

Andrzej Bajguz

**Wpływ brassinosteroidów
na kultury glonu *Chlorella vulgaris*
poddane działaniu wybranych
fitohormonów i czynników stresowych**



Białystok 2007

Recenzenci: prof. dr hab. Andrzej Tretyn
 prof. dr hab. Romuald Czerpak

Wydanie publikacji sfinansowane przez
JM Rektora Uniwersytetu w Białymstoku

© Copyright by Uniwersytet w Białymstoku

Białystok 2007

Korekta: Anna Rutkowska
Skład i redakcja techniczna: Alicja A. Sakowska

ISBN 978-83-7431-130-4

Wydawnictwo Uniwersytetu w Białymstoku
15-097 Białystok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 14
tel. (085) 745 70 59
e-mail: ac-dw@uwb.edu.pl, <http://www.wydawnictwo.uwb.edu.pl>

Druk i oprawa:
Mazowieckie Zakłady Graficzne
e-mail: drukarnia@mzgraf.pl

Szczególne podziękowania chciałbym złożyć Recenzentom – Panu Prof. dr. hab. Andrzejowi Tretynowi z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu i Panu Prof. dr. hab. Romualdowi Czerpakowi z Uniwersytetu w Białymstoku za cenne sugestie i życzliwe uwagi wykorzystane podczas redagowania pracy.

Wykonanie części badań było możliwe dzięki współpracy z laboratoriami University of Exeter (United Kingdom) i Institute of Physical and Chemical Research RIKEN (Saitama, Japan).

Mojej najbliższej Rodzinie dziękuję za wsparcie w trakcie pisania niniejszej monografii.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	9
Wstęp.....	11
1. BRASSINOSTEROIDY	13
1.1. Budowa chemiczna brassinosteroidów	14
1.2. Występowanie brassinosteroidów	21
1.3. Biosynteza brassinosteroidów	25
1.3.1. Biosynteza brassinosteroidów typu C ₂₇	26
1.3.2. Biosynteza brassinosteroidów typu C ₂₈	28
1.4. Metabolizm i transport brassinosteroidów u roślin	31
1.5. Aktywność biologiczna brassinosteroidów.....	35
2. CEL PRACY.....	37
3. CHAKTERYSTYKA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO	39
3.1. Charakterystyka ogólna glonów.....	39
3.2. Cechy biochemiczne glonów	40
3.3. Warunki hodowli glonów	44
3.4. Metody analityczne.....	45
3.4.1. Pomiar liczby i wielkości komórek <i>Chlorella vulgaris</i> oraz pH pożywki	48
3.4.2. Oznaczanie zawartości chlorofili w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	49
3.4.3. Oznaczanie zawartości monosacharydów w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	50
3.4.4. Oznaczanie zawartości białka w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	51
3.4.5. Rozdział elektroforetyczny białek szoku termicznego.....	51
3.4.6. Oznaczanie zawartości peptydów tiolowych (glutationu i fitochelatyn) w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	53
3.4.7. Oznaczanie zawartości metali ciężkich (kadmu, ołowiu i miedzi) w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	54
3.4.8. Oznaczanie zawartości auksyn w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	54
3.4.9. Oznaczanie zawartości cytokinin w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	55

3.4.10. Oznaczanie zawartości brassinosteroidów w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	56
3.4.11. Oznaczanie poziomu enzymatycznych antyoksydantów w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	57
3.4.12. Oznaczanie zawartości askorbinianu w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	58
4. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DyskusJA	59
4.1. Występowanie i biosynteza brassinosteroidów w glonie <i>Chlorella vulgaris</i>	59
4.2. Wpływ brassinosteroidów na wzrost <i>Chlorella vulgaris</i>	70
4.3. Współdziałanie brassinosteroidów z auksynami i cytokininami na ich endogenną zawartość, wzrost i biochemizm glonu <i>Chlorella vulgaris</i>	77
4.4. Wpływ brassinosteroidów na glon <i>Chlorella vulgaris</i> poddany działaniu światła o różnej intensywności i barwie.....	102
4.5. Wpływ brassinosteroidów na glon <i>Chlorella vulgaris</i> poddany działaniu różnych temperatur.....	119
4.6. Wpływ brassinosteroidów na glon <i>Chlorella vulgaris</i> poddany działaniu metali ciężkich	128
4.7. Wpływ brassinosteroidów na glon <i>Chlorella vulgaris</i> poddany działaniu stresu oksydacyjnego, wywołanego oddziaływaniem światła, temperatury i metali ciężkich.....	142
5. STRESZCZENIE	153
6. SUMMARY	159
7. WNIOSKI	165
Spis rycin.....	167
Spis tabel	170
Piśmiennictwo	171

Wykaz stosowanych skrótów

2,4-D	– kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy
24-epiBL	– 24-epibrassinolid
25-MeCS	– 25-metylokastasteron
25-MeDS	– 25-metylodolichosteron
25-MeDS-Glu	– 23-O-β-D-glukopiranozylo-25-metylodolichosteron
28-homoBL	– 28-homobrassinolid
3-DT	– 3-dehydroteasteron
3-Glu-TE	– 3-O-β-D-glukopiranozyd teasteronu
3-La-TE	– 3-laurynian teasteronu
3-My-TE	– 3-mirystynian teasteronu
4-Cl-IAA	– kwas 4-chloroindoliilo-3-octowy
6-deokso-3-DT	– 6-deokso-3-dehydroteasteron
6-deoksoCS	– 6-deoksokastasteron
6-deoksoCT	– 6-deoksokatasteron
6-deoksoTE	– 6-deoksoteasteron
6-deoksoTY	– 6-deoksotyfasterol
6-OH-CN	– 6-hydroksykampestanol
AAS	– atomowa spektrometria absorpcyjna
ACC	– kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy
ALA	– kwas γ-aminolewulinowy
ALAD	– dehydrogenaza kwasu γ-aminolewulinowego
APX	– peroksydaza askorbinianowa
AX	– auksyny
BL	– brassinolid
BR	– brassinosteroid(y)
Brz	– brassinazol
CAT	– katalaza
CK	– cytokininy
Clo	– kłomazon
CN	– kampestanol
CS	– kastasteron
CT	– katasteron
DL	– dolicholid

DMAPP	– dimetyloallilopirofosforan
DPU	– 1,3-difenylomocznik
DS	– dolichostron
FPP	– farnezylodifosforan
GR	– reduktaza glutationowa
GSH	– zredukowany glutation
HMG~CoA	– hydroksymetyloglutarylo~CoA
HSP	– białka szoku termicznego
IAA	– kwas indolilo-3-octowy
IBA	– kwas indolilo-3-masłowy
IPA	– kwas indolilo-3-propionowy
IPP	– pirofosforan izopentenyłu
IPyA	– kwas indolilo-3-pirogronowy
Kin	– kinetyna
Mev	– mewinolin
MVA	– kwas mewalonowy
PAR	– promieniowanie fotosyntetyczne czynne
PCD	– programowana śmierć komórki
PCIB	– kwas <i>p</i> -chlorofenoksyizomasłowy
ROS	– reaktywne formy tlenu
s.m.	– sucha masa
SE	– błąd standardowy
SOD	– dysmutaza ponadtlenkowa
św.m.	– świeża masa
TE	– teasteron
TY	– tyfasterol

Wstęp

Życie w ekosystemach kształtują różnorodne czynniki środowiskowe o charakterze chemicznym, fizycznym i biologicznym. Modyfikują one procesy fizjologiczne i morfologiczne, zachodzące w organizmach roślinnych. W regulacji tych procesów mogą brać udział niemal wszystkie substancje pochodzenia endogennego i egzogenego. Wywierają one różnorodny wpływ na intensywność procesów metabolicznych, począwszy od stymulującego poprzez modyfikujący do inhibicyjnego. Efekt metaboliczny zależy przede wszystkim od budowy chemicznej związków, ich struktury przestrzennej, stężenia, powinowactwa do odpowiednich receptorów komórkowych, gatunku rośliny, jej stanu fizjologicznego, a także od warunków otaczającego środowiska (Davies 2004).

Hormony roślinne (fitohormony) są strukturalnie prostymi związkami organicznymi, wytwarzanymi w niewielkich ilościach w różnych częściach rośliny, wpływającymi na ich wzrost i rozwój. Przez wiele lat wyróżniano pięć odrębnych grup fitohormonów określanych jako hormony „klasyczne”, a mianowicie: auksyny, cytokininy, gibereliny, kwas abscysynowy i etylen. Obecnie do grupy hormonów roślinnych włączono również brassinosteroidy i jasmonidy. W ogólnym rozumieniu definicji hormonu roślinnego związki te występują powszechnie w roślinach i wykazują aktywność biologiczną w bardzo niskich stężeniach – rzędu 10^{-8} – 10^{-6} M, wykluczających ich funkcje odżywcze czy budulcowe. Charakterystyczną cechą fitohormonów jest ich działanie plejotropowe, które oznacza indukowanie odrębnych odpowiedzi fizjologicznych w różnych komórkach docelowych przez ten sam związek. Wiadomo również, że pojedynczy proces fizjologiczny może być regulowany przez różne hormony, co w dużym stopniu utrudnia analizowanie odpowiedzi biologicznej tego hormonu. Aktywność fitohormonów determinują także czynniki wewnętrzne, które obejmują procesy ich biosyntezy, koniugacji, degradacji, transportu oraz zewnętrzne czynniki środowiskowe, do których należy zaliczyć m.in. światło, temperaturę, działanie patogenów czy metali ciężkich (Lewak 1995, Gaspar i inni 1996, Kende i Zeevaart 1997, Bajguz 1999, Bajguz i Tretyn 2003a, Davies 2004).

Oprócz fitohormonów u roślin wyizolowano hormony zwierzęce oraz ich analogi chemiczne. Stwierdzono ich występowanie we wszystkich grupach taksonomicznych roślin – od glonów i grzybów do roślin naczyniowych. Dotychczas u wielu gatunków roślin wyodrębniono hormony pochodzenia zwierzęcego takie, jak: acetylocholina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina i histamina, związki steroidowe, zwłaszcza z grupy androgenów, estrogenów i kortykoidów oraz ekdysteroidy, prostaglandyny i ich związki pokrewne (Bajguz 2000c, Roshchina 2001, Bajguz i Dinan 2004, Davies 2004).

1 BRASSINOSTEROIDY

Brassinosteroidy (BR) stanowią grupę hormonów roślinnych. Ogółem do tej grupy fitohormonów należy 70 związków w postaci wolnej i związanej z cukrami i kwasami tłuszczowymi. W 1979 roku wyizolowano pierwszy brassinosteroid – brassinolid (BL) (Grove i inni 1979). Egzogenne BR wywołują efekty fizjologiczne zależne od użytego stężenia: niskie zazwyczaj indukują je, a wysokie hamują. W przeciwieństwie do innych roślinnych substancji wzrostowych stymulację procesów biologicznych przez BR uzyskuje się w stężeniach o kilka rzędów wielkości niższych, w granicach pikomoli, a nawet femtomoli. Równie niskie stężenie BR wykrywa się wewnątrz tkanek roślinnych (Sakurai i inni 1991, Sasse 1991a, Yokota 1997).

BR są kolejną grupą fitohormonów, dla których określono molekularną budowę ich receptorów (Li i Chory 1997, Schumacher i Chory 2000, Vert i inni 2005, Vert i Chory 2006, Li i Jin 2007). Białka BR11 i BAK1, pełniące funkcje receptora, budową przypominają zwierzęce receptorowe kinazy białkowe. Poza zewnątrzkomórkową domeną receptorową cytoplazmatyczny odcinek tego polipeptydu posiada aktywność kinazy serynowo/treoninowej (He i inni 2000, Friedrichsen i Chory 2001, Nomura i inni 2003, Kinoshita i inni 2005, Wang i Chory 2006). Od kilku lat trwają badania mające na celu określenie mechanizmów działania BR na różne procesy fizjologiczne, w tym współdziałanie z innymi fitohormonami, czy odpowiedzi BR na stresy środowiskowe (Bajguz 1999, Dhaubhadel i inni 1999, 2002, Krishna 2003, Bajguz i Tretyn 2003a, Nemhauser i inni 2004, Bajguz 2005, 2007).

1.1. Budowa chemiczna brassinosteroidów

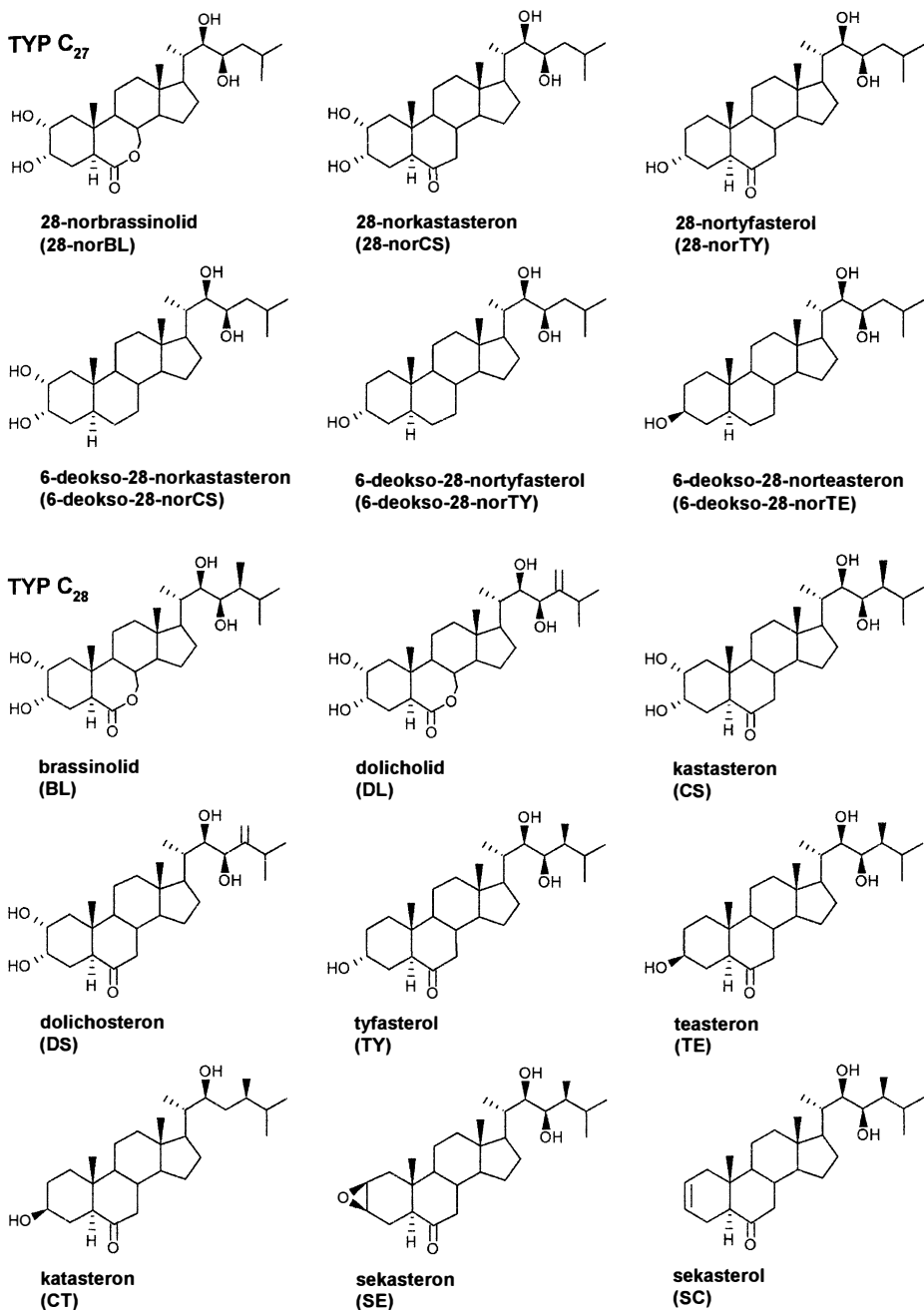
Strukturę chemiczną BR stanowi steroidowy szkielet 5α -cholestanu, charakteryzujący się 7-oksalaktonowym, 6-keetonowym lub nieutlenionym pierścieniem B. Ogółem grupa liczy 70 związków, wśród których pięć występuje jako koniugaty glukozydowe (posiadają w C-3 lub C-23 resztę glukozy) i acylowe (posiadają w C-3 resztę kwasów tłuszczowych: laurynowego lub mirystynowego). W pierścieniu A zazwyczaj występują dwie grupy hydroksylowe w pozycjach C-2 i C-3 oraz w łańcuchu bocznym w pozycjach C-22R i C-23R. Ponadto wyizolowano BR, które zamiast dwóch grup hydroksylowych w pierścieniu A posiadają jedną grupę w pozycji C-3 bądź grupę keetonową lub grupę epoksydową przy węglach C-2 i C-3 (np. sekasteron). Dotychczas wyizolowano dwa związki, które w pozycji C-1 posiadają dodatkową grupę hydroksylową w położeniu α lub β , to znaczy 3-epi-1 α -hydroksykasteron (3-epi-1 α -OH-CS) oraz 1 β -hydroksykasteron (1 β -OH-CS). Spotykane są również BR z podwójnym wiązaniem w pierścieniu A (np. sekasterol z $\Delta^{2,3}$, (22S,24S)-22-hydroksyergost-4-en-3-on z $\Delta^{4,5}$) lub pierścieniu B (np. (22S)-22-hydroksykampesterol z $\Delta^{5,6}$). Dwa ostatnie związki zalicza się do BR, choć wydaje się to kontrowersyjne z uwagi na budowę bardziej przypominającą sterole niż omawiane fitohormony (Bajguz i Tretyn 2003a, b, Bajguz 2005).

Przykłady wzorów strukturalnych BR, podzielonych według ogólnej ilości atomów węgla w cząsteczce oraz koniugatów, przedstawia rycina 1.1.

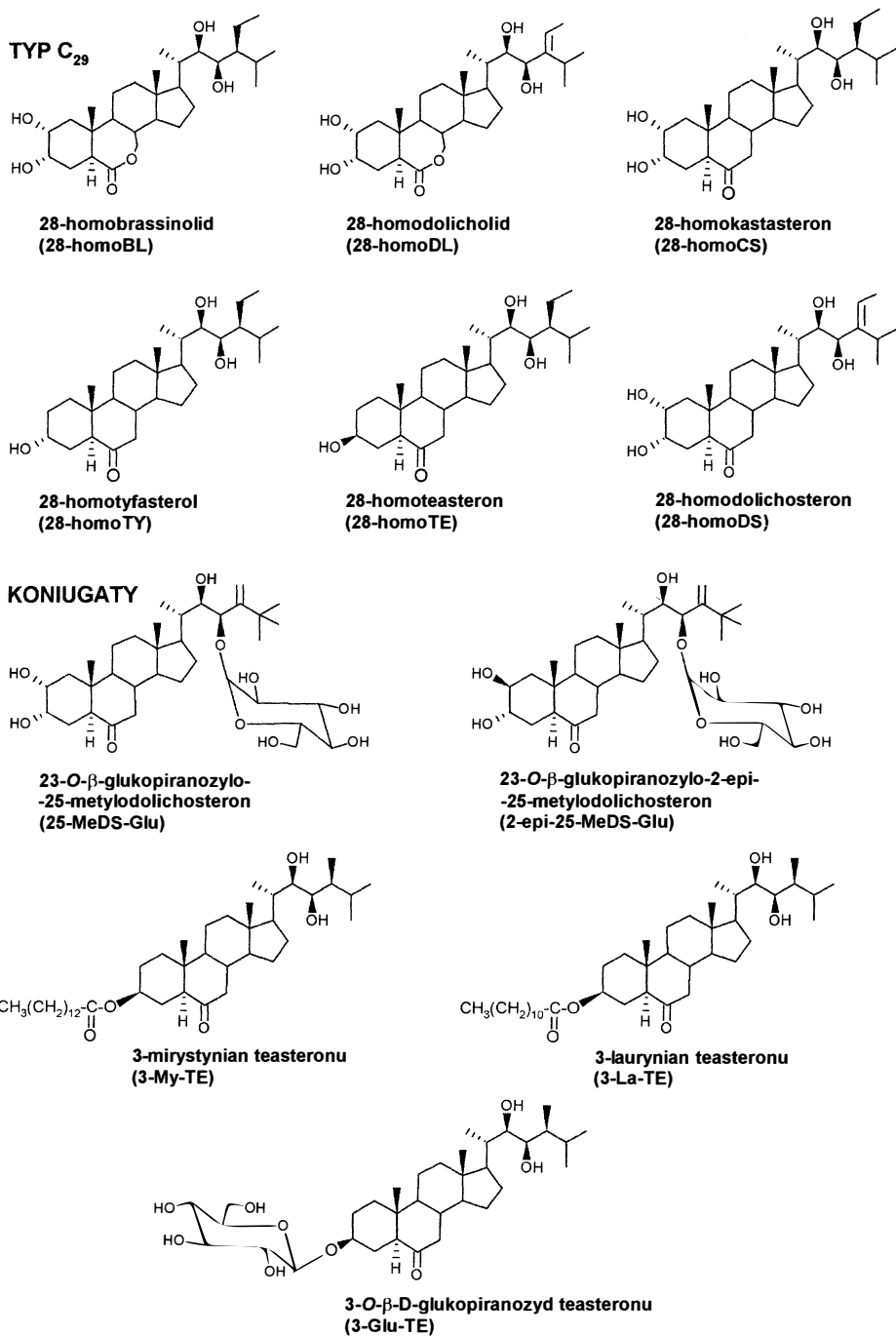
Pod względem struktury chemicznej pierścienia B można wyróżnić pięć zasadniczych typów BR. Pierwszy typ – 7-oksalakton – stanowi 12 związków, zawierających tlen w pierścieniu B, który z sąsiadującą grupą keetonową tworzy formę laktozową. Drugi typ – 6-okso – to 34 BR, zawierające przy atomie węgla C-6 okso grupę. Trzeci typ – 6-deokso – to 21 związków, posiadających pierścień B pozbawiony atomu tlenu. Czwarty typ – 6-hydroksy – reprezentuje jak dotąd jeden związek z grupą hydroksylową w położeniu C-6 α . Piąty typ – 5-en – to dwa BR, posiadające podwójne wiązanie $\Delta^{4,5}$ w pierścieniu A (Bajguz i Tretyn 2003a, b).

W zależności od budowy pierścieni A/B i przestrzennego położenia grup hydroksylowych, keetonowych czy epoksydowych w pierścieniu steroidowym wyróżniamy następujące typy BR:

- związki z 7-członowym 7-oksalaktonowym pierścieniem B oraz dwiema grupami hydroksylowymi w pierścieniu A w pozycjach C-2 i C-3;
- 6-oksozwiązki z 6-członowym pierścieniem B, posiadające dwie grupy hydroksylowe w pozycjach C-2 i C-3;



Ryc. 1.1. Wzory strukturalne wybranych brassinosteroidów (wg Bajguz i Tretyn 2003a, b, Bajguz 2005, zmodyfikowano)



Ryc. 1.1. Wzory strukturalne wybranych brassinosteroidów (wg Bajguz i Tretyn 2003a, b, Bajguz 2005, zmodyfikowano) – ciąg dalszy

- 6-oksozwiązki z grupą hydroksylową w konformacji C-3 (konfiguracja α lub β);
- 6-oksozwiązki z dodatkową grupą hydroksylową w C-1 (konfiguracja α lub β);
- 6-oksozwiązki z grupą epoksydową w konformacji C-2 β , C-3 β ;
- związki z 3-okso grupą w pierścieniu A, niekiedy z podwójnym wiązaniem w $\Delta^{4,5}$;
- związki z grupą hydroksylową w pozycji C-6 pierścienia B;
- związki charakteryzujące się brakiem wbudowanego bądź przyłączonego atomu tlenu w pierścieniu B (Bajguz i Tretyn 2003a, b, Bajguz 2005).

Szczegółowy podział BR w zależności od budowy pierścienia B i konformacji grup hydroksylowych oraz grupy ketonowej i epoksydowej przy węglach C-1, C-2, C-3 i C-6 w pierścieniu A, w tym skróty nazw BR, przedstawia tabela 1.1. Z kolei różnorodność budowy struktur chemicznych BR, występujących w pierścieniu A i B oraz w łańcuchu bocznym, przedstawia rycina 1.2.

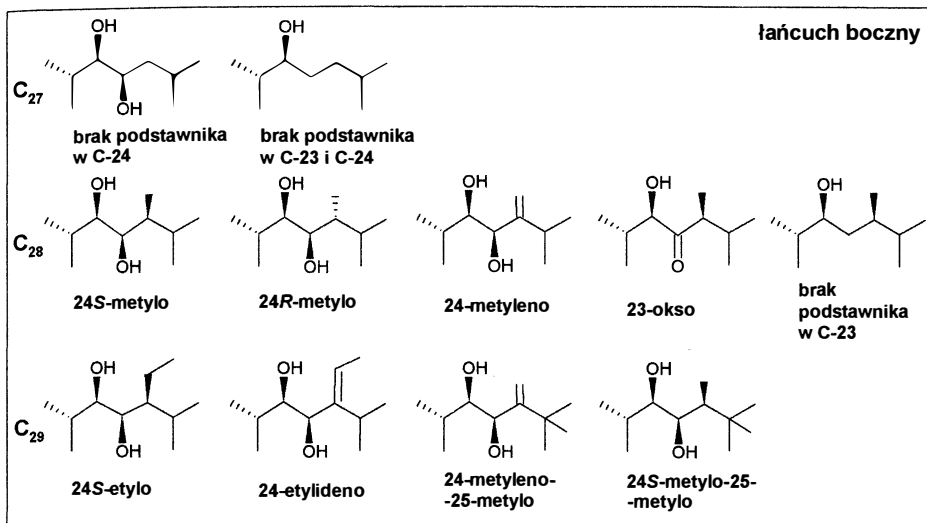
Tabela 1.1. Podział brassinosteroidów w zależności od budowy pierścienia B i konformacji grup hydroksylowych, grupy ketonowej i epoksydowej przy węglach C-1, C-2, C-3 i C-6 w pierścieniu A (wg Bajguz i Tretyn 2003a, b)

Typy brassinosteroidów					
Pozycja węgla	7-oksalakton	6-okso	6-deokso	6-hydroksy	5-en
C(2 α ,3 α) ^a	brassinolid (BL) 24-epiBL 28-norBL 28-homoBL dolicholid (DL) 28-homoDL 23-dehydroBL	kastasteron (CS) 24-epiCS 28-norCS 28-homoCS 25-MeCS) dolichosteron (DS) 28-homoDS 25-MeDS 23-O- β -D-glukopiranozylo-25-MeDS	6-deoksoCS 6-deokso-24-epiCS 6-deoksoDS 6-deokso-28-homoDS 6-deokso-25-MeDS		
C(2 α ,3 β) ^a	3-epiBL 3-epi-23-dehydroBL	3-epiCS 3,24-diepiCS	3-epi-6-deoksoCS		
C(2 β ,3 α) ^a	2-epi-23-dehydroBL	2-epiCS 2-epi-25-MeDS 23-O- β -D-glukopiranozylo-2-epi-25-MeDS			
C(2 β ,3 β) ^a	2,3-diepi-23-dehydroBL	2,3-diepiCS 2,3-diepi-25-MeDS			

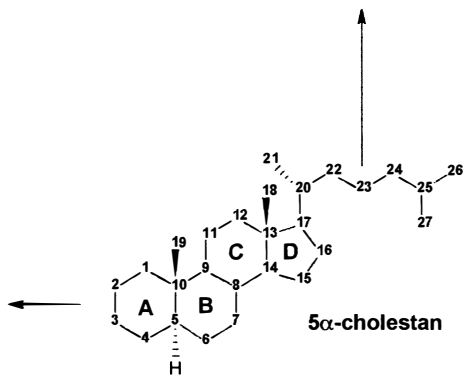
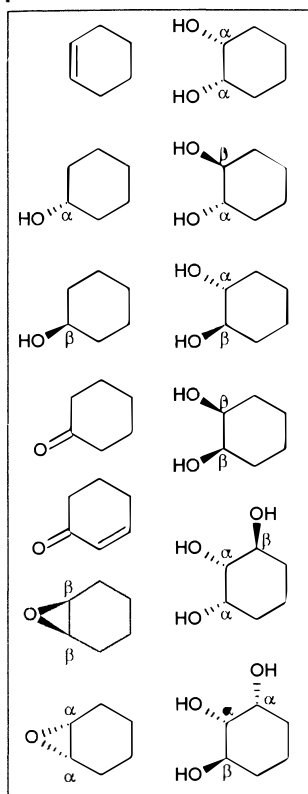
Tabela 1.1. ciąg dalszy

Typy brassinosteroidów					
Pozycja węgla	7-oksalakton	6-okso	6-deokso	6-hydroksy	5-en
C(3 α) ^a	2-deoksyBL	tyfasterol (TY) 28-homoTY 28-norTY 2-deoksy-25- -MeDS	6-deoksoTY 6-deokso-28- -norTY 6-deokso-28- -norTE 3-epi-6-deoksoCT 3-epi-6-deokso- -28-norCT		
C(3 β) ^a		teasteron (TE) 28-homoTE 3-mirystynian TE (3-My-TE) 3-laurylian TE (3-La-TE) 3-O- β -D-gluko- piranozyd TE (3-Glu-TE) 3-epi-2-deoksy- -25-MeDS katasteron (CT)	6-deoksoTE 6-deoksoCT 6-deokso-28- -norCT		22-OHCR 28-nor-22- -OHCR
C(1 α ,2 α ,3 β) ^a		3-epi-1 α -OH-CS			
C(1 β ,2 α ,3 α) ^a		1 β -OH-CS			
C(2 α ,3 α ,6 α) ^a				6 α -OH-CS	
C3 ^b		3-dehydroTE (3-DT)	3-dehydro-6-de- oksoTE 3-dehydro-6-de- okso-28-norTE 22-OH-3-on 28-nor-22-OH- -3-on		
C(2 β ,3 β) ^c		sekasteron (SE) 2,3-diepiSE 24-epiSE			
C3, $\Delta^{4,5}$			22-OH-4-en-3-on 28-nor-22-OH-4- -en-3-on		
$\Delta^{2,3}$		sekasterol			

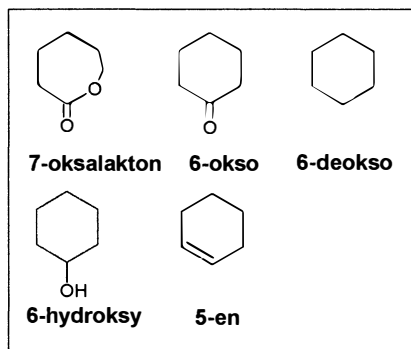
^a – grupa hydroksylowa, ^b – grupa ketonowa, ^c – grupa epoksydowa
 22-OHCR, (22S)-22-hydroksykampesterd; 28-nor-22-OHCR, 28-nor-(22S)-22-hydroksykampesterd; 22-OH-
 -3-on, (22S,24R)-22-hydroksy-5 α -ergostan-3-on; 28-nor-22-
 -3-on; 22-OH-4-en-3-on, (22S,24R)-22-hydroksyergost-4-en-3-on; 28-nor-22-OH-4-en-3-on, 28-nor-(22S)-22-
 -hydroksyergost-4-en-3-on



pierścień A



pierścień B



Ryc. 1.2. Różnorodne podstawniki w pierścieniach A i B oraz łańcucha bocznego naturalnie występujących brassinosteroidów (wg Bajguz i Tretyn 2003a, b)

Biorąc pod uwagę ilość grup hydroksylowych w steroidowym szkielecie, wyodrębniono następujące pochodne BR: a) pentahydroksylowe z grupami -OH przy C-1, C-2, C-3, C-22 i C-23; b) tetrahydroksylowe z grupami -OH przy C-2, C-3, C-22 i C-23; c) trihydroksylowe z grupami -OH przy C-3, C-22 i C-23 oraz d) dihydroksylowe z grupami -OH przy C-3 i C-22 lub C-22 i C-23 (Bajguz i Tretyn 2003a, b).

BR są oligohydroksysteroidami, posiadającymi przeważnie orientację przestrzenną typu *S* grupy metylowej lub etylowej przy węglu C-24 łańcucha bocznego. Do wyjątków należą m. in. 24-epiCS, 3,24-diepiCS i 24-epiBL z grupą metylową w położeniu *R*. Niemal wszystkie opisane dotąd BR charakteryzują się posiadaniem sąsiadujących ze sobą dwóch grup hydroksylowych w konfiguracji *R,R* w C-22 i C-23. Wyjątek stanowią BR, posiadające 23-okso grupę oraz pochodne katasteronu (CT) z jedną grupą hydroksylową w C-22. Na podstawie cholestanowego łańcucha bocznego, w którym występują różnorodne podstawniki wyróżnia się następujące kategorie BR: 23-okso, 24*S*-metylo, 24*R*-metylo, 24-metyleno, 24*S*-etylo, 24-etylideno, 24-metyleno-25-metylo, 24*S*-metylo-25-metylo oraz bez podstawników w pozycji C-23 i/lub C-24 (tabela 1.2) (Bajguz i Tretyn 2003a, b).

Tabela 1.2. Podział brassinosteroidów ze względu na zróżnicowanie podstawników łańcucha bocznego (wg Bajguz i Tretyn 2003a, b)

Kategoria	Przedstawiciele	Ogółem związków
23-okso	23-dehydroBL, 2-epi-23-dehydroBL, 3-epi-23-dehydroBL, 2,3-diepi-23-dehydroBL	4
24 <i>S</i> -metylo	BL, 3-epiBL, CS, 2-epiCS, 3-epiCS, 2,3-diepiCS, TY, TE, 3-La-TE, 3-My-TE, 6-deoksoCS, 3-epi-6-deoksoCS, 3-DT, SE, 2,3-diepiSE, 6-deoksoTY, 2-deoksyBL, 3-epi-1 α -OH-CS, 1 β -OH-CS, 6 α -OH-CS, 3-Glu-TE, 6-deoksoTE, 3-dehydro-6-deoksoTE, sekasterol	24
24 <i>R</i> -metylo	24-epiBL, 24-epiCS, 3,24-diepiCS, 6-deokso-24-epiCS, 24-epiSE	5
24-metyleno	DL, DS, 6-deoksoDS	3
24 <i>S</i> -etylo	28-homoBL, 28-homoCS, 28-homoTE, 28-homoTY	4
24-etylideno	28-homoDL, 28-homoDS, 6-deokso-28-homoDS	3
24-metyleno-25-metylo	25-MeDS, 2-epi-25-MeDS, 2,3-diepi-25-MeDS, 2-deoksy-25-MeDS, 3-epi-2-deoksy-25-MeDS, 6-deokso-25-MeDS, 25-MeDS-Glu, 2-epi-25-MeDS-Glu	8
24 <i>S</i> -metylo-25-metylo	25-MeCS	1
brak podstawnika w C-23	CT, 6-deoksoCT, 3-epi-6-deoksoCT, 22-OH-4-en-3-on, 22-OH-3-on, 22-OHCR	6
brak podstawnika w C-24	28-norBL, 28-norCS, 28-norTY, 6-deokso-28-norCS, 6-deokso-28-norTY, 6-deokso-28-norTE, 3-dehydro-6-deokso-28-norTE	7
brak podstawnika w C-23 i C-24	6-deokso-28-norCT, 28-nor-22-OHCR, 28-nor-22-OH-4-en-3-on, 28-nor-22-OH-3-on, 3-epi-6-deokso-28-norCT	5

1.2. Występowanie brassinosteroidów

Ekstrakcja i oczyszczanie BR z materiału roślinnego polega na rozdziale i odparowywaniu do sucha odpowiednich frakcji rozpuszczalników oraz zastosowaniu technik chromatograficznych. BR mogą być ekstrahowane przy użyciu metanolu lub mieszaniny metanol/octan etylu bądź metanol/chloroform. Związki, występujące we frakcji metanolu, są oczyszczane dzięki użyciu chromatografii kolumnowej. W celu rozdzielenia składników ekstraktu stosuje się wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC, *ang.* high performance liquid chromatography) z kolumnami z „odwróconą fazą”. Bardzo często do jakościowego i ilościowego oznaczania BR wykorzystuje się chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC/MS, *ang.* gas chromatography/mass spectrometry). Oprócz tego stosuje się metodę GC-SIM-MS (SIM, *ang.* selected-ion-monitoring) z użyciem standardów znakowanych stabilnymi izotopami, spektroskopię NMR (*ang.* nuclear magnetic resonance) oraz testy immunologiczne (test radioimmunologiczny – RIA i enzymatyczny – ELISA). Aktywność poszczególnych frakcji jest monitorowana za pomocą testów biologicznych. Ze względu na niską zawartość BR w materiale roślinnym testy muszą charakteryzować się wysoką czułością i specyficznością. Najczęściej wykorzystuje się test wydłużenia drugiego międzywęzła fasoli oraz test wygięcia blaszki liściowej ryżu (test ryżowy). W pierwszym teście BR wywołują charakterystyczne objawy wydłużenia i podziału komórek, które wynikają ze wzrostu, spęcznienia i rozerwania drugiego międzywęzła fasoli. W drugim teście obserwuje się stopień wygięcia blaszki liściowej ryżu przez BR. Czułość obu testów wynosi 0,1 pmola l⁻¹ (Takatsuto 1994, Gamoh i Takatsuto 1994, Bajguz i Tretyn 2003a).

BR wyizolowano dotychczas z 60 gatunków roślin, w tym 51 gatunków roślin okrytonasiennych (12 jednoliściennych i 39 dwuliściennych), sześciu gatunków roślin nagonasiennych, po jednym z glonu, paprotnika i mszarka. Przykłady występowania BR w roślinach przedstawia tabela 1.3 (Bajguz i Tretyn 2003a, b).

BR występują w nadziemnych częściach roślin takich, jak: pędy, liście, pyłek kwiatowy, pylniki i nasiona. Najwyższe stężenie BR, tj. 6-deoksoTY, stwierdzono w pyłku kwiatowym cyprysu arizońskiego (*Cupressus arizonica*), który zawierał 6,4 mg/kg. Zasobne w BR okazały się również galasy (wyrosła wywołane nakłuciem tkanek pędów lub liści przez owady) kasztana japońskiego (*Castanea crenata*) czy *Distylium racemosum*. Stwierdzono, że poziom BR w galasach był 20–300 razy wyższy niż w normalnych, zdrowych tkankach. Stężenie BR w tkankach wegetatywnych jest bardzo niskie, prze-

ciężnie wynosi od kilku nanogramów do mikrogramów na kilogram materiału roślinnego. Ponadto tkanki młodych roślin wykazują wyższe stężenie BR niż tkanki dojrzałe. Pyłek kwiatowy oraz niedojrzałe nasiona zawierają najwyższe stężenia BR, przeciętnie 1–100 µg/kg świeżej masy (św.m.). Przykładem są pyłki kwiatowe rzepaku (*Brassica napus*), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus*) czy bobu (*Vicia faba*), zawierające ponad 100 µg BL/kg św.m. Z kolei z pyłku kwiatowego cyprysu arizońskiego (*Cupressus arizonica*) wyizolowano 1000 µg CS/kg św.m. W liściach i pędach roślin stężenie BR wynosi przeciętnie 0,01–0,1 µg/kg św.m. (Bajguz i Tretyn 2003a, b).

Z korzeni kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*) (Kim i inni 2000), pomidora (*Lycopersicon esculentum*) (Yokota i inni 2001) i rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) (Konstantinova i inni 2001) wyizolowano tylko sześć BR, spośród których trzy (6-deokso-28-norCT, 6-deokso-28-norTY i 3-epiBL) po raz pierwszy. Z kolei w kambium sosny zwyczajnej (*Pinus silvestris*) stwierdzono obecność BL i CS, zaś w kalusie korzeniowym *Arabidopsis thaliana* – BL i 3-epiBL.

Spośród naturalnie występujących BR najbardziej rozpowszechnionym związkiem jest CS, który wyizolowano z 51 gatunków roślin, z kolei BL z 35, TY z 25, 6-deoksoCS i TE z 19, 28-norCS z 12. Natomiast od 2 do 10 BR występuje u nielicznych roślin. Przykładowo 24-epiCS wykryto u ośmiu, DS i 3-DT u siedmiu, 6-deoksoTY u pięciu, 28-homoCS i 24-epiBL u czterech, DL, 6-deoksoTE, 6-deoksoDS i 28-norBL u trzech, 28-homoTE i 2-deoksyBL u dwóch gatunków roślin. Najwięcej, bo aż 25 BR (23 w postaci wolnej i dwa w formie koniugatów glukozydowych), stwierdzono w niedojrzałych nasionach fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris*) (tabela 1.3). Stosunkowo szerokie spektrum różnego typu BR wykryto w karłowatym mutancie barwinka różyczkowego (*Catharanthus roseus*) (19 związków), *Arabidopsis thaliana* (18 związków), pylnikach i pyłku kwiatowym cedru japońskiego (*Cryptomeria japonica*) (9 związków), pyłku kwiatowym cyprysu arizońskiego (9 związków) (tabela 1.3). Z kolei w tkankach wspięgi pospolitej (*Dolichos lablab*), ryżu siewnego (*Oryza sativa*), żyta zwyczajnego (*Secale cereale*) oraz herbaty chińskiej (*Thea sinensis*) zidentyfikowano 8, w liliu długokwiatowej (*Lilium longiflorum*) – 7, zaś w porostnicy wielokształtnej (*Marchantia polymorpha*), *Distylium racemosum* – 6 różnych BR (tabela 1.3) (Bajguz i Tretyn 2003a, b, Bajguz 2005).

Tabela 1.3. Przykłady występowania brassinosteroidów u roślin (wg Bajguz i Tretyn 2003b)

Rodzina	Gatunek	Organ / część rośliny	Brassinosteroid
Rośliny niższe			
Hydrodikiwowe (<i>Hydrodictyaceae</i>) - glony	Płócnia sieciowata (<i>Hydrodictyon reticulatum</i>)	komórki glonów	28-homoCS; 24-epiCS
Porostnicowate (<i>Marchantiaceae</i>)	Porostnica wielokształtna (<i>Marchantia polymorpha</i>)	kultury komórek	BL; 28-norBL; CS; TE; 3-DT; TY
Skrzypowe (<i>Equisetaceae</i>)	Skrzyp polny (<i>Equisetum arvense</i>)	cała roślina	28-norBL DS; 28-norCS; CS
Rośliny nagonasienne			
Cyprowsowate (<i>Cupressaceae</i>)	Cyprys arizoński (<i>Cupressus arizonica</i>)	pyłek kwiatowy	BL; 6-deoksoTY; 3-dehydro-6-deoksoTE; 6-deoksoCS; CS; TY; TE; 3-DT; 28-homoCS
Sosnowate (<i>Pinaceae</i>)	Sosna zwyczajna (<i>Pinus silvestris</i>)	kambium	BL; CS
Rośliny okrytonasienne			
Astrowate (<i>Asteraceae</i>)	Słonecznik zwyczajny (<i>Helianthus annuus</i>)	pyłek kwiatowy	BL; 28-norCS; CS
Bukowate (<i>Fagaceae</i>)	Kasztan japoński (<i>Castanea crenata</i>)	galasy	BL; CS; 6-deoksoCS
		pędy, liście, pączki kwiatowe	CS; 6-deoksoCS
Brzozowate (<i>Betulaceae</i>)	Olsza czarna (<i>Alnus glutinosa</i>)	pyłek kwiatowy	BL; CS
Baldaszkowate (<i>Apiaceae</i>)	Selery zwyczajne (<i>Apium graveolens</i>)	nasiona	2-deoksyBL
	Marchew siewna (<i>Daucus carota</i>)	nasiona	BL; CS; 24-epiCS
Herbatowate (<i>Theaceae</i>)	Herbata chińska (<i>Thea sinensis</i>)	liście	CS; TY; TE; BL; 28-norCS; 28-homoCS
		nasiona	28-norCS; 6-deokso-28-norCS; 6-deokso-28-norTY; 6-deokso-28-norTE; 6-deokso-28-norCT; 3-dehydro-6-deokso-28-norTE
Komosowate (<i>Chenophyllaceae</i>)	Burak zwyczajny (<i>Beta vulgaris</i>)	nasiona	CS; 24-epiCS
Krzyszowe (<i>Brassicaceae</i>)	Rzepak (<i>Brassica napus</i>)	pyłek kwiatowy	BL
	Rzodkiewnik pospolity (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	pędy – ekotyp Kolumbia (typ dziki)	6-deoksoCT; 6-deoksoTY; CS; 6-deoksoCS; 3-dehydro-6-deoksoTE; TY; 6-deoksoTE; BL; TE; 28-norCS; 28-norTY
		nasiona – ekotyp Kolumbia (typ dziki)	6-deoksoCS; TY; BL; 6-deoksoTY; 6-deoksoTE; CS; 24-epiBL
		nasiona (ekotyp 24)	CS; 24-epiBL

Tabela 1.3. ciąg dalszy

Rodzina	Gatunek	Organ / część rośliny	Brassinosteroid
Krzyżowe (<i>Brassicaceae</i>)	Rzodkiewnik pospolity (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	kalus korzeniowy	BL; 3-epiBL
		sażonki	6-deoksoCT; 3-epi-6-deoksoCT; 6-deokso-28-norCT; 3-epi-6- -deokso-28-norCT; 22-OH-4-en- -3-on; 28-nor-22-OH-4-en-3-on; 22-OH-3-on; 28-nor-22-OH-3-on; 28-nor-22-OHCR
Mirtowate (<i>Myrtaceae</i>)	<i>Eucalyptus calophylla</i>	pyłek kwiatowy	BL
	<i>Eucalyptus marginata</i>	pyłek kwiatowy	DS
Rośliny okrytonasienne			
Motylkowate (<i>Fabaceae</i>)	Bób (<i>Vicia faba</i>)	pyłek kwiatowy	BL; CS; 28-norCS; DS
	Fasola zwykła (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	nasiona	BL; CS; 2-epiCS; 3-epiCS; 2,3-die- piCS; 3,24-diepiCS; TY; TE; 6- -deoksoCS; 3-epi-6-deoksoCS; 1β-OH-CS; 3-epi-1α-OH-CS; DL; DS; 6-deoksoDS; 6-deokso-28- -homoDS; 25-MeDS; 2-epi-25- -MeDS; 2,3-diepi-25-MeDS; 2-deoksy-25-MeDS; 2-epi-2-de- oksy-25-MeDS; 3-epi-2-deoksy- -25-MeDS; 6-de-okso-25-MeDS; 25-MeDS-Glu; 2-epi-25-MeDS- -Glu
	Groch zwyčajny (<i>Pisum sativum</i>)	nasiona	BL; 2-deoksyBL; TY; CS; 6-deoksoCS
	Sera de la pastewna (<i>Ornithopus sativus</i>)	nasiona	CS; 24-epiCS
Psiankowate (<i>Solanaceae</i>)	Pomidor (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	pędy	CS; 28-norCS; 6-deoksoCS
Rdestowate (<i>Polygonaceae</i>)	Gryka zwyčajna (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	pyłek kwiatowy	BL; CS
Trawy (<i>Gramineae</i>)	Kukurydza zwyčajna (<i>Zea mays</i>)	pyłek kwiatowy	CS; 28-norCS; DS
	Pszenica zwyčajna (<i>Triticum aestivum</i>)	źdźbła	CS; TY; TE; 6-deoksoCS; 3-DT
	Żyto zwyčajne (<i>Secale cereale</i>)	nasiona	CS; TY; TE; 6-deoksoCS; 28-norCS; SE

1.3. Biosynteza brassinosteroidów

BR wykazują dużą różnorodność w budowie chemicznej, począwszy od liczby atomów węgla po obecność różnych podstawników (grupy metylenowej, metylowej, etylenowej, etylowej) w pozycji węgla C-24 łańcucha bocznego, brak lub występowanie w C-25 dodatkowej grupy metylowej (tabela 1.2). Wymienione podstawniki występują również w strukturze steroli roślinnych, co oznacza, że BR są pochodnymi odpowiednich steroli posiadających taki sam łańcuch boczny. W związku z tym uważa się, że BR typu C_{27} (ryc. 1.1) z brakującym podstawnikiem w C-24 są pochodnymi cholesterolu. Natomiast BR typu C_{28} (ryc. 1.1), w których występuje grupa α -metylowa, β -metylowa lub metylenowa są odpowiednio pochodnymi: kampesterolu, 24-epikampesterolu i 24-metylenocholesterolu. Z kolei BR typu C_{29} (ryc. 1.1), posiadające grupę α -etylową w C-24, pochodzą od sitosterolu. Oprócz tego BR typu C_{29} z grupą metylenową w C-24 i dodatkową metylową w C-25 mogą być syntezowane z 24-metyleno-25-metylocholesterolu. Stwierdzono, że ten sam gatunek rośliny może wykorzystywać kilka steroli jako prekursorów w biosyntezie BR (Yokota 1997, Bajguz i Tretyn 2003a, Fujioka i Yokota 2003).

Do badań nad biosyntezą BR wykorzystano następujące gatunki roślin: barwinka różyczkowego (*Catharanthus roseus*), tytoń (*Nicotiana tabacum*), ryż siewny (*Oryza sativa*) i lilię długokwiatową (*Lilium longiflorum*) (Yokota i inni 1990, Fujioka i inni 1995a, b, Suzuki i inni 1995a). Jednak największy postęp w badaniach uzyskano stosując etiolowane siewki karłowatych mutantów *Arabidopsis thaliana*, grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*) i pomidora (*Lycopersicon esculentum*), charakteryzujące się deficytem BR. Mutanty wykorzystano do analizy poszczególnych etapów biosyntezy steroli i BR. Karłowate mutanty *dwf Arabidopsis thaliana* charakteryzują się silnie skróconym wzrostem, krótkimi ciemnozielonymi okrągłymi i skrzyżnymi liśćmi, zredukowaną płodnością lub sterylnością. Ponadto większość karłowatych mutantów wykazuje przedłużony okres rozwoju. Karłowate mutanty *Arabidopsis thaliana* rosnące na świetle można podzielić na standardowe (*dwf1*, *dwf4-dwf8*) i małe (*dwf2*, *dwf3*) (Feldmann i inni 1989, Kauschmann i inni 1996, Szekeres i inni 1996, Fujioka i inni 1997, Azpiroz i inni 1998, Choe i inni 1998, Klahre i inni 1998, Bishop i inni 1999, Koka i inni 2000, Noguchi i inni 2000, Catterou i inni 2001a, b).

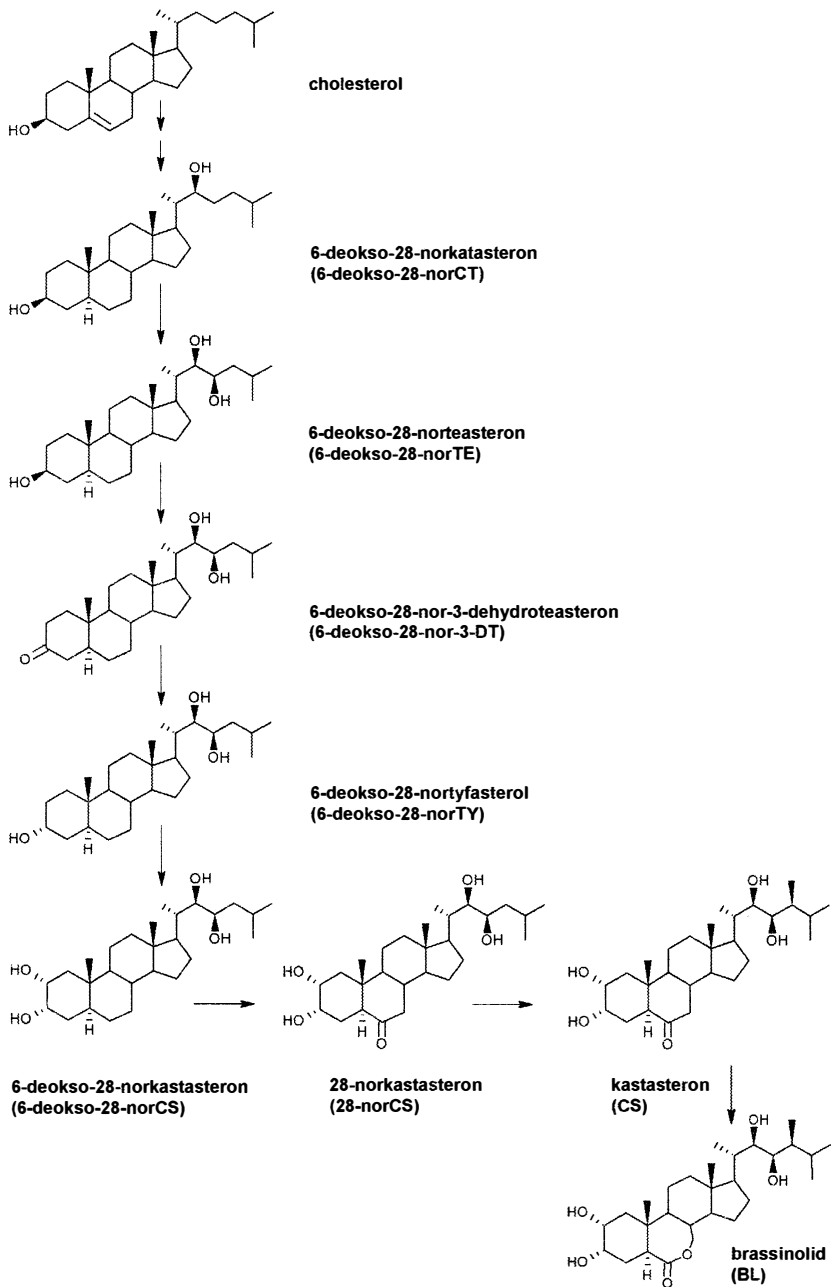
BL i pokrewne biosyntetycznie C_{28} -związki są najczęściej spotykanymi BR u roślin. Z kolei BR typu C_{27} i C_{29} wykazują ograniczone występowanie. Zazwyczaj izolowano je razem z C_{28} -BR, pochodzącymi z kampesterolu.

Sugeruje to, że enzymy biosyntezy BR bardziej preferują C_{28} -steroidy jako substraty. Szlak biosyntezy BR typu C_{27} nie został w pełni poznany. Jak dotąd brak jest informacji odnośnie biosyntezy BR typu C_{29} (Bajguz i Tretyn 2003a, Choe 2006).

Biosynteza steroli roślinnych zachodzi dwoma szlakami: niemewalonowym (u roślin niższych, np. w glonie *Chlorella vulgaris*) (Lichtenthaler 2000, Schwender i inni 2001, Bajguz i Asami 2004) i mewalonowym (u większości roślin wyższych, np. w *Arabidopsis thaliana*) (Bajguz i Tretyn 2003a, Bajguz 2005, Choe 2006). W szlaku niemewalonowym związkami wyjściowymi są pirogronian i aldehyd 3-fosfoglicerynowy, przekształcające się w 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforan, który poprzez szereg reakcji daje pirofosforan izopentenyłu. Kwas mewalonowy, przekształcając się w pirofosforan izopentenyłu, a następnie w skwalen, ulega przemianie do cykloartenolu. Cholesterol, związek wyjściowy w biosyntezie BR typu C_{27} , powstaje w wyniku uwodornienia desmosterolu, który pochodzi z cykloartenolu. W wyniku metylacji podwójnego wiązania, $\Delta^{24(25)}$, w łańcuchu bocznym cykloartenolu tworzy się cykloaudenol, cyklosadol i 24-metylenocykloartanol, który w wyniku kolejnej metylacji tworzy 24-metylenocholesterol oraz izofukosterol. Epimeryzacja 24-metylenocholesterolu do 24-metylodesmosterolu i jego uwodornienie powoduje przekształcenie się w kampesterol – związek wyjściowy w biosyntezie BR typu C_{28} .

