosti listu (SpHm) ukázaly významné rozdíly mezi genotypy pouze při ošetření $10^{-10}$ M a $10^{-14}$ M, nejvyšších hodnot SpHm dosáhly genotypy 704 a 23, nejnižší byly tyto hodnoty u F1 generace (Tab. 70.). Rozdíly mezi průměrem rodičů a F1 generací byly patrné také při těchto koncentracích, konkrétně po ošetření TO v teple a K v teple, u koncentrace $10^{-14}$ M také po ošetření E v teple (Tab. 71.). Rozdíly mezi pěstováním v teple a chladu byly průkazné téměř vždy (Tab. 73.).

Při porovnávání významnosti rozdílů hodnot RWC mezi způsoby ošetření (Tab. 68.) jsem zjistila významný nárůst hodnot u genotypu 23 po ošetření koncentrací $10^{-8}$ M a $10^{-10}$ M TO v teple (Obr. 67. a 69.) oproti kontrole, významným se ukázal být také pokles hodnot RWC u F1 křížence po ošetření $10^{-12}$ M TO oproti neošetřené kontrole (Obr. 69.). Tyto výkyvy byly velmi malé (cca 3%), přesto se ukázaly být významné, protože mezi jednotlivými opakováními byl velmi malý rozptyl. Při použití koncentrací $10^{-10}$ M a $10^{-14}$ M byly hodnoty RWC téměř shodné s kontrolními (Obr. 68. a 70.). Také hodnoty SpHm u ošetřených genotypů nebyly nijak výrazně vyšší nebo nižší než u neošetřených, i zde se však díky malému rozptylu ukázalo být několik rozdílů významných. Při použití koncentrace $10^{-8}$ M byla naměřena vyšší hodnota SpHm u genotypu 23 ošetřeného TO a u F1 křížence ošetřeného E pěstovaných v teple (Obr. 72.), naopak při koncentraci $10^{-12}$ M byly hodnoty SpHm u genotypů 23 a F1 po ošetření TO v teple nižší v porovnání s kontrolou (Obr. 73.). Po ošetření genotypu 704 koncentrací $10^{-14}$ M TO v teple byly také významně zvýšeny hodnoty

SpHm (Obr. 74.). Při použití koncentrace $10^{-8}$ M nebyly patrné výrazné rozdíly SpHm mezi ošetřenými a neošetřenými genotypy (Obr. 70.).

Relativní obsah vody v listu a specifická hmotnost listu byly po aplikaci brassinosteroidů ovlivněny pouze málo, a to při pěstování v teple u genotypů 23 a F1. Při pěstování chladu tyto parametry aplikací brassinosteroidů ovlivněny nebyly.

Tab. 66.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách relativního obsahu vody v listu mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,2429 | 0,8560 | 0,1803 | 0,1817 |
| E teplo | 0,4042 | 0,9918 | 0,2994 | 0,2461 |
| K teplo | 0,0036 | 0,5127 | 0,0407 | 0,1966 |
| TO chlad | 0,8100 | 0,2184 | 0,7238 | 0,2969 |
| E chlad | 0,5023 | 0,3117 | 0,0396 | 0,4056 |
| K chlad | 0,8048 | 0,4392 | 0,7220 | 0,1006 |

Tab. 67.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách relativního obsahu vody v listu mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,1814 | 0,6467 | 0,0341 | 0,0875 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,3653 | 0,9430 | 0,1556 | 0,4539 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,0553 | 0,4520 | 0,2295 | 0,8276 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,8698 | 0,2482 | 0,6867 | 0,5746 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,7920 | 0,2384 | 0,1964 | 0,5377 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,3990 | 0,3371 | 0,0000 | 0,4893 |

Tab. 68.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách relativního obsahu vody v listu mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,0033 | 0,8585 | 0,0151 | 0,3169 |
| 23 chlad | 0,3939 | 0,4288 | 0,1828 | 0,6377 |
| 704 teplo | 0,7727 | 0,7193 | 0,2561 | 0,7161 |
| 704 chlad | 0,4871 | 0,2619 | 0,5938 | 0,9614 |
| F1 teplo | 0,4102 | 0,5044 | 0,0341 | 0,3440 |
| F1 chlad | 0,8439 | 0,1695 | 0,4290 | 0,4552 |

Tab. 69.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů rozdílů v hodnotách relativního obsahu vody v listu mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0770 | 0,1730 | 0,0235 | 0,2482 |
| 23 E | 0,0179 | 0,3311 | 0,0023 | 0,7588 |
| 23 K | 0,5953 | 0,2873 | 0,0009 | 0,9053 |
| 704 TO | 0,4570 | 0,1594 | 0,3913 | 0,9701 |
| 704 E | 0,6603 | 0,9884 | 0,0470 | 0,5570 |
| 704 K | 0,5722 | 0,3111 | 0,0000 | 0,8160 |
| F1 TO | 0,1317 | 0,1361 | 0,0032 | 0,1170 |
| F1 E | 0,2898 | 0,7555 | 0,0012 | 0,1017 |
| F1 K | 0,8448 | 0,6910 | 0,0027 | 0,4979 |

Tab. 70.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách specifické hmotnosti listu mezi genotypy (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo | 0,6519 | 0,0080 | 0,2858 | 0,0044 |
| E teplo | 0,4402 | 0,7473 | 0,2466 | 0,0449 |
| K teplo | 0,0950 | 0,0001 | 0,4576 | 0,0534 |
| TO chlad | 0,2916 | 0,0431 | 0,5070 | 0,0517 |
| E chlad | 0,5852 | 0,3455 | 0,1616 | 0,1141 |
| K chlad | 0,3105 | 0,0636 | 0,6013 | 0,5089 |

Tab. 71.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách specifické hmotnosti listu mezi F1 generací a průměrem rodičovských linií (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| TO teplo(F1/průměr P) | 0,3585 | 0,0131 | 0,0641 | 0,0113 |
| E teplo(F1/průměr P) | 0,1548 | 0,6711 | 0,2933 | 0,0408 |
| K teplo(F1/průměr P) | 0,0983 | 0,0002 | 0,1774 | 0,0410 |
| TO chlad(F1/průměr P) | 0,5103 | 0,0606 | 0,4818 | 0,4551 |
| E chlad(F1/průměr P) | 0,9086 | 0,2757 | 0,1652 | 0,4886 |
| K chlad(F1/průměr P) | 0,4228 | 0,0819 | 0,5633 | 0,6195 |

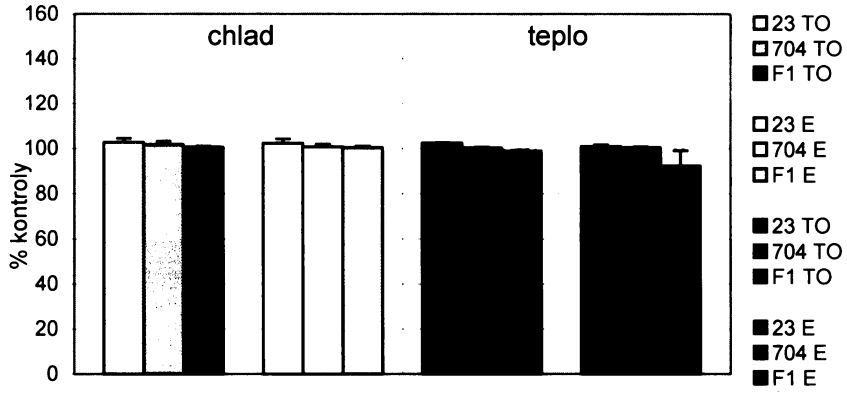
Tab. 72.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách specifické hmotnosti listu mezi způsoby ošetření (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly)

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 teplo | 0,1398 | 0,0035 | 0,0177 | 0,7402 |
| 23 chlad | 0,3466 | 0,1568 | 0,1575 | 0,9586 |
| 704 teplo | 0,3677 | 0,2234 | 0,1511 | 0,0160 |
| 704 chlad | 0,3353 | 0,7298 | 0,2034 | 0,2854 |
| F1 teplo | 0,3265 | 0,0401 | 0,0219 | 0,7950 |
| F1 chlad | 0,8757 | 0,6615 | 0,1027 | 0,5492 |

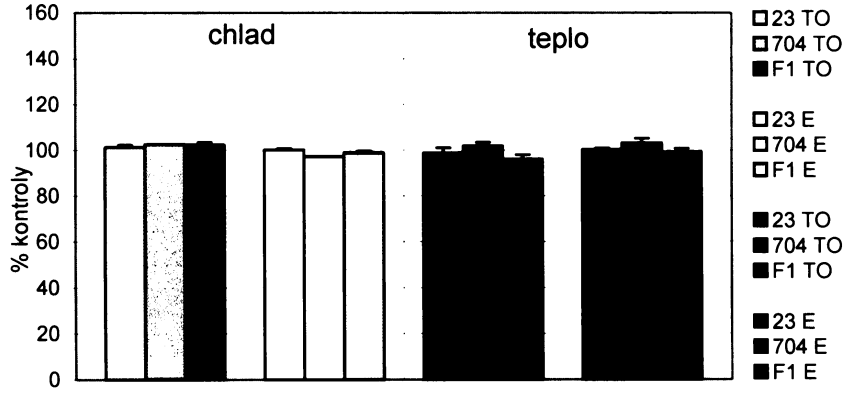
Tab. 73.: Hodnoty statistické významnosti rozdílů v hodnotách specifické hmotnosti listu mezi způsoby pěstování (červeně jsou zvýrazněny statisticky významné rozdíly.

| | $10^{-8}$ M | $10^{-10}$ M | $10^{-12}$ M | $10^{-14}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 23 TO | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| 23 E | 0,0016 | 0,0003 | 0,0014 | 0,0002 |
| 23 K | 0,0004 | 0,0000 | 0,0018 | 0,0000 |
| 704 TO | 0,0015 | 0,0000 | 0,0021 | 0,0006 |
| 704 E | 0,0002 | 0,0000 | 0,0029 | 0,0001 |
| 704 K | 0,0002 | 0,0001 | 0,0847 | 0,0000 |
| F1 TO | 0,0009 | 0,0001 | 0,0025 | 0,0001 |
| F1 E | 0,0000 | 0,0006 | 0,0015 | 0,0000 |
| F1 K | 0,0000 | 0,0000 | 0,0005 | 0,0000 |

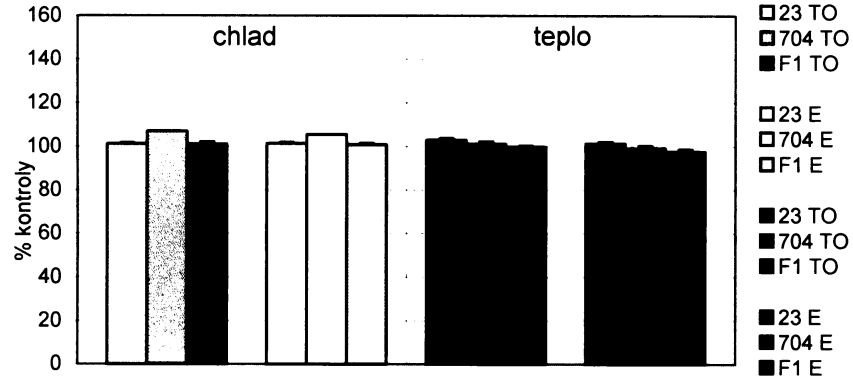
Obr. 67.: Hodnoty relativního obsahu vody v listu při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



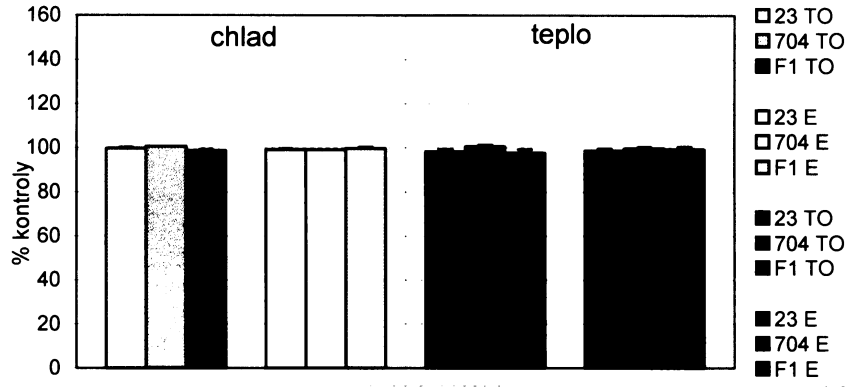

Obr. 68.: Hodnoty relativního obsahu vody v listu při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



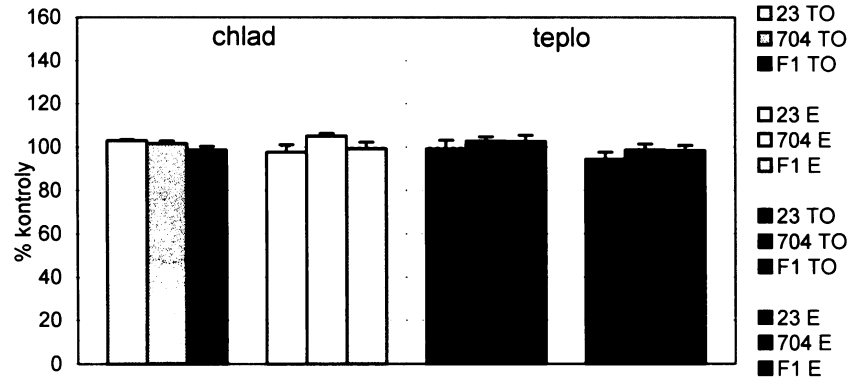
Obr. 69.: Hodnoty relativního obsahu vody v listu při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



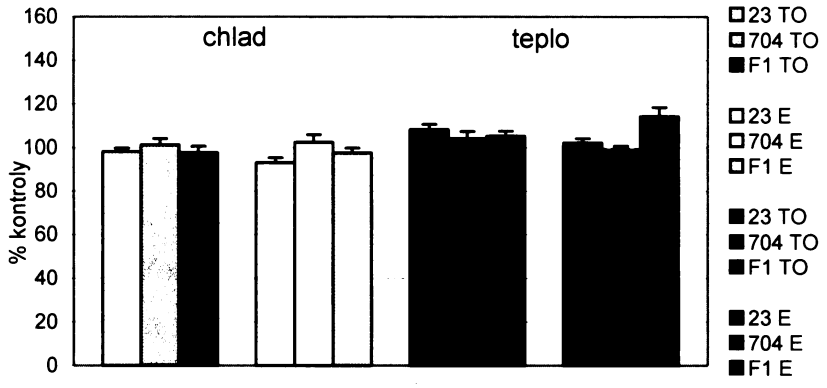

Obr. 70.: Hodnoty relativního obsahu vody v listu při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



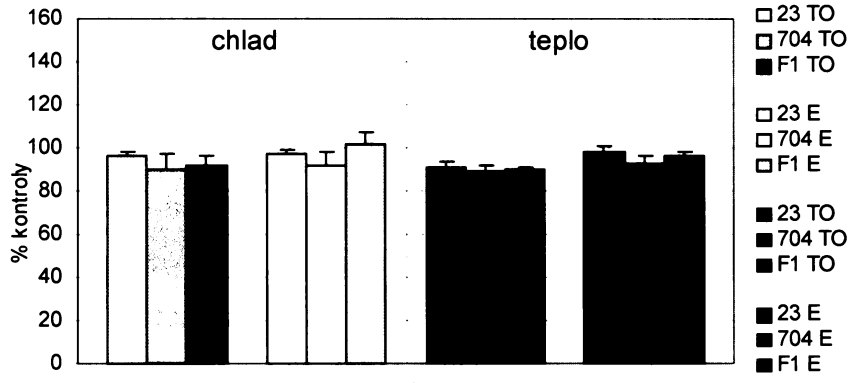

Obr. 71.: Specifická hmotnost listu při ošetření koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



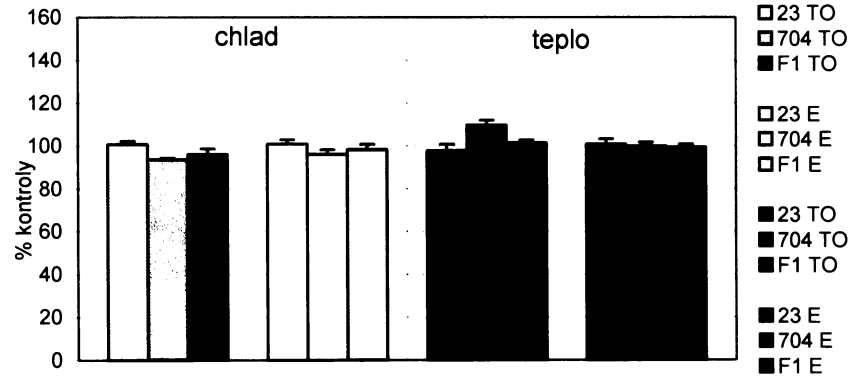
Obr. 72.: Specifická hmotnost listu při ošetření koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 73.: Specifická hmotnost listu při ošetření koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 74.: Specifická hmotnost listu při ošetření koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).

