



University of Białystok
Faculty of Biology

Marta Talarek-Karwel

**The share of 24-epibrassinolide in *Acutodesmus obliquus*
adaptation to stress induced by lead ions**

PhD dissertation

Supervisor: dr hab. Andrzej Bajguz, prof. UwB
Auxiliary supervisor: dr Alicja Piotrowska-Nieczyporuk

Białystok 2021

Streszczenie

Różnorodne czynniki środowiskowe kształtują życie w ekosystemach. Wpływają one na modyfikację procesów morfologicznych i fizjologicznych w organizmach roślinnych. Większość substancji pochodzenia endogennego oraz egzogenego, np. fitohormony, bierze udział w regulacji tych procesów. Brassinosteroidy (BR) stanowią szeroko rozpowszechnioną grupę steroidowych hormonów roślinnych, wykazujących wysoką aktywność biologiczną w bardzo niskich stężeniach. Liczne badania dowodzą, iż 24-epibrassinolid (EBL) jest jednym z najbardziej aktywnych BR. EBL znacząco stymuluje wzrost i zwiększa zawartość podstawowych metabolitów u glonów oraz roślin wyższych. Ponadto, chroni rośliny przed niekorzystnymi warunkami środowiska, np. poprzez zwiększenie aktywności antyoksydantów enzymatycznych podczas stresu oksydacyjnego, a także znacząco ogranicza akumulację metali ciężkich przez rośliny. Z roku na rok wzrasta problem zanieczyszczenia ekosystemów wodnych toksycznymi metalami ciężkimi, w tym ołowiem, będącymi skutkiem m.in. przemysłowej działalności człowieka. Ołów przyczynia się głównie do ograniczenia wzrostu, spadku zawartości barwników fotosyntetycznych, węglowodanów, białek czy wystąpienia stresu oksydacyjnego w organizmach roślinnych (**Rozdział I**). Podwyższona zawartość jonów metali w środowisku wodnym negatywnie wpływa na wszystkie organizmy, najbardziej narażone są glony, które są głównymi producentami ekosystemów wodnych oraz znajdują się u podstawy łańcucha pokarmowego.

W związku z powyższym podjęłam badania mające na celu ustalić egzogeny wpływ EBL na jednokomórkową zielenicę *Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald & Hanagata 2000 (szczep SAG 276-6), poddaną działaniu jonów ołowiu. Głównym celem mojej pracy doktorskiej było sprawdzenie czy egzogenicznie stosowany fitohormon ograniczy toksyczny wpływ ołowiu na zielenicę w trakcie 7-dniowej hodowli. W ramach postawionego problemu badawczego stwierdziłam wpływ EBL na wzrost *A. obliquus* (wyrażony liczbą komórek) oraz zawartość: barwników fotosyntetycznych (chlorofili, karotenów i ksantofili), białek, cukrów, nadtlenu wodoru (H_2O_2), nieenzymatycznych antyoksydantów oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych (tj. katalazy, CAT; peroksydazy askorbinianowej, APX; dysmutazy ponadtlenkowej, SOD), a także na proces peroksydacji lipidów (wyrażony poziomem dialdehydu malonowego, MDA). Ustaliłam stężenie EBL działające optymalnie na wzrost i rozwój zielenicy traktowanej ołowiem oraz wykazałam rolę EBL na odpowiedź roślin na stres wywołany obecnością ołowiu poprzez zbadanie aktywności enzymów