1.3.1. Biosynteza brassinosteroidów typu C_{27}

Prekursorem w biosyntezie BR typu C_{27} (ryc. 1.3) jest cholesterol, a związkiem końcowym 28-norCS. Cholesterol podlega przemianie poprzez cholest-4-en-3-on i cholestanol do 6-oksocholestanolu. Produktami pośrednimi w biosyntezie 28-norCS są 6-deokso-28-norCT, 6-deokso-28-norTE, 6-deokso-28-nor-3-DT i 6-deokso-28-norTY. Współwystępowanie 28-norTY i 28-norCS w siewkach *Arabidopsis thaliana* sugeruje, że 28-norCS może być biosyntezowany z 28-norTY, którego prekursorem prawdopodobnie jest TY poprzez szlak wczesnego C6 utleniania w biosyntezie BR typu C_{28} ; ponadto 6-deokso-28-norCT i jego 3-epimer, jak również trzy 22-hydroksylowe BR, należące do typu C_{27} : (22S)-22-hydroksycholesterol, (22S)-22-hydroksycholest-4-en-3-on i (22S)-22-hydroksy-5 α -cholestan-3-on, które zostały wyizolowane z kultur komórkowych barwnika różyczkowego i siewek *Arabidopsis thaliana*. Wskazuje to, że biosynteza BR typu C_{27} podobnie do typu C_{28} , przebiega przez szlak wczesnego C22 utleniania. W korzeniach i pędach pomidora oraz kukurydzy stwierdzono występowanie 28-norCS. Biosynteza BR typu C_{27} w korzeniach sugeruje, że związki te są niezbędne nie tylko do



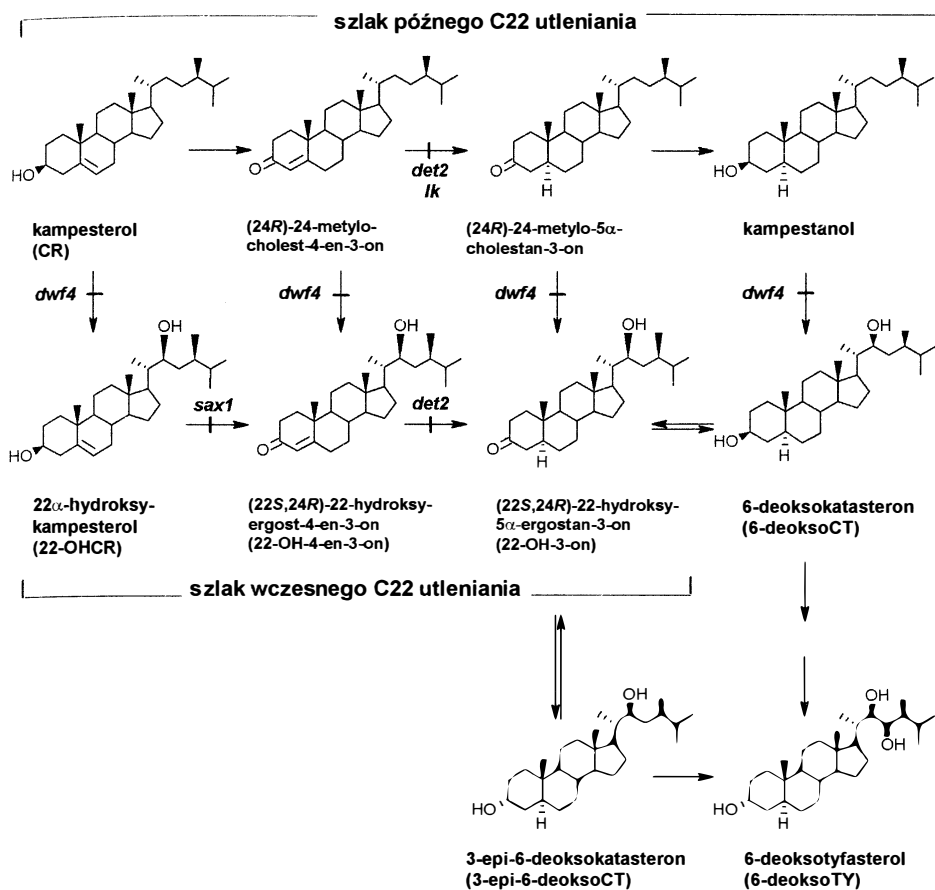
Ryc. 1.3. Biosynteza brassinosteroidów typu C_{27} (wg Bajguz i Tretyn 2003a, Kim i inni 2005, zmodyfikowano)

wzrostu pędów, ale również korzeni. Jednocześnie wysoki poziom 28-norCS w pędach i jego brak w korzeniach dowodzi, że wrażliwość korzeni (tak jak w przypadku auksyny) na ten związek jest znacznie mniejsze niż pędów pomidora. Wykazano również możliwość przemiany CS do 28-norCS (Kim i inni 2005, 2006, Choe 2006).

1.3.2. Biosynteza brassinosteroidów typu C₂₈

Bezpośrednim prekursorem w biosyntezie BR typu C₂₈ jest kampesterol, który poprzez uwodornienie przekształcany jest w kampestanol (ryc. 1.4). Reakcja ta przebiega analogicznie do metabolizmu androgenów u ssaków, a jej produktami pośrednimi są również (24R)-24-metylencholest-4-en-3-on i (24R)-24-metylo-cholestan-3-on. Wspomniany ciąg reakcji, zwany szlakiem późnego C22 utleniania, jest blokowany w karłowatym mutancie *det2 Arabidopsis thaliana*, wykazującym deficyt BR (Noguchi i inni 1999). Endogenny poziom substratu, (24R)-24-metylencholest-4-en-3-onu, 3-krotnie wzrasta w mutancie *det2*, podczas gdy zawartość BR spada poniżej 10% w stosunku do poziomu roślin typu dzikiego (ekotyp Kolumbia). Ponadto endogenny poziom kampestanolu w pędach mutantów *det2* wynosi 8–15% w porównaniu do roślin typu dzikiego. Podobną blokadę przemiany kampesterolu w kampestanol wykazuje mutant *lk* grochu (Yokota i inni 1997). Endogenny poziom CS, 6-deoksoCS i 6-deoksoTY w tkankach mutantu *lk* zmniejszył się o około 25% w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Przemiana kampesterolu (CR) w 22 α -hydroksykampesterol (22-OHCR) prawdopodobnie może być blokowana w mutancie *dwf4 Arabidopsis thaliana*. Z kolei mutacja *sax1* zmienia reakcje utleniania i izomeryzacji 22 α -hydroksykampesterolu (22-OHCR), będącego prekursorem 3-okso, Δ^4 -steroidu, który w komórkach mutantu *det2* może przekształcać się w 6-deoksoCT. Ciąg reakcji: 20-OHCR \rightarrow 22-OH-4-en-3-on \rightarrow 22-OH-3-on \rightarrow 6-deoksoCT nazwano szlakiem wczesnego C22 utleniania (ryc. 1.4) (Bajguz i Tretyn 2003a, Bajguz 2005, Choe 2006).

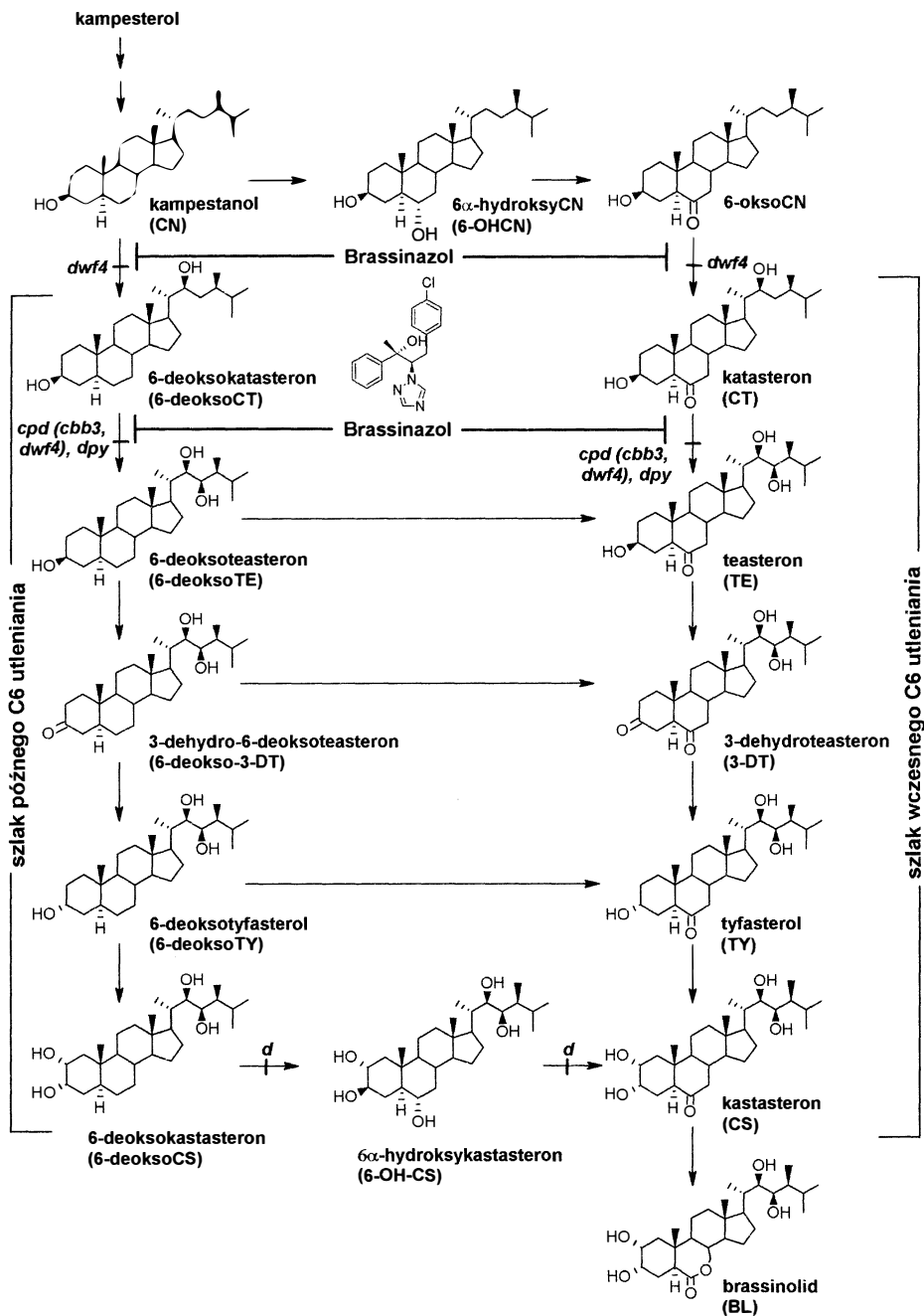
Biosynteza BL rozpoczyna się od konwersji kampestanolu w wielostopniowym ciągu reakcji, tzw. wczesnego lub późnego szlaku C₆ utleniania (ryc. 1.5). Proces ten zależy od tego, czy BR posiadają grupę ketonową w pozycji C-6 lub stanowią formę 6-deoksozwiązków. W obu przypadkach dochodzi do powstania CS, związku będącego bezpośrednim prekursorem BL. Typ późnego C₆ utleniania jest bardziej rozpowszechniony u roślin, np. występuje w *Arabidopsis thaliana* i grochu zwyczajnym, podczas gdy u pomidora jest jedynym szlakiem biosyntezy BR (Fujioka i inni 1995a, b, 2000a, b, 2002, Bajguz i Tretyn 2003a, Fujioka i Yokota 2003, Bajguz 2005, Choe 2006).



Ryc. 1.4. Biosynteza kampesterolu do kampestanolu (wg Bajguz i Tretyn 2003a)

Objaśnienia skrótów: *det2*, *dwf4*, *sax1* – mutanty *Arabidopsis thaliana*,
lk – mutant grochu zwyczajnego – wykazujące deficyt brassinosteroidów

W szlaku wczesnego C6 utleniania kampestanol (CN) jest hydrolizowany w pozycji C-6 do 6 α -hydroksykampestanolu (6-OH-CN) (ryc. 1.5). Następnie powstały związek ulega utlenianiu do 6-oksokampestanolu (6-oksoCN), który po hydroksylacji w pozycji C-22 daje pierwszy BR; katasteron (CT) – (6-deokso-22 α -hydroksyCN). CT ulega hydroksylacji, zachodzącej przy C-23, tworząc TE, który w wyniku utleniania katalizowanego przez dehydrogenazę TE jest przekształcany w 3-DT. Z kolei redukcja w pozycji C-3 z udziałem reduktazy 3-DT powoduje powstanie TY. Następnie TY w wyniku hydroksylacji w pozycji C-2 ulega przemianie do CS (Fujioka i inni 1995a, b, 2000a, b, 2002, Bajguz i Tretyn 2003a, Fujioka i Yokota 2003, Bajguz 2005, Choe 2006).



Ryc. 1.5. Biosynteza brassinosteroidów typu C₂₈ (wg Bajguz i Tretyn 2003a, zmodyfikowano)

Objaśnienia skrótów: *cpd*, *dpy*, *dwf4* – mutant *Arabidopsis thaliana*, *d* – mutanty pomidora – wykazujące deficyt brassinosteroidów

6-DeoksoCT może powstawać dwiema drogami. Pierwsza to bezpośrednie przekształcenie się z kampestanolu (CN) (ryc. 1.5). Druga to 22 α -hydroksylacja kampesterolu do 22 α -hydroksykampesterolu, który ulega utlenianiu i izomeryzacji 3 β -hydroksy, Δ^5 do 3-okso, Δ^4 -steroidu poprzez szlak wczesnego C22 utleniania. Po przekształceniu się 6-deoksoCT w 6-deokso-TE zachodzi proces 3-epimeryzacji do 3-dehydro-6-deoksoTE, który przechodzi w 6-deoksoTY. Reakcje te wykazują podobieństwo do przemian TE w szlaku wczesnego C6 utleniania. 6-DeoksoTY może również powstać w wyniku przemiany 22-OH-3-onu w 3-epi-6-deoksoCT. Następnie 6-deoksoTY jest przekształcany w 6-deoksoCS, który poprzez utlenianie w C-6 daje CS. W przemianie tej prawdopodobnie pośrednio zachodzi proces hydroksylacji, w wyniku którego tworzy się 6 α -OH-CS. Przekształcenie CS w BL odbywa się poprzez reakcję typu Baeyer-Villigera – wstawienie atomu tlenu w pierścień B pomiędzy atomy węgla C-6 i C-7. Konwersja ta obserwowana jest tylko w kulturach komórkowych i sadzonkach barwinka różyczkowego, sadzonkach tytoniu, ryżu siewnego i *Arabidopsis thaliana*. BL jest najbardziej aktywnym biologicznie związkami spośród naturalnie występujących BR (Fujioka i inni 1995a, b, 2000a, b, 2002, Kim i inni 2005, Choe 2006).

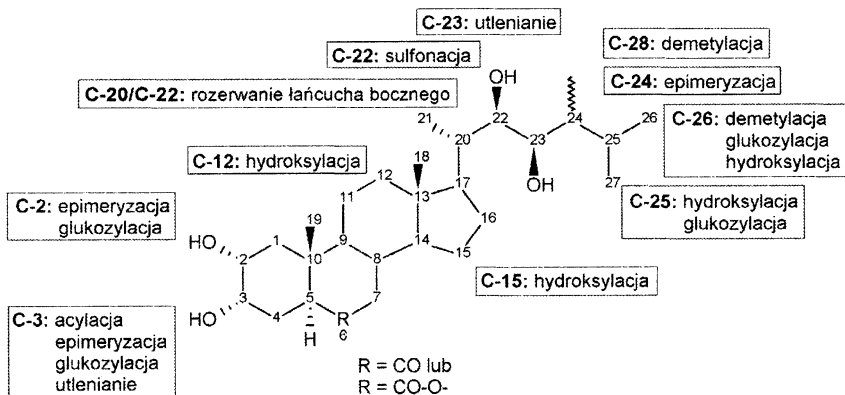
Specyficznymi inhibitorami dla biosyntezy BR jest syntetyczny analog chemiczny paklobutrazolu, 4-(4-chlorofenilo)-2-fenilo-3-(1,2,4-triazoilo)butan-2-ol, brassinazol oraz jego diastereomeryczna mieszanina – Brz2001 (Asami i Yoshida 1999, Asami i inni 2000). Brassinazol posiada dwa enancjomery, z których jeden wykazuje kilkakrotnie większą aktywność od drugiego. Związki te blokują proces utleniania BR w pozycji C-22 w szlaku wczesnego (6-oksoCN w CT i CT w TE) oraz późnego (CN w 6-deoksoCT i 6-deoksoCT w 6-deoksoTE) C6 utleniania (ryc. 1.5).

1.4. Metabolizm i transport brassinosteroidów u roślin

Obecnie znanych jest około 50 pochodnych BR (tabela 1.4), powstałych w wyniku różnorodnych przemian metabolicznych:

- acylacji – przyłączenia reszty kwasów tłuszczowych w pozycji C-3;
- demetylacji w pozycji C-24 i C-26;
- epimeryzacji – zmiany konformacji atomu węgla, niosącego grupę hydroksylową w pozycji C-2, C-3 i C-24;
- glikozylacji – przyłączenia reszty cukrowej w pozycji C-2, C-3, C-23, C-25 i C-26;

- hydroksylacji w pozycji C-12, C-15, C-20, C-25 i C-26;
- rozerwania łańcucha bocznego w pozycji C-20/C-22;
- sulfonacji w pozycji C-22;
- utleniania w pozycji C-3 i C-23 (ryc. 1.6) (Bajguz 2005, 2007).



Ryc. 1.6. Miejsca w cząsteczce brassinosteroidu, które podlegają procesom metabolicznym (wg Bajguz 2005, 2007)

Egzogennie podane BR przemieszczają się w roślinie przez tzw. transport polarny. Zachodzi on w sposób ukierunkowany bazypetalnie – od wierzchołków rośliny do jej podstawy. Transport ten jest niezależny od przemieszczania się BR w naczyniach, wymaga nakładu energetycznego oraz obecności białek nośnikowych w błonie komórkowej. Ponadto transport BR może być regulowany przez wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia (Yokota i inni 1992). Okazało się również, że potraktowanie korzeni egzogennymi BR powoduje ich przemieszczanie się akropetalnie (dowierzchołkowo) w kierunku liści. BR mogą być transportowane w postaci niezmienionej lub podlegają wewnątrz tkanek przemianom metabolicznym, których produkty są przemieszczane ku wierzchołkowi rośliny. W związku z tym, że informacje na temat transportu BR są skromne, wymagają szczegółowych wyjaśnień w najbliższej przyszłości. Jak dotąd nie przedstawiono żadnych dowodów dotyczących transportu akropetalnego czy bazypetalnego endogennych BR. 24-EpiBL, podany egzogennie do korzeni, liści i łodyg ogórka (*Cucumis sativus*), był transportowany akropetalnie. Badania wykazały, że 24-epiBL, wchłonięty przez korzenie sadzonek ogórka, był metabolizowany jedynie w liściach do 2,24-diepiBL. Prawdopodobnie następowało również przyłączenie kwasów tłuszczowych i/lub cukrów do grup hydroksylowych pierścienia A lub łańcucha bocznego BR (Nishikawa i inni 1994).

Tabela 1.4. Produkty przemian metabolicznych brassinosteroidów u roślin (wg Bajguz i Tretyń 2003a, Bajguz 2005, 2007)

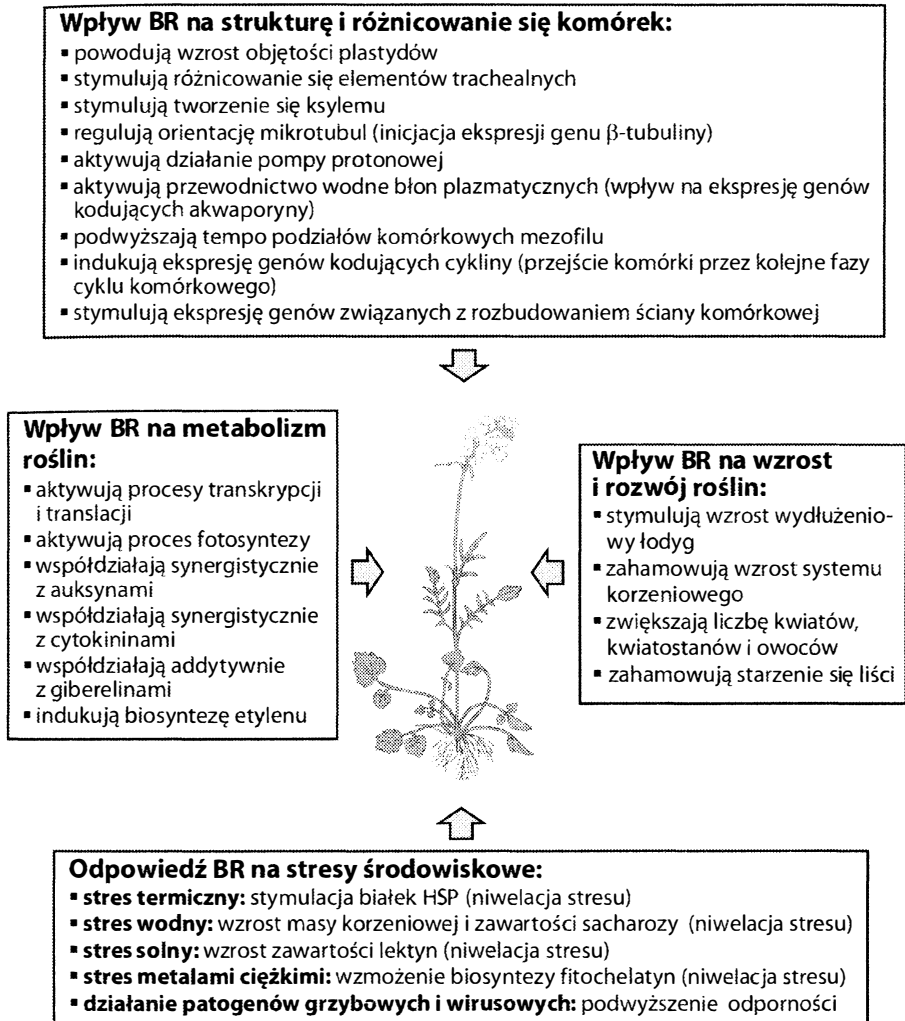
Substrat	Produkt	Reakcja	Gatunek rośliny	Materiał	
BL	23-O-β-D-glukopiranozyloBL	glukozyłacja	Garbipląt (<i>Vigna radiata</i>)	eksplanty	
	23-dehydroBL	utlenianie	Cedr japoński (<i>Cryptomeria japonica</i>)	pyłek kwiatowy pylniki	
	26-norBL	demetylacja	Porostnica wielokształtna (<i>Marchantia polymorpha</i>)	plechy	
24-epiBL	2,24-diepiBL	epimeryzacja	Ogórek (<i>Cucumis sativus</i>)	sadzonki	
			Pszenvica zwyczajna (<i>Triticum aestivum</i>)		
	3,24-diepiBL	epimeryzacja	Seradela pastewna (<i>Ornithopus sativus</i>)	kultury komórkowe	
	3β-laurynian-3,24-diepiBL 3β-mirystynian-3,24-diepiBL 3β-palmitynian-3,24-diepiBL	acyłacja			
	20R-hydroksy-3,24-diepiBL 25-hydroksy-3,24-diepiBL	hydroksylacja			
		2α,3β-dihydroksy-B-homo-7- -oksa-5α-pregnan-6,20-dion	rozerwanie łańcucha bocznego		
		25-hydroksy-24-epiBL 26-hydroksy-24-epiBL	hydroksylacja	Pomidor (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	kultury komórkowe
		25-β-D-glukopiranozyloksy- -24-epiBL 26-β-D-glukopiranozyloksy- -24-epiBL	glukozyłacja		
		12β-hydroksy-24-epiBL	hydroksylacja	<i>Cunninghamella echinulata</i> (grzyby)	
23-dehydroBL	2-epi-23-dehydroBL 3-epi-23-dehydroBL 2,3-diepi23-dehydroBL	epimeryzacja	Cedr japoński (<i>Cryptomeria japonica</i>)	pyłek kwiatowy pylniki	
	24-epiCS	epimeryzacja	Fasola zwykła (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	niedojrzałe nasiona	
			3-epiCS	epimeryzacja	Barwinek różyczkowy (<i>Catharanthus roseus</i>) Ryż siewny (<i>Oryza sativa</i>)
28-norCS	demetylacja	Rzodkiewnik pospolity (<i>Arabidopsis thaliana</i>)			
		Pomidor (<i>Lycopersicon esculentum</i>)			

Tabela 1.4. ciąg dalszy

Substrat	Produkt	Reakcja	Gatunek rośliny	Materiał
24-epiCS	2,24-diepiCS	epimeryzacja	Fasola zwykła (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	niedojrzałe nasiona
	3,24-diepiCS	epimeryzacja	Seradela pastewna (<i>Ornithopus sativus</i>)	kultury komórkowe
	3 β -laurynian-3,24-diepiCS 3 β -mirystynian-3,24-diepiCS 3 β -palmitynian-3,24-diepiCS	acylacja		
	20R-hydroksy-3,24-diepiCS	hydroksylacja		
	2 α ,3 β ,6 β -trihydroksy-5 α -pregnan-20-on 2 α ,3 β -dihydroksy-5 α -pregnan-6,20-dion	demetylacja		
24-epiCS	3,24-diepiCS	epimeryzacja	Pomidor (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	kultury komórkowe
	25-hydroksy-24-epiCS 25-hydroksy-3,24-diepiCS 26-hydroksy-24-epiCS	hydroksylacja		
	2-O- α -D-glukozylo-3,24-diepiCS	glukozyłacja		
	3-O- β -D-glukozylo-3,24-diepiCS			
	25- β -D-glukopiranozyloksy-24-epiCS			
	26- β -D-glukopiranozyloksy-24-epiCS			
	3-dehydro-24-epiCS			
24-epiCS	12 β -hydroksy-24-epiCS	hydroksylacja	<i>Cunninghamella echinulata</i> (grzyby)	
	15 β -hydroksy-24-epiCS	hydroksylacja	<i>Cochliobolus lunatus</i> (grzyby)	
24-epiCT	22-sulfonian-24-epiCT	sulfonacja	Rzepak (<i>Brassica napus</i>)	
TE	3-mirystynian TE 3-laurynian TE	acylacja	Lilia długokwiatowa (<i>Lilium longiflorum</i>)	pylniki
	3-O- β -D-glukopiranozyd TE	glukozyłacja		
24-epiTE	3-O- β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 6))- β -D-glukopiranozylo-24-epiTE	glukozyłacja	Pomidor (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	kultury komórkowe
	3-O- β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 4))- β -D-galaktopiranozylo-24-epiTE			
	3-O- β -D-glukopiranozylo-24-epiTE			
	22-sulfonian-24-epiTE	sulfonacja	Rzepak (<i>Brassica napus</i>)	
3-dehydro-24-epiTE	24-epiTE 24-epiTY	epimeryzacja	Pomidor (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	kultury komórkowe
TY	CS	hydroksylacja	Porostnica wielokształtna (<i>Marchantia polymorpha</i>)	plechy

1.5. Aktywność biologiczna brassinosteroidów

Oddziaływanie BR w roślinie rosnącej w warunkach normalnych i podanej działaniu czynników stresowym zostało przedstawione schematycznie na rycinie 1.7.



Ryc. 1.7. Aktywność biologiczna brassinosteroidów (wg Bajguz i Tretyn 2003a)

2 CEL PRACY

Wybór obiektu badawczego był nieprzypadkowy, ponieważ glon *Chlorella vulgaris* należy do organizmów, u których odbiór bodźca hormonalnego czy środowiskowego oraz odpowiedź biochemiczna zachodzi w obrębie pojedynczej komórki i nie ulega rozproszeniu. Wiadomo, że niektóre procesy fizjologiczno-biochemiczne kontrolowane są przez więcej niż jeden hormon. Jednak poszczególne fitohormony mogą wywoływać efekty przeciwstawne, addytywne lub synergistyczne. Aktywność regulatorów wzrostu i rozwoju roślin determinują również czynniki wewnętrzne, które obejmują procesy ich biosyntezy, degradacji, koniugacji oraz transportu. Ponadto efekty wywoływane przez fitohormony modyfikują zewnętrzne sygnały środowiskowe, do których należy zaliczyć m.in. światło, temperaturę, działanie patogenów czy metali ciężkich (Davies 2004).

Do przeprowadzenia badań dotyczących współdziałania brassinosteroidów wraz z auksynami i cytokininami oraz odpowiedzi brassinosteroidów na działanie różnorodnych czynników stresowych w glonie *Chlorella vulgaris* skłoniły mnie następujące przesłanki:

- dotychczas brak jakichkolwiek tego typu badań na roślinach jednokomórkowych;
- stwierdzenie występowania dwóch brassinosteroidów, 24-epikasteronu i 28-homokasteronu, jedynie w glonie zielenicy wielokomórkowej – płóćni sieciowatej (*Hydrodictyon reticulatum*) (Yokota i inni 1987);
- stwierdzenie występowania fitosteroli w glonach z rodzaju *Chlorella*, m.in. 24-metylocholesterolu (kampesterolu) (Holden i Patterson 1982), które są prekursorami biosyntezy brassinosteroidów.

W niniejszej pracy zostały wyróżnione dwa główne cele badawcze.

1. Hormonalna regulacja wzrostu i rozwoju glonu *Chlorella vulgaris*,
w wyjaśnieniu której podlegały następujące punkty:

- analiza jakościowa i ilościowa endogennych auksyn, brassinosteroidów i cytokinin;
- określenie szlaku biosyntezy brassinosteroidów oraz zawartości endogennych brassinosteroidów pod wpływem światła o różnym natężeniu (0 – ciemność, 10, 50, 100 i 500 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) i barwie: białej, czerwonej i niebieskiej;
- ustalenie biologicznie optymalnego stężenia auksyn (kwasu indolilo-3-octowego, kwasu indolilo-3-propionowego i kwasu indolilo-3-masłowego), brassinosteroidów (brassinolidu, BL; 24-epiBL; 28-homoBL; kastasteronu, CS; 24-epiCS i 28-homoCS) i cytokinin (zeatyny, kinetyny i 1,3-difenyłomocznika) dla wzrostu glonu oraz zawartości białek, chlorofili i cukrów;
- analiza zawartości białek, chlorofili i cukrów oraz ustalenie liczby komórek glonu poddanych działaniu mieszanin poszczególnych związków auksyn i brassinosteroidów, cytokinin i brassinosteroidów;
- ustalenie typu współdziałania pomiędzy auksynami a brassinosteroidami, cytokininami a brassinosteroidami na wzrost i rozwój *Chlorella vulgaris*.

2. Odpowiedź brassinosteroidów w kulturach *Chlorella vulgaris* narażonych na działania różnorodnych czynników stresowych:

- światła o różnym natężeniu (0 – ciemność, 10, 50, 100 i 500 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) i barwie: białej, czerwonej i niebieskiej;
- metali ciężkich: kadmu, ołowiu i miedzi (oznaczanie endogennej zawartości metali);
- temperatury (5–40°C) na liczbę komórek glonu oraz zawartość białek, chlorofili i cukrów.

Podjęto również wyjaśnienie roli brassinosteroidów w mechanizmach adaptacyjnych do stresów:

- pod wpływem działania temperatury – syntezę białek szoku termicznego;
- pod wpływem działania metali ciężkich – syntezę fitochelatyn;
- pod wpływem działania wysokiego natężenia światła, temperatury i metali ciężkich, powodującego wytworzenie dużych ilości reaktywnych form tlenu (stres oksydacyjny) – oznaczenie poziomu enzymatycznych antyoksydantów (dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinianowej i reduktazy glutationowej) i nieenzymatycznych antyoksydantów (askorbinianu i glutationu) w komórkach *Chlorella vulgaris*.

3 CHAKTERYSTYKA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

3.1. Charakterystyka ogólna glonów

Głony stanowią specyficzną grupę organizmów, ponieważ należy do nich 20 000 gatunków zróżnicowanych pod względem ukształtowania plechy i osiągniętych rozmiarów. Wśród nich są organizmy jednokomórkowe, tworzące kolonie oraz wielokomórkowe gatunki plechowate o różnej morfologii, a także tworzące zaczątki pseudotkanek. Występują gatunki o wielkości kilku mikrometrów, jak również duże liściopodobne, kilkunastometrowe glony morskie. Nieliczne z nich odznaczają się zdolnością ruchu dzięki obecności jednej lub kilku wici. Głony występują na całej kuli ziemskiej, wszędzie tam, gdzie jest woda, a więc w stałych lub okresowych zbiornikach wodnych, na śniegach i lodowcach, w gorących źródłach, na glebie, skałach i korze drzew oraz w jamach ciała organizmów żywych (Shubert 1984, Kawecka i Eloranta 1994, Canter-Lund i Lund 1996).

Głony są przede wszystkim organizmami samożywnymi. Jednak istnieją także gatunki glonów miksotroficznych (mogą wykorzystywać materię organiczną pochodzącą ze środowiska) lub heterotroficznych, korzystających wyłącznie z gotowej materii organicznej jako saprofity, rzadziej jako pasożyty roślin i zwierząt. Charakteryzują się licznymi interakcjami ekologicznymi z innymi organizmami, np. grzybami (tworząc porosty), bakteriami, roślinami wyższymi, pierwotniakami lub zwierzętami bezkręgowymi, np. jamochłonami i nicieniami (Shubert 1984, Podbielkowski 1996).

Znaczenie tej grupy roślin w przyrodzie i gospodarce człowieka jest przeogromne. Ich powszechne występowanie w bardzo różnych warunkach klimatyczno-siedliskowych i duża odporność na wiele niekorzystnych czynników środowiska kwalifikuje glony do roślin pionierskich, biorących udział w zasiedlaniu nieopanowanych przez życie biotopów (Shubert 1984, Kawecka i Eloranta 1994). Ze względu na dużą zawartość ważnych troficznie substancji organicznych i nieorganicznych glony stanowią ogromną rezerwę pokarmową, lecz dotychczas wykorzystywaną przez człowieka tylko w niewielkim stopniu. Biorą udział w obiegu pierwiastków w przyrodzie oraz uczestniczą w mineralizacji wielu substancji organicznych. Ponadto wytwarzają aż 70% materii organicznej oraz są głównym producentem tlenu w przyrodzie. Glony glebowe wzbogacają glebę w próchnicę. Odgrywają też rolę czynnika geologicznego, gdyż pewne ich gatunki biorą udział w procesach skałotwórczych (złoża diatomitu, sapropelu), inne zaś – wydzielając kwasy organiczne – rozkładają skały. Wiele glonów wraz z bakteriami rozkładającymi substancje organiczne bierze udział w oczyszczaniu różnego rodzaju ścieków. Człowiek wykorzystuje glony głównie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, farbiarskim, kosmetycznym, włókienniczym i papierniczym (Kawecka i Eloranta 1994, Podbielkowski 1996).

3.2. Cechy biochemiczne glonów

Skład chemiczny glonów, mimo ich ogromnego taksonomicznego zróżnicowania i dużej zmienności ekologicznej, nie został dokładnie poznany. W dużej mierze wpływ na zawartość metabolitów u glonów wywierają czynniki abiotyczne (np. temperatura, światło, skład chemiczny wody i podłoża) i biotyczne (np. oddziaływania osobników tego samego lub innych gatunków – symbioza, konkurencja, pasożytnictwo). Badania biochemiczne wykazały, że glony zawierają wszystkie podstawowe substancje organiczne niezbędne do życia, a mianowicie: kwasy nukleinowe (3,5–7% suchej masy, s.m.), białka (20–70% s.m.), węglowodany (15–80% s.m.), lipidy (1–25% s.m.) i składniki mineralne (5–25% s.m.) takie, jak: siarka, potas, sód, fosfor, chlor, brom, jod, magnez, wapń, mangan, miedź, kobalt i cynk (Podbielkowski 1996, Zych i Burczyk 1998).

Sumaryczna zawartość DNA i RNA u glonów waha się w granicach 3,5–5% s.m., a w przypadku zielenic z rodzaju *Chlorella* 4–5% s.m. Kwasy nukleinowe, podobnie jak u innych organizmów, tworzą kompleksy z białkami i w tej postaci pozostają podczas okresu spoczynkowego komórki. U glonów

z gromady zielenice (*Chlorophytae*) struktura i funkcje kwasów nukleinowych są analogiczne jak u roślin wyższych (Kawecka i Eloranta 1994, Podbielkowski 1996). Analiza sekwencji nukleotydów w DNA chloroplastowym *Chlorella vulgaris* wykazała homologię z genomem chloroplastowym roślin wyższych, w którym zlokalizowane są 3 geny rRNA oraz 31 genów tRNA, w tym jeden nie występuje u roślin naczyniowych. Zidentyfikowano również 69 genów kodujących białka, 8 genów konserwatywnych oraz 2 sąsiadujące ze sobą geny homologiczne z genami bakteryjnymi, które biorą aktywny udział w podziałach komórek. Pozwala to przypuszczać, że mechanizm podziałów chloroplastowych jest podobny do podziałów bakteryjnych (Wakasugi i inni 1997, Noutoshi i inni 1998).

Białko glonowe zawiera wszystkie niezbędne endo- i egzogenne aminokwasy potrzebne do prawidłowego wzrostu i rozwoju zwierząt. Wśród nich dominują: alanina, leucyna, seryna, arginina, lizyna oraz kwasy: asparaginy i glutaminowy. W mniejszych ilościach występują aminokwasy aromatyczne: prolina, fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan oraz siarkowe: cysteina i metionina. Dość powszechnie występują u glonów aminokwasy niebiałkowe i ich pochodne takie, jak: β -alanina, tauryna, cholina, kwas γ -aminomasłowy, kwas 1,6-diaminopimelinowy. Wśród białek prostych dominują albuminy, globuliny oraz gluteliny, natomiast ze złożonych: biliproteiny, lipoproteiny, nukleoproteiny i chromoproteiny. Zawartość białka zależy w dużym stopniu od warunków środowiska, a także od stadium rozwojowego ich komórek. Białka u glonów jednokomórkowych zawierają około 80% całkowitego azotu, znajdującego się w biomacie. Troficzna wartość tych białek jest bardzo wysoka, np. białko w *Chlorella* sp. bogate jest w argininę i kwas glutaminowy oraz aminokwasy egzogenne dla człowieka, np. lizynę, leucynę i walinę. Glony ze względu na obecność w nich wysokoenergetycznych białek mogą być w przyszłości masowo wykorzystywane jako cenne źródło pokarmu dla człowieka oraz jako dodatek do pasz dla zwierząt hodowlanych (Podbielkowski 1996, Zych i Burczyk 1998, Barbarino i Lourenço 2005).

Ważnym materiałem zapasowym glonów są lipidy. Organizmy te gromadzą w swoich komórkach duże ilości kwasów tłuszczowych, spośród których 80% stanowią nienasycone kwasy tłuszczowe: oleinowy, linolowy, linolenowy (Mazurek 1993, Podbielkowski 1996).

Glony stanowią bogate źródło różnych węglowodanów. Zawierają mono-, di-, oligo- i polisacharydy, pełniące funkcję strukturalną, zapasową, energetyczną i osmotyczną. Wśród monosacharydów dominują glukoza i fruktoza, natomiast ksyloza, ryboza, ramnoza i galaktoza są rzadziej reprezentowane. Oligosacharydy występują w niewielkich ilościach i są to najczęściej sacharoza, rafinoza i trehaloza. W polisacharydy oraz ich pochodne szczegól-

nie bogate są glony morskie, u których stwierdzono obecność laminaryny, fukoidyny, karageiny, kwasu alginowego oraz agar-agaru. Do innych wielocukrów, występujących u glonów, należą: skrobia, paramylon, lichenina i chryzolaminaryna. Najbardziej zbadanym wielocukrem glonowym jest kwas alginowy i jego sole – alginiany, które powszechnie występują u brunatnic i są podstawowym składnikiem ścian komórkowych. Związek ten dzięki właściwościom tworzenia żelu i selektywnym interakcjom z różnymi kationami ma szerokie zastosowanie w przemyśle papierniczym, farbiarskim, farmaceutycznym i włókienniczym. Z węglowodanów o funkcji zapasowej spotyka się najczęściej dulcyt, inozyt, mannit, sorbit i wolemit. Do sacharydów o funkcji strukturalnej należą: celuloza, hemiceluloza, askofilan, kaloza, kwas alginowy i fucynowy, ksyłany, mannany oraz pektyny poliuronidowe, związki mukopolisacharydowe i chitynopodobne (Gumiński 1990, Becker 1994, Podbielkowski 1996).

W chloroplastach glonów występują substancje barwne zdolne do absorpcji światła, są to: chlorofile, karotenoidy i fikobiliny. Z wymienionych grup chlorofil *a* występuje u wszystkich glonów zdolnych do fotosyntezy, a towarzyszą mu zwykle pomocnicze chlorofile typu *b*, *c*, *d*, *e*. Spotykane u glonów karotenoidy charakteryzują się dość dużą różnorodnością i zmiennością chemiczną, spowodowaną głównie czynnikami środowiskowymi i genetycznymi. Mimo to poszczególne grupy taksonomiczne glonów posiadają charakterystyczne barwniki karotenoidowe. Spośród glonów najbardziej zasobne w karotenoidy są złotowiciowce, zielenice, okrzemki i eugleniny. Zawartość karotenoidów w glonach waha się w granicach od 0,4 do 1,7% s.m., zaś u roślin naczyniowych może wynosić najwyżej 0,3% s.m. Karotenoidy dzielimy na węglowodorowe, zwane karotenami i ich pochodne tlenowe, zwane ksantofilami, które można podzielić na ubogie, średnio zasobne i bogate w tlen. Z glonów wyizolowano α , β , γ , δ , ζ -karoten, likopen i α -, β -zeakaroten oraz następujące ilościowo dominujące ksantofile: astaksantynę, anteraksantynę, afanizol, diadinoksantynę, dinoksantynę, euglenanon, echinenon, fukoksantynę, flawoksantynę, kantaksantynę, kryptoksantynę, luteinę, luteoksantynę, mutatokasantynę, neoksantynę, neofukoksantynę, neodinoksantynę, syfonoksantynę, taraksantynę, wiolaksantynę, zeaksantynę i wiele innych. Najczęściej występują i przeważają ilościowo α - i β -karoten. Barwniki karotenoidowe razem z chlorofilami odgrywają podstawową rolę w procesie fotosyntezy, zwłaszcza u glonów żyjących w głębszych warstwach wody, u których pełnią one rolę bezpośrednich absorbentów energii świetlnej. Ponadto u zwierząt karoteny, a także ksantofile, ubogie w tlen, posiadające konfigurację β -jononu, są głównym źródłem prowitaminy A (Greider i Osborne 1992, Becker 1994, Hörtensteiner 1999, Ladygin 2000).

Głony zasobne są również w sterole takie, jak: cholesterol, sitosterol, fukosterol, lanosterol, cykloartenol, kampesterol, obtusifoliol, stigmasterol i ergosterol oraz terpeny, głównie pinen, karwon, cymen, cyneol, geraniol itd. Związki te najobficiej występują u brunatnic, krasnorostów i zielenic. W glonach stwierdzono również obecność fitohormonów: auksyn, giberelin, cytokinin, brassinosteroidów i kwasu abscysynowego (Mazur i inni 2001, Stirk i inni 2003). Oprócz nich u niektórych gatunków glonów wyodrębniono katecholaminy i pokrewne z nimi aminy aromatyczne i heterocykliczne, prostaglandyny i związki analogiczne, a także acetylocholinę oraz steroidy takie, jak: anteridiol i oogoniolo: A, B, C, D. W glonach stwierdzono obecność amin i poliamin alifatycznych w postaci wolnej lub w formie soli amoniowych. Najczęściej są to: metylo-, butylo-, etylo- i propyloaminy, putrescyna, spermina, spermidyna i etanoloamina. Toksycznymi związkami w komórkach glonów są alkaloidy (anatoksyna A, debromoaplazjotoksyna). Do grupy związków antybiotycznych należą fitoncydy szeroko rozpowszechnione u glonów plechowych (Collins 1978, Gumiński 1990, Becker 1994, Podbielkowski 1996).

Głony, podobnie jak inne organizmy roślinne, podczas wzrostu i rozwoju mogą wydzielać do otaczającego je środowiska różne substancje organiczne. Substancje te mogą działać w różny sposób na organizmy roślinne i zwierzęce, także na glony z tego samego gatunku lub innych gatunków. Mogą to być: stymulatory wzrostu, związki o charakterze toksycznym i antybiotycznym, hamujące wzrost własnych komórek (autoinhibitory) lub ograniczające rozwój konkurencyjnych gatunków fitoplanktonu. Głony wydzielają pozakomórkowo następujące substancje organiczne:

a) drobnocząsteczkowe takie, jak:

- aminokwasy: zwłaszcza kwas asparaginowy i glutaminowy, alanina, leucyna, seryna, arginina, lizyna;
- monosacharydy;
- związki chelatujące jony metali, np. jony miedzi;
- witaminy, głównie: B₂, B₆, B₁₂, B_C, H, PP, C;
- aminy, aldehydy, ketony, fitohormony, kwasy organiczne;

b) wielkocząsteczkowe takie, jak:

- polisacharydy, enzymy i peptydy o właściwościach toksycznych, antybiotycznych i autoinhibicyjnych (Becker 1994, Durrieu i Tran-Minh 2002).

W sekrecji pozakomórkowej zielenic dominuje kwas glukonowy, którego zawartość w uwalnianych produktach może dochodzić nawet do 90%. Kwas ten stymuluje wzrost i podziały komórkowe *Chlorella* sp. Wydzielanie substancji przez glony zależy od stanu fizjologicznego, stadium rozwojowego komórek oraz od warunków środowiska (Shubert 1984, Gumiński 1990, Podbielkowski 1996, Durrieu i Tran-Minh 2002).

3.3. Warunki hodowli glonów

Doświadczenia prowadzono na młodej i zsynchronizowanej monokulturze zielenicy *Chlorella vulgaris* Beijerinck (*Trebouxiophyceae*). Czas trwania hodowli w każdej serii był stały i wynosił 48 godzin. Glony hodowano w kolbach stożkowych Erlenmayera o pojemności 500 ml, zatkanych korkami bakteriologicznymi, na pożywkę Knopa (1865) używanej do intensywnej hodowli zielenic (tabela 3.1).

Tabela 3.1. Skład chemiczny pożywki Knopa (1865)

Związek chemiczny	Ilość (g/l)	Związek chemiczny	Ilość (g/l)
KNO_3	0,5	H_3BO_3	0,003
$\text{Ca}(\text{NO}_2)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,5	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,002
KH_2PO_4	0,2	NH_4VO_3	0,0003
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,15	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,0002
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,012	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,0001

Synchronizację glonów wykonano według metody Pirsona i Lorenzena (1966). W ciągu 2–3 tygodni kultury glonu, rosnące na skosach agarowych, były poddane ciągłemu działaniu światła o niskim natężeniu (2–3 klx) i stałej temperaturze (25°C). Po tym okresie glony z inokulum przenoszono do pożywki Knopa (200 ml) oraz poddawano działaniu wysokiego natężenia światła (10 klx) w okresie 5 dni i niskiego (1 klx) w okresie 2–3 dni. Ostatecznie kultury glonu poddano optymalnym warunkom dla synchronicznych podziałów, tj. 3–4 cyklom 70-godzinnemu naświetlaniu o natężeniu 10 klx i 24-godzinnym okresie ciemności.

Przed założeniem hodowli glonów pożywkę Knopa, kolby Erlenmayera oraz korki bakteriologiczne sterylizowano 3-krotnie w komorze ciepłej w temperaturze 105°C przez okres 3 godzin. Sumaryczna objętość pożywki Knopa po dodaniu stosowanych BR i zawiesiny kultury macierzystej *Chlorella vulgaris* w każdej kolbie wynosiła 250 ml. Hodowlę glonów prowadzono w stabilnych warunkach pomieszczenia klimatyzowanego, w komorze fitotronowej. W trakcie trwania hodowli glonów temperatura powietrza wynosiła 25(±0,5)°C, intensywność oświetlenia, uzyskana za pomocą lamp fluorescencyjnych (Philips Aqua Relle 40 W), wynosiła 50 μmola m⁻²s⁻¹ promieniowania fotosyntetycznego czynnego (PAR). Czas naświetlania glonów

był automatycznie regulowany przez zegar sterujący i wynosił 16 godzin na dobę. W ciągu doby kultury glonowe były mieszane 50 obrotów na minutę (rpm) co 15 minut przez okres 10 minut. Wyjątek stanowiły doświadczenia, dotyczące działania stresu termicznego, gdzie glony hodowano w zakresie temperatur 5–40°C. Natomiast w przypadku stresu świetlnego doświadczenia prowadzono w ciemności oraz wykorzystując różną intensywność światła, tj. 10, 50, 100 i 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR i różną jego barwę: białą, czerwoną i niebieską. Stosowane barwy światła uzyskano poprzez zastosowanie specjalnych pojemników fitotronowych „Phytatray” firmy Sigma (St. Louis, MO; USA).

Przed ustaleniem wyjściowej suchej masy rosnących około 1 miesiąca glonów, hodowlę macierzystą odwirowywano (4000 rpm, 15 min). W celu wyeliminowania z powierzchni glonów wydzielin (wtórne metabolity) ich osad przemywano świeżą pożywką, wirowano i następnie przenoszono je do świeżo wykonanej pożywki Knopa. Z otrzymanej mieszaniny pobierano 25 ml zawiesiny glonów w celu ustalenia wyjściowej ilości glonów, jako odpowiednika 0,1 g suchej masy w 250 ml pożywki. Pobraną ilość glonów odwirowywano (4000 rpm, 15 min), a po rozpuszczeniu w 2 ml wody destylowanej przenoszono do uprzednio zważonego tygla i suszono przez okres 5 godzin w temperaturze 105°C. Następnie z różnicy ciężarów tygli wyliczano suchą masę glonów, odnosząc ją do 0,1 g w 250 ml pożywki.

3.4. Metody analityczne

Badania prowadzono w 3 równoległych seriach, powtórzonych 5-krotnie. Do każdej z kolb dodawano odpowiednie ilości: pożywki Knopa, kultury macierzystej glonu *Chlorella vulgaris*, oddzielnie roztwór brassinosteroidu, auksyny, cytokininy, soli metalu ciężkiego lub mieszaninę BR z odpowiednią auksyną, cytokininą czy metalem ciężkim (tabela 3.2). Wzory strukturalne fitohormonów, stosowanych w doświadczeniach, przedstawia rycina 3.1. Objętość sumaryczna hodowli wynosiła 250 ml. Zawartość początkowa glonów w dniu rozpoczęcia hodowli eksperymentalnych wynosiła 0,1(\pm 0,005) g suchej masy w 250 ml pożywki Knopa, co stanowiło $0,65 \times 10^6$ komórek w 1 ml.

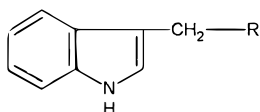
Tabela 3.2. Egzogenne związki zastosowane w doświadczeniach

Nazwa zwyczajowa	Skrót	Zakres stosowanych stężeń
auksyny		
kwasi indolilo-3-octowy	IAA	10^{-6} – 10^{-4} M
kwasi indolilo-3-propionowy	IPA	10^{-6} – 10^{-4} M
kwasi indolilo-3-masłowy	IBA	10^{-6} – 10^{-4} M
cytokiny		
<i>trans</i> -zeatyna	Z	10^{-10} – 10^{-4} M
kinetyna	Kin	10^{-10} – 10^{-4} M
1,3-difenylomocznik	DPU	10^{-10} – 10^{-4} M
brassinosteroidy		
brassinolid	BL	10^{-15} – 10^{-6} M
24-epibrassinolid	24-epiBL	10^{-15} – 10^{-6} M
28-homobrassinolid	28-homoBL	10^{-15} – 10^{-6} M
kastasteron	CS	10^{-15} – 10^{-6} M
24-epikastasteron	24-epiCS	10^{-15} – 10^{-6} M
28-homokastasteron	28-homoCS	10^{-15} – 10^{-6} M
związki metali ciężkich		
azotan kadmu, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	-	10^{-7} – 10^{-3} M
azotan miedzi, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	-	10^{-7} – 10^{-3} M
azotan ołowiu, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	-	10^{-7} – 10^{-3} M

Wszystkie testowane brassinosteroidy pochodziły z laboratorium Institute of Physical and Chemical Research RIKEN (Saitama, Japonia), natomiast pozostałe fitohormony i związki metali ciężkich zostały zakupione w firmie Sigma (St. Louis, MO; USA).

W celu oznaczenia liczby i wielkości komórek pobierano 100 μl zawiesiny glonów. Do pomiarów zawartości metabolitów pobierano po 10 ml zawiesiny glonowej, które odwirowywano (4000 rpm, 15 min). Analizowane składniki biochemiczne obliczano w jednostkach wagowych (femptogramach na jedną komórkę). W celu oznaczenia aktywności enzymów i wykonania elektroforezy białek pobierano 50 ml zawiesiny glonowej, którą sączono pod ciśnieniem na sączkach szklanych firmy Whatman, a następnie homogenizowano w ciekłym azocie. Z kolei, ustalając występowanie oraz aktywność fitohormonów (auksyn, brassinosteroidów i cytokinin), wykorzystano przeciętnie około 500 g kultury glonów. W trakcie trwania hodowli pobierano z poszczególnych kolb odpowiednie objętości zawiesiny glonowej w celu oznaczenia odpowiednich parametrów fizjologiczno-biochemicznych wybranymi metodami analitycznymi (tabela 3.3).

AUKSYNY



R = -COOH

kwasy indolilo-3-octowy

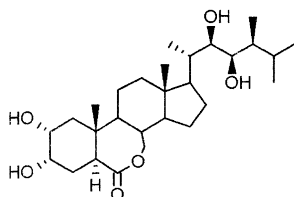
R = -CH₂-COOH

kwasy indolilo-3-propionowy

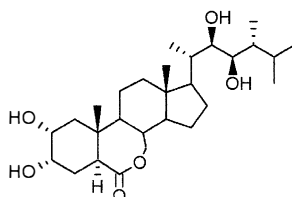
R = -CH₂-CH₂-COOH

kwasy indolilo-3-mastowy

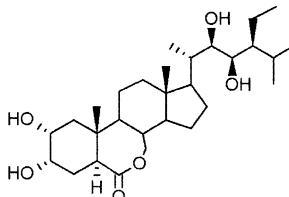
BRASSINOSTEROIDY



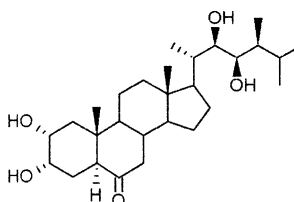
**brassinolid
(BL)**



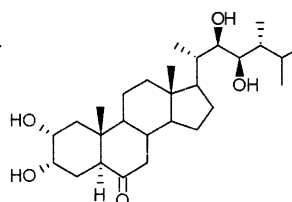
**24-epibrassinolid
(24-epiBL)**



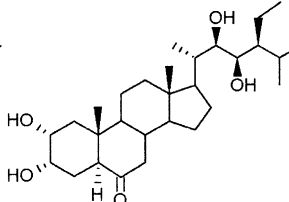
**28-homobrassinolid
(28-homoBL)**



**kastasteron
(CS)**

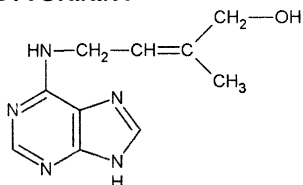


**24-epikastasteron
(24-epiCS)**

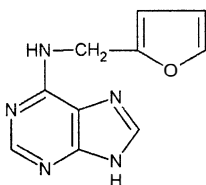


**28-homokastasteron
(28-homoCS)**

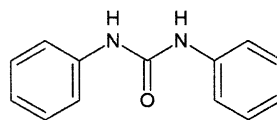
CYTOKININY



zeatyna



kinetyna



1,3-difenylo mocznik

Ryc. 3.1. Wzory strukturalne auksyn, brassinosteroidów i cytokinin, stosowanych w doświadczeniach

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji przy założonym poziomie istotności 0,05 (Stanisz 1998) w programie komputerowym „Statistica 6” StatSoft, Inc. USA (2001).