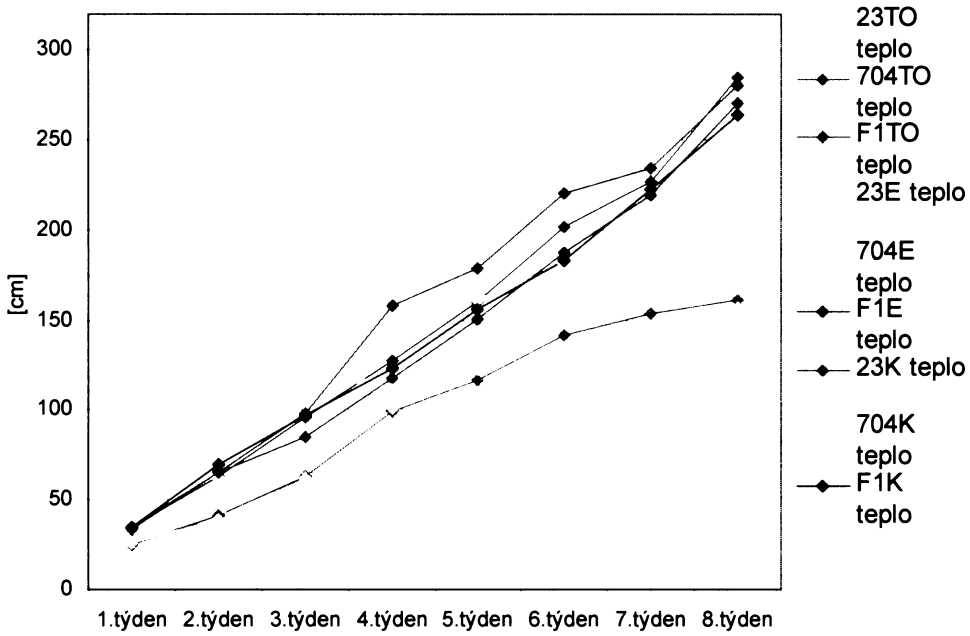


## 4.5. Morfologické parametry rostlin

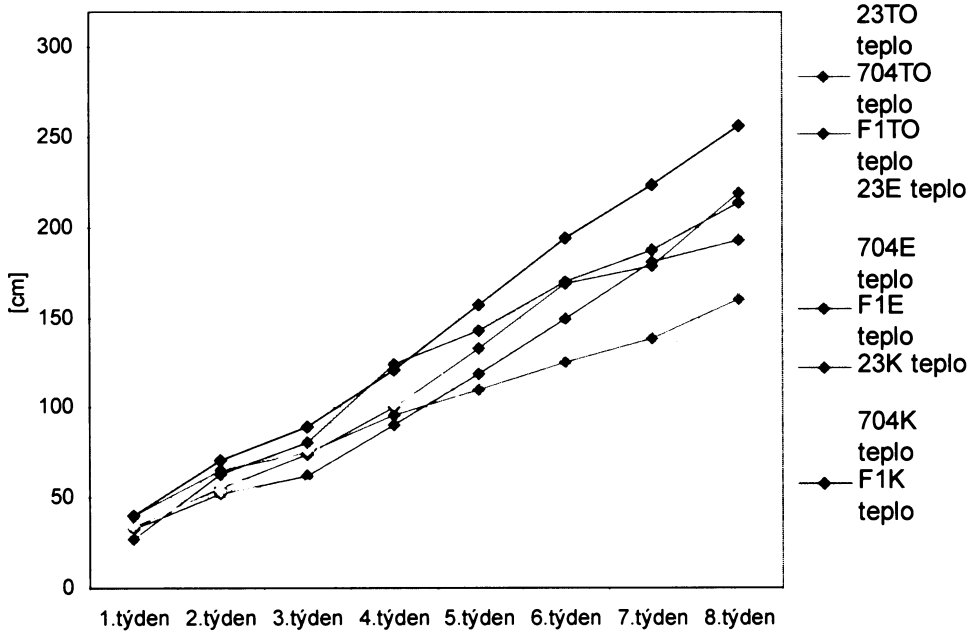
### 4.5.1. Součty internodií

Jako charakteristiku pro hodnocení výšky rostlin jsem zvolila součet délky všech internodií na rostlině. Pro hodnocení významnosti rozdílů v morfologických parametrech mezi ošetřenými a neošetřenými rostlinami nebyla provedena statistická analýza. Z grafů však je vidět, že nejvíce se projevil vliv aplikace brassinosteroidů na genotyp 704, a to jak při pěstování v chladu, tak i v teple. Genotyp 704 vždy dosahoval v součtu internodií nejmenší výšky, po ošetření brassinosteroidy byla výška viditelně zvýšena. V teple se toto zvýšení součtu internodií projevilo při koncentraci $10^{-8}$ M E (Obr. 75.), $10^{-10}$ M TO (Obr. 76.) a $10^{-12}$ M E i TO (Obr. 77.) a při koncentraci $10^{-14}$ M tento vliv patrný téměř není (Obr. 78.). V chladu je zvýšena délka internodií po ošetření $10^{-8}$ M E (Obr. 79.), $10^{-10}$ M TO (Obr. 80.) a oběma brassinosteroidy v koncentraci $10^{-12}$ M a $10^{-14}$ M (Obr. 81. a 82.). V hodnotách součtu délek internodií mezi ostatními genotypy je vidět rozdíl pouze při koncentraci $10^{-10}$ M v teple a u F1 křížence také v chladu, zde však kontrolny dosahují vyších hodnot než rostliny ošetřené (Obr. 76.). V chladu je také patrné, že bezprostředně po první aplikaci brassinosteroidů (tedy mezi 1. a 2. měřením) je nárůst délky internodií výrazně vyšší u ošetřených genotypů oproti neošetřeným, hlavně při použitých koncentracích $10^{-8}$ M a $10^{-14}$ M (Obr. 79. a 82.).

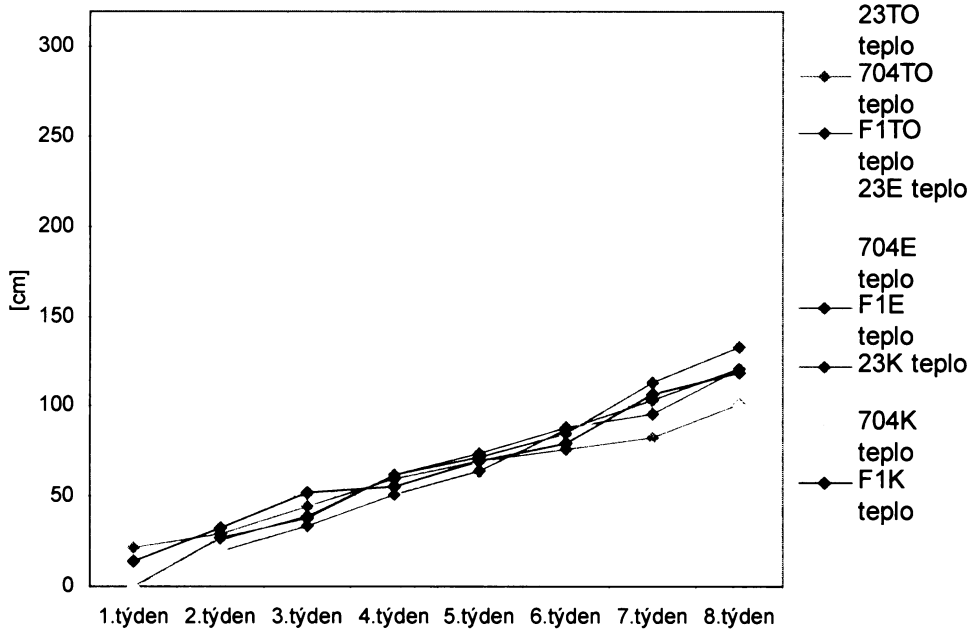
Obr. 75.: Součet internodií u rostlin pěstovaných v teple při ošetření rostlin koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v centimetrech.



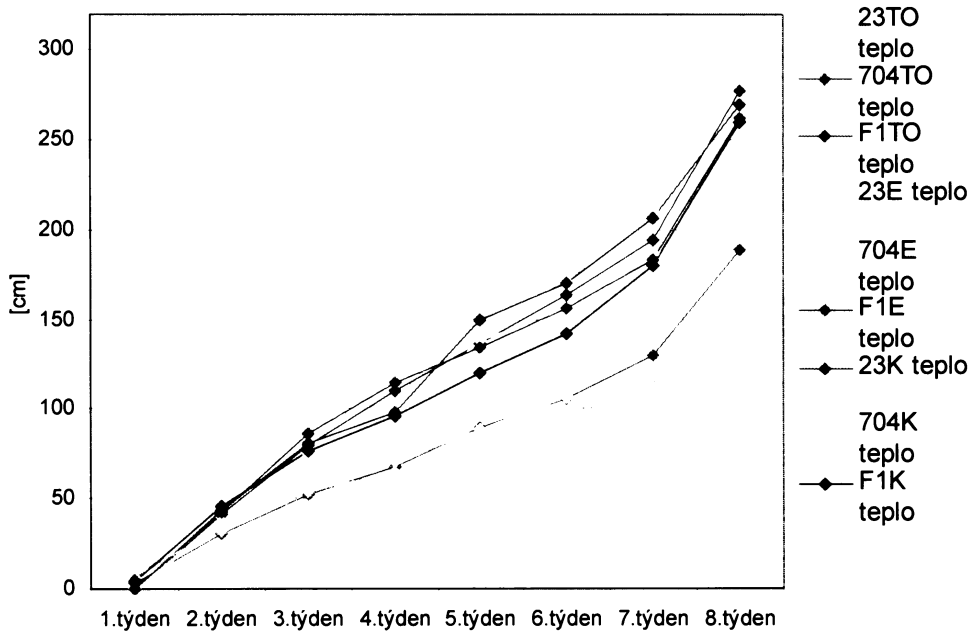

Obr. 76.: Součet internodií u rostlin pěstovaných v teple při ošetření rostlin koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v centimetrech.



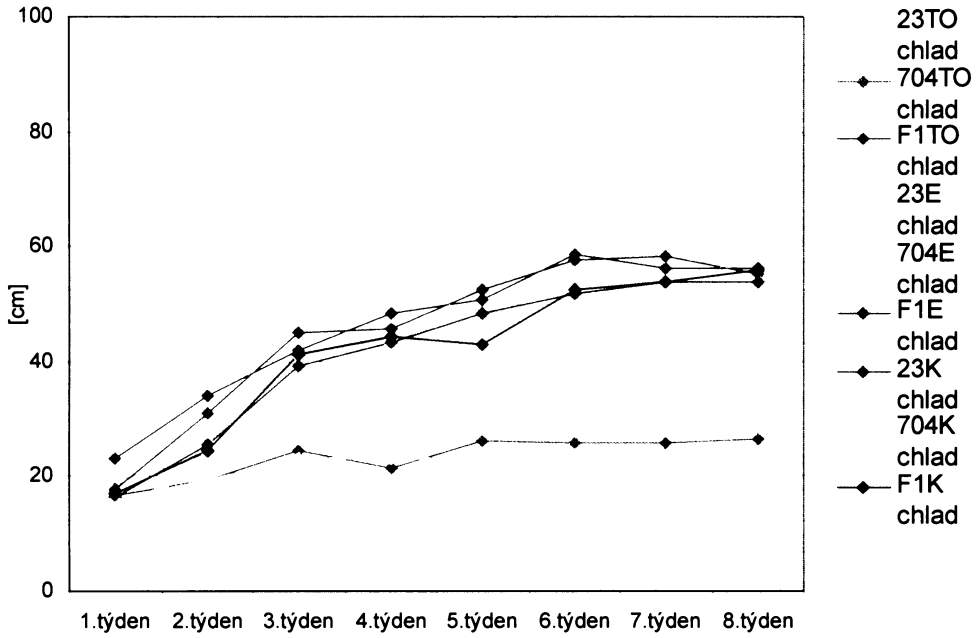
Obr. 77.: Součet internodií u rostlin pěstovaných v teple při ošetření rostlin koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v centimetrech.



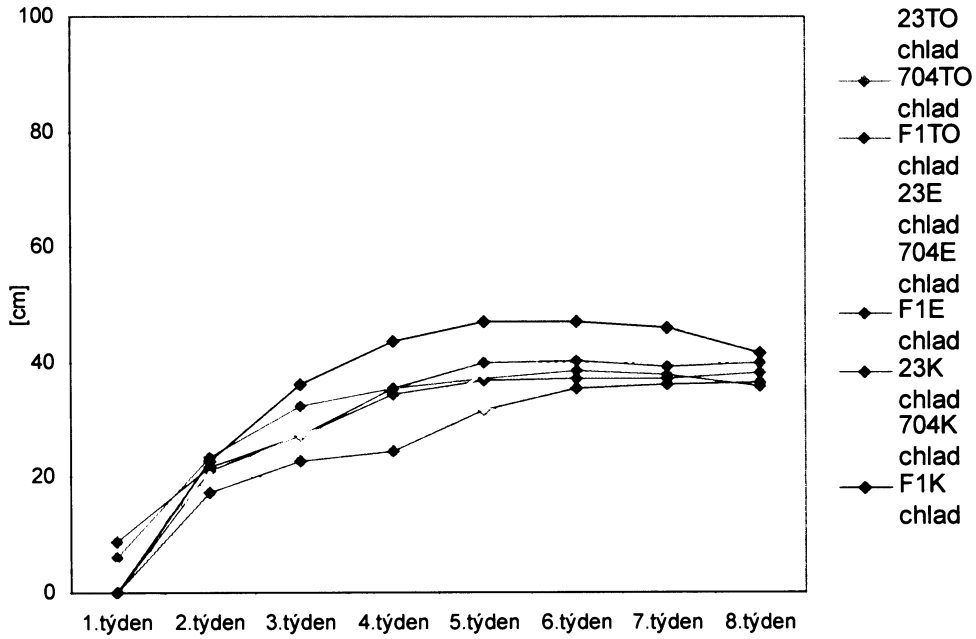

Obr. 78.: Součet internodií u rostlin pěstovaných v teple při ošetření rostlin koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v centimetrech.



