

BRASINOSTEROIDY – HORMONY ROŚLINNE

Brassinosteroids – the phytohormons

Krystyna Maria JANAS

Summary. Brassinosteroids (BRs) occur in the plant kingdom and are naturally occurring plant hormones. They have a range of effects which can be distinguished from those of recognised hormones, especially in the promotion of young vegetative growth. The pleiotropic effects of the BR-insensitive and BR-deficient *Arabidopsis* and pea mutations on leaf morphology, pollen fertility, light development, and cell elongation suggest that BRs are an important class of plant hormones. It seems that control of BRs levels is essential for normal growth *via* auxin-independent mechanism. BRs also interact with environmental signals such as light and temperatures.

Key words: brassinolide, brassinosteroids, photomorphogenesis, plant growth.

Dr hab. Krystyna Maria Janas, Katedra Regulacji Wzrostu Roślin, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90–237 Łódź

WSTĘP

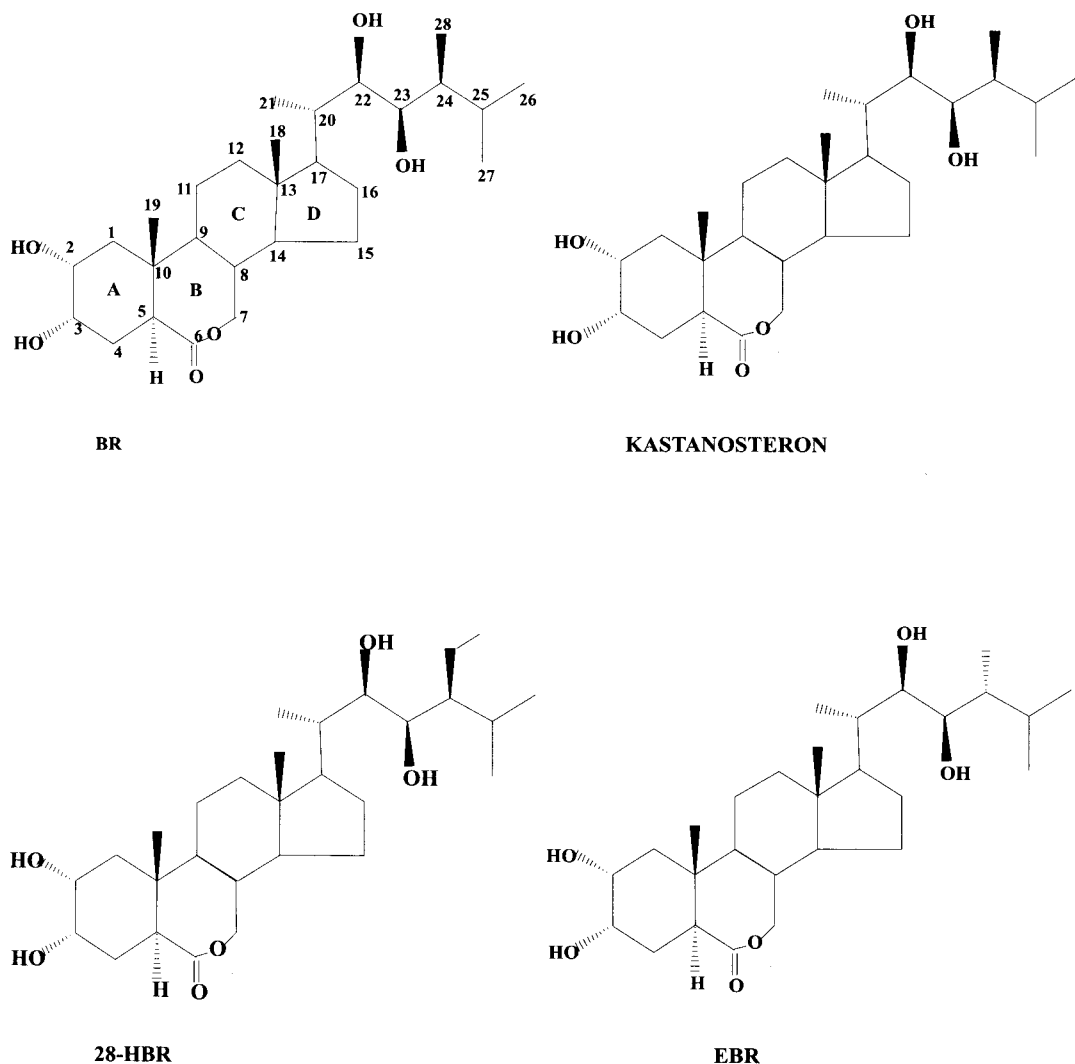
W 1979 r. Grove i wsp. [16] wyizolowali z pyłku rzepaku (*Brassica napus* L.) bardzo aktywne związki, które stymulowały wzrost roślin. Zaliczono je do steroidów i nazwano brasinosteroidami (BRs). Unikalne cechy tych związków oraz stymulowanie wzrostu w niskich stężeniach skłoniły wielu badaczy do zainteresowania się nimi. Metody HPLC i spektrometrii masowej (MS) pozwoliły na określenie struktury około 60 związków [33, 41]. Rośliny wytwarzają wiele różnych BRs, z których tylko kilka wykazuje aktywność biologiczną.