Tabela 3.3. Metody analityczne zastosowane w badaniach

Oznaczany parametr	Metoda	Piśmiennictwo
Liczba komórek	mikroskopowa	Bajguz 2000a, b
Zawartość endogenna ogólna chlorofili	spektroskopowa	Wellburn 1994
Zawartość endogenna cukrów	spektroskopowa	Somogyi 1954
Zawartość endogenna białka	spektroskopowa	Lowry i inni 1951, Hewitt 1958
Rozdział elektroforetyczny białek HSP	elektroforetyczna – SDS-PAGE, western blotting	Laemmli 1970, Sambrook i inni 1989, Lewis i inni 1999
Zawartość ogólna fitochelatin	HPLC	Tukendorf i Rauser 1990, Meuwly i inni 1995
Zawartość endogenna metali ciężkich (kadmu, ołowiu i miedzi)	AAS	Bajguz 2000b, Bajguz i Godlewska-Zylkiewicz 2004
Zawartość endogenna auksyn	HPLC, GC-SIM-MS	Chen i inni 1988
Zawartość endogenna cytokinin	HPLC-MS	Lexa i inni 2003
Zawartość endogenna brassinosteroidów	HPLC, GC-SIM-MS	Noguchi i inni 1999
Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (EC 1.15.1.11)	spektroskopowa	Elstner i Heupel 1976
Aktywność katalazy (EC 1.11.1.6)	spektroskopowa	Claiborne 1985, Ahmad i inni 2000
Aktywność peroksydazy askorbinianowej (EC 1.11.1.11)	spektroskopowa	Nakano i Asada 1981
Aktywność reduktazy glutationowej (EC 1.6.4.2)	spektroskopowa	Jablonski i Anderson 1978
Zawartość endogenna askorbinianu	spektroskopowa	Kampfenkel i inni 1995
Zawartość endogenna glutationu	HPLC	Tukendorf i Rauser 1990, Meuwly i inni 1995

3.4.1. Pomiar liczby i wielkości komórek *Chlorella vulgaris* oraz pH pożywki

W celu oznaczenia liczby komórek *Chlorella vulgaris* po dokładnym ich wymieszaniu pobierano 100 µl zawiesiny glonowej. Następnie nanoszono ją pod szkiełko nakrywkowe komory Bürkera i liczono pod mikroskopem ilość komórek w 80 małych kwadratach. Oznaczenia powtarzano 3-krotnie dla każdej z prób. Liczbę komórek glonu obliczano według następującego wzoru:

$$LK = a \times v \times 5 \times 10^4,$$

gdzie:

- LK – liczba komórek,
 a – ilość komórek w małych kwadratach,
 v – objętość zawiesiny glonu (100 μ l).

Liczbę komórek wyrażano ostatecznie jako 10^6 komórek ml^{-1} (Bajguz 2000a, b).

Pomiar wielkości komórek ($n=100$) wykonano, mierząc okulem mikrometrycznym oraz dodatkowo elektronicznie za pomocą programu komputerowego MultiScanBase 13.01 (Computer Scanning Systems, Ltd.). Wartość pH pożywki mierzono za pomocą pH-metru inoLab/Oxi Level 3 (WTW, Germany).

3.4.2. Oznaczanie zawartości chlorofili w komórkach *Chlorella vulgaris*

10 ml zawiesiny glonu oddzielano od pożywki przez wirowanie (4000 rpm, 15 min). Po zlaniu supernatantu dodawano 5 ml metanolu. Następnie próbówki zatkałe korkami bakteriologicznymi wstawiano do łaźni wodnej (70°C, 30 min). Po upływie tego czasu, zawartość próbek wirowano (4000 rpm, 15 min). Ekstrakt przelewano do nowej próbówki i uzupełniano do 7 ml metanolem, a następnie mieszano.

Wartość absorbancji mierzono wobec próby odnośnikowej (metanol) przy długości fal 652,4 nm i 665,2 nm. Stężenie chlorofili (fg kom^{-1}) obliczano według wzoru (Wellburn 1994):

$$\text{Chl } a = [(16,72 \times A_{665,2} - 9,16 \times A_{652,4}) \times V] / LK$$

$$\text{Chl } b = [(34,09 \times A_{652,4} - 15,28 \times A_{665,2}) \times V] / LK,$$

gdzie:

- $A_{652,4}$, $A_{665,2}$ – wartości absorbancji dla długości fal 652,4 i 665,2 nm,
 Chl – stężenie chlorofilu (a lub b),
 LK – liczba komórek policzona w komorze Bürkera i przeliczona na 10 ml,
 V – całkowita objętość ekstraktu (ml).

3.4.3. Oznaczanie zawartości monosacharydów w komórkach *Chlorella vulgaris*

10 ml próbki glonu wirowano (4000 rpm, 15 min), a następnie, po usunięciu supernatantu, do zawiesiny glonów dodawano 5 ml 95% etanolu. Próby inkubowano (60°C, 24 godziny), a otrzymany ekstrakt wirowano (3500 rpm, 10 min), po czym pobierano po 0,5 ml do dalszych analiz.

Do 0,5 ml próby badanej (0,5 ml wody destylowanej – jako próby odnośnikowej lub 0,5 ml etanolowego roztworu glukozy – jako próby wzorcowej) dodawano 0,5 ml odczynnika miedziowego Somogyi (roztwór A i B, 4:1) i wstawiano do wrzącej łaźni wodnej na 20 minut. Następnie dodawano 0,5 ml odczynnika arsenomolibdenowego i 3,5 ml wody destylowanej, dokładnie mieszając. Wartość absorbancji odczytywano przy długości fali 540 nm wobec próby odnośnikowej (Somogyi 1954).

Stężenia cukrów obliczano według następującego wzoru:

$$c_p = (A_p \times c_w) / A_w,$$

gdzie:

- c_p – stężenie próby badanej,
- c_w – stężenie wzorca,
- A_p – absorbancja próby badanej,
- A_w – absorbancja próby wzorcowej.

Odczynnik miedziowy Somogyi:

Roztwór A: 7,72 g Na_2SO_4 rozpuszczano na gorąco (90°C) w 60 ml wody destylowanej. Oddzielnie rozpuszczano w 20 ml wody destylowanej 1,5 g winianu sodowo-potasowego. Łączono oba roztwory. Dodawano 2 g NaHCO_3 , 3 g NaCO_3 , a po rozpuszczeniu uzupełniano wodą destyloowaną do 100 ml, następnie przesączano.

Roztwór B: 0,3 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ rozpuszczano w 10 ml wody destylowanej, dodawano 3 g Na_2SO_4 i uzupełniano do 15 ml wodą destyloowaną.

Odczynnik arsenomolibdenowy Nelsona:

Roztwór A: 8,3 g molibdenianu amonu ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 7\text{H}_2\text{O}$) rozpuszczano w 150 ml wody destylowanej, dodawano 7 ml stężonego H_2SO_4 .

Roztwór B: 1 g arsenianu sodu ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) rozpuszczano w 8,3 ml wody destylowanej (bardzo szybko wymieszano).

Roztwór A i B łączono oraz inkubowano (37°C, 24 godziny).

3.4.4. Oznaczanie zawartości białka w komórkach *Chlorella vulgaris*

10 ml próbki glonu wirowano (4000 rpm, 15 min), następnie – po usunięciu supernatantu – do zawiesiny glonów dodawano 2,5 ml 1M NaOH, po czym próbki wstawiano do wrzącej łaźni wodnej na 10 minut. Po wyjęciu probówek dodawano 2,5 ml wody destylowanej. Zawartość probówek wirowano (4000 rpm, 15 min).

Do 0,5 ml próby badanej (ewentualnie 0,5 ml wody destylowanej z 1M NaOH – jako próby odnośnikowej lub 0,5 ml roztworu albuminy – jako próby wzorcowej) dodawano 2,5 ml odczynnika miedziowego (mieszano roztwór A: 2% Na_2CO_3 w 0,1M NaOH z roztworem B: 0,5% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ w 1% cytrynianie sodu w stosunku 50:1). Po 10 minutach do mieszaniny dodawano 0,25 ml 1M odczynnika Folina-Ciocalteu. Próby odstawiano na 30 minut, a następnie odczytywano wartość absorbancji przy długości fali 750 nm wobec próby odnośnikowej (Lowry i inni 1951, Hewitt 1958).

Stężenie białka obliczano według wzoru:

$$c_p = (A_p \times c_w) / A_w$$

gdzie:

- c_p – stężenie próby badanej,
- c_w – stężenie wzorca,
- A_p – absorbancja próby badanej,
- A_w – absorbancja próby wzorcowej.

3.4.5. Rozdział elektroforetyczny białek szoku termicznego

W celu oddzielenia komórek *Chlorella vulgaris* od pożywki, 50 ml zawiesiny glonów sączono pod zwiększonym ciśnieniem przez sączek szklany GF/C Whatman (o średnicy porów 1,2 μm), a następnie materiał homogenizowano w ciekłym azocie z dodatkiem 10 ml buforu lizującego o pH 7,8 (0,394 g Tris/HCl, 10 ml glicerolu, 90 ml H_2O , 50 μl Tryton-X 100) oraz 1 μl fluorku fenylometylosulfonylowego, antypainy i pepstatyny A na każdy ml buforu. Homogenat odwirowywano (8000 rpm, 10 min, 4°C), a uzyskany preparat białkowy наносzono na żel poliakrylamidowy (Laemmli 1970, Sambrook i inni 1989, Lewis i inni 1999).

W celu zabezpieczenia żelu rozdzielającego, przygotowano najpierw poliakrylamidową warstwę zabezpieczającą: 30% roztwór monomerów akrylamidu (29,2 g akrylamidu i 0,8 g bisakrylamidu), 1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 10% SDS, 10% nadsiarczan amonu, TEMED, H_2O . Następnie miesza-

nę wprowadzano między dwie szklane szyby (uprzednio odtłuszczone w acetonie i zaktywowane (60°C, 30 min) na wysokość 1 cm. Po spolimeryzowaniu żelu zabezpieczającego nanoszono 12,5% żel rozdzielający: 4 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 6,7 ml 30% akrylamidu, 5,3 ml H₂O, 20 µl 10% roztworu nadsiarczanu amonu i 10 µl TEMEDU. Żel nawarstwiano *n*-butanolem i pozostawiano w celu polimeryzacji na około 1–1,5 godziny. Następnie zlewano *n*-butanol, a powierzchnię żelu płukano wodą destylowaną. Po umocowaniu teflonowego grzebienia wprowadzano 3% roztwór żelu zagęszczającego: 0,83 ml 30% akrylamidu, 1,23 ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 30 µl 10% SDS, 2,842 ml H₂O, 25 µl 10% nadsiarczanu amonu i 5 µl TEMEDU. Po jego polimeryzacji wyjmowano grzebień. Przygotowany w ten sposób żel poliakrylamidowy umieszczano w aparacie do elektroforezy, do którego wlewano bufor elektroforetyczny (0,25M Tris – 1,92 glicyna, 10% SDS pH 8,3). Do dołków żelu zagęszczającego wprowadzono po 25 µl prób białkowych. Rozdział wykonywano w temperaturze 4°C, stosując napięcie 60 V i 140 V (Sambrook i inni 1989).

Po zakończeniu elektroforezy, rozdzielone białka były przenoszone z żelu na nitrocelulozę (Hybond-C, Amersham Biociences Ltd., Amersham, UK). Transfer wykonywano w temperaturze 4°C w ciągu 12 godzin, stosując napięcie 135 mA przy użyciu Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) i bufora T (25mM Tris (pH 8,3), 192 mM glicynę, 20% metanol). Po upływie ustalonego czasu arkusz nitrocelulozy płukano 3-krotnie wodą destylowaną w celu usunięcia śladów buforu T. Następnie nitroceluloza była barwiona w Ponceau (0,2% Ponceau S, 3% TCA) przez okres 60 minut. Odbarwienie tła następowało poprzez płukanie wodą. Blot białkowy odbarwiano, płuczając go 3-krotnie w 5% odtłuszczonym mleku w buforze PBS (1,5 mM KH₂PO₄, 6,5 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 0,14 NaCl). Immunochemiczna identyfikacja białek, przeniesionych na nitrocelulozę, polegała na przereagowaniu z odpowiednim przeciwciałem, a następnie zlokalizowaniu kompleksu antygen-przeciwciało na powierzchni nitrocelulozy. Zastosowano monoklonalne przeciwciała myszy HSP20, HSP25, HSP30, HSP40, HSP60, HSP70 i HSP90 (AssayDesign, Ann Arbor, USA). Blot nitrocelulozowy po wysuszeniu poddano analizie chemifluorescencyjnej (STORM Imager and ImagerQuant; Amersham Biociences Ltd., Amersham, UK).

3.4.6. Oznaczanie zawartości peptydów tiolowych (glutationu i fitochelatyn) w komórkach *Chlorella vulgaris*

Kultury glonów wirowano (4000 rpm, 15 min), a po usunięciu supernatantu zawiesinę *Chlorella vulgaris* zmrażano w ciekłym azocie i rozcierano w schłodzonym móździerzu z 2-krotną objętością 0,1 M HCl. Homogenat wirowano (10000 rpm, 5 min, 4°C), a otrzymany supernatant był wykorzystywany do analiz chromatograficznych.

Ekstrakty rozdzielano z użyciem chromatografu firmy Beckman (model 126/166) z prekolumną o wymiarach 4,6 × 10 mm i kolumną o wymiarach 4,6 × 250 mm (Supelco, wypełnione Ultrasphere C-18). Próbkę nanoszono przy użyciu mikrostrzykawki na pętlę o objętości 100 µl. Jako eluaty stosowano dwa roztwory: 0,05% wodny roztwór kwasu trifluorooctowego (TFA) i 50% acetonitryl (ACN) w 0,05% TFA. Rozdział próbki zachodził w liniowym gradiencie (0–20%) ACN w 0,05% TFA przez 30 minut, przy przepływie solwentów z prędkością 1 ml/min. Przed naniesieniem kolejnej próbki kolumnę przemywano ACN przez 5 minut i równoważono TFA przez 9 minut.

W czasie chromatografii prowadzonej w warunkach kwaśnego pH (pH 2–3) związany z peptydami metal oddysocjowuje, a grupy cysteiny, wiążące ten metal, ulegają redukcji do formy -SH. Dla oznaczenia zawartości grup -SH wykorzystano ich reakcję z odczynnikiem Ellmana (kwas 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesowy, DTNB). Produkty tej reakcji mają barwę żółtą, co pozwala wykrywać je spektrofotometrycznie.

Małe frakcje peptydów, wypływające z kolumny, były kierowane do mieszalnika o pojemności 10 µl, gdzie doprowadzano (pompa firmy Beckman, model 110) 200 µM DTNB w 0,05 M buforze potasowo-fosforanowym (pH 7,6), przepływający przez układ z szybkością 0,5 ml/min. Absorbancję produktów reakcji DTNB z grupami -SH mierzono przy długości fali 405 nm za pomocą detektora firmy Beckman (model 160). Jakościową analizę chromatogramów przeprowadzano, porównując czasy retencji identyfikowanych pików z czasami retencji mieszaniny wzorców glutationu i fitochelatyn n=2–10 (Tukendorf i Rauser 1990, Meuwly i inni 1995).

3.4.7. Oznaczanie zawartości metali ciężkich (kadmu, ołowiu i miedzi) w komórkach *Chlorella vulgaris*

Kultury glonów wirowano (4000 rpm, 15 min), a po usunięciu supernatantu zawiesinę *Chlorella vulgaris* mineralizowano metodą suchą, która polegała na spalaniu próbki w piecu muflowym (temperatura 550°C, 5 godzin) (Bajguz 2000b, Bajguz i Godlewska-Zylkiewicz 2004). Otrzymaną po mineralizacji próbkę w postaci stałej rozpuszczano w HNO₃, a następnie poddawano analizie na aparacie do atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS). Przygotowano odpowiednie roztwory wzorcowe związków miedzi, kadmu i ołowiu. Następnie ustawiano właściwe parametry aparatu AAS: przepływ gazów oraz właściwą długość fali dla odpowiedniego metalu: kadm – 228,8 nm, miedź – 324,7 nm, ołów – 283,3 nm. Przeprowadzono analizę roztworów wzorcowych i zmineralizowanych próbek badanych rozpuszczonych w 2 ml HNO₃. Na podstawie wyników absorbancji, uzyskanych dla prób wzorcowych, wykreślano krzywą wzorcową, a z wykresu wzorcowego odczytywano zawartość analizowanego metalu w próbce.

3.4.8. Oznaczanie zawartości auksyn w komórkach *Chlorella vulgaris*

Kultury glonów wirowano (4000 rpm, 15 min), a po usunięciu supernatantu zawiesinę *Chlorella vulgaris* zmrażano w ciekłym azocie i liofilizowano przez 48 godzin. Następnie materiał roślinny kruszono w moździerzu, a 50 mg liofilizowanych glonów ekstrahowano w temperaturze 4°C 65% 2-propanolem w 200 mM buforze imidazolowym (pH 7). Ekstrakty filtrowano, następnie odparowywano do fazy wodnej i wirowano (5000 rpm, 10 min). Odczyn supernatantu zwiększano do pH 7,0 i ekstrahowano 3-krotnie z octanem etylu. Następnie odczyn fazy wodnej ustalano na poziomie pH 3 i ponownie ekstrahowano 3-krotnie octanem etylu. Frakcje organiczne łącznie, odparowywano do sucha i rozpuszczano w 65% 2-propanolu w 200 mM buforze imidazolowym (pH 7). Badane próbki były rozcieńczane w stosunku 1:10 wodą destylowaną i podlegały oczyszczeniu na NH₂-kolumnie. Do każdej z próbek dodawano 100 ng ¹³C₆-IAA, 100 ng ¹³C₆-IBA (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA). Eluaty były poddawane kolejnemu oczyszczeniu z wykorzystaniem HPLC (solwenty: 1% kwas octowy, metanol; szybkość przepływu: 0,7 ml min⁻¹). Równocześnie wykonywano chromatografy autentycznych standardów auksyn przy długości fali 280 nm z oznaczeniem odpowiednich czasów retencji, np. dla IAA w 15,5 min i IBA w 22,7 min. Związki były zbierane w odpowiednim czasie i odparowywane do sucha. Ekstrakty podlegały procesowi metylacji z diazometanem, a następnie przeno-

szono je bezpośrednio do GC-MS (kolumna Durabond-5, 30 m × 0,25 mm; temperatura 70°C przez 2 min, ze wzrostem 30°C min⁻¹ do 200°C, następnie do 230°C ze wzrostem 5°C min⁻¹, ostatecznie do 270°C ze wzrostem 30°C min⁻¹ przez 5 min). Widmo mas otrzymywano przy napięciu 70 eV. Charakterystykę pełnego zestawu jonów dla auksyn od *m/z* 50 do 500 otrzymywano w ciągu 0,45 s. Na podstawie uzyskanych widm standardów porównywano widma w ekstraktach uzyskanych z prób badanych (Chen i inni 1988).

3.4.9. Oznaczanie zawartości cytokinin w komórkach *Chlorella vulgaris*

Kultury glonów wirowano (4000 rpm, 15 min), a po usunięciu supernatantu zawiesinę *Chlorella vulgaris* zmrażano w ciekłym azocie i liofilizowano przez 48 godzin. Następnie materiał roślinny kruszono w moździerzu, a 50 mg liofilizowanych glonów ekstrahowano w temperaturze -20°C roztworem Bieleskiego (60% MeOH, 25% CHCl₃, 10% HCOOH, 5% H₂O). Ekstrakty wirowano (5000 rpm, 10 min), po czym dodawano do supernatantu po 100 ng zdeuterowanych standardów cytokinin: [²H₆]-izopentenylo adeniny, [²H₅]-zeatyny, [²H₅]-dihydrozeatyny, [²H₆]-izopentenyloadenozyny, [²H₅]-rybozydu zeatyny, [²H₅]-5'-monofosforanu rybozydu zeatyny, [²H₅]-7-glukozyd zeatyny i [²H₅]-9-glukozyd zeatyny. Następnie ekstrakty 2-krotnie oczyszczano przy użyciu chromatografii kolumnowej, w której wykorzystywano kolumny Sep-Pack Vac Silica (35 ml, Waters, Milford, USA) i odparowywano do fazy wodnej. Ustalano pH ekstraktów do 6,5, by poddać je kolejnemu oczyszczaniu z użyciem kolumn DEAE Sefadeks i Sep-Pack C₁₈. Występujące w ekstraktach cytokininy (formy wolne, rybozydy i glukozydy) były wymywane z kolumny Sep-Pack 5 ml 80% MeOH, po 2-krotnym przemyciu 5 ml zdejonizowanej wody i 3 ml 10% MeOH. Frakcje eluatów odparowywano do sucha w atmosferze azotu. Otrzymane w ten sposób próbki poddawane były analizie jakościowej z wykorzystaniem LC-MS. Z kolei ewentualnie występujące w ekstrakcie fosforany cytokinin były wymywane 10 ml 1 M NH₄HCO₃ z kolumny DEAE Sefadeks. pH próbek neutralizowano i przepuszczano przez kolumnę Sep-Pack C₁₈ z 8 ml 80% MeOH, następnie odparowywano w atmosferze azotu do fazy wodnej. Do otrzymanej próbki dodawano 4 ml 0,1 M Tris (pH 9,6) i kwaśnej fosfatazy (30 min, 37°C). Po neutralizacji roztwór poddawano kolejnemu oczyszczaniu przez Sep-Pack C₁₈, ewentualne nukleotydy cytokinin były wymywane 5 ml 80% MeOH, po 2-krotnym przemyciu 5 ml zdejonizowanej wody i 3 ml 10% MeOH. Frakcje eluatów odparowywano do sucha w atmosferze azotu. Otrzymane w ten sposób próbki poddawane były analizie jakościowej z wykorzystaniem HPLC-MS (Lexa i inni 2003).

Fracje cytokinin podlegały analizie przy użyciu HPLC-MS. Próbkki (10 μ l) były наносzone na kolumnę C_{18} (Phenomenex, AQUA, 2 mm \times 250 mm, 5 μ m) i przemywane 0,001% kwasem octowym i acetonitrylem (5 min 10% nitryl; 10 min 17% acetonitryl, 10 min 46%, acetonitryl z szybkością przepływu 0,2 ml min^{-1} ; temperatura kolumny 30°C). Eluaty poddawano badaniu, stosując spektrometrię mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (220°C, +4,5 kV kapilary, atmosfera azotu) (Lexa i inni 2003).

3.4.10. Oznaczanie zawartości brassinosteroidów w komórkach *Chlorella vulgaris*

Kultury glonów wirowano (4000 rpm, 15 min), a po usunięciu supernatantu zawiesinę *Chlorella vulgaris* zmrażano w ciekłym azocie i liofilizowano przez 48 godzin. Następnie materiał roślinny kruszono w mrożdzierzu. 50 g liofilizowanych glonów ekstrahowano 2-krotnie z 400 ml mieszaniny metanol/chloroform (MeOH-CHCl_3) (4:1), po czym dodawano do ekstraktu po 100 ng [$^2\text{H}_6$]brassinolidu, [$^2\text{H}_6$]kastasteronu, [$^2\text{H}_6$]tyfasterolu, [$^2\text{H}_6$]teasteronu, [$^2\text{H}_6$]6-deoksokastasteronu, [$^2\text{H}_6$]6-deoksotyfasterolu i [$^2\text{H}_6$]6-deoksoteasteronu (Noguchi i inni 1999). Po odparowaniu metanolu w próżni, ekstrakt wytrząsano 3-krotnie wodą. Związki występujące we frakcji chloroformu oczyszczano przy użyciu chromatografii kolumnowej, w której kolumny Sep-Pack Vac Silica (35 ml, Waters, Milford, USA) przemywano 100 ml CHCl_3 , a wypełnione Sefadexsem LH-20 (200 ml) przemywano 2% i 7% MeOH w CHCl_3 . Następnie frakcje MeOH-CHCl_3 (4:1) przepuszczano przez kolumny Sep-Pack Plus C_{18} (Waters, Milford, USA). Eluaty poddawano kolejnemu oczyszczeniu z wykorzystaniem HPLC (Senshu Pak Pegasil ODS, 10 \times 30 mm + Senshu Pak Pegasil ODS, 20 \times 250 mm; Senshu Scientific, Tokyo) z przepływem 8 ml min^{-1} . Wykorzystywano acetonitryl w stężeniu 70% i 90% do oczyszczenia frakcji z 7% i 2% MeOH. W 7% MeOH stwierdzano obecność następujących frakcji brassinosteroidów: brassinolidu (R_t 8–10 min), kastasteronu (R_t 12–14 min), teasteronu (R_t 17–20 min), tyfasterolu (R_t 26–32 min) i 6-deoksokastasteronu (R_t 38–44 min). Z kolei w 2% MeOH stwierdzano obecność następujących frakcji brassinosteroidów: 6-deoksoteasteronu (R_t 32–36 min) i 6-deoksotyfasterolu (R_t 48–52 min). Każda frakcja podlegała analizie z użyciem GC-SIM po przekształceniu w lotne pochodne w procesach derywatywacji: a) bismetanoboracji (frakcje brassinolidu, kastasteronu i 6-deoksokastasteronu) z użyciem kwasu metanoborowego i pirydyny; b) metanoboracji i trimetylosililacji (frakcje teasteronu, tyfasterolu, 6-deoksoteasteronu i 6-deoksotyfasterolu).

Charakterystyka zestawu jonów molekularnych dla brassinosteroidów jest następująca: brassinolid, m/z 534, 528, 338, 332, 161, 155; kastasteron, m/z 518, 512, 287, 161, 155; tyfasterol i teasteron, m/z 550, 544, 535, 529; 6-deokastasteron, m/z 504, 498, 489, 483; 6-deoksotyfasterol i 6-deoksoteasteron, m/z 536, 530, 521, 515, 215. Endogenna zawartość brassinosteroidów, z wyjątkiem brassinolidu, była obliczana ze stosunku powierzchni piku jonu molekularnego standardu do analizowanego związku. Natomiast zawartość brassinolidu obliczano ze stosunku powierzchni piku fragmentu jonów m/z 338 i m/z 332.

3.4.11. Oznaczanie poziomu enzymatycznych antyoksydantów w komórkach *Chlorella vulgaris*

Kultury glonów wirowano (4000 rpm, 15 min), a po usunięciu supernatantu zawiesinę *Chlorella vulgaris* homogenizowano w temperaturze 0–4°C w schłodzonym 50 mM buforze fosforanowym zawierającym 1 mM EDTA- Na_2 i 2% poliwinylpolipyrrolidon. Następnie homogenat wirowano (10 000 rpm, 45 min, 4°C), a supernatant używano do analizy aktywności następujących enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy askorbinianowej (APX) i reduktazy glutationowej (GR).

Oznaczenie aktywności SOD przeprowadzono, stosując metodę spektrofotometryczną (absorbancja 530 nm), w której hydroksyloamina była utleniana do azotynu w temperaturze 25°C (Eltner i Heupel 1976). Z kolei aktywność CAT mierzono poprzez spadek absorbancji przy długości fali 240 nm w temperaturze 25°C. W kuwecie umieszczano 50 mM bufor potasowo-fosforanowy (pH 7,0) i 54 mM wodny roztwór nadtlenu wodoru w buforze potasowo-fosforanowym (pH 7,0). Reakcje inicjowano, dodając ekstrakt enzymatyczny lub roztwór katalazy. Za jednostkę aktywności przyjęto ilość enzymu, który w ciągu jednej minuty rozkłada 1 μmol H_2O_2 (Claiborne 1985, Ahmad i inni 2000). W celu oznaczenia aktywności APX ekstrakt dodawano do mieszaniny reaktywnej zawierającej 0,1 mM askorbinian, 0,1 mM EDTA i 10 mM H_2O_2 w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,0). Aktywność APX mierzono poprzez spadek absorbancji przy długości fali 290 nm przez okres 3 minut (Nakano i Asada 1981). Oznaczenie aktywności GR przeprowadzono dodając do 200 μl ekstraktu enzymatycznego (50 μl 10 mM GSSG, 200 μl 1 mM Na_2EDTA , 1 ml 200 mM buforu potasowo-fosforanowego (pH 8,0)). Całość inkubowano przez 5 minut w temperaturze 25°C. Reakcję inicjowano przez dodanie 50 μl 1 mM NADPH. Utlenianie NADPH monitorowano, mierząc absorbancję przy długości fali 340 nm (Jablonski i Anderson 1978).

3.4.12. Oznaczanie zawartości askorbinianu w komórkach *Chlorella vulgaris*

10 ml kultury glonu wirowano (4000 rpm, 15 min), a po usunięciu supernatantu zawiesinę *Chlorella vulgaris* zamrażano w ciekłym azocie. Następnie materiał roślinny skruszano w mrożdzierzu i homogenizowano z dodatkiem 2 ml 6% kwasu 3-chlorooctowego (TCA). Homogenat wirowano (5000 rpm, 15 min, 4°C), a otrzymany supernatant wykorzystywano do analizy zawartości askorbinianu (Kampfenkel i inni 1995) (tabela 3.4).

Tabela 3.4. Procedura analizy zawartości askorbinianu

Etapy procedur	Związek (ml)	Próba badana	Próba odnośnikowa
I	Przygotowano ekstrakt roślinny lub roztwór standardowy askorbinianu rozpuszczonego w 0,2 ml 6% TCA	0,2	-
II	10 mM ditiotreitrol (DTT) w 0,2 M buforze fosforanowym (pH 7,4)	0,2	0,2
	6% TCA	-	0,2
	0,2 M bufor fosforanowy (pH 7,4)	0,4	0,4
	inkubowano przez 15 minut w temperaturze 42°C w łaźni wodnej		
III	0,5% N-etylmaleimid (NEM)	0,2	0,2
	inkubowano przez 1 minutę w temperaturze 25°C		
IV	10% TCA	1,0	1,0
	42% H ₃ PO ₄	0,8	0,8
	4% 2,2'-dipirydyli w 70% etanolu	0,8	0,8
	3% FeCl ₃	0,4	0,4
	mieszano energicznie		
	inkubowano przez 40 minut w temperaturze 42°C w łaźni wodnej		
V	pomiar absorbancji przy długości fali 525 nm		

4 OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

4.1. Występowanie i biosynteza brassinosteroidów w glonie *Chlorella vulgaris*

W niniejszym rozdziale opisano wyniki badań, dotyczących występowania BR w komórkach glonu *Chlorella vulgaris*. Ponadto określono szlak biosyntezy BR, jak również zmiany zawartości tych związków pod wpływem światła o różnym natężeniu (0 – ciemność, 10, 50, 100 i 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) i barwie: białej, czerwonej i niebieskiej. Jednym z celów było wykazanie regulatorowej roli światła na biosyntezę tych fitohormonów.

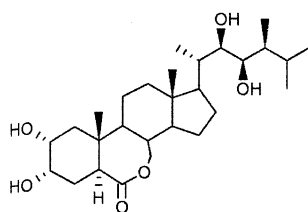
Ekstrakcję i oczyszczanie BR z komórek glonu *Chlorella vulgaris* wykonano poprzez rozdział i odparowywanie do sucha odpowiednich frakcji rozpuszczalników oraz zastosowanie technik chromatograficznych. BR ekstrahowano mieszaniną metanol/chloroform. Związki, które występowały we frakcji metanolu były oczyszczane przy użyciu chromatografii kolumnowej. Z kolei, aby rozdzielić składniki ekstraktu zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC, *ang.* high performance liquid chromatography) oraz chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC/MS, *ang.* gas chromatography/mass spectrometry) (Noguchi i inni 1999). Szczegółowe informacje dotyczące metod analitycznych przedstawia rozdział 3.4.10.

Przeprowadzone badania własne wykazały, że w komórkach glonu *Chlorella vulgaris* występuje trzynaście BR (ryc. 4.1). Spośród wyizolowanych BR dwanaście należy do związków typu C_{28} , natomiast jeden (28-homoBL) za-

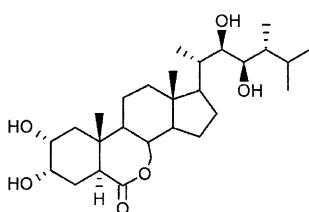
licza się do typu C_{29} , BR typu C_{27} nie stwierdzono w komórkach *Chlorella vulgaris*. Pod względem budowy pierścienia B pięć związków zalicza się do typu 6-okso (CS, TY, TE, 3-DT i CT), kolejne pięć związków do typu 6-deokso (6-deoksoCS, 6-deoksoTY, 6-deoksoTE, 6-deoksoCT i 6-deokso-3-DT), a trzy pozostałe związki do typu 7-oksalakton (BL, 24-epiBL i 28-homoBL). Z uwagi na zróżnicowanie podstawników w łańcuchu bocznym wyróżniono cztery typy BR: pierwszy to 24*S*-metylo (9 związków: BL, CS, TY, TE, 6-deoksoCS, 3-DT, 6-deoksoTY, 6-deoksoTE i 6-deokso-3-DT), drugi – 24*R*-metylo (1 związek: 24-epiBL), trzeci – 24*S*-etylo (1 związek: 28-homoBL) i czwarty typ, charakteryzujący się brakiem podstawnika w pozycji C-23 (2 związki: CT i 6-deoksoCT). Z kolei pod względem ilościowym w komórkach *Chlorella vulgaris* dominuje CS, zaś najmniejszą zawartość wykazuje 24-epiBL (tabela 4.1).

Dotychczas stwierdzono obecność brassinosteroidów (BR) jedynie u trzech gatunków roślin niższych. Z komórek zielenicy płóczni sieciowatej (*Hydrodictyon reticulatum*) wyizolowano jedynie 24-epiCS i 28-homoCS (Yokota i inni 1987). Z kolei z kultur komórkowych porostnicy wielokształtnej (*Marchantia polymorpha*) wyizolowano trzy BR, tzn. TE, 3-DT i TY (Park i inni 1999). Natomiast w skrzypie polnym (*Equisetum arvense*) stwierdzono obecność czterech związków, a mianowicie: dolichosteronu, 28-norCS, CS i 28-norBL (Takatsuto i inni 1990). Ogólnie wykryto obecność dziewięciu różnorodnych hormonów steroidowych, wśród których dominuje osiem BR typu 6-okso i jeden związek należący do typu 7-oksalakton, tj. 28-norBL (Bajguz i Tretyn 2003a, b).

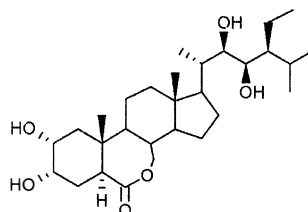
Biorąc pod uwagę liczbę trzynastu wyizolowanych BR z komórek glonu *Chlorella vulgaris*, roślina ta jest jedną z bardziej zasobnych w steroidowe hormony roślinne. Najwięcej BR posiadają tylko niedojrzałe nasiona fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris*) (25 związków), barwinek różyczkowy (*Catharanthus roseus*) (19 związków) czy *Arabidopsis thaliana* (18 związków) (Bajguz i Tretyn 2003a, b, Bajguz 2005). Na uwagę zasługują dwa BR wyizolowane z komórek *Chlorella vulgaris* – 24-epiBL i 28-homoBL, które są metabolitami BL. Na tej podstawie można sądzić, że w *Chlorella vulgaris*, obok typowych związków biosyntezy BR, występują również produkty przemian BL, który uległ reakcji epimeryzacji i metylacji w pozycji C-24.



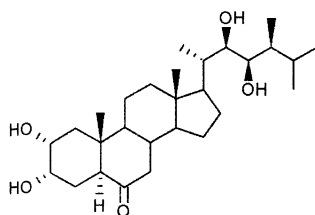
**brassinolid
(BL)**



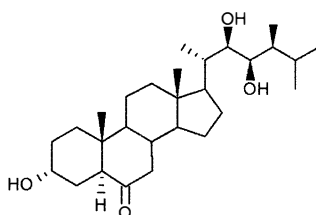
**24-epibrassinolid
(24-epiBL)**



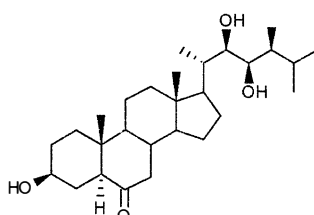
**28-homobrassinolid
(28-homoBL)**



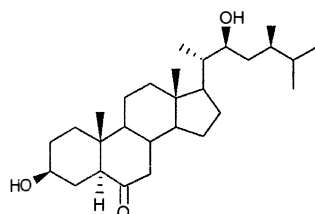
**kastasteron
(CS)**



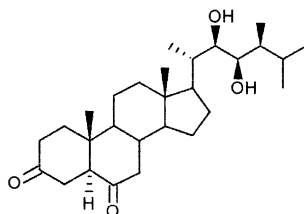
**tyfasterol
(TY)**



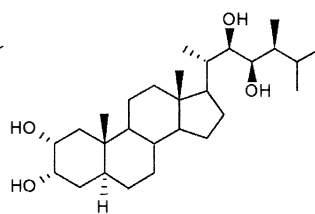
**teasteron
(TE)**



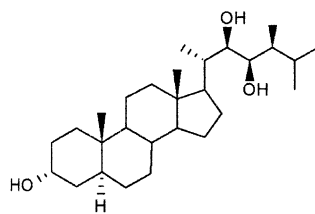
**katasteron
(CT)**



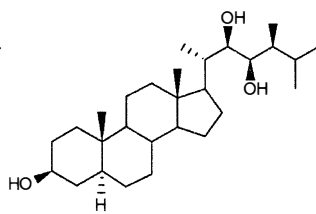
**3-dehydroteasteron
(3-DT)**



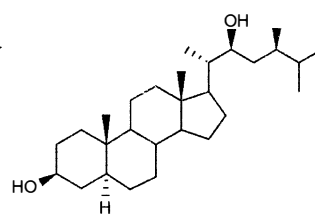
**6-deoksokastasteron
(6-deoksoCS)**



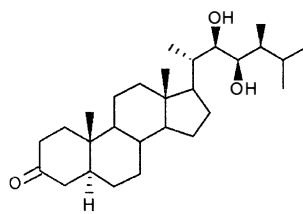
**6-deoksotyfasterol
(6-deoksoTY)**



**6-deoksoteasteron
(6-deoksoTE)**



**6-deoksokatasteron
(6-deoksoCT)**



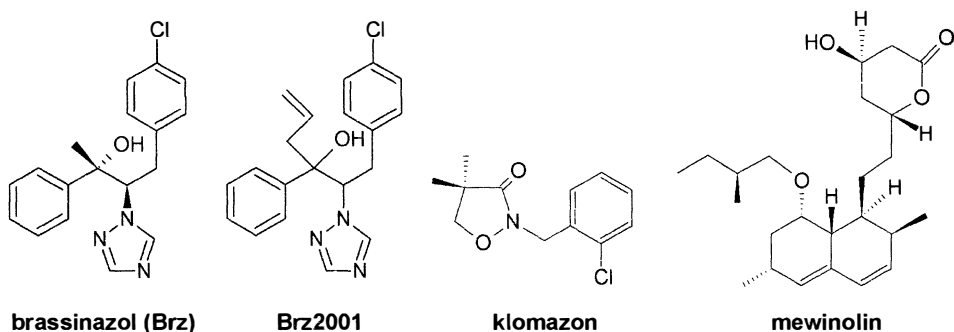
**6-deokso-3-dehydroteasteron
(6-deokso-3-DT)**

Ryc. 4.1. Wzory strukturalne brassinosteroidów wyizolowanych z glonu *Chlorella vulgaris*

Tabela 4.1. Zawartość brassinosteroidów w komórkach glonu *Chlorella vulgaris*

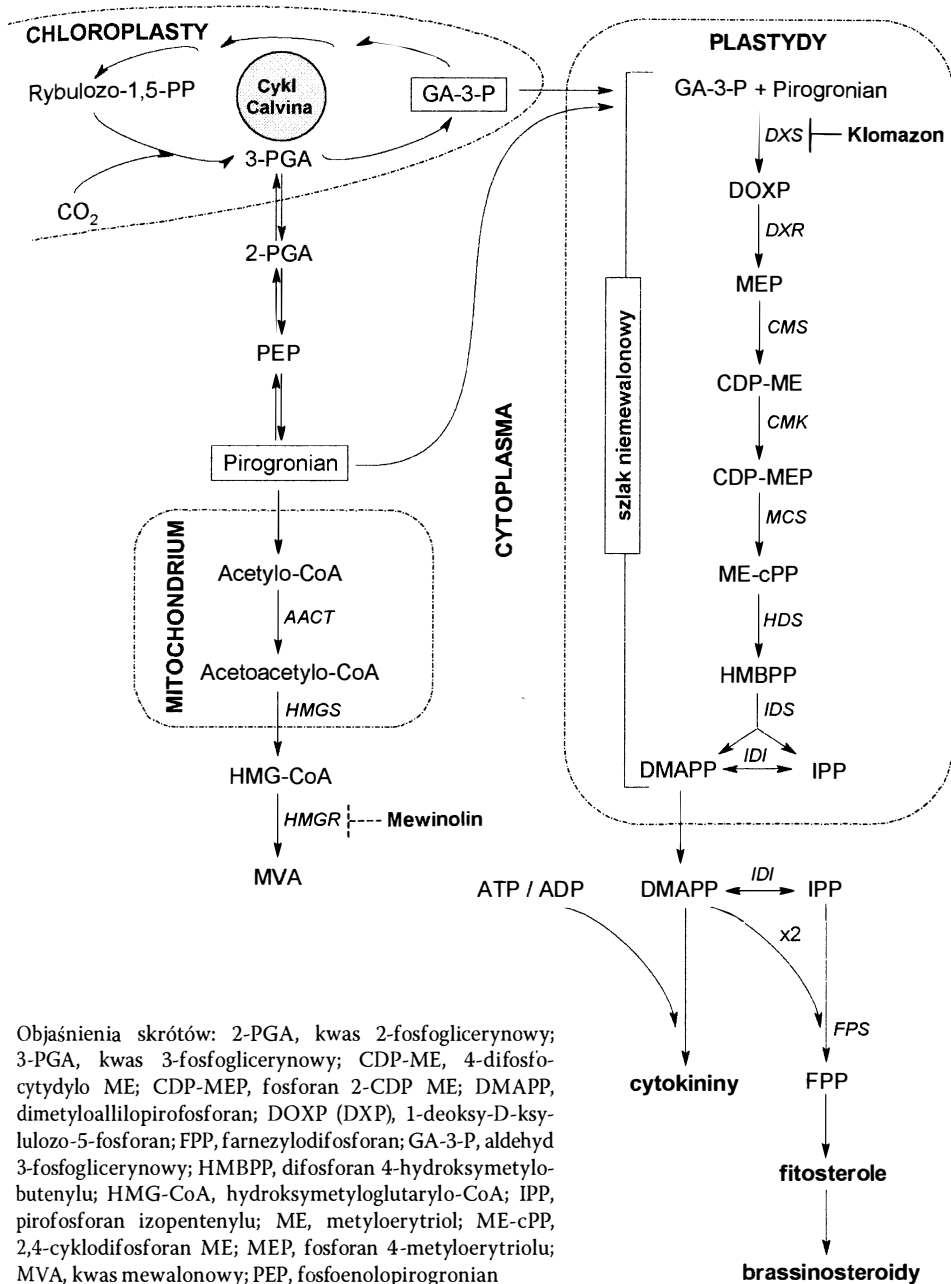
Nazwa związku	Zawartość (fg kom ⁻¹)
Kastasteron (CS)	0,329
6-Deoksokastasteron (6-deoksoCT)	0,267
Tyfasterol (TY)	0,251
6-Deoksokastasteron (6-deoksoCS)	0,223
Teasteron (TE)	0,191
3-Dehydroteasteron (3-DT)	0,173
6-Deoksoteasteron (6-deoksoTE)	0,151
6-Deoksotyfasterol (6-deoksoTY)	0,129
Katasteron (CT)	0,104
28-Homobrassinolid (28-homoBL)	0,101
6-Deokso-3-dehydroteasteron (6-deokso-3-DT)	0,095
Brassinolid (BL)	0,085
24-Epibrassinolid (24-epiBL)	0,062

Biosynteza steroli roślinnych może zachodzić równolegle dwoma szlakami lub jednym z nich – niemewalonowym i/lub mewalonowym (Lichtenthaler 2000, Schwender i inni 2001). W glonie *Chlorella vulgaris* biosynteza steroli przebiega wyłącznie poprzez szlak niemewalonowy (Bajguz i Asami 2004). Jednym z pośrednich dowodów na istnienie tego szlaku jest brak reakcji komórek *Chlorella vulgaris* na działanie specyficznego inhibitora – mewinolinu (Mev) (ryc. 4.2, tabela 4.2) – reakcji hydroksymetyloglutarylo~CoA (HMG~CoA) w kwas mewalonowy (MVA) (ryc. 4.3).



Ryc. 4.2. Wzory strukturalne inhibitorów biosyntezy brassinosteroidów (brassinazol, Brz 2001), szlaku niemewalonowego (kломazon) i mewalonowego (mewinolin)

Miejsce działania tych związków zaznaczono na rycinach 4.3 i 4.5.



Objaśnienia skrótów: 2-PGA, kwas 2-fosfoglicerynowy; 3-PGA, kwas 3-fosfoglicerynowy; CDP-ME, 4-difosfocytydylo ME; CDP-MEP, fosforan 2-CDP ME; DMAPP, dimetyoallilopirofosforan; DOXP (DXP), 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforan; FPP, farnezyldifosforan; GA-3-P, aldehyd 3-fosfoglicerynowy; HMBPPP, difosforan 4-hydroksymetylobutenylo; HMG-CoA, hydroksymetyloglutarylo-CoA; IPP, pirofosforan izopentenylu; ME, metyloerytriol; ME-cPP, 2,4-cyklodifosforan ME; MEP, fosforan 4-metyloerytriolu; MVA, kwas mewalonowy; PEP, fosfoenolopirogronian

AACT, tiolaza acetoacetylo-CoA; CMK, kinaza CDP-ME; CMS, syntaza CDP-ME; DXR, reduktioizomeraza DXP; DXS, syntaza DXP; FPS, syntaza FPP; HDS, syntaza HMBPPP; HMGR, reduktaza HMG-CoA; HMGS, syntaza HMG-CoA; IDI, izomeraza IPP; IDS, syntaza IPP/DMAPP; MCS, syntaza ME-cPP

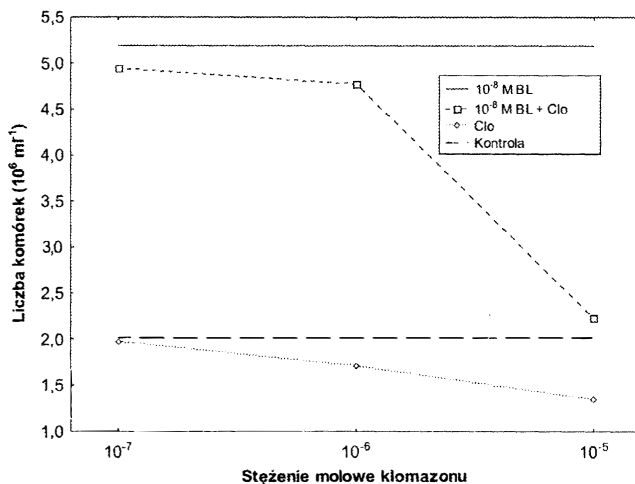
Nazwy enzymów zapisano czcionką pochyloną. Przedstawiono reakcje blokowane przez specyficzne inhibitory – kломazon, brassinazol i nieblokowane – przez mewinolin

Ryc. 4.3. Uproszczony niemewalonowy szlak biosyntezy steroli roślinnych w glonie *Chlorella vulgaris* (wg Bajguz i Asami 2004)

Tabela 4.2. Porównanie liczby komórek *Chlorella vulgaris* w kulturach traktowanych mewnolinem (Mev) i/lub brassinolidem (BL) w odniesieniu do kultur kontrolnych (10^6 komórek ml^{-1} ; $P < 0,05$; $n=20$; wartość średnia \pm SE)

Stężenie	24 godz.	48 godz.
0 (kontrola)	$1,17 \pm 0,02$	$2,02 \pm 0,02$
10^{-8} M BL	$3,17 \pm 0,02$	$5,19 \pm 0,03$
10^{-7} M Mev	$1,15 \pm 0,03$	$2,01 \pm 0,03$
10^{-7} M Mev + 10^{-8} M BL	$3,18 \pm 0,02$	$5,21 \pm 0,03$
10^{-6} M Mev	$1,21 \pm 0,03$	$2,07 \pm 0,02$
10^{-6} M Mev + 10^{-8} M BL	$3,15 \pm 0,01$	$5,12 \pm 0,02$
10^{-5} M Mev	$1,25 \pm 0,02$	$2,09 \pm 0,02$
10^{-5} M Mev + 10^{-8} M BL	$3,14 \pm 0,02$	$5,09 \pm 0,03$

Związkami wyjściowymi szlaku niemewalonowego są pirogronian i aldehyd 3-fosfoglicerynowy, przekształcane w 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforan (ryc. 4.3). Inhibitorem tej reakcji jest kłomazon (Clo) (ryc. 4.2), którego hamujący wpływ na wzrost glonu *Chlorella vulgaris* został przedstawiony na rycinie 4.4. Clo wykazuje największe zahamowanie liczby komórek *Chlorella vulgaris* w stężeniu 10^{-5} M w 48. godzinie hodowli. Najmniejszą aktywnością inhibicyjną Clo charakteryzuje się w stężeniu 10^{-7} M. Niezależnie od zastosowanego stężenia Clo kultury glonów równoległe poddane działaniu 10^{-8} M BL cechuje odwrócenie hamującego działania tego inhibitora. Dochodzi do zwiększenia liczby komórek glonu.



Ryc. 4.4. Wpływ kłomazonu (Clo) na liczbę komórek glonu *Chlorella vulgaris* w odniesieniu do kultur kontrolnych i traktowanych brassinolidem (BL) w stężeniu 10^{-8} M w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)

1-Deoksy-D-ksylulozo-5-fosforan, poprzez szereg reakcji, tworzy pirofosforan izopentenylu (IPP), czyli aktywny izopren, który częściowo przekształca się w dimetyloallilopirofosforan (DMAPP) (ryc. 4.3). Następnie DMAPP, łącząc się z cząsteczką ATP lub ADP, poprzez szereg związków prowadzi do powstania cytokininy – zeatyny, występującej w dwóch formach izomerycznych: *trans* i *cis* (zob. rozdział 4.3). Ponadto poprzez syntezę IPP i DMAPP tworzy się farnezylodifosforan (FPP), którego dwie cząsteczki łączą się w obecności swoistej ligazy w skwalen – 30-węglowy węglowodór (Bajguz i Asami 2004, 2005). Skwalen ulega przemianie do cykloartenolu, następnie do desmosterolu, który w wyniku uwodornienia tworzy cholesterol, jako związek wyjściowy w biosyntezie BR typu C_{27} . Z kolei w wyniku metylacji podwójnego wiązania, $\Delta^{24(25)}$, w łańcuchu bocznym cykloartenolu tworzy się cykloaudenol, cyklosadol i 24-metylenocykloartanol, który w wyniku kolejnej metylacji tworzy 24-metylenocholesterol oraz izofukosterol. Epimeryzacja 24-metylenocholesterolu do 24-metylodesmosterolu i jego uwodornienie powoduje przekształcenie się w kampesterol – związek prekursorowy w biosyntezie BR typu C_{28} (Fujioka i inni 2002, Fujioka i Yokota 2003, Bajguz i Asami 2004, 2005).

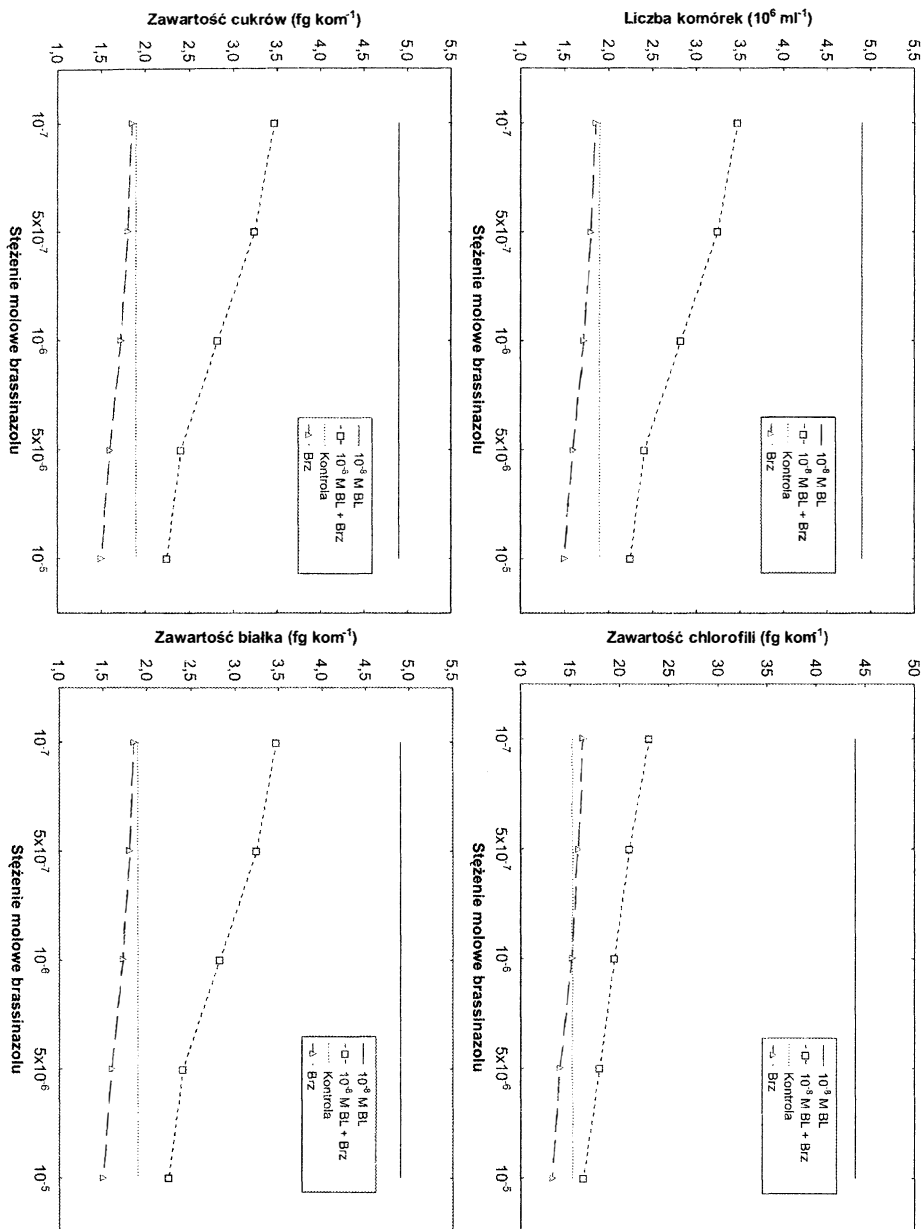
U wielu roślin biosynteza BR rozpoczyna się poprzez wielostopniowy ciąg reakcji kampestanolu, który rozgałęzia się na tzw. wczesny i późny szlak C6 utleniania. Badania własne potwierdziły jednoczesne występowanie obu szlaków biosyntezy BR w glonie *Chlorella vulgaris* (ryc. 4.5). W obu przypadkach dochodzi do powstania CS, związku będącego bezpośrednim prekursorem BL. W szlaku wczesnego C6 utleniania kampestanol (CN) jest hydrolizowany w pozycji C-6 do 6 α -hydroksykampestanolu (6-OH-CN). Następnie powstały związek ulega utlenianiu do 6-oksokampestanolu (6-oksoCN), który po hydroksylacji w pozycji C-22 daje pierwszy BR, obecny w kulturach *Chlorella vulgaris* – katasteron (CT), czyli 6-deokso-22 α -hydroksyCN. Związek ten ulega hydroksylacji, zachodzącej w pozycji węgla C-23, tworząc TE, który w wyniku utleniania katalizowanego przez dehydrogenazę TE jest przekształcany w 3-DT. Z kolei redukcja w pozycji C-3 z udziałem reduktazy 3-DT powoduje powstanie TY. Następnie TY, w wyniku hydroksylacji w pozycji C-2, ulega przemianie do CS. Ogólna zawartość BR w komórkach *Chlorella vulgaris*, dotycząca związków charakterystycznych dla szlaku wczesnego C6 utleniania, wynosi 1,048 fg kom⁻¹ (tabela 4.3).

