

ANDRZEJ BAJGUZ, ROMUALD CZERPAK
Zakład Biochemii, Instytut Biologii,
Uniwersytet Warszawski, Filia w Białymstoku
ul. Świerkowa 20 B, 15-950 Białystok

BIOSYNTeza I PRZEMIANY METABOLICZNE BRASSINOSTEROIDÓW

WSTĘP

Brassinosteroidy (BR) stanowią nową grupę roślinnych związków steroidowych o właściwościach hormonalnych, które posiadają zdolność stymulacji wzrostu i rozwoju roślin w odpowiedniej korelacji z typowymi fitohormonami, zwłaszcza z auksynami, giberelinami i cytokininami (SAKURAI i FUJIOKA 1993, ADAM 1994). Aktywność metaboliczna BR polega na stymulacji wzrostu elongacyjnego roślin, zwłaszcza we wczesnej fazie ich rozwoju ontogenetycznego, głównie poprzez aktywację procesów biosyntezy kwasów nukleinowych i białek o charakterze enzymatycznym i regulującym ekspresję genów (KALINICH i współaut. 1986, ARTECA 1995, BAJGUZ i CZERPAK 1996a, JONES-HELD i współaut. 1996). Prócz tego BR wzmagają aktywność niektórych enzymów, między innymi ATPaz oraz pompy protonowej i ekstrazję (wydzielanie) protonów, co ma ścisły związek z mechanizmem stymulacji przez nie wzrostu ściany komórkowej (CERANA i współaut. 1983, ROMANI i współaut. 1983, BAJGUZ i CZERPAK 1996b).

Pod względem struktury chemicznej BR są pochodnymi 5α -cholestanu, w którym pierścień B może występować w formie 7-oksalaktenu lub 6-ketonu, bądź pozbawiony atomu tlenu. Prócz tego BR w pierścieniu A przy atomach węgla C-2 i C-3 posiadają z reguły grupy hydroksylowe. Niektóre spośród nich zawierają w pierścieniu A tylko jedną grupę hydroksylową bądź ketonową przy węglu w pozycji C-3 (SAKURAI i FUJIOKA 1993, BAJGUZ i CZERPAK 1995).

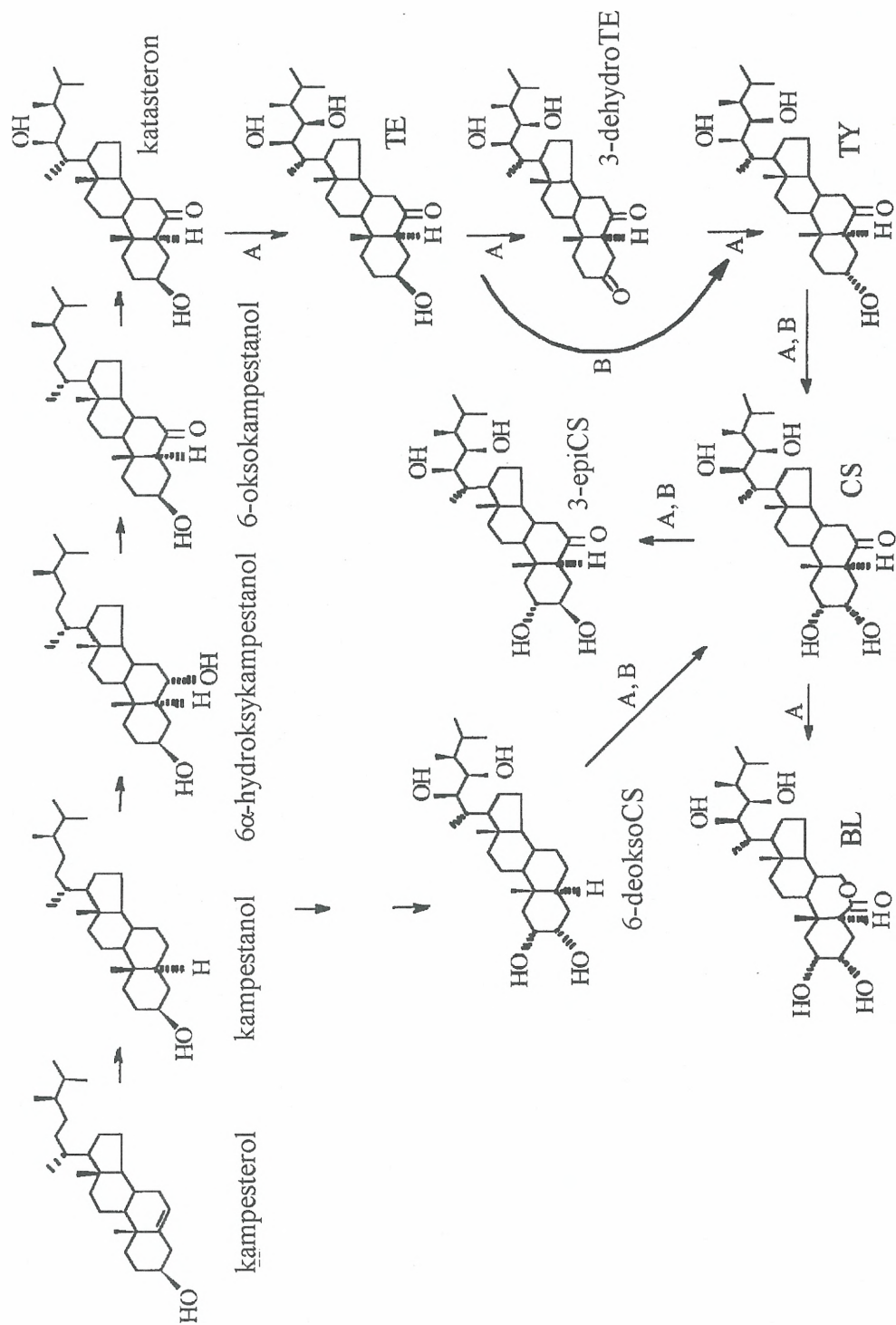
Dotychczas wyizolowano z różnych grup taksonomicznych roślin, głównie naczyniowych, ponad czterdzieści związków BR w postaci wolnej lub glikozydowej w połączeniu z β -D-glukozą. Ostatnio wykryto w komórkach seradeli pastewnej (*Ornithopus sativus*) połączenia estrowe węgla C-3 BR z kwasami tłuszczowymi: laurynowym, mirystynowym, palmitynowym, stearynowym i oleinowym (KOLBE i współaut. 1995). Budowa chemiczna, występowanie i aktywność biologiczna BR u roślin zostały omówione we wcześniejszej publikacji (BAJGUZ i CZERPAK 1995).