BUDOWA I BIOSYNTeza BRs

BRs są polihydroksysteroidami, w pozycji 17 pierścienia D mają przyłączony łańcuch boczny z grupami hydroksylowymi przy węglu 22, 23. Poszczególne BRs różnią się podstawnikami w pierścieniu A i B oraz strukturą łańcucha bocznego. Podobną budową bocznego łańcucha charakteryzują się sterole roślinne, co może su-

gerować, iż odpowiednie sterole są prekursorami BRs. Wzory najczęściej spotykanych BRs zostały przedstawione na Ryc. 1. W zależności od ilości atomów węgla w łańcuchu bocznym BRs sklasyfikowano jako związki C₂₇, C₂₈ oraz C₂₉ [60]. Najczęściej spotykanymi BRs i występującymi w najwyższym stężeniu są brasinolid (BR) oraz jego pochodne sklasyfikowane jako związki C₂₈. Zawierają one grupę metylenową, α–metylową lub β–metylową przy C₂₄. Związki te pochodzą prawdopodobnie od, odpowiednio, 24-metylencholesterolu, kampesterolu lub 24-epikampesterolu [60]. Najaktywniejszymi są te, które mają pierścień B w postaci 7-oksalaktonu i grupę ketonową w pozycji 6, jak BR. Dla aktywności BRs ważne są też dwie grupy – OH sąsiadujące ze sobą w pierścieniu A oraz grupy – OH w łańcuchu bocznym, a także różnice w budowie końcowego odcinka łańcucha bocznego [33].

Synteza BR zaczyna się od kampesterolu, a szlak biosyntezy prowadzi przez testosteron, 3-dehydrotestosteron, tyfasterol do kastasteronu i BR w hodowlach komórek i w całych roślinach



Ryc. 1. Wzory strukturalne niektórych brasinosteroidów (BRs). BR, brasinolid; 28-HBR, 28-homobrasinolid; EBR, epibrasinolid.

Fig. 1. Structures of some brassinosteroids. BR, brassinolide; 28-HBR, 28-homobrassinolide; EBR, epibrassinolide.

Catharanthus roseus, *Nicotiana tabacum* i *Oryza sativa* [48, 50]. Wykazano, że możliwa jest inna droga przekształcenia kampestrolu poprzez 6-deoksykastasteron do kastasteronu i BR w transformowanych komórkach *C. roseus* [10]. Dokładniejsze dane na temat biosyntezy tych interesujących związków zostały przedstawione w pracach Yokota [60] oraz Bajguzi Czerpak [5].

Informacji o mechanizmie działania i biosyntezy związków dostarczają mutacje genów,

których produkty odpowiadają za przebieg kolejnych etapów szlaku syntezy. Dzięki zastosowaniu mutantów *Arabidopsis* oraz grochu, zrobiono duży postęp w badaniach nad poznaniem szlaku biosyntezy BRs [30, 36, 51].

Badań na temat metabolizmu BRs jest niewiele, a dotychczasowe wyniki są niejednoznaczne i trudno stwierdzić, czy metabolizm tych związków jest taki sam, czy różny w różnych gatunkach roślin [5, 17, 27, 35, 44, 49].

WYSTĘPOWANIE

BRs są szeroko rozpowszechnione w świecie roślin. Występują u roślin jedno- i dwuliściennych, a także iglastych (sosnowate, *Pinaceae*). Ich obecność wykazano w roślinach ważnych gospodarczo, jak rzepak, ryż, herbata, kapusta chińska, groch, słonecznik. Stwierdzono ich występowanie w zielonym glonie *Hydrodictyon reticulatum*, a niedawno zostały wykryte w skrzypowatych (*Equisetaceae*) [33]. BRs wyizolowano praktycznie ze wszystkich części roślin. Szczególnie bogate w te związki są pyłki różnych roślin, m.in. w pyłku rzepaku występuje ok. 100 µg/kg, w pyłku bobiku – 190 µg/kg BR, natomiast pyłek *Pinus thunbergii* zawiera 2-deoksykasteron w ilości 90 µg/kg. Inne części roślin są znacznie uboższe w BRs, a ich stężenie jest rzędu nanogramów na kg masy. Jest interesujące, że w indukowanych przez owady galasach *Distylium racemosum* występuje 50–300 razy więcej BRs niż w liściach, natomiast w galasach i liściach kasztana (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) wykazano taką samą ilość BR [2].

FIZJOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ BRs

BRs wykazują wielorakie działanie i mogą modyfikować różne procesy fizjologiczne analogicznie do znanych hormonów, takich jak auksyny, gibereliny, cytokininy. Zastosowane w biotestach, m.in. drugiego międzywęźla fasoli, pochwę 2. liścia siewek ryżu pobudzają wydłużanie, a także skrzywienie, spęcznienie i pęknięcia tkanki [1, 20]. Według Mandavy [32] BRs są najaktywniejszymi ze wszystkich regulatorów wzrostu roślin w pobudzaniu wydłużania się łodygi.