Tabela 4.3. Zawartość brassinosteroidów w komórkach glonu *Chlorella vulgaris* nie-traktowanych i traktowanych inhibitorem biosyntezy brassinosteroidów – brassinazolem

Zawartość brassinosteroidów (fg kom ⁻¹)		
Nazwa związku	- Brz	+ Brz (10 ⁻⁵ M)
6-DeoksoCT	0,267	0,078
6-DeoksoTE	0,151	0,044
6-Deokso-3-DT	0,095	0,027
6-DeoksoTY	0,129	0,052
6-DeoksoCS	0,223	0,066
Ogółem związki szlaku późnego C6 utleniania:	0,865	0,267
Katasteron (CT)	0,104	0,043
Teasteron (TE)	0,191	0,077
3-Dehydroteasteron (3-DT)	0,173	0,046
Tyfasterol (TY)	0,251	0,097
Kastasteron (CS)	0,329	0,121
Ogółem związki szlaku wczesnego C6 utleniania:	1,048	0,384
Brassinolid (BL)	0,085	0

W *Chlorella vulgaris* deoksoCT powstaje poprzez bezpośrednie przekształcenie się z kampestanolu (CN) (szlak późnego C6 utleniania). Po przekształceniu się 6-deoksoCT w 6-deoksoTE zachodzi proces 3-epimeryzacji do 3-dehydro-6-deoksoTE, który przechodzi w 6-deoksoTY. Reakcje te wykazują podobieństwo do przemian TE w szlaku wczesnego C6 utleniania. Następnie 6-deoksoTY jest przekształcany w 6-deoksoCS, który poprzez utlenianie w C-6 daje CS. Ogólna zawartość BR w komórkach *Chlorella vulgaris* związków szlaku późnego C6 utleniania wynosi 0,865 fg kom⁻¹. Najaktywniejszym hormonem jest 6-deoksoCT, którego zawartość wynosi 0,267 fg kom⁻¹ (tabela 4.3). W wielu roślinach przemianie 6-deoksoCS w CS towarzyszy dodatkowo proces hydroksylacji, w wyniku którego tworzy się związek pośredni 6 α -OH-CS. Jednak z komórek *Chlorella vulgaris* nie udało się wyizolować tego związku. Przyczyną jest zbyt niskie stężenie tego związku poniżej poziomu detekcji. Przekształcenie CS w BL odbywa się poprzez reakcję typu Baeyer-Villigera – wstawienie atomu tlenu w pierścień B pomiędzy atomy węgla C-6 i C-7. Zawartość BL w komórkach *Chlorella vulgaris* jest najniższa ze wszystkich wyizolowanych związków wchodzących w reakcje biosyntezy BR (tabela 4.3).

Przemiana CS w BL została dotychczas stwierdzona wyłącznie w kulturach komórkowych (Suzuki i inni 1993, 1994a, b, Fujioka i inni 1995b, 2000b) i sadzonkach barwinka różyczkowego (*Catharanthus roseus*) (Yokota i inni 1990, Suzuki i inni 1994b, 1995a, b), sadzonkach tytoniu (*Nicotiana taba-*



Ryc. 4.6. Wpływ brassinazolu (Brz) na liczbę komórek oraz zawartość chlorofilu, cukrów i białka w glonie *Chlorella vulgaris* w odniesieniu do kultur kontrolnych i traktowanych brassinolidem w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)

cum), ryżu siewnego (*Oryza sativa*) (Suzuki i inni 1995a, b) i *Arabidopsis thaliana* (Kim i inni 2005). Spośród naturalnie występujących BR wykazano, że BL jest najbardziej aktywnym biologicznie związkami (zob. rozdział 4.2). Dowodzi to, że BL z 6-okso-7-oksą grupą laktonową w pierścieniu B jest końcowym produktem szlaku biosyntezy BR.

Specyficznym inhibitorem biosyntezy BR w *Chlorella vulgaris* jest syntetyczny analog chemiczny paklobutrazolu, 4-(4-chlorofenylo)-2-fenylo-3-(1,2,4-triazoilo)butan-2-ol – brassinazol (Brz) (Asami i Yoshida 1999). Związek ten blokuje proces utleniania BR w pozycji C-22 w szlaku wczesnego (6-oksoCN w CT i CT w TE) oraz późnego (CN w 6-deoksoCT i 6-deoksoCT w 6-deoksoTE) C6 utleniania (tabela 4.3). Po jego dodaniu do pożywki dochodzi do około 70% zmniejszenia zawartości BR w komórkach *Chlorella vulgaris*. Ponadto kultury glonu traktowane przez Brz w zakresie stężeń 10^{-7} – 10^{-5} M charakteryzują się zahamowaniem wzrostu i rozwoju (ryc. 4.6). Z kolei stężenia poniżej 10^{-7} M Brz nie wywierają żadnego efektu inhibicyjnego, ponieważ liczba komórek kultur narażonych na działanie Brz była zbliżona do kultur kontrolnych (danych nie przedstawiono). Brz wykazuje najbardziej inhibicyjny wpływ na liczbę komórek *Chlorella vulgaris* pod wpływem stężenia 10^{-5} M. Zastosowanie mieszaniny Brz i 10^{-8} M BL spowodowało zniesienie hamującego działania inhibitora. Niezależnie od użytego stężenia Brz zaobserwowano działanie stymulujące na liczbę komórek *Chlorella vulgaris* w porównaniu do kultur kontrolnych. Podobny efekt działania Brz stwierdzono, badając zawartość chlorofili, cukrów i białka. Najsilniej hamująco oddziałuje Brz w stężeniu 10^{-5} M, najsłabiej w 10^{-7} M. Efekt inhibicyjny był znoszony przez dodanie BL do kultur glonu.

Regulacja biosyntezy BR w glonie *Chlorella vulgaris* poprzez działanie światła o zróżnicowanym natężeniu oświetlenia i barwie została przedstawiona w rozdziale 4.4.

Na podstawie wyników uzyskanych w tej części badań wyciągnięto następujące wnioski:

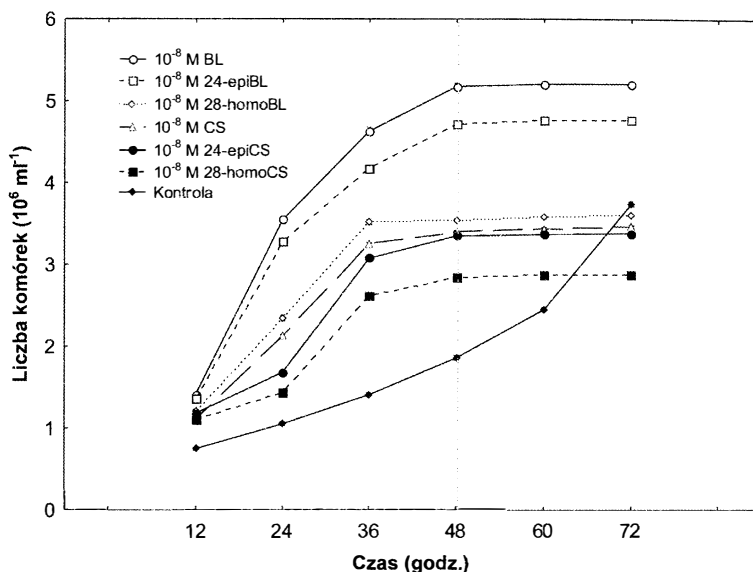
1. W komórkach glonu *Chlorella vulgaris* stwierdzono występowanie następujących brassinosteroidów: brassinolid, 24-epibrassinolid, 28-homobrassinolid, teasteron, 3-dehydroteasteron, 6-deokso-3-dehydroteasteron, 6-deoksoteasteron, tyfasterol, 6-deoksotyfasterol, kasteron, 6-deoksokasteron, kastasteron, 6-deoksokastasteron;
2. Biosynteza BR w *Chlorella vulgaris* zachodzi poprzez niemewalonowy szlak biosyntezy steroli, dla porównania w roślinach wyższych przez mewalonowy i/lub niemewalonowy szlak biosyntezy steroli;

3. W komórkach *Chlorella vulgaris* występują równolegle dwa szlaki biosyntezy BR: późny i wczesny C6 utleniania, dominującym okazał się szlak wczesnego C6 utleniania;
4. Intensywność światła była regulatorem biosyntezy BR w *Chlorella vulgaris*:
 - wraz ze wzrostem natężenia oświetlenia (0–100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) zwiększała się zawartość BR;
 - wysokie natężenie oświetlenia (500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) spowodowało obniżenie się zawartości BR;
 - w ciemności nie stwierdzono obecności BL, co oznacza że światło inicjuje przemianę CS w BL (zob. rozdział 4.4);
5. Barwa światła (białe, niebieskie, czerwone) była regulatorem biosyntezy BR w *Chlorella vulgaris*:
 - niezależnie od zastosowanego rodzaju światła szlaki późnego i wczesnego C6 utleniania przebiegają równolegle, przy czym dominującym był również szlak wczesnego C6 utleniania;
 - światło białe było stymulatorem przemiany CS w BL;
 - światło czerwone i niebieskie było inhibitorem przemiany CS w BL, egzogenne podanie BL kulturom *Chlorella vulgaris*, rosnącym wyłącznie na świetle czerwonym, spowodowało odblokowanie tej przemiany (zob. rozdział 4.4).

4.2. Wpływ brassinosteroidów na wzrost *Chlorella vulgaris*

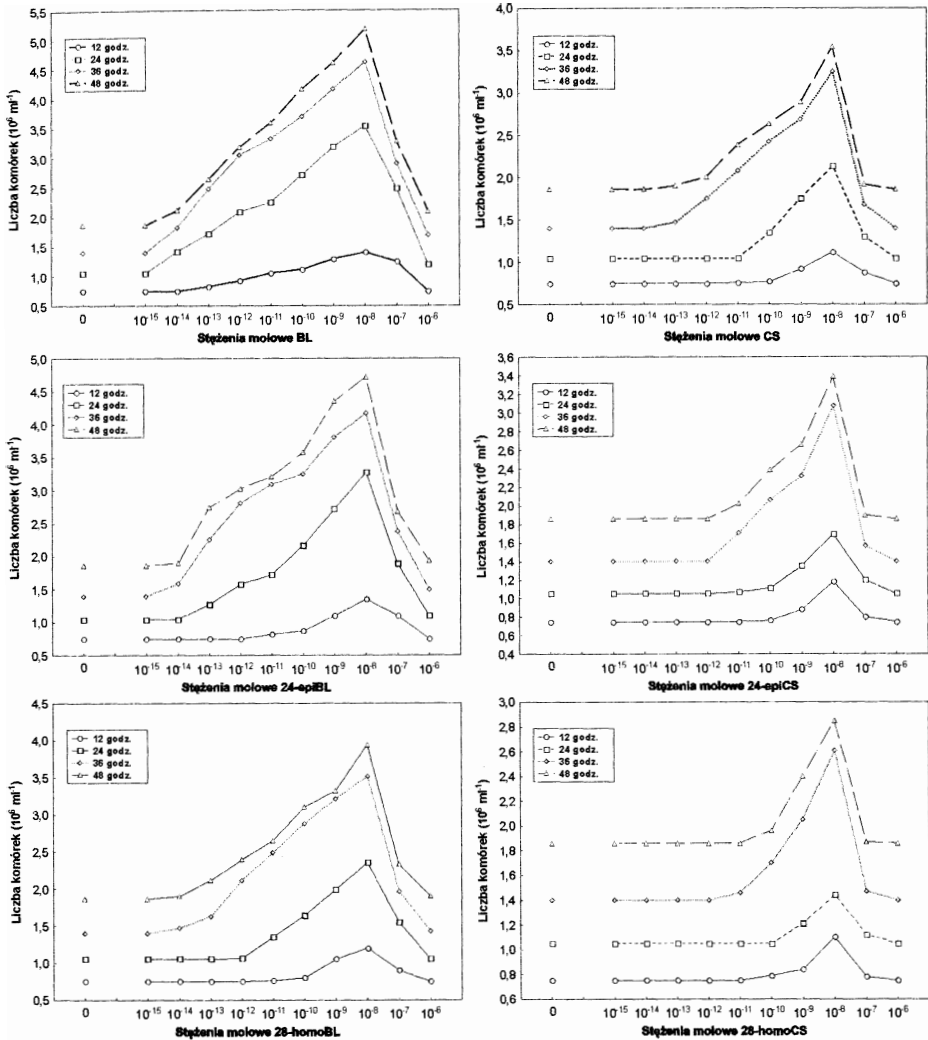
W niniejszym rozdziale przedstawiono wpływ brassinosteroidów (BR) na wzrost glonu *Chlorella vulgaris*, wyrażony liczbą komórek w stałej objętości pożywki. Pozostałe parametry takie, jak: wpływ protonów z komórek do pożywki (pH), komórkowa zawartość kwasów nukleinowych, białek, chlorofili, karotenoidów, cukrów, fosforu organicznego i nieorganicznego oraz wydzielanie pozakomórkowe białek, cukrów, kwasu glikolowego oraz intensywność procesu fotosyntezy, zostały szczegółowo zaprezentowane w pracy doktorskiej (Bajguz 1997) oraz związanych z nią artykułach (Bajguz i Czerpak 1996, 1998, Bajguz 2000a).

W pierwszej fazie badań zastosowano BR, należące do dwóch typów związków, a mianowicie 7-oksalaktone (brassinolid, BL; 24-epiBL; 28-homoBL) i 6-okso (kastasteron, CS; 24-epiCS; 28-homoCS). Kultury glonu, kontrolne



Ryc. 4.7. Wpływ optymalnego stężenia brassinosteroidów na wzrost *Chlorella vulgaris* w trakcie 72-godzinnej hodowli (SE < 5%)

i traktowane 10^{-8} M BL, poddano 72-godzinnej hodowli, a pomiary liczby komórek wykonywano co 12 godzin (ryc. 4.7). Dane dotyczące optymalnego stężenia oparto na równoległe przeprowadzonych doświadczeniach z BR w zakresie stężeń 10^{-15} – 10^{-6} M w czasie 48-godzinnej hodowli (ryc. 4.8). Zmiany w liczebności komórek *Chlorella vulgaris* w warunkach kontrolnych następują stopniowo wraz z upływem czasu hodowli. Największy przyrost liczby komórek odnotowano w trzeciej dobie hodowli, zwłaszcza pomiędzy 60. a 72. godziną. Krzywa wzrostu nie miała tu „klasycznego” kształtu. Natomiast BL i 24-epiBL najefektywniej działały w pierwszej dobie hodowli, a krzywa wzrostu kultur poddanych działaniu tych BR charakteryzuje się „klasycznym” przebiegiem. Z uzyskanych danych wynika również, że najbardziej stymulujący wpływ na wzrost i rozwój glonu *Chlorella vulgaris* wywierały wszystkie BR w stężeniu 10^{-8} M w 48. godzinie hodowli. BR stosowane w optymalnym dla rozwoju stężeniu wykazały 2–3-krotny wzrost liczby komórek glonu. Największą aktywność wykazywał BL, zaś najmniejszą aktywnością charakteryzował się 28-homoCS. Pod wpływem 10^{-8} M BR pomiędzy 12. a 48. godziną trwania hodowli liczba komórek *Chlorella vulgaris* wzrastała liniowo. Z kolei pomiędzy 48. a 72. godziną działania BR zaobserwowano wyłącznie nieznaczny przyrost liczby komórek, który spowodowany był zahamowaniem tempa podziałów komórkowych. Zjawisko to nosi nazwę fazy stagnacji, która w warunkach kontrolnych pojawia się dopiero po 168 godzinach, czyli 7 dniach hodowli (dane nie prezentowane).



Ryc. 4.8. Wpływ różnych stężeń brassinosteroidów na wzrost *Chlorella vulgaris* podczas 48-godzinnej hodowli (SE < 5%)

Do dalszych eksperymentów z kulturą glonu *Chlorella vulgaris*, poddaną działaniu różnych czynników hormonalnych i stresowych wybrano stężenie 10^{-8} M BL, niekiedy 10^{-8} M CS oraz 48. godzinę okresu ich działania (zob. rozdziały 4.3–4.6).

Skrócenie cyklu rozwojowego oraz 2–3-krotne przyspieszenie jego przebiegu w ciągu 48 godzin hodowli glonu sugeruje, że następuje zwiększenie tempa procesu transkrypcji i translacji (Bajguz i Czerpak 1998). Mechanizm

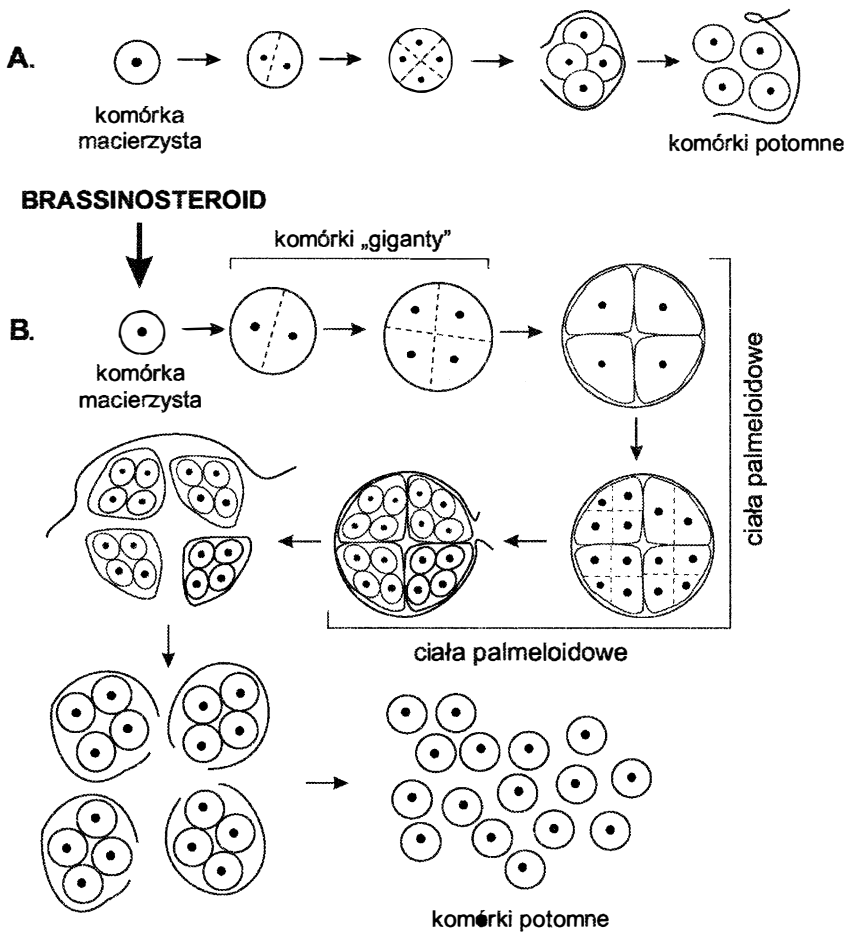
działania hormonów roślinnych jest związany z powstaniem kompleksu hormon-receptor komórkowy. Badanie kinetyki odpowiedzi hormon-receptor pozwoliło na wyróżnienie tzw. odpowiedzi szybkich, rozpoczynających się w bardzo krótkim czasie po potraktowaniu hormonem kultur roślinnych oraz odpowiedzi powolnych, których czas reakcji następuje po dłuższym okresie, zwykle mierzonym w dziesiątkach minut lub w godzinach. W odpowiedziach szybkich kompleks hormon-receptor uczestniczy bezpośrednio w realizacji regulowanego procesu. Natomiast w odpowiedziach powolnych powstanie tego kompleksu inicjuje funkcjonowanie łańcucha transdukcji sygnału, w następstwie którego dochodzi do modyfikacji selektywnej ekspresji genów, które kodują białka, uczestniczące w aktywacji procesu fizjologiczno-biochemicznego rośliny (Lewak 1995, Davies 2004). Silne oddziaływanie BR na wzrost glonu można tłumaczyć w oparciu o kwasową teorię wzrostu, która zakłada, że w plazmolemie zlokalizowana jest pompa protonowa aktywowana przez BR. Hormony te inicjują kaskadę reakcji: transport aktywny jonów wodorowych z komórki do apoplastu, czego następstwem jest zakwaszenie ściany komórkowej. Spadek pH wpływa na rozluźnienie struktury micelarnej, czemu towarzyszy wzrost ciśnienia turgorowego. W konsekwencji następuje zwiększenie wielkości komórek glonu (Rayle i Cleland 1992, Bajguz i Czerpak 1996). Jest to jeden z czynników powodujących gigantyzm komórek macierzystych (ryc. 4.9), których wielkość pod wpływem różnorodnych BR została przedstawiona w tabeli 4.4. Największy 2,5-krotny wzrost objętości komórek zachodzi pod wpływem 10^{-8} M BL. Prawie 2-krotny wzrost wielkości komórek uzyskano, stosując 10^{-8} M 24-epiBL i 28-homoBL. Niewielkie zmiany w objętości komórek stwierdzono w kulturach traktowanych pochodnymi CS.

Tabela 4.4. Średnica komórek gigantycznych *Chlorella vulgaris* (μm) w 48. godzinie działania brassinosteroidów

Stężenie	BR typu 7-oksalakton			BR typu 6-okso		
	BL	24-epiBL	28-homoBL	CS	24-epiCS	28-homoCS
0	24	24	24	24	24	24
10^{-8} M	60	51	45	39	34	29

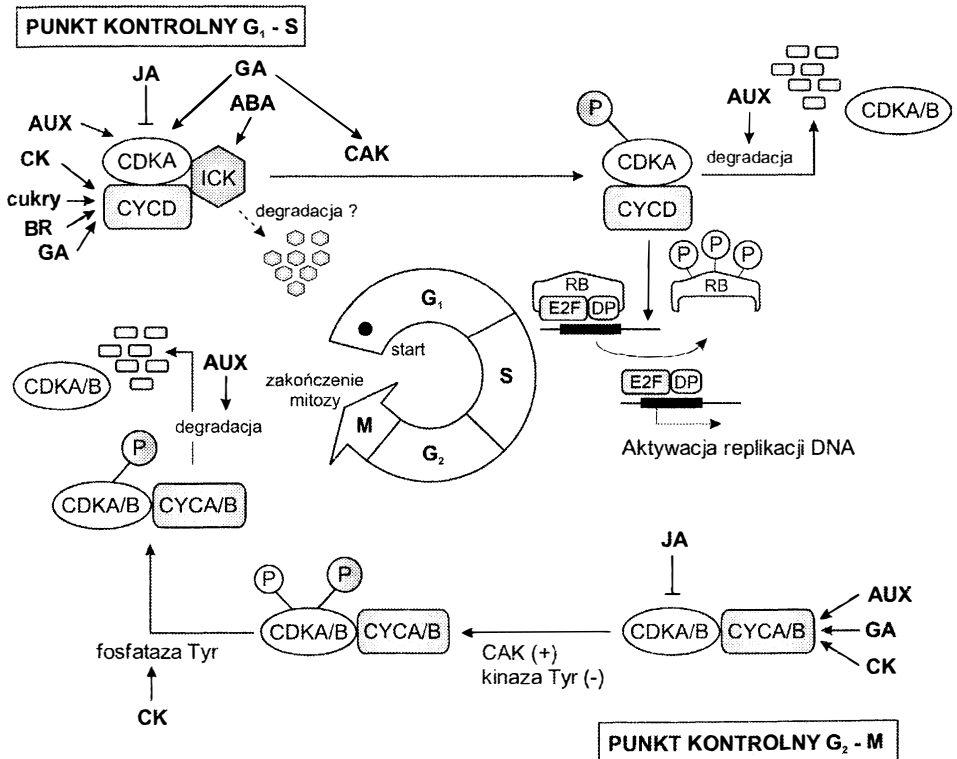
BR, posiadające 7-oksalakton w pierścieniu B (np. 24-epiBL, 28-homoBL), wykazują wyższą aktywność niż ich 6-keetonowe odpowiedniki, tzn. 24-epiCS i 28-homoCS. Położenie grupy metylowej w pozycji C-24S (np. 24-epiBL, 24-epiCS) wpływa na podwyższenie aktywności biologicznej w stosunku do BR typu C₂₉ (np. 28-homoBL, 28-homoCS). Ponadto BR z bocznym łańcuchem

stigmastanu (np. 28-homoBL, 28-homoCS i ich analogi) charakteryzują się większą aktywnością niż BR z łańcuchem ergostanu (np. 24-epiBL, 24-epiCS i ich analogi). Wyjątek stanowi 22S,23S-24-epiBL, który jest bardziej aktywny biologicznie niż 22S,23S-28-homoBL (Brosa 1999). Zmianę aktywności biologicznej w zależności od struktury chemicznej BR stwierdzono również u roślin naczyniowych, tj. pomidora (*Lycopersicon esculentum*) i ryżu siewnego (*Oryza sativa*). Wykazano, że przyłączenie kolejnej grupy metylowej do węgla C-24 w bocznym łańcuchu alifatycznym powoduje osłabienie aktywności BL (Roddick 1994).



Ryc. 4.9. Cykl rozwojowy komórek *Chlorella vulgaris* nietraktowanych (A) i traktowanych (B) egzogennymi brassinosteroidami

Regulacja cyklu komórkowego polega na uruchamianiu kaskadowych reakcji fosforylacji i defosforylacji charakterystycznych białek, prowadzonych z określonymi kinazami i fosfatazami (ryc. 4.10). W regulacji cyklu komórkowego biorą udział cykliny i zależne od nich kinazy białkowe (CDK) (D'Agostino i Kieber 1999, Horvath i inni 2003). Wpływ na podziały komórkowe posiadają hormony roślinne takie, jak: auksyny (AX), BR, cytokiny (CK), gibereliny (GA), kwas abscysynowy (ABA) i kwas jasmonowy (JA). Po zakończeniu mitozy CDK, występująca w formie nieaktywnej, ulega aktywacji w trakcie fazy G_1 w wyniku przyłączenia odpowiednich cyklin (CYC), dysocjacji białka inhibitorowego CDK (ICK). Ekspresję ICK może indukować ABA. Kompleks CycD-CDK bierze udział w hiperfosforylacji białka Rb (*ang.* retinoblastoma), które po modyfikacji nie tworzy kompleksów z czynnikiem elongacyjnym E2F. Dzięki temu wolny E2F jest zdolny do indukcji ekspresji genów niezbędnych do wejścia komórki w fazę S. BR indukuje ekspresję genu



Ryc. 4.10. Kontrola cyklu komórkowego u roślin przez cykliny i kinazy zależne od cyklin (wg Horvath i inni 2003, zmodyfikowano)

Objaśnienia skrótów w tekście

CycD3, kodującego cykliny, które – aktywując odpowiednie kinazy – kontrolują przejście komórki z fazy G_1 do S w mutacie *det2* i *bri1 Arabidopsis thaliana* (Hu i inni 2000). Podobną stymulacją cechują się cytokininy z tą różnicą, że działanie BR nie wynika z modyfikacji istniejących białek, lecz wymaga syntezy niezidentyfikowanego peptydu. BR mogą również kontrolować drugi tzw. punkt krytyczny cyklu mitotycznego, który występuje na granicy faz G_2 i M. W etiolowanych siewkach *Arabidopsis* pod wpływem BR stwierdzono wzrost ekspresji genu *CDC2b*, którego białko wykazuje zdolność do wiązania się z cyklinami. Jednak w jego łańcuchu polipeptydowym nie występuje sekwencja aminokwasowa PSTAIRE, charakterystyczna dla CDK. Interesujące, lecz nie do końca poznane wydaje się współdziałanie BR z cytokinunami i auksynami na przebieg i regulację cyklu komórkowego.

Prawdopodobnie BR wraz z auksynami i cytokinunami pobudzają syntezę i aktywność specyficznej kinazy $p34^{cdc2}$, która reguluje proces endoreplikacji DNA oraz kontroluje przejście fazy G_2 w M podczas cyklu komórkowego (Hu i inni 2000, Horvath i inni 2003). Dochodzi do aktywacji polimerazy DNA α i δ replikującej chromosomową DNA. Do tego procesu wzmaga się aktywność polimerazy β , uczestniczącej w procesie naprawy nowo zsyntetyzowanej nici DNA. Stymulacja aktywności polimeraz przez cytokininy odbywa się na drodze posttranslacyjnej obróbki cząsteczki białka. Wzrostowi poziomu endoreplikacji towarzyszy również wzmożona synteza wszystkich rodzajów RNA i białek. Zwiększenie zawartości DNA jest skorelowane z powiększeniem się zarówno objętości jąder komórkowych, jak i samych komórek (Nicolov 1997). Podobną zależność stwierdzono w komórkach *Chlorella vulgaris* traktowanych BR charakteryzującymi się wzrostem zawartości DNA na komórkę, z jednoczesnym 2–2,5-krotnym zwiększeniem ich średnicy (Bajguz 2000a). Jednakże nie musi występować bezpośredni związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy zawartością DNA a wielkością komórek. Może dochodzić do wzrostu liczby kopii (poprzez endoreplikację) genów, które odpowiadają za przyspieszenie metabolizmu i proliferacji komórek.

Na podstawie wyników uzyskanych w tej części badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Brassinosteroidy zastosowane w zakresie stężeń 10^{-15} – 10^{-6} M osiągały optymalne działanie w stężeniu 10^{-8} M;
2. 72-godzinna hodowla kultur glonu traktowana brassinosteroidami cechowała się dwiema fazami wzrostu *Chlorella vulgaris*: logarytmiczną – pomiędzy 12. a 48. godziną i stagnacji – pomiędzy 48. a 72. godziną. Kultury kontrolne wykazały jedynie fazę wzrostu logarytmicznego;

3. Pod wpływem brassinosteroidów uaktywniły się nowe formy rozrodcze w cyklu komórkowym *Chlorella vulgaris* o kilkakrotnie większej średnicy, a mianowicie komórki „giganty” i ciała palmeloidowe, co prowadziło do szybkiego zwiększenia liczby komórek;
4. Szereg aktywności biologicznej zastosowanych brassinosteroidów przedstawiał się następująco: brassinolid > 24-epibrassinolid > 28-homobrassinolid > kastasteron > 24-epikastasteron > 28-homokastasteron;
5. Największą aktywność biologiczną posiadały brassinosteroidy o następującej budowie chemicznej: 7-oksalakton w pierścieniu B, połączenie *trans* pierścieni A/B, grupy hydroksylowe w położeniu 2 α ,3 α w pierścieniu A, konfiguracja *RR* grup hydroksylowych w pozycji C-22, C-23 w łańcuchu bocznym, podstawniki metylowe lub etylowe w pozycji C-24S.

4.3. Współdziałanie brassinosteroidów z auksynami i cytokininami na ich endogenną zawartość, wzrost i biochemizm glonu *Chlorella vulgaris*

Aktywność biologiczna hormonów roślinnych oraz specyficzne odpowiedzi tkankowe są związane z ich stężeniem komórkowym oraz wzajemnymi stosunkami ilościowymi fitohormonów. Aby utrzymać właściwy poziom aktywnych hormonów, rośliny wykształciły skomplikowany mechanizm regulacji, który jest podatny na sygnały środowiskowe. Działanie fitohormonów zasadniczo polega na regulacji metabolizmu kwasów nukleinowych i białek poprzez ich wpływ na procesy replikacji, transkrypcji i translacji (Weyers i Paterson 2001, Davies 2004). Na intensywność procesów metabolicznych substancje wzrostowe mogą wpływać stymulująco bądź hamująco. Właściwości te zależą przede wszystkim od ich budowy chemicznej, struktury przestrzennej, stężenia, powinowactwa do odpowiednich receptorów, przynależności roślin, ich stanu fizjologicznego i metabolicznego, a także od warunków środowiskowych, np. temperatury, światła, pH, składników mineralnych czy stężenia CO₂ (Kacperska 1995, 2002). Zawartość endogenna hormonu jest wynikiem złożonych procesów metabolicznych takich, jak: biosynteza, koniugacja i degradacja oraz transport hormonu. Procesy te podlegają skoordynowanej regulacji, zapewniającej homeostazę hormonalną, istotną dla prawidłowego funkcjonowania rośliny. Fitohormony mogą

wzajemnie na siebie oddziaływać, zwiększając lub zmniejszając intensywność procesów biologicznych lub wywoływać przeciwstawne działanie na ten sam proces. Stąd też wyróżnia się następujące rodzaje współdziałania: addytywne, synergistyczne czy antagonistyczne (Weyers i Paterson 2001, Davies 2004, Del Pozo i inni 2004).

Występowanie auksyn i cytokinin w organizmach roślinnych jest powszechne (Davies 2004). Główną naturalną auksyną jest kwas indolilo-3-octowy (IAA), który charakteryzuje się największą aktywnością biologiczną. Ponadto stwierdzono szereg pochodnych IAA takich, jak: aldehyd indolilo-3-octowy, nityl kwasu indolilo-3-octowego, indolilo-3-acetamid, kwasy: indolilo-3-propionowy, indolilo-3-pirogronowy, indolilo-3-mlekowy, indolilo-3-glikolowy, indolilo-3-karboksyłowy oraz estry metylowe i etylowe IAA, których aktywność biologiczna jest mniejsza w porównaniu z IAA (Normanly 1997, Jakubowska 2004). Auksyny mogą występować w postaci wolnej, czyli aktywnej metabolicznie lub związanej estrowo, glikozydowo lub kompleksowo w połączeniu z alkoholami, cukrami, białkami i jonami metali. Z kolei cytokininy występują głównie w postaci wolnej, często jako koniugaty kwasów nukleinowych i białek (Kaminek i inni 1992, Barciszewski i inni 2000, Czerpak i Piotrowska 2003). Pod względem budowy chemicznej cytokininy zalicza się do pochodnych adeniny (cytokininy purynowe) i pochodnych mocznika (cytokininy mocznikowe). Cytokininy purynowe zawierają niepolarne alifatyczne lub aromatyczne podstawniki w pozycji N^6 pierścienia adeniny. W związku z tym wyróżniamy purynowe cytokininy izoprenowe i aromatyczne. Do najbardziej znanych cytokinin należy benzyloadenina (BA), zeatyna (Z), N^6 -(Δ^2 -izopentenylo)adenina (iP), N^6 -furfuryloadenina (kinetyna). Dotychczas w roślinach nie stwierdzono występowania cytokinin mocznikowych (Binns 1994, Harberer i Kieber 2002). Na drodze syntezy chemicznej uzyskano ponad 500 związków cytokinino-podobnych, spośród których najbardziej aktywny jest 1,3-difenylmocznik (DPU).

W niniejszym rozdziale przedstawiono występowanie auksyn i cytokinin w glonie *Chlorella vulgaris* oraz ich współdziałanie z brassinosteroidami w regulacji biosyntezy oraz aktywności biologicznej glonu. Spośród szeregu auksyn wybrano trzy najbardziej pospolite u roślin, tzn. kwas indolilo-3-octowy (IAA), kwas indolilo-3-masłowy (IBA) i kwas indolilo-3-propionowy (IPA), którymi potraktowano kultury glonu w zakresie stężeń 10^{-6} – 10^{-4} M. Z kolei cytokininy – zeatynę, kinetynę (Kin) i difenylmocznik (DPU) zastosowano w zakresie stężeń 10^{-10} – 10^{-4} M. Jednym z celów badań było ustalenie biologicznie optymalnego stężenia auksyn (IAA, IPA i IBA), BR (BL, 24-epiBL, 28-homoBL, CS, 24-epiCS i 28-homoCS) i cytokinin (zeatyny, kinety-

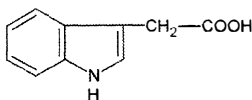
ny i 1,3-difenyloamocynina) dla wzrostu glonu oraz zawartości białek, chlorofili i cukrów. Ponadto przeprowadzono analizę zawartości białek, chlorofili i cukrów oraz ustalono liczbę komórek glonu poddanego działaniu mieszanin poszczególnych związków z następujących grup fitohormonów: auksyn i brassinosteroidów, cytokinin i brassinosteroidów. Określono również typ współdziałania pomiędzy auksynami a BR, cytokininami a BR na wzrost i rozwój *Chlorella vulgaris*.

Pomimo powszechności występowania auksyn i cytokinin u roślin wyższych dotychczas nie stwierdzono obecności tych fitohormonów w glonie *Chlorella vulgaris* (Davies 2004). Dlatego też przed przystąpieniem do badań dotyczących współdziałania brassinosteroidów, naturalnych hormonów *Chlorella vulgaris* (zob. rozdział 4.1) z auksynami i cytokininami w komórkach *Chlorella vulgaris*, podjęto próby ich wyizolowania. Ekstrakcję i oczyszczanie z komórek tego glonu wykonano poprzez rozdział i odparowanie do sucha odpowiednich frakcji rozpuszczalników oraz zastosowanie technik chromatograficznych. W celu rozdzielenia składników ekstraktu zastosowano wysokosprawną chromatografię ciekłą (HPLC), chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC/MS) oraz chromatografię ciekłą sprzężoną ze spektrometrią mas (LC/MS). Szczegółowe informacje dotyczące metod analitycznych przedstawia rozdział 3.4.8–10.

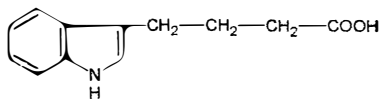
W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono występowanie następujących auksyn: kwasu indolilo-3-octowego (IAA), kwasu indolilo-3-mlekowego (IBA), kwasu indolilo-3-pirogronowego (IPyA) i kwasu 4-chloroindolilo-3-octowego (4-Cl-IAA) w komórkach glonu *Chlorella vulgaris* (ryc. 4.11). Pod względem ilościowym w glonie *Chlorella vulgaris* dominował kwas indolilo-3-octowy ($0,175 \text{ fg kom}^{-1}$), nieco mniejszą zawartość wykazał kwas indolilo-3-pirogronowy ($0,139 \text{ fg kom}^{-1}$), zaś najmniejszą zawartość posiadał kwas indolilo-3-masłowy ($0,037 \text{ fg kom}^{-1}$) i kwas 4-chloroindolilo-3-octowy ($0,024 \text{ fg kom}^{-1}$) (Ryc. 4.12). Okazało się również, że w komórkach glonu *Chlorella vulgaris* występują cytokiny, a mianowicie zeatyna, której obecność stwierdzono w dwóch formach izomerycznych: *trans* i *cis* (ryc. 4.11). Zawartość *trans*- i *cis*-zeatyny wynosiła odpowiednio $0,123$ i $0,063 \text{ fg kom}^{-1}$ (ryc. 4.12). Cytokiny te występowały w ilościach przekraczających 1,5-krotnie zawartość BL ($0,085 \text{ fg kom}^{-1}$). Ponadto stwierdzono, że w komórkach *Chlorella vulgaris*, traktowanych optymalnym stężeniem (10^{-8} M), BL wzrastała przeciętnie o 50–60% zawartość IAA, *trans*- i *cis*-zeatyny.

Pod wpływem stężeń $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ IAA i 10^{-8} M *trans*-zeatyny stwierdzono również wzrost zawartości BR, wchodzących w szlak biosyntezy (tabela 4.5). Najbardziej stymulująco działała *trans*-zeatyna, nieco słabiej IAA, co może świadczyć o współdziałaniu fitohormonów na poziomie regulacji ich biosyntezy.

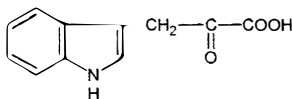
AUKSYNY



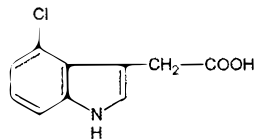
kwasy indolilo-3-octowy



kwasy indolilo-3-masłowy

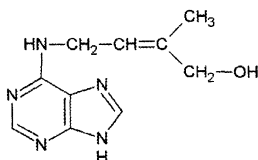


kwasy indolilo-3-pirogronowy

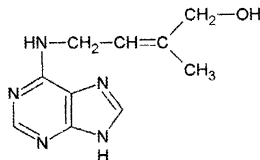


kwasy 4-chloroindolilo-3-octowy

CYTOKININY

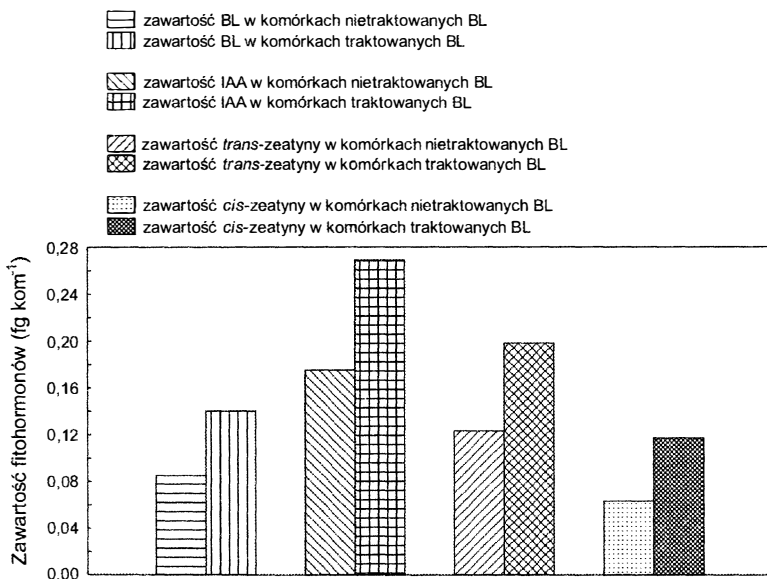


trans-zeatyna



cis-zeatyna

Ryc. 4.11. Wzory strukturalne auksyn i cytokinin, występujących w komórkach *Chlorella vulgaris*



Ryc. 4.12. Zawartość brassinolidu (BL), kwasu indolilo-3-octowego (IAA), *trans*- i *cis*-zeatyny w komórkach *Chlorella vulgaris* nietraktowanych i traktowanych 10⁻⁸ M BL w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)

Tabela 4.5. Zawartość brassinosteroidów w komórkach glonu *Chlorella vulgaris* traktowanych kwasem indolilo-3-octowym (IAA) i *trans*-zeatyną (*t-Z*) w 48. godzinie hodowli

Zawartość brassinosteroidów (fg kom ⁻¹)			
Brassinosteroid	Kontrola	+ 5 × 10 ⁻⁵ M IAA	+ 10 ⁻⁸ M <i>t-Z</i>
6-DeoksoCT	0,267	0,312	0,343
6-DeoksoTE	0,151	0,175	0,196
6-Deokso-3-DT	0,095	0,101	0,134
6-DeoksoTY	0,129	0,135	0,173
6-DeoksoCS	0,223	0,241	0,294
Ogółem związku szlaku późnego C6 utleniania:	0,865	0,964	1,140
Katasteron (CT)	0,104	0,116	0,172
Teasteron (TE)	0,191	0,213	0,245
3-Dehydroteasteron (3-DT)	0,173	0,192	0,215
Tyfasterol (TY)	0,251	0,267	0,319
Kastasteron (CS)	0,329	0,339	0,447
Ogółem związku szlaku wczesnego C6 utleniania:	1,048	1,127	1,398
Brassinolid (BL)	0,085	0,098	0,124

Występowanie cytokinin w glonach z gromady zielenice (*Chlorophytae*) stwierdzono w *Chara globularis*, *Cladophora capensis*, *Ulva* sp., *Caulerpa filiformis*, *Halieda cuneata* oraz *Chlamydomonas reinhardii* (Zhang i inni 1989, Ivanova i inni 1992, Stirk i inni 2003, Stirk i van Staden 2003). Wyizolowano szereg związków, wśród których dominuje: N⁶-(Δ²-izopentenyl)adenina (iP) i jej metabolity: 9-rybozyd N⁶-(Δ²-izopentenyl)adeniny, 9-rybozydo-5'-monofosforan N⁶-(Δ²-izopentenyl)adeniny oraz cytokininy izoprenowe: *cis/trans*-zeatyna, 9-rybozyd *cis/trans*-zeatyny, O-glukozyd *cis/trans*-zeatyny, O-glukozyd 9-rybozydu *cis/trans*, 9-rybozydo-5'-monofosforan *trans*-zeatyny i dihydrozeatyna (DHZ). W niewielkich ilościach wykryto cytokininy aromatyczne takie, jak: N⁶-benzyladenina (BA), N⁶-(*orto*-hydroksybenzyl)adenina, N⁶-(*meta*-hydroksybenzyl)adenina oraz ich formy rybozydowe i glukozydowe. W jednokomórkowej zielenicy *Chlamydomonas reinhardii* wyizolowano N⁶-(Δ²-izopentenyl)adeninę, która w postaci wolnej zasady purynowej stanowi aż 90% wszystkich cytokinin zawartych w komórce tego glonu (Ivanova i inni 1992). Wiadomo, że w komórkach glonów cytokininy występują głównie w postaci wolnej, część z nich jest związana z kwasami nukleinowymi oraz białkami.

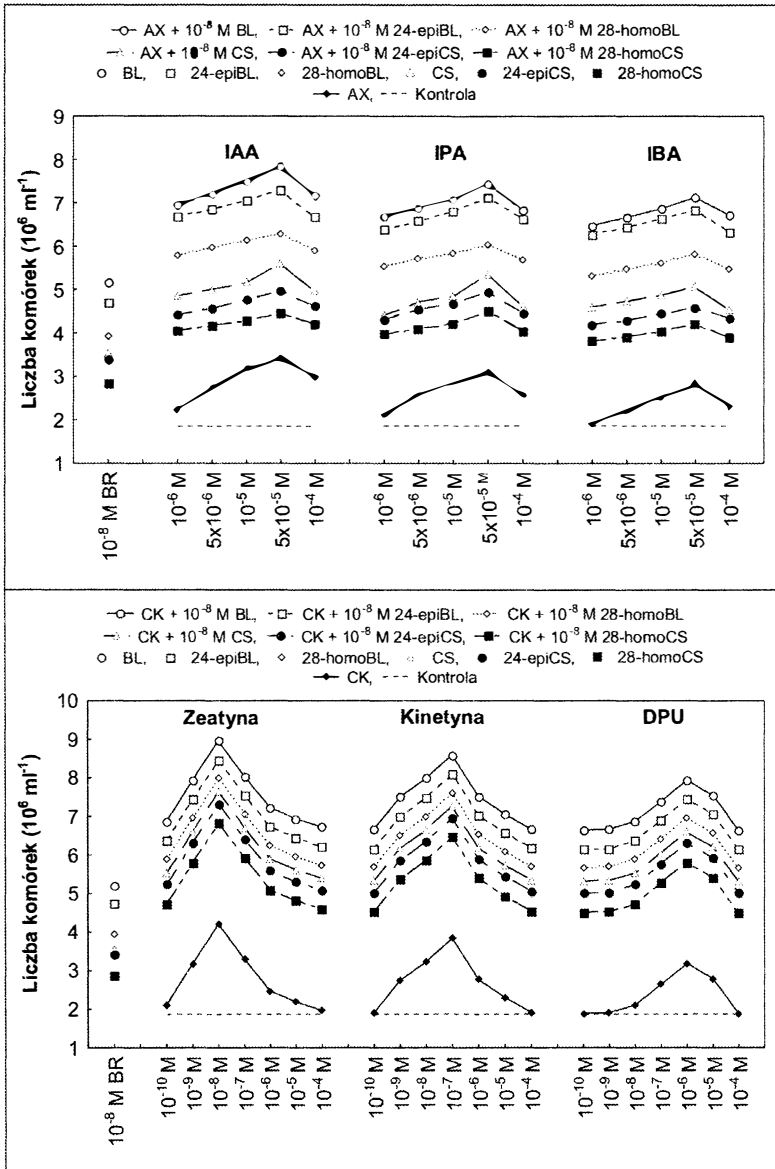
Biosynteza kwasu indolilo-3-octowego (IAA) przebiega u roślin kilkoma drogami. Ogólnie występują dwa alternatywne szlaki; zależny i niezależny od tryptofanu (Baldi i inni 1991, Michalczuk i inni 1992, Normanly i inni 1993, Rapparini i inni 1999, Ludwig-Müller 2000, Bartel i inni 2001, Chen 2001,

Cohen i inni 2003, Jakubowska 2004, Campanoni i Nick 2005). W większości szlaków biosyntezy prekursorem IAA jest tryptofan – aminokwas heterocykliczny, zawierający w cząsteczce pierścień indolowy. Kluczowymi związkami pośrednimi poszczególnych szlaków są: kwas indolilo-3-pirogronowy, indolilo-3-acetaldoksym, indolilo-3-acetamid i tryptamina.

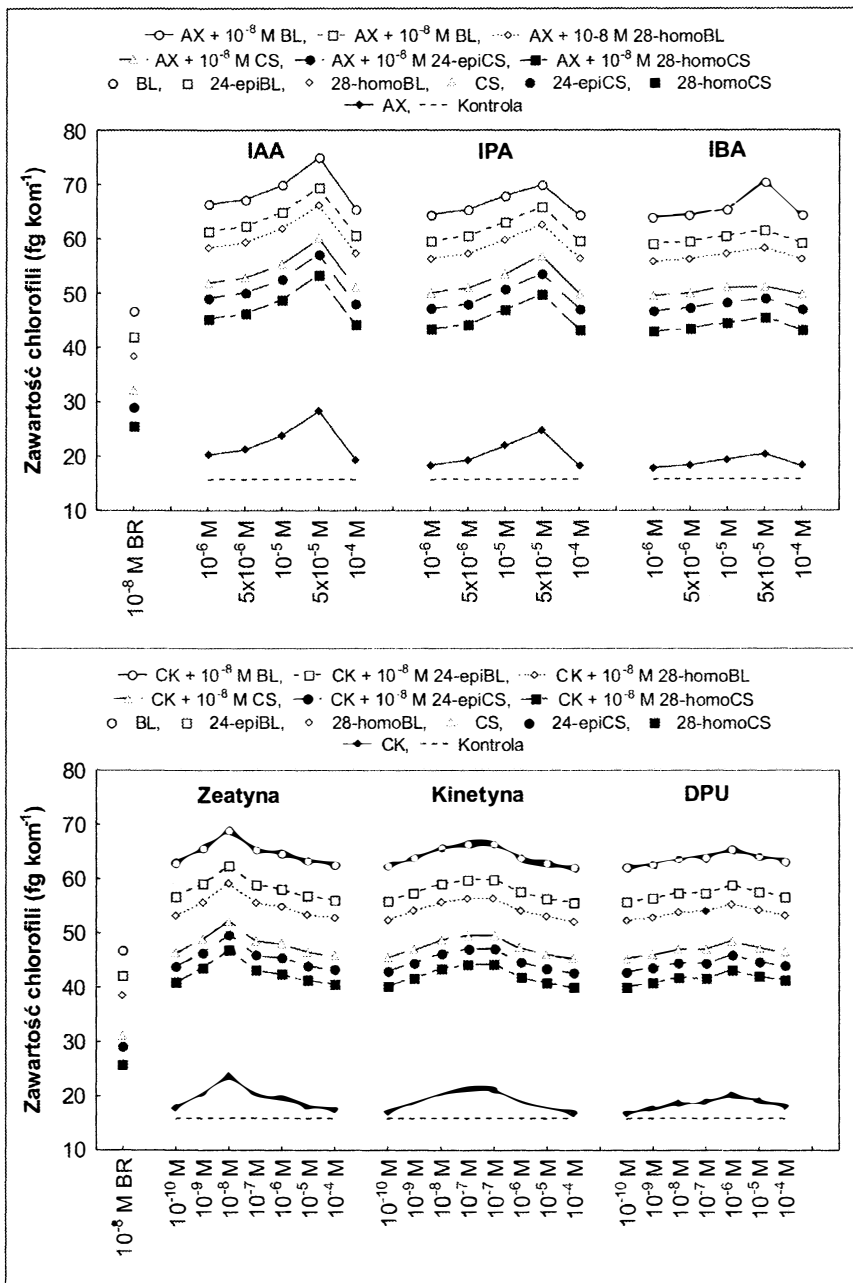
W roślinach wyższych występują dwa alternatywne szlaki biosyntezy steroli roślinnych, prowadzące do powstania związków prekursorowych: 1) kwasu mewalonowego (tzw. szlak mewalonowy) oraz 2) pirogronianu i aldehydu 3-fosfoglicerynowego (tzw. szlak niemewalonowy) (Lichtenthaler 2000, Mok i inni 2000, Mok i Mok 2001, Kakimoto 2003, Bajguz i Asami 2005, Sakakibara 2006). Z kolei w roślinach niższych, np. glonie *Chlorella vulgaris*, występuje jedynie szlak niemewalonowy, którego związki prekursorowe poprzez kondensację tworzą 5-fosforan 1-deoksy-D-ksylulozy (DXP) (Schwender i inni 1997, 2001, Disch i inni 1998, Lichtenthaler 2000, Mueller i inni 2000, Rodriguez-Concepción i Boronat 2002, Bajguz i Asami 2004). Związek ten jest przekształcany poprzez 2-C-metylo-D-erytrozo-4-fosforan do pirofosforanu izopentenylu (IPP) (ryc. 4.3), który następnie przechodzi częściowo w dimetyloallilopirofosforan (DMAPP). Przyłączenie łańcucha izopentenylowego DMAPP do atomu pierścienia nukleotydów adeninowych ADP i/lub ATP rozpoczyna właściwe reakcje szlaku biosyntezy cytokinin. W wyniku reakcji powstają rybotydy izopentenyladeniny, które są przekształcane do wolnej zasady – N^6 -(Δ^2 -izopentenyl)adeniny (iP). Izopentenylowy łańcuch boczny ulega hydroksylacji w pozycji *trans*, powstają rybotydy i rybozydy *trans*-zeatyny, a następnie wolna *trans*-zeatyna, która może ulegać izomeracji do formy *cis*.

Przeprowadzone badania wykazały, że auksyny i cytokiny w stężeniu 10^{-3} M działają toksycznie na kultury glonu *Chlorella vulgaris*. Powodowały zahamowanie liczby komórek glonu oraz wzrostu zawartości analizowanych metabolitów – białek, chlorofili i cukrów. Z kolei auksyny w stężeniach poniżej 10^{-6} M, a cytokiny w stężeniach poniżej 10^{-10} M nie wywierały istotnych zmian we wzroście i rozwoju *Chlorella vulgaris* (dane nie prezentowane).