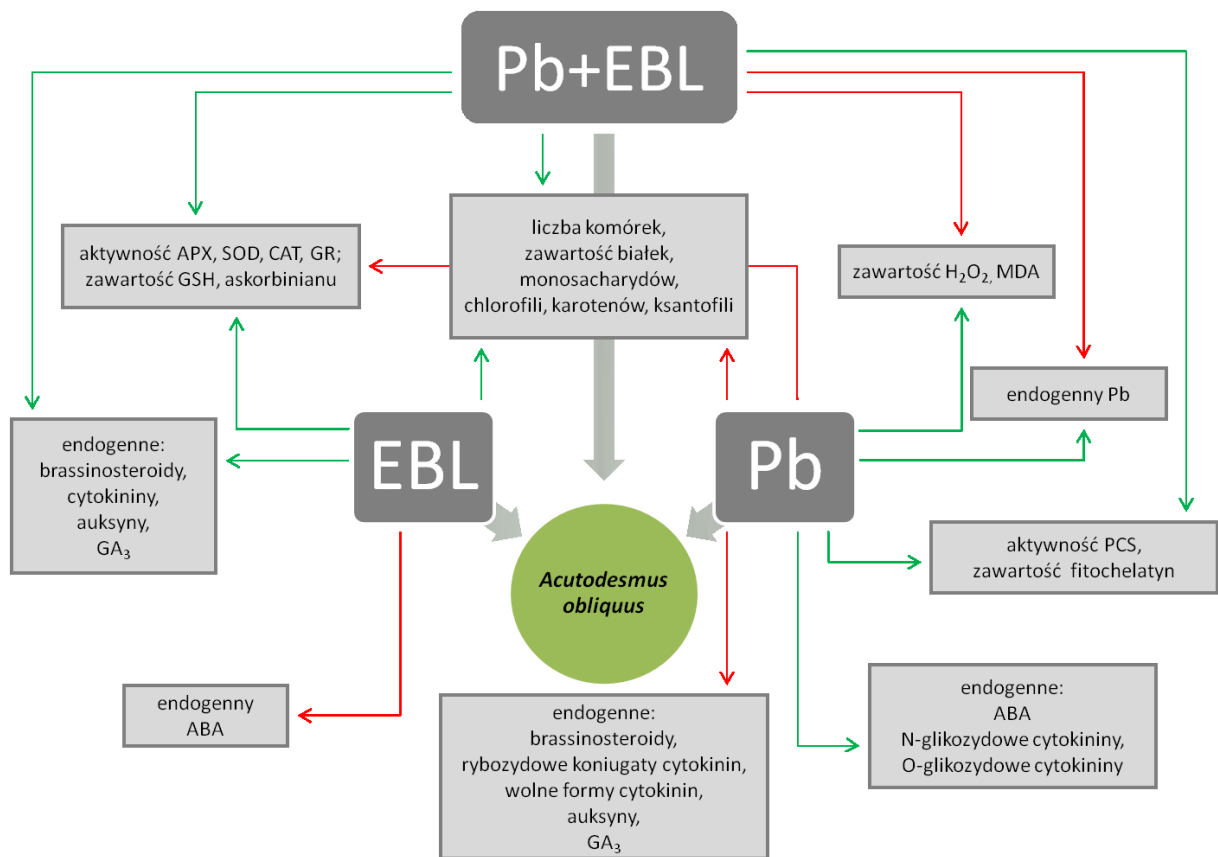
antyoksydacyjnych (CAT, APX, SOD, reduktazy glutationowej, GR) oraz nieenzymatycznych antyoksydantów (askorbinianu i glutationu, GSH). Określiłam rolę EBL w mechanizmie detoksykacyjnym zielenicy *A. obliquus* narażonej na działanie ołowiu poprzez jego wpływ na biosyntezę fitochelatyn, aktywność syntazy fitochelatynowej czy redukcję zawartości metalu w komórkach glonu. Ponadto, zbadalam w jaki sposób ołów, EBL oraz ich mieszanina może wpływać na poziom endogennych fitohormonów: auksyn, BR, cytokinin, kwasu abscysynowego (ABA) oraz kwasu giberelinowego (GA_3) w *A. obliquus*.

Najistotniejszym etapem badań było ustalenie optymalnego stężenia EBL, które w największym stopniu stymulowało wzrost zielenicy. W tym celu zbadalam wpływ EBL w zakresie stężeń 0,0001-10 μM na liczbę komórek, wybrane parametry biochemiczne podczas 7-dniowej hodowli. Otrzymane wyniki wykazały, że wraz ze wzrostem stężenia fitohormonu wzrastał jego stymulujący wpływ na badane parametry. EBL wykazywał największą aktywność w stężeniu 1 μM w piątym dniu hodowli, co przejawiało się największym wzrostem liczby komórek *A. obliquus*, zawartością barwników fotosyntetycznych (chlorofili, karotenów i ksantofili), białek oraz cukrów. Ponadto, EBL ograniczał powstawanie H_2O_2 oraz MDA, będącego produktem peroksydacji lipidów. Otrzymane wyniki, dostarczyły również informacji na temat aktywnego uczestnictwa fitohormonu w aktywacji systemu antyoksydacyjnego, bowiem po zastosowaniu 1 μM EBL zaobserwowałam znaczący wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, APX) oraz zwiększenie zawartości askorbinianu (**Rozdział II**).