BRs wpływają na wzrost oraz rozwój roślin w bardzo niskich stężeniach (rzędu 10^{-7} – 10^{-15} M). Aktywność ich przejawia się silną stymulacją wzrostu wydłużeniowego oraz przyspieszeniem podziałów komórkowych, szczególnie w młodych rozwijających się tkankach [32, 38]. Jasnych dowodów na udział BRs w niektórych aspektach wzrostu i rozwoju roślin dostarczyły badania na mutantach *Arabidopsis* i grochu niewrażliwych na BR oraz z jego deficytem [11, 12].

Zależność pomiędzy strukturą BRs a ich

wpływem na wzrost wydłużeniowy wskazuje, że najmniejsze modyfikacje strukturalne wpływają na obniżenie ich aktywności biologicznej. Tak dokładne wymagania co do struktury mogą wskazywać, iż w efektach BRs mogą pośredniczyć receptory białkowe.

Stosując znakowane ^{14}C -BRs wykazano, iż w ryżu, ogórkach i owsie związki te są transportowane *via* ksylem z korzeni do łodygi [35, 37].

BRs stymulują różne procesy, m.in. wzrost łagiewki pyłkowej, hamują odpadanie liści, pobudzają różnicowanie się drewna, indukują epinastię [19, 43, 46] oraz podwyższają procent skielkowanych starych nasion [56]. Wykazano, iż stężenie wolnych BRs wzrasta wraz z dojrzewaniem pyłku lilii [4], a traktowanie roślin znamienia słupka BR indukuje powstanie roślin haploidalnych [26].

Wykazano też w nielicznych przypadkach działanie hamujące BRs, m. in. na deformację działek kielicha, która mogła być spowodowana zastosowaniem zbyt wysokiego stężenia BR i jego wpływem na syntezę etylenu [47].

Podobnie jak w przypadku innych regulatorów wzrostu, m. in. GA i auksyn, w roślinach traktowanych BRs wzrasta zawartość RNA i DNA oraz białek [22]. Aktynomycyna D (inhibitor syntezy RNA) oraz cykloheksimid (inhibitor syntezy białka) hamują stymulowany przez BR wzrost epikotyli fasoli złotej [31].

BRs podwyższają oporność na różnego rodzaju stresy, jak zbyt wysokie lub zbyt niskie temperatury, infekcje grzybowe, uszkodzenia przez herbicydy i sole [32]. Siewki pomidora, ryżu oraz kukurydzy traktowane BRs wykazują podwyższoną oporność na chłód [18, 23, 29]. W kulturach zawieszin komórek stokłosa (*Bromus inermis* Leyss.) BR wprowadzie tylko minimalnie podwyższał tolerancję na niską temperaturę, ale znacznie zwiększał żywotność komórek hodowanych w wyższych temperaturach. Jednocześnie, w komórkach tych stwierdzono obecność białek hsp oraz hsp90 (ang. heat stable polypeptides) [55].

WPŁYW BRs NA FOTOMORFOGENEZĘ

BRs wymagają do swojego działania światła i są na ogół nieaktywne w ciemnych testach, w

przeciwieństwie do auksyn. Ich działanie polega między innymi na przzwycięzeniu hamowania wzrostu, powodowanego przez światło białe i czerwone [33]. Związki te częściowo odwracają hamujący wpływ światła białego na wydłużanie się łodyg grochu [60]. Wykazano też stymulujący wpływ BRs na wydłużanie się korzeni oraz liści rzodkiewki, a efekt był silniejszy w warunkach dnia krótkiego niż długiego [33]. O udziale BR w fitochromowym mechanizmie regulacji wzrostu świadczyć może fakt, iż karłowatość oraz deetiolacja u mutantów fitochromowych *Arabidopsis* typu *det2* z zaburzeniami w przebiegu łańcucha transdukcji sygnału świetlnego może być odwrócona przez BR, a nie przez giberelinę lub auksynę [30]. W wyniku mutacji, u tych mutantów dochodzi do zapoczątkowania procesów fotomorfogenetycznych, których realizacja u roślin typu dzikiego stymulowana jest światłem. Na świetle mutanty *det2* są mniejsze i ciemnozielone w porównaniu z typem dzikim. Mają obniżoną dominację apikalną i męską sterility. Analiza składu aminokwasowego białka DET2 produktu genu *DET2* wykazała znaczny stopień podobieństwa do 5 α -reduktazy steroidowej u ssaków [30]. Pleiotropowe efekty mutacji *det2* sugerują, iż BRs mogą brać udział w różnych procesach, które są regulowane przez światło oraz inne hormony, jak ekspresja genów jądrowych *CAB* (dla białka LHPC), *RBCS* (kodującego małą jednostkę karboksylazybisforanowej), pobudzenie wzrostu elongacyjnego komórek i indukcję kwitnienia. Li i wsp. [30] sugerują, że światło może działać poprzez modulowaną przez BRs drogę łańcucha transdukcji sygnałnej w komórkach docelowych (ang. target cells) możliwe, że poprzez regulację biosyntezy BRs albo zmianę odpowiedzi komórek docelowych na BRs.