BIOSYNTeza BRASSINOSTEROIDÓW

BR są spotykane u wielu gatunków roślin wyższych i sporadycznie u niższych, posiadają unikalną aktywność biologiczną oddziaływującą na wzrost i rozwój roślin (SAKURAI i FUJIOKA 1993, ADAM 1994, BAJGUZ i CZERPAK 1995). Spośród ponad czterdziestu naturalnie występujących BR poznano szlak biosyntezy tylko kilku z nich. Począwszy od lat 90-tych rozpoczęto badania dotyczące biosyntezy BR u barwinka różyczkowego (*Catharanthus roseus*), a obecnie rozpoczęto tego typu badania na tytoniu (*Nicotiana tabacum*), ryżu siewnym (*Oryza sativa*), lilii długokwiatowej (*Lilium longiflorum*),

Distylium racemosum i cyprysie arizońskim (*Cupressus arizonica*) (YOKOTA i współaut. 1990, 1994, FUJIOKA i współaut. 1995b, GRIFFITHS i współaut. 1995, SUZUKI i współaut. 1995a).

Szlak biosyntezy BR najlepiej poznany w komórkach barwinka różyczkowego przedstawiony jest na rycinie 1. W roślinie tej 24-metylocholesterol, czyli kampesterol stanowi główny związek sterolowy, którego ilość szacuje się na około 50% ogólnej puli steroli. Prawdopodobnie związek ten jest bezpośrednim prekursorem w biosyntezie brassinolidu (BL) (SUZUKI i współaut. 1995b).



Ryc. 1. Biosynteza brassinosteroidów z kampesterolu w komórkach barwinka różyczkowego (*Catharanthus roseus*) (A), ryżu siewnego (*Oryza sativa*) (B) i tytoniu (*Nicotiana tabacum*) (B).

W 14-dniowym ryżu siewnym oraz tytoniu stwierdzono występowanie teasteronu (TE) i jego przemiany biochemiczne zgodnie z ciągiem reakcji: TE → tyfasterol (TY) → kastasteron (CS). Ponadto dla tych roślin są charakterystyczne także przemiany typu: CS → 3-epiCS oraz 6-deoksoCS → CS → BL (ryc. 1) (YOKOTA i współaut. 1990, 1991, 1994, SUZUKI i współaut. 1993a, 1994a, 1994b, 1995a, FUJIOKA i współaut. 1995a, b, CHOI i współaut. 1996).

Biosynteza BL z TE odbywa się w wyniku epimeryzacji grupy hydroksylowej węgla C-3 TE powodującej konwersję do TY, natomiast w wyniku hydroksylacji TY w pozycji węgla C-2 powstaje CS, w którym utlenienie pierścienia B przekształca go w BL (SAKURAI i współaut. 1991). Występowanie TE, TY, CS i BL w pylnikach lilii długokwiatowej oraz liściach *Distylium racemosum* przyczyniło się do stwierdzenia tylko przemiany TE w TY poprzez 3-dehydroteasteron (3-DT) (ABE i współaut. 1992, 1994). Również pyłek kwiatowy cyprysu arizońskiego zawiera szereg związków BR typowych dla szlaku ich biosyntezy w barwinku różyczkowym.

Okazało się, że 6-deoksoTY oraz 3-dehydro-6-deoksoTE są prawdopodobnie prekursorami w biosyntezie 6-deoksoCS (ryc. 1). Występowanie TY, TE oraz 3-dehydroTE w pyłku kwiatowym cyprysu arizońskiego sugeruje, że może dokonywać się zamiana grup 3-hydroksylowych na 3-okso-grupy. Z tego wynika, że możliwa jest więc biosynteza TY i TE z 6-deoksoTY poprzez 3-dehydro-6-deoksoTE, oczywiście pod warunkiem stopniowego utlenienia pierścienia B. Przekształcenia te, jak na razie nie mają pełnego potwierdzenia empirycznego (GRIFFITHS i współaut. 1995).

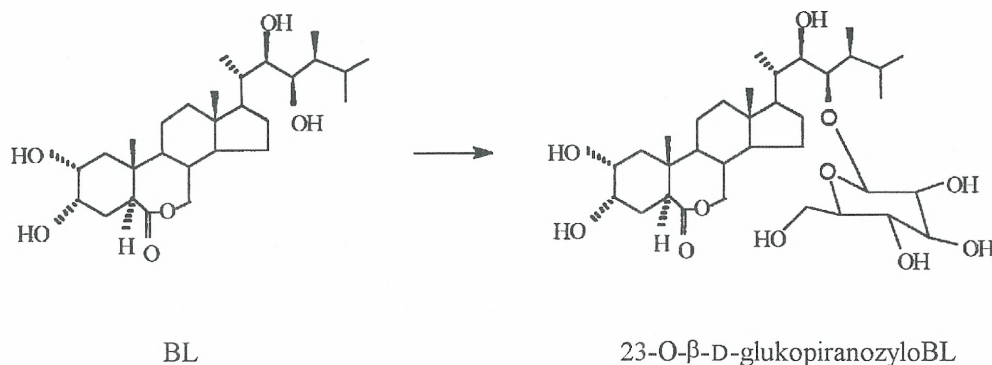
Niedojrzałe nasiona fasoli (*Phaseolus vulgaris*) zawierają aż kilkanaście różnorodnych BR oraz sporo typowych fitosteroli, z których 24-metyleno-25-metylo-cholesterol jest prekursorem w biosyntezie 25-metylodolichosteronu — jednego z głównych przedstawicieli BR. Ten przykład wskazuje na wybiórczy charakter reakcji utleniania węgla w pozycji C-24 w postaci grupy metylowej lub metylenowej w sterolach roślinnych, co w efekcie prowadzi do biosyntezy różnorodnych BR (KIM i współaut. 1987, 1988).

PRZEMIANY BIOCHEMICZNE BRASSINOSTEROIDÓW A ICH AKTYWNOŚĆ METABOLICZNA

Spośród ponad czterdziestu naturalnie występujących BR tylko niektóre są formami aktywnymi biologicznie, zaś sporo z nich należy do bezpośrednich prekursorów lub intermediałów w ich biosyntezie. Przykładem przemian biochemicznych BR może być CS, który jako forma 6-keonowa jest utleniany enzymatycznie do BL — formy 7-oksalaktonowej. Empirycznie wykazano, że BL posiada większą aktywność fizjologiczno-metaboliczną aniżeli CS. W niektórych roślinach, na przykład ryżu czy tytoniu, nie zachodzi przekształcanie CS w BL. Prawdopodobnie CS ulega przemianom do nieznanego dotychczas rozpuszczalnego w wodzie metabolitu, który jest jego glikozydem. Chemiczna struktura i aktywność biologiczna meta-

bolitów CS nie została dotychczas jednoznacznie określona. Natomiast BL w przeciwieństwie do CS może przekształcać się w 23-O-β-D-glikozyd w 14-dniowych roślinach garbipiłata (*Vigna radiata*) (ryc. 2) (SUZUKI i współaut. 1993b).