Zastosowanie 0,01 μM i 500 μM Pb pozwoliło stwierdzić toksyczne oddziaływanie na zielenicę, a także wywołanie stresu oksydacyjnego manifestującego się zwiększeniem poziomu H_2O_2 . Endogenne EBL (w stężeniu 1 μM) skutecznie ograniczył skutki toksycznego działania ołowiu, tzn. znacząco stymulował wzrost glonu, co przejawiało się zwiększeniem liczby komórek oraz badanych metabolitów (białek, monosacharydów, chlorofili, karotenoidów). Jednoczesne zastosowanie EBL oraz ołowiu spowodowało zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych (APX, CAT, SOD, GR) oraz wzrost zawartości askorbinianu i GSH. Ponadto, EBL znacząco zwiększał aktywność syntazy fitochelatynowej, co skutkowało wzrostem produkcji fitochelatyn. W efekcie nastąpił spadek zawartości endogennego ołowiu w komórkach glonu, a także obniżenie poziomu H_2O_2 oraz spowolnienie procesu peroksydacji lipidów, co miało wpływać na detoksykację toksycznego ołowiu w komórkach zielenicy (**Rozdział III**).

Przeprowadzone badania wykazały obecność ABA, GA₃, auksyn (kwas indolilo-3-octowy, IAA; kwas fenylooctowy, PAA), BR (brassinolidu, BL; EBL; 28-homobrassinolidu, HBL; kastasteronu, CS; 24-epikastasteronu, ECS; tyfasterolu, TY; katasteronu, CT; 6-deoksotyfasterolu, dTY) oraz różnych form cytokinin (formy wolnych zasad, w połączeniach z rybozą, N-glikozydowych, O-glikozydowych) w zielenicy *A. obliquus*. Wśród 30 zidentyfikowanych fitohormonów pod względem zawartości dominowały auksyny (19,71-25,93 pmol/g ś.m.), następnie cytokininy (0,12-7,96 pmol/g ś.m.), ABA (5,00 pmol/g ś.m.), BR (0,09-3,25 pmol/g ś.m.) oraz GA₃ (1,76 pmol/g ś.m.). EBL efektywnie oddziaływał na syntezę fitohormonów, za wyjątkiem ABA, którego zawartość zmalała. Działanie jonów ołowiu spowodowało zmniejszenie zawartości BR, GA₃, auksyn oraz wolnych form cytokinin i ich rybozydowych koniugatów przy jednoczesnym wzroście poziomu ABA oraz N-glikozydowych, O-glikozydowych cytokinin. Zastosowanie mieszaniny EBL i jonów ołowiu spowodowało wzrost zawartości BR, GA₃, auksyn i cytokinin w komórkach glonu (**Rozdział IV**).

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdziłam, iż EBL jest zaangażowany w proces detoksykacji jonów ołowiu (Ryc. 1). Uważam, że uzyskane wyniki badań przyczynią się do lepszego zrozumienia roli BR w biochemicznej adaptacji roślin do warunków stresowych.



Ryc. 1. Wpływ 24-epibrassinolidu (EBL) i/lub ołowiu (Pb) na kultury glonu *Acutodesmus obliquus*.

Objaśnienia skrótów: APX – peroksydaza askorbinianowa, ABA – kwas abscysynowy, CAT – katalaza, GA₃ – kwas giberelinowy, GR – reduktaza glutationowa, GSH – glutation, H₂O₂ – nadtlenek wodoru, MDA – dialdehyd malonowy, PCS – syntaza fitochelatynowa, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, → działanie stymulujące, → działanie hamujące.

Abstract

Various environmental factors influence life in ecosystems. They modify the morphology and physiology of plant organisms. Most endogenous and exogenous substances, including phytohormones, are involved in the regulation of these processes. Brassinosteroids (BRs) are a widely distributed group of steroidal phytohormones exhibiting high biological activity at very low concentrations. Numerous studies have demonstrated that 24-epibrassinolide (EBL) is one of the most active BR. EBL significantly stimulates growth and increases the levels of basic metabolites in algae and vascular plants. In addition, it protects plants against negative environmental conditions, e.g., by stimulating the activity of enzymatic antioxidants during oxidative stress and significantly reducing the accumulation of heavy metals in plants. The pollution of aquatic ecosystems with toxic heavy metals, including lead (Pb), caused by industry is increasing every year. The main effects of Pb include growth restriction, a decrease in the level of photosynthetic pigments, carbohydrates, and proteins, and an increase in the level of malondialdehyde or the induction of oxidative stress in plant organisms (**Chapter I**). The increased content of toxic metals in the aquatic environment has a negative effect on all organisms, but the most vulnerable are algae, which are the key producers in aquatic ecosystems and are at the food chain base.