Mutanty *Arabidopsis* typu *cpd* (konstitutywnie fotomorfogeniczny i karłowaty) są fenotypowo podobne do mutantów *det2*. Zastosowanie BRs u tych mutantów przywraca wzrost elongacyjny hypokotyli, liści i ogonków liściowych w roślinach rosnących zarówno na świetle jak i w ciemności, a także znosi deetiolację w ciemności i poprawia męską sterility. Gen *CPB* koduje białko CYP90 (cytochrom P-450),

które wykazuje dużą homologię ze szczurzą 16 α -hydroksylazą testosteronu oraz 21-hydroksylazą progesteronu człowieka. Zahamowanie długości i sterility męska u mutantów *cpd* mogą być odwrócone przez BRs z grupą hydroksylową przy C-23 jak testosteron, 3-dehydrotestosteron, tyfasterol, kastasteron i brasinolid, lecz nie przez katasteron pozbawiony tej grupy. Wydaje się więc, że CYP90 może być 23-hydroksylazą testosteronu. Badania te dowodzą również, że CYP90 może brać udział w biosyntezie aktywnych BRs, które są związkami ważnymi w regulacji wzrostu elongacyjnego w czasie rozwoju roślin [51].

WSPÓŁDZIAŁANIE Z INNYMI REGULATORAMI WZROSTU

BRs mogą brać udział w kontroli wzrostu i rozwoju rośliny współdziałając z innymi hormonami lub zmieniając ich efektywność [1, 25]. BRs mogą zmieniać równowagę między endogennymi hormonami, takimi jak IAA, ABA, GA oraz etylenem [15, 24, 43, 58].

Wpływ BRs na syntezę etylenu jest niejasny. Wykazano, iż związki te wpływają na syntezę etylenu poprzez aktywację syntezy ACC (kwas aminocyklopropano-1-karboksylowy) [45]. Synteza ACC oraz zdolność tkanki do łączenia ACC z MACC (kwas (1-malonyloamino)-cyklopropano-1-karboksylowy) były stymulowane przez BRs bez wpływu na aktywność oksydazy ACC (ang. ethylene forming enzyme) [3]. Badania wykonane na *Arabidopsis* wykazały, że cytokiny mogą regulować transkrypcję genu *CPD*, która jest też regulowana przez BRs [51]. BRs stosowane łącznie z IAA synergistycznie podwyższają syntezę etylenu. Kwas aminooksydotowy (AOA), cykloheksimid i CoCl₂ hamują stymulowaną przez BRs i auksynę syntezę tego hormonu i ACC [3, 45]. Ubocznym efektem działania BRs, poprzez stymulację syntezy ACC i etylenu, może być wpływ na epinastię, który obserwowano w kulturach hydroponicznych pomidora [46]. Epinastia mogła być w tym przypadku wywołana zbyt wysokim stężeniem BRs w pożywce. Doniesiono też o braku wpływu

BRs na syntezę etylenu w etiolowanych hypocotylach dyni oraz rzeżuchy [15, 21].

W segmentach hypocotyli dyni traktowanych BR wzrasta endogenny poziom IAA, podczas gdy w segmentach nietraktowanych poziom IAA obniża się. Może to sugerować, że BR stymuluje wydłużanie się hypocotyli poprzez utrzymywanie wysokiego endogennego stężenia IAA [15, 53]. Na różnych systemach biologicznych obserwowano synergizm działania auksyn i BRs. BRs mogą zarówno podwyższać wrażliwość roślin na auksynę, jak też pobudzać ich aktywność biologiczną poprzez wpływ na endogenny poziom IAA albo stymulować jego biosyntezę [32]. W wydłużających się epikotylach siewek soi po 2 godz. od dodania BR obserwowano ekspresję genów *BRU1* (ang. brassinosteroid upregulated), której nie powodowały inne znane hormony, jak np. auksyny. Analiza sekwencji genów *BRU1* wykazała podobieństwo do genów *MERI-5* i *TCH4* odpowiedzialnych za syntezę endotransferazy ksyloglukanu (XET) nasturcji (enzym wpływający na rozluźnienie struktury ściany komórkowej). Podwyższony poziom transkryptów *BRU1* w wydłużających się epikotylach oraz podobieństwo do genów odpowiedzialnych za syntezę XET mogą świadczyć o wpływie białka kodowanego przez geny *BRU1* na zmiany struktury ścian komórkowych w czasie wydłużania [61, 62]. Ponieważ synergistyczne działanie auksyn i BRs było obserwowane u wielu różnych roślin oraz oba hormony wpływają stymulująco na aktywność XET, wydawało się prawdopodobne, że oba te regulatory wpływają na wzrost poprzez rozluźnianie struktury ściany komórkowej, a działanie BRs może zależeć od auksyn lub *vice versa*. Również u mutantów karłowatych grochu *lkb* z zablokowaną syntezą BR, stwierdzono obniżoną zawartość IAA co mogłoby sugerować, iż karłowatość u mutantów *lkb* może być częściowo związana z redukcją zawartości IAA [36]. Potraktowanie wyżej wymienionych mutantów łącznie IAA i BR wykazało ich działanie synergistyczne [57].