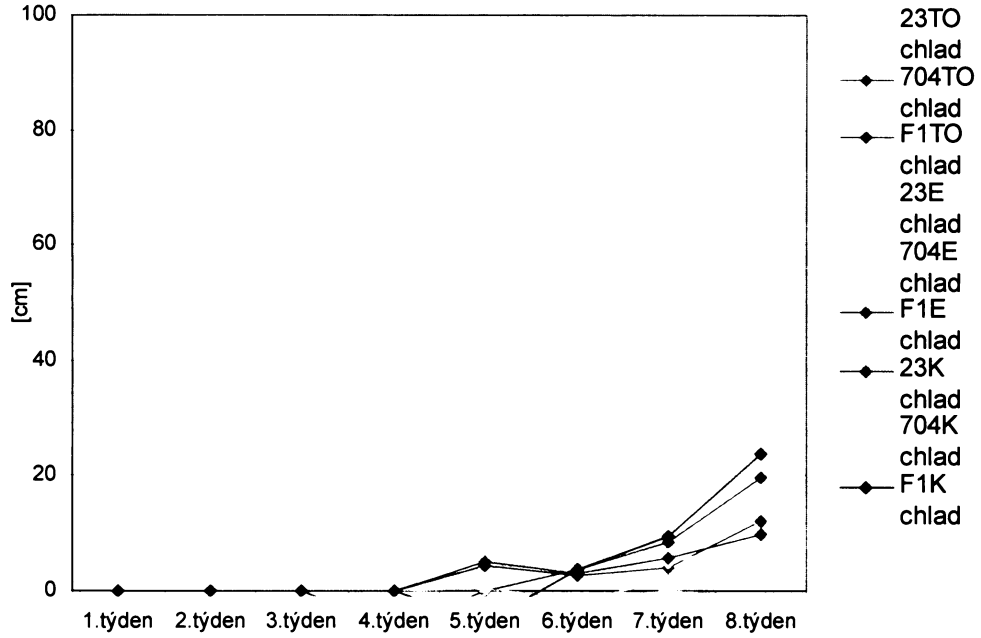
Obr. 79.: Součet internodií u rostlin pěstovaných v chladu při ošetření rostlin koncentrací $10^{-8}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v centimetrech.



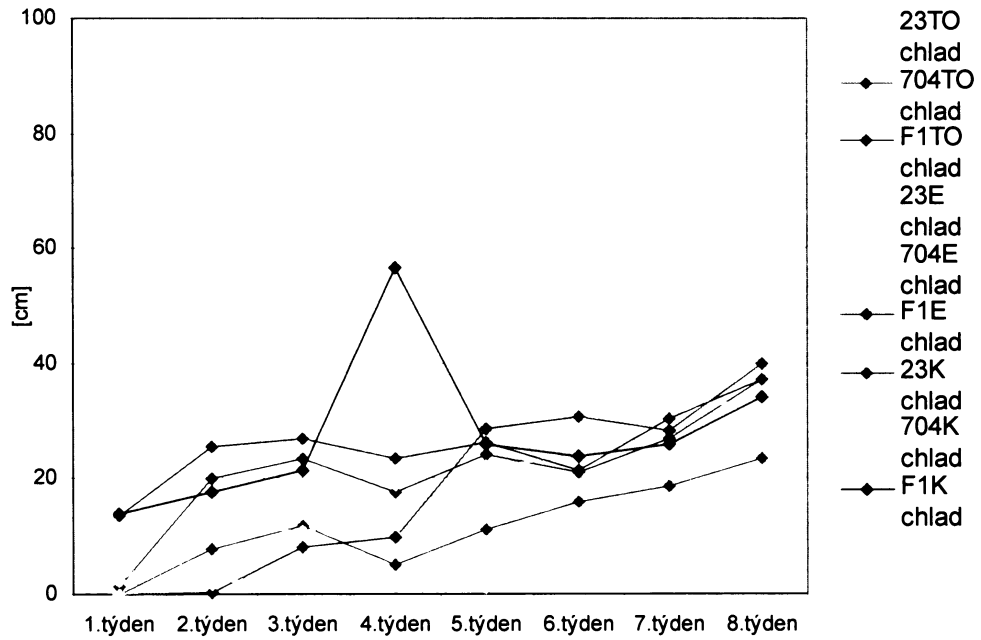

Obr. 80.: Součet internodií u rostlin pěstovaných v chladu při ošetření rostlin koncentrací $10^{-10}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v centimetrech.



Obr. 81.: Součet internodií u rostlin pěstovaných v chladu při ošetření rostlin koncentrací $10^{-12}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v centimetrech.



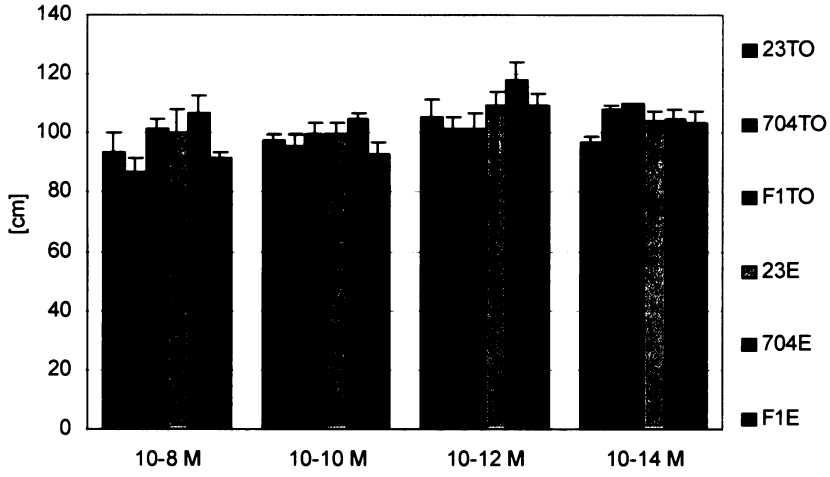

Obr. 82.: Součet internodií u rostlin pěstovaných v chladu při ošetření rostlin koncentrací $10^{-14}$ M roztoku 24-epibrassinolidu (E) a syntetického analogu castasteronu (TO). Vyjádřeno v centimetrech.



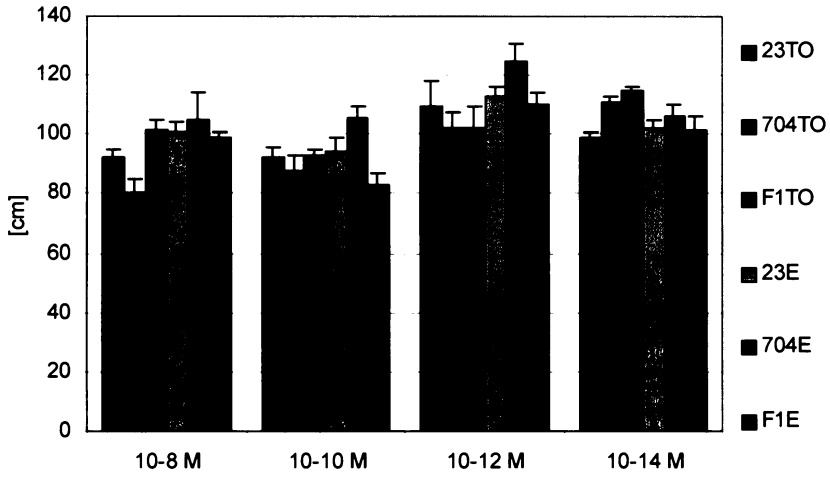
### 4.5.2. Délka plně vyvinutých listů

Délka 1. listu byla po ošetření u všech genotypů většinou stejná nebo mírně nižší než u kontroly, v teple i chladu (Obr. 83. a 88.). Délka 2. listu byla vyšší při použití koncentrace $10^{-12}$ M u genotypu 704, v teple po ošetření E, v chladu po ošetření TO i E oproti kontrole. U ostatních kombinací byly délky 2. listu po ošetření srovnatelné s kontrolními (Obr. 84. a 89.). Délka 3. listu byla při koncentraci $10^{-12}$ M v teple zvýšena u všech genotypů oproti kontrole, u genotypu 704 bylo toto zvýšení větší. Ostatní koncentrace brassinosteroidů neměly v teple na délku 3. listu viditelný vliv (Obr. 85.). Při pěstování v podmínkách chladového stresu byly delší také 3. listy genotypu 704 po aplikaci brassinosteroidů v koncentraci $10^{-12}$ M, naopak kratších délek 3. listů ve srovnání s kontrolou dosahovaly při této koncentraci F1 kříženci. Při použití koncentrace ošetření $10^{-14}$ M byly naopak ve srovnání s kontrolou delší 3. listy u F1 generace, a při koncentraci $10^{-10}$ M byly brassinosteroidy pozitivně ovlivněny délky 3. listů u genotypu 23. Při použití koncentrace $10^{-8}$ M byla oproti kontrole naměřena větší délka 3. listů u genotypu 704 ošetřeného TO a u genotypu 23 ošetřeného E byly naměřeny kratší 3. listy ve srovnání s kontrolou (Obr. 90.). V teple se při koncentraci $10^{-12}$ M výrazně prodloužily délky 4. listů u genotypu 704 (o >40%), naopak při koncentraci $10^{-14}$ M byly délky 4. listů u genotypu 704 po ošetření brassinosteroidy menší než u kontroly. Také koncentrace $10^{-10}$ M měla mírně negativní vliv na délku 4. listů u F1 křížence a při koncentraci $10^{-8}$ M dosahovaly kratších délek 4. listy u genotypu 23 po ošetření TO (Obr. 86.). V chladu při koncentraci $10^{-8}$ M byly delší 4. listy u genotypu 704 po aplikaci brassinosteroidů v porovnání s kontrolou, také jsem zaznamenala mírný pokles délky 4. listu u F1 křížence po ošetření TO při koncentracích $10^{-10}$ M a $10^{-12}$ M, při koncentraci $10^{-14}$ M byly v porovnání s kontrolou naměřeny delší 4. listy u genotypu 704 a F1 po ošetření TO a u F1 křížence po ošetření E (Obr. 91.). Délku 5. listů v chladu již nebylo možné porovnávat, v teple byly opět naměřeny delší listy oproti kontrole u genotypu 704 ošetřeného $10^{-12}$ M brassinosteroidy a $10^{-8}$ M E, naopak při koncentraci $10^{-10}$ M byly délky 5. listů u F1 křížence kratší než u kontroly (Obr. 87.).

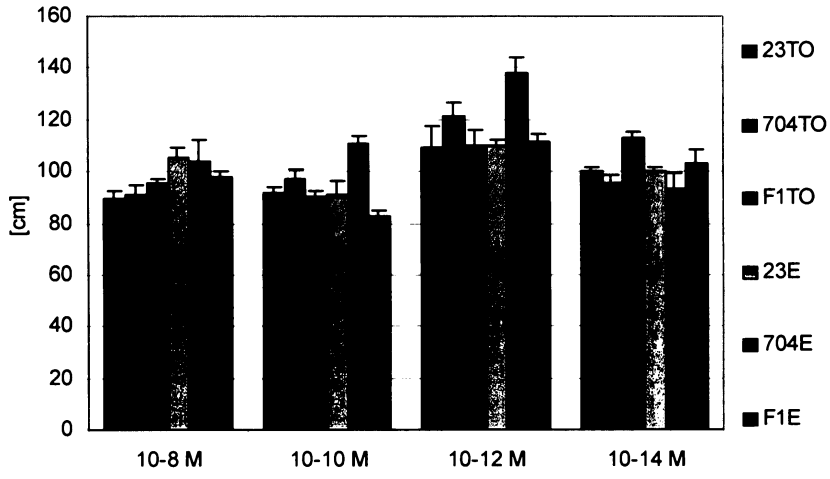
Obr. 83.: Průměrná délka 1. listů při pěstování v teple. Vyjádřeno v procentech kontroly.



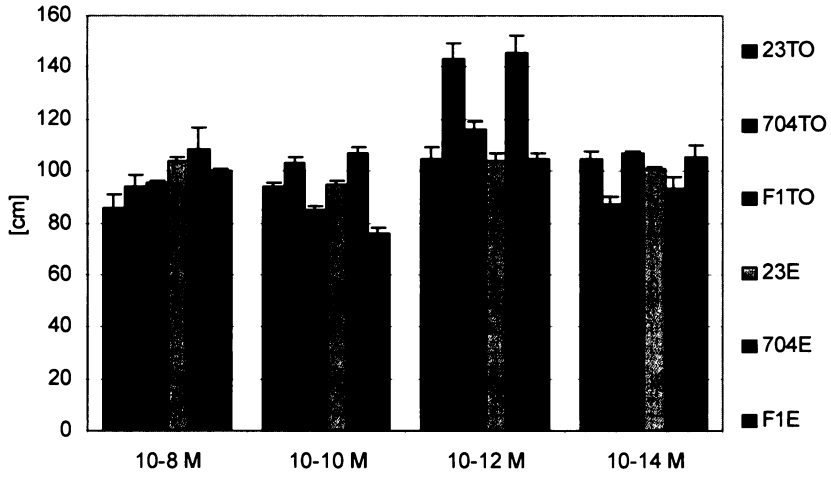

Obr. 84.: Průměrná délka 2. listů při pěstování v teple. Vyjádřeno v procentech kontroly.



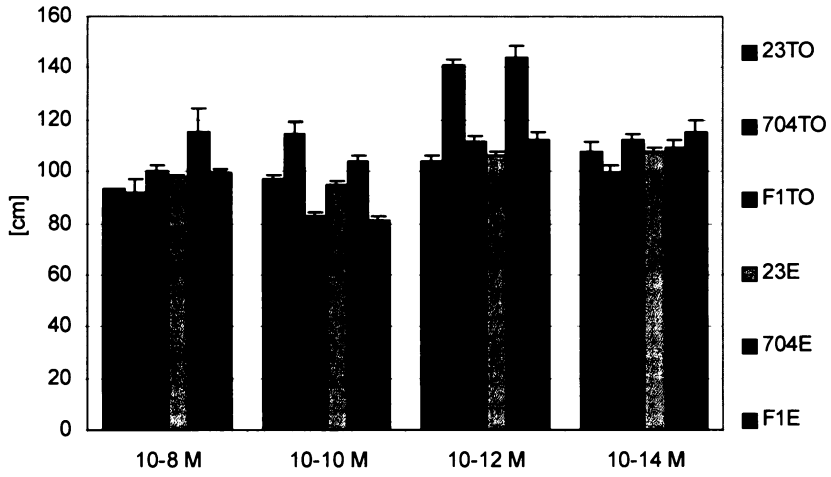

Obr. 85.: Průměrná délka 3. listů při pěstování v teple. Vyjádřeno v procentech kontroly.