Zmiany liczebności komórek *Chlorella vulgaris* pod wpływem stosowanych auksyn i cytokinin przedstawia rycina 4.13, natomiast zmiany zawartości chlorofilu, cukrów i białek obrazują graficznie ryciny 4.14–4.16. Wszystkie zastosowane auksyny wykazały optimum działania w stężeniu 5×10^{-5} M. Najbardziej stymulujący wpływ wykazał IAA w stosunku do kontroli, z kolei najmniejszą aktywnością charakteryzuje się IBA. Z grupy cytokinin najbardziej stymulujące działanie na wzrost i metabolizm glonu *Chlorella vulgaris* stwierdzono pod wpływem zeatyny w stężeniu 10^{-8} M. Nieco mniejszą aktywnością charakteryzuje się kinetyna, która w stężeniu 10^{-7} M spowodowała



Ryc. 4.13. Wpływ auksyn (AX) i cytokinin (CK) oraz ich oddziaływanie z brassinosteroidami na liczbę komórek *Chlorella vulgaris* w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)

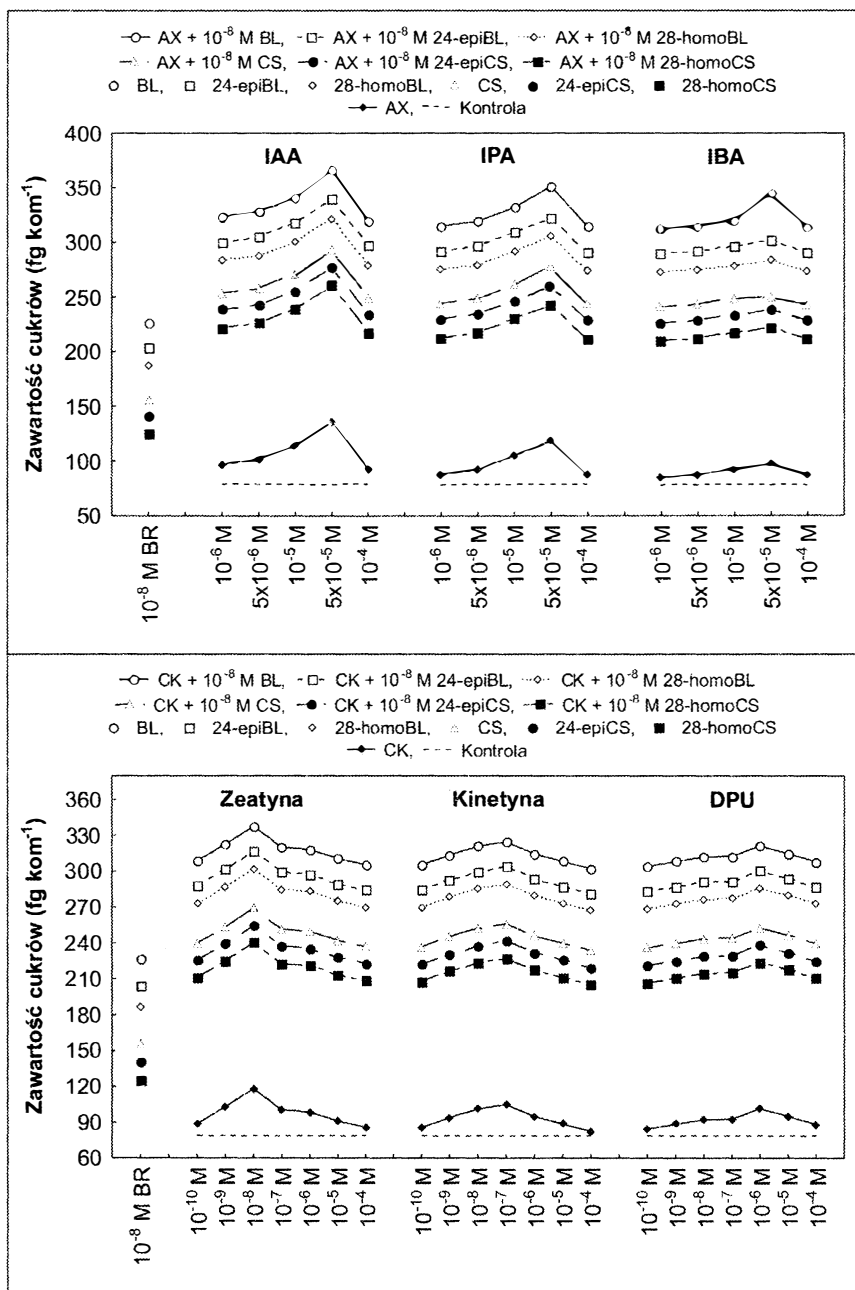


Ryc. 4.14. Wpływ auksyn (AX) i cytokinin (CK) oraz ich oddziaływanie z brassinosteroidami na zawartość chlorofilii w *Chlorella vulgaris* w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)

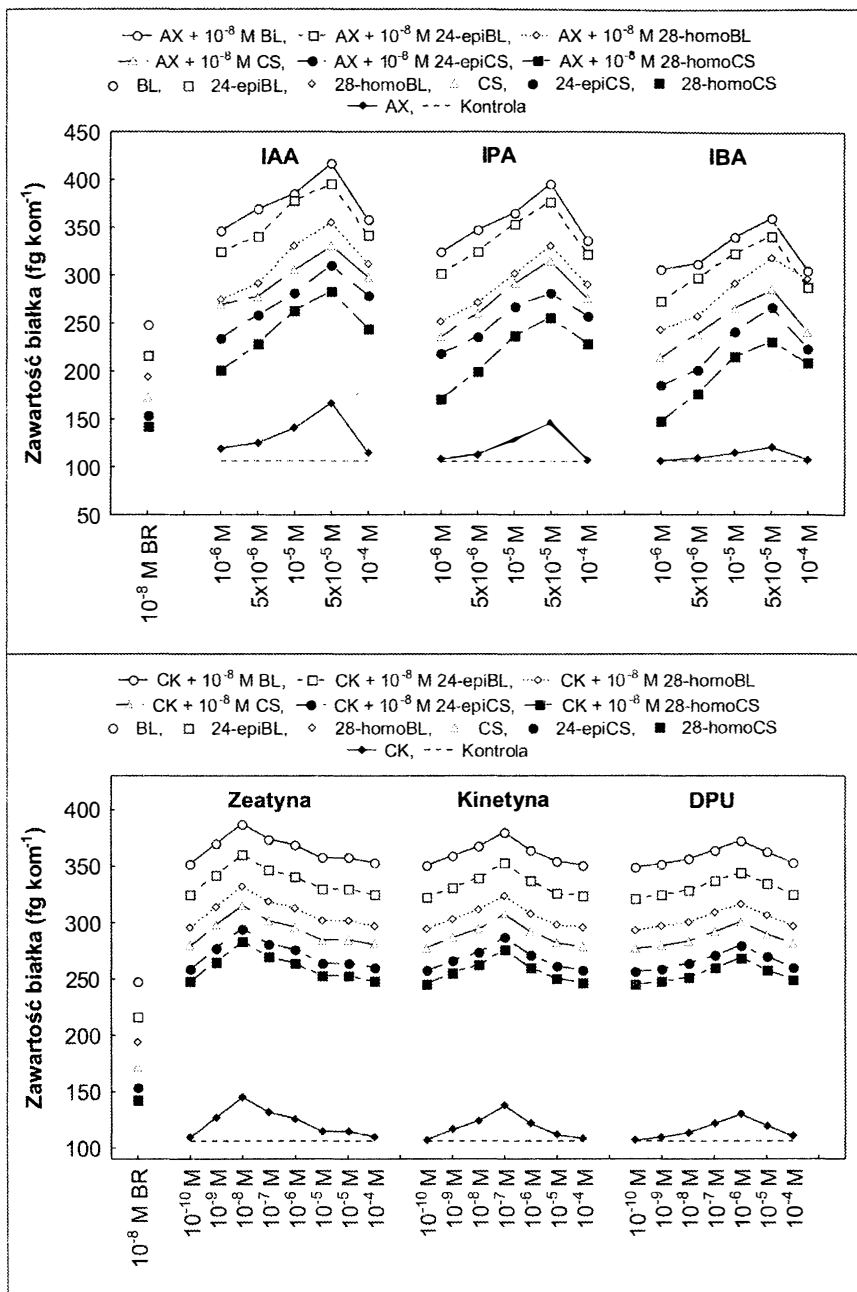
2-krotny przyrost liczby komórek i analizowanych parametrów biochemicznych. Z kolei najsłabszą stymulację wzrostu glonów posiada 10^{-6} M DPU. Zastosowane cytokiny wykazały większą aktywność biologiczną w stosunku do auksyn. Pod wpływem cytokinin następuje wzrost liczebności komórek *Chlorella vulgaris* oraz zawartości analizowanych składników komórkowych w stężeniach znacznie mniejszych (10^{-8} – 10^{-6} M), jednocześnie ich aktywność biologiczna jest większa niż auksyn. W związku z tym szereg aktywności przedstawia się następująco: zeatyna > kinetyna > DPU > IAA > IPA > IBA. Porównując działanie auksyn i cytokinin w stosunku do brassinosteroidów w 48. godzinie trwania hodowli glonu okazało się, że BR w optymalnym stężeniu – 10^{-8} M – charakteryzują się większą aktywnością biologiczną. Z kolei 28-homoBL i zeatyna posiadały porównywalny efekt stymulujący na kultury glonu. Zatem szereg aktywności biologicznej (zmiana liczby komórek oraz zawartości białek, chlorofili i cukrów) wszystkich zastosowanych fitohormonów przedstawia się następująco: BL > 24-epiBL > zeatyna > 28-homoBL > CS > 24-epiCS > 28-homoCS > kinetyna > DPU > IAA > IPA > IBA.

Współdziałanie auksyn i cytokinin z brassinosteroidami na liczbę komórek *Chlorella vulgaris* oraz analizowanych składników komórkowych przedstawiono na rycinach 4.13–4.16 i porównawczo w optymalnych stężeniach na rycinie 4.17. Niezależnie od zastosowanej mieszaniny BR z auksynami lub cytokininami stwierdzono przyrost liczby komórek glonu oraz zawartości chlorofilu, cukrów i białek powyżej poziomu stymulacji w kulturach traktowanych przez pojedynczy hormon. Najsilniejsze współdziałanie fitohormonów stwierdzono w kulturach traktowanych mieszaniną BR z cytokininami, zaś nieco słabsze w mieszaninie BR z auksynami. W obu przypadkach wykazano działanie synergistyczne auksyn i cytokinin z BR w kulturach glonu *Chlorella vulgaris*. Największy wpływ stymulujący na kultury glonu *Chlorella vulgaris* posiadała mieszanina optymalnych stężeń 10^{-8} M BL i 10^{-8} M zeatyny w stosunku do kultur pozbawionych działania egzogennych hormonów. Najsłabszy stymulujący wpływ wykazywała mieszanina 10^{-8} M BL i 5×10^{-5} M IBA (ryc. 4.17). Wiadomo, że nie tylko BR są aktywatorami przebiegu cyklu komórkowego u roślin, ale także pozostałe hormony roślinne: auksyny, cytokininy, gibereliny i kwas abscysynowy uczestniczą w regulacji mitozy. Auksyny i cytokininy pobudzają aktywność kinaz, natomiast pod wpływem BR znacznie wzrasta ich zawartość w określonych tkankach. Dowodzi to, że fitohormony mogą współdziałać względem siebie, zaś prawidłowy przebieg cyklu komórkowego zależy od wahań stężeń tychże fitohormonów (Clouse 2002, Bajguz i Tretyn 2003a).

Zmiany aktywności biologicznej auksyn (IAA > IPA > IBA) uwarunkowane były jedynie wydłużeniem łańcucha bocznego o kolejną grupę metyleno-



Ryc. 4.15. Wpływ auksyn (AX) i cytokinin (CK) oraz ich oddziaływanie z brassinosteroidami na zawartość cukrów w *Chlorella vulgaris* w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)

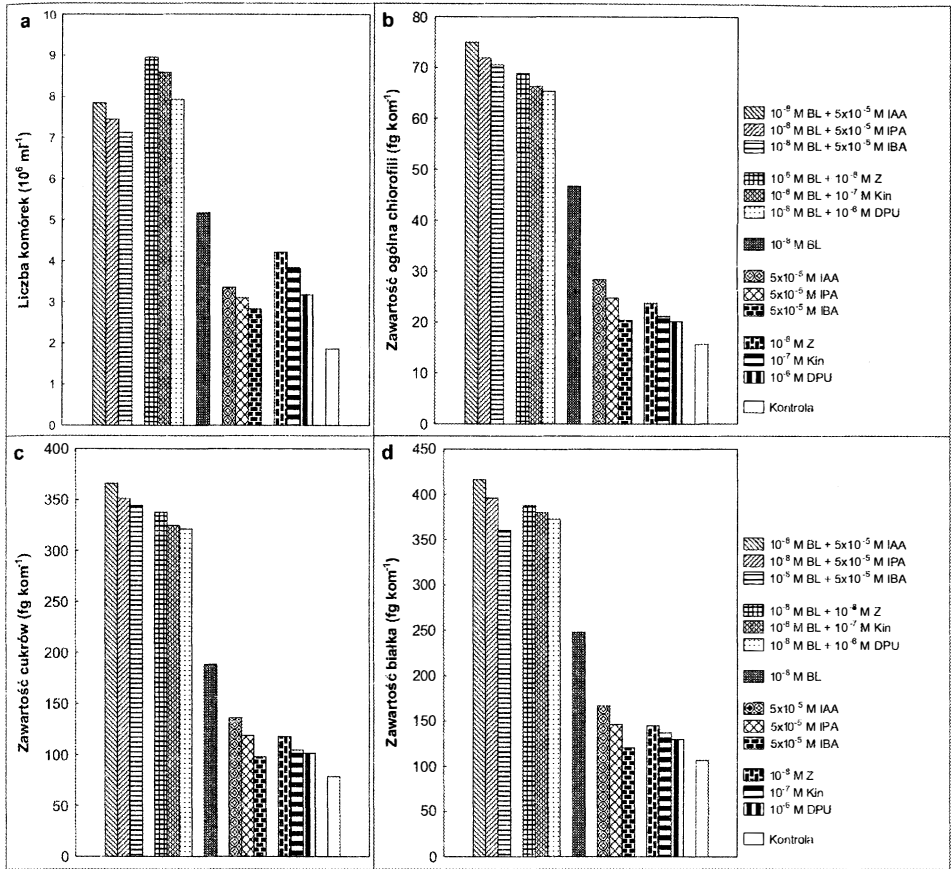


Ryc. 4.16. Wpływ auksyn (AX) i cytokinin (CK) oraz ich oddziaływanie z brassinosteroidami na zawartość białek w *Chlorella vulgaris* w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)

wą pierścienia indolowego (ryc. 3.1). Wiadomo, że wprowadzenie dodatkowej grupy hydroksylowej czy atomu chloru do łańcucha alifatycznego lub pierścienia aromatycznego powoduje znaczne obniżenie aktywności biologicznej (Czerpak i Bajguz 1993, 1997, Czerpak i inni 1994). Natomiast zastąpienie w auksynach pierścienia indolowego pierścieniem fenylovym, benzylovym, fenoksylovym lub naftylovym obniża, a w niektórych przypadkach wzmacnia aktywność biologiczną auksyn (Campanoni i Nick 2005).

Głównym czynnikiem warunkującym aktywność biologiczną cytokinin purynowych (zeatyny i kinetyny) w glonie *Chlorella vulgaris* jest występowanie różnorodnych podstawników w pozycji N^6 pierścienia adeniny (Mok i inni 2000, Czerpak i Bajguz 1997, Czerpak i Piotrowska 2003). Obecność łańcucha alifatycznego w N^6 zeatyny powoduje, że związek ten wykazuje największą aktywność biologiczną spośród badanych cytokinin. W przypadku kinetyny występowanie grupy furfurylowej przyłączonej do łańcucha bocznego powoduje obniżenie jej aktywności biologicznej. Zależność między strukturą chemiczną a aktywnością cytokinin purynowych zależy od długości łańcucha bocznego, liczby i rozmieszczenia wiązań podwójnych oraz dodatkowo przyłączonej grupy hydroksylowej bądź metylowej. Spośród cytokinin największą aktywność posiadają te związki, które zawierają pięciowęglowy łańcuch pochodny izoprenu z wiązaniem podwójnym i przyłączoną w C-4 grupą hydroksylową (Kaminek i inni 1997). Obecność w pozycji C-2 dodatkowych grup: chlorowej, sulfhydrylowej, azowej czy aminowej powoduje obniżenie aktywności cytokinin, natomiast przyłączenie rodników w pozycji N^7 i N^3 pierścienia powoduje całkowity zanik właściwości cytokininowych lub wytworzenie właściwości antycytokininowych (mutagennych) (Oka 2003). W przypadku cytokininy z podstawnikiem aromatycznym (benzyloadenina) bądź heterocyklicznym (kinetyna) stwierdzono, że występowanie jednowęglowego mostka alkilowego w pozycji N^6 grupy aminowej adeniny jest czynnikiem warunkującym dużą aktywność biologiczną.

Uzyskane wyniki badań potwierdzają, że BR współdziałają z pozostałymi fitohormonami w regulacji i kontroli procesów wzrostu i rozwoju roślin. Dochodzi do zwiększenia endogennej zawartości auksyn i cytokinin w kulturach *Chlorella vulgaris* traktowanych BL (ryc. 4.12). Ponadto wykazano, że egzogenna IAA i zeatyna stymulują poziom BR (tabela 4.5). Stwierdzono współdziałanie synergistyczne we wzroście i biochemizmie *Chlorella vulgaris* oraz w regulacji biosyntezy BR przez auksyny i cytokininy. Z dotychczasowego piśmiennictwa wiadomo, że BR wpływają na metabolizm auksyn i ich transport w obrębie roślin (Cohen i Meudt 1983). Podczas wzrostu tkanek roślinnych BR przyspieszają działanie auksyn, zwiększając ich endogenne



Ryc. 4.17. Porównanie współdziałania brassinosteroidów z auxynami i cytokininami w *Chlorella vulgaris* w optymalnych stężeniach w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)

poziom lub stymulując ich biosyntezę (Takeno i Pharis 1982, Eun i inni 1989, Sasse 1985, 1990, 1991a, b, Sakurai i inni 1991). Prawdopodobnie obecność auxyn jest niezbędna do procesu wydłużania komórek stymulowanych przez BR. Okazało się, że w młodych tkankach roślinnych wzrasta zawartość BR oraz auxyn. Wskazuje to na zależność procesów biosyntezy obu hormonów (Mandava i inni 1981, Yopp i inni 1981, Katsumi 1985, 1991). BR efektywniej stymulują wydłużanie epikotylu grochu i hypokotyli fasoli, aniżeli chemiczne analogi auxyn, np. kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) (Yopp i inni 1981). Z kolei wydłużanie hypokotyli ogórka, wywołane przez BR i gibereliny, było mniej intensywne niż pod wpływem IAA (Katsumi 1991). W przeciwieństwie do IAA, BR nie współdziałają synergistycznie z giberelinami. Dotychczasowe badania wykazały, że BR są aktywniejsze w inicjacji wydłużania

lodyg u roślin bardziej wrażliwych na IAA niż GA (Gregory i Mandava 1982, Sasse 1985). Wydłużanie komórek hypokotylu ogórka, indukowanych przez BR, było zahamowane w obecności kwasu *p*-chlorofenoksyizomasłowego (PCIB), posiadającego właściwości antyauksynowe. Podobnie do PCIB działa kinetyna, która hamuje wydłużanie się komórek potraktowanych mieszaniną IAA z BR. Przedstawione fakty sugerują, że obecność auksyn jest jednak niezbędna do procesu elongacji komórek stymulowanych przez BR. Stwierdzono również, że w młodych tkankach roślinnych wzrasta zawartość BR, a wraz z nimi auksyn. Prawdopodobnie wskazuje to na pewną zależność procesów biosyntezy obu hormonów (Mandava i inni 1981, Yopp i inni 1981, Katsumi 1985, 1991). Z kolei w etiolowanych hypokotylach dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima*) stwierdzono, że BR zwiększają poziom endogennego IAA, a zmniejszają ABA. Prawdopodobnie modulują one endogenne poziomy auksyn przez regulację aktywności genów szlaku biosyntezy bądź przez interferencję w katabolizmie IAA (Eun i inni 1989, Kulaeva i inni 1991).

Auksyny i cytokininy, działając niezależnie od siebie, biorą udział w stymulacji syntezy etylenu, przy czym cytokininy odznaczają się jego niewielką stymulacją (Yi i inni 1999). Jednakże cytokininy w połączeniu z IAA wykazują synergistyczny wpływ na produkcję etylenu. Etylen powstaje z metioniny w wyniku jej kolejnych przemian w tzw. cyklu metioninowym, w którym pośrednimi produktami przemian są *S*-adenozylometionina i kwas 1-amino-cyklopropano-1-karboksyłowy (ACC). Auksyny stymulują wytwarzanie etylenu w różnorodnych tkankach roślin przez inicjację *de novo* syntazy ACC. Okazało się, że geny syntazy ACC (*VR-ACSI*, *VR-ACS6* i *VR-ACS7*) wykazują ekspresję w hypokotylach fasoli w odpowiedzi na działanie auksyn. BR zwiększają ekspresję genu *VR-ACS7*, która może być regulowana przez szlak transdukcji sygnału auksyny oraz BR. Z kolei BR synergistycznie zwiększają poziom mRNA *VR-ACS6* i *VR-ACS7*, indukowanego przez IAA, lecz hamują *VR-ACSI*. Dowodzi to, że auksyny i BR współdziałają z każdym genem, wpływając na ekspresję wielogenowej syntazy ACC.

Współdziałanie BR z cytokininami powoduje 2–3-krotny wzrost syntezy etylenu (Schlagnhauser i inni 1984, Artega i inni 1988, Cao i Chen 1995, Woeste i inni 1999, Yi i inni 1999). Jednocześnie stwierdzono stymulację biosyntezy endogennego poziomu IAA. Współdziałanie pomiędzy BR a auksynami i cytokininami świadczy o indukcji biosyntezy etylenu. Po pierwsze, BR i cytokininy wpływają na zwiększenie endogennego poziomu IAA, który wzmacnia produkcję etylenu poprzez stymulację aktywności syntazy ACC. Po drugie, w roślinach traktowanych mieszaniną BR i cytokinin dochodzi (na zasadzie synergizmu) do stymulacji syntazy ACC. Po trzecie, BR i auksyny współdziałają w tworzeniu etylenu w tkankach roślinnych.

Badania własne wykazały, że auksyny, BR i cytokininy stymulowały podziały komórkowe oraz przyrost biomasy w *Chlorella vulgaris*. Ponadto zwiększały endogenną zawartość białek, chlorofili i węglowodanów. Wiadomo, że auksyny powiększają objętość komórek i niektórych ich struktur takich, jak: jądro komórkowe, mitochondria, chloroplasty oraz powodują wzrost ogólnej liczby rybosomów (Davies 2004). Auksyny skracają również czas trwania pełnego cyklu rozwojowego glonów z rodzaju *Chlorella* i *Scenedesmus* (Czerpak i Bajguz 1993, Czerpak i inni 1994). Ponadto auksyny łatwo ulegają utlenieniu, zwłaszcza w obecności światła pod wpływem oksydaz i peroksydaz do form nieaktywnych biologicznie (Davies 2004, Dharmasiri i Estelle 2004). Osłabiają procesy kataboliczne, a zwłaszcza aktywność oddechową mitochondriów, cykl pentozowy i cykl Krebsa oraz łańcuch oddechow. Pod wpływem auksyn, BR i cytokinin wzrasta aktywność wielu enzymów i przepuszczalność błon cytoplazmatycznych. Kontrolują aktywność polimeraz DNA i RNA oraz innych enzymów związanych z biosyntezą białek. Fitohormony te stymulują podziały mitotyczne komórek, ich regenerację oraz wzrost elongacyjny. Natomiast w dużych stężeniach działają hamująco, a nawet toksycznie, powodując obumieranie roślin. Pod wpływem auksyn znacznie wzrasta fosforylacja histonów, synteza cAMP, powstawanie polisomów podczas procesu translacji. Wzmagają również transport aktywny jonów metali aktywnych metabolicznie przez błony protoplazmatyczne.

Charakterystyczną odpowiedzią komórek roślin na działanie fitohormonów jest wzmożona synteza i akumulacja barwników fotosyntetycznych (Braun i Wild 1984). Podobne wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych na *Chlorella vulgaris*, w której zaobserwowano wzrost zawartości chlorofilu i cukrów (ryc. 4.17). Wzrost zawartości barwników fotosyntetycznych pod wpływem auksyn, BR, cytokinin i mieszaniny BR z auksynami i cytokinami może odbywać się na drodze stymulacji ich syntezy i/lub hamowania procesu degradacji (Braun i Wild 1984). Wiadomo, że fitohormony znoszą fazę zwłoki poprzedzającą syntezę chlorofilu w roślinach rosnących na świetle. BR i cytokininy na świetle i w ciemności zwiększają aktywność hydratazy δ -aminolewulinowej, enzymu biorącego udział w regulacji syntezy tetrapiroli w roślinach. Dochodzi do wzmożonej akumulacji kwasu γ -aminolewulinowego, który jest specyficznym prekursorem szlaku biosyntezy porfiryne – chlorofilu i hemu. Zwiększenie się zawartości barwników fotosyntetycznych w komórkach glonu jest istotnym czynnikiem, przyspieszającym tempo procesu fotosyntezy, którego produktami finalnymi są monosacharydy. Wytworzone cukry proste (monosacharydy) w procesie fotosyntezy są dla rośliny materiałem budulcowym, a także źródłem energii niezbędnej do napędzania wszystkich reakcji i procesów biochemicznych, wymagających jej

nakładu. Reakcje dotyczące fotosyntezy i fotooddychania u glonów przebiegają podobnie jak u roślin naczyniowych. Również rola karboksylazy/oksygenazy rybulozo 1,5-bifosforanu (rubisco) jest taka sama jak u innych roślin (Tolbert 1997). Fotosynteza u jednokomórkowych glonów rosnących przy niskim stężeniu CO₂ wykazuje podobieństwo do fotosyntezy u roślin typu C₄. BR zwiększają wiązanie CO₂ przez rybulozo 1,5-bifosforan (Braun i Wild 1984). Wynika stąd, że BR intensywnie aktywują proces fotosyntezy glonów (Bajguz i Czerpak 1998). Substraty do procesu fotosyntezy pochodzą ze środowiska, a glony żyjące w sztucznym mikrośrodku zamkniętych kolb, wykorzystują CO₂ pochodzące z fotooddychania, którego aktywność BR prawdopodobnie znacznie zwiększają. W komórkach glonów przy niedoborze CO₂ funkcjonuje mechanizm zatężania wewnątrzkomórkowego stężenia CO₂, a synteza i metabolizm kwasu glikolowego są hamowane. Z kolei przy wysokim stężeniu CO₂ glony nie posiadają mechanizmu zatężającego wewnątrzkomórkowe stężenie CO₂. W rezultacie intensywnej fotosyntezy podnosi się wewnątrzchloroplastowe stężenie tlenu, wskutek czego może wzrosnąć szybkość syntezy i wydzielania pozakomórkowego glikolanu. Dodatkowym czynnikiem, który stymuluje pozakomórkową sekrecję kwasu glikolowego z komórek glonu *Chlorella vulgaris* jest zakwaszenie środowiska. Wzrost zawartości monosacharydów jednocześnie powoduje wzrost ciśnienia osmotycznego komórki. Prowadzi to do zwiększenia tempa pobierania wody przez komórkę, co wpływa na powiększenie jej rozmiarów oraz zahamowanie procesów starzenia komórek. Podobną zależność między wzrostem zawartości cukrów prostych, a powiększeniem się średnicy komórek pod wpływem BR zaobserwowano w glonie *Chlorella vulgaris* (zob. rozdział 4.2).

Na podstawie wyników uzyskanych w tej części badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. W komórkach *Chlorella vulgaris* występują auksyny (kwas indolilo-3-octowy, kwas indolilo-3-mlekowy, kwas indolilo-3-pirogronowy i kwas 4-chloroindolilo-3-octowy) oraz cytokininy (*trans*-zeatyna i *cis*-zeatyna);
2. Auksyny i cytokininy współdziałały synergistycznie z brassinosteroidami na wzrost glonu, zawartości endogennej białek, chlorofili i cukrów oraz regulację związków szlaku biosyntezy brassinosteroidów;
3. Aktywność biologiczna auksyn i cytokinin, współdziałających z brassinosteroidami przedstawiała się następująco: *trans*-zeatyna > kinetyna > difenylomocznik > kwas indolilo-3-octowy > kwas indolilo-3-pirogronowy > kwas indolilo-3-masłowy;

4. Największą stymulację na wzrost i biochemizm glonu *Chlorella vulgaris* posiadała mieszanina 10^{-8} M brassinolidu i 10^{-8} M *trans*-zeatyny, najmniejszą – 10^{-8} M brassinolidu i 5×10^{-5} M kwasu indolilo-3-maśłowego.

Wyjaśnienie molekularnego mechanizmu działania brassinosteroidów w glonie *Chlorella vulgaris* nie było jednym z celów pracy. W przyszłości zostaną podjęte badania, dotyczące wyizolowania białka receptorowego, a w konsekwencji przedstawienia szlaku transdukcji sygnału BR w tym modelowym obiekcie doświadczalnym. Niemniej jednak poniżej zostaną przedstawione znane już fakty dotyczące mechanizmu działania auksyn, cytokinin i BR w innej modelowej roślinie – *Arabidopsis thaliana*. Można przypuszczać, że występuje jakieś podobieństwo działania tych fitohormonów w *Arabidopsis* i *Chlorella*.

Odpowiedź biologiczna każdej komórki roślinnej na działanie egzogenego hormonu jest skomplikowanym procesem (Lewak 1995, Davies 2004). Powstanie kompleksu hormon-receptor indukuje uruchomienie kaskady wewnątrzkomórkowych przekaźników, które amplifikują i zmieniają sygnał auksynowy, cytokininowy lub brassinosteroidowy na formę molekularną. Ostatnim elementem jest regulacja ekspresji określonych genów, prowadząca do zmian w syntezie specyficznych białek. Fitohormony, działając pojedynczo lub współdziałając z BR, wpływają na wzrost ogólnej puli białek rozpuszczalnych w komórkach, które zapoczątkowują reakcje wtórne modyfikujące metabolizm komórki. Prowadzi to do szeregu zjawisk obserwowanych w roślinach, tzn. zmiany aktywności enzymów, akumulacji i wydzielania metabolitów, przyspieszenia procesu mitozy, wzrostu objętościowego komórek, zahamowania degradacji czy opóźniania procesów starzenia w ciemności. Proces percepcji i transdukcji sygnału fitohormonowego ma kluczowe znaczenie w poznaniu mechanizmu działania tych związków. Oddziaływanie BR na wzrost komórek ma złożony charakter, wynikający z regulacji cyklu komórkowego, w którym biorą udział cykliny i zależne od nich kinazy białkowe (CDK) (Clouse 2002, Li 2005). Wpływ na podziały komórkowe posiadają także inne fitohormony: auksyny, cytokiny, gibereliny, kwas abscysynowy i kwas jasmonowy. Niemniej nie zostało w pełni wyjaśnione współdziałanie BR z cytokininami i auksynami na przebieg i regulację cyklu komórkowego. Więcej informacji na ten temat przedstawiono w rozdziale 4.2.

Stymulacja wzrostu glonu *Chlorella vulgaris* pod wpływem działania BR związana jest ze zwiększaniem się wydzielania protonów poza ścianę komór-

kową glonu (Bajguz i Czerpak 1996). Wzrost objętościowy komórek indukowany jest głównie przez auksyny i BR bądź niezależnie od siebie przez oba hormony (Cerana i inni 1983, 1984, 1985, De Michelis i Lado 1986, Rayle i Cleland 1992). Jedną z teorii mechanizmu działania auksyn zakłada bezpośredni udział jonów wapnia w mechanizmie działania tych hormonów. Synergizm auksyn z BR wskazuje na udział jonów Ca^{2+} w kontroli wzrostu i rozwoju roślin. Stwierdzono również, że auksyny stymulują podwyższanie przepuszczalności błony komórkowej dla jonów wapnia wraz ze zmianami jego zawartości w cytoplazmie podstawowej. Wykazano, że pod wpływem działania IAA, BR oraz ich mieszaniny następuje wzrost zawartości jonów Ca^{2+} w komórkach, któremu towarzyszy spadek pH cytoplazmy (Arteca i inni 1983, Bajguz i Czerpak 1996). Prawdopodobnie spowodowane jest to hamującym wpływem jonów wapnia na funkcjonowanie w plazmolemie pompy protonowej bądź też stymulującym działaniem podwyższonego poziomu jonów wapnia na transport protonów z wnętrza wakuoli do cytoplazmy podstawowej. Przypuszcza się, że jony wapnia i wodoru mogą pełnić funkcje wtórnych przekaźników informacji w mechanizmie działania auksyn i BR.

Molekularny mechanizm współdziałania BR z auksynami lub cytokinami nie został w pełni poznany (Zurek i Clouse 1994). Stwierdzono jednak, że kinetyka działania auksyn i BR znacznie się różni, np. stymulacja wydłużania pędów przez IAA rozpoczyna się już po 10–15 minutach (tzw. fazy zwłoki), z maksimum działania po 45 minutach. Z kolei kultury roślinne potraktowane BR wykazywały wstępne działanie dopiero po 45 minutach, a maksimum osiągały po kilku godzinach. Prawdopodobnie świadczy to o niezależnym mechanizmie działania auksyn i BR na niektóre procesy fizjologiczno-metaboliczne na poziomie molekularnym komórek. BR stymulują rozluźnianie struktur ściany komórkowej roślin. Przeprowadzone badania wykazały, że BR powodują specyficzną ekspresję genu *BRU1*, który charakteryzuje się podobieństwem do genu odpowiedzialnego za syntezę endotransglukozyazy ksyloglukanu. Gen ten odpowiedzialny jest właśnie za rozluźnianie ściany komórkowej. Prawdopodobne jest jednak to, że BR stymulują ekspresję genu *SAUR*, który może być jednym z enzymów specyficznym pobudzanych przez auksyny.

Szlak transdukcji sygnału auksynowego z miejsca percepcji fitohormonu do miejsca, gdzie następuje odpowiedź komórki nie został również w pełni poznany. Prawdopodobnie białko wiążące auksyny – ABP1 (*ang.* auxin binding protein) jest receptorem współdziałającym z białkiem G (Napier 2001, Napier i inni 2002). Aczkolwiek wiadomo, że ABP1 nie jest jedynym białkiem wiążącym auksyny. Oprócz błonowych białek wiążących auksyny, zidentyfikowano też kilka rozpuszczalnych białek, które charakteryzują się wysokim powinowactwem wzglę-

dem auksyn. Szlak transdukcji sygnału obejmuje aktywację fosfolipazy A₂, która uwalnia wtórne przekaźniki pochodzenia lipidowego, aktywujące kinazę białkową, regulującą w drodze fosforylacji plazmatyczną H⁺-ATPazę. Transdukcję sygnału auksynowego wiąże się również z funkcjonowaniem kaskady kinaz MAP (Leyser 2002). Z kolei badania mutantów auksynowych (*axr1*, *tir1*, *sur1*) *Arabidopsis thaliana* wykazały, że regulacja cyklu komórkowego poprzez odpowiedź auksyny zależy od systemu ubikwitynowego, regulującego cykl komórkowy (Zielińska i Kowalczyk 2000, Kowalczyk i inni 2005). Mechanizm regulujący ubikwitylację białek AUX/IAA w odpowiedzi na rosnące stężenie auksyny nie został w pełni poznany. Niemniej zaproponowano przypuszczalny mechanizm regulacji ekspresji genów przez auksynę. W warunkach braku lub niskiego stężenia auksyny białka AUX/IAA tworzą heterodimery z czynnikami odpowiedzi auksynowej ARF, blokując ich działanie aktywujące lub hamujące na ekspresję odpowiednich genów. Z kolei wzrost stężenia auksyny prowadzi do modyfikacji odpowiedniego białka AUX/IAA, promującego jego ubikwitylację bądź wpływa aktywująco na ligazę SCF, regulowaną przez układ rubinyłacji/derubinyłacji kuliny oraz przez białka CAND1 i SGT1b. Degradacja białka AUX/IAA prowadzi do uwolnienia z heterodimeru AUX/IAA-ARF odpowiedniego białka ARF, które może aktywować lub hamować ekspresję genów pierwotnych odpowiedzi auksynowych. Produkty tych genów z kolei regulują aktywność genów zaangażowanych w procesy wzrostowe i rozwojowe rośliny. Spadek stężenia auksyny prowadzi do wzrostu poziomu białek AUX/IAA w jądrze, które „wyłączają” białka ARE, tworząc z nimi nieaktywne heterodimery. W ten sposób komórka staje się gotowa do odbioru kolejnego sygnału auksynowego.

W transdukcji sygnału cytokininowego uczestniczy szereg przekaźników białkowych, które selektywnie oddziałują z DNA, hamując lub indukując transkrypcję określonych genów lub oddziałują na szlaki metaboliczne, zmieniając aktywność wybranych enzymów (Hwang i Sheen 2001, Mok i Mok 2001, Piotrowska i Czerpak 2004, Riefler i inni 2006, Salomé i inni 2006). Związane jest to z fosforylacją lub defosforylacją białkowych czynników regulujących proces transkrypcji poprzez aktywację odpowiednich kinaz i/lub fosfataz. Znana jest budowa cytokininowych receptorów: CKI1, CRE1 oraz białek AHK. Przypuszcza się, że mogą one funkcjonować jednocześnie lub niezależnie od siebie, indukując odmienne odpowiedzi biologiczne u roślin. Jednak wspólną cechą białkowych receptorów cytokinin jest to, że działają jako kinazy histydynowo/asparaginowe.

Przełom w badaniach nad molekularnym mechanizmem działania BR nastąpił po zidentyfikowaniu w *Arabidopsis thaliana*, grochu i pomidorze licznych mutantów, charakteryzujących się zmianami we wrażliwości tych roślin na działanie egzogenne podawanych BR lub zaburzeniami w endo-

gennym poziomie tych substancji (Clouse 2002). Receptory BR u roślin mają podobną budowę do receptorów peptydowych czynników wzrostu ssaków i człowieka. Zasadniczą cechą różniącą je od receptorowych kinaz tyrozynowych jest brak w domenie cytoplazmatycznej aktywności kinazy tyrozynowej. W ich miejsce pojawiają się sekwencje aminokwasowe, charakterystyczne dla kinaz serynowo/treoninowych. Z tego względu roślinne odpowiedniki receptorowych kinaz tyrozynowych nazywane są kinazami receptoropodobnymi (RLK, *ang.* receptor-like kinase). W genomie *Arabidopsis thaliana* występuje ponad 340 sekwencji DNA kodujących RLK, czyniąc tę rodzinę receptorów najbardziej liczną w świecie roślin.

Białko BRI1 posiada sekwencję sygnałową składającą się z 23 hydrofobowych aminokwasów, która umożliwia transport syntetyzowanego polipeptydu do wnętrza cystern siateczki śródplazmatycznej (Sharma i inni 2001, Müssig i Altmann 2003). Ustalono również, że każda z domen LRR (*ang.* leucine-rich repeat) zawiera po 25 reszt aminokwasu leucyny. W zewnątrzkomórkowej części BRI1 występuje 13 potencjalnych miejsc, w których może zachodzić proces *N*-glikozylacji. Domena transbłonowa zawarta jest pomiędzy 793 a 814 resztą aminokwasową. Natomiast cytoplazmatyczny odcinek BRI1 zawiera 12 subdomen wraz ze wszystkimi sekwencjami aminokwasowymi, występującymi w eukariotycznych kinazach białkowych. Te z nich, które występują w subdomenach VIB i VIII są jedynie charakterystyczne dla kinaz serynowo/treoninowych.

W *Arabidopsis thaliana* ekspresja genu *BRI1* ma charakter konstytutywny i zachodzi podobnie we wszystkich jego organach (Sharma i inni 2001, Clouse 2002, Bajguz i Tretyn 2003a, Müssig i Altmann 2003). Białko BRI1 budową przypomina inne RLK, zidentyfikowane u *Arabidopsis thaliana* (*CLAVATA1*, *ERECTA*) i ryżu (*Xa21*), które odpowiadają za oddziaływania międzykomórkowe oraz reakcje obronne u roślin. Zewnątrzkomórkowa *N*-końcowa domena BRI1 zawiera 25 sekwencji bogatych w reszty leucynowe (LRR), w której pomiędzy 21. a 22. sekwencją znajduje się 70-aminokwasowa pętla pozbawiona motywów LRR. W *C*-końcowym, cytoplazmatycznym fragmencie BRI1 zidentyfikowano reszty aminokwasowe, występujące w kinazach serynowo/treoninowych. Poza *BRI1*, *CLAVATA1*, *ERECTA* w genomie *Arabidopsis thaliana*, jak już wspomniano, może występować około 340 sekwencji kodujących RLK, z których 174 prawdopodobnie posiada zewnątrzkomórkowe domeny typu LRR.

W przypadku *CLAVATA1* domena LRR odpowiada za oddziaływanie z innym białkiem – *CLAVATA3*, które występuje w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Friedrichsen i Chory 2001, Sharma i inni 2001). Przypuszcza się, że sekwencja LRR, występująca w białku BRI1, umożliwia jego dimeryzację

(poprzez mechanizm suwaka leucynowego) lub/i pozwala na wiązanie się z innymi białkami, które posiadają podobne domeny polipeptydowe. Z analizy mutacji występujących w *loci BRI1* wynika, że dla utrzymania aktywności biologicznej białkowego produktu tego genu poza cytoplazmatyczną domeną kinazową jest konieczna zewnątrzkomórkowa pętla, występująca między 21. a 22. sekwencją LRR. Wykazano, że mutacje punktowe w obrębie genu kodującego wspomniany 70-aminokwasowy fragment *N*-końcowy omawianego polipeptydu w bardzo istotny sposób redukują zdolność BRI1 do wiązania BL. Wyniki te mogą wskazywać, że to właśnie ten odcinek polipeptydu, a nie domeny typu LRR, odgrywa kluczową rolę w wiązaniu BR. Budowa zewnątrzkomórkowej domeny BRI1, jak i obecność w jej części cytoplazmatycznej sekwencji aminokwasowych, charakterystycznych dla kinaz białkowych, sugerują, że białko to może pełnić funkcje receptorowe. Jak dotąd nie ustalono czy BRI1 bezpośrednio wiąże cząsteczki BR, czy też w procesie tym uczestniczą dodatkowe peptydy, występujące w przestrzeni pozakomórkowej. Występowanie domen LRR w zewnątrzkomórkowej części BRI1 sugeruje, że ligand, który może być przez nią wiązany ma polipeptydową naturę. Na tej podstawie można wnioskować, że w apoplacie funkcjonują białka wiążące BR, które, łącząc się z BRI1, stymulują związaną z nim kinazę, co prowadzi do uruchomienia dalszych etapów szlaku transdukcji sygnału. Nie można jednak wykluczyć, że 70-aminokwasowa pętla zewnątrzkomórkowa odpowiada za bezpośrednie wiązanie cząsteczek BR lub też, podobnie jak występuje to w przypadku zwierzęcych hormonów steroidowych, istnieją dwie klasy białek receptorowych. Jedna funkcjonuje na powierzchni komórki, a druga – rozpuszczalna w cytoplazmie – występuje wewnątrz jąder komórkowych. Trzeci z proponowanych mechanizmów działania BR zakłada, że BRI1 może tworzyć heterodimery z inną, dotąd nieznaną, receptoropodobną kinazą lub innym białkiem. Ekspresja genów kodujących drugi ze składników powstałego tą drogą receptora BR mogłaby być ograniczana do pewnych komórek lub stadiów rozwojowych roślin, a tym samym wpływać na ich zróżnicowaną wrażliwość na te związki.

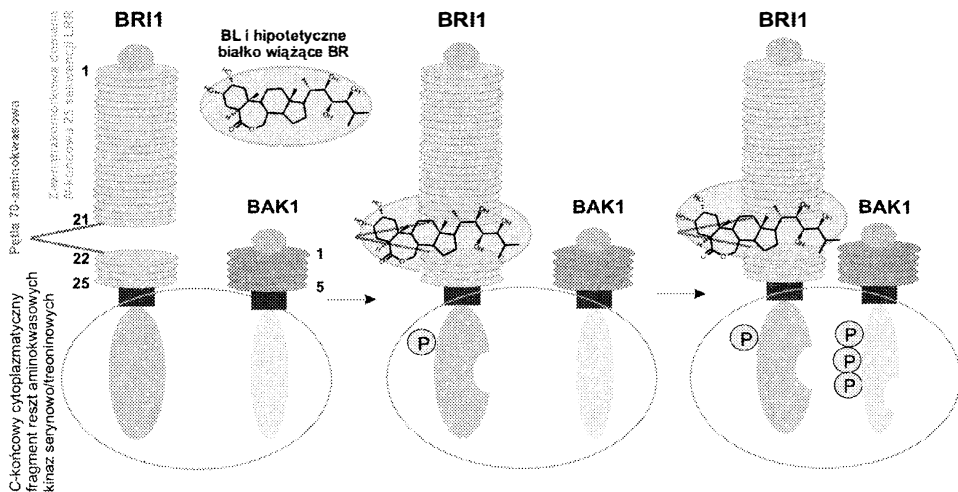
W warunkach *in vitro* BRI1 autofosforyluje reszty serynowe i treoninowe z przewagą serynowych (Wang i He 2004). Proces autofosforylacji ma charakter wewnątrzcząsteczkowy i nie wymaga obecności innych białek. W cytoplazmatycznej domenie BRI1 występuje co najmniej 12 reszt aminokwasowych, które mogą podlegać autofosforylacji. Pięć z nich leży w bezpośrednim sąsiedztwie odcinka transbłonowego polipeptydu (to jest *N*-końcowo względem domeny kinazowej), pięć kolejnych w obrębie tej domeny (po jednej w subdomenie I i VIa oraz trzy w subdomenie VIII) i dwie w *C*-końcowym fragmencie białka.

W *Arabidopsis thaliana* występuje dodatkowe, poza BRI1, białko receptorowe, które może uczestniczyć w wiązaniu BR (Peng i Li 2003, Wang i He 2004, Wang i inni 2005). Kodujący je gen nazwano *BAK1* (ang. BRI1-associated receptor kinase1). Podobnie jak BRI1, również BAK1 wykazuje budowę typową dla receptoropodobnych kinaz białkowych (RLK). Jednakże w przeciwieństwie do polipeptydu BRI1, który w domenie zewnątrzkomórkowej posiada 25 powtórzeń aminokwasowych bogatych w leucynę BAK1, zawiera jedynie 5 takich motywów. Brak jest 70-aminokwasowej pętli, która przypuszczalnie odpowiada za wiązanie BR z BRI1. Ustalono, że zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* białko BAK1 może tworzyć kompleks z BRI1.

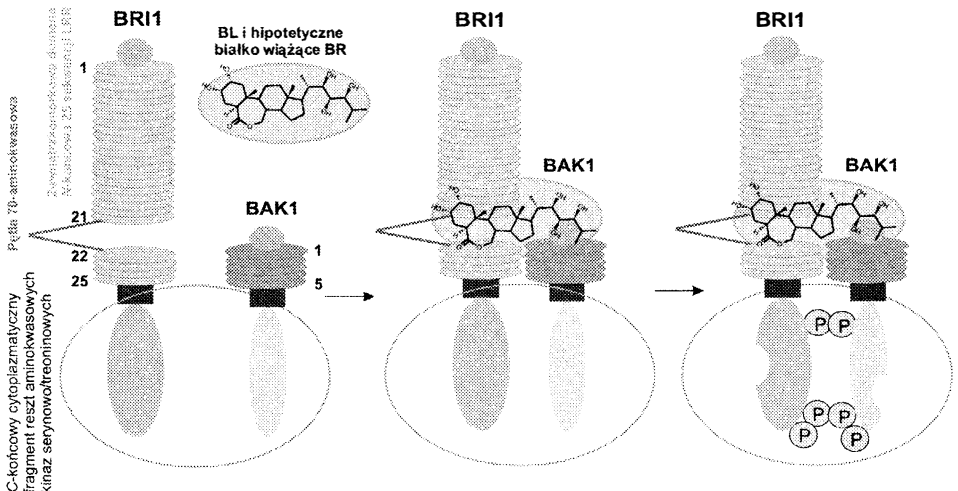
Na podstawie możliwości fizycznego oddziaływania białkowych produktów genów *BRI1* i *BAK1* w komórkach drożdży i bakterii *Escherichia coli* zaproponowano dwa modele funkcjonowania receptora BR (ryc. 4.18) (Li 2003, 2005). Pierwszy z nich – model fosforylacji sekwencyjnej – zakłada, że związaniu się BR z BRI1 towarzyszy autofosforylacja i aktywacja tego białka receptorowego. Uaktywniona domena kinazowa BRI1, fosforylując podobnego typu domenę BAK1, umożliwia powstanie kompleksu obydwu omawianych białek. W konsekwencji dochodzi do inicjacji przemian metabolicznych (szlaków transdukcji sygnałów) prowadzących do powstania odpowiedzi komórkowych. Drugi to model transfosforylacyjny, który zakłada, że wiązanie BR (lub białka wiążącego te hormony) stymuluje dimeryzację BRI1-BAK1 i wzajemną fosforylację domen kinazowych obu RLK. Uaktywniony kompleks receptorowy, działając przez odpowiednie elementy szlaku transdukcji sygnału, indukuje powstanie odpowiedzi fizjologicznej. Przypomina on mechanizm działania zwierzęcych receptorowych kinaz tyrozynowych.

Jednym z kluczowych elementów indukowanego przez BR szlaku transdukcji sygnałów jest produkt genu *BIN2* (ang. BR-insensitive2), który jest homologiczny do serynowo/treoninowych kinaz GSK3 β ssaków i SHAGGY muszki owocowej (Li 2003, 2005). Siewki *Arabidopsis thaliana* wykazują brak wrażliwości na działanie egzogennie podawanych BR. Gen *BIN2* koduje opisaną wcześniej cytoplazmatyczną kinazę serynowo/treoninową, ASK η . Jej katalityczna domena w 70% jest identyczna z podobnymi sekwencjami aminokwasowymi, występującymi w kinazach białkowych typu GSK3 β ssaków i SHAGGY muszki owocowej. Poza *BIN2* w genomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano dziewięć innych *GSK3/SHAGGY*-podobnych genów. Jak dotąd niewiele wiadomo na temat ich udziału w regulacji wzrostu i rozwoju roślin. Sugeruje się, że kodowane przez wspomniane geny kinazy mogą brać udział w powstawaniu odpowiedzi na zranienia i szok osmotyczny oraz

A. Model fosforylacji sekwencyjnej



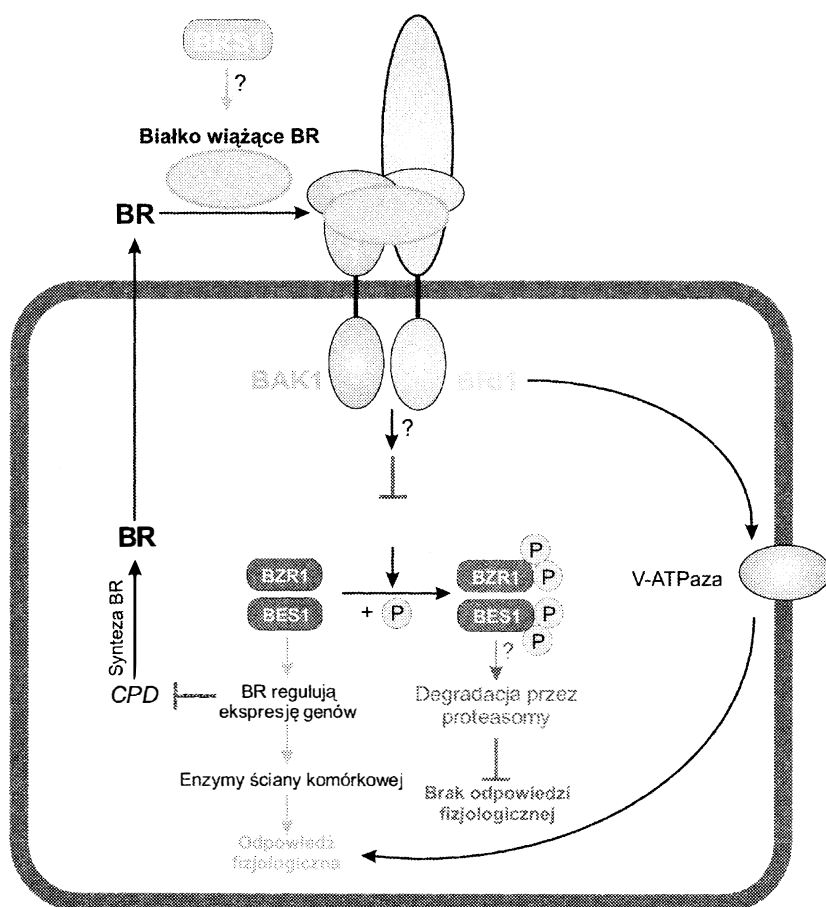
B. Model transfosforylacyjny



Ryc. 4.18. Modele współdziałania białek BRI1 i BAK1 podczas łączenia brassinosteroidu z receptorem (wg Li 2003, zmodyfikowano)

Objaśnienia skrótów w tekście

w regulacji morfogenezy kwiatów. Przypuszcza się, że kodowana przez gen *BIN2* GSK3/SHAGGY–podobna kinaza bierze udział w mechanizmie działania BR. Biorąc pod uwagę fakt, że u zwierząt aktywność tej grupy enzymów hamowana jest przez ich fosforylację i oddziaływania z innymi białkami, BIN2 funkcjonuje jako negatywny regulator szlaków transdukcyjnych indukowanych przez BRI1, przypuszczalny błonowy receptor BR. W komórkach, które nie zostały poddane działaniu BR szlaki transdukcyjne, prowadzące do powstania odpowiedzi komórkowych, są hamowane przez BIN2. Natomiast po związaniu się BR z receptoropodobną kinazą BRI1 prowadzi do fosfory-



Ryc. 4.19. Indukcja przez brassinosteroidy szlaku transdukcji sygnałów w *Arabidopsis thaliana* (wg Peng i Li 2003, Wang i He 2004, zmodyfikowano)

Objaśnienia skrótów w tekście

lacji BIN2, a tym samym do uruchomienia ciągu reakcji prowadzących do powstania odpowiedzi fizjologicznej stymulowanej przez BR. Ponieważ nie udało się stwierdzić fizycznego oddziaływania między cząsteczkami BRI1 i BIN2 (stosując drożdżowy system dwuhybrydowy) oraz bezpośredniej fosforylacji BIN2 przez BRI1 przypuszcza się, że pomiędzy tymi białkami funkcjonuje dodatkowy element szlaku transdukcijnego.

Potencjalnymi substratami dla BIN2 są produkty genów *BES1* (*ang.* bri1 EMS suppressor1) i *BZR1* (*ang.* brassinazole resistant1), które kodują zbliżone pod względem budowy białka o dotąd nieznaną funkcję (ryc. 4.19) (Peng i Li 2003, Wang i He 2004). Białka te występują głównie w cytoplazmie, natomiast w wyniku traktowania komórek BR przemieszczają się do wnętrza jąder. Z analizy mutantów *bes1* i *bzr1* wynika, że BES1 i BZR1 mogą uczestniczyć w kontroli ekspresji genów kodujących enzymy, które zaangażowane są w regulację wzrostu komórkowego.

Na podstawie dostępnej obecnie wiedzy można zaproponować następujący mechanizm działania BR (Peng i Li 2003, Wang i He 2004). W komórkach nie poddanych działaniu BR występuje aktywna forma kinazy białkowej ASK η (kodowanej przez gen *BIN2*), która fosforylując białka BES1 i BZR1 odpowiada za ich cytoplazmatyczną lokalizację. W wyniku związania się BR z kompleksem receptorowym BRI1/BAK1 następuje uruchomienie reakcji prowadzącej do fosforylacji kolejnych białek, których końcowym elementem może być BIN2. Spadek aktywności tej kinazy prowadzi do zahamowania procesu fosforylacji BES1 i BZR1, a w następstwie do transportu obu tych białek do wnętrza jąder. W wyniku indukowanej przez BES1 i BZR1 ekspresji odpowiednich genów dochodzi do syntezy enzymów, które – modyfikując ścianę komórkową – odpowiadają za przyspieszenie tempa wzrostu komórek.