For these reasons, I conducted a study to determine the role of EBL in the culture of unicellular green algae *Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald & Hanagata 2000 (strain SAG 276-6), exposed to Pb. The main objective of my research for my PhD dissertation was to investigate the role of EBL in inhibiting the toxic effects of Pb during a seven-day culture of this green algae. Under the research project I stated the influence of EBL on the growth and development of *A. obliquus* by measuring the number of cells and the concentrations of photosynthetic pigments (chlorophylls, carotenes, xanthophylls), the concentration of proteins, sugars, and hydrogen peroxide (H₂O₂), non-enzymatic antioxidants, and the activity of enzymatic antioxidants (catalase, CAT; ascorbate peroxidase, APX; superoxide dismutase, SOD), as well as on the lipid peroxidation process (express by the level of malondialdehyde, MDA). I determined the concentration of EBL that works optimally on the growth and development of Pb-treated green algae. I demonstrated the role of EBL in the response of plants to Pb-induced stress by examining the activity of antioxidant enzymes (CAT, APX, SOD, glutathione reductase, GR) and non-enzymatic antioxidants (ascorbate and glutathione, GSH). I identified the role of EBL in the detoxification

mechanism in *A. obliquus* green algae exposed to Pb through the involvement of EBL in the biosynthesis of phytochelatin, its effect on the activity of phytochelatin synthase, and the reduction of metal concentration in algal cells. In addition, I examined the effect of Pb and EBL alone, as well as the combination of Pb and phytohormone on the endogenous levels of BRs, auxins, cytokinins, abscisic acid (ABA), and gibberellic acid (GA₃) in *A. obliquus*.

The most important stage of the research was to determine the optimal concentration of EBL, which stimulated the growth of green algae to the greatest extent. For this purpose, I tested the effects of EBL in a range of concentrations, from 0.0001 to 10 μM, on the number of cells, selected basic biochemical parameters during the seven-day culture. The results of this study confirmed a positive correlation between the concentrations of EBL and the stimulating effect on the analyzed parameters. The highest activity of EBL was found at a concentration of 1 μM on the fifth day of culture, which was manifested by a significant increase in the number of *A. obliquus* cells, concentrations of photosynthetic pigments (chlorophylls, carotenes, xanthophylls), proteins, and sugars. EBL also restricted the formation of H₂O₂ and MDA, which is a product of lipid peroxidation. The obtained results also provided information on the involvement of EBL in the activation of the antioxidant system, because after using 1 μM EBL, a significant increase in the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, APX) and an increase in ascorbate concentration were observed (**Chapter II**).

The application of 0.01 μM and 500 μM Pb allowed determining the toxic effect on green algae, as well as the induction of oxidative stress manifested by an increase in the level of H₂O₂. Endogenous EBL (at a concentration of 1 μM) effectively limited the effects of Pb toxicity, i.e., it significantly stimulated algae growth, which was displayed by an increase in the number of cells and the levels of analyzed metabolites (proteins, monosaccharides, chlorophylls, carotenes, and xanthophylls). The combined treatment of algal culture with EBL and Pb increased the activity of antioxidant enzymes (APX, CAT, SOD, GR) and increased the concentrations of ascorbate and GSH. Moreover, EBL significantly increased the activity of phytochelatin synthase, which resulted in the increased production of phytochelatin. As a result, there was a decrease in the level of endogenous Pb in algal cells and reduced the level of H₂O₂, and slowed down the lipid peroxidation process, which was to affect the detoxification of toxic Pb in green algae cells (**Chapter III**).

The study confirmed the presence of ABA, GA₃, auxins (indole-3-acetic acid, IAA; phenylacetic acid, PAA), BRs (brassinolide, BL; EBL; 28-homobrassinolide, HBL;

castasterone, CS; 24-epicastasterone, ECS; typhasterol, TY; cathasterone, CT; 6-deoxotyphasterol, dTY), and different types of cytokinins (free bases, ribosides, and N- and O-glucosides) in the green algae *A. obliquus*. Among 30 phytohormones identified in algal cells, the highest levels were found for auxins (19.71-25.93 pmol/g FW), and lower levels for cytokinins (0.12-7.96 pmol/g FW), ABA (5.00 pmol/g FW), BRs (0.09-3.25 pmol/g FW) and GA₃ (1.76 pmol/g FW). EBL effectively stimulated the synthesis of endogenous phytohormones, except for ABA, which the content decreased. The action of Pb ions reduced the content of BRs, GA₃, auxins, and some cytokinins (free bases and riboside conjugates), while increasing the levels of ABA, N-glycoside, and O-glycoside cytokinins. An increase in the concentration of BRs, GA₃, auxins, and cytokinins in algal cells exposed to the combined treatment with EBL and Pb was observed. (**Chapter IV**).