Aktywność biologiczna glikozydu BL jest znacznie słabsza w stosunku do jego formy wolnej. Z badań nad zależnością między strukturą a aktywnością biologiczną BR wynika, że nawet niewielka modyfikacja chemiczna w łańcuchu bocznym powoduje znaczne zmiany w ich aktywności fizjologiczno-metabolicznej (BAJGUZ i CZERPAK 1996a, b). Dlatego też przypuszcza się, że 23-O-β-D-glukopiranozyloBL posiada znacznie mniejszą aktywność biologiczną z powodu zajmującego wiele przestrzeni



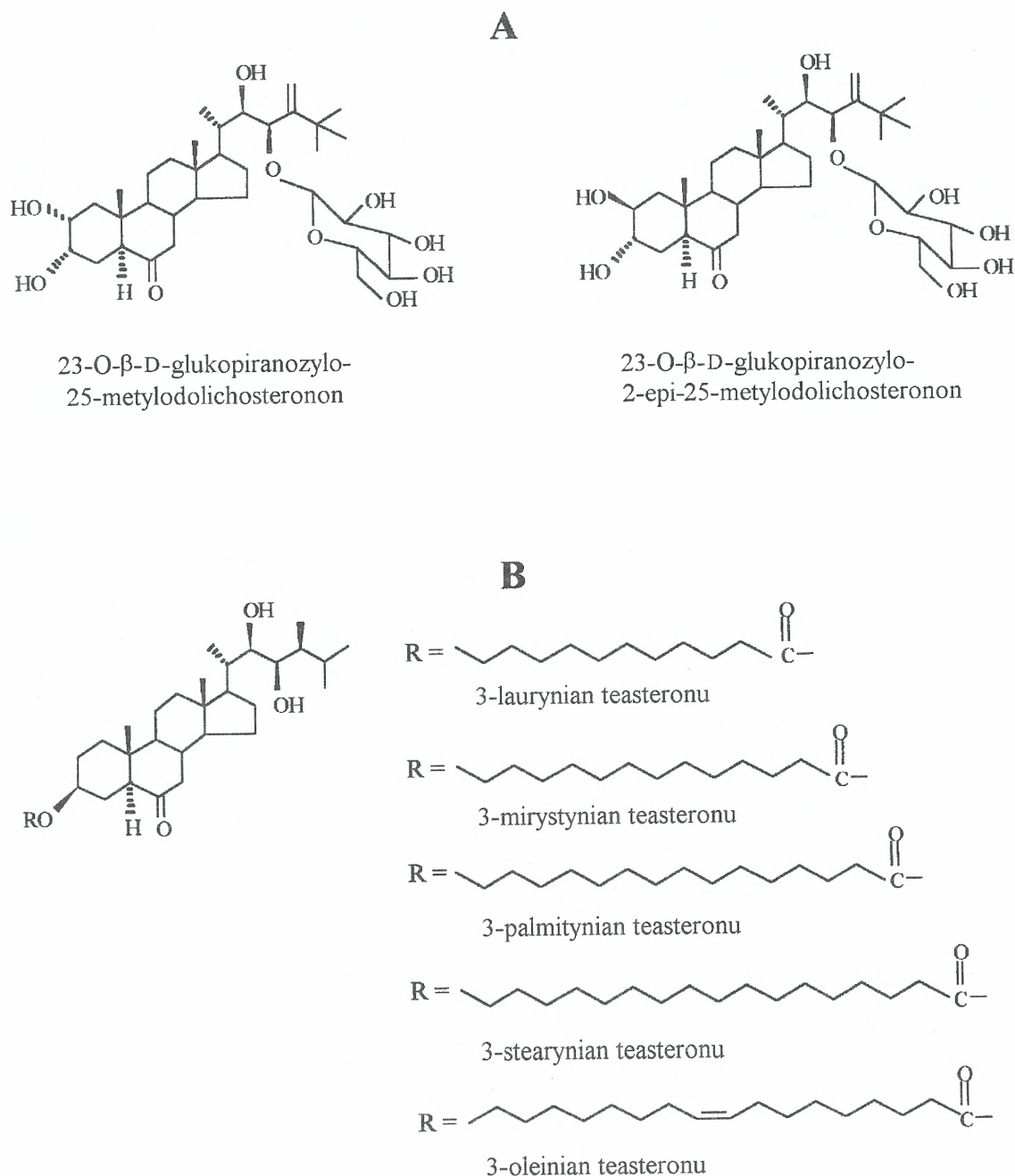
Ryc. 2. Glukozyłacja brassinolidu (BL) do 23-O-β-D-glukopiranozyloBL w komórkach garbipiłata (*Vigna radiata*).

rodnika glukopiranozylowego w łańcuchu bocznym (SUZUKI i współaut. 199 b). Na przykładzie fasoli wykazano, że glukozylacja grupy hydroksylowej przy węglu C-23 w BR jest głównym procesem biochemicznym ich dezaktywacji u roślin. Potwierdzeniem tego jest występowanie w nasionach fasoli dwóch form izomerów 23-O-glikozydowych BR, to jest: 23-O- β -D-glukopiranozylo-25-metylodolichosteronu i jego epimeru (ryc. 3A) (ABE 1991).

Powszechnym mechanizmem regulacji aktywności biologicznej fitohormonów są ich przemiany metaboliczne typu syntezy, degradacji lub przejściowej inaktywacji poprzez połączenia

z niektórymi związkami niskocząsteczkowymi, na przykład aminokwasami, kwasami tłuszczowymi, monosacharydami w formie estrów albo glikozydów. Jako pierwsze w formie połączeń glikozydowych zostały scharakteryzowane gibereliny (GA) jako 2-O- β -D-glukozyd-GA₈, wyizolowany z komórek fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus*). Tego typu połączenia związków niskocząsteczkowych, głównie cukrów z fitohormonami, zostały nazwane koniugatami hormonów roślinnych (SEMBDNER i współaut. 1994).

Po raz pierwszy estrowe koniugaty BR z resztami kwasów tłuszczowych stwierdzono w