Badania przeprowadzone na innych roślinach, zmierzające do wyjaśnienia interakcji auksyna i BR wykazały jednak niezależne działania tych hormonów [14, 43, 54]. Na etiolowa-

nych segmentach hypocotyli ogórka wykazano, że miejscem „docelowym” działania BR są tkanki wewnętrzne, podczas gdy IAA działa docelowo na epidermę [53]. Dowodów niezależnego działania auksyn i BRs dostarczyły też badania wykonane na mutantach *Arabidopsis* typu *axr1* (ang. auxin resistant) niewrażliwych na auksynę oraz pomidora typu *dgt* (ang. diageotropica). Wzrost wydłużeniowy korzeni u mutantów *axr1* był hamowany przez BRs, a nie przez auksynę syntetyczną 2,4-D [13]. Łodygi mutantu *dgt* wydłużały się po potraktowaniu BR, natomiast były niewrażliwe gdy hodowano je w obecności auksyny. Zaobserwowano, że mutanty *dgt* były wrażliwe na BRs, ale bez wpływu na geny *SAUR* (ang. small auxin upregulated RNAs) [14].

REGULACJA WZROSTU ROŚLIN

BR podobnie do auksyn wpływa na wzrost roślin, czemu towarzyszy wydzielanie H^+ oraz hiperpolaryzacja potencjału transmembranowego, co wykazano na epikotylach grochu Azuki oraz zielonych glonach *Chlorella vulgaris* [6, 8]. Stymulujący wpływ BR na wydłużanie się tkanek wegetatywnych obserwowano, m. in. na mezokotylu kukurydzy [52], epikotylu grochu [29, 52], gorczyicy białej, życie i fasoli złotej [7, 28], siewkach rzeżuchy [21] oraz segmentach hypocotyli etiolowanych siewek [24, 35, 38].

Znanych jest wiele mutantów karłowatych z zaburzoną biosyntezą GA, lecz znane są też i takie mutanty, w których biosynteza GA jest normalna. Do takich roślin należą karłowate mutanty grochu typu *lka* i *lkb*, których karłowatość jest spowodowana zaburzeniem szlaku biosyntezy BRs. Badania wykonane na tych mutantach wykazały, iż BRs pełnią ważną rolę w procesach wzrostu [36]. Stwierdzono, że mutanty *lkb* hodowane w obecności BR, kastasteronu, tyfasterolu, 3-dehydrotestasteronu i testasteronu odzyskiwały wygląd rośliny dzikiej. Natomiast odpowiedź mutantów *lka* na kastasteron była słabsza niż *lkb*, ale stwierdzono u nich tylko obniżenie zawartości BR oraz akumulację kastasteronu w porównaniu z roślinami dzikimi. Wykazano,

iż u mutantów tych odpowiedź na BR była ok. 100 razy słabsza w porównaniu z mutantami *lkb*. Może to sugerować, iż mutacja *lka* obniża tylko wrażliwość roślin na BR [36].

Jasnych dowodów na udział BRs w niektórych aspektach wzrostu i rozwoju roślin dostarczyły badania na mutantach *Arabidopsis* i grochu niewrażliwych na BRs (np. *bri1*, *cdd2*, *lka*) oraz z deficytem BRs (np. *dwf1-6/cbb1* – fenotyp karłowaty, *cbb3/cpd* – fenotyp karłowaty konstytutywnie fotomorfogeniczny, *det2* oraz *lkb*) [11].

Podwyższona aktywność XET w roślinach hodowanych w obecności BR może sugerować, iż karłowatość u mutantów *det2*, *dwf1*, *cbb/bri1* i *cbb3* oraz skrócone międzywęzła u *lka* i *lkb* mogą być efektem redukcji poziomu lub wrażliwości na BR, w rezultacie której obniża się aktywność XET i następuje rozluźnienie ścian komórkowych. Wykazano, iż produkty genów *TCH4* i *MER15* również wykazują wysoki stopień homologii do BRU1 oraz XET. Geny *TCH4* i *MER15* mają obniżoną ekspresję u mutantów *dwf1*, *cbb2/bri1* i *cbb3*, co wskazuje na udział XET oraz BRs we wzroście roślin [11, 25].

Wzrost elongacyjny komórek zależy też od ciągłego dostarczania składników do budowy ściany komórkowej i odpowiedniego ukierunkowania celulozowych mikrofibryli, które są skojarzone z odpowiednią orientacją mikrotubul. BR sam lub łącznie z auksyną podwyższał procent odwrotnie zorientowanych mikrotubul [34].

Obserwowano zarówno stymulujący, jak i hamujący wpływ BRs na wzrost korzeni [38, 39]. Wykazano, iż korzenie roślin starszych są mniej wrażliwe na BR niż korzenie młode oraz zawiązki korzeniowe [21].