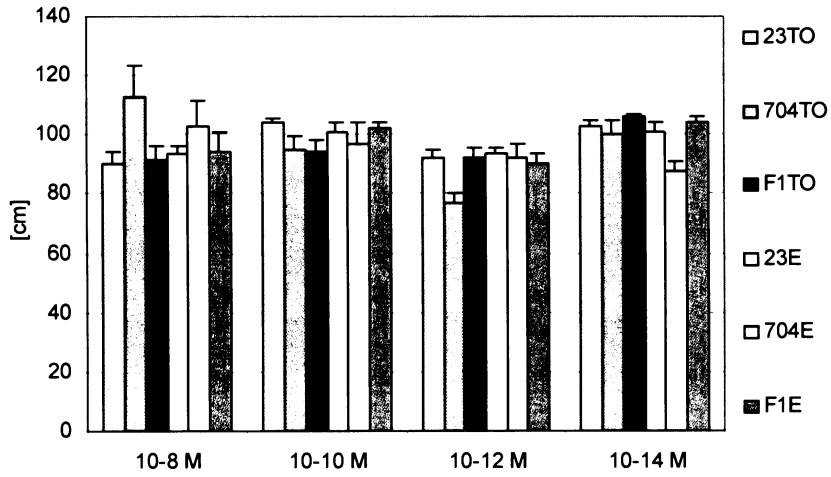
Obr. 86.: Průměrná délka 4. listů při pěstování v teple. Vyjádřeno v procentech kontroly.



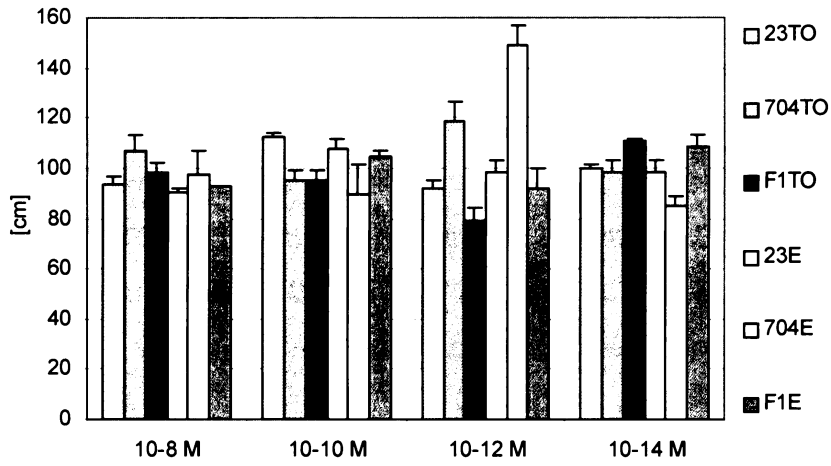

Obr. 87.: Průměrná délka 5. listů při pěstování v teple. Vyjádřeno v procentech kontroly.



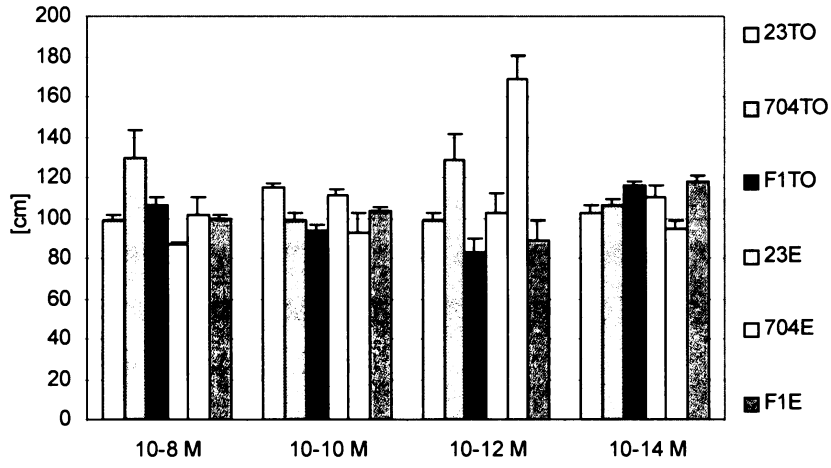

Obr. 88.: Průměrná délka 1. listů při pěstování v chladu. Vyjádřeno v procentech kontroly.



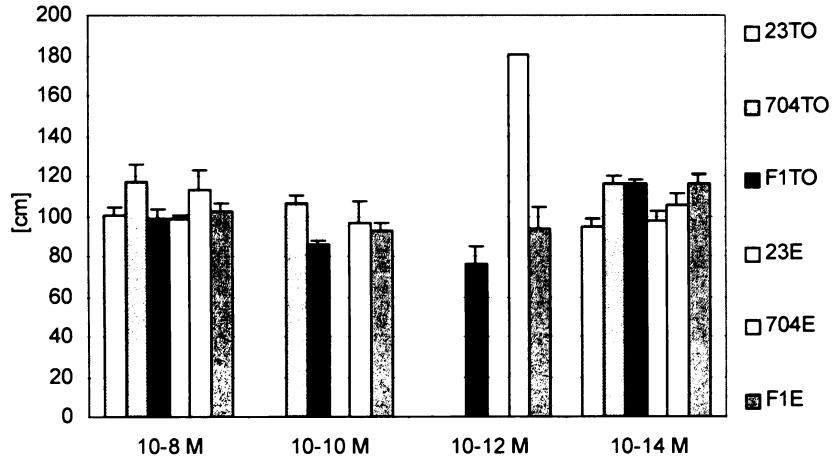
Obr. 89.: Průměrná délka 2. listů při pěstování v chladu. Vyjádřeno v procentech kontroly.




Obr. 90.: Průměrná délka 3. listů při pěstování v chladu. Vyjádřeno v procentech kontroly.



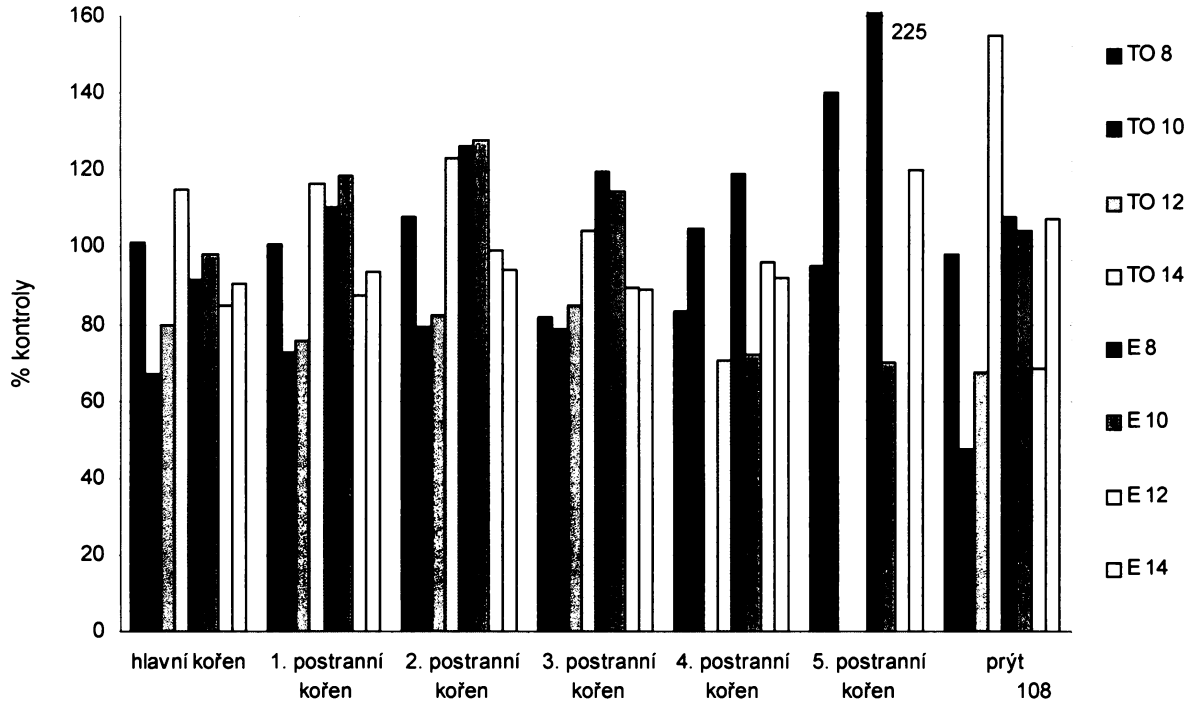

Obr. 91.: Průměrná délka 4. listů při pěstování v chladu. Vyjádřeno v procentech kontroly.



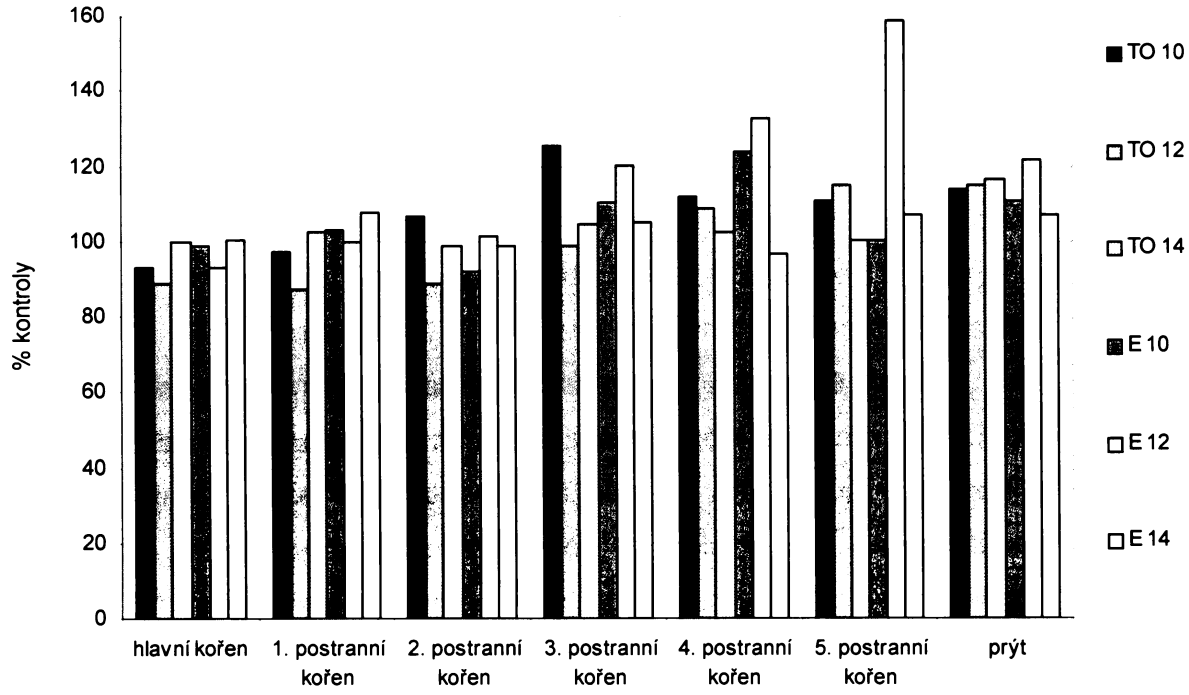
## 4.6. Morfologické parametry klíčících rostlin

U klíčících rostlin ovlivněných brassinosteroidy jsem studovala délku kořenů a prýtů. U genotypu 704 jsem zjistila, že délka hlavního kořene byla po aplikaci brassinosteroidů mírně snížena oproti kontrole, nejvíc po ošetření $10^{-10}$ M TO. Pouze po aplikaci $10^{-14}$ M TO byl hlavní kořen delší než u kontroly. Délka postranních kořenů byla prodloužena po aplikaci $10^{-14}$ M TO, $10^{-8}$ M a $10^{-10}$ M E. Ostatní ošetření délku postranních kořenů snížily v porovnání s kontrolou. Délka prýtu byla výrazně vyšší (o 55%) oproti kontrole po ošetření $10^{-14}$ M TO, naopak po aplikaci $10^{-10}$ M TO, $10^{-12}$ M TO a $10^{-12}$ M E byla délka prýtu nižší v porovnání s kontrolou (Obr. 92.). U starých semen genotypu 704 byl prýt mírně delší u ošetřených rostlin v porovnání s kontrolními, délka kořenů byla ovlivněna jen minimálně, a to zejména délka 3., 4. a 5. postranního kořenů, které byly dělší po ošetření $10^{-8}$ M TO a $10^{-12}$ M E oproti kontrole (Obr. 93.). Délka prýtu u F1 křížence byla většinou srovnatelná s kontrolou, pouze po aplikaci $10^{-12}$ M E byla mírně vyšší. Délka hlavního kořene ovlivněna nebyla, délky 3. a 4. postranního kořene byly zvýšeny po aplikaci většiny koncentrací nebo byly s kontrolou srovnatelné. Pouze délka 5. postranního kořene byla po aplikaci $10^{-10}$ M E mírně nižší než u kontroly (Obr. 94.).

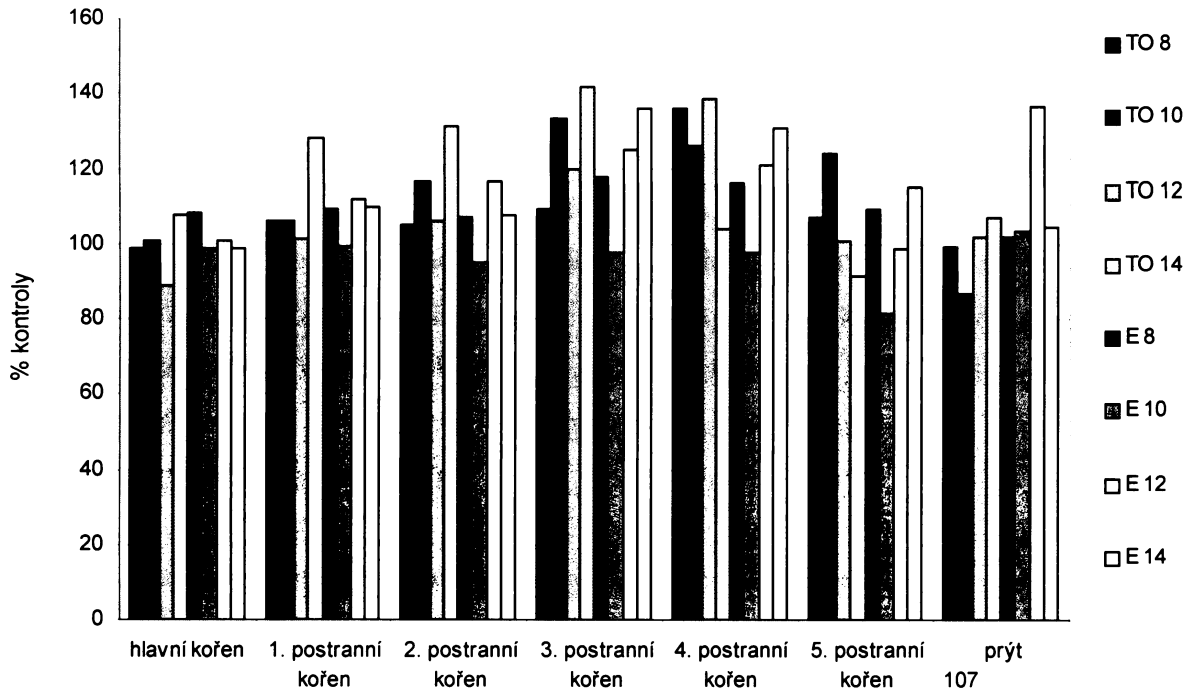
Obr. 92.: Morfologické parametry klíčících rostlin genotypu 704 rostoucích z nových semen. Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 93.: Morfologické parametry klíčících rostlin genotypu 704 rostoucích ze starých semen. Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



Obr. 94.: Morfologické parametry klíčících rostlin F1 kříženec. Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).