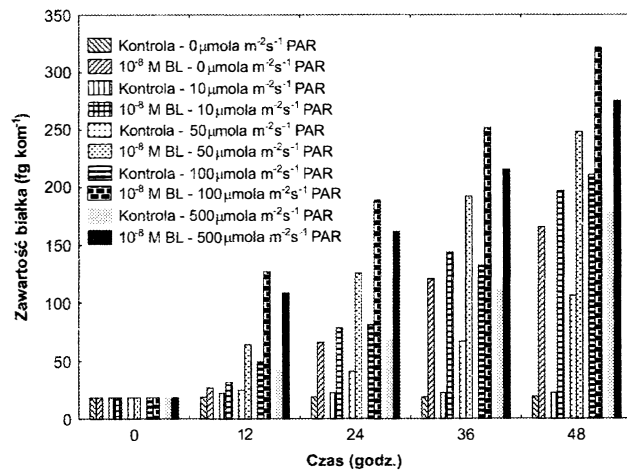
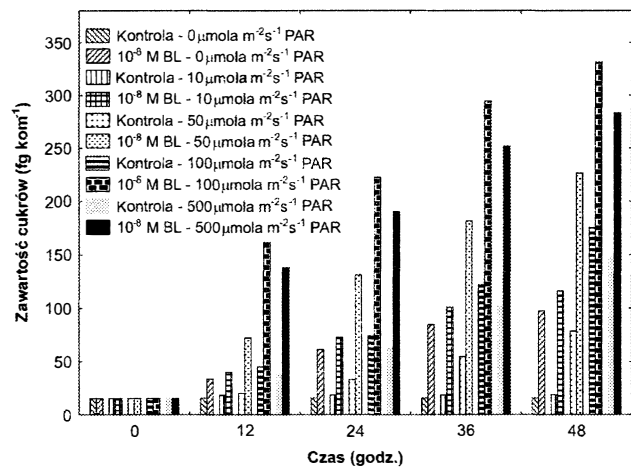
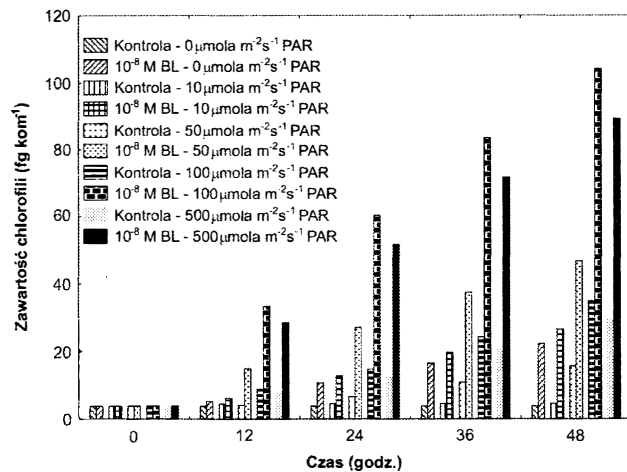
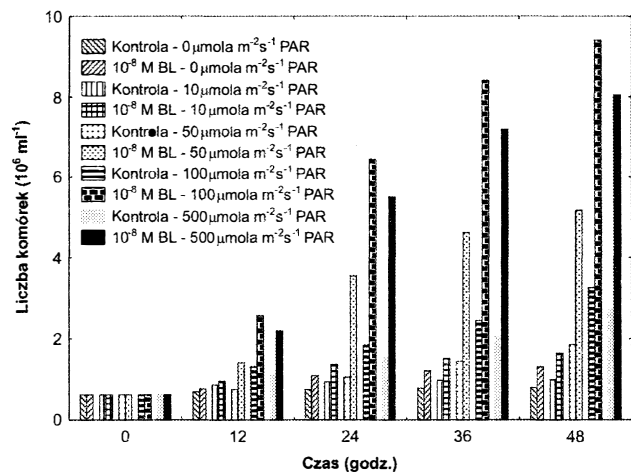
4.4. Wpływ brassinosteroidów na glon *Chlorella vulgaris* poddany działaniu światła o różnej intensywności i barwie

Światło jest źródłem energii, która jest wykorzystywana zaledwie w kilku procentach przez rośliny i przeważnie w kilkunastu procentach przez glony. Rośliny wytwarzają około 2/3 materii organicznej i tlenu na Ziemi. U roślin światło, poza podstawową funkcją w procesie fotosyntezy, odgrywa również istotną rolę w kontroli i regulacji wzrostu, rozwoju, reprodukcji i metabolizmu (Neff i inni 2000). W przypadku roślin światło działa aktywnie na procesy morfogenetyczne i metaboliczne w zakresie długości fal od 320 do 800 nm. Wpływ światła na rośliny jest bardzo zróżnicowany, zależy głównie od ich taksonomii i warunków środowiska.

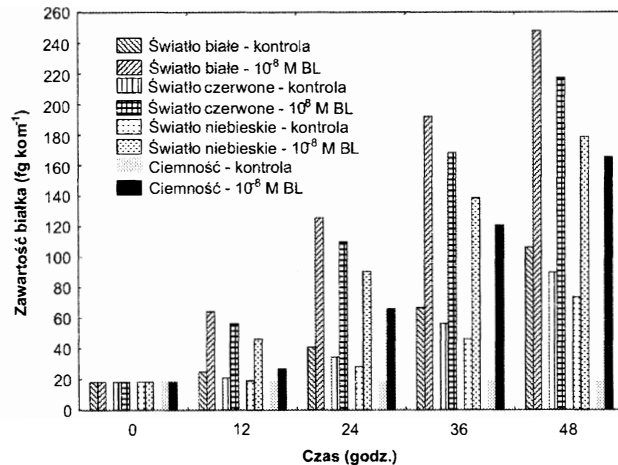
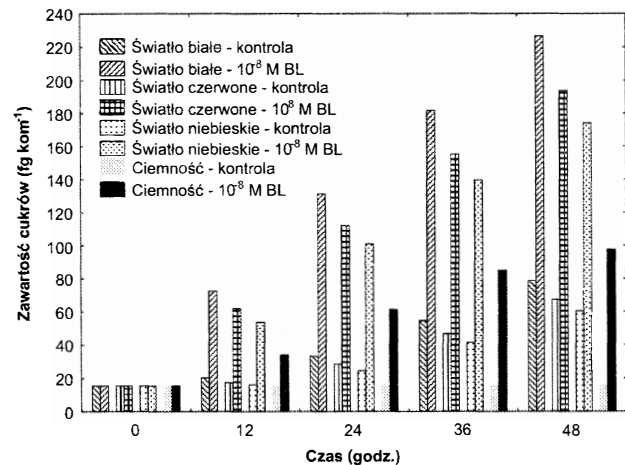
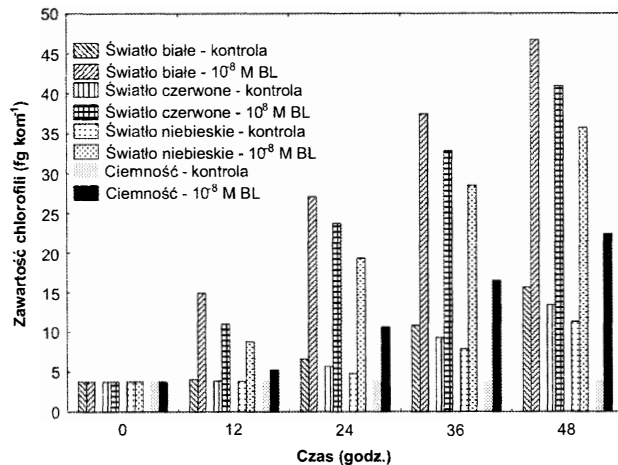
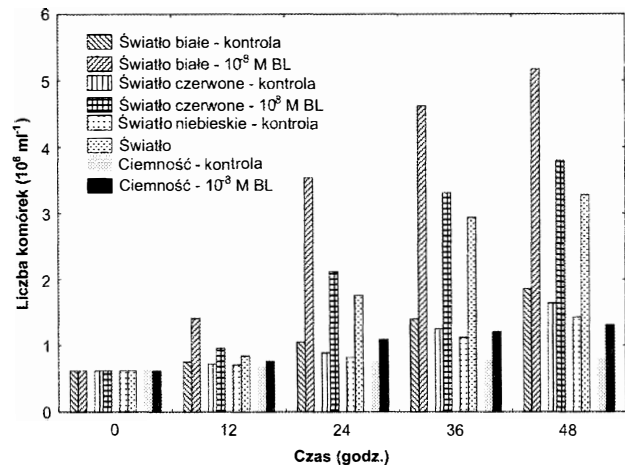
W naturalnym środowisku na rośliny działa wiele różnorodnych czynników stresowych o charakterze biotycznym i abiotycznym, które mogą powodować zakłócenia w ich wzroście, rozwoju i procesach fizjologicznych (Kacperska 1995, 2002). Działanie stresu wywołuje określoną reakcję rośliny, polegającą na zmianie jej wzrostu i metabolizmu. Od stopnia natężenia i czasu trwania lub działania czynnika stresowego zależy czy zmiany te będą miały charakter odwracalny, czy też nie. W wyniku skrajnie wysokiego nasilenia stresu dochodzi do nieodwracalnego uszkodzenia komórek i śmierci rośliny. Stres może zostać wywołany nie tylko przez nadmiar, ale i niedobór niektórych czynników środowiska takich, jak: sole mineralne, woda, tlen i światło. Przystosowanie roślin do skrajnych warunków środowiska polega przede wszystkim na tolerancji i adaptacji do warunków stresowych.

Niniejszy rozdział przedstawia wpływ światła o zróżnicowanej intensywności i barwie na procesy wzrostu i metabolizmu glonu *Chlorella vulgaris* poddanego działaniu brassinolidu (BL). W doświadczeniach zbadano oddziaływanie ciemności oraz światła o intensywności: 10, 50, 100 i 500 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ promieniowania fotosyntetycznego czynnego (PAR) (ryc. 4.20). Ponadto zbadano oddziaływanie światła o barwie białej, czerwonej i niebieskiej na wzrost i rozwój glonu, wyrażony liczbą komórek glonu oraz zawartością białek, chlorofili i cukrów (ryc. 4.21).

Badania przeprowadzone na kulturze glonu *Chlorella vulgaris*, hodowanego w ciemności, wykazały 10–30% przyrost liczby komórek oraz zawartości chlorofili, cukrów i białek w porównaniu do kultury glonu w momencie rozpoczęcia doświadczenia (ryc. 4.20–4.21). Z kolei pod wpływem 10^{-8} M BL wzrastała liczba komórek i zawartość w niej chlorofili, cukrów i białek



Ryc. 4-20. Wpływ brassinolidu (BL) na liczbę komórek, zawartość chlorofilii, cukrów i białka w kulturach *Chlorella vulgaris*, poddanych działaniu światła o różnej intensywności promieniowania fotosyntetycznego czynnego (PAR) podczas 48-godzinnej hodowli (SE < 5%)



Ryc. 4-21. Wpływ brassinolidu (BL) na liczbę komórek, zawartość chlorofilu, cukrów i białka w kulturach *Chlorella vulgaris*, poddanych działaniu światła o różnej barwie o intensywności $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR podczas 48-godzinnej hodowli (SE < 5%)

przeciętnie o 10–23%. Natomiast porównując wzrost i rozwój glonu pod wpływem BL do kultur kontrolnych w poszczególnych godzinach analiz, stwierdzono przeciętnie wzrost o 6–10%. Największą liczbę komórek i zawartość analizowanych parametrów stwierdzono w 48. godzinie hodowli (ryc. 4.20–4.21). Ponadto glony rosnące w ciemności wykazały fazę ograniczonego wzrostu od 36. godziny hodowli. Zjawisko to zaobserwowano wyłącznie w kulturach pozbawionych endogennego BL. Z kolei glony potraktowane BL charakteryzowały się ciągłym wzrostem liczby komórek oraz stymulacją zawartości chlorofili, cukrów i białek (ryc. 4.20–4.21). Zatem w warunkach ciemności traktowanie glonów BL indukowało akumulację ww. składników chemicznych. Można przypuszczać, że fitohormony te mogą w ciemności zastąpić efekt światła białego, które jest niezbędne do indukcji procesów zachodzących w jego obecności takich, jak: podział komórek, biosynteza barwników fotosyntetycznych, cukrów czy białek.

Wpływ światła o intensywności 10, 50, 100 i 500 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR na liczbę komórek i zawartość w nich chlorofili, cukrów i białek w kulturach kontrolnych i traktowanych BL przedstawia rycina 4.20. Glony hodowane przy oświetleniu 10 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR wykazały ograniczony przyrost liczby komórek oraz nieznaczną stymulację zawartości ww. składników chemicznych komórki. W ciągu pierwszych 24 godzin hodowli dochodziło do 50% stymulacji wzrostu i rozwoju glonu w porównaniu do kultur glonu w momencie rozpoczęcia doświadczenia. Natomiast począwszy od 36. godziny trwania eksperymentu zaobserwowano fazę stagnacji, wzrost glonu był nieznaczny i wynosił 6–7% (ryc. 4.20). Z kolei kultury *Chlorella vulgaris* traktowane BL w stężeniu 10^{-8} M charakteryzowały się stymulacją wzrostu i zawartości chlorofili, cukrów i białek przeciętnie o 50–164% w porównaniu do hodowli kontrolnej w godzinie zero (ryc. 4.20). Wraz ze wzrostem intensywności oświetlenia od 50 do 100 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ glonu oraz stymulację zawartości analizowanych składników chemicznych w kulturach *Chlorella vulgaris* (ryc. 4.20). Z kolei światło o intensywności 500 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR było czynnikiem ograniczającym przeciętnie o 15% wzrost liczby komórek glonu oraz zawartości chlorofili, cukrów i białek w porównaniu do kultur poddanych naświetleniu o intensywności 100 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR (ryc. 4.20). Ponadto stwierdzono stymulujący wpływ BL w kulturach glonu narażonych na działanie światła o dużej intensywności, tj. 500 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR (ryc. 4.20).

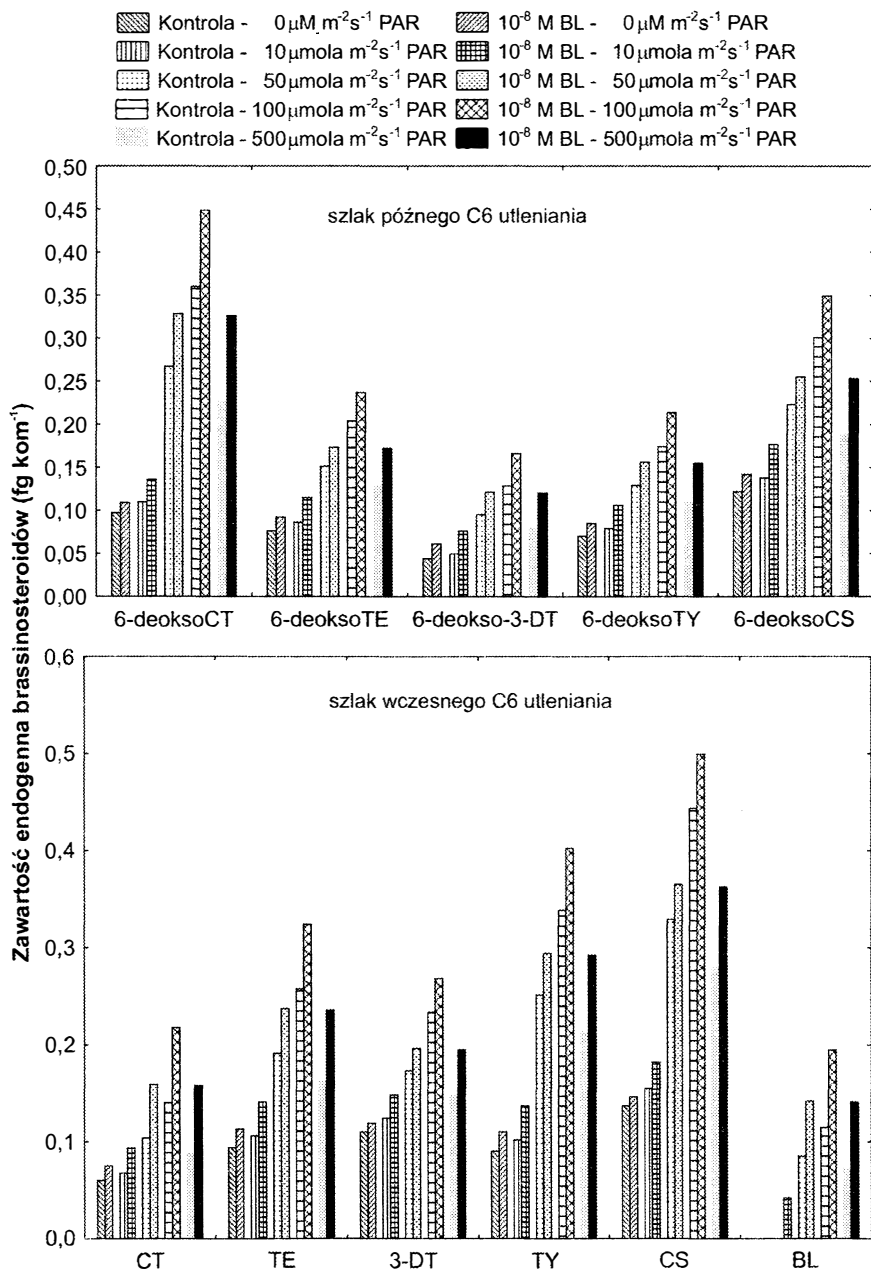
Na podstawie badań własnych stwierdzono, że pod wpływem światła białego liczba komórek *Chlorella vulgaris* wzrastała wprost proporcjonalnie w czasie – od 21% w 12. godzinie hodowli do 200% w 48. godzinie (ryc. 4.21). Z kolei światło czerwone spowodowało przyrost liczby glonu przeciętnie

o 16–164%, a światło niebieskie – o 14–31%. Niezależnie od zastosowanej barwy światła stwierdzono fazę wzrostu logarytmicznego w kulturach kontrolnych. Ponadto okazało się, że najbardziej optymalną barwą światła dla wzrostu glonu było światło białe. Światło niebieskie spowodowało ograniczenie wzrostu liczby komórek *Chlorella vulgaris* w stosunku do kultur naświetlanych światłem białym. Aktywność biologiczna glonu *Chlorella vulgaris* wzrastała pod wpływem naświetlania światłem: białym, czerwonym i niebieskim. Podobną zależność zaobserwowano, traktując kultury glonu optymalnym stężeniem BL (10^{-8} M).

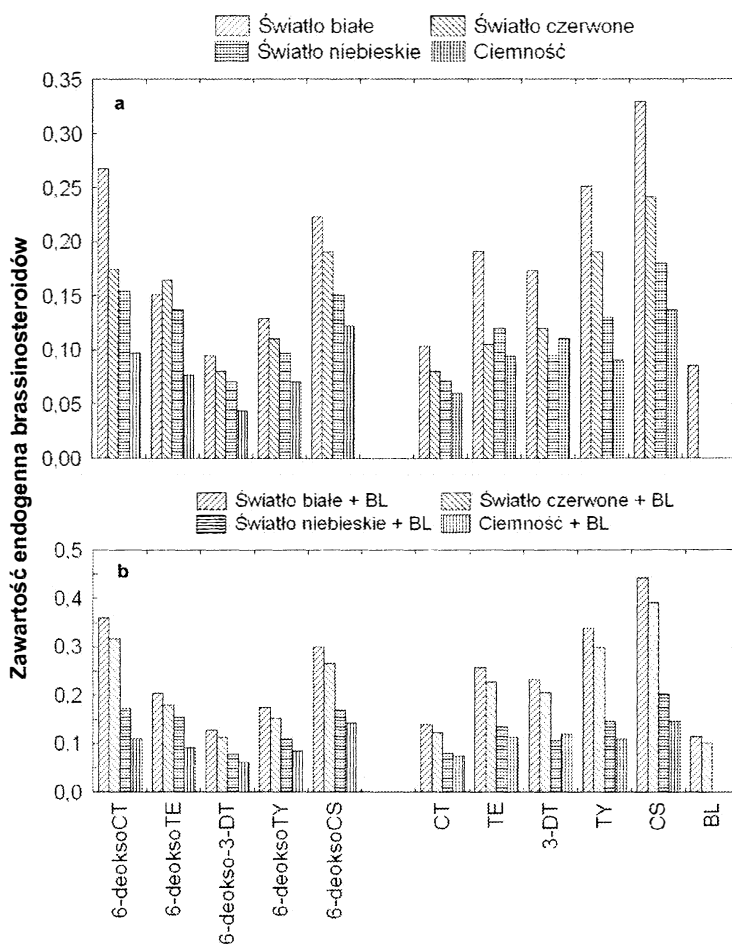
Analogicznie jak w przypadku liczby komórek, wzrastała zawartość chlorofili, cukrów i białek w kulturach *Chlorella vulgaris* nie- i traktowanych BL. Największy przyrost zawartości analizowanych parametrów biochemicznych stwierdzono pomiędzy 36.–48. godziną trwania hodowli (ryc. 4.21). Dalsze wydłużanie czasu hodowli glonu potraktowanego BL nie spowodowało istotnych zmian w zawartości chlorofili, cukrów i białek. Pomiedzy 48. a 72. godziną działania BL obserwowano zahamowanie aktywności biologicznej glonu, określane jako faza stagnacji. Hodowla kultur glonu pozbawiona endogennego BL, lecz naświetlana różnymi rodzajami światła, nie wykazała przejścia w fazę stagnacji (dane nieprezentowane).

Jedną z pierwszych odpowiedzi roślin na działanie czynnika stresowego są zmiany w zawartości hormonów, powodujące zakłócenia w ich równowadze fizjologicznej. Dochodzi często do obniżenia poziomu hormonów odpowiedzialnych za stymulację wzrostu roślin (auksyn, brassinosteroidów, cytokinin, giberelin) bądź też zwiększenia poziomu hormonów hamujących wzrost roślin (ABA, etylenu, kwasy jasmonowego) (Kacperska 1995, 2002, Bajguz i Tretyn 2003a).

W badaniach przeprowadzonych na kulturach glonu *Chlorella vulgaris* wykazano wpływ intensywności oświetlenia (ryc. 4.22) i barwy światła, tj. białego, niebieskiego i czerwonego (ryc. 4.23) na zawartość endogennych BR. Badania były również przeprowadzone w warunkach ciemności. Okazało się, że światło było regulatorem biosyntezy BR w komórkach *Chlorella vulgaris*. Wraz ze wzrostem intensywności oświetlenia, tzn. 0 (ciemność), 10, 50 i 100 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR następowało zwiększenie zawartości BR w komórkach *Chlorella vulgaris* (ryc. 4.22). Natomiast pod wpływem światła o intensywności 500 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR obserwowano znaczne obniżenie się zawartości BR występujących w szlaku biosyntezy w stosunku do hodowli poddanej działaniu światła o intensywności 50 i 100 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR. W przypadku hodowli glonów w ciemności i przy niskiej intensywności oświetlenia (10 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) w kulturach *Chlorella vulgaris* nie stwierdzono obecności BL (ryc. 4.22). W ciemności poddanie ich działaniu 10^{-8} M BL nie



Ryc. 4.22. Wpływ światła o różnej intensywności na zawartość brassinosteroidów szlaku biosyntezy, występujących w komórkach glonu *Chlorella vulgaris*, które zostały poddane działaniu egzogenego brassinolidu (BL) w 48. godzinie hodowli



Ryc. 4.23. Wpływ światła i ciemności na zawartość brassinosteroidów szlaku biosyntezy, występujących w komórkach glonu *Chlorella vulgaris* nie traktowanych (a) i traktowanych (b) brassinolidem (BL) w 48. godzinie hodowli

Dalszy opis w tekście

spowodowało inicjacji syntezy endogennego BL (Ryc. 4.22). Niewielką jego zawartość ($0,042 \text{ fg kom}^{-1}$) stwierdzono dopiero w hodowli poddanej działaniu $10 \mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR oraz egzogenego BL. Zaobserwowano również obniżenie zawartości BL do poziomu $0,072 \text{ fg kom}^{-1}$ pod wpływem $500 \mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR.

Reasumując, najbardziej optymalne dla regulacji biosyntezy BR okazało się światło o intensywności oświetlenia 50 i $100 \mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR. Kultury glonu *Chlorella vulgaris*, poddane działaniu egzogenego BL, wykazały stymulację zawartości poszczególnych BR szlaku biosyntezy. Domi-

nującym szlakiem w biosyntezie BR okazał się szlak wczesnego C6 utleniania (CT → TE → 3-DT → TY → CS). Ogólna zawartość związków wchodzących w reakcje tego szlaku zmieniała się wraz ze wzrostem intensywności oświetlenia: $0 < 10 < 50 < 100 \mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR, wynosząc odpowiednio 0,491, 0,555, 1,048, 1,411 fg kom⁻¹. Ponadto kultury poddane działaniu BL oraz ww. intensywności oświetlenia charakteryzowały się wzrostem zawartości BR średnio o 20% w stosunku do kontroli. Wysoka intensywność światła $500 \mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR spowodowała zahamowanie stymulacji biosyntezy BR szlaku wczesnego C6 utleniania, niezależnie czy kultury były traktowane egzogennym BL, czy też nie.

Stwierdzono również, że zawartość endogennych BR w komórkach glonu *Chlorella vulgaris* ulegała zmianom pod wpływem działania różnych długości światła (ryc. 4.23a). Okazało się, że światło białe było najbardziej aktywnym regulatorem w biosyntezie BR w *Chlorella vulgaris*. Jednocześnie stwierdzono, że wyłącznie światło białe było stymulatorem przemiany CS w BL. Z kolei pod wpływem światła czerwonego, niebieskiego i ciemności dochodziło do zahamowania biosyntezy BL. Dominujący w biosyntezie BR (niezależnie od zastosowanego rodzaju światła czy ciemności) okazał się szlak wczesnego C6 utleniania (ryc. 4.23a). Największą endogenną zawartość w komórkach *Chlorella vulgaris* wykazywał CS. Wynika z tego, że zarówno światło, jak i ciemność były stymulatorami biosyntezy CS, a światło białe wyłącznie stymulowało biosyntezę BL. W szlaku C6 późnego utleniania pod wpływem światła białego i niebieskiego zanotowano największą zawartość 6-deoksoCT (odpowiednio 0,267 i 0,154 fg kom⁻¹). Z kolei światło czerwone najbardziej stymulowało zawartość 6-deoksoTE (0,264 fg kom⁻¹), zaś brak światła był stymulatorem 6-deoksoCS (0,122 fg kom⁻¹). Ponadto stwierdzono, że szlaki wczesnego i późnego C6 utleniania mogą działać równocześnie. Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie endogennych BR, powstających w obu szlakach biosyntezy (ryc. 4.23a).

W kulturach glonu *Chlorella vulgaris* potraktowanych 10^{-8} M BL w obecności światła białego, czerwonego i niebieskiego oraz w ciemności dochodziło do zwiększenia zawartości BR poszczególnych szlaków biosyntezy (ryc. 4.23b). Dodatkowo stwierdzono obecność endogennego BL w hodowli glonu poddanej działaniu światła czerwonego. Pomimo zastosowania egzogennego BL nie wykryto jego endogennej zawartości w komórkach hodowanych w świetle niebieskim i ciemności. W związku z tym można uznać, że światło niebieskie oraz ciemność było czynnikiem hamującym przemianę CS w BL.

Jedną z istotnych właściwości BR jest stymulacja podziałów komórkowych *Chlorella vulgaris* (ryc. 4.7). Badania własne wskazały, że BR przeciętnie 2-krotnie zwiększały liczbę komórek glonu *Chlorella vulgaris* podczas 48-godzinnej

hodowli na świetle (ryc. 4.20–4.21). Natomiast w ciemności następowało obniżenie liczby komórek glonu w kulturach kontrolnych, przy czym nie dochodziło do degradacji i autolizy komórek (ryc. 4.20–4.21). Z kolei pod wpływem BL dochodziło do niewielkiej stymulacji liczby komórek glonu. Prawdopodobnie BL był czynnikiem zastępującym efekt działania światła białego, które było niezbędne do zapoczątkowania podziałów komórkowych (ryc. 4.21). W ciemności dochodziło do zmniejszenia zawartości białek, co potwierdzono w doświadczeniach własnych, wykorzystując kultury komórkowe *Chlorella vulgaris* (ryc. 4.20–4.21). Jednak traktowanie kultur glonu BR przypuszczałnie zastępowało efekt działania światła białego, co manifestowało się aktywacją procesu translacji. W konsekwencji następował wzrost zawartości białek w komórkach *Chlorella vulgaris*.

Charakterystyczną cechą odpowiedzi roślin, poddanych działaniu BR, a hodowanych na świetle o zróżnicowanym natężeniu oraz w ciemności, była wzmożona biosynteza i akumulacja barwników fotosyntetycznych (ryc. 4.20–4.21). Zwiększenie poziomu barwników fotosyntetycznych pod wpływem BR może odbywać się na drodze stymulacji ich biosyntezy i/lub hamowania degradacji. BR na świetle i w ciemności zwiększają aktywność hydratazy δ -aminolewulinowej, kluczowego enzymu biorącego udział w regulacji syntezy tetrapiroli w roślinach (Hotta i inni 1998). Dzięki temu pobudzają akumulację kwasu δ -aminolewulinowego – specyficznego prekursora dla szlaku biosyntezy chlorofilu i hemu. Fitohormony te hamują aktywność oraz obniżają poziom enzymów: chlorofilazy i Mg-dechelatazy degradujących chlorofile w niekorzystnych warunkach środowiska, do których zalicza się również brak światła.

Wzrost zawartości chlorofili w ciemności w komórkach *Chlorella vulgaris* traktowanych BL (ryc. 4.20–4.21) prawdopodobnie może być spowodowany ich udziałem w inhibicji rozkładu barwników. Wzrost zawartości chlorofili w komórkach glonu traktowanych BR może być czynnikiem przyspieszającym tempo procesu fotosyntezy, którego pierwotnymi produktami są monosacharydy. Prawdopodobnie BR stymulują mobilizację cukrowych rezerw komórkowych, polegającą na rozkładzie oligo- i polisacharydów zapasowych (Bajguz i Czerpak 1998).

Z kolei badania Roitscha i innych (2003) wykazały, że wraz ze wzrostem stężenia endogennych BR wzrasta ilość transkryptów mRNA, kodujących inwertazy związane ze ścianą komórkową. Związki te również stymulują aktywność inwertaz, katalizujących hydrolizę sacharozy do glukozy i fruktozy. Zwiększeniu stężenia endogennych cukrów prostych, które są wykorzystywane jako materiał odżywczy i energetyczny, dodatkowo towarzyszy wzrost ciśnienia osmotycznego komórki. Prowadzi to do zwiększenia tempa

pobierania wody przez komórkę, co ostatecznie wpływa na powiększenie jej rozmiarów oraz zahamowanie procesów starzenia się komórek.

W roślinach poza fotoreceptorami, pochłaniającymi energię świetlną, niezbędną do przebiegu procesu fotosyntezy, istnieją różnorodne systemy receptorowe, odbierające bodźce fizykochemiczne ze środowiska zewnętrznego i wewnętrznego organizmu. U roślin naczyniowych i ramienic, a także u niektórych glonów z grupy zielenic, brunatnic i krasnorostów występuje układ fotoreceptorowy pochłaniający bliski ultrafiolet (UV-A), światło niebieskie oraz światło czerwone i daleką czerwień (Hetmann i Kowalczyk 2004b). Dzięki niemu następuje kontrola morfogenezy, reprodukcji i metabolizmu roślin za pomocą światła. Morfogenezę roślin niższych i grzybów indukuje przede wszystkim światło niebieskie i ultrafioletowe (Hetmann i Kowalczyk 2004a). U roślin wyższych rolę w procesach morfogenetycznych pełni czerwień i daleka czerwień. Fotoreceptorem, pochłaniającym światło czerwone i daleką czerwień, jest fitochrom, zaś światło niebieskie – kryptochrom (Kopcewicz i inni 1992, Frankowski i inni 2001).

Fitochrom, którego strukturę chemiczną i funkcję biologiczną u roślin fotosyntezujących dotychczas najlepiej poznano, występuje w dwóch podstawowych odmianach konformacyjnych P_r i P_{fr} , które posiadają właściwości odwracalnej fotokonwersji (Kopcewicz i inni 1992). Forma P_r fitochromu selektywnie pochłania światło czerwone o długościach fal 650–660 nm i przekształca się w aktywną biologicznie formę P_{fr} , która pod wpływem dalekiej czerwieni (725–730 nm) lub przy braku światła przekształca się w formę tego barwnika. Forma fitochromu P_{fr} jest formą aktywną, która bierze udział w przekazywaniu informacji o warunkach świetlnych do dalszych elementów szlaku transdukcji sygnałów. Fitochromy *Arabidopsis thaliana* kodowane są przez pięć genów *PhyA-PhyE*, które monitorują te same sygnały lub różne ich parametry oraz regulują takie same bądź różne odpowiedzi fizjologiczne rośliny (Frankowski i inni 2001, Hetmann i Kowalczyk 2004b). Ze względu na szybki proces degradacji fitochromu A w formie P_{fr} u roślin etiolowanych oraz ze względu na dużą trwałość fitochromu B-E wyróżniono dwie grupy fotoreceptora: labilną – kodowaną przez gen *PhyA* i stabilną – kodowaną przez geny *PhyB-PhyE*.

Białka fitochromowe są rozpuszczalnymi, dimerycznymi chromopoli-peptydami o masie cząsteczkowej 120–130 kDa, których cząsteczkę można podzielić na dwie domeny. Domena N-końcowa (74 kDa) za pośrednictwem wiązań kowalencyjnych wiąże otwartą grupę tetrapirołową – chromofor. Natomiast domena C-końcowa (55 kDa) jest odpowiedzialna za dimeryzację oraz oddziaływanie z białkowymi elementami łańcuchów transdukcji sygnałów, dzięki obecności domen PAS (Kopcewicz i inni 1992, Frankow-

ski i inni 2001). Białka fitochromowe roślin wyższych, obok domeny strukturalnej wiążącej chromofor, posiadają w części C-końcowej polipeptydu dwie subdomeny PRD i HKRD. Subdomena PRD (*ang.* PAS repeat domain), uczestniczy w oddziaływaniach fitochromu z innymi białkami szlaku sygnałowego. Rola subdomeny HKRD (*ang.* histidine kinase-related domain), podobnej do przekaźnika w bakteryjnych kinazach histydynowych, nie została w pełni wyjaśniona (Kevei i Nagy 2003). Fitochromy posiadają zdolność fosforylacji szeregu białek (PKS1, Aux/IAA, kryptochromy, NDPK2) lub w wyniku bezpośrednich oddziaływań z odpowiednimi białkami jądrowymi (PIF3, HFR1/REP/RSF1, PIF4, ELF3, ARR4) mogą uczestniczyć w regulacji transkrypcji genów (Hetmann i Kowalczyk 2004b). Charakterystycznymi reakcjami roślin na światło czerwone i daleką czerwień są: ekspresja genów białek PSI i PSII (*fnr, cab*) oraz genów odpowiedzialnych za biosyntezę antocyjanów (*chs*). Związkiem działającym jako wtórny przekaźnik pomiędzy fitochromem a syntezą antocyjanów jest cGMP, który w połączeniu z jonami wapnia i CaM prowadzi do syntezy białek fotosystemu PSI. Wiadomo, że jony wapnia i CaM pośredniczą w biosyntezie białek fotosystemu PSII. Sygnały świetlne odbierane przez fitochromy uruchamiają co najmniej dwa niezależne szlaki sygnałowe. Pierwszy, który przebiega dość szybko, polega na transporcie aktywnej formy fitochromów z cytoplazmy do jądra, gdzie z odpowiednimi białkami tworzą kontrolowane przez światło kompleksy regulujące transkrypcję genów. Drugi, wolniejszy szlak prowadzi do zmiany stężenia białek regulujących transkrypcję na drodze regulowanej przez światło ubikwitynacji odpowiednich białek i ich degradacji w proteasomach. Elementami szlaków sygnałowych są: białka jądrowe, białka zlokalizowane na terenie cytoplazmy, a także, tak jak w przypadku COP1, białka zmieniające swoją lokalizację w zależności od warunków świetlnych.

Poza fitochromem u niektórych roślin naczyniowych oraz glonów, należących do zielenic, chryzofitów, brunatnic i krasnorostów oraz u wielu rodzajów grzybów, zwłaszcza *Phycomyces* i *Trichoderma*, stwierdzono obecność fotoreceptorów absorbujących światło niebieskie w zakresie fal 370–480 nm i bliski ultrafiolet (UV-A) w zakresie fal 320–370 nm (Kamiya 1998, Suárez-López i Coupland 1998, Tretyn i Wiśniewska 1999, Lin 2000, Liscum i inni 2003, Hetmann i Kowalczyk 2004a). Fotoreceptorem pochłaniającym te rodzaje światła jest kryptochrom – białko rozpuszczalne, które posiada dwie grupy chromoforowe: pierwsza to flawina, występująca w formie utlenionej (FAD) oraz częściowo (FADH[•]) lub w pełni zredukowanej (FADH₂); a druga, w przypadku *Cry Arabidopsis*, to pteryna pochłaniająca światło niebieskie. Flawina może również funkcjonować w stosunkowo stabilnej formie semi-

chinonowej (FAD⁻), która ma zdolność pochłaniania światła zielonego. Gen *HY4*, zbudowany z trzech intronów i czterech eksonów, koduje białko CRY1 składające się z 681 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej 75,8 kDa (Tretyn i Wiśniewska 1999, Hetmann i Kowalczyk 2004a). Właściwości CRY1 są nietypowe, ponieważ jego *N*-końcowa domena wykazuje wysoki stopień homologii do bakteryjnych fotoliaz, zaś fragment *C*-końcowy budową zbliżony jest do zwierzęcego białka kurczliwego – tropomiozyny. Między obiema domenami występuje odcinek łącznikowy, który nie wykazuje podobieństwa do znanych polipeptydów. Analiza pierwszorzędowej struktury białka CRY1 wykazała brak w nim potencjalnych odcinków transbłonowych. Poza genem *HY4* (*CRY1*), kodującym białkowy składnik kryptochromu typu CRY1, sklonowano gen *CRY2*, którego białkowy produkt wykazuje 52% stopień identyczności składu aminokwasów w stosunku do białka CRY1. Absorpcja światła niebieskiego przez kryptochrom przypuszczalnie zapoczątkowuje łańcuch przemieszczania sygnału, prowadzący do powstania odpowiedzi komórkowych. Jednym z najszybszych procesów indukowanych przez tę barwę światła jest depolaryzacja błon komórkowych. Mechanizm działania światła niebieskiego na hypokotyle ogórka i *Arabidopsis* może polegać na hamowaniu aktywności plazmolemowej H⁺-ATPazy (w trakcie depolaryzacji) oraz stymulacji kanałów jonowych (podczas repolaryzacji). Absorpcji światła niebieskiego przez kryptochrom towarzyszy aktywacja białek wiążących GTP i wzrost stężenia cytoplazmatycznego Ca²⁺. Przypuszcza się, że występowanie różnych fotoreceptorów wywala między nimi następujące typy oddziaływań: pierwszy – kiedy mechanizmy działania fotoreceptorów są niezależne od siebie, drugi – kiedy mogą współdziałać w regulacji określonego procesu, wywołując efekt synergistyczny, trzeci – gdy wpływają na niego przeciwnie, wywołując efekt antagonistyczny. Przykładem współdziałania synergistycznego jest współdziałanie fitochromu z kryptochromem u niektórych roślin naczyniowych i glonów z grupy brunatnic, krasnorostów i zielenic w stymulacji biosyntezy antocyjanin i flawonoidów (Czerpak 1993).

Fotoreceptory, pochłaniające światło zielone, a sporadycznie zielono-niebieskie lub zielono-żółte, nazwano fikochromami (Thümmler i Rüdiger 1984, Holzwarth 1991, Czerpak 1993, Hellingwerf i inni 1996). Występują one głównie w glonach z grupy: kryptofitów i tobołków, zaś nielicznie występują u zielenic, krasnorostów i roślin naczyniowych. Fikochromy pochłaniają przeważnie światło o długościach fal w zakresie 500–600 nm. Pod względem budowy chemicznej są chromoproteinami, w których część białkowa jest związana z barwnikami fikobilinowymi, przeważnie fikocyjanem lub bilioliolną, tworząc allofikocyjaninę. Przypuszcza się, że w receptorach fiko-

chromowych w niewielkich ilościach może znajdować się fikoerytryna lub bilirodyna. Prawdopodobnie jednak związki te stanowią odrębne fotoreceptory o właściwościach i działaniu antagonistycznym w stosunku do fikochromu. Dotychczas wyizolowano fikochrom *a*, który pochłania światło zielono-żółte w zakresie fal 575–580 i 630 nm, fikochrom *b*, absorbujący światło niebiesko-zielone w zakresie fal 510 i 570 nm i fikochrom *c* pochłaniający wyłącznie światło zielone w zakresie fal 545–560 nm).

Światło czerwone działa stymulująco na przepuszczalność błon plazmatycznych, zwłaszcza na transport aktywny metabolitów (Kopcewicz i inni 1992, Czerpak 1993, Lee i Palsson 1996, Parks 2003). W zależności od gatunku rośliny światło to działa na błony depolaryzująco lub hiperpolaryzująco, a także na zmiany struktury i biochemizmu kanałów jonowych i aktywność białek nośnikowych oraz enzymów, uczestniczących w transporcie aktywnym. Stwierdzono aktywację światła na transport jonów H^+ , K^+ , Cu^{2+} , Mg^{2+} przez plazmolemę. Działanie to polega głównie na aktywacji pomp jonowych, działających przy udziale enzymów ATP-az. Pod wpływem światła czerwonego następuje aktywacja kanałów jonowych w plazmolemie poprzez stymulację biosyntezy diacyloglicerolu i trifosfoinozytolu, spełniających rolę przekaźników chemicznych drugiego rzędu.

Fitochrom aktywuje niektóre enzymy z klasy oksydoreduktaz (np. katalazę, peroksydazę, oksydazę askorbinianową), część enzymów uczestniczących w cyklu Calvina, oksydazę cytochromową oraz zwiększa szybkość przepływu elektronów przez półogniwa łańcucha oddechowego (Kopcewicz i inni 1992, Parks 2003). Efektem tego działania jest wzrost wydajności biosyntezy ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Ponadto proces fotooddychania jest aktywowany przez światło czerwone, które powoduje dominację cyklu glikolanowego nad glioksalowym. Światło czerwone i niebieskie działa stymulująco na procesy metaboliczne takie, jak: fotosynteza, biosynteza kwasów nukleinowych, białek, barwników fotosyntezujących, głównie chlorofili, antocyjanin, fikocyjaniny (Neff i inni 2000, Frankowski i inni 2001). Wzrasta aktywność enzymów: fosfokinazy NAD, dolicholu, kwasu asparaginowego, fruktozy, glukozy, glicerolu, inozytolu, cyklazy i fosfodiesterazy adenylowej, reduktazy azotanowej, fosfolipaz A, ATPaz, metylaz i innych kinaz białkowych, uczestniczących w metabolizmie protein. U glonów rosnących na różnych głębokościach procesy morfogenetyczne i metaboliczne są kontrolowane równoległe przez oba fotoreceptory – fitochrom i kryptochrom (Parks 2003). Światło czerwone i niebieskie stymuluje wzrost pojedynczych komórek i wielokomórkowych plech, ich podziały, tworzenie się w nich ryzoidów, różnego rodzaju wyrostków, np. włosków, wici oraz wytwarzanie gamet i zarodników, a także ich uwalnianie do wodnego środowiska. Natomiast

daleka czerwień z wyjątkiem ramienic działa antagonistycznie w stosunku do światła czerwonego.

Na podstawie badań własnych stwierdzono, że najbardziej optymalnym rodzajem światła dla wzrostu i rozwoju glonu jest światło białe. Światło czerwone i niebieskie powoduje ograniczenia wzrostu *Chlorella vulgaris* w stosunku do kultur naświetlanych światłem białym. Aktywność biologiczna glonu *Chlorella vulgaris*, wyrażona zawartością białek, chlorofili i cukrów, wzrasta pod wpływem naświetlania światłem: białym, czerwonym i niebieskim. Nie stwierdzono różnic dla tej zależności w kulturach kontrolnych czy traktowanych BL. Jedynie kultury traktowane BL wykazują większą aktywność biologiczną, charakteryzującą się wzrostem liczby komórek oraz większą zawartością chlorofili, cukrów i białek (ryc. 4.21).

BR stymuluje na świetle wydłużanie się pędów. Wykazano, że wydłużanie pędów garbipłata (*Vigna radiata*) następuje pod wpływem monochromatycznego światła niebieskiego i dalekiej czerwieni (Chory i Li 1997, Neff i inni 2000). Jednocześnie w tych warunkach świetlnych BL nie wykazywał żadnego działania. Ponadto wzrost epikotyli był opóźniany przez światło białe i monochromatyczne światło czerwone. Wzrost epikotyli nastąpił dopiero pod wpływem BL, który niwelował hamujący wpływ ww. długości światła. Wiadomo, że światło o odpowiednich długościach fal jest selektywnie pochłaniane przez specyficzne receptory komórkowe. Prawdopodobnie pod ich wpływem wzrasta biosynteza BR oraz pozostałych fitohormonów, głównie auksyn i giberelin.

Wzrost i rozwój roślin regulowany jest w wyniku współdziałania światła i fitohormonów. Rośliny, rosnące w ciemności i na świetle, charakteryzują się zgoła odmiennym pokrojem. W przypadku roślin dwuliściennych, np. *Arabidopsis thaliana*, światło kontroluje wszystkie etapy ich wzrostu i rozwoju, poczynając od kiełkowania nasion, a na kwitnieniu i starzeniu się kończąc (Li i inni 1996, Barnes i inni 1997). Natomiast wyrosłe w ciemności siewki *Arabidopsis* posiadają wydłużony i wygięty u szczytu w kształcie kolanka hypokotyl, który jest zakończony złożonymi, słabo rozwiniętymi liścieniami. Inny fenotyp mają rośliny wyrosłe na świetle: jest to krótki, pozbawiony kolanka hypokotyl zwieńczony rozwiniętymi, zielonymi liścieniami. Tego typu pokrój charakteryzuje również niektóre mutanty *Arabidopsis* takie, jak: *det2* (*de-etiolated 2*), *cpd* (*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*). Mutanty te, rosnąc na świetle, mają karłowaty pokrój, są ciemnozielone, ich starzenie jest opóźnione, a ich kwiaty są męskosterylne. Wykazano, że białkowy produkt genu *DET2* ma bardzo wysoki stopień homologii do 5 α -reduktazy steroidów ssaków, który przekształca progesteron i testosteron w ich dihydrospochodne. Jednakże w przypadku *Arabidopsis* enzym

ten odpowiada za przekształcanie kampesterolu w kampestanol. Wprowadzeniu genu *DET2* do mutantu *Arabidopsis* spowodowało wzrost poziomu kampestanolu i zmianę fenotypu podobnego do roślin typu dzikiego. Z kolei gen *CPD* koduje białko, które wykazuje wysoki stopień identyczności sekwencji aminokwasów z kilkoma typami cytochromów P450 u ssaków (Szekeres i inni 1996). Również inna mutacja *Arabidopsis*, *dwarf4* (*dwf4*) prowadzi do zaburzeń w metabolizmie BR. Okazało się, że gen *DWF4* koduje enzym monooksygenazę cytochromu P450, który odpowiada za wprowadzanie grup hydroksylowych do łańcucha bocznego BR. Podobnie jak i inne mutanty *Arabidopsis*, wykazujące deficyt BR, rosnący w ciemności *dwf4*, charakteryzuje się krótkim hypokotylem, brakiem kolanka, rozłożonymi liścieniami i rozwijającymi się zawiązkami liści – cechami obserwowanymi u siewek *Arabidopsis* rosnących na świetle. Wszystkie te mutanty wykazują charakterystyczny karłowaty fenotyp, a ich wzrost może być przywrócony do normy poprzez podanie egzogennych BR. Inne fitohormony nie mają istotnego wpływu na ten proces. Wyniki przytoczonych badań wskazują, że zarówno światło, jak i BR mogą współdziałać w regulacji morfogenezy roślin.

Powszechnie wiadomo, że wiązanie się cząsteczek sygnałowych z receptorem często prowadzi do aktywacji tzw. białek sprzęgających. Wśród nich można wyróżnić tzw. małe (niskocząsteczkowe) i duże (heterotrimerowe) białka wiążące GTP, zwane białkami G (Kang i inni 2001). Białka te, występujące po wewnętrznej stronie błony komórkowej, przenoszą stan aktywacji z receptora na białka efektorowe, którymi mogą być kanały jonowe lub różnego typu enzymy. Obecnie wiadomo, że zarówno nisko-, jak i wysokocząsteczkowe białka G mogą uczestniczyć w mechanizmie działania różnych fitohormonów oraz fotoreceptorów. W mechanizm działania BR w grochu może być zaangażowane niskocząsteczkowe białko G, które jest kodowane przez gen *Pra2*, a jego aktywność jest hamowana przez światło. Gen *Pra2* ulega ekspresji wyłącznie w szybko rosnącej, górnej części epikotyli. Również w tej części etiolowanej siewki grochu, najbardziej wrażliwej na działanie egzogennie podawanych BR, obserwuje się najwyższy poziom fitochromu, receptora światła czerwonego i dalekiej czerwieni. Białkiem efektorowym, na które może oddziaływać *Pra2* okazał się produkt genu *DDWF1* (*ang.* dark-induced DWF-like protein1), którego najwyższy poziom ekspresji występuje w szybko rosnącej części hypokotyli, to jest miejscu największego nagromadzenia cząsteczek *Pra2* i fitochromu. Stwierdzono również, że białka *Pra2* i *DDWF1* mogą bezpośrednio oddziaływać ze sobą *in vitro* i *in vivo*. Na podstawie analizy komputerowej sekwencji nukleotydowych *DDWF1* stwier-

dzono, że koduje ono cząsteczki hydroksylazy cytochromu P450, enzymu katalizującego C-2 hydroksylację TY do CS. Na tej podstawie można sądzić, że małe białko G (kodowane przez *Pra2*) pełni funkcje regulatora aktywności katalitycznej DDWF1, a tym samym integruje szlaki transdukcji sygnałów indukowanych przez światło i BR.

Dotychczas niewiele uwagi poświęcono oddziaływaniu różnego rodzaju światła na regulację biosyntezy BR. W pędach ryżu (*Oryza sativa*) poziom BR takich, jak: CS, TY, 6-deoksoCS znacząco wzrósł pod wpływem światła białego w porównaniu do zawartości endogennych BR w sadzonkach rosnących wyłącznie w ciemności (Yokota i inni 2001). Stwierdzono, że światło niebieskie oddziałuje podobnie do światła białego. Z kolei wpływ światła czerwonego i dalekiej czerwieni na zawartość BR był znacznie słabszy w porównaniu do działania światła niebieskiego. Wykazano, że światło zapoczątkowuje biosyntezę BR w pędach ryżu, a najbardziej efektywnym okazało się światło niebieskie. Natomiast w korzeniach ryżu nie zaobserwowano znaczącego wpływu światła na poziom BR.

Badania własne wykazały, że światło białe było największym czynnikiem regulującym biosyntezę BR w glonie *Chlorella vulgaris*. Jednocześnie stwierdzono, że tylko pod wpływem światła białego zachodziła przemiana CS w BL. Z kolei pod wpływem światła czerwonego, niebieskiego i ciemności dochodziło do zahamowania biosyntezy BL (ryc. 4.23). Podobnie jak w kulturach komórkowych barwinka różyczkowego (*Catharanthus roseus*) szlaki wczesnego i późnego C6 utleniania mogą działać równocześnie w glonie *Chlorella vulgaris* (ryc. 4.22). Natomiast w *Arabidopsis thaliana* związki pośrednie obu szlaków występują wyłącznie w sadzonkach rosnących na świetle. Jednocześnie wykazano zróżnicowanie aktywności BR typu 6-okso i 6-deokso w mutantach *det2* (Fujioka i inni 1997) i *dwf4* (Choe i inni 1998) rosnących na świetle i ciemności. Mutanty *det2 Arabidopsis*, które charakteryzują się zaburzeniami w szlaku transdukcji sygnałów świetlnych są fenotypowo podobne do mutantów *cpd*. Aby przywrócić wzrost karłowatego mutantu, rosnącego na świetle, wystarczy poddać go działaniu 6-deoksoBR. Mimo braku bezpośrednich dowodów sądzi się, że szlak późnego C6 utleniania odgrywa dominującą rolę podczas wzrostu roślin na świetle, podczas gdy szlak wczesnego C6 utleniania byłby dominujący w ciemności. Przypuszcza się, że światło niebieskie może stymulować biosyntezę BL (Fujioka i inni 1997, Li i inni 1996, Chory i Li 1997, Clouse i Feldmann 1999, Li i Chory 1999) oraz wpływać na biosyntezę CS – bezpośredniego prekursora BL (Nomura i inni 1997, 2001, Yokota 1997).

Na podstawie wyników uzyskanych w tej części badań wyciągnięto następujące wnioski:

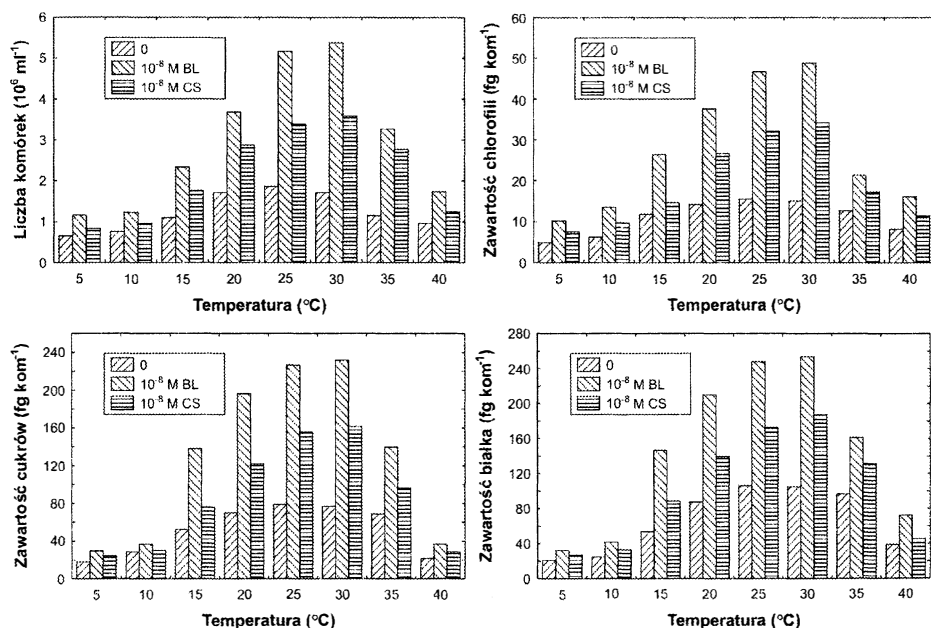
1. W kulturach *Chlorella vulgaris*, rosnących na świetle o intensywności 10 i 500 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR, stwierdzono zmniejszenie liczby komórek glonu oraz zawartości chlorofili, cukrów i białek w porównaniu do kultur poddanych naświetleniu o intensywności 50 i 100 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR;
2. W kulturach *Chlorella vulgaris*, rosnących na świetle i ciemności, a traktowanych brassinolidem, stwierdzono wzrost liczby komórek oraz zawartości chlorofili, cukrów i białek;
3. Barwa światła wywierała istotny wpływ na wzrost i rozwój *Chlorella vulgaris* – aktywność biologiczna glonu wzrastała pod wpływem naświetlania światłem: białym, czerwonym i niebieskim;
4. Egzogenny brassinolid znosił hamujący wpływ światła czerwonego i niebieskiego na rozwój *Chlorella vulgaris*;
5. W ciemności brassinolid zastępował efekt działania światła białego, które było niezbędne do zapoczątkowania podziałów komórkowych *Chlorella vulgaris*;
6. Barwa światła była czynnikiem regulującym biosyntezę brassinosteroidów w *Chlorella vulgaris*;
7. Pod wpływem światła białego zachodziła przemiana CS w BL, natomiast światło czerwone i niebieskie oraz ciemność zahamowały tę przemianę;
8. Intensywność światła była regulatorem biosyntezy BR w *Chlorella vulgaris*:
 - wraz ze wzrostem natężenia oświetlenia (0–100 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) zwiększała się zawartość BR;
 - wysokie natężenie oświetlenia (500 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) spowodowało obniżenie się zawartości BR.

4.5. Wpływ brassinosteroidów na glon *Chlorella vulgaris* poddany działaniu różnych temperatur

Aktywność fitohormonów determinują czynniki wewnętrzne, obejmujące procesy ich biosyntezy, degradacji, koniugacji oraz transportu. Efekty wywołane przez te związki modyfikują również sygnały środowiskowe, do których należy zaliczyć m.in. temperaturę (Davies 2004).

Celem niniejszego rozdziału było przedstawienie odpowiedzi brassinosteroidów w kulturach *Chlorella vulgaris*, poddanych działaniu temperatury (5–40°C) na liczbę komórek glonu oraz zawartość białek, chlorofili i cukrów. Ponadto wyjaśniono rolę BR w mechanizmie adaptacyjnym do stresu wywołanego wysoką temperaturą. Poddano analizie białka, których synteza jest indukowana wysoką temperaturą.