UWAGI KOŃCOWE

Brasinosteroidy są grupą roślinnych hormonów, które w bardzo niskich stężeniach wpływają na wzrost roślin, szczególnie we wczesnych stadiach wzrostu wegetatywnego [1, 9, 20, 33, 42]. Zostały znalezione u wielu gatunków roślin i przypuszczalnie występują powszechnie w świecie roślin. Plejotropowe efekty u mutantów

typu *det2*, *dwf1-6/cbb1*, *cbb2*, *cbb3/cpd*, *bri1*, *lka* i *lkb* na morfologię liści, dojrzewanie pyłku, wzrost na świetle i wydłużanie komórek sugerują, że BRs są ważną klasą hormonów roślinnych. Chociaż wiemy coraz więcej o tych interesujących związkach, to daleko nam jeszcze do dokładniejszego poznania ich działania. Jest to spowodowane ich bardzo niskim stężeniem w tkankach roślinnych i, podobnie jak w przypadku klasycznych hormonów, wielokierunkowym działaniem fizjologicznym [1, 9, 32, 47].

Są najaktywniejsze ze wszystkich znanych hormonów w stymulacji wydłużania [32]. Na podstawie jeszcze niekompletnych danych wydaje się, iż BRs wpływają na wzrost działając niezależnie od auksyn czy giberelin. Konieczne są jednak dalsze badania zmierzające do dokładniejszego poznania zarówno ich biosyntezy, działania oraz metabolizmu. Na podstawie dostępnych publikacji można sądzić, iż są one tak samo ważne dla roślin, jak steroidy dla zwierząt, owadów oraz skorupiaków.

BR stosowany w bardzo niskich stężeniach (1–100 µg/L) stymulująco wpływał na plony takich roślin jak owies, ryż, kukurydza, jęczmień, soja. Podwyższał też oporność roślin na niekorzystne warunki zewnętrzne. Doniesiono też o nietoksycznym wpływie na rośliny oraz zwierzęta [33, 59]. Wydaje się, iż w najbliższej przyszłości związki te będą stosowane jako bioregulatory zarówno w rolnictwie, jak i ogrodnictwie. Do tej pory większość wyników badań dotyczących zastosowania jest opatentowanych.

LITERATURA

- [1] ADAM G., PETZOLD U. 1994. Brassinosteroide-eine neue Phytohormon-Gruppe? *Naturwissenschaften* **81**: 210–217.
- [2] ARIMA M., YAKOTA T., TAKAHASHI N. 1984. Identification and quantification of brassinolide-related steroids in the insect gall and healthy tissues of the chestnut plant. *Phytochemistry* **23**: 1587–1591.
- [3] ARTECA R. N., BACHMAN J. W., MANDAVA N. N. 1988. Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mung bean hypocotyl segments. *J. Plant Physiol.* **133**: 430–435.
- [4] ASAKAWA S., ABE H., NISHIKAWA N., NATSUME M., KOSHIOKA M. 1996. Purification and identification of new acylconjugated teasterones in lily pollen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 1416–1420.