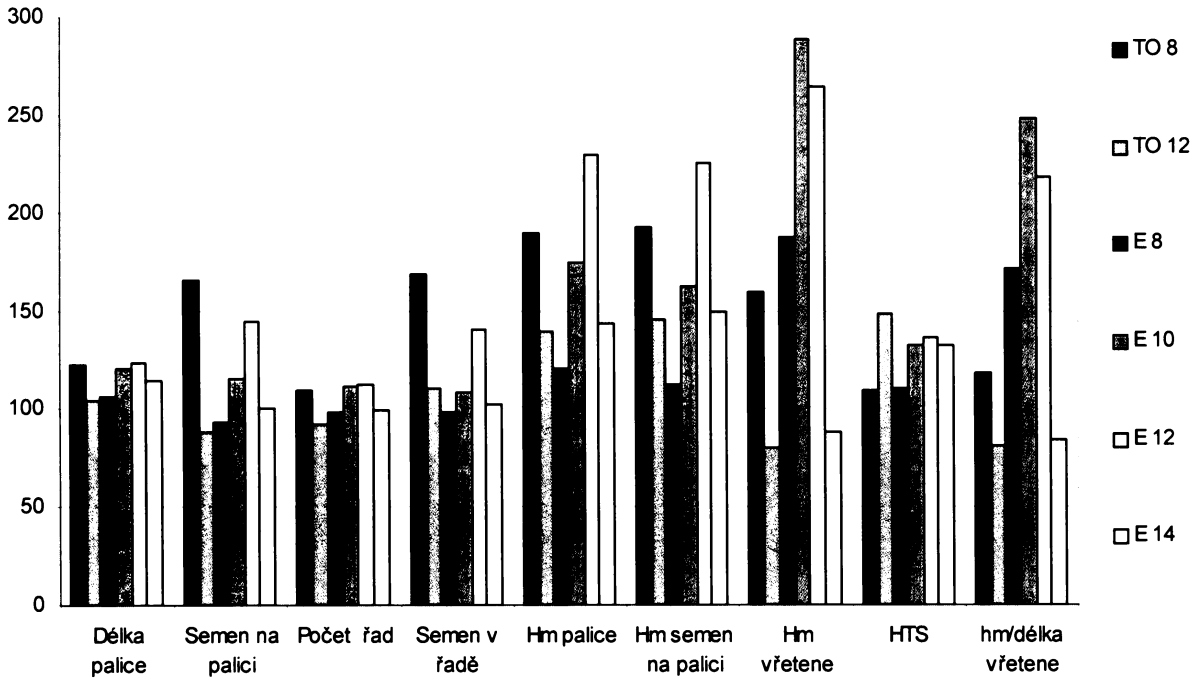



## 4.7. Výnosové charakteristiky

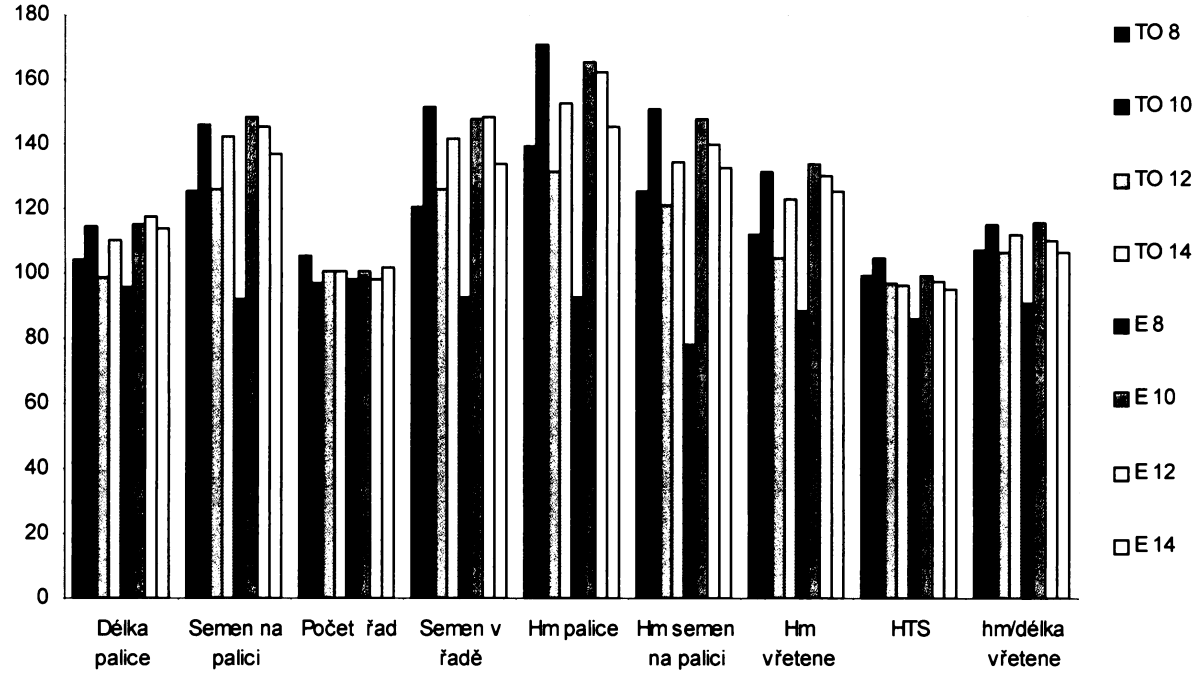
Z následujících grafů je patrné, že výnosové parametry u kukuřice byly po aplikaci brassinosteroidů velmi často zvýšeny. Výrazně zvýšeno bylo mnoho hodnot. U genotypu 23 byla v roce 2003 výrazně zvýšena hmotnost palice a hmotnost tisíce semen (HTS) po ošetření $10^{-12}$ M TO (Obr. 95.). V roce 2004 bylo u genotypu 23 naměřeno po aplikaci brassinosteroidů více významně zvýšených výnosových parametrů. Při koncentraci $10^{-10}$ M byla v porovnání s kontrolou nezměněna pouze HTS a počet řad na palici, ostatní parametry byly významně zvýšeny. Také po aplikaci $10^{-12}$ M E byla výrazně zvýšena délka palice, počet semen na palici, počet semen v řadě, hmotnost palice, hmotnost semen na palici a hmotnost vřetene. Při koncentraci $10^{-14}$ M E se pouze prokazatelně oproti kontrole zvýšila délka palice, po ošetření $10^{-14}$ M TO měly palice významně vyšší počet semen v řadě a hmotnost palice (Obr. 96.). U tohoto genotypu byly zvýšeny výnosové parametry i u dalších ošetření, ale statisticky nebyly tyto změny významné (Obr. 95. a 96.). U genotypu 704 jsem pouze

ve dvou případech naměřila výrazné zvýšení HTS, konkrétně v roce 2003 po ošetření $10^{-12}$ M E a v roce 2004 po ošetření $10^{-14}$ M E. U genotypu 704 se naopak vyskytlo jediné průkazné snížení hodnot výnosových parametrů po ošetření brassinosteroidy a to konkrétně snížený počet semen v řadě po ošetření $10^{-10}$ M TO. U tohoto genotypu jsem také zaznamenala mnoho mírných snížení výnosových parametrů po ošetření oproti kontrole (Obr. 97. a 98.). U F1 křížence jsem v roce 2003 po aplikaci $10^{-8}$ M TO naměřila větší hmotnost palice a po aplikaci $10^{-8}$ M E a $10^{-10}$ M TO větší hmotnost vřetene a poměr hmotnosti palice ku její délce oproti neošetřené kontrole. Mnoho parametrů zde bylo také po aplikaci brassinosteroidů neprůkazně zvýšeno (Obr. 99.). V roce 2004 jsem u F1 křížence nenaměřila žádné výrazné ani mírné zvýšení výnosových parametrů (Obr. 100.).

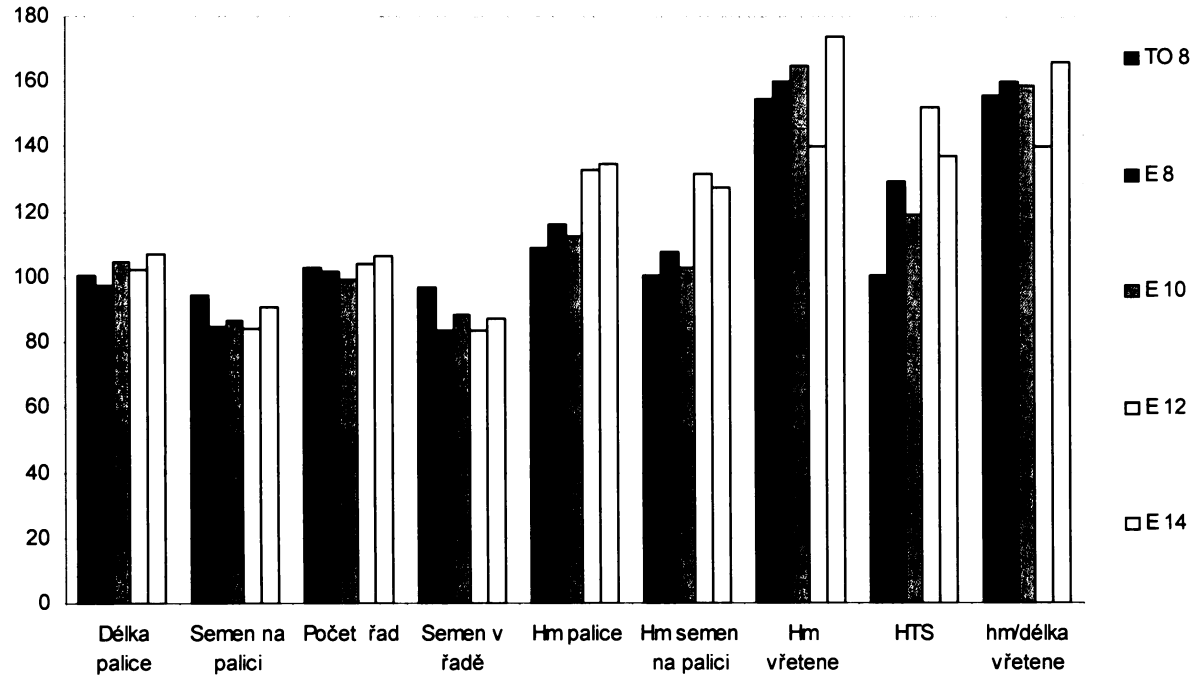
Obr. 95.: Výnosové charakteristiky kukuřic genotypu 23 v roce 2003. Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



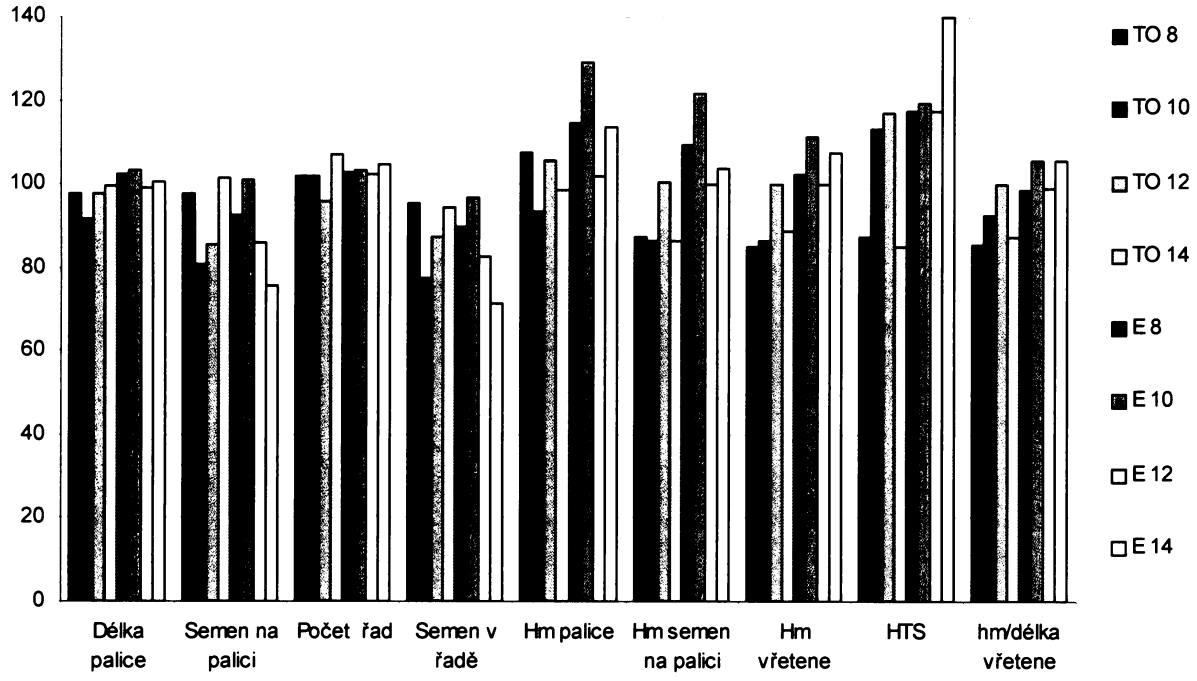
Obr. 96.: Výnosové charakteristiky kukuřic genotypu 23 v roce 2004. Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



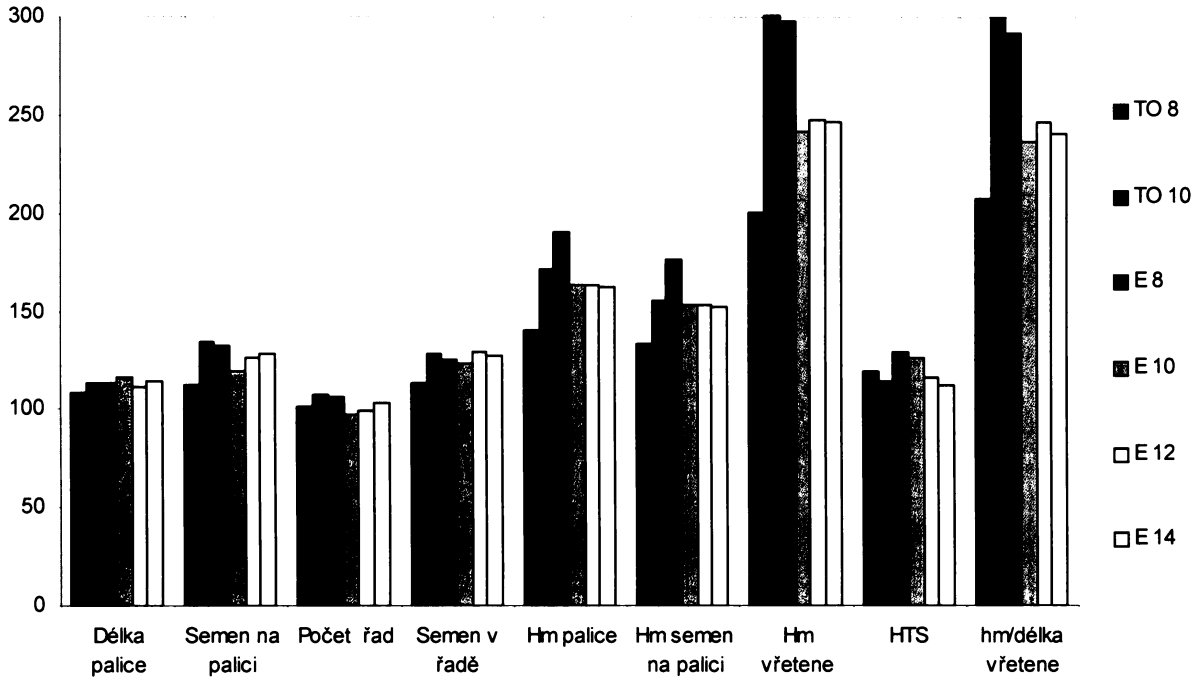

Obr. 97.: Výnosové charakteristiky kukuřic genotypu 704 v roce 2003. Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