Zmiany liczby komórek oraz zawartości chlorofili, cukrów i białek w kulturach glonu *Chlorella vulgaris*, rosnącego w zróżnicowanych temperaturach (5–40°C), pod wpływem brassinolidu (BL) i kastasteronu (CS) w stężeniu 10^{-8} M przedstawia rycina 4.24. Pomiary liczby komórek dokonano w 48. godzinie trwania eksperymentu.



Ryc. 4.24. Wpływ brassinosteroidów na liczbę komórek, zawartość chlorofili, cukrów i białka w kulturach *Chlorella vulgaris*, poddanych działaniu różnej temperatury w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)

Badane BR pobudzały podziały komórkowe glonu, powodując przyrost liczby komórek, niezależnie od warunków termicznych. W kulturach kontrolnych poddanych działaniu 5–10°C stwierdzono nieznaczny wzrost liczby komórek *Chlorella vulgaris* w ciągu 48 godzin hodowli. W porównaniu do liczby komórek w momencie rozpoczęcia doświadczenia zanotowano 8–27% stymulację wzrostu w powyższych warunkach termicznych. Wraz ze wzrostem temperatury stwierdzono wzrost liczby komórek glonu, zarówno w hodowli kontrolnej, jak i traktowanej BR. Efekt ten był najbardziej widoczny w przedziale temperatur 5–25°C, osiągając optymalne działanie w temperaturze 25°C. Najbardziej stymulujące działanie na intensywność podziałów komórek *Chlorella vulgaris* stwierdzono pod wpływem 10⁻⁸ M BL, który zwiększał ich liczebność o 278% w 25°C i 314% w 30°C w porównaniu z kontrolą. Nieco mniejszą aktywnością charakteryzuje się stężenie 10⁻⁸ M CS, które indukowało prawie 2-krotny wzrost liczby komórek *Chlorella vulgaris*. Ponadto zwiększenie temperatury od 30 do 40°C spowodowało ograniczenie wzrostu glonu, pomimo zastosowania egzogennych BR (ryc. 4.24).

Bardzo ważnym efektem działania BR na poziomie pojedynczej komórki jest ich udział w indukcji akumulacji chlorofili niezbędnego do przebiegu procesu fotosyntezy. Największy przyrost zawartości chlorofili stwierdzono również w temperaturze 25–30°C w hodowli kontrolnej i traktowanej BL czy CS. Odnotowano 3-krotny wzrost zawartości chlorofili pod wpływem 10⁻⁸ M BL i 2-krotny pod wpływem CS. Podobnie jak w przypadku liczby komórek, niska (5–15°C) i wysoka (35–40°C) temperatura spowodowały zahamowanie biosyntezy chlorofili.

Zmiana zawartości cukrów w komórkach glonu związana była z działaniem stymulującym BR oraz zmieniającymi się warunkami termicznymi (ryc. 4.24). Największą aktywność, niezależnie od zastosowanej temperatury, wykazywały kultury glonu potraktowane BL, zaś najmniejszą – CS. Niska temperatura była czynnikiem ograniczającym wzrost zawartości cukrów w pojedynczej komórce. Kultury glonu potraktowane BR charakteryzowały się nieznacznym, 2–7%, przyrostem zawartości cukrów. Z kolei w glonach poddanych działaniu wysokich temperatur (35–40°C) zanotowano spadek zawartości cukrów w stosunku do kultur hodowanych w temperaturze 25–30°C.

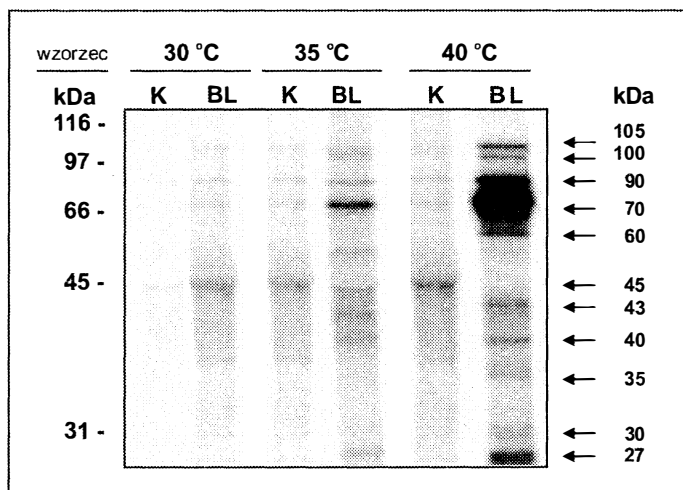
Przeprowadzone badania wskazują, że na poziom białek największy stymulujący wpływ posiadały BR w kulturach *Chlorella vulgaris*, poddanych działaniu temperatury w zakresie 25–30°C (ryc. 4.24). W wyniku jej działania stwierdzono 2,5-krotny przyrost zawartości białek w komórkach glonu potraktowanego BL w odniesieniu do kontroli. Nieco mniejszą aktywnością charakteryzuje się CS, który stymulował 2-krotnie wzrost zawartości białek.

Hodowla glonów w temperaturze 40°C wykazuje zahamowanie biosyntezy białek, które nie było niwelowane poprzez podanie egzogennych BR.

Badania własne wykazały, że kultury glonu *Chlorella vulgaris*, poddane działaniu BR w warunkach niskiej (5°C), jak i wysokiej (40°C) temperatury, charakteryzują się większą przeżywalnością. Oznacza to zwiększony wzrost liczby komórek glonu oraz wzrost zawartości chlorofili, cukrów i białek w stosunku do kontroli (ryc. 4.24). W związku z tym podjęto badania, umożliwiające wyjaśnienie mechanizmów obronnych, za indukcję których odpowiadają BR. Wiadomo, że stres temperaturowy jest źródłem tworzenia się dużych ilości reaktywnych form tlenu, zaś rośliny posiadają szereg systemów obronnych, umożliwiających prawidłowe funkcjonowanie w obecności aktywnych form tlenu. Więcej danych na ten temat przedstawia rozdział 4.7.

Bodziec cieplny jest jednym z czynników determinujących syntezę specyficznych białek ochronnych, zwanych białkami szoku termicznego (HSP, *ang.* heat shock proteins), które chronią pozostałe białka komórkowe przed denaturacją (Gwóźdź 1996). HSP pełnią więc rolę tzw. białek opiekuńczych, zapewniając innym białkom utrzymanie lub uzyskanie właściwej, funkcjonalnej konfiguracji przestrzennej nie tylko w warunkach stresu termicznego, ale i normalnych.

W celu precyzyjnego określenia frakcji białek, których synteza była indukowana przez 10^{-8} M BL w 3. godzinie trwania hodowli kultur *Chlorella vulgaris*, poddanych działaniu temperatur w zakresie 30–40°C, przeprowadzono ich elektroforezę na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) oraz identyfikację na nitrocelulozie metodą western blotting (ryc. 4.25, tabela 4.6). Analiza elektroforogramu wskazała, że BL selektywnie stymulował biosyntezę polipeptydów. W warunkach kontrolnych, tj. w kulturach glonu poddanych działaniu temperatury 30°C, pojawiły się polipeptydy o masie cząsteczkowej 45, 70 i 90 kDa. Wzrost temperatury o 5°C spowodował stymulację syntezy kolejnych polipeptydów o masach cząsteczkowych 30, 40 i 100 kDa. W wyniku działania temperatury 40°C w komórkach glonu pojawił się polipeptyd o masie cząsteczkowej 105 kDa. Wzrost poziomu syntezy stwierdzono jedynie w przypadku polipeptydu o masie cząsteczkowej 45 kDa. Natomiast w komórkach *Chlorella vulgaris*, traktowanych 10^{-8} M BL oraz poddanych działaniu 30°C, zaobserwowano pojawienie się 6 polipeptydów o masach cząsteczkowych 30, 40, 45, 70, 90 i 100 kDa. Trzech z nich (30, 40, 100 kDa) nie stwierdzono w kulturach kontrolnych. Natomiast w temperaturze 35°C BL stymulował syntezę nowych polipeptydów o masach cząsteczkowych 27, 43 i 60 kDa. Z kolei w kulturach *Chlorella vulgaris*, poddanych działaniu temperatury 40°C oraz 10^{-8} M BL, nastąpiła stymulacja kolejnych polipeptydów



Ryc. 4.25. Rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE, western blotting) białek komórkowych kultury glonu *Chlorella vulgaris*, poddanego działaniu temperatury w zakresie 30–40°C pod wpływem 10^{-8} M brassinolidu (BL) w porównaniu do kontroli (K) w 3. godzinie hodowli

(35, 105 kDa). Zwiększoną syntezę 6 polipeptydów (27, 60, 70, 90, 100, 105 kDa) obserwowano wraz ze wzrostem temperatury z 35 do 40°C w kulturach traktowanych BL. Hormon ten zwiększał poziom niektórych polipeptydów, np. o masie 70 kDa, zaś syntezę innych indukował *de novo* (27, 35, 43 i 60 kDa). Podsumowując wyniki tej części badań należy stwierdzić, że BL selektywnie oddziaływał na syntezę określonych polipeptydów.

Rośliny podlegają ciągłym różnorodnym sygnałom fizycznym takim, jak: światło, przyciąganie ziemskie, zmiany temperatury i chemicznym, jak działanie hormonów. Mogą one wywołać w roślinie stres, który w zależności od natężenia, czasu trwania lub działania czynnika może spowodować zmiany o charakterze odwracalnym lub nieodwracalnym. Jednym z czynników stresowych, który niekorzystnie wpływa na wzrost i metabolizm roślin jest szok temperaturowy. Reakcja roślin na ten rodzaj stresu jest dotąd najlepiej scharakteryzowana na poziomie molekularnym. Odpowiedź komórek na stres termiczny polega na ograniczeniu wytwarzania normalnych białek i indukcji syntezy nowych, specyficznych białek szoku termicznego (HSP) (Porankiewicz i Gwóźdź 1993, Gwóźdź 1996, Iba 2002, Cymers i Niemiałowski 2004). Temperatura, jaka może spowodować syntezę specyficznych białek jest zróżnicowana w zależności od gatunku rośliny, zazwyczaj wynosi od 10–15°C powyżej wyznaczonej doświadczalnie optymalnej temperatury wzrostu. U roślin można wyróżnić trzy fazy odpowiedzi na działanie wysokiej temperatury: a) indukcja syntezy (pierwsze kilka minut); b) synteza HSP

Tabela 4.6. Szacunkowa zawartość frakcji białek HSP glonu *Chlorella vulgaris*, poddanego działaniu temperatury w zakresie 30–40°C pod wpływem 10⁻⁸ M brassinolidu (BL) w porównaniu do kontroli (K) w 3. godzinie hodowli

Masa cząsteczkowa polipeptydów (kDa)	30°C		35°C		40°C	
	K	BL	K	BL	K	BL
105					+	++
100		+	+	++	+	++
90	+	+	+	+	+	++
70	+	+	+	++	+	+++
60				+		++
45	+	+	+	+	++	+
43				+		+
40		+	+	+	+	+
35						+
30		+	+	+	+	+
27				+		++

+ /++ / +++ szacunkowa zawartość
kolorem szarym zaznaczono HSP pojawiające się wyłącznie pod wpływem BL

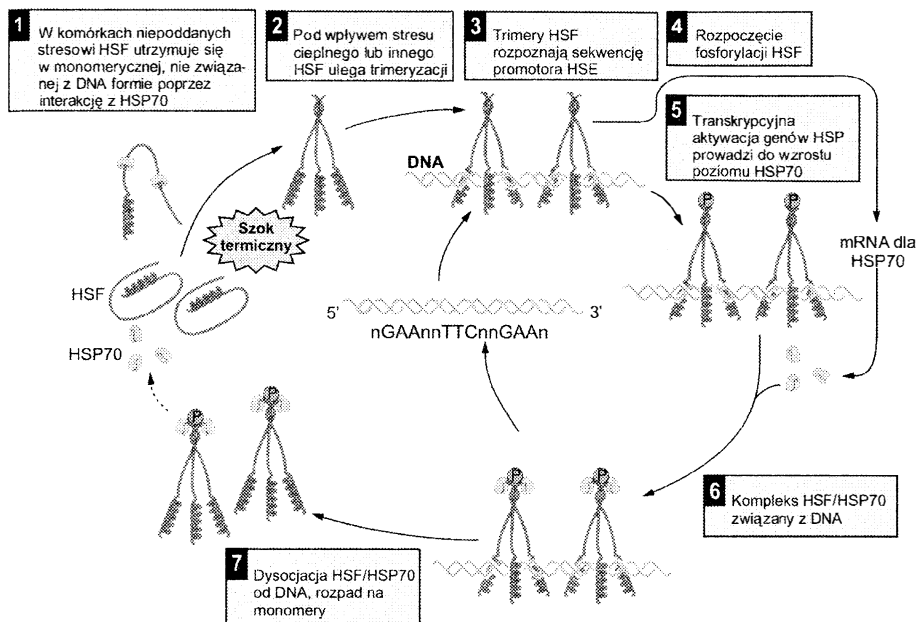
(1–3 godziny); c) rozpad białek szoku termicznego (12–50 godzin). Białka szoku termicznego sklasyfikowano w następujące rodziny: HSP8,5, nisko-cząsteczkowe HSP (30–15 kDa), HSP60 (57–60 kDa), HSP70 (69–71 kDa), HSP90 (80–94 kDa) i HSP100 (100–114 kDa) (Gwóźdź 1996, Iba 2002). Ponadto znana jest grupa białek o innych właściwościach niż typowe HSP, których czynnikiem inicjującym ekspresję jest zmiana poziomu glukozy – białka GRP (*ang.* glucose-regulated proteins) (Cymers i Niemiałtowski 2004). Białka te posiadają masę cząsteczkową 75, 78 i 94 kDa, w związku z tym zaliczane są do rodziny HSP. W warunkach fizjologicznych HSP są syntezowane na poziomie konstytutywnym, tzn. biorą udział w fałdowaniu kompleksów białek oraz w rozpadzie nowo syntetyzowanych polipeptydów, transporcie białek przez błony i rozpadzie tych kompleksów. Zwiększony poziom białek szoku termicznego w komórkach roślinnych obserwuje się nie tylko z oddziaływaniem wysokiej temperatury, ale występuje on również pod wpływem innych czynników stresowych i toksycznych takich, jak: metale ciężkie, arsen, deficyt wodny, hormony steroidowe, błękit metylenowy, glukozamina, analogi aminokwasów. Jednak synteza pełnego kompletu HSP ma miejsce wyłącznie w warunkach stresu powodowanego wysoką temperaturą. W warunkach stresu wysokiej temperatury zmniejszała się intensywność biosyntezy większości białek komórkowych (ryc. 4.24) z wyjątkiem białek szoku termiczne-

go, których synteza ulegała znacznemu zwiększeniu (ryc. 4.25, tabela 4.6). U niektórych roślin w ekstremalnych dla danego gatunku temperaturach (np. 45–52°C) HSP są jedynymi białkami, jakie są wytwarzane w komórce.

Aktywacja genów *HSP* w odpowiedzi na różnorodne czynniki stresowe jest reakcją przejściową i odwracalną, regulowaną na poziomie transkrypcji i translacji (Porankiewicz i Gwóźdź 1993, Gwóźdź 1996, Miernyk 1997, Pratt i inni 2001, Iba 2002, Zhang i Glase 2002, Sung i inni 2003, Cymers i Niemiałowski 2004, Wang i inni 2004). W pierwszym etapie w ciągu 5 minut od chwili wystąpienia szoku termicznego następuje rozpad polirybosomów, uczestniczących w biosyntezie normalnych białek komórkowych. Proces ten obejmuje degradację kodującego je normalnego mRNA, następnie zahamowanie inicjacji translacji oraz destrukcję organizacji cytoszkieletu. Następnie w ciągu 10–30 minut zachodzi formowanie się polirybosomów zdolnych do syntezy HSP, w który to proces włączone są nowo syntetyzowane *HS* mRNA oraz zmienione czynniki inicjacji i ufosforylowane rybosomy. Inicjacja ekspresji genów białek szoku termicznego zachodzi poprzez przyłączenie się zaktywowanego białkowego czynnika transkrypcyjnego (*HSF*, *ang.* heat shock factor) do około 10-nukleotydujowej sekwencji regulatorowej (*HSE*, *ang.* heat shock element) (ryc. 4.26). Nie podlegające translacji normalne mRNA, związane z cytoszkieletem, są chronione przed degradacją przez zwiększony poziom HSP, a po 15 minutach szoku termicznego rozpoczyna się tworzenie ziarnistości cytoplazmatycznych, z których po powrocie do normalnych warunków temperaturowych uwolniony jest mRNA. W przypadku wydłużenia działania temperatury stresowej następuje stopniowe obniżenie syntezy HSP i przywrócenie syntezy normalnych białek komórkowych.

W warunkach fizjologicznych HSP występują w cytoplazmie, mitochondriach i siateczce śródplazmatycznej (Cymers i Niemiałowski 2004, Wang i inni 2004). Pod wpływem czynników stresogennych obserwuje się wzrost poziomu HSP w cytoplazmie oraz wzmożoną translokację HSP z cytoplazmy do jądra i jąderka. HSP chronią białka jądra i jąderka oraz przywracają im utracone funkcje, ponieważ w jądrze podczas stresu następuje akumulacja i agregacja ziarnistości perichromatyny, składającej się głównie z niedojrzałego mRNA, w jąderku natomiast agregacji ulegają prerybosomy i inne kompleksy nukleoproteinowe.

Znane są doniesienia dotyczące bezpośredniego lub pośredniego wpływu niektórych niebiałkowych metabolitów (np. proliny) czy fitohormonów (np. brassinosteroidy, kwas abscysynowy) na funkcjonowanie komórek w warunkach stresowych, w których działają osłaniająco lub jako modulatory odpowiedzi na stres termiczny (Lee i inni 1985, Hosono i inni 1994, Sakai i inni 1995, Ogonna i Tanaka 1996, Shen i Lee 1997, Sayed i El-Shahed 2000,



Ryc. 4.26. Aktywacja przez stres temperaturowy czynnika transkrypcyjnego białka szoku termicznego (HSF) (wg Bray i inni 2000, zmodyfikowano)
Objaśnienia skrótów w tekście

Wilson i inni 2003, Singh i Shono 2005). Badania własne potwierdzają udział BR w zwiększaniu przeżywalności roślin w warunkach szoku termicznego. Potwierdzono wzrost syntezy HSP pod wpływem działania BR w podwyższonej temperaturze od 30–40°C (ryc. 4.25, tabela 4.6). Na uwagę zasługuje pojawienie się pod wpływem BL niskocząsteczkowego HSP27. Wiadomo, że HSP27 chroni komórki przed śmiercią spowodowaną uwalnianiem wolnych rodników – pośrednio poprzez wzrost komórkowego stężenia glutationu, natomiast bezpośrednio przez neutralizację efektów toksycznych utlenionych białek. Nie zaobserwowano syntezy HSP w temperaturach niższych, tzn. 5–10°C. Nie oznacza to jednak braku odpowiedzi antystresowej *Chlorella vulgaris* na działanie niskiej temperatury. W rozdziale 4.7 przedstawiono reakcję glonu na stres temperaturowy, w wyniku którego dochodzi do wzmożonej syntezy systemu nieenzymatycznych antyutleniaczy: glutationu i askorbinianu oraz enzymatycznych antyutleniaczy: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy askorbinianowej, dodatkowo stymulowanych poprzez BR. Fitohormony te zwiększają zawartość chlorofili, cukrów i białek w kulturach poddanych działaniu temperatur w zakresie 5–40°C. Najbardziej optymalną temperaturą dla wzrostu i rozwoju glonu *Chlorella vulgaris* okazała się

temperatura 30°C, przy czym dla kultur kontrolnych było to 25°C (ryc. 4.24). Wraz ze wzrostem temperatury, począwszy od 5°C do 30°C, stwierdzono podwyższenie liczby komórek *Chlorella vulgaris* oraz zawartości chlorofili, cukrów i białek. Z kolei kultury glonu, hodowane w temperaturze 35–40°C, wykazują zahamowanie wzrostu i rozwoju, przy czym w temperaturze 40°C dochodzi do niemal całkowitego zmniejszenia zawartości metabolitów oraz stopniowego zahamowania tempa podziałów komórkowych i metabolizmu *Chlorella vulgaris*. Jedynie kultury glonu traktowane BR charakteryzują się stymulacją wzrostu i metabolizmu. Świadczy to o wzmożonej odpowiedzi glonu, dodatkowo modulowanej przez te fitohormony, na czynnik stresowy. Podobne wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych na glonie *Chlorella vulgaris*, poddanym działaniu skrajnych temperatur, w którym stwierdzono zahamowanie przemian metabolicznych, zwłaszcza anabolicznych: biosyntezę i akumulację białek, monosacharydów czy barwników fotosyntetycznych.

W warunkach niskich temperatur (0–3°C) BL podnosi odporność roślin na ochłodzenie, wynikiem czego jest 2-krotny wzrost koleoptylu i mezofilu kukurydzy (*Zea mays*) w stosunku do hodowli kontrolnych (He i inni 1991). Z kolei stokłosa bezostna (*Bromus inermis*), rosnąca w podobnych warunkach temperaturowych, potraktowana 24-epiBL, nieznacznie zwiększa tolerancję na niską temperaturę, jednakże nie stwierdzono stymulacji wzrostu. Ponadto roślina ta, poddana działaniu wysokiej temperatury (37°C) oraz potraktowana 24-epiBL, charakteryzuje się znacznie wyższą przeżywalnością (Wilen i inni 1995). Wykazano, że w sadzonkach ryżu (*Oryza sativa*), poddanych działaniu niskich temperatur, nastąpiło 5-krotnie obniżenie biosyntezy kwasu γ -aminolewulinowego (ALA), a w konsekwencji zmniejszenie zawartości chlorofilu. Kwas γ -aminolewulinowy jako prekursor biosyntezy porfiryn, np. chlorofilu, w stężeniach poniżej 1,8 nM stymuluje wzrost i rozwój roślin (Hotta i inni 1998). Jednakże potraktowanie roślin ALA spowodowało wzrost odporności roślin na stres wywołany niską temperaturą. Podobny efekt uzyskano podając egzogenne BR.

Sadzonki rzepaku i pomidora, rosnące w obecności 24-epiBL, wykazują wysoką odporność na temperaturę letalną, tzn. 45°C (Dhaubhadel i inni 1999, 2002). Pod wpływem działania stresu cieplnego rośliny traktowane 24-epiBL zwiększają syntezę niskocząsteczkowych HSP oraz HSP o masach cząsteczkowych 70, 90 i 100 kDa. Ponadto 24-epiBL spowodował, że przeszło 90% sadzonek rzepaku i pomidora pozostało w ogóle nieuszkodzonych lub uszkodzonych nieznacznie (zwiększona przeżywalność). U roślin kontrolnych tylko 32% sadzonek przeżyło działanie wysokiej temperatury.

W warunkach wysokiej temperatury w sadzonkach stokłosa bezostnej czy pomidorze (*Lycopersicon esculentum*), potraktowanych 24-epiBL, do-

chodzi do wzmożonej syntezy polipeptydów o małej masie molekularnej: 24 i 43 kDa (Wilén i inni 1995, Singh i Shono 2005). Ponadto stwierdzono, że 24-epiBL zredukował poziom białka HSP66, które było obecne w roślinach kontrolnych. Okazało się również, że 24-epiBL stymulował w warunkach wysokiej temperatury poziom transkrypcji HSP90. Zatem BR wykazują właściwości antystresowe na działanie wysokiej temperatury, jednak przypuszcza się, że mechanizmy obronne, indukowane przez te związki, są częściowo podobne do odpowiedzi indukowanych przez kwas abscysynowy. BR nieznacznie zwiększają syntezę białka HSP90 w fizjologicznej temperaturze (Kulaeva i inni 1991). Stwierdzono, że poziom białka HSP90 zazwyczaj zwiększa się w cytozolu zarówno pod wpływem niskiej, jak i wysokiej temperatury.

Na podstawie wyników uzyskanych w tej części badań wyciągnięto następujące wnioski:

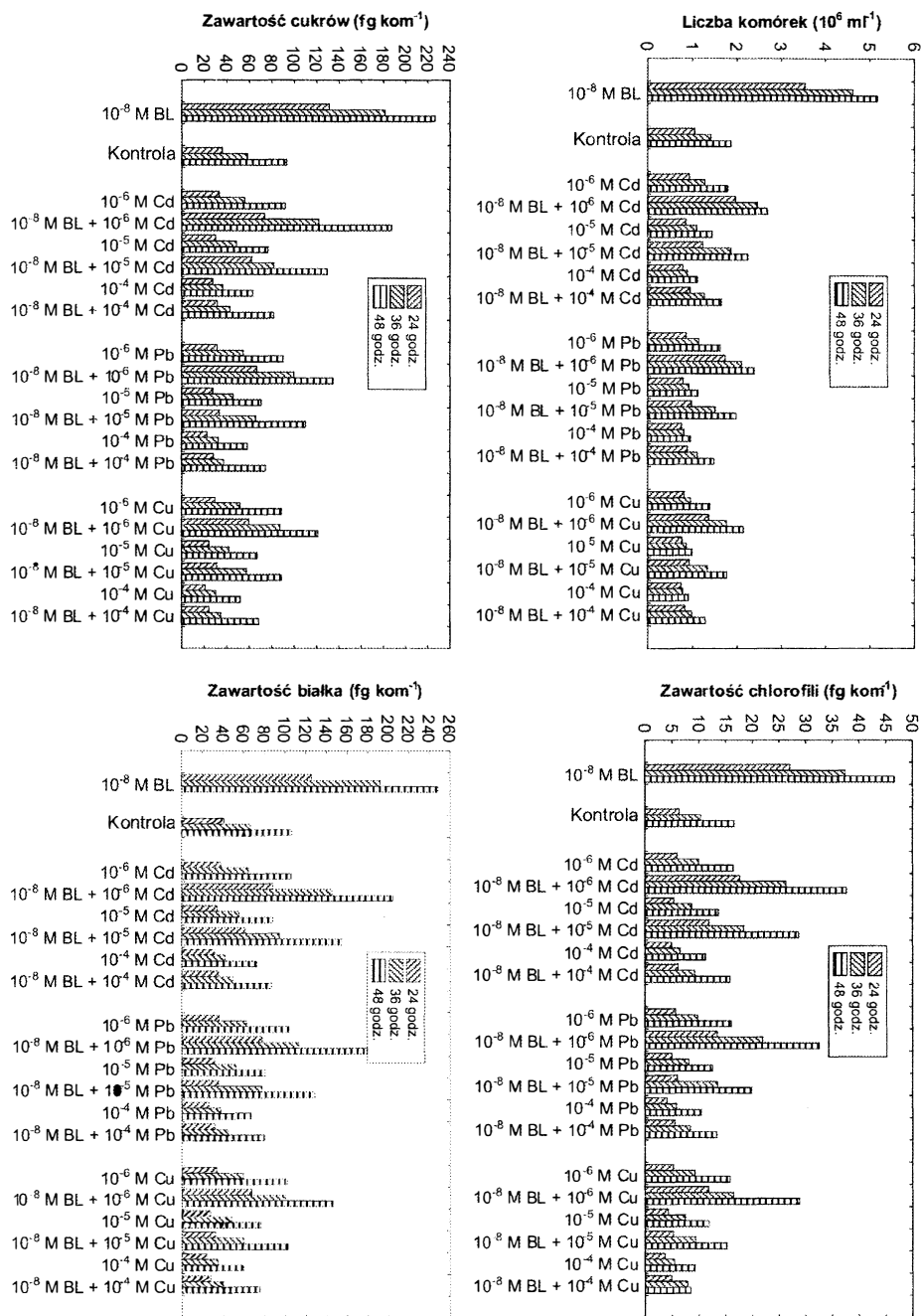
1. Najbardziej optymalną dla rozwoju glonu była temperatura 25–30°C;
2. Niska (5–15°C) i wysoka (35–40°C) temperatura ograniczały wzrost i rozwój glonu, przy czym kultury traktowane brassinolidem wykazały zwiększoną liczbę komórek i wzrost zawartości chlorofilu, cukrów i białek;
3. Brassinolid selektywnie stymulował syntezę następujących białek szoku termicznego w kulturach poddanych działaniu:
 - temperatury 30°C – 6 polipeptydów o masie cząsteczkowej: 30, 40, 45, 70, 90 i 100 kDa, z tego 3 nowe: 30, 40, 100 kDa w stosunku do kontroli;
 - temperatury 35°C – 3 polipeptydów o masach cząsteczkowych 27, 43, 60 kDa;
 - temperatury 40°C – 2 polipeptydów o masach cząsteczkowych 35, 105 kDa;
4. Brassinolid indukował *de novo* syntezę 4 polipeptydów o masach cząsteczkowych 27, 35, 43 i 60 kDa.

4.6. Wpływ brassinosteroidów na glon *Chlorella vulgaris* poddany działaniu metali ciężkich

W przyrodzie na organizmy żywe działa wiele czynników, które w różny sposób modyfikują ich rozwój (Kawecka i Eloranta 1994, Bohnert i inni 1995, Smirnoff 1995, Vilchez i inni 1997). Znaczenie każdego z nich zmienia się w zależności od środowiska, pory roku, gatunku czy działalności antropogenicznej. Każdy z tych czynników, posiadający zdolność wywołania u rośliny potencjalnie szkodliwej zmiany fizycznej lub chemicznej, nazywany jest stresem. Działanie stresu powoduje określoną reakcję rośliny, polegającą na zmianie wzrostu i metabolizmu. Najczęściej spotykanymi w naturalnym środowisku stresami są: stres termiczny, solny, oksydacyjny, niedobór tlenu, działanie patogenów i wpływ metali ciężkich.

W niniejszym rozdziale zostało przedstawione oddziaływanie metali ciężkich (kadmu, ołowiu i miedzi) na kulturę jednokomórkowego glonu *Chlorella vulgaris*. Zbadano wpływ kadmu, miedzi i ołowiu w zakresie stężeń 10^{-7} – 10^{-3} M oraz współdziałanie tych metali ciężkich z brassinolidem (BL) w stężeniu 10^{-8} M na zmiany liczby komórek, zawartość chlorofili, cukrów i białek w zielenicy *Chlorella vulgaris*. Ponadto określono zmiany odczynu środowiska występowania glonu, wywołane przez metale ciężkie, ich zawartość komórkową. Wyjaśniono również mechanizmy detoksykacji metali ciężkich z komórek glonu, indukowane przez BL. W tym celu zbadano ogólny poziom fitochelatyn oraz wybranych enzymatycznych i nieenzymatycznych antyutleniaczy, które są indukowane przez metale ciężkie (zob. rozdział 4.7).

Wyniki, dotyczące zmiany liczby komórek oraz zawartości chlorofili, cukrów i białek w glonie *Chlorella vulgaris* w zależności od użytych stężeń metali ciężkich i BL, przedstawiono na rycinie 4.27. Wprowadzenie metali ciężkich w stężeniu 10^{-3} M do *Chlorella vulgaris* spowodowało efekt letalny, który nie został zniwelowany poprzez dodanie BL. Największą inhibicję na wzrost glonu i zawartość chlorofili, cukrów i białek wykazały metale ciężkie w stężeniu 10^{-4} M, z których miedź posiadała największe działanie toksyczne, natomiast najślabiej oddziaływał kadm. W stężeniu 10^{-6} M zastosowane metale ciężkie wykazały nieznacznie hamujący wpływ na kultury glonu. Obniżenie stężenia metali ciężkich do 10^{-7} M nie powodowało istotnych zmian w liczbie komórek glonu, zawartości chlorofili, cukrów i białek w stosunku do kontroli. Hamujący wpływ metali ciężkich malał wraz ze zmniejszającym się stężeniem oraz wzrostem czasu hodowli. Najsilniejsze działanie inhibicyjne zaobserwowano w 24. godzinie działania. Natomiast pomiędzy 24. a 48. godziną trwania



Ryc. 4.27. Wpływ brassinolidu na liczbę komórek, zawartość chlorofilu, cukrów i białka w kulturach *Chlorella vulgaris*, poddanych działaniu metali ciężkich (kadmu, ołowiu i miedzi) podczas 48-godzinnej hodowli (SE < 5%)

hodowli działanie hamujące metali ciężkich stopniowo malało, w wyniku którego nastąpił wzrost liczby komórek glonu oraz zawartości chlorofili, cukrów i białek. Jednak dopiero po upływie 48 godzin ołów i kadm w stężeniu 10^{-6} M nie wywierały praktycznie żadnego wpływu na kulturę *Chlorella vulgaris*. Inhibitorowa aktywność biologiczna metali ciężkich przedstawia się następująco: kadm > ołów > miedź.

Egzogennie podany BL w stężeniu 10^{-8} M wraz z metalami ciężkimi wykazywał stymulującą aktywność biologiczną na liczbę komórek oraz zawartość chlorofili, cukrów i białek (ryc. 4.27). Niezależnie od zastosowanego stężenia metalu BL znosił ich inhibicyjny wpływ na glon *Chlorella vulgaris*. Dodanie BL do kultur glonu, potraktowanych metalami ciężkimi, spowodowało zniesienie ich hamującego wpływu. Najniższą stymulację wzrostu i metabolizmu glonu stwierdzono w kulturach glonu, traktowanych BL oraz metalami w stężeniu 10^{-4} M, zaś największą w 10^{-6} M. Stymulacja ta była dużo słabsza niż wykazana w *Chlorella vulgaris*, poddanych wyłącznie działaniu BL. Wraz z upływem czasu kultury glonów, traktowane łącznie BL i metalami ciężkimi, charakteryzowały się zwiększeniem liczby komórek oraz wzrostem zawartości chlorofili, cukrów i białek.

Obecność metali ciężkich w zakresie stężeń 10^{-6} - 10^{-4} M w pożywce wzrostu glonu *Chlorella vulgaris* spowodowała obniżenie pH ze słabo kwaśnego (6,60) do silnie kwaśnego (3,10–5,60) (tabela 4.7). Zmiana pH była wprost proporcjonalna do zwiększającego się stężenia metali ciężkich. Największe obniżenie odczynu pożywki zanotowano w kulturach traktowanych metalami ciężkimi w stężeniu 10^{-4} M. Najsilniej działały jony miedzi, nieco słabiej ołowiu, zaś najslabiej kadmu. Podanie do kultury glonu 10^{-8} M BL spowodowało zmianę pH w kierunku słabo kwaśnego, przeciętny wzrost wyniósł jedną jednostkę. Z kolei kultury glonu, potraktowane samym BL, wykazywały nieznaczny spadek pH do 6,35 w stosunku do 6,60 kultury kontrolnej.

Tabela 4.7. Wpływ metali ciężkich na pH pożywki kultur komórkowych *Chlorella vulgaris*, traktowanych brassinolidem (BL) (wartość średnia \pm SE; 48 godz.)

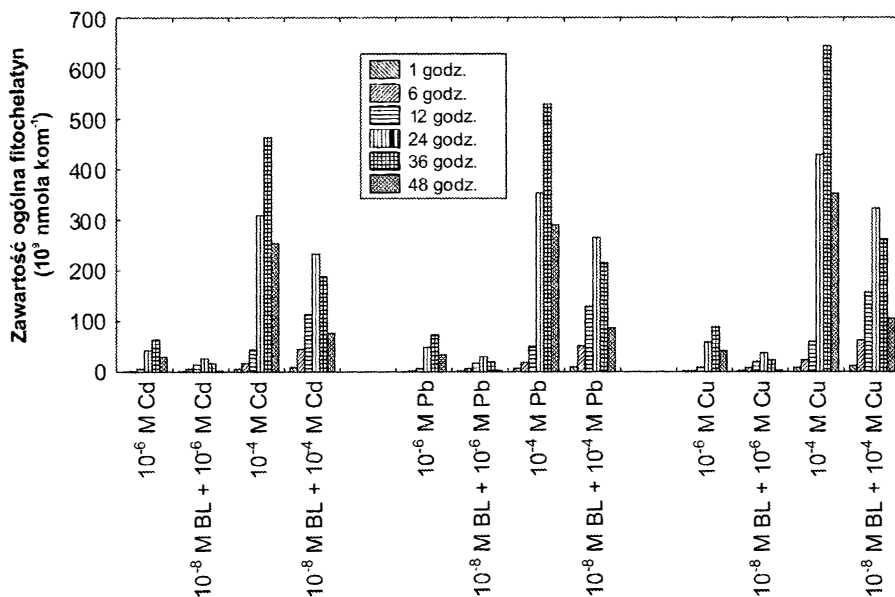
Stężenie	Wartość pH		
	Cu	Pb	Cd
10^{-4} M	3,10 \pm 0,03	3,30 \pm 0,04	3,45 \pm 0,07
10^{-4} M + 10^{-8} M BL	5,28 \pm 0,05	5,33 \pm 0,06	5,45 \pm 0,06
10^{-5} M	4,25 \pm 0,04	4,50 \pm 0,06	4,75 \pm 0,03
10^{-5} M + 10^{-8} M BL	5,41 \pm 0,06	5,55 \pm 0,04	5,62 \pm 0,04
10^{-6} M	5,25 \pm 0,03	5,46 \pm 0,03	5,60 \pm 0,03
10^{-6} M + 10^{-8} M BL	5,75 \pm 0,04	5,83 \pm 0,05	6,00 \pm 0,04
10^{-8} M BL	6,35 \pm 0,04	6,35 \pm 0,04	6,35 \pm 0,05
0 (kontrola)	6,60 \pm 0,05	6,60 \pm 0,05	6,60 \pm 0,05

Zawartość metali ciężkich w glonie *Chlorella vulgaris* zmieniała się wprost proporcjonalnie do użytego stężenia metalu ciężkiego (tabela 4.8). Największą endogenną zawartość metali ciężkich stwierdzono w kulturach traktowanych metalami ciężkimi w stężeniu 10^{-4} M. Najbardziej akumulującym się metalem była miedź, najslabiej kadm. Kultury glonu, potraktowane mieszaniną metalu ciężkiego oraz BL, charakteryzowały się znacznym obniżeniem zawartości metali ciężkich w komórkach.

Tabela 4.8. Wpływ egzogennie podawanych metali ciężkich na ich zawartość w komórkach (μg metalu kom^{-1}) w *Chlorella vulgaris*, traktowanym brassinolidem (wartość średnia \pm SE)

Czas (godz.) \ Stężenie	Zawartość Cu			Zawartość Pb			Zawartość Cd		
	24	36	48	24	36	48	24	36	48
10^{-4} M	1006,1 $\pm 0,08$	814,6 $\pm 0,06$	549,9 $\pm 0,08$	827,1 $\pm 0,09$	669,7 $\pm 0,07$	452,0 $\pm 0,06$	757,9 $\pm 0,07$	613,7 $\pm 0,06$	414,2 $\pm 0,09$
10^{-4} M + 10^{-8} M BL	361,3 $\pm 0,06$	292,2 $\pm 0,07$	191,9 $\pm 0,6$	310,2 $\pm 0,09$	251,2 $\pm 0,09$	167,7 $\pm 0,05$	273,7 $\pm 0,06$	221,6 $\pm 0,04$	142,3 $\pm 0,08$
10^{-5} M	220,4 $\pm 0,08$	178,5 $\pm 0,05$	120,5 $\pm 0,06$	183,5 $\pm 0,04$	148,6 $\pm 0,07$	100,3 $\pm 0,08$	153,3 $\pm 0,07$	124,1 $\pm 0,09$	83,8 $\pm 0,06$
10^{-5} M + 10^{-8} M BL	89,2 $\pm 0,06$	72,1 $\pm 0,09$	48,3 $\pm 0,08$	78,7 $\pm 0,06$	63,7 $\pm 0,06$	42,5 $\pm 0,06$	70,6 $\pm 0,04$	57,2 $\pm 0,06$	35,7 $\pm 0,07$
10^{-6} M	15,1 $\pm 0,09$	12,2 $\pm 0,08$	8,2 $\pm 0,04$	12,6 $\pm 0,08$	10,2 $\pm 0,07$	6,9 $\pm 0,06$	10,1 $\pm 0,08$	8,2 $\pm 0,05$	5,5 $\pm 0,08$
10^{-6} M + 10^{-8} M BL	5,7 $\pm 0,05$	4,6 $\pm 0,06$	3,1 $\pm 0,05$	4,7 $\pm 0,06$	3,8 $\pm 0,05$	2,4 $\pm 0,1$	4,1 $\pm 0,06$	3,3 $\pm 0,07$	1,7 $\pm 0,06$
10^{-8} M BL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0 (kontrola)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Pod wpływem metali ciężkich największą stymulację biosyntezy fitochelatyn stwierdzono w 36. godzinie hodowli glonu (ryc. 4.28). Najsilniejszy wpływ na ten proces wywierała miedź, zaś najslabiej kadm. Z kolei w kulturach potraktowanych mieszaniną metali ciężkich i BL największą zawartość fitochelatyn odnotowano w 24. godzinie hodowli. Wraz z upływem czasu następował spadek zawartości fitochelatyn w kulturach traktowanych metalami ciężkimi i BL od 36. godziny hodowli i dla kultur traktowanych wyłącznie metalami ciężkimi – od 48. godziny. Należy dodać, że w kontroli oraz w kulturach traktowanych samym BL nie stwierdzono obecności fitochelatyn w komórkach *Chlorella vulgaris*. Jednocześnie wykazano, że zawartość tych peptydów była większa w kulturach traktowanych samymi metalami ciężkimi. Oznacza to, że BL przyspieszał biosyntezę fitochelatyn i sugeruje, że oprócz biosyntezy fitochelatyn BL oddziaływał na inny mechanizm detoksykacji metali ciężkich. Może to być system enzymatycznych i nieenzymatycznych antyutleniaczy, indukowany przez metale ciężkie (zob. rozdział 4.7).



Ryc. 4.28. Wpływ brassinolidu na zawartość ogólną fitochelatyn w kulturach *Chlorella vulgaris*, poddanych działaniu metali ciężkich (kadmu, ołowiu i miedzi) podczas 48-godzinnej hodowli (SE < 5%)

Grupa pierwiastków o gęstości większej niż 5 g/cm³ jest określana jako „metale ciężkie”. Do tej grupy potencjalnych czynników toksycznych roślin należą: chrom (Cr), kobalt (Co), nikiel (Ni), miedź (Cu), cynk (Zn), molibden (Mo), kadm (Cd), rtęć (Hg) i ołów (Pb), a także metale lekkie – glin (Al) i półmetale – arsen (As) (Pawlik-Skowrońska 2002, Baranowska-Morek 2003). Metale ciężkie wykazują zróżnicowaną toksyczność w stosunku do podstawowych procesów, zachodzących w organizmie roślinnym, zaburzając procesy fizjologiczne i metaboliczne w komórce oraz wpływają na ultrastrukturę i morfologię. Mogą regulować fotosyntezę, oddychanie, stosunki wodne i azotowe, wielkość, kształt komórek i podstawowych organelli komórkowych oraz szereg innych procesów, zachodzących w żywym organizmie (Woźny 1995). Stwierdzono, że w środowisku występuje wiele metali ciężkich, które ze względu na swoją toksyczność oraz bioakumulację w środowisku przyczyniają się do jego degradacji. W zależności od warunków środowiskowych, stężenia metalu, czy też stanu fizjologicznego rośliny, pierwiastki śladowe powodują również efekty toksyczne w organizmie roślinnym (Rai i inni 1981, Takamura i inni 1989, 1990a, b, Volesky 1990, Wilde i Benemann 1993, Bajguz 2002).

Odporność na dostępne w nadmiarze pierwiastki może opierać się na unikaniu (tj. usuwaniu pierwiastka z organizmu lub niedopuszczeniu do

jego pobrania) oraz na tolerancji, tzn. na zdolności do przetrwania, wzrostu i rozmnażania organizmu, pomimo występowania znacznej ilości metalu w komórkach (Sandau i inni 1996, Pawlik-Skowrońska 2002). W kulturach glonów występują następujące mechanizmy, związane ze strategią unikania: 1) wiązanie metalu ze ścianą komórkową; 2) pozakomórkowe wydzielanie organicznych substancji o właściwościach kompleksujących metale, które zmniejszają penetrację jonów metali przez plazmolemę; 3) adaptacyjna regulacja systemu pobierania metali, zapobiegająca nadmiernemu wnikanu pierwiastka przy wzroście stężenia zewnętrznego; 4) obniżenie powinowactwa permeaz błonowych do jonów metali, związane z obniżeniem pobierania metali; 5) zmniejszone wnikanie kationów metali poprzez dodatni potencjał zeta błony cytoplazmatycznej, związany z efektywnym usuwaniem protonów z cytoplazmy, np. za pomocą superaktywnych ATP-az błonowych; 6) usuwanie metalu z komórek w postaci jonów lub kompleksów organicznych (Bedell i Darnall 1990, Kuyucak i Volesky 1990, Sandau i inni 1996, Pawlik-Skowrońska 2002). Tolerancja związana jest głównie z procesami detoksykacji metali ciężkich, tzn. wytwarzaniu specyficznych polipeptydów (fitochelatyn), kompartmentacji metali w wakuolach oraz generowaniu wolnych rodników (aktywnych form tlenu) w postaci rodników ponadtlenkowych oraz tworzenia kompleksów metali ciężkich z kwasami organicznymi przez grupę karboksylową (zob. rozdział 4.7) (Grill i inni 1985a, b, Tukendorf 1993, Cobbett 2000, Bajguz 2002, Cobbett i Goldsbrough 2002, Piechalak i Tomaszewska 2004).

W przedstawionej pracy zbadano wpływ metali ciężkich na przebieg podstawowych procesów fizjologicznych i biochemicznych w jednokomórkowym glonie *Chlorella vulgaris*. Wyniki badań wykazały, że zastosowane metale ciężkie były inhibitorami wzrostu, rozwoju i metabolizmu glonu. Aktywność inhibicyjna metali malała stopniowo wraz ze spadkiem ich stężenia w pożywce, osiągając najniższą wartość w stężeniu 10^{-4} M. Stężenia metali ciężkich, równe lub większe od 10^{-3} M, spowodowały defragmentację i lizę komórek *Chlorella vulgaris*. Z kolei stężenia poniżej 10^{-6} M nie wywierały hamującego wpływu na kultury glonu. Wprowadzony do pożywki BL w stężeniu 10^{-8} M spowodował odwrócenie hamującego działania metali ciężkich, który najefektywniej współdziałał ze stężeniami 10^{-6} – 10^{-5} M. Ustalono, że hamujące działanie metali ciężkich przedstawia się w następującej kolejności: kadm > ołów > miedź, niezależnie od badanego parametru.

Liczne doniesienia literaturowe potwierdzają zmiany zawartości liczby i wielkości komórek glonów (zielenicy *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Cosmarium melanosporum* i cyjanobakterii *Schizothrix calcicola*) pod wpływem rtęci, miedzi, kadmu, cynku i ołowiu (Kessler 1986, Ilangovan i inni 1992, Bilgrami i Kumar 1997, Lam i inni 1999, Bajguz 2002). Wykazano,

że niskie stężenia tych pierwiastków powodowały niewielki spadek biomasy fitoplanktonu oraz wyraźny spadek liczby glonów. Zauważono również, że w miarę wzrostu stężenia tych metali liczba komórek glonów i gęstość biomasy była o 50% mniejsza niż w środowisku o niższym stężeniu pierwiastków. Ponadto stwierdzono, że niskie stężenia ($0,1 \text{ g m}^{-3}$) miedzi i cynku były zazwyczaj mało toksyczne dla fitoplanktonu (*Chlorella vulgaris*, *Closterium acerosum*, *Pediastrum simplex* i *Scenedesmus quadricauda*) (Gächter i Máreš 1979, Fargašová 1993). Stwierdzono nawet wzrost liczby komórek od 8% do 95% w stosunku do kontroli. Jednakże wyższe stężenie miedzi (10 g m^{-3}) okazało się dla komórek toksyczne i wywołało zahamowanie wzrostu biomasy, która wynosiła 22% w porównaniu z kontrolą. Okazało się również, że analogiczne stężenia cynku były mniej toksyczne od miedzi. Toksyczność metali dla glonów, testowanych na *Scenedesmus quadricauda*, przedstawiała się następująco: $\text{Cd}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{Pb}^{2+} > \text{As}^{5+}$, przy czym zależy ona w znacznym stopniu od warunków środowiska.

Głównym objawem toksycznego oddziaływania metali ciężkich na rośliny jest ograniczenie wzrostu i chloroza. Metale ciężkie (kadm, miedź, ołów) hamują biosyntezę barwników fotosyntetycznych, obniżając zawartość chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów w komórkach zdolnych do przeprowadzenia procesu fotosyntezy (Hampp i Lenzian 1974, Burzyński 1987, Stiborova i inni 1986, Woźny 1995, Poskuta i inni 1996, Słowik 1999). Mechanizm toksycznego działania metali ciężkich na procesy tworzenia barwników fotosyntezujących nie jest w pełni wyjaśniony. Hamowanie syntezy barwników, głównie chlorofili, jest przejawem oddziaływania różnych metali ciężkich na proces fotosyntezy.

Chlorofile są barwnikami, których synteza jest przeważnie najsilniej hamowana przez metale ciężkie. Substratem do syntezy układu porfirynowego, istotnego w syntezie chlorofilu roślin, jest porfobilinogen (Burzyński 1987, Słowik 1999). Reakcję jego powstania katalizuje enzym dehydrogenaza kwasu γ -aminolewulinowego (ALAD), którego synteza jest zahamowana w wyniku działania ołowiu. Na skutek niedoboru ALAD następuje spadek zawartości chlorofilu, co powoduje zakłócenia w działaniu fotosystemów, zmniejszenie zawartości ATP i NADPH_2 i tempa asymilacji CO_2 (obniżenie wydajności fazy jasnej i ciemnej fotosyntezy). Okazuje się, że kadm i ołów jednakowo hamują asymilację CO_2 i transpirację u lucerny i koniczyny, lecz w różnym stopniu wpływają na wydajność zużycia wody, tzn. ilość związanego fotosyntetycznie CO_2 na mol wytranspirowanej wody (Becerril i inni 1988). Wykazano, że ołów znacznie obniżał wydajność zużycia wody w stosunku do kadmu. Świadczy to, że ołów oddziałuje na asymilację CO_2 bardziej niż na transpirację, natomiast kadm działa podobnie na asymilację CO_2 i na transpirację.

Z kolei kadm hamuje głównie cykl Calvina, zmniejszając w ten sposób zużycie siły asymilacyjnej, w wyniku którego na zasadzie sprzężenia zwrotnego, hamowany jest fotosystem II i transport elektronów (Krupa i Baszyński 1995). Badania przeprowadzone na cyjanobakterii *Nostoc muscorum* wykazały, że hamowanie syntezy barwników wykazuje następującą tendencję: chlorofil > fikocjanina > karotenoidy (Rai i inni 1990).

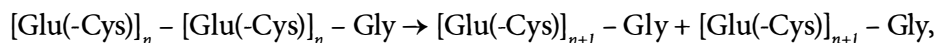
Wytworzone w procesie fotosyntezy cukry proste są dla roślin materiałem budulcowym oraz źródłem energii niezbędnej do stymulowania wszystkich procesów i reakcji biochemicznych wymagających jej nakładu (Kopcewicz i Lewak 2002). Spadek zawartości barwników fotosyntetycznych spowodował również zahamowanie syntezy cukrów w komórkach *Chlorella vulgaris* (ryc. 4.27). Dane eksperymentalne dowodzą, że metale ciężkie w stężeniu 10^{-4} M spowodowały najsilniejsze zahamowanie zawartości cukrów w komórkach glonu. Podobnie jak zawartość cukrów, pod wpływem metali ciężkich obniżała się również zawartość ogólna białka. Hamujący wpływ tych związków był niwelowany poprzez dodanie do kultur 10^{-8} M BL. Wiadomo, że niektóre białka są w stanie związać jony metali ciężkich. W ten sposób następuje ochrona komórek przed szkodliwym, toksycznym działaniem metali ciężkich. Rolę w detoksykacji metali ciężkich odgrywają polipeptydy o niewielkim ciężarze cząsteczkowym, bogate w reszty cysteinowe, zwane fitochelatynami (Grill i inni 1985a, b, Tukendorf 1993, Cobbett 2000, Cobbett i Goldsbrough 2002, Piechalak i Tomaszewska 2004).

Metale ciężkie (np. ołów, miedź) indukują również syntezę innych białek, których ciężary cząsteczkowe są znacznie większe niż fitochelatyn (Cobbett 2000, Cobbett i Goldsbrough 2002). W korzeniach łubinu żółtego pod wpływem ołowiu i miedzi stwierdzono indukcję polipeptydu o ciężarze cząsteczkowym 160 kDa (Przymusiński i inni 1991, Przymusiński i Gwóźdź 1994). Przypuszcza się, że indukowany polipeptyd 160 kDa jest podjednostką dysmutazy nadtlenkowej, enzymu odpowiedzialnego za usuwanie z komórek toksycznych wolnych rodników. Jednocześnie dochodziło do redukcji akumulacji szeregu polipeptydów, zwłaszcza o ciężarach cząsteczkowych wyższych niż 700 kDa. Spadek zawartości całkowitego RNA oraz białek wraz z zahamowaniem kiełkowania nasion i wzrostu siewek pod wpływem jonów ołowiu odnotowano w przypadku kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*) (Kalimuthu i Sivasubramanian 1990). Z kolei ołów obniżał kiełkowanie nasion, hamował syntezę chlorofili, a jednocześnie zwiększał zawartość całkowitego białka w pszenicy (*Triticum sativum*) i soczewicy jadalnej (*Lens esculenta*) (Mesmar i Jaber 1991).

Reasumując, mechanizm oddziaływania metali ciężkich na procesy fizjologiczne, związane z syntezą białek, jest jeszcze nie w pełni poznany. Pro-

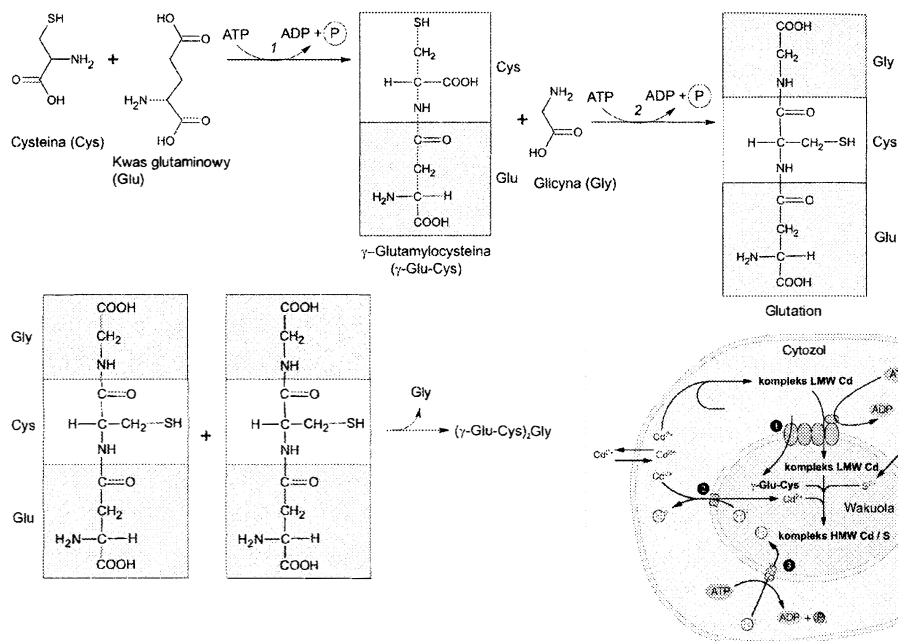
ces transkrypcji i syntezy białek stanowi podstawę wzrostu i rozwoju roślin. Jednak wydaje się oczywistym, że na poziomie biosyntezy białek zachodzą główne, najważniejsze relacje między rośliną a działaniem metali ciężkich. Oddziaływanie BR poprzez zwiększenie zawartości podstawowych składników komórek glonu *Chlorella vulgaris*, hodowanych w obecności metali ciężkich, stanowi dowód na antystresowe właściwości tych fitohormonów.