- [5] BAJGUZ A., CZERPAK R. 1997. Biosynteza i przemiany metaboliczne brassinosteroidów. *Kosmos* **46**: 259–268.
- [6] BAJGUZ A., CZERPAK R. 1996. Effect of brassinosteroids on growth and proton extrusion in the alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (*Chlorophyceae*). *J. Plant Growth Regul.* **15**: 153–156.
- [7] BRAUM P., WILD A. 1984. The influence of brassinosteroid on growth and paramets of photosynthesis of wheat and mustard plants. *J. Plant Physiol.* **116**: 189–196.
- [8] CERANA R., BONETTI A., MARRE M. T., ROMANI G., LADO P., MARRE E. 1983. Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in Azuki bean epicotyls. *Physiol. Plant.* **59**: 23–27.
- [9] CREELMAN R. A., MULLEN J. E. 1997. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *The Plant Cell* **9**: 1211–1223.
- [10] CHOI Y., FUJIKOKA S., HARADA A., YAKOTA T., TAKATSUTO S., SAKURAI A. 1996. A new brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone. *Phytochemistry* **43**: 593–596.
- [11] CLOUSE S. D. 1997. Molecular genetic analysis of brassinosteroid action. *Physiol. Plant.* **100**: 702–705.
- [12] CLOUSE S. D., LANEGFORD M., HALL A. F., MCMORRIS T. C., BAKER M. E. 1996. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol.* **111**: 671–678.
- [13] CLOUSE S. D., LANEGFORD M., HALL A. F., MCMORRIS T. C., BAKER M. E. 1993. Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul.* **12**: 61–66.
- [14] CLOUSE S. D., ZUREK D. M., MCMORRIS T. C., BAKER M. E. 1992. Effect of brassinolide on gene expression in elongating soybean epicotyls. *Plant Physiol.* **100**: 1377–1383.
- [15] EUN J., KURAISHI S., SAKURAI N. 1989. Changes in levels of auxin and abscisic acid and the evolution of ethylene in squash hypocotyls after treatment with brassinolide. *Plant Cell Physiol.* **30**: 807–810.
- [16] GROVE M. D., SPENCER G. F., ROHWEDDER W. K., MANDAVA N. B., WORLEY J. F., WARTHEN J. D., STEFFENS G. L., FLIPPEN-ANDERSON J. L., COOK J. C. 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **281**: 216–217.
- [17] HAI T., SCHNEIDER B., ADAM G. 1995. Metabolic conversion of 24-epibrassinolide into pentahydroxylated brassinosteroid glucosides in tomato cell cultures. *Phytochemistry* **40**: 443–448.
- [18] HE R. Y., WANG G. J., WANG X. S. 1991. Effects of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings. W: H. G. CUTLER, T. YOKOTA, G. ADAM (red.), *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Application*, American Chemical Society, Washington, DC, s. 220–230.
- [19] IWASAKI T., SHIBAOKA H. 1991. Brassinosteroids act as regulators of tracheary element differentiation in isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.* **32**: 1007–1014.
- [20] JANKIEWICZ L. S. 1997. Brassinosteroidy i związki pokrewne. W: L. S. JANKIEWICZ (red.), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, 1 PWN, Warszawa, s. 72–82.
- [21] JONES-HELD S., VANDOREN M., LOCKWOOD T. 1996. Brassinolide application to *Lepidium sativum* seeds and the effects on seedling growth. *J. Plant Growth Regul.* **15**: 63–67.
- [22] KALINICH J. F., MANDAVA B., TODHUNTER J. A. 1985. Relationship of nucleic acid metabolism to brassinolide-induced responses in beans. *J. Plant Physiol.* **120**: 207–214.
- [23] KAMURO Y., TAKATSUTO S. 1991. Capability for and problems of practical uses of brassinosteroids. W: H. G. CUTLER, T. YOKOTA, G. ADAM (red.) *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Application*, American Chemical Society, Washington DC, s. 292–297.
- [24] KATSUMI M. 1985. Interaction of a brassinosteroid with IAA and GA₃ in the elongation of cucumber hypocotyl sections. *Plant Cell Physiol.* **26**: 615–625.
- [25] KAUSCHMANN A., JESSOP A., KONCZ C., SZEKERES M., WILLMITZER A., ALTMANN T. 1996. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant J.* **9**: 701–713.
- [26] KITANI Y. 1994. Induction of parthenogenetic haploid plants with brassinolide. *Jpn. J. Genet.* **69**: 35–39.
- [27] KOLBE A. B., SCHNEIDER B., PORZEL A., SCHMIDT J., ADAM G. 1995. Acyl-conjugated metabolites of brassinosteroids in suspension culture of *Ornithopus sativus*. *Phytochemistry* **38**: 633–636.
- [28] KRIZEK D., MANDAVA N. B. 1983. Influence of spectral quality on their growth response of intact bean plants to brassinosteroid, a growth-promoting steroidal lactone. I. Stem elongation and morphogenesis. *Physiol. Plant.* **57**: 324–329.
- [29] KULAEVA O. N., BURKHANOVA E. A., FEDINA A. B., KHOKHLOVA V. A., BOKEBAYEVA G. A., VORBRODT H. M., ADAM G. 1991. Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultrastructure under stress conditions. W: H. G. CUTLER, T. YOKOTA, G. ADAM (red.) *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Application*, American Chemical Society, Washington DC, s. 141–155.
- [30] LI J., NAGPAL P., VITART V., MCMORRIS T. C., CHORY J. 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* **272**: 397–401.
- [31] MANDAVA N. B., THOMPSON M. J., YOPP J. H. 1987. Effects of selected putative inhibitors of RNA and protein synthesis on brassinosteroid-induced responses in mung bean epicotyls. *J. Plant Physiol.* **128**: 53–65.
- [32] MANDAVA N. B. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 23–52.
- [33] MARQUARDT V., ADAM G. 1991. Recent advances in brassinosteroid research. W: W. EBING (red.), *Chemistry of Plant Protection*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York s. 103–140.
- [34] MAYUMI K., SHIBAOKA H. 1995. A possible double role for brassinolide in the re-orientation of cortical mic-