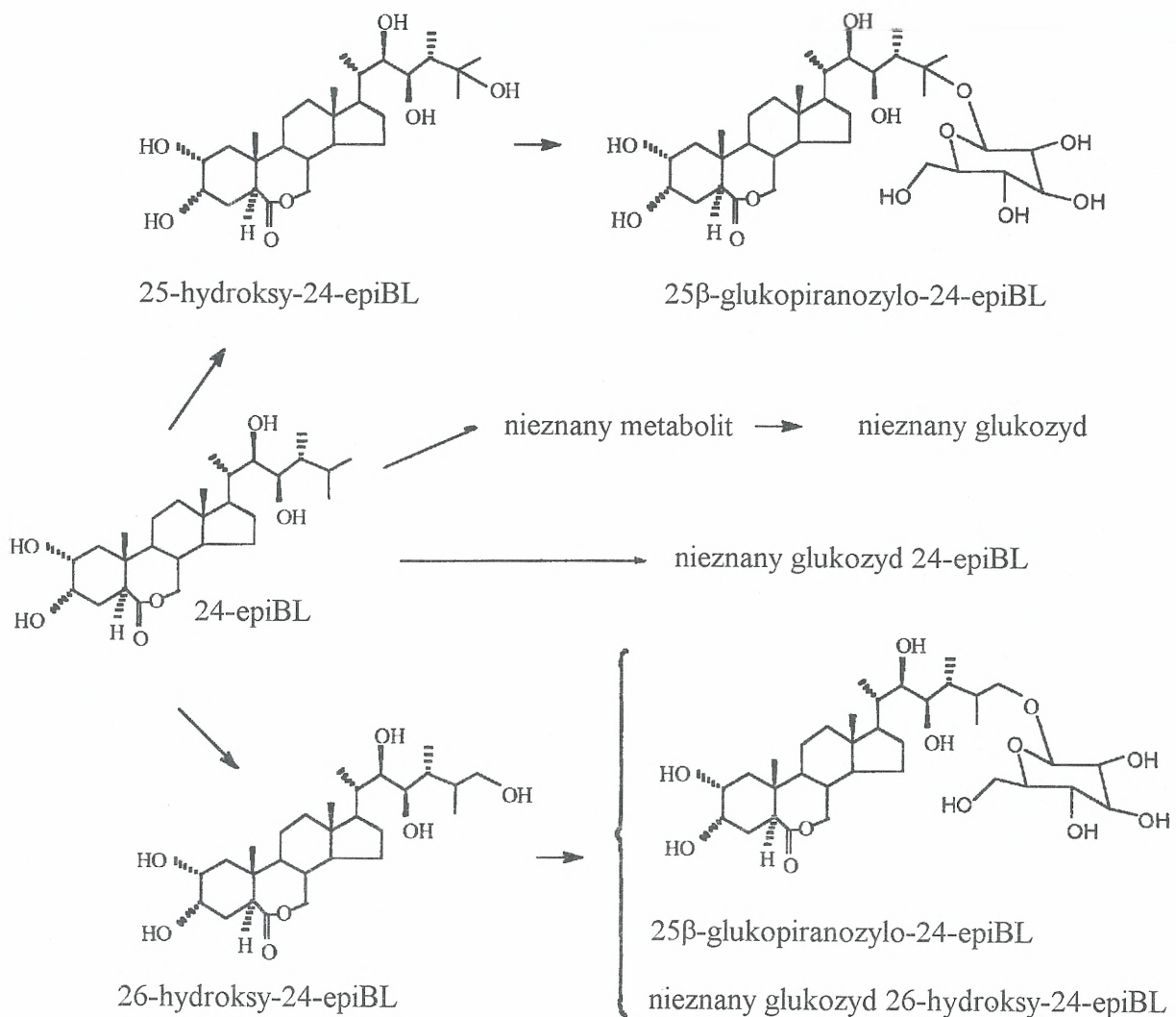


Ryc. 3. Wzory strukturalne koniugatów glikozydowych i acylowych brassinosteroidów.

pyłku kwiatowym lili długokwiatowej (*Lilium longiflorum*) w przypadku TE (ryc. 3B). Estryfikacja TE prawdopodobnie była możliwa w wyniku specyficzności substratowej enzymu do TE. Dopasowanie struktury TE do jednoznacznie zdefiniowanej przestrzennej struktury centrum aktywnego enzymu prowadzi do powstania tego typu koniugatów. Enzym biorący udział w tym procesie prawdopodobnie eliminuje możliwość estryfikacji pozostałych BR, występujących w pyłku kwiatowym lili. Sugeruje to występowanie tak zwanej absolutnej specyficzności substratowej, bądź specyficzności przestrzennej enzymu. Za tą drugą możliwością przemawia fakt, iż biotransformacji ulega tylko TE posiadający β -konfigurację grupy hydroksylowej w pozycji węgla C-3 w pierścieniu A (ASAKAWA i współaut. 1994, 1996). Podobne wyniki uzyskał KOLBE ze współpracownikami (1996) opisując koniugaty 3,24-diepiBL i 3,24-diepiCS jako metabolity 24-epiBL i 24-epiCS, powstałe

podczas reakcji estryfikacji katalizowanej przez acetylotransferazę.

Dwa izomeryczne metabolity, 25- β -D-glukopiranozylo-24-epiBL i 26- β -D-glukopiranozylo-24-epiBL, powstają w komórkach pomidora (*Lycopersicon esculentum*) z egzogennie podanego 24-epiBL (ryc. 4). Związkami pośrednimi, powstającymi w wyniku hydroksylacji 24-epiBL, są 25-hydroksy-24-epiBL i 26-hydroksy-24-epiBL, które mogą być katalizowane przez monoooksygenazę cytochromu P-450. Prawdopodobnie przemiany metaboliczne 24-epiBL w komórkach pomidora są podobne do procesów zachodzących w komórkach bakteryjnych i zwierzęcych. Również u owadów ekdyson podlega procesowi hydroksylacji łańcucha bocznego w pozycjach węgla C-22 i C-25. Przemiana ta jest katalizowana przez monoooksygenazę cytochromu P-450 (SCHNEIDER i współaut. 1994, 1995, HAI i współaut. 1995). Ekdysteroidy są związkami wykazującymi znaczne podo-