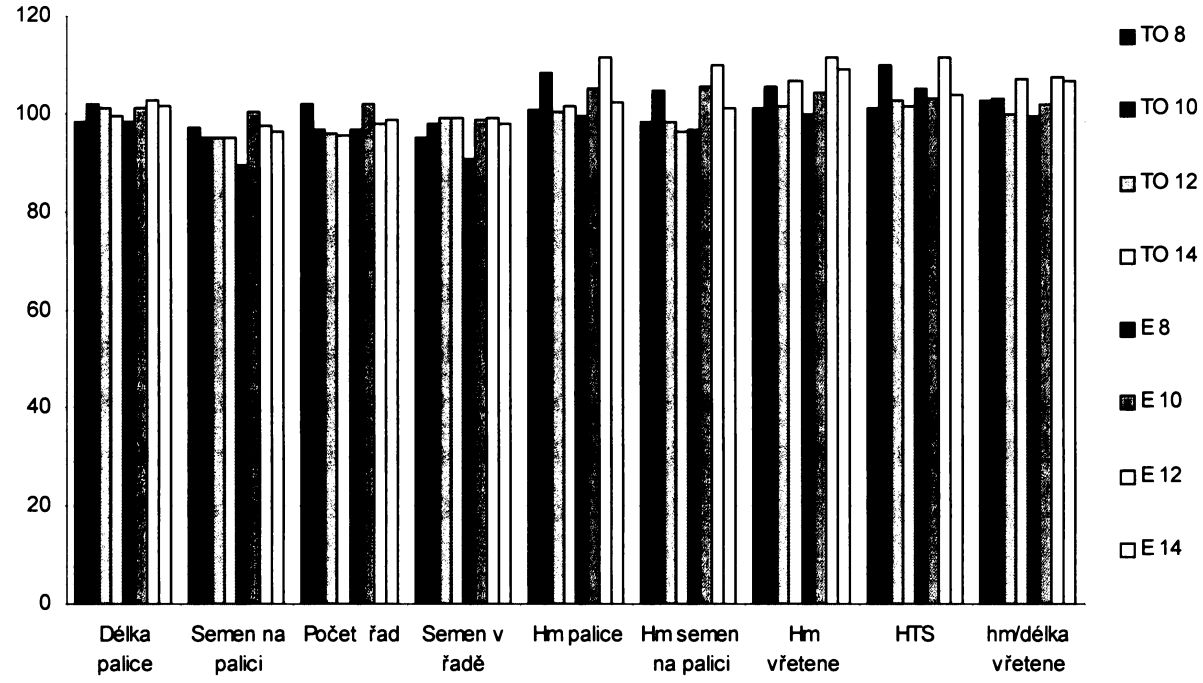
Obr. 98.: Výnosové charakteristiky kukuřic genotypu 704 v roce 2004. Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).




Obr. 99.: Výnosové charakteristiky kukuřic F1 křížence v roce 2003. Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



Obr. 100.: Výnosové charakteristiky kukuřic F1 křížence v roce 2004. Vyjádřeno v procentech kontroly (ošetřené vodou).



# 5. Diskuze

Brassinosteroidy jsou látky, které pozitivně ovlivňují mnoho procesů v rostlinách, mají výrazný vliv při zvyšování výnosu různých ekonomicky významných plodin (**Hayat et al., 2000, Khripach et al., 2000, Khripach et al, 2001, Rao et al., 2002, Peng et al., 2003, Müssig, 2005**), pozitivně ovlivňují růst a dělení buněk (**Bajguz, 2000a, Clouse, 2002, Rao et al., 2002**). Částečně prozkoumané jsou jejich protistresové aktivity, a výzkumy prokazují, že brassinosteroidy pomáhají rostlinám odolávat různým abiotickým i biotickým stresům, a jejich vliv je ve stresových podmínkách výraznější (**Kamuro & Takatsuto, 1999, Katsumi, 1999, Fujii & Saka, 2001, Dhaubhadel et al., 2002, Mazorra et al., 2002, Yu et al., 2002**).

V literatuře jsou dostupné některé práce, ve kterých autoři zkoumali vliv brassinosetroidů na fotosyntézu (**Hayat et al., 2000, Staszková et al., 2002, Yu et al., 2002, 2004, Hradecká et al., 2003a**). Pouze **Yu et al., (2002)** však studoval ovlivnění fotosyntézy pomocí brassinosteroidů při chladovém stresu. Toto téma tedy není v literatuře komplexně zpracováno, ačkoli je velmi zajímavým předmětem k výzkumu.

Z výsledků, které jsem zpracovala ve své diplomové práci, jsem zjistila, že brassinosteroidy zvyšují obsah fotosyntetických pigmentů u rostlin kukuřice genotypu 704 při stresové zátěži (a to zejména při koncentracích $10^{-8}$ M a $10^{-12}$ M), zatímco v teple jsou u rostlin genotypu 704 po ošetření brassinosteroidy obsahy pigmentů srovnatelné nebo mírně nižší než u kontroly. Je tedy možné, že na vyrovnání stresové zátěže je potřeba relativně velké množství brassinosteroidů, což potvrzuje i **Yu et al., (2002)**, který zjistil, že největší vliv na zlepšení fotosyntických charakteristik měla koncentrace 0,1 mg/l (která odpovídá koncentraci $2x10^{-7}$ M). Navíc rostliny genotypu 704 lze považovat za méně odolné, citlivější k chladu oproti rostlinám genotypu 23 a F1 kříženci. V mých pokusech jsem pozorovala výrazné zvýšení většiny fotosyntetických parametrů u rostlin tohoto genotypu po aplikaci $10^{-8}$ M a $10^{-12}$ M obou brassinosteroidů při chladovém stresu oproti kontrole než u rostlin genotypu 23 a F1 kříženec. Tyto výsledky souhlasí se zjištěním, publikovaným v pracech **Sasse (1999)**

a **Khripach et al., (2000)**, že brassinosteroidy působí výrazněji právě při stresu, a v mém pokusu nejvíce ovlivnily právě rostliny nejcitlivějšího genotypu.

Nízké koncentrace brassinosteroidů ($10^{-14}$ M) měly pozitivní vliv na fotosyntetické parametry hlavně u rostlin genotypu 23 a F1 generace (které jsou odolnější vůči chladovému stresu a lépe se přizpůsobují k podmínkám chladu v ranných fázích vývoje) rostoucích v teple. Reakce fotosyntetických parametrů na aplikaci brassinosteroidů u rostlin genotypů 23 a F1 křížence měly při nižších koncentracích ($10^{-14}$ M a $10^{-12}$ M) shodné tendence, zatímco u vyšších koncentrací ($10^{-8}$ M a $10^{-10}$ M) se i jejich odpověď na aplikaci brassinosteroidů vzájemně lišila, a to nejen v obsahu fotosyntetických pigmentů, ale i v hodnotách aktivit PS I a AHR. Tyto rozdíly lze připisovat rozdílům v genové výbavě rostlin. **Hradecká et al., (2003a)** zjistila, že různé rostlinné druhy (řepka a pšenice) odpovídají na aplikaci brassinosteroidů různým způsobem co se týče změn v obsahu chlorofylu.

Obsahy fotosyntetických pigmentů a hodnoty aktivit PS I a AHR byly ovlivněny aplikací brassinosteroidů, většina těchto charakteristik po aplikaci brassinosteroidů vzrostla, ale velký vliv měla použitá koncentrace a podmínky při pěstování.

Rozdíly se také vyskytly mezi použitými typy brassinosteroidů. To, zda rostliny odpovídaly silněji na aplikaci E nebo TO, záviselo částečně na použité koncentraci a genotypu rostliny, většinou však TO ovlivnil fotosyntetické charakteristiky větší měrou než E. To je v rozporu se zjištěním **Stazková et al., (2002)**, která používala při pokusech stejné brassinosteroidy jako já, že obsah chlorofylu u pšenice byl výrazněji zvýšen po ošetření E než po ošetření TO. Pro každý typ brassinosteroidu a druh či genotyp rostliny tedy existuje nejspíš určitá optimální koncentrace s nejvyšší účinností, která se mění v závislosti na podmínkách pěstování. Mé výsledky ukazují, že u rostlin genotypu 704 pěstovaných v chladu byla touto optimální koncentrací pro zvýšení fotosyntetických charakteristik koncentrace $10^{-8}$ M a při pěstování v teple žádná z použitých koncentrací rostliny výrazně neovlivnila, a u rostlin genotypu 23 při pěstování v chladu $10^{-14}$ M TO a u 24-epibrassinolidu dosahovala nejvyšších hodnot každá z charakteristik (obsah pigmentů, aktivita PS I a AHR) při jiné koncentraci. V teple nejvyšší odpověď vyvolala aplikace obou brassinosteroidů v koncentraci $10^{-14}$ M. Rostliny F1 křížence při pěstování v chladu dosahovaly nejvyšších hodnot

fotosyntetických parametrů při koncentraci $10^{-8}$ M, přesto tato koncentrace nebyla pro tyto rostliny ideální. U F1 generace byly v teple nejvíc zlepšené fotosyntetické parametry při koncentraci $10^{-14}$ M. Vliv brassinosteroidů na fotosyntetické parametry tedy závisel na genotypu kukuřice, koncentraci brassinosteroidu a podmínkách pěstování. Je zajímavé, že koncentrace $10^{-14}$ M TO působila u rostlin genotypu 23 (a v teple i u F1 křížence) výrazněji na růst obsahu chlorofylů než karotenoidů (zatímco jinde byl poměr Chl (*a*+*b*)/Kar téměř shodný jako u kontroly), je tedy možné, že s odlišnými koncentracemi brassinosteroidů se mírně liší i mechanizmy jejich účinku, (při koncentraci $10^{-14}$ M byly u rostlin genotypu 23 a F1 křížence výrazněji zvýšeny hodnoty obsahu chlorofylů než hodnoty obsahu karotenoidů).

V mém pokusu brassinosteroidy ovlivnily specifickou hmotnost listu (SpHm) pouze v několika málo případech, (při aplikaci $10^{-12}$ M TO dokonce negativně), přestože by se dalo očekávat, že vyšší rychlost fotosyntézy způsobí rychlejší vznik asimilátů a nárůst hmoty. **Hayat et al., (2000)** zjistil, že 28-homobrassinolid zvýšil rychlost fotosyntézy a karboxylace a díky tomu i hmotnost sušiny rostlin. Tyto hodnoty měřil 60 dnů po aplikaci brassinosteroidu. Je tedy možné, že jsem v mém pokusu měřila specifickou hmotnost listu příliš brzy po aplikaci, a vliv brassinosteroidů se tedy ještě nestihl projevit. Spíš si však myslím, že rostliny (ty, u kterých jsem zjistila po aplikaci brassinosteroidů vyšší hodnoty fotosyntetických parametrů) nepřeměňovaly vzniklé asimiláty na vyšší hmotu listů, ale jiných částí rostliny. Zajímavé je, že výrazné rozdíly SpHm byly naměřeny pouze u rostlin pěstovaných v teple, při pěstování v chladu byla pouze neprůkazně snížena SpHm u rostlin genotypu 704 po ošetření koncentracemi $10^{-12}$ M obou brassinosteroidů. U těchto rostlin jsem také naměřila delší listy a to by mohlo potvrdit mou doměnku o tom, že v těchto rostlinách jsou vzniklé asimiláty využívány k zvětšení plochy listu na úkor jejich specifické hmotnosti. Celková hmotnost sušiny rostlin, u kterých brassinosteroidy zvýšily hodnoty fotosyntetických parametrů, by nejspíš byla také zvýšena, protože vyšší účinnost fotosyntézy způsobí rychlejší vznik asimilátů a růst biomasy rostliny. Tyto pokusy jsem však ve své práci neprováděla.

Relativní obsah vody v listu (RWC) nebyl ovlivněn aplikací brassinosteroidů o více než 5%. V literatuře se sice uvádí, že brassinosteroidy ovlivňují aktivitu aquaporinů a

propustnost buněk pro vodu (**Morillon et al., 2000**), ale v mém pokusu rostliny netrpěly nedostatkem ani přebytkem vody, proto si myslím, že rostliny neměly potřebu výrazněji regulovat obsah vody v listech. Jednotlivé odlišnosti v RWC (u rostlin genotypu 23 při ošetření $10^{-8}$ M a $10^{-12}$ M TO a rostliny F1 křížence při ošetření $10^{-12}$ M E) jsou nejspíš způsobeny aktuálním fyziologickým stavem rostlin, popř. jednotlivých listů.

Brassinosteroidy mají pozitivní vliv na růst buněk a tkání, především na růst mladých tkání, listů i stonků (**Clouse, 2002, Rao et al., 2002**), a to i u rostlin stresovaných chladem (**Kamuro & Takatsuto, 1999, Fujii a Saka, 2001**).

Z výsledků morfologických měření jsem zjistila, že vliv brassinosteroidů na délku internodií je patrný u rostlin genotypu 704 ve všech testovaných koncentracích při obou způsobech pěstování. Tento fakt lze vysvětlit tím, že rostliny genotypu 704 jsou citlivější k vnějším podmínkám a rostou hůř oproti ostatním sledovaným rostlinám, a i když byly pěstovány v teple tak dosahovaly menších rozměrů (jak výšky tak délky listů) než rostliny genotypu 23 a F1 generace, ošetření oběma brassinosteroidy zde tedy posílilo růst rostlin. Je možné, že brassinosteroidy u rostlin tohoto genotypu aktivovaly transkripci nějakých mlčících genů a tím zvýšily růst internodií a listů. Mnoho genů je totiž regulovatelných brassinosteroidy (**Müssig & Altman, 2003, Müssig, 2005**) a tak je pravděpodobné, že se u rostlin tohoto genotypu některá z těchto regulací vyskytla, zatímco u rostlin genotypu 23 nebyla tak výrazná. Proto byl větší růst zaznamenán u rostlin genotypu 704 po ošetření brassinosteroidy a ne u rostlin ostatních sledovaných genotypů, kde to regulace zřejmě nebyla tak intenzivní. Rostliny F1 křížence měly ve svých odpovědích na aplikaci brassinosteroidů většinou podobné tendence jako rostliny mateřského genotypu 23, což by mohlo naznačovat, že tyto genové regulace jsou silně ovlivněny mateřským genotypem a mohou být, alespoň částečně, vázány na mimojadernou (tj chloroplastovou) dědičnost. Pro potrzení této hypotézy by však bylo potřeba více dalších experimentů.

Také byl u většiny ošetřených rostlin patrný nárůst délky internodií oproti kontrole (v chladu výrazněji) v druhém a třetím týdnu měření, tedy bezprostředně po ošetření. výrazný byl přírůstek délky mezi 1. a 2. týdnem měření (po první aplikaci

brassinosteroidů) a mezi 3. a 4. týdnem (po druhé aplikaci brassinosteroidů) byl přírůstek internodií u ošetřených rostlin srovnatelný s kontrolou, což potvrzuje, že mladé tkáně jsou citlivější k působení brassinosteroidů, jak již uvádějí **Rao et al., (2002)** a **Müssig, (2005)**. Přírůstek byl nejvýraznější při koncentraci obou brassinosteroidů $10^{-14}$ M, a tato tendence nezávisela na typu brassinosteroidu ani na genotypu kukuřice. Délka listů byla po aplikaci brassinosteroidy ovlivněna pouze mírně. Jediný případ, kdy ošetření brassinosteroidy působilo na růst listů a způsobilo jejich prodloužení, zvláště u citlivého genotypu 704, byl při ovlivnění koncentrací $10^{-12}$ M, kdy kromě působení brassinosteroidů působil na rostliny silnější chlad s rychlým nástupem nízkých teplot. Ostatní fotosyntetické parametry však zůstaly obdobné, jako při působení jiných koncentrací. Brassinosteroidy zde zřejmě vyrovnávaly vliv extrémního počasí, což by souhlasilo se zjištěním **Hradecká et al., (2003b)**, že brassinosteroidy působí výrazněji právě v při extrémní zátěži. Bylo by zajímavé zjistit, zda by rostliny ošetřené brassinosteroidy přežily déle působení velmi nízkých teplot než rostliny neošetřené při působení extrémně nízkých teplot nebo jiných stresových faktorů, tyto pokusy jsou ale již z časových důvodů nebyly provedeny.