Fitochelatyny są liniowymi polimerami glutationu z powtarzającymi się 2–11 razy fragmentami diaminokwasowymi γ -Glu-Cys. Przenoszone są one dzięki obecności enzymu transpeptydazy dipeptydu γ -glutamylcysteiny (syntetazy fitochelatynowej) (EC 6.3.2.2). Sekwencja reakcji tworzenia fitochelatyn przez syntetazę fitochelatynową przebiega zgodnie z następującym równaniem:



gdzie $n = 1, 2, 3 (\dots) 11$ (Tukendorf 1993, Cobbett 2000, Cobbett i Goldsbrough 2002, Piechalak i Tomaszewska 2004). Fitochelatyny są peptydami bogatymi w cysteinę. Metale ciężkie takie, jak: kadm, cynk, ołów, miedź czy magnez są wewnątrz komórek chelatowane przez fitochelatyny, tworząc kompleksy merkaptydowe. Najsilniejszym induktorem okazały się jony kadmu w stężeniu 100 μM , natomiast jony ołowiu wykazują nieco mniejszą aktywność w stężeniu 10-krotnie wyższym, tzn. 1000 μM (Grill i inni 1985a, b).

Najszybciej tworzy się fitochelatyna o najkrótszym łańcuchu, gdzie $n = 2$, nieco później syntetyzują się fitochelatyny o dłuższych łańcuchach (Tukendorf 1993). Transpeptydaza dipeptydu γ -glutamylcysteiny (syntetaza fitochelatynowa) jest konstytutywnym, cytoplazmatycznym i oligomerycznym enzymem o masie cząsteczkowej równej 100 kDa. Aktywność syntetazy fitochelatynowej jest całkowicie zależna od obecności jonów metalu. Jony te są jej aktywatorami w następującej kolejności: kadm, miedź, rtęć, cynk, ołów, srebro, bizmut, złoto. Natomiast jony wapnia, baru, kobaltu i potasu nie aktywowały tego enzymu. Biosynteza fitochelatyn wymaga więc obecności enzymu — syntetazy fitochelatynowej, jonów metali jako jego aktywatorów oraz glutationu (ryc. 4.29). Aktywność enzymu podlega procesowi samoregulacji. Aktywowany wolnymi jonami enzym katalizuje polimeryzację glutationu, tworząc fitochelatyny, z kolei te, kompleksując z jonami metali, usuwają je, tworząc kompleksy metalo-peptydowe. Okazało się, że wolne jony metali są aktywatorami enzymu syntetazy glutationowej (EC 6.3.2.3.), który katalizuje reakcję syntezy prekursora fitochelatyn – glutationu. Jednak brak wolnych jonów metali hamuje dalszą syntezę fitochelatyn (Rüeggsegger i inni 1990). Z kolei egzogenne glutation dodawany do środowiska zawierającego jony metali ciężkich powoduje wzrost ilości wytwarzanych fitochelatyn, co



Ryc. 4.29. Biosynteza fitochelatyn i mechanizm detoksykacji metali ciężkich na przykładzie kadmu (wg Crawford i inni 2000, zmodyfikowano)

Objaśnienia skrótów: kompleks HMW – kompleks peptydów o dużej masie cząsteczkowej, kompleks LMW – kompleks peptydów o małej masie cząsteczkowej

w konsekwencji prowadzi do zwiększenia efektywności wiązania metali przez te związki (Tukendorf 1993, Cobbett 2000, Cobbett i Goldsbrough 2002, Piechalak i Tomaszewska 2004). Przypuszcza się, że syntaza fitochelatynowa może być regulowana posttranslacyjnie poprzez jony metali ciężkich, a do reakcji wymaga dwóch substratów, tzn. zredukowanego glutationu i odpowiedniego tiolowanego metalu. Aktywacja syntazy fitochelatynowej u *Arabidopsis thaliana* składa się z kilku etapów. Najpierw cząsteczka donorowa γ -Glu-Cys dokonuje acetylacji enzymu na domenie *N*-końcowej, z jednoczesnym odłączeniem grupy Gly. Następnie powstaje aktywna forma enzymu γ -Glu-Cys-AtPCSI, która przenosi cząsteczkę γ -Glu-Cys na drugi substrat – cząsteczkę γ -Glu-Cys-Gly z przyłączonym metalem poprzez grupę -SH cysteiny. W ten sposób powstaje kompleks fitochelatyna-metal.

Za wskaźniki biodostępności metali dla glonów przyjęto uważać rozpoczęcie syntezy fitochelatyn po wnikięciu jonów metali do komórek tych roślin (Grill i inni 1985a). Na przykładzie komórek zielenic *Stichococcus bacillaris* i *Stigeoclonium tenue* stwierdzono, że zmianom dostępności oraz

wewnątrzkomórkowej akumulacji cynku i ołowiu (zależnym od określonych czynników środowiskowych) towarzyszy wzrost poziomu indukowanych peptydów o dwu-, trzyłańcuchowych strukturach diaminokwasowych γ -Glu-Cys, syntetyzowanych w ciągu pierwszych kilkunastu godzin kontaktu z metalami. Zwiększenie syntezy fitochelatyn nastąpiło w komórkach glonów, rosnących w obecności światła, podczas gdy ciemność była czynnikiem ograniczającym pobieranie metali. Z kolei inny czynnik środowiskowy, alkaliczny odczyn (np. pH 8,2), obniżał stężenie labilnych form jonów metali, ograniczając biodostępności metali dla glonów, w wyniku czego zmniejszała się aktywność syntezy fitochelatyn. Wzrost kwasowości środowiska (np. do pH 6,8) spowodował zwiększenie biodostępności metali, skutkiem czego była zwiększona synteza fitochelatyn w glonach (Rachlin i Grosso 1993, Macfie i inni 1994, Franklin i inni 2000, Pawlik-Skowrońska 2002, Slaveykova i Wilkinson 2003). Badania własne wykazały podobne tendencje, gdzie wraz ze zmianą odczynu środowiska wzrastała dostępność metali ciężkich dla glonów oraz następowała zwiększona synteza fitochelatyn. Ponadto czynnikiem stymulującym syntezę tych peptydów był steroidowy hormon roślinny – brassinolid, który powodował zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia metali ciężkich w *Chlorella vulgaris* (ryc. 4.28, tabela 4.8).

Przypuszcza się, że mechanizm detoksykacji kadmu jest funkcjonalnie analogiczny dla większości metali ciężkich. Porównując izolowane protoplasty i wakuole z liści *Nicotiana rustica* oraz komórki *Chara corralina*, *Chlorella vulgaris* traktowane kadmem stwierdzono, że zarówno kadm, jak i fitochelatyny zlokalizowane były w wakuoli. Ponadto fitochelatyny, wiążące jony kadmu, występowały również w cytozolu (Vögeli-Lange i Wagner 1990, Carr i inni 1998, Ma 2000). Prawdopodobnie w cytozolu zachodził proces detoksykacji kadmu poprzez utworzenie kompleksów jonu metalu z fitochelatynami. W związku z tym wysunięto hipotezę, że jony metalu są kompleksowane w cytozolu przez fitochelatyny, a następnie transportowane w postaci nietoksycznego kompleksu Cd-peptyd do wakuoli, gdzie dzięki niższemu odczynowi soku wakuolarnego, protony mogą efektywnie wypierać kadm z tiolowych ligandów fitochelatyn. W związku z tym uwolnione jony metalu mogą wiązać się z innymi ligandami. Stwierdzono również, że stężenie kwasów organicznych, np. cytrynowego, jabłkowego lub kwasu fitynowego w wakuoli jest wysokie, co pozwala tym związkom funkcjonować jako ligandy metali przy niskich wartościach pH, które są charakterystyczne dla wakuoli. Z kolei peptydy uwolnione od jonów metalu mogą być degradowane przez wakuolarne hydrolazy lub mogą przedostawać się z wakuoli do cytoplazmy podstawowej. Sugeruje to, że nowo zsyntetyzowany kompleks Cd-peptyd stanowi jedyne źródło peptydów transportujących kadm do cytoplazmy. Zatem

nie można wykluczyć, że kadm i kompleks Cd-peptyd mogą być transportowane do wakuoli niezależnie od siebie.

Coraz częściej przedstawiane są doniesienia minimalizujące istotną rolę fitochelatyn w detoksykacji metali ciężkich. Stwierdza się, że niekiedy rośliny wrażliwe syntetyzują więcej fitochelatyn niż rośliny tolerancyjne, w wyniku traktowania ich metalem o takim samym stężeniu (Tukendorf i Rauser 1990, Schat i Kalff 1992, Harmens i inni 1993, De Knecht i inni 1994). Zaobserwowano również, że rośliny tolerancyjne syntetyzują mniej dłuższych łańcuchów fitochelatyn niż wrażliwe oraz to, że stabilne kompleksy fitochelatyny-metale są szybciej formowane u roślin wrażliwych niż u tolerancyjnych (De Knecht i inni 1994). Innym argumentem, przemawiający przeciwko roli fitochelatyn w detoksykacji metali ciężkich, jest działanie sulfoksimidu butioniny, który jest inhibitorem syntezy glutationu. Niekiedy sulfoksimid butioniny powoduje ograniczenie syntezy fitochelatyn w roślinach wrażliwych, jak i tolerancyjnych na metale ciężkie. Jednocześnie sulfoksimid butioniny nie wpływał na tolerancję roślin na metale. Stwierdzono, że rośliny tolerancyjne rosły i rozwijały się normalnie, pomimo niższego poziomu fitochelatyn (Davies i inni 1991). Wykazano również, że w korzeniach tolerancyjnych osobników *Silene vulgaris* fitochelatyny posiadają pewne znaczenie w mechanizmach detoksykacji metali ciężkich. Stopień tolerancji u tych roślin na te metale nie zależy bezpośrednio od zdolności do syntezy fitochelatyn. Przypuszcza się, że zwiększona synteza fitochelatyn indukowanych przez metal u roślin wrażliwych może być spowodowana: 1) specyficzną aktywnością syntetazy fitochelatynowej; 2) zróżnicowanym tempem rozpadu fitochelatyn; 3) zróżnicowanym tempem transportu kompleksów fitochelatyna-metal przez tonoplast (Cobbett i Goldsbrough 2002). Zatem tempo transportu przez tonoplast może wpływać na szybkość rozpadu fitochelatyn, co w konsekwencji prowadzi do zmiany stężenia fitochelatyn. Istnieje również możliwość, że jon metalu lub inny kompleks niż fitochelatyna-metal może być transportowany do wakuoli (De Knecht i inni 1994). Los metali ciężkich w wakuolach glonów nie jest poznany, chociaż analogicznie do roślin wyższych można by przypuszczać, że są one wiązane przez organiczne ligandy takie, jak: kwasy organiczne lub fitochelatyny (Cobbett 2000, Ma 2000, Cobbett i Goldsbrough 2002). Z kolei w wakuolach glonu *Chlorella fusca* stwierdzono występowanie granul polifosforanowych, w których wykazano obecność jonów miedzi, cynku, żelaza i glinu (Wong i inni 1994).

Nieliczne doniesienia dotyczą detoksykacji niektórych metali ciężkich poprzez procesy utleniania, redukcji, alkilacji i dealkilacji w komórkach glonu *Chlorella vulgaris* odpornego na rtęć (De Filippis i Pallaghy 1976) czy arsen (Maeda i inni 1992). Przypuszcza się, że organiczne sole metali ciężkich

są bardziej toksyczne od soli nieorganicznych w komórkach glonów (Wong i inni 1997, Pawlik-Skowrońska i inni 1997, 1998, Ma 2000).

Podsumowując należy podkreślić, że występowanie i rozwój glonów w obecności metali ciężkich uzależniony jest od kilku czynników: 1) ograniczonej biodostępności toksycznych form (zwykle kationowych); 2) ograniczonej akumulacji wewnątrzkomórkowej, spowodowanej funkcjonowaniem mechanizmów unikania; 3) funkcjonowania mechanizmów obronnych, polegających na wewnątrzkomórkowej detoksykacji; 4) funkcjonowania adaptacyjnych mechanizmów, służących ograniczaniu dostępu nadmiernych stężeń pobranych metali do miejsc metabolicznie aktywnych, np. wzmożonej aktywności enzymatycznej. Badania własne wykazały, że obecność w środowisku brassinosteroidów (BR), które w warunkach naturalnych mogą zostać wydzielone pozakomórkowo przez inne rośliny (Yokota 1997) stanowi dodatkowy czynnik przyspieszający wewnątrzkomórkową detoksykację z metali ciężkich. Związane jest to ze zwiększeniem tempa syntezy fitochelatyn w komórkach *Chlorella vulgaris*. Równocześnie wzmożona synteza fitochelatyn przyczyniała się do zwiększenia liczby komórek glonu (ryc. 4.27) i zmniejszenia w nich zawartości metali ciężkich (tabela 4.8). Badania wykazały także, że w komórce potraktowanej egzogennym metalem ciężkim dochodzi do zahamowania wzrostu i metabolizmu glonu niezależnie od czasu działania metalu (ryc. 4.27). Natomiast brassinolid (BL) dodany do kultur traktowanych metalami ciężkimi spowodował stymulację wzrostu liczby komórek (ryc. 4.27). Ponadto zaobserwowano przeciętnie 2-krotną stymulację zawartości chlorofili, cukrów i białek (ryc. 4.27). Równocześnie mieszaniny BL i metalu zwiększały zawartość fitochelatyn w *Chlorella vulgaris* (ryc. 4.28). Zwiększenie tempa procesów detoksykacji przez BR w komórkach spowodowało zwiększenie tempa wzrostu i rozwoju glonu.

Przedostające się do środowiska zanieczyszczenia, ścieki, pyły i odpady przemysłowe wywołują zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania całych ekosystemów (Piechalak i Tomaszewska 2004). Dotychczas stosowane metody usuwania zanieczyszczeń są bardzo kosztowne, wymagają wyszukanego sprzętu, a w efekcie mogą powodować zanik na oczyszczanym terenie jakiegokolwiek aktywności życiowej. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na możliwość wykorzystania roślin do usuwania lub inaktywacji zanieczyszczeń z gleby i wód powierzchniowych. W środowiskach zanieczyszczonych metalami ciężkimi można hodować rośliny, które wykazują dużą odporność na wysoki poziom metali lub hiperakumulatory, tzn. rośliny gromadzące w suchej masie organów nadziemnych ponad 1% całej ilości pobranego przez roślinę metalu.

Dane przedstawione w niniejszej pracy dowodzą, że egzogennie podany BL jest stymulatorem procesów metabolicznych, zachodzących w komórkach glonu *Chlorella vulgaris*, natomiast metale ciężkie takie, jak: kadm, ołów i miedź są inhibitorami wzrostu i metabolizmu glonu. Wyniki badań dowodzą, że BL znosi inhibitory efekt działania metali ciężkich. Glony akumulują pierwiastki toksyczne z ekosystemu wodnego. Współdziałając z BR, wykazują zintensyfikowanie zdolności do inaktywacji metali ciężkich. W związku z tym w przyszłości BR mogą być wykorzystywane w oczyszczaniu ścieków z toksycznych związków metali przy udziale glonów.

Na podstawie wyników uzyskanych w tej części badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Metale ciężkie (kadm, ołów i miedź) w zakresie stężeń 10^{-6} - 10^{-4} M zahamowały wzrost i zmniejszenie się zawartości białek, chlorofilu i cukrów w *Chlorella vulgaris*;
2. Inhibitorowa aktywność biologiczna metali ciężkich przedstawiała się następująco: kadm > ołów > miedź;
3. Traktowanie brassinolidem kultur glonu poddanych działaniu metali spowodowało wzrost liczby komórek oraz analizowanych składników chemicznych komórek;
4. Zawartość metali ciężkich w glonie *Chlorella vulgaris* zmieniała się wprost proporcjonalnie do dodanego do pożywki stężenia metalu ciężkiego;
5. Kultury glonu, potraktowane mieszaniną metalu ciężkiego i brassinolidu, charakteryzowały się obniżeniem zawartości metali ciężkich w komórkach;
6. Obecność metali ciężkich w pożywce glonu *Chlorella vulgaris* podczas doświadczenia obniżała pH ze słabo kwaśnego (6,60) do silnie kwaśnego (3,10–5,60). Podanie brassinolidu do kultury glonu wykazało zmianę pH w kierunku słabo kwaśnego;
7. Brassinolid był stymulatorem biosyntezy fitochelatyn w komórkach glonu poddanego działaniu metali ciężkich.

4.7. Wpływ brassinosteroidów na glon *Chlorella vulgaris* poddany działaniu stresu oksydacyjnego, wywołanego oddziaływaniem światła, temperatury i metali ciężkich

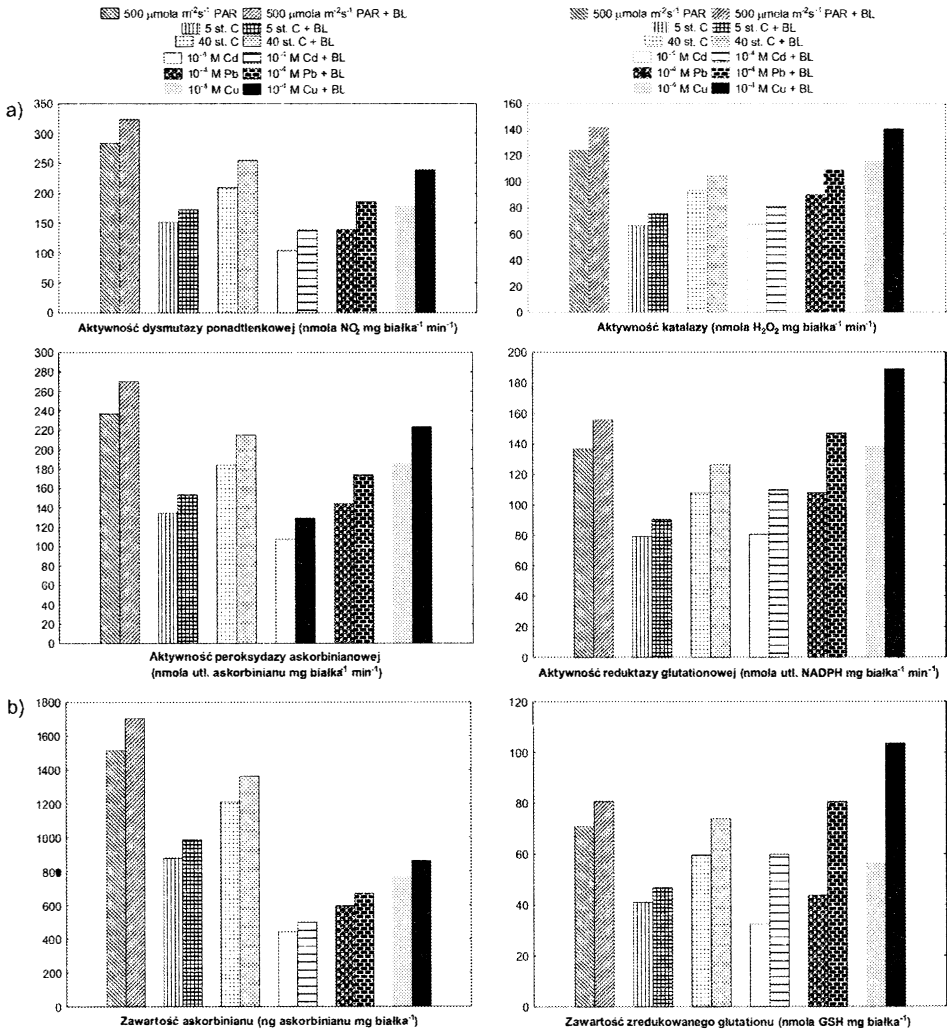
Tlen to źródło życia dla organizmów tlenowych, ale jednocześnie źródło szkodliwych cząsteczek, zwanych reaktywnymi formami tlenu (ROS, *ang.* reactive oxygen species). Zwiększenie w komórce poziomu reaktywnych form tlenu (określane jako stres oksydacyjny) może spowodować uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne, prowadzące do śmierci komórki (Mostowska i Gwóźdź 1995, Bray i inni 2000, Apel i Hirt 2004, Małecka i Tomaszewska 2005, Bartosz 2006, Del Rio i inni 2006, Rhoads i inni 2006, Sagi i Fluhr 2006).

Poniższy rozdział przedstawia udział wybranych czynników stresowych w tworzeniu reaktywnych form tlenu w komórkach *Chlorella vulgaris*. Wystąpienie objawów stresu oksydacyjnego wyrażono poprzez zmiany aktywności enzymatycznych (dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinianowej i reduktazy glutationowej) i nieenzymatycznych (glutationu i askorbinianu) antyutleniaczy. Kultury glonu, poddane stresogennemu działaniu, były jednocześnie traktowane brassinolidem (BL). Celem badań było wykazanie antystresowej roli brassinosteroidów (BR) w glonie *Chlorella vulgaris* poddanych działaniu stresu oksydacyjnego.

Jak dotąd niewiele jest informacji dotyczących roli BR w odpowiedzi na działanie różnorodnych czynników stresowych, w szczególności wywołujących powstanie w nadmiarze reaktywnych form tlenu (Krishna 2003, Kwak i inni 2006).

Źródłem powstania stresu oksydacyjnego w komórkach *Chlorella vulgaris* było wysokie natężenie światła, niska i wysoka temperatura oraz działanie metali ciężkich. W przypadku stresu oksydacyjnego, wywołanego różnymi czynnikami środowiska, reaktywne formy tlenu indukują również syntezę białek szoku termicznego (HSP, *ang.* heat shock proteins). Rola HSP w komórkach została przedstawiona w rozdziale 4.5. Szczegółowe informacje dotyczące bezpośredniego działania BR na kultury glonu *Chlorella vulgaris* zawierają rozdziały 4.4–4.6. We wszystkich przypadkach zahamowanie tempa wzrostu i rozwoju glonu oraz zmniejszenie zawartości białek, chlorofilu i cukrów w komórkach *Chlorella vulgaris* było niwelowane przez BR (ryc. 4.20, 4.24, 4.27). Wyniki badań własnych wykazały, że pod wpływem BR dochodziło do podwyższenia aktywności nieenzymatycznych antyutleniaczy:

glutatonu i askorbinianu oraz enzymatycznych antyutleniaczy: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy askorbinianowej (APX) i reduktazy glutationowej (GR) w stosunku do kultur pozbawionych egzogenego BR (ryc. 4.30).



Ryc. 4.30. Wpływ 10⁻⁴ M brassinolidu na: a) enzymatyczny system antyoksydacyjny (aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinianowej i reduktazy glutationowej) oraz b) nieenzymatyczny system antyoksydacyjny (zawartość askorbinianu i glutationu) w kulturach *Chlorella vulgaris*, poddanych działaniu różnorodnych czynników stresowych: światło (500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR; 48 godz. hodowli; fotoperiod 16/8 godz.; 25°C), temperatura (5°C, 40°C; 5 godz. hodowli; fotoperiod 16/8 godz.; 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) i metali ciężkich (stężenie 10⁻⁴ M Cd, Pb i Cu; 48 godz. hodowli; fotoperiod 16/8 godz.; 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) (SE < 5%)

Badania własne wykazały, że w warunkach wysokiego natężenia światła, stresu, wywołanego działaniem metali ciężkich oraz niskiej i wysokiej temperatury, BR podwyższały aktywność enzymów systemu obronnego przeciwko stresowi oksydacyjnemu, czego efektem był wzrost aktywności enzymów SOD, APX i CAT oraz zawartości askorbinianu i glutationu. Największą aktywność enzymu dysmutazy ponadtlenkowej stwierdzono pod wpływem jonów miedzi, zaś najmniejszą – jonów kadmu (ryc. 4.30). W następstwie wzrostu stężenia metali ciężkich dochodziło do podwyższenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. Dodanie BL do kultur narażonych na działanie metali ciężkich spowodowało wzrost aktywności tego enzymu. Z kolei aktywność katalazy w kulturach traktowanych metalami ciężkimi wzrastała wraz ze wzrostem stężenia metalu. Stymulujący wpływ metali ciężkich na aktywność enzymów systemu antyoksydacyjnego przedstawiał się następująco: miedź > ołów > kadm. Egzogenny BL powodował podwyższenie aktywności ww. enzymów.

Aktywność reduktazy glutationowej pod wpływem stężenia 10^{-6} M metali ciężkich w nieznacznym stopniu ulegała obniżeniu (tabela 4.9). Najsilniej hamująco oddziaływały metale w stężeniu 10^{-4} M. Kultury glonu narażone na działanie metali ciężkich, a potraktowane 10^{-8} M BL charakteryzowały się aktywnością reduktazy glutationowej zbliżoną do kontroli. Zatem BL niwelował hamujące działanie metali ciężkich poprzez podwyższenie aktywności tego enzymu. W podobny sposób metale ciężkie i BL oddziaływały na zawartość zredukowanego glutationu (tabela 4.9). Pomiędzy aktywnością reduktazy glutationowej a zawartością zredukowanego glutationu zachodziła silna zależność, w której współczynnik korelacji liniowej Pearsona wyniósł 0,998. Analogicznie do aktywności reduktazy glutationowej i zawartości zredukowanego glutationu przedstawiało się działanie metali ciężkich i BL na aktywność peroksydazy askorbinianowej i zawartość askorbinianu. Pomiędzy aktywnością peroksydazy askorbinianowej a zawartością askorbinianu, zawartością glutationu i askorbinianu, aktywnością peroksydazy askorbinianowej i glutationu zachodziła silna korelacja, w której współczynnik korelacji liniowej Pearsona wyniósł 0,997.

Stres oksydacyjny występuje wówczas, gdy wzrasta w komórkach poziom reaktywnych form tlenu takich, jak: wolnorodnikowy anion ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru (H_2O_2) i rodnik hydroksylowy (Małecka i Tomaszewska 2005, Bartosz 2006, Del Rio i inni 2006, Rhoads i inni 2006, Sagi i Fluhr 2006). U roślin stres oksydacyjny może być indukowany poprzez szereg czynników takich, jak: skażenie atmosferyczne, metale ciężkie, starzenie, herbicydy, biotoksyny, promieniowanie UV, niska lub wysoka temperatura czy wysokie natężenie światła (ryc. 4.31). Formy aktywnego tlenu powsta-

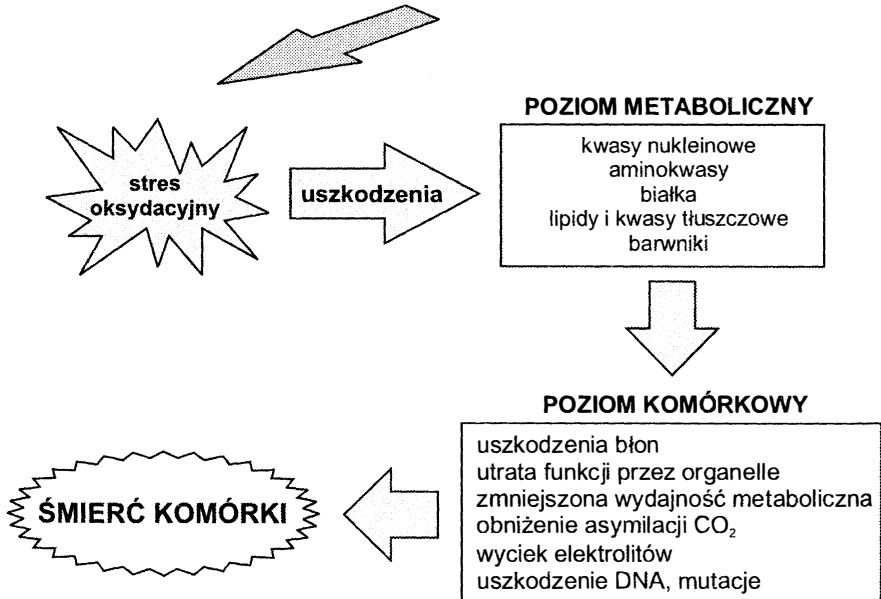
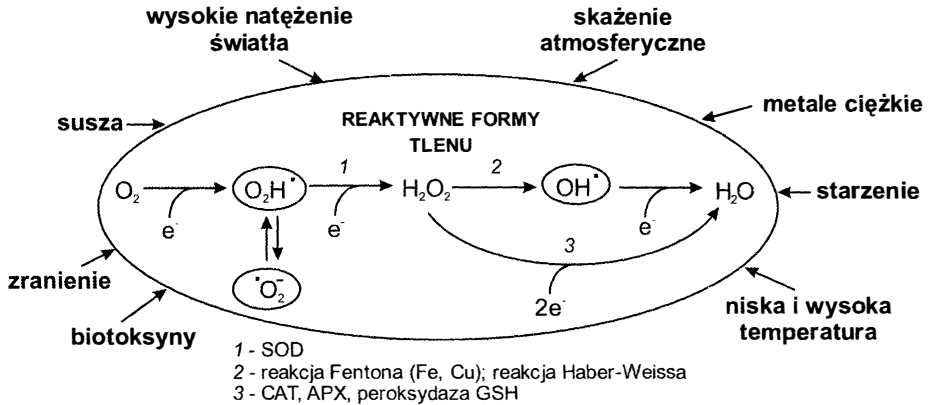
Tabela 4.9. Wpływ brassinolidu na aktywność enzymatycznych i nieenzymatycznych antyutleniaczy w komórkach *Chlorella vulgaris*, potraktowanych metalami ciężkimi (24 godz. hodowli, 25°C, fotoperiod 16/8 godz., 50 $\mu\text{mola m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) (wartość średnia \pm SE)

Stężenie \ Parametr	SOD	CAT	APX	GR	Askorbinian	GSH
0 (Kontrola)	82,32 \pm 0,08	22,14 \pm 0,06	53,17 \pm 0,05	23,42 \pm 0,08	376,11 \pm 0,07	22,32 \pm 0,09
10 ⁻⁶ M Cd	86,41 \pm 0,06	33,43 \pm 0,08	71,59 \pm 0,07	42,38 \pm 0,05	339,46 \pm 0,05	24,84 \pm 0,05
10 ⁻⁶ M Cd + 10 ⁻⁸ M BL	102,24 \pm 0,09	39,74 \pm 0,07	88,43 \pm 0,09	48,55 \pm 0,08	450,58 \pm 0,04	26,35 \pm 0,08
10 ⁻⁵ M Cd	98,11 \pm 0,07	50,65 \pm 0,06	87,35 \pm 0,09	58,08 \pm 0,04	410,12 \pm 0,09	27,41 \pm 0,04
10 ⁻⁵ M Cd + 10 ⁻⁸ M BL	115,37 \pm 0,06	65,54 \pm 0,08	101,12 \pm 0,07	72,11 \pm 0,09	476,34 \pm 0,05	34,53 \pm 0,06
10 ⁻⁴ M Cd	103,68 \pm 0,08	67,28 \pm 0,07	107,28 \pm 0,06	80,52 \pm 0,05	441,73 \pm 0,06	32,58 \pm 0,05
10 ⁻⁴ M Cd + 10 ⁻⁸ M BL	138,43 \pm 0,09	81,19 \pm 0,09	129,16 \pm 0,05	109,61 \pm 0,08	497,95 \pm 0,07	59,84 \pm 0,07
10 ⁻⁶ M Pb	115,84 \pm 0,05	44,45 \pm 0,07	95,64 \pm 0,08	56,57 \pm 0,07	456,63 \pm 0,05	33,41 \pm 0,05
10 ⁻⁶ M Pb + 10 ⁻⁸ M BL	137,39 \pm 0,08	52,53 \pm 0,09	118,54 \pm 0,09	64,66 \pm 0,06	606,15 \pm 0,06	35,43 \pm 0,06
10 ⁻⁵ M Pb	132,01 \pm 0,06	67,35 \pm 0,05	117,19 \pm 0,08	78,13 \pm 0,07	552,27 \pm 0,07	36,91 \pm 0,09
10 ⁻⁵ M Pb + 10 ⁻⁸ M BL	154,91 \pm 0,07	87,56 \pm 0,06	136,05 \pm 0,07	96,98 \pm 0,09	641,17 \pm 0,07	46,47 \pm 0,08
10 ⁻⁴ M Pb	138,74 \pm 0,06	90,25 \pm 0,08	144,13 \pm 0,06	107,76 \pm 0,07	594,03 \pm 0,09	43,78 \pm 0,07
10 ⁻⁴ M Pb + 10 ⁻⁸ M BL	185,89 \pm 0,08	109,11 \pm 0,07	173,76 \pm 0,05	146,82 \pm 0,05	669,46 \pm 0,04	80,55 \pm 0,07
10 ⁻⁶ M Cu	148,95 \pm 0,09	57,16 \pm 0,07	122,97 \pm 0,09	72,74 \pm 0,08	587,15 \pm 0,06	42,95 \pm 0,06
10 ⁻⁶ M Cu + 10 ⁻⁸ M BL	176,66 \pm 0,08	67,55 \pm 0,07	152,42 \pm 0,08	83,14 \pm 0,09	779,40 \pm 0,04	45,55 \pm 0,07
10 ⁻⁵ M Cu	169,74 \pm 0,07	86,60 \pm 0,06	150,68 \pm 0,07	100,46 \pm 0,07	710,12 \pm 0,06	47,46 \pm 0,06
10 ⁻⁵ M Cu + 10 ⁻⁸ M BL	199,18 \pm 0,09	112,58 \pm 0,09	174,93 \pm 0,08	124,70 \pm 0,08	824,43 \pm 0,08	59,75 \pm 0,07
10 ⁻⁴ M Cu	178,40 \pm 0,06	116,04 \pm 0,08	185,32 \pm 0,09	138,56 \pm 0,08	763,81 \pm 0,07	56,29 \pm 0,06
10 ⁻⁴ M Cu + 10 ⁻⁸ M BL	239,02 \pm 0,08	140,29 \pm 0,07	223,43 \pm 0,08	188,79 \pm 0,07	860,80 \pm 0,09	103,57 \pm 0,09

SOD, dysmutaza ponadtlenkowa (nmola NO₂ mg białka⁻¹ min⁻¹); CAT, katalaza (nmola H₂O₂ mg białka⁻¹ min⁻¹); APX, peroksydaza askorbinianowa (nmola utlenionego askorbinianu mg białka⁻¹ min⁻¹); GR, reduktaza glutationowa (nmola utlenionego NADPH mg białka⁻¹ min⁻¹); askorbinian (ng askorbinianu mg białka⁻¹); GSH, zredukowany glutation (nmola GSH mg białka⁻¹)

ją również w komórkach w warunkach normalnych jako uboczny produkt wielu reakcji oksydoredukcyjnych. Ilość powstających rodników uwarunkowana jest ilością dostępnego NADP⁺, wielkością natężenia światła i wydajnością cyklu Calvina. W warunkach normalnych blisko 96% rodnika ponadtlenkowego, produkowanego wewnątrz błon tylakoidów, jest utleniana do tlenu w drodze cyklicznego przepływu elektronów lub spontanicznej dysmutacji do nadtlenku wodoru, który powstaje w reakcji utleniania rodników ponadtlenkowych przy współudziale dysmutazy ponadtlenkowej. Z kolei rodniki hydroksylowe wytwarzane są w reakcji nadtlenku wodoru z rodnika ponadtlenkowego. Tlen singletowy produkowany jest podczas przekazy-

wania energii z chlorofilu na tlen. Głównymi źródłami ROS w komórkach roślinnych są: chloroplasty, peroksosomy i mitochondria. ROS uszkadzają wiele makrocząsteczek takich, jak: białka, tłuszcze oraz kwasy nukleinowe, powodując modyfikację struktury, utratę aktywności i właściwości biologicznych tych cząsteczek. Nagromadzenie zmodyfikowanych makrocza-

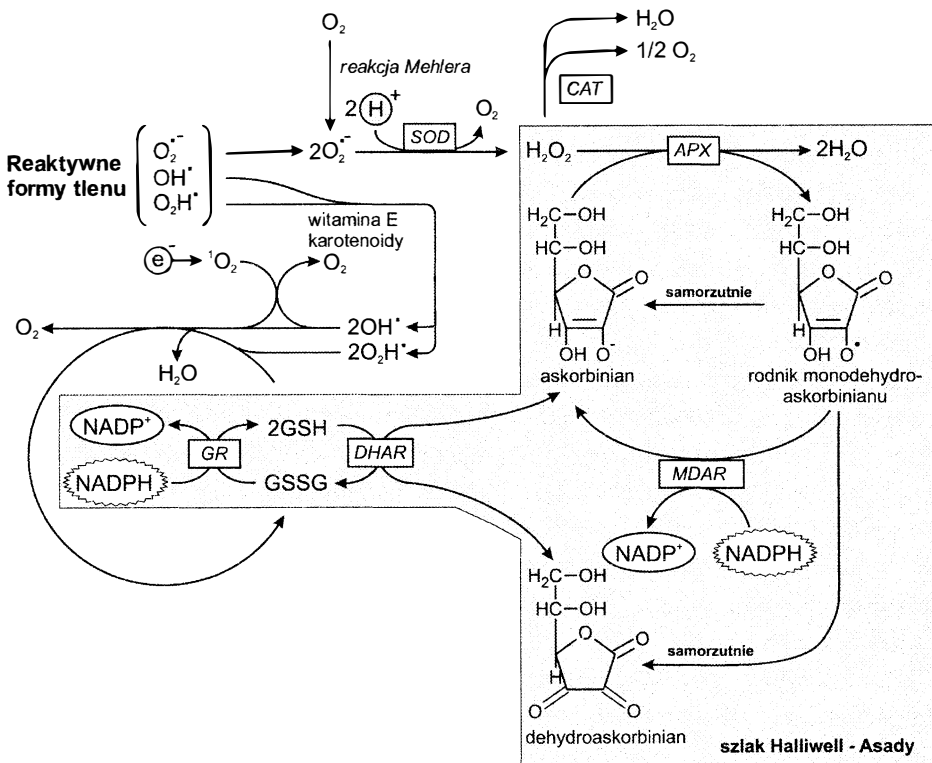


Ryc. 4.31. Źródła stresu oksydacyjnego oraz powstawanie uszkodzeń na poziomie metabolicznym i komórkowym u roślin (wg Mostowska i Gwóźdź 1995, Bray i inni 2000, zmodyfikowano)

Objaśnienia skrótów: APX – peroksydaza askorbinianowa, CAT – katalaza, GSH – glutation, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

steczek prowadzi do uszkodzeń strukturalnych komórki, a w końcu do jej śmierci. ROS posiadają również funkcję cząsteczek sygnałowych. Organizmy przed uszkodzeniami spowodowanymi przez ROS są chronione poprzez antyoksydacyjny system obronny, na który składają się enzymy: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, *ang.* superoxide dismutase), katalaza (CAT, *ang.* catalase), peroksydaza askorbinianowa (APX, *ang.* ascorbate peroxidase) i reduktaza glutationowa (GR, *ang.* glutathione reductase) oraz składniki nieenzymatyczne: askorbinian, glutation, homoglutation czy cysteina (ryc. 4.32).

Enzymatyczne antyutleniacze – dysmutazy ponadtlenkowe (SOD) występują w trzech typach SOD: Fe-SOD, Cu,Zn-SOD i Mn-SOD (Bray i inni 2000, Mittler 2002, Apel i Hirt 2004, Mittler i i inni 2004, Małecka i Tomaszewska 2005, Czarna i Jarmuszkiewicz 2006). Dysmutazy występują w wielu organelach komórkowych, m.in. w mitochondriach, chloropla-



Ryc. 4.32. Mechanizmy obronne przeciwdziałające stresowi oksydacyjnemu u roślin (wg Bray i inni 2000, Mittler i inni 2004, zmienione)

Objaśnienia skrótów: APX – peroksydaza askorbinianowa, CAT – katalaza, DHAR – reduktaza dehydroaskorbinianowa, GR – reduktaza glutationowa, MDAR – reduktaza monodehydroaskorbinianowa, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

stach i peroksysomach. Ponadto występują w cytosolu oraz na zewnątrz komórek. Poszczególne formy i liczby izoenzymów SOD u różnych gatunków zlokalizowane są w różnych miejscach w obrębie chloroplastów, np. typ Cu,Zn-SOD w szpinaku zlokalizowany jest w stromie i przestrzeni wewnątrztylakoidowej, natomiast typ Mn-SOD w błonie tylakoidów. Z kolei peroksydaza askorbinianowa (APX), reduktaza glutationowa (GR), zależna od NADPH i reduktaza dehydroaskorbinianowa (DHAR) są enzymami, które na terenie chloroplastu usuwają H_2O_2 według szlaku Halliwell-Asady (ryc. 4.32).

Do nieenzymatycznych antyutleniaczy należy α -tokoferol, który jest syntetyzowany w chloroplastach, występujący w dużych ilościach w membranach tylakoidów i blokujący łańcuchową reakcję utleniania lipidów (Mostowska i Gwóźdź 1995, Bray i inni 2000, Apel i Hirt 2004, Bartosz 2006, Mullineaux i inni 2006). Antyoksydacyjne działanie tokoferoli polega na zmiataniu wtórnych wolnych rodników organicznych i zakończeniu reakcji peroksydacji lipidów. Ponadto tokoferole są efektywnym wygaszaczem stanu tlenu singletowego. Kolejnymi antyoksydantami hydrofobowymi są karotenoidy i ksantofile, których rola polega na wygaszaniu tlenu singletowego, reakcji z organicznymi wolnymi rodnikami, powstającymi w peroksydacji lipidów. Ponadto ksantofile umożliwiają rozproszenie nadmiaru energii w cyklu ksantofilowym, deepoksydacji wiolaksantyny. Askorbinian zlokalizowany jest głównie w stromie chloroplastowej i jest substratem w szlaku Halliwell-Asady, ponieważ reaguje z rodnikami ponadtlenkowymi oraz uczestniczy w deepoksydacji wiolaksantyny. Innym antyoksydantem nieenzymatycznym jest glutation, który bierze udział w regeneracji askorbinianu z dehydroaskorbinianu. Związek ten reaguje także z tlenem singletowym i rodnikami hydroksylowymi oraz ochrania grupy tiolowe enzymów (ryc. 4.32).

Z dotychczasowych danych wynika, że działanie metali ciężkich na rośliny naczyniowe oraz glony powoduje zwiększenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy askorbinianowej (Cakmak i Horst 1991, Gwóźdź i inni 1997, Stroiński i Kozłowska 1997, Okamoto i inni 2001, Mallick 2004, Tewari i inni 2006). Stwierdzono również zależność pomiędzy stężeniem metali a aktywnością ww. enzymów. Wraz ze wzrostem stężenia wrastała aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy askorbinianowej, zaś zmniejszała się aktywność katalazy (Rucińska i inni 1999).

Badania własne wykazały, że kultury glonu *Chlorella vulgaris*, poddane działaniu BR w warunkach niskiej ($5^{\circ}C$) i wysokiej ($40^{\circ}C$) temperatury, charakteryzowały się większą przeżywalnością. Oznaczało to zwiększony wzrost

liczby komórek glonu oraz wzrost zawartości chlorofili, cukrów i białek (ryc. 4.24). W związku z tym podjęto badania umożliwiające wyjaśnienie mechanizmów obronnych, za indukcję których odpowiadają BR. Wiadomo, że stres temperaturowy powoduje tworzenie się dużych ilości aktywnych form tlenu. Rośliny posiadają szereg systemów obronnych, umożliwiających prawidłowe funkcjonowanie w obecności aktywnych form tlenu. Zwiększony poziom enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów w komórce jest powszechnym zjawiskiem, który może być wynikiem działania czynników stresowych, jak i bezpośrednim objawem starzenia się komórek. Ustalono, że w warunkach niskiej i wysokiej temperatury pod wpływem 10^{-8} M BL następowało podwyższenie aktywności średnio o 20% enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinianowej i reduktazy glutationowej.

Szereg aktywności biologicznej enzymatycznego systemu antyutleniaczy w *Chlorella vulgaris* pod wpływem różnorodnych czynników stresowych przedstawiał się następująco:

- dysmutaza ponadtlenkowa: wysokie natężenia światła > wysoka temperatura > działanie miedzi > działanie ołowiu > niska temperatura > działanie kadmu;
- katalaza: wysokie natężenia światła > działanie miedzi > wysoka temperatura > działanie ołowiu > niska temperatura > działanie kadmu;
- peroksydaza askorbinianowa: wysokie natężenia światła > wysoka temperatura > działanie miedzi > działanie ołowiu > niska temperatura > działanie kadmu;
- reduktaza glutationowa: działanie miedzi > wysokie natężenia światła > działanie ołowiu > wysoka temperatura > działanie kadmu > niska temperatura.

Z kolei szereg aktywności biologicznej nieenzymatycznego systemu antyutleniaczy w *Chlorella vulgaris* pod wpływem różnorodnych czynników stresowych był następujący:

- askorbinian: wysokie natężenia światła > wysoka temperatura > niska temperatura > działanie miedzi > działanie ołowiu > działanie kadmu;
- zredukowany glutation: działanie miedzi > wysokie natężenia światła > działanie ołowiu > wysoka temperatura > działanie kadmu > niska temperatura. Okazało się, że spośród sześciu czynników stresowych, którym poddane były kultury glonu *Chlorella vulgaris* największą odpowiedź na stres oksydacyjny wywołuje wysokie natężenie światła, zaś najmniejszą – działanie kadmu.

Dotychczas wiadomo, że w warunkach stresu wodnego (suszy) i zasolenia potraktowanie roślin BL powoduje zwiększenie aktywności antyutleniaczy enzymatycznych: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy askorbinianowej, peroksydazy i reduktazy glutationowej (Li i van Staden 1998a, b, Li i inni 1998, Núñez i inni 2003, Özdemir i inni 2004, Almeida i inni 2005). Dochodzi również do wzrostu zawartości kwasu askorbinowego i karotenoidów. Ponadto stwierdzono podwyższony poziom wymienionych antyutleniaczy w sadzonkach odpornych na suszę, w których uszkodzenia spowodowane zaistniałym stresem oksydacyjnym były mniejsze. Rośliny traktowane BR charakteryzowały się większą przeżywalnością, zatem wzrastała odporność na czynniki stresogenne.

BR przyspieszają uruchomienie mechanizmu detoksykacji ROS, ponieważ indukują syntezę i aktywność enzymów bezpośrednio zaangażowanych w usuwanie reaktywnych rodników tlenowych (dysmutazy ponadtlenkowe, katalazy, peroksydazy), jak i enzymów biorących udział w reakcjach utleniania i redukcji kwasu askorbinowego (peroksydaza askorbinianu) czy redukcji glutationu (reduktaza glutationu). Wiadomo, że w wyniku traktowania roślin BR dochodzi do wzrostu zawartości osmoprotektantów takich, jak: prolina, sorbitol, mannitol, które mogą pełnić rolę wychwytywaczy agresywnych metabolicznie form tlenu (Almeida i inni 2005). Działanie takie wykazują również same BR, dzięki czemu łagodzą skutki stresu oksydacyjnego i opóźniają śmierć komórek. W związku z tym należy traktować BR jako związki, które – stymulując aktywność antyutleniaczy enzymatycznych i nieenzymatycznych – przyczyniają się do przyspieszenia reakcji usuwania toksycznych form tlenu, których źródłem może być działanie wysokiego natężenia światła, obecność metali ciężkich w środowisku rośliny lub niska i wysoka temperatura otoczenia (Krishna 2003). Podobną rolę jak BR w regulacji mechanizmu detoksykacji ROS posiadają inne hormony roślinne – cytokiny. Indukują one syntezę i aktywność białek enzymatycznych (dysmutazy ponadtlenkowe, katalazy, peroksydazy, oksydaza alternatywna), związków niskocząsteczkowych czy białek nieenzymatycznych (m.in. glutation, askorbinian, α -tokoferol, tioredoksyna) (Hare i inni 1997, Rakwal i inni 2003, Synková i inni 2004).

Na podstawie wyników uzyskanych w tej części badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Glony *Chlorella vulgaris* posiadają antyoksydacyjny system obronny, na który składają się enzymy: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza askorbinianowa i reduktaza glutationowa oraz składniki nieenzymatyczne: askorbinian czy glutation;
2. Kultury glonu traktowane brassinolidem wykazały zwiększoną zawartość ww. antyutleniaczy;
3. Szereg aktywności biologicznej dla enzymatycznego systemu antyutleniaczy w *Chlorella vulgaris* pod wpływem różnorodnych czynników stresowych przedstawiał się następująco:
 - dysmutaza ponadtlenkowa: wysokie natężenia światła > wysoka temperatura > działanie miedzi > działanie ołowiu > niska temperatura > działanie kadmu;
 - katalaza: wysokie natężenia światła > działanie miedzi > wysoka temperatura > działanie ołowiu > niska temperatura > działanie kadmu;
 - peroksydaza askorbinianowa: wysokie natężenia światła > wysoka temperatura > działanie miedzi > działanie ołowiu > niska temperatura > działanie kadmu;
 - reduktaza glutationowa: działanie miedzi > wysokie natężenia światła > działanie ołowiu > wysoka temperatura > działanie kadmu > niska temperatura;
4. Szereg aktywności biologicznej dla nieenzymatycznego systemu antyutleniaczy w *Chlorella vulgaris* pod wpływem różnorodnych czynników stresowych był następujący:
 - askorbinian: wysokie natężenia światła > wysoka temperatura > niska temperatura > działanie miedzi > działanie ołowiu > działanie kadmu;
 - zredukowany glutation: działanie miedzi > wysokie natężenia światła > działanie ołowiu > wysoka temperatura > działanie kadmu > niska temperatura.

5 STRESZCZENIE

Doświadczenia przeprowadzono na zsynchronizowanej monokulturze zielenicy *Chlorella vulgaris* Beijerinck (*Trebouxiophyceae*). Celem pracy było zbadanie: 1) wpływu auksyny, brassinosteroidy (BR) i cytokiny oraz ich współdziałanie na wzrost i rozwój *Chlorella vulgaris*; 2) odpowiedzi brassinosteroidów w kulturach glonu, poddanych działaniu różnych czynników stresowych (światło o różnym natężeniu i barwie, metale ciężkie, temperatura) oraz wyjaśnienie roli BR w mechanizmach adaptacyjnych do stresów (białka szoku termicznego, fitochelatyny, enzymatyczne i nienzymatyczne antyoksydanty) w komórkach *Chlorella vulgaris*. Zastosowano szereg metod analitycznych: mikroskopową (liczba komórek glonu), spektroskopową (zawartość chlorofili, cukrów, białek, dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinianowej, reduktazy glutationowej i askorbinianu), SDS-PAGE i western blotting (analiza białek szoku termicznego), AAS (zawartość metali ciężkich), HPLC (zawartość fitochelatyn i glutationu), HPLC-MS (analiza jakościowa i ilościowa cytokinin), HPLC i GC-SIM-MS (analiza jakościowa i ilościowa auksyn i BR).

W komórkach glonu *Chlorella vulgaris* stwierdzono występowanie następujących fitohormonów z grupy: auksyn (4 związki: kwas indolilo-3-octowy, kwas indolilo-3-masłowy, kwas indolilo-3-pirogronowy, kwas 4-chloroindolilo-3-octowy), brassinosteroidów (BR) (13 związków: brassinolid, 24-epibrassinolid, 28-homobrassinolid, teasteron, 3-dehydroteasteron, 6-deokso-3-dehydroteasteron, 6-deoksoteasteron, tyfasterol, 6-deoksotyfasterol, katasteron, 6-deoksokatasteron, kastasteron, 6-deoksokastasteron) i cytokinin (2 związki: *trans*-zeatyna, *cis*-zeatyna). Wykazano, że w *Chlorella*

vulgaris biosynteza steroli zachodzi wyłącznie poprzez szlak niemewalonowy. W biosyntezie BR występują równolegle późny i wczesny (dominujący) szlak C6 utleniania. Natomiast auksyny i cytokininy są regulatorami biosyntezy BR. Dodane do kultur *Chlorella vulgaris* IAA i *trans*-zeatyna zwiększały zawartość endogennych BR, przy czym najbardziej stymulująca okazała się *trans*-zeatyna. Poza fitohormonami również światło było regulatorem biosyntezy BR w *Chlorella vulgaris*. Wraz ze wzrostem natężenia oświetlenia (0–100 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) zwiększała się endogenna zawartość BR w komórkach tego glonu. Natomiast wysokie natężenie oświetlenia (500 $\mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) powodowało obniżenie ich zawartości. Kultury glonów hodowane w ciemności nie wykazały obecności brassinolidu (BL). Oznacza to, że światło jest stymulatorem przemiany kastasteronu (CS) w BL. Poza intensywnością również barwa światła (białe, niebieskie, czerwone) w istotny sposób wpływała na biosyntezę BR w *Chlorella vulgaris*. Światło białe stymulowało przemianę CS w BL, natomiast światło czerwone i niebieskie – hamowało tę reakcję. Kultury *Chlorella vulgaris*, hodowane na świetle czerwonym i traktowane BL, wykazały obecność endogenego BL. Traktowanie BL glonów, rosnących na świetle niebieskim i w ciemności, nie spowodowało inicjacji przemiany CS w BL.

Egzogenne BR, zastosowane w zakresie stężeń 10^{-15} – 10^{-6} M, osiągały optymalne działanie na wzrost i zawartość chlorofili, cukrów i białek w stężeniu 10^{-8} M. 72-godzinna hodowla kultur glonu traktowanych BR wykazywała dwie formy wzrostu *Chlorella vulgaris*: logarytmiczną – pomiędzy 12. a 48. godziną i stagnacji – pomiędzy 48. a 72. godziną. Kultury kontrolne, pozbawione egzogennych BR, charakteryzowały się jedynie fazą wzrostu logarytmicznego. Pod wpływem BR uaktywniały się nowe formy rozrodcze w cyklu komórkowym *Chlorella vulgaris* o kilkakrotnie większej średnicy, a mianowicie komórki „giganty” i ciała palmelloidowe. W konsekwencji następowało zwiększenie liczby komórek glonu. Największą aktywność biologiczną posiadały BR typu 7-oksalakton, mające połączenie *trans* pierścieni A/B, grupy hydroksylowe w położeniu $2\alpha,3\alpha$ w pierścieniu A, grupy hydroksylowe w pozycji C-22R, C-23R w łańcuchu bocznym oraz podstawniki metylowe lub etylowe w pozycji C-24S. W przeprowadzonych doświadczeniach szereg aktywności biologicznej zastosowanych BR przedstawiał się następująco: BL > 24-epiBL > 28-homoBL > CS > 24-epiCS > 28-homoCS.

Stwierdzono synergistyczny wpływ auksyn (kwasu indolilo-3-octowego, kwasu indolilo-3-masłowego i kwasu indolilo-3-pirogronowego) i cytokinin (zeatyny, kinetyny i 1,3-difenyłmocznika) z BR na liczbę komórek glonu oraz zawartość białek, chlorofili i cukrów. Aktywność biologiczna auksyn i cytokinin, współdziałających z BR, przedstawiała się następująco: *trans*-zeatyna

+ BR > kinetyna + BR > 1,3-difenyłomocznik + BR > kwas indolilo-3-octowy + BR > kwas indolilo-3-pirogronowy + BR > kwas indolilo-3-masłowy + BR. Największą stymulację na wzrost i metabolizm glonu *Chlorella vulgaris* wywierała mieszanina 10^{-8} M BL i 10^{-8} M *trans*-zeatyny, najmniejszą – 10^{-8} M BL i 5×10^{-5} M kwasu indolilo-3-masłowego.

Stres świetlny ograniczał wzrost kultur glonu *Chlorella vulgaris*, zaś dodanie BL do kultur spowodowało wzrost liczby komórek oraz zawartości chlorofili, cukrów i białek. Pod wpływem światła o niskim ($10 \mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) i wysokim ($500 \mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR) natężeniu kultury *Chlorella vulgaris* wykazały znikomy przyrost liczby komórek oraz nieznaczną stymulację zawartości chlorofili, cukrów i białek w porównaniu do kultur poddanych naświetleniu $50\text{--}100 \mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR, przy czym podanie BL wywierało działanie stymulujące na wzrost i skład chemiczny komórek *Chlorella vulgaris*. Barwa światła (białe, czerwone i niebieskie) była czynnikiem ograniczającym wzrost i rozwój *Chlorella vulgaris*. Najbardziej optymalną barwą światła dla wzrostu glonu było światło białe. Egzogenny BL w pełni znosił hamujący wpływ światła czerwonego i niebieskiego na rozwój *Chlorella vulgaris*. W ciemności BL zastępował efekt działania światła białego, które było niezbędne do zapoczątkowania wzrostu *Chlorella vulgaris*.