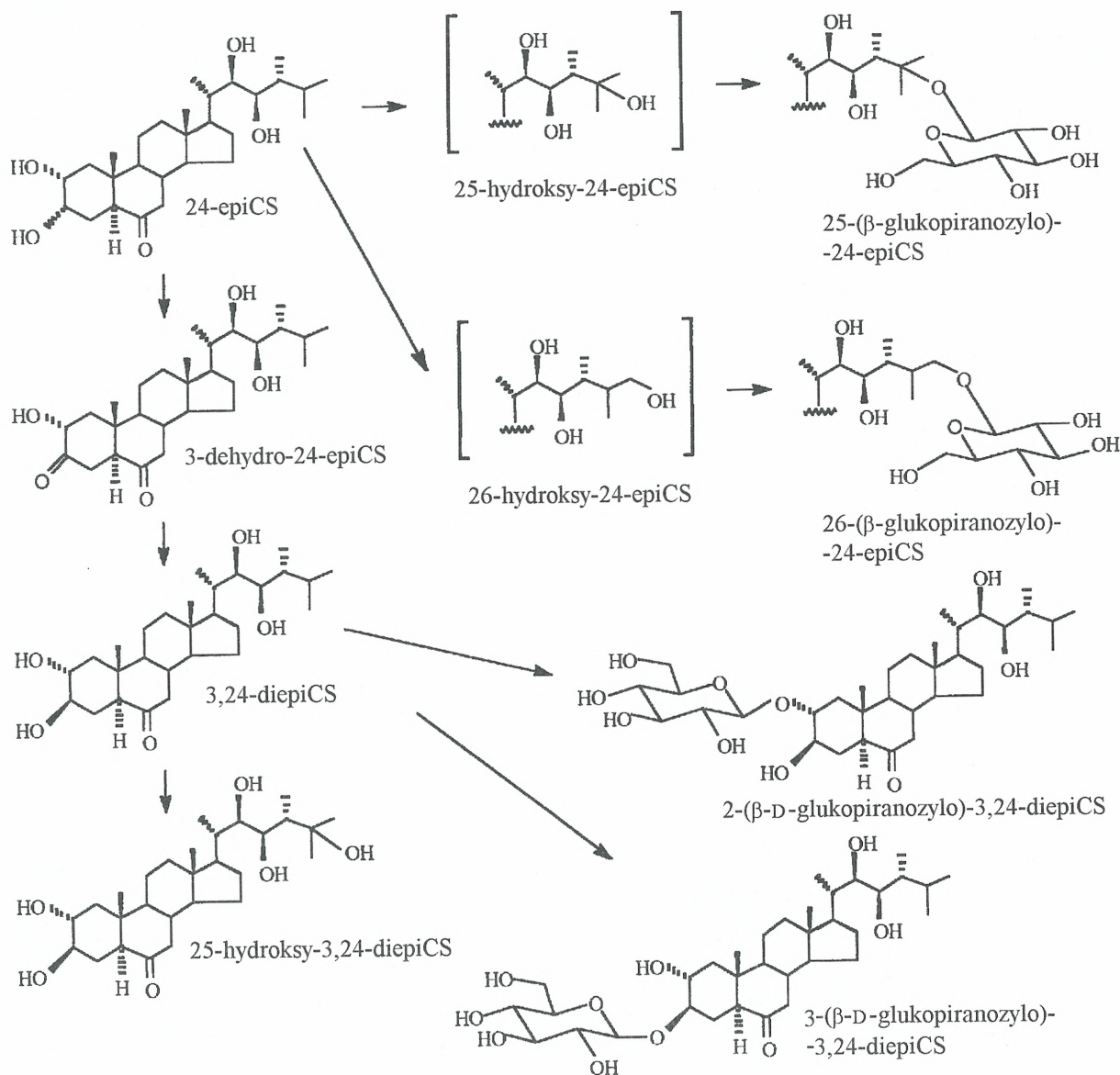


Ryc. 4. Metaboliczna konwersja 24-epibrassinolidu do glikozydów brassinosteroidowych w komórkach pomidora (*Lycopersicon esculentum*).

bieństwo strukturalne do BR, a niektórzy badacze uważają je za związki ekdysteroidopodobne (LAFONT i HORN 1989). Jednakże powstaje pytanie, czy proces hydroksylacji 24-epiBL, w wyniku którego powstają dwa związki, to jest 25-hydroksy-24-epiBL i 26-hydroksy-24-epiBL, jest katalizowany przez ten sam enzym, czy też przez dwa różne enzymy. Stosując specyficzne inhibitory cytochromu P-450, na przykład cytochrom c, 2,6-dichlorofenolindofenol stwierdzono, że hydroksylacja 24-epiBL jest jednak katalizowana przez dwa różne niezależnie działające enzymy: C-25 hydroksylazę i C-26 hydroksylazę. Oba glikozydy 25- β -D-glukopiranozylo-24-epiBL i 26- β -D-glukopiranozylo-24-epiBL

powstają na drodze dwustopniowych przemian: hydroksylacji i częściowej glukozytacji. Powstałe wcześniej pośrednie hydroksy-związki stanowią doskonalszy substrat wyjściowy do procesu glukozytacji aniżeli 24-epiBL. Stwierdzono również, że 24-epiBL może przekształcić się bezpośrednio w nieznaną dotąd glikozyd 24-epiBL. Nie zidentyfikowane dotychczas metabolity pośrednich i bezpośrednich przemian 24-epiBL w komórkach pomidora świadczą o różnokierunkowym, a zarazem skomplikowanym metabolizmie tegoż BR (SCHNEIDER i współaut. 1994, 1995, HAI i współaut. 1995).

Biotransformacja 24-epiCS w komórkach pomidora do glikozydów BR jest przedstawiona

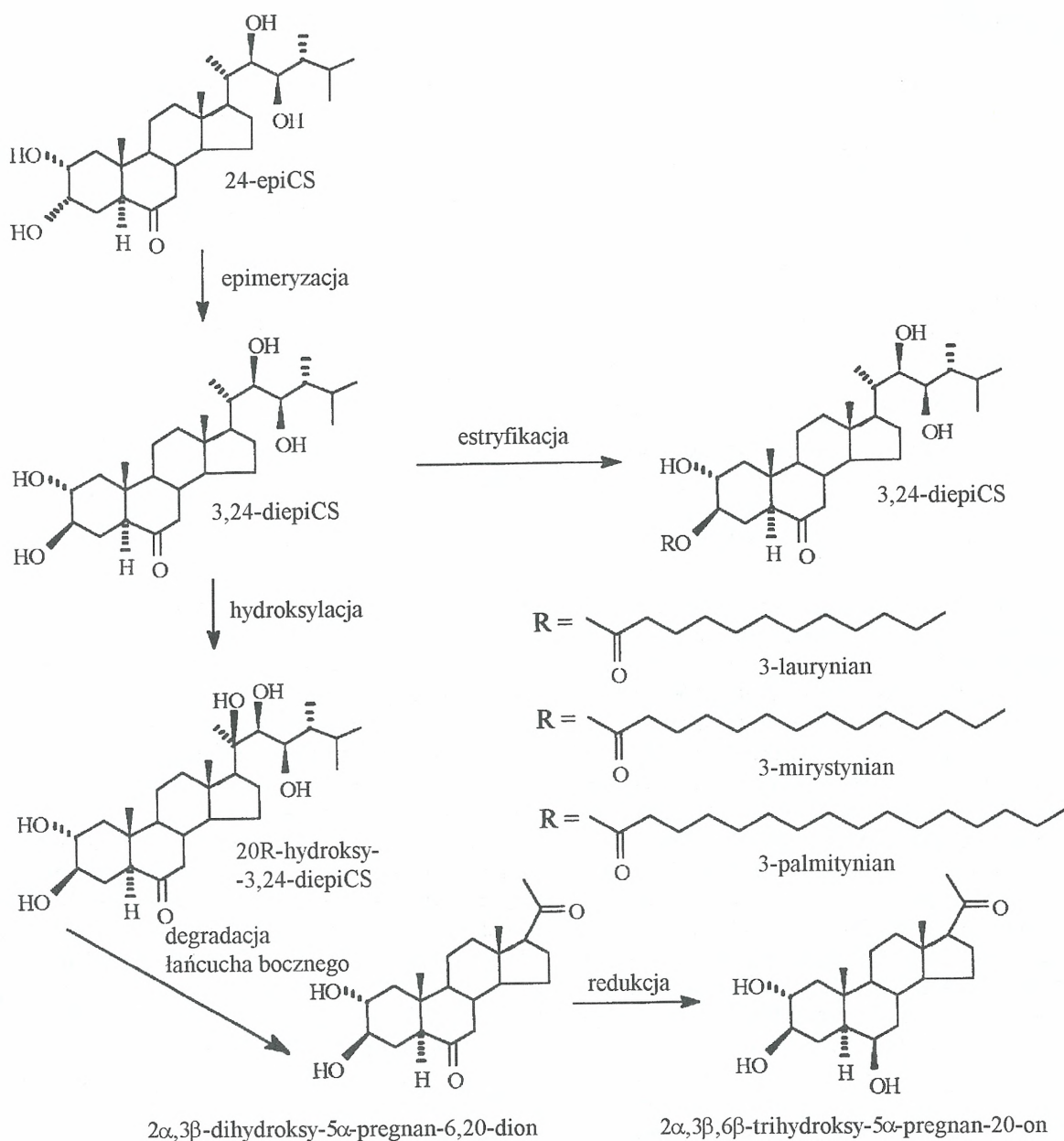


Ryc. 5. Metaboliczna konwersja 24-epikasteronu do glikozydów brassinosteroidowych w komórkach pomidora (*Lycopersicon esculentum*).