Vliv brassinosteroidů na růst kořenů stále ještě není detailně prostudován, ale zřejmě závisí na použité koncentraci mnohem víc než v jiných orgánech, nízké koncentrace brassinosteroidů nejspíš růst kořenů ovlivňují pozitivně a vyšší koncentrace negativně. Aktivita závisí také na typu aplikovaného brassinosteroidu a na genotypu rostliny (**Guan & Roddick 1988, Kim et al., 2000a, b, Fujii & Saka 2001, Müssig et al., 2003, Müssig, 2005**).

Při pozorování vlivu brassinosteroidů na klíčící obilky kukuřice jsem zjistila, že délka hlavního kořene byla většinou srovnatelná s kontrolou nebo mírně inhibována, což odpovídá zjištění v některých studiích (**Guan & Roddick 1988, Fujii & Saka 2001**), zatímco délka postranních kořenů byla velmi často větší v porovnání s kontrolou. Růst hlavního kořene byl tedy pravděpodobně méně ovlivněn působením brassinosteroidů než postranní kořeny klíčících rostlin. Nejvíc patrný byl pozitivní vliv brassinosteroidů na délku 3. a 4. postranních kořenů. U F1 hybridů byly oproti kontrole

delší postranní kořeny hlavně při použití koncentrace $10^{-14}$ M, což odpovídá zjištění **Müssig et al., (2003)**, že nízké koncentrace brassinosteroidů růst kořenů stimulují. U rostlin genotypu 704 rostoucích z nových obilek však toto tvrzení neplatilo, a to, zda brassinosteroidy aktivovaly nebo inhibovaly růst záviselo na použité koncentraci a zároveň typu brassinosteroidu. Rostliny rostoucí z nových obilek genotypu 704 měly růst kořenů po aplikaci brassinosteroidů nejvíc inhibovaný po ošetření $10^{-10}$ M TO, $10^{-12}$ M TO, $10^{-12}$ M E a $10^{-14}$ M E, a kořeny byly delší než kontrolní po aplikaci $10^{-8}$ M E, $10^{-10}$ M E a $10^{-14}$ M TO, zatímco na růst kořenů u rostlin rostoucích ze starých obilek genotypu 704 aplikace brassinosteroidů ve všech koncentracích růst příliš neovlivnila. Kořeny rostlin rostoucích ze starých obilek genotypu 704 byly tedy k působení brassinosteroidů méně citlivé. Možná ve starých obilkách byly inhibovány některé regulační látky, které snížily citlivost kořenů těchto rostlin k brassinosteroidům. Pro vyjasnění vlivu brassinosteroidů na růst kořenů bude potřeba provést ještě nejeden výzkum.

Délka prýtu byla ovlivněna pouze nepatrně, přestože ve většině studií se uvádí, že brassinosteroidy výrazně stimulují růst stonku mladých rostlin. Příčinou byl nejspíš způsob aplikace, kdy obilky ležely v roztoku brassinosteroidů celou dobu pěstování, podobně jako ve studii **Fujii & Saka (2001)**, kde měla na délku prýtu vliv doba, po kterou brassinosteroidy na obilky působily. Také **Ono et al., (2000)** ve své studii zjistili, že brassinolid nemá průkazný vliv na délku stonku begónie, zde však k výzkumu použili starší rostliny. Pouze u starých obilek genotypu 704 byla délka prýtu při všech použitých koncentracích mírně zvýšena, možná proto, že stáří obilek působilo jako mírný stresový faktor. Ve starších semenech se pomaleji rozbíhají exprese genů, což způsobí pomalejší růst mladé rostliny. Brassinosteroidy možná pozitivně ovlivnily rychlost exprese genů a tím i růst prýtu ve starých obilkách genotypu 704. Brassinosteroidy tedy možná urychlují expresi genů v rostlinách, klíčících ze starých obilek, která mají částečně omezenu funkci translačního aparátu.

Brassinosteroidy pozitivně ovlivňují výnos mnoha plodin, mezi kterými je také kukuřice (**Rao et al., 2002**), což se potvrdilo i v mých pokusech. Vliv brassinosteroidů na výnosové charakteristiky byl celkem zřetelný, i při hodnocení výnosových

parametrů byl však velmi patrný vliv genotypu rostlin. Nejlépe na aplikaci brassinosteroidů reagovaly rostliny genotypu 23, u kterých byla výrazně zvýšena hmotnost palice, a to zejména při koncentraci obou brassinosteroidů $10^{-10}$ M a $10^{-12}$ M. Naopak negativně na výnosové parametry rostlin genotypu 23 působilo ošetření $10^{-8}$ M E. Zajímavé je, že ošetření brassinosteroidem TO působilo na výnosové parametry rostlin genotypu 23 velmi pozitivně i v tak vysokých koncentracích jakou je $10^{-8}$ M. Brassinosteroid E měl tedy při vysoké koncentraci negativní vliv na výnos kukuřice genotypu 23, naopak výnos kukuřice genotypu 704 a F1 křížence E v tak vysoké koncentraci zvyšoval, často i výrazněji než jiná ošetření. Rostliny genotypu 23 možná neumí účinně metabolizovat tak vysoké koncentrace 24-epibrassinolidu, a proto toto ošetření působilo na rostliny jako mírná zátěž. Brassinosteroid TO je v rostlinách nejspíš metabolizován odlišným způsobem, pro který mají lépe vyvinutý mechanizmus i rostliny genotypu 23, a proto u nich vysoké koncentrace TO nepůsobily na výnos inhibičně.

Pro zvýšení výnosových charakteristik při ošetření rostlin v polních podmínkách u rostlin genotypu 23 byla ideální koncentrace obou brassinosteroidů $10^{-12}$ M. Zatímco u rostlin genotypu 23 byla hmotnost palice po aplikaci brassinosteroidů výrazně zvýšena, a to zejména díky zvýšení počtu semen na palici, u rostlin genotypu 704 byla pouze mírně zvýšena HTS, naopak počet obilek byl po aplikaci brassinosteroidů nižší a hmotnost palice tedy ve výsledku ovlivněna nebyla. U F1 hybrida byl patrný velký vliv vnějších faktorů na tvorbu výnosu po aplikaci brassinosteroidů, v roce 2003 byl u rostlin tohoto genotypu výnos zvýšen (podobně jako u rostlin genotypu 23) zvýšením počtu semen na palici a navíc i (podobně jako u rostlin genotypu 704) mírným zvýšením HTS. V roce 2004 však brassinosteroidy neměly na výnosové parametry rostlin tohoto genotypu žádný vliv. Podmínky při kterých byly kukuřice pěstovány tedy výrazně ovlivnily reakci F1 křížence na aplikaci brassinosteroidů, podobně jako ve studii **Hradecká et al., (2002b)**. To, že u F1 generace byl v roce 2003 zvýšen výnos díky zvýšení počtu semen v řadě i HTS, bylo nejspíš způsobeno vlivem genotypu rostlin. Také lze uvažovat o možném vlivu některých brassinosteroidy regulovatelných genů, které tyto rostliny získaly dílem od mateřského (23) i otcovského genotypu (704). Této úvaze mírně odporuje fakt, že v roce 2003 byla i u rostlin genotypu mírně

zvýšena HTS, možná tedy i při zvyšování výnosu hraje roli i mimojaderná dědičnost. Bylo by zajímavé detailněji studovat, jaké dědičné vlivy se podílí na zvyšování výnosu pomocí brassinosteroidů u rodičovských linií a jejich kříženců, což však již nemohlo být z kapacitních důvodů náplní této práce.

Při sledování vlivu námi použitých brassinosteroidů na fotosyntetické charakteristiky a výnosové parametry, je zřejmé, že průkazný rozdíl mezi použitými typy brassinosteroidů (přírodní E a syntetický TO) se vyskytl při měření fotosyntetických charakteristik pouze v jednom případě (u rostlin genotypu 23 ošetřených koncenrtacemi $10^{-10}$ M), a po ošetření TO zde byly naměřeny vyšší hodnoty poměru celkových chlorofylů/celkovým karotenoidům. Při měření výnosových parametrů se naopak častěji vyskytl průkazný rozdíl mezi ošetřeními brassinosteroidy TO a E, kde však rostliny dosahovaly vyšších hodnot výnosových parametrů po ošetření E. Většinou byl zde vliv dvou typů brassinosteroidů srovnatelný. Obvykle tedy nebyl pozorován rozdíl v aktivitě obou sledovaných brassinosteroidů při měření fotosyntetických parametrů a pouze v některých případech při měření výnosových charakteristik. Tyto dva brassinosteroidy měly mírně odlišný účinek na výnos kukuřice, přičemž 24-epibrassinoslid zvyšoval výnosové parametry víc než brassinosteroid TO. Podobné výsledky zjistila také **Hradecká et al., (2003b)**, která pracovala se stejnými brassinosteroidy jako já. E v jejích pokusech prodlužoval délku klasu pšenice, zvyšoval HTS a výnos víc než TO, většinou však také působily na výnos srovnatelně.

Je téměř jasné, že rostliny každého genotypu reagují mírně odlišně na různé typy a koncentrace brassinosteroidů a neexistuje tedy žádný "univerzální brassinosteroid" který by zlepšoval fotosyntetické, výnosové a morfologické charakteristiky u všech rostlinných druhů.

V mém pokusu bohužel nebylo možné z kapacitních důvodů pracovat s reciprokým kříženecem, což by umožnilo provést detailnější genetickou analýzu. Některé otázky proto stále zůstávají otevřeny.

# 6. Souhrn

Zjistila jsem, že brassinosteroidy stimulovaly růst hodnot fotosyntetických parametrů u rostlin kukuřice genotypu 704 při chladovém stresu, a to hlavně při relativně vysokých koncentracích ($10^{-8}$ M a $10^{-12}$ M). U rostlin genotypu 23 a F1 byly stimulovány fotosyntetické parametry v optimálních podmínkách, a to zejména při nízkých použitých koncentracích ($10^{-14}$ M a $10^{-12}$ M). Při vyšších koncentracích se reakce rostlin genotypu 23 a F1 lišila. Vliv brassinosteroidů na fotosyntetické charakteristiky kukuřice tedy závisí zejména na genotypu rostliny, koncentraci brassinosteroidu a vnějších podmínkách.

Při použití koncentrace $10^{-14}$ M TO a pěstování v chladu se u rostlin genotypu 23 odlišoval účinek brassinosteroidu na obsah chlorofylů od obsahu karotenoidů. Různé procesy v rostlině jsou zřejměregulovány brassinosteroidy odlišně.

Brassinosteroidy stimulovaly růst internodií u rostlin genotypu 704 pěstovaných v chladu. Na délku listů mají brassinosteroidy vliv nejspíš hlavně při extrémních podmínkách pěstování. Nezjistila jsem výrazný rozdíl mezi použitými koncentracemi a typy brassinosteroidů na růst internodií. Týdenní přírůstek délky internodií při chladovém stresu byl stimulován aplikací brassinosteroidů, zejména při koncentraci $10^{-14}$ M. Tento vliv byl nejvýraznější po prvním ošetření rostlin, tedy v mladším vývojovém stádiu. Přírůstek nezávisel na typu brassinosteroidu ani genotypu rostliny. V teple neměly brassinosteroidy na růst internodií výrazný vliv.

Délky 3. a 4. postranních kořenů u klíčících obilek byly aplikací brassinosteroidů stimulovány, délka hlavního kořene po aplikaci testovaných koncentrací ovlivněna nebyla. U rostlin F1 křížence měla aplikace brassinosteroidů největší vliv na prodlužování délky postranních kořenů zejména při nízkých koncentracích, u rostlin ostatních genotypů jsem závislost na koncentraci nevysledovala. Délku prýtu brassinosteroidy ovlivnily pouze při aplikaci na staré obilky.

Exogenní aplikace brassinosteroidů výrazně zvýšila výnos u rostlin genotypu 23, nejvýrazněji koncentrace $10^{-12}$ M a $10^{-10}$ M. U palic tohoto genotypu byl po aplikaci brassinosteroidů výrazně zvýšen počet semen v řadě a díky tomu i hmotnost palice. Vysoká koncentrace 24-epibrassinolidu ($10^{-8}$ M) působila na výnos mírně negativně. U palic genotypu 704 byla pouze neprůkazně zvýšena hmotnost 1000 semen, zatímco počet semen v řadě byl snížen a na výnos rostlin tohoto genotypu tedy neměly brassinosteroidy vliv. U F1 křížence byl po aplikaci brassinosteroidů výnos zvýšen pouze mírně v roce 2003 a to díky zvýšení HTS i počtu semen v řadě. U těchto rostlin se tedy nejspíš projevil výrazný vliv ročníku.

Mezi vlivem zkoumaných typů brassinosteroidů na rostliny většinou nebyl výrazný rozdíl, pokud se však vyskytl, tak TO měl lepší vliv na zvýšení hodnot fotosyntetických a morfologických parametrů než E, a E měl lepší vliv na zvýšení výnosových parametrů kukuřice.

Potvrdila jsem, že vliv brassinosteroidů závisí ve velké míře na koncentraci, na době ošetření a mnoha dalších faktorech. Zjistila jsem, že každý genotyp kukuřice reaguje na aplikaci brassinosteroidů jiným způsobem, rostliny genotypu CE704 reagují pozitivně ve stresových podmínkách na vyšší koncentrace brassinosteroidů ($10^{-8}$ M a $10^{-12}$ M) a odpověď genotypu 2023 a F1 generace byla pozitivní při optimálních podmínkách při nižších koncentracích brassinosteroidů $10^{-14}$ M zvýšením hodnot fotosyntetických charakteristik. Potvrdila jsem, že brassinosteroidy pozitivně ovlivňují výnos kukuřice, u rostlin genotypu 2023 zvýšením počtu semen na palici a u rostlin genotypu CE704 zvyšují pouze neprůkazně hmotnost 1000 semen. Výrazný rozdíl mezi přírodním a syntetickým brassinosteroidem jsem nezjistila.

# 7. Přehled citované literatury


1. **Asami, T. & Yoshida, S. (1999)**: Brassinosteroid biosynthesis inhibitors, Trends Plant Sci., 4 (9): 348-353.

2. **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: 93-99.

3. **Bajguz, A. (2000a):** Effect of brassinosteroids on nucleic acids content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*, Plant Physiol. Biochem, 38: 209-215.

4. **Bajguz, A. (2000b)**: Blockage of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide, Plant Physiol. Biochem., 38: 797-801.

5. **Bajguz, A. & Tretyn, A. (2003)**: The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants, Phytochem., 62: 1027-1046.

6. **Bartoš, J., Berková, E. & Šetlík, I. (1975)**: A versatile chamber for gas exchange measurements in suspension of algae and chloroplasts, Photosyntetica, 9: 395-406.

7. **Bishop, G. J., & Koncz, C. (2002)**: Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling, The Plant Cell, 14: 97-110.