- rototubes in the epidermal cells of Azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* **36**: 173–181.
- [35] NISHIKAWA N., SHIDA A., TOYAMA S. 1995. Metabolism of ^{14}C -labeled epibrassinolide in intact seedlings of cucumber and wheat. *J. Plant Res.* **108**: 65–69.
- [36] NOMURA T., NAKAYAMA M., REID J. B., TAKEUCHI Y., YAKOTA T. 1997. Blockage of brassinosteroid biosynthesis and sensitivity causes dwarfism in garden pea. *Plant Physiol.* **113**: 31–31.
- [37] NISHIKAWA N., TOYAMA S., SHIDA A., FUTATSUYA F. 1994. The uptake and transport of ^{14}C -labelled epibrassinolide in intact seedlings of cucumber and wheat. *J. Plant Res.* **107**: 125–130.
- [38] RODDICK J. G., IKEKAWA N. 1992. Modification of root and shoot development in monocotyledon and dicotyledon seedlings by 24-epibrassinolide. *J. Plant Physiol.* **140**: 70–74.
- [39] RODDICK J. G., RIJNENBERG A. L., IKEKAWA N. 1993. Developmental effects of 24-epibrassinolide in excised roots of tomato grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* **87**: 453–458.
- [40] SAKURAI A., FUJIOKA S. 1993. The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids: A review. *J. Plant Growth Reg.* **13**: 147–159.
- [41] SASSE J. M. 1997. Recent progress in brassinosteroid research. *Physiol. Plant.* **100**: 660–701.
- [42] SASSE J. M. 1991. The case for brassinosteroids as endogenous plant hormones. W: H. G. CUTLER, T. YOKOTA, G. ADAM (red.), *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Application*, American Chemical Society, Washington, DC, s. 158–166.
- [43] SASSE J. M. 1990. Brassinolide, elongation and auxin. *Physiol. Plant.* **80**: 401–408.
- [44] SCHNEIDER B., KOLBE A., PORZEL A., ADAM G. 1994. A metabolite of 24-epibrassinolide in cell suspension cultures of *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry* **36**: 319–321.
- [45] SCHLAGNHAUFER C. D., ARTECA R. N., YOPP J. H. 1984. Inhibition of brassinosteroid-induced epinasty in tomato plants by aminooxyacetic acid and Co^{2+} . *Physiol. Plant.* **65**: 551–555.
- [46] SCHLAGNHAUFER C. D., ARTECA R. N. 1985. Brassinosteroid-induced epinasty in tomato plants. *Plant Physiol.* **78**: 300–303.
- [47] SUGE H. 1986. Reproductive development of higher plants as induced by brassinolide. *Plant Cell Physiol.* **27**: 199–205.
- [48] SUZUKI H., FUJIOKA S., TAKATSUTO S., YAKOTA T., MUROFUSHI N., SAKURAI A. 1995. Biosynthesis of brassinosteroids in seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 168–172.
- [49] SUZUKI H., INONE T., FUJIOKA S., SAITO S., TAKATSUTO S., YAKOTA T., MUROFUSHI N., YANAGISAWA T., SAKURAI A. 1995. Conversion of 24-methylcholesterol to 6-oxo-24-methylcholesterol, a putative intermediate of the biosynthesis of brassinosteroids in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* **40**: 1391–1397.
- [50] SUZUKI H., INOUE T., FUJIOKA S., TAKATSUTO S., YANAGISAWA T., YAKOTA T., MUROFUSHI N., SAKURAI A. 1994. Possible involvement of 3-dehydroteasterone in the conversion of teasterone to typhasterol in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 1186–1188.
- [51] SZEKERES M., NEMETH K., KONCZ-KALMAN Z., MATTHUR J., KAUSCHMANN A., ALTMANN T., REDEI G. P., NAGY F., SCHELL J., KONCZ C. 1996. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and detoliation in *Arabidopsis*. *Cell* **85**: 171–182.
- [52] TOMINAGA R., SAKURAI N., 1966. Brassinolide induces vacuolar H^{+} – ATPase activation and stem elongation. *Plant Cell Physiol.* **37** (Suppl): 152.
- [53] TOMINAGA R., SAKURAI N., KURAISHI S. 1994. Brassinolide-induced elongation of inner tissues of segments of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* **35**: 1103–1106.
- [54] WANG T. W., COSGROVE D. J., ARTECA R. N. 1993. Brassinosteroid stimulation of hypocotyl elongation and wall relaxation in pakchoi (*Brassica chinensis* cv. Zai-Choi). *Plant Physiol.* **101**: 965–968.
- [55] WILEN R. W., SACCO M., GUSTA L. V., KRISHNA P. 1995. Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (*Bromus inermis*) cell cultures. *Physiol. Plant.* **95**: 195–202.
- [56] YAMAGUCHI T., WAKIZUKA T., HIRAI K., FUJII S., FUJITA A. 1987. Stimulation of germination in aged rice seeds by pretreatment with brassinolide. W: A. R. COOKE (red.), Proc 14th Annu. Meeting Plant Growth Regul. Soc. of Amer. s. 26–27.
- [57] YANG T., DAVIES P. J., REID J. B. 1996. Genetic dissection of the relative roles of auxin and gibberellin in the regulation of stem elongation in intact light-grown peas. *Plant Physiol.* **110**: 1029–1034.
- [58] YANG T., LAW D. M., DAVIES P. J. 1993. Magnitude and kinetics of stem elongation induced by exogenous indole-3-acetic acid in intact light-grown pea seedlings. *Plant Physiol.* **102**: 717–724.
- [59] YOKOTA T., TAKAHASHI N. 1986. Chemistry, physiology and agricultural application of brassinolide and related steroids. W: M. BOPP (red.) *Plant Growth Substances* 1985. Springer Verlag, Berlin s. 298–3053.
- [60] YOKOTA T. 1997. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in Plant Science* **2**: 137–143.
- [61] ZUREK D. M., CLOUSE S. D. 1994. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongation soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiol.* **104**: 161–170.
- [62] ZUREK D. M., RAYLE D. L., MCMORRIS T. C., CLOUSE S. D. 1994. Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. *Plant Physiol.* **104**: 505–513.