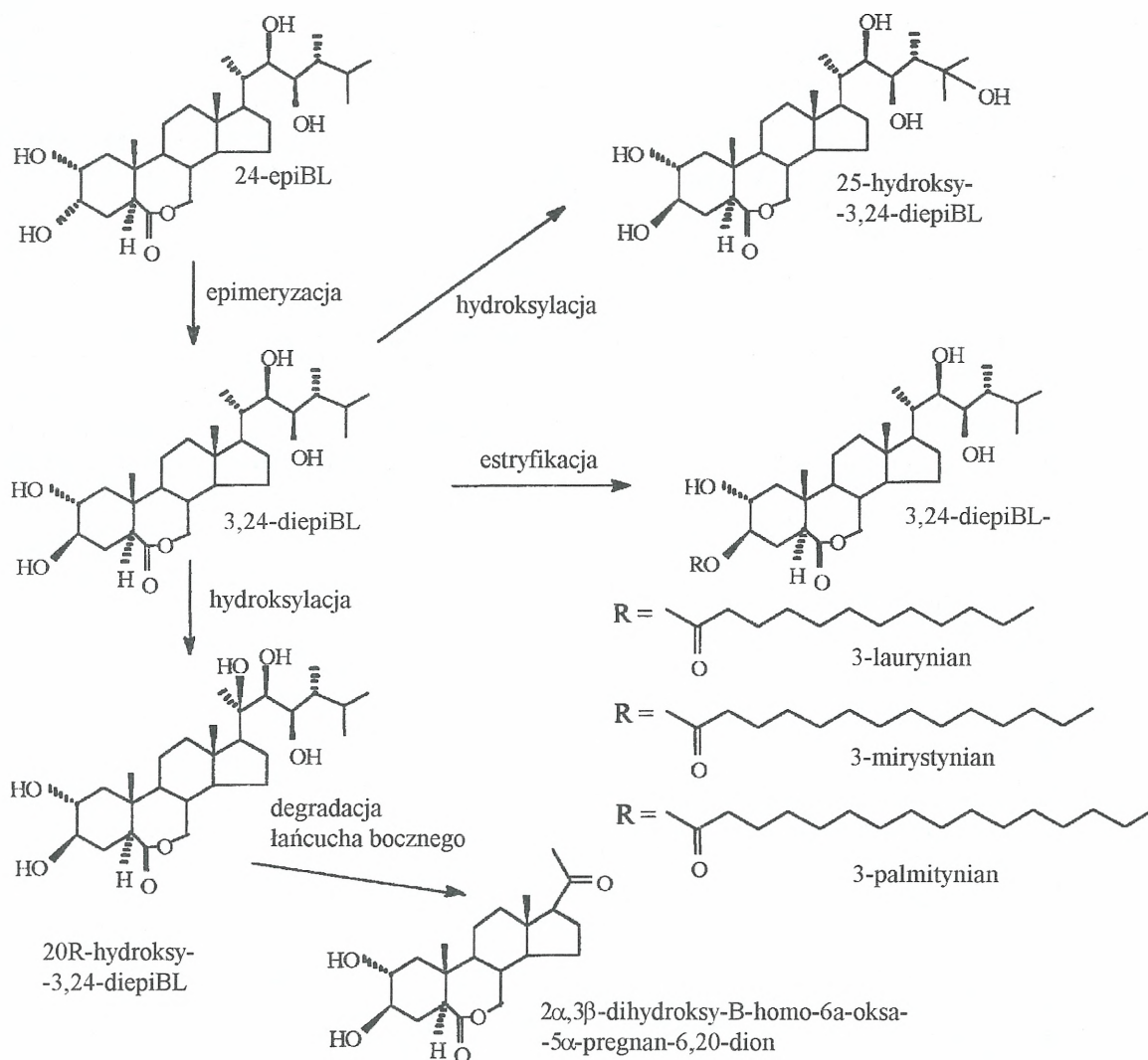
na rycinie 5. Metaboliczny szlak 24-epiBL (ryc. 4) cechuje się podobnym i specyficznym procesem hydroksylacji oraz glikozylacji 24-epiCS (ryc. 5). W wyniku tych przemian tworzą się najpierw związki: 25- i 26-hydroksylowe, a następnie ich 25- i 26-glikozydowe pochodne. W wyniku odłączenia wodoru od grupy hydroksylowej w pozycji węgla C-3 24-epiCS tworzy się 3-dehydro-24-epiCS. Stanowi on związek pośredni w procesie epimeryzacji do 3,24-diepiCS, który jest naturalnie występującym BR (BAJGUZ i CZERPAK 1995) oraz związkiem pośrednim w metabolizmie 24-epiCS w komórkach seradeli pastewnej (*Ornithopus sativus*) (KOLBE i współaut. 1995, 1996). Z kolei w wyniku glikozylacji

3,24-diepiCS w pozycjach 3β -OH czy 2α -OH może powstawać odpowiednio: 2-(β -D-glukopiranozylo)-3,24-diepiCS i 3-(β -D-glukopiranozylo)-3,24-diepiCS. Hydroksylacja tegoż epimeru CS w pozycjach węgla C-25 daje 25-hydroksy-3,24-diepiCS. Przemiany metaboliczne 24-epiCS, przedstawione na rycinie 6, wskazują na występowanie różnorodnych form glikozydowych i aglikonowych BR, głównie 3,24-diepiCS i jego glikozydów (HAI i współaut. 1996).

W komórkach seradeli pastewnej egzogenne wprowadzone: 24-epiCS i 24-epiBL ulegają epimeryzacji oraz estryfikacji w pozycji węgla C-3. W efekcie tych przemian powstają koniugaty BR w postaci estrów kwasów tłuszczowych



Ryc. 6. Metabolizm 24-epikastasteronu w komórkach seradeli pastewnej (*Ornithopus sativus*).