The presented experimental studies revealed the involvement of EBL in the protection of *A. obliquus* against the toxic effects of Pb (Fig. 1). The findings from these studies contribute to a better understanding of the role of phytohormones in the biochemical adaptation of plants to stressful conditions.

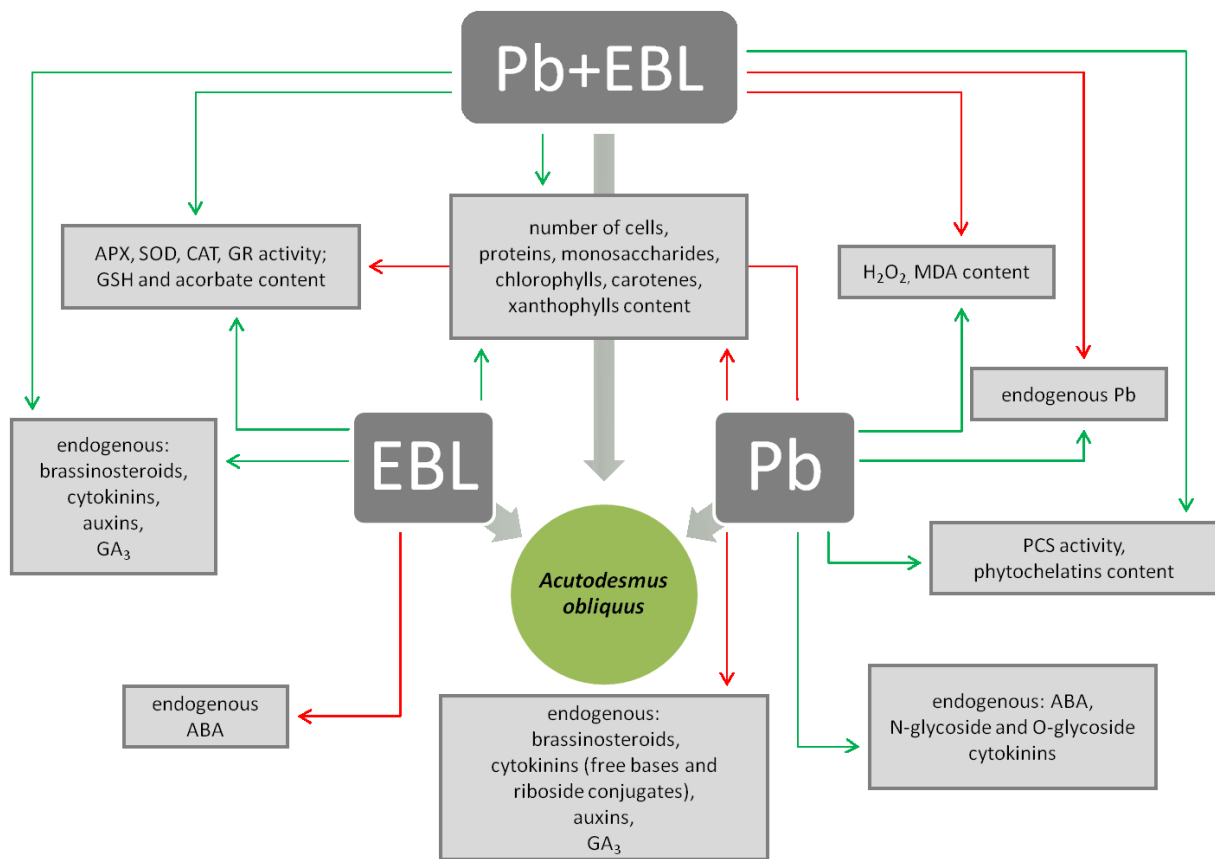


Fig. 1. Effect of 24-epibrassinolide (EBL) and/or lead (Pb) on the culture of algae *Acutodesmus obliquus*.

Abbreviations: APX – ascorbate peroxidase, ABA – abscisic acid, CAT – catalase, GA₃ - gibberellic acid, GR – glutathione reductase, GSH – glutathione, H₂O₂ – hydrogen peroxide, MDA – malondialdehyde, PCS – phytochelatin synthase, SOD – superoxide dismutase, → stimulatory effect, -> inhibitory effect.