8. **Bishop, G.J., Nomura, T., Yokota, T., Harrison, K., Noguchi, T.,Fujioka, S., Takatsuto, S., Jones, J.D.G., & Kamiya, Y. (1999)**: The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 1761–1766.

9. **Clouse, S. D. & Feldmann, K. A. (1999)**: Molecular genetics of brassinosteroid action. In: Brassinosteroids Steroidal Plant Hormones (Sakurai, A., Yokota, T., & Clouse, S.D., eds) Springer-Verlag, Tokyo: 163-190.

10. **Clouse, S. D. (2002)**, Brassinosteroids, The Arabidopsis Book, 26 (1): 1-23.

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

12. **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, The Plant J., 29 (6): 681-691.

13. **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.

14. **Diener, A. C., Li, H., Zhou, W., Whoriskey, W. J., Nes, W. D. & Fink, G. R. (2000)**: Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. The Plant Cell, 12: 853-870.

15. **Du, L. & Poovaiah, B. W. (2005)**: $Ca^{2+}$/calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth, Nature, 437 (29): 741-745.

16. **Ephritikhine, G., Fellner, M., Vannini, C., Lapous, D., & Barbier-Brygoo, H. (1999)**: The *sax1* dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, giberelins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid, Plant J., 18: 303–314.

17. **Friedrichsen, D.M., Joazeiro, C. A. P., Li, J., Hunter, T. & Chory, J. (2000)**: Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitinously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase, Plant Physiol., 123: 1247-1255.

18. **Fujii S. & Saka H. (2001)**: The promotive effect of brassinolide on lamina joint-cell elongation, germination and seedling growth under low-temperature stress in rice (*Orhyza sativa* L.), Plant prod. sci., 4 (3): 210-214.

19. **Fujioka, S., Li, J., Choi, Y. H., Seto, H.,Takatsuto, S., Noguchi, T., Watanabe, T., Kuriyama, H., Yokota, T., Chory, J. & Sakurai, A. (1997)**: The Arabidopsis deetiolated2 mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis, Plant Cell, 9: 1951-1962.

20. **Guan, M., & Roddick, J.G. (1988)**: Epibrassinolide-inhibition of development of excised, adventitious and intact roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*): Comparison with the effects of steroidal estrogens, Physiol. Plant., 74: 720–726.

21. **Halliday, K. J. (2004)**: Plant hormones: the interplay of brassinosteroids and auxin, Current Biol., 14: 1008-1010.

22. **Hayat, S., Ahmad, A., Mobin, M., Hussain, A., & Fariduddin, Q. (2000)**: Photosynthetic rate, growth, and yield of mustard plants sprayed with 28-homobrassinolide, Photosynthetica, 38 (3): 469-471.

23. **He, J. X., Gendron, J. M., Yang, Y. L., Li, J., M. & Wang, Z. Y. (2002)**: The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BRZ1, a pozitive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 10185-10190.

24. **He, R., Wang, G. & Wang, X. (1991)**: Effects of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings, In: Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications (Cutler, H. G. C., Yokota, T. & Adam, G., eds.), Washington, D.C. :American Chemical Society: 220-230.

25. **Holá, D., Langrová, K., Kočová, M. & Rothová, O. (2003)**: Photosynthetic parameters of maize (*Zea mays* L.) inbred lines and F1 hybrids: their different response to, and recovery from rapid or gradual onset of low-temperature stress, Photosynthetica, 41 (3): 429-442.

26. **Hradecká, D., Staszková, L. & Kohout, L. (2003a)**: Vliv směsi brassinosteroidů s organickými hydrolyzáty na růst a energetiku fotosyntézy pšenice a řepky, In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin (ed. Bláha, L.): 117-121.

27. **Hradecká, D., Staszková, L. & Kohout, L. (2003b)**: Dokáží brassinosteroidy redukovat stres v kalamitním roce?, In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin (ed. Bláha, L.): 111-116.

28. **Choe, S., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tissier, C. P., Gregory, B. D., Ross, A. S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F. E. & Feldmann, K. A. (1999)**: The *Arabidopsis dwf7/ste1* mutant is defective in the $\Delta^7$ sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis, Plant Cell, 11: 207-221.

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

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

31. **Jang, J. C., Fujioka, S., Tasaka, M., Seto, H., Takatsuto, S., Ishii, A., Aida, M., Yoshida, S. & Sheen, J. (2000)**: A critical role for sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the *fackel* mutants of *Arabidopsis thaliana*, Genes Dev., 14: 1485-1497.

32. **Jiang, J.R., & Clouse, S.D. (2001)**: Expression of a plant gene with sequence similarity to animal TGF-beta receptor interacting protein is regulated by brassinosteroids and required for normal plant development, Plant J., 26: 35–45.

33. **Kamuro, Y., & Takatsuto, S. (1999)**: Practical applications of brassinosteroids in agricultural fields, In: Brassinosteroids Steroidal Plant Hormones (Sakurai, A., Yokota, T., & Clouse, S.D., eds) Springer-Verlag, Tokyo: 223-241.

34. **Kang, J.G., Yun, J., Kim, D.H., Chung, K.S., Fujioka, S., Kim, J.I., Dae, H.W., Yoshida, S., Takatsuto, S., Song, P.S., & Park, C.M. (2001)**: Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth, Cell, 105: 625–636.

35. **Katsumi, M. (1991)**: Physiological modes of brassinolide action in cucumber hypocotyl growth, In: Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications (Cutler, H. G. C., Yokota, T. & Adam, G., eds.), Washington, D.C. :American Chemical Society: 246-254.

36. **Khripach, V. A., Zhabinskii, V. N. & Malevannaya, N. N. (1997)**: Recent advances in brassinosteroids study and application, Proc. Plant Growth Regul. Soc. Amer., 24: 101-106.

37. **Khripach, V., Zhabinskii, V & De Groot, A. (2000):** Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century, Ann. Bot., 86: 441-447.

38. **Kim, S. K., Chang, S. C., Lee, E. J., Chung, W. S., Kim, Y. S., Hwang, S. & Lee, J. S. (2000a)**: Involvement of brassinosteroids on the gravitropic response of primary roots of maize, Plant Physiol., 123: 997-1004.

39. **Kim, T. W., Han, K. S., Joo, S. H., Kang, M. W. & Kim, S. K. (2000b)**: Metabolism of brassinolide in suspension cultured cells of *Phaseolus vulgaris*, Bull. Korean Chem. Soc., 21 (10): 1044-1046.

40. **Kim, T. W., Hwang, J. Y., Kim, Y. S., Joo, S. H., Chang, S. C., Lee, J. S., Takatsuto, S. & Kim, S. K. (2005)**: Arabidopsis CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinolide biosynthesis, The Plant Cell, 17: 2397-2412.

41. **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.

42. **Kim, Y. S., Sup, Y. H., Kim, T. W., Joo, S. H. & Kim, S. K. (2002)**: Identification of a brassinosteroid, castasterone from *Marchantia polymorpha*, Bull. Korean Chem. Soc., 23 (7): 941-942.

43. **Kohout L., Kasal A., Chodounská H., Slavíková B. & Hniličková J. (2005)**: The use of 2α,3α,17ß-trihydroxy-5α-androstan-6-one for plant development regulation, EU patent No. 1 401 278 (28. 9. 2005, in press).

44. **Kohout, L. (1994)**: New method of preparation of brassinosteroids. Coll. Czech. Chem. Commun. 59: 457-460.

45. **Kohout, L., Strnad, M. & Kamínek, M. (1991)**: Types of brassinosteroids and their bioassays. In: Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications (Cutler, H. G. C., Yokota, T. & Adam, G., eds.), Washington, D.C. :American Chemical Society: 56-73.

46. **Koka, C.V., Cerny, R.E., Gardner, R.G., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., & Clouse, S.D. (2000)**: A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. Plant Physiol., 122: 85–98.

47. **Krishna, P. (2003)**: Brassinosteroid-mediated stress responses, J. Plant Growth Regul., 22: 289-297.

48. **Kulaeva, O. N., Burkhanova, E. A., Fedina, A. B., Khikhlova, V. A., Bokebayeva, G. A., Vorbrodt, H. M. & Adam, G. (1991)**: Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultrastructure under stress conditions. In: Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications (Cutler, H. G. C., Yokota, T. & Adam, G., eds.), Washington, D.C. :American Chemical Society: 141-155.

49. **Li, J,. & Chory, J. (1997)**: A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction, Cell, 90: 701-713.

50. **Li, J. & Chory, J. (1999)**: Brassinosteroid actions in plants, J. Exp. Bot., 50 (332): 275-282.

51. **Li, J.M., Nagpal, P., Vitart, V., Mc Morris, T.C., and Chory, J. (1996)**: A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*, Science, 272: 398–401.

52. **Mathur, J., Molnar, G., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., Yokota, T., Adam, G., Voigt, B., Nagy, F. & Maas, C., Schell, J., Koncz, C. and Szekeres, M. (1998)**: Transcription of the *Arabidopsis CPD* gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids, Plant J., 14: 593-602.

53. **Mazorra, L. M., Núnez, M., Hechavarria, M, Coll, F. & Sánchez-Blanco, M. J. (2002)**: Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures, Biol. Plant., 45 (4): 593-596.

54. **Mitchel, J. W., Mandava, N. B., Worley, J. F., Plimmer, J. R. & Smith, M. V., (1970)**: Nature, 225: 1065-1066.

55. **Morillon, R., Catterou, M., Sangwan, R. S., Sangwan, B. S. & Lassalles, J. P. (2000)**: Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana*, Planta, 212: 199-204.

56. **Müssig, C. (2005)**: Brassinosteroid-promoted growth, Plant Biol., 7: 110-117.

57. **Müssig, C. & Altman, T. (2003)**: Genomic brassinosteroid effects, J. Plant Growth Regul., 22: 313-324.

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

59. **Nagata, N., Min, Y. K., Nakano, T., Asami, T. & Yoshida, S. (2000)**: Treatment of dark-grown *Arabidolsis thaliana* with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinoazole, induces some characteristics of light-grown plants, Planta 211: 781-790.

60. **Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I. & Yoshida, S. (2003)**: Brassinosteroids functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice, The Plant J., 33: 887-898.

61. **Neff, M. M., Nguyen, S. M., Malancharuvil, E. J., Fujioka, S., Noguchi, T., Seto, H., Tsubuki, M., Honda, T., Takatsuto, S., Yoshida, S. & Chory, J. (1999)**: *BAS1*: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 15316-15323.

62. **Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Tax F.E., Yoshida S., & Feldmann K.A. (2000)**: Biosynthetic pathways of brassinolide in Arabidopsis, Plant Physiol., 124: 201–209.

63. **Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., Yoshida, S., Li, J. & Chory, J. (1999):** *Arabidopsis det2* is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholest-4-en-3-one to (24R)-24-methyl-5-cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis, Plant Physiol., 120: 833-839.

64. **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.

65. **Nomura, T., Nakayama, M., Reid, J.B., Takeuchi, Y., & Yokota, T.** (1997): Blockage of brassinosteroid biosynthesis and sensitivity causes dwarfism in garden pea, Plant Physiol., 113: 31–37.

66. **Nomura, T., Sato, T., Bishop, G. J., Kamiya, Y., Takatsuto, S. & Yokota, T. (2001)**: Accumulation of 6-deoxocathasterone in Arabidopsis, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis, Phytochem., 57: 171-178.

67. **Ono, E. O., Nakamura, T., Machado, S. R., & Rodriguez, J. D. (2000)**: Application of brassinosteroid to *Tabebuia alba* (Bignoniaceae) plants, R. Bras. Fisiol. Veg., 12 (3): 187-194.

68. **Peng, J., Tang X. & Feng, H. (2003)**: Effects of brassinolide on the physiological properties of litchi pericarp (*Litchi chinensis* cv. nuomoci), Scientia Horticulturae, 101: 407-416.

69. **Porra, R. J., Thompson, W. A. & Kriedemann, P. E. (1989)**: Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verifications of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, Biochim. Biophys. Acta, 975: 384-394

70. **Ramírez J. A., Brosa, C. & Galagovsky, L. R. (2005)**: Synthesis and bioactivity of C-29 brassinosteroid analogues with different functional groups at C-6, Phytochem., 66: 581-587.

71. **Rao, S. S. R., Vardhini, B. V., Sujatha, E. & Anuradha, S. (2002)**: Brassinosteroids-a new class of phytohormones, Current Sci., 82 (10): 1239-1245.

72. **Sairam, R. K. (1994)**: Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varietes, Plant Growth Regul., 14: 173-181.

73. **Sasse, J. (1999)** Physiological actions of brassinosteroids, In: Brassinosteroids Steroidal Plant Hormones (Sakurai, A., Yokota, T., & Clouse, S.D., eds) Springer-Verlag, Tokyo: 137-161.

74. **Shimada, Y., Goda, H., Nakamura, A., Takatsuto, S., Fujioka, S. & Yoshida, S. (2003)**: Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis*, Plant Physiol., 131: 287-297.

75. **Staszková, L., Hradecká, D. & Kohout, L. (2002)**: Využití brassinosteroidů k regulaci stresu při tvorbě výnosu, In: Vliv abiotockých a biotických stresů na vlastnosti rostlin (ed. Hnilička, F.): 131-134.

76. **Steber, C. M. & Mc Court, P. (2001)**: A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*, Plant Physiol., 125: 763-769.

77. **Szekeres, M., Németh, K., Koncz-Kálmán, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Rédei, G.P., Nagy, F., Schell, J., & Koncz, C. (1996)**: Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and deetiolation in *Arabidopsis*, Cell, 85: 171–182.

78. **Wang, Z. Y. & He, J. X. (2004)**: Brassinosteroid signal transduction - choices of signals and receptors, Trends Plant Sci., 9 (2): 91-96.

79. **Werbrouck, S. P. O., Saibo, N. J. M., Dhuyvetter, H., De Schepper, S., Van Der Straeten, D. & Debergh, P. C. (2003)**: Physiological and morphological evidence of brassinosteroid-biosynthesis inhibition by the fungicide imazalil, Biol. Plant., 119: 69-77.

80. **Yokota, T. (1999)**: The history of brassinosteroids: discovery to isolation of biosynthesis and signal transduction mutants, In: Brassinosteroids Steroidal Plant Hormones (Sakurai, A., Yokota, T., & Clouse, S.D., eds) Springer-Verlag, Tokyo: 1-20.

81. **Yokota, T., Sato, T., Takeuchi, Y., Nomura, T., Uno, K., Watanabe, T. & Takatsuto, S. (2001)**: Roots and shoots of tomato produce 6-deoxo-28-norcathasterone, 6-deoxo-28-nortyphasterol and 6-deoxo-28-norcastasterone, possible precursors of 28-norcastasterone, Phytochem., 58: 233–238.

82. **Yopp, J. H., Colclasure, G. C. & Mandava, N. (1979)**: Effects of brassin-complex on auxin and giberelin mediated events and the morphogenesis of the etiolated bean hypocotyl, Physiol. Plant., 46: 247-254.

83. **Yu, J. Q., Huang, L.F., Hu, W. H., Zhou, Y. H., Mao, W. H., Ye, S. F. & Nogués, S. (2004)**: A role for brassinosteroids in the regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus*, J. Exp. Bot., 55 (399): 1135-1143.

84. **Yu, J. Q., Zhou, Y. H., Ye, S. F & Huang, L. F. (2002)**: 24-epibrassinolide and abscisic acid protect cucumber seedlings from chilling injury, J. Hort. Sci. & Biotech., 77 (4): 470-473.