Ryc. 7. Metabolizm 24-epibrassinolidu w komórkach seradeli pastewnej (*Ornithopus sativus*).

jako lauryniany, mirystyniany i palmityniany 3,24-diepiCS lub 3,24-diepiBL (ryc. 6 i 7). Również 24-epiCS i 24-epiBL mogą częściowo przekształcać się do pregnano-metabolitów posiadających grupę ketonową w pozycji węgla C-20. Pierwszą reakcją w tej przemianie jest hydroksylacja powstałych diepimerów CS i BL do 20R-hydroksy związków, w których z kolei po degradacji łańcucha bocznego powstają pregnano-metabolity: 2 α ,3 β -dihydroksy-5 α -pregnan-6,20-dion i 2 α ,3 β -dihydroksy-B-homo-6 α -oksapregnan-6,20-dion. Metabolit powstały z 24-epiCS ze względu na występowanie w pierścieniu B grupy ketonowej może dodatkowo podlegać procesowi redukcji do 2 α ,3 β ,6 β -trihydroksy-5 α -pregnan-20-onu (ryc. 6). Metabolizm 24-epiBL w komórkach seradeli pastewnej (ryc. 7) jest analogiczny do przemian 24-epiCS, z wyjątkiem redukcji wspomnianego pregnano-metabolitu 24-epiCS (ryc. 6) (KOLBE i

współaut. 1994, 1995, 1996). Poznanie produktów biotransformacji 24-epiCS i 24-epiBL stanowi kolejny krok w ustaleniu kolejnych naturalnie występujących acylo-koniugatów BR. W przypadku acylowych koniugatów TE dotychczas poznano jedynie laurynian, mirystynian, palmitynian, oleinian i stearynian (ASAKAWA i współaut. 1994, 1996).

Przedstawiony metabolizm 24-epiCS i 24-epiBL w komórkach seradeli pastewnej wykazuje pewne podobieństwo do przemian biochemicznych ekdysonu u owadów i skorupiaków. W organizmach owadzych następuje epimeryzacja grupy hydroksylowej ekdysonu w pozycji węgla C-20. Jednakże w przeciwieństwie do zachodzących przemian CS i BL w seradeli pastewnej, owady nie tworzą estrowych koniugatów z kwasami tłuszczowymi w pozycji C-3, ale w C-22 (LAFONT i CONNAT 1989, GRZELAK 1994).

PODSUMOWANIE

Ogólny przebieg biosyntezy BR został poznany na początku lat dziewięćdziesiątych, zaś szczegółowe szlaki wraz z alternatywnymi drogami ich wytwarzania ustalono w ostatnich dwóch latach.

Aktywność metaboliczna poszczególnych form strukturalnych BR zależy przede wszystkim od ich budowy chemicznej i czynników środowiska w jakich żyją rośliny. Najprawdopodobniej przemiany metaboliczne poszczególnych rodzajów BR są uzależnione w dużym stopniu od taksonomii roślin uwarunkowanej genetycznie i specyficznych nieraz krańcowo

drastycznych warunków środowiskowych ich życia.

Z przedstawionych danych literaturowych wynika, że u roślin brassinosteroidy mogą ulegać wielu dość różnorodnym przemianom biochemicznym do form bardziej lub mniej aktywnych biologicznie. Okazuje się, że metabolizm związków BR niektórych roślin wykazuje częściowe podobieństwo do przemian biochemicznych ekdysteroidów owadów. Zbliżona struktura chemiczna BL i ekdysonu również stanowi niejako potwierdzenie jedności świata roślinnego i zwierzęcego.

BIOSYNTHESIS AND METABOLISM OF BRASSINOSTEROIDS

Summary

The general course of the brassinosteroids biosynthesis in plants was recognized at the beginning of the 1990s while specific routes and alternatives of their production were determined during the last two years. High metabolic activity of particular structural forms of brassinosteroids depends primarily on their chemical structure and the environmental factors of the plants habitat. Most probably the metabolic transformations of particular kinds of brassinosteroids depend to a large extent on the plant taxonomy determined genetically, as well as specific, sometimes ex-

treme, living conditions. The subject literature presented suggests that brassinosteroids in plants may undergo many biochemical transformations into forms with various biological activity. It appears that the metabolism of brassinosteroids in some plants shows certain similarity to biochemical changes of ecdysteroids in insects. A similar chemical structure of brassinosteroids and ecdysone may also to some extent confirm the unity of the plant and animal world.

LITERATURA

- ABE H. 1991. *Rice-lamina inclination, endogenous levels in plant tissues and accumulation during pollen development of brassinosteroids*. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. CUTLER H.G., YOKOTA T., ADAM G. (red.). American Chemical Society, Washington, DC, 200-207.
- ABE H., ASAKAWA S., ANDO T., MOURI T., ABURATANI M., TAKEUCHI T. 1992. *Effect of introducing a lactone group into typhasterol and teasterone to promote rice lamina inclination*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1312-1313.
- ABE H., HONJO C., KYOKAWA Y., ASAKAWA S., NARSUME M., NARUSHIMA M. 1994. *3-Oxoteasterone and the epimerization of teasterone: identification in lily anthers and Distylium racemosum leaves and its biotransformation into typhasterol*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 986-989.
- ADAM G. 1994. *Brassinosteroid — eine neue phytohormon-gruppe?* *Naturwissenschaften* 81, 210-217.
- ARTECA R. N. 1995. *Brassinosteroids*. [W:] *Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*. DAVIES P. J. (red.). Kluwer Academic Publishers, 206-213.
- ASAKAWA S., ABE H., KYOKAWA Y., NAKAMURA S., NATSUME M. 1994. *Teasterone 3-myristate: a new type of brassinosteroid derivative in Lilium longiflorum anthers*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 219-220.
- ASAKAWA S., ABE H., NISHIKAWA N., NATSUME M., KOSHIOKA M. 1996. *Purification and identification of new acyl-conjugated testerones in lily pollen*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 1416-1420.
- BAJGUZ A., CZERPAK R., 1995. *Występowanie i aktywność biologiczna brassinosteroidów — nowych hormonów roślin*. *Kosmos* 44, 129-144.
- BAJGUZ A., CZERPAK R. 1996a. *Brassinosteroids and changes of the protein contents in the green alga Chlorella vulgaris Beijerinck*. *Plant Physiol. Biochem.*, Special Issue, 10th FESPP Congress, Florence, Italy, September 9-13, 307-308.
- BAJGUZ A., CZERPAK R. 1996b. *Effect of brassinosteroids on growth and proton extrusion in the alga Chlorella vulgaris Beijerinck (Chlorophyceae)*. *J. Plant Growth Regul.* 15, 153-156.
- CERANA R., BONETTI A., MARRE M. T., ROMANI G., MARRE E. 1983. *Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in Azuki bean epicotyls*. *Physiol. Plant.* 59, 23-27.
- CHOI Y.-H., FUJIOKA S., HARADA A., YOKOTA T., TAKATSUTO S., SAKURAI A. 1996. *A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone*. *Phytochemistry* 43, 593-596.
- FUJIOKA S., INOUE T., TAKATSUTO S., YANAGISAWA T., SAKURAI A., YOKOTA T. 1995a. *Identification of a new brassinosteroid, cathasterone, in cultured cells of Catharanthus roseus as a biosynthetic precursor of teasterone*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1543-1547.
- FUJIOKA S., INOUE T., TAKATSUTO S., YANAGISAWA T., SAKURAI A., YOKOTA T. 1995b. *Biological activities of biosynthetically-related congeners of brassinolide*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1973-1975.
- GRIFFITHS P. G., SASSE J. M., YOKOTA T., CAMERON D. W. 1995. *6-Deoxytyphasterol and 3-dehydro-6-deoxoteasterone, possible precursors to brassinosteroids in pollen of Cupressus arizonica*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 956-959.
- GRZELAK K. 1994. *Ekdysteroidy owadzie — biosynteza, metabolizm i funkcja*. *Post. Bioch.* 40, 181-190.

- HAI T., SCHNEIDER B., ADAM G. 1995. *Metabolic conversion of 24-epi-brassinolide into pentahydroxylated brassinosteroid glucosides in tomato cell cultures*. *Phytochemistry* 40, 443–448.
- HAI T., SCHNEIDER B., PORZEL A., ADAM G. 1996. *Metabolism of 24-epi-castasterone in cell suspension cultures of *Lycopersicon esculentum**. *Phytochemistry* 41, 197–201.
- 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.
- KALINICH J. F., MANDAWA N. B., TODHUNTER J. A. 1986. *Relationship of nucleic acid metabolism to brassinolide-induced responses in beans*. *J. Plant Physiol.* 125, 345–353.
- KIM S. K., AKIHISA T., TAMURA T., MATSUMOTO T., YOKOTA T., TAKAHASHI N. 1988. *24-Methylene-25-methylcholesterol in *Phaseolus vulgaris* seed: structural relation to brassinosteroids*. *Phytochemistry* 27, 629–631.
- KIM S. K., YOKOTA T., TAKAHASHI N. 1987. *25-Methylidolichosterone, a new brassinosteroid with tertiary butyl group from immature seed of *Phaseolus vulgaris**. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2303–2305.
- KOLBE A., SCHNEIDER B., PORZEL A., ADAM G. 1996. *Metabolism of 24-epi-castasterone and 24-epi-brassinolide in cell suspension cultures of *Ornithopus sativus**. *Phytochemistry* 41, 163–167.
- KOLBE A., SCHNEIDER B., PORZEL A., VOIGT B., KRAUSS G., ADAM G. 1994. *Pregnane-type metabolites of brassinosteroids in cell suspension cultures of *Ornithopus sativus**. *Phytochemistry* 36, 671–673.
- KOLBE A., SCHNEIDER B., PORZEL A., SCHMIDT J., ADAM G. 1995. *Acyl-conjugated metabolites of brassinosteroids in cell suspension cultures of *Ornithopus sativus**. *Phytochemistry* 38, 633–636.
- LAFONT R., CONNAT J.-L. 1989. *Pathways of ecdysone metabolism*. [W:] *Ecdysone from chemistry to mode of action*, KOOLMAN J. (red.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 167–173.
- LAFONT R., HORN D. H. S. 1989. *Phytoecdysteroids: structures and occurrence*. [W:] *Ecdysone from chemistry to mode of action*, KOOLMAN J. (red.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 39–64.
- ROMANI G., MARRE M. T., BONETTI A., CERANA R., LADO P., MARRE E. 1983. *Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in maize segments*. *Physiol. Plant.* 59, 528–532.
- SAKURAI A., FUJIOKA S. 1993. *The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids*. *Plant Growth Regul.* 13, 147–159.
- SAKURAI A., FUJIOKA S., SAIMOTO H. 1991. *Production of brassinosteroids in plant-cell cultures*. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*, CUTLER H. G., YOKOTA T., ADAM G. (red.). American Chemical Society, Washington, DC, 97–106.
- SCHNEIDER B., KOLBE A., HAI T., PORZEL A., ADAM G., 1995. *Brassinosteroid metabolism in plant cell suspension cultures*. *15th International Conference on Plant Growth Substances*. July 14–18. Minneapolis, Minnesota USA. Abstract No. 183.
- SCHNEIDER B., KOLBE A., PORZEL A., ADAM G. 1994. *A metabolite of 24-epi-brassinolide in cell suspension cultures of *Lycopersicon esculentum**. *Phytochemistry* 36, 319–321.
- SEMBDNER G., ATZORN R., SCHNEIDER G. 1994. *Plant hormone conjugation*. *Plant Molec. Biol.* 26, 1459–1481.
- SUZUKI H., FUJIOKA S., TAKATSUTO S., YOKOTA T., MUROFUSHI N., SAKURAI A. 1993a. *Biosynthesis of brassinolide from castasterone in cultured cells of *Catharanthus roseus**. *J. Plant Growth Regul.* 12, 101–106.
- SUZUKI H., FUJIOKA S., TAKATSUTO S., YOKOTA T., MUROFUSHI N., SAKURAI A. 1994a. *Biosynthesis of brassinolide from teasterone via typhasterol and castasterone in cultured cells of *Catharanthus roseus**. *J. Plant Growth Regul.* 13, 21–26.
- SUZUKI H., FUJIOKA S., TAKATSUTO S., YOKOTA T., MUROFUSHI N., SAKURAI A. 1995a. *Biosynthesis of brassinosteroids in seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* and *Oryza sativa**. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 168–172.
- SUZUKI H., INOUE T., FUJIOKA S., SAITO T., TAKATSUTO S., YOKOTA T., MUROFUSHI N., YANAGISAWA T., SAKURAI A. 1995b. *Conversion of 24-methylcholesterol to 6-oxo-24-methylcholestanol, a putative intermediate of the biosynthesis of brassinosteroids, in cultured cells of *Catharanthus roseus**. *Phytochemistry* 40, 1391–1397.
- SUZUKI H., INOUE T., FUJIOKA S., TAKATSUTO S., YANAGISAWA T., YOKOTA T., MUROFUSHI N., SAKURAI A. 1994b. *Possible involvement of 3-dehydroteasterone in the conversion of teasterone to typhasterol in cultured cells of *Catharanthus roseus**. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1186–1188.
- SUZUKI H., KIM S.-K., TAKAHASHI N., YOKOTA T. 1993b. *Metabolism of castasterone and brassinolide in mung bean explant*. *Phytochemistry* 33, 1361–1367.
- YOKOTA T., NAKAYAMA M., WAKISAKA T., SCHMIDT J., ADAM G. 1994. *3-Dehydroteasterone, a 3,6-diketobrassinosteroid as a possible biosynthetic intermediate of brassinolide from wheat grain*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1183–1185.
- YOKOTA T., OGINO Y., TAKAHASHI N., SAIMOTO H., FUJIOKA S., SAKURAI A. 1990. *Brassinolide is biosynthesized from castasterone in *Catharanthus roseus* crown gall cells*. *Agric. Biol. Chem.* 54, 1107–1108.
- YOKOTA T., OGINO Y., SUZUKI H., TAKAHASHI N., SAIMOTO H., FUJIOKA S., SAKURAI A. 1991. *Metabolism and biosynthesis of brassinosteroids*. [W:] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*, CUTLER H. G., YOKOTA T., ADAM G. (red.). American Chemical Society, Washington, DC, 86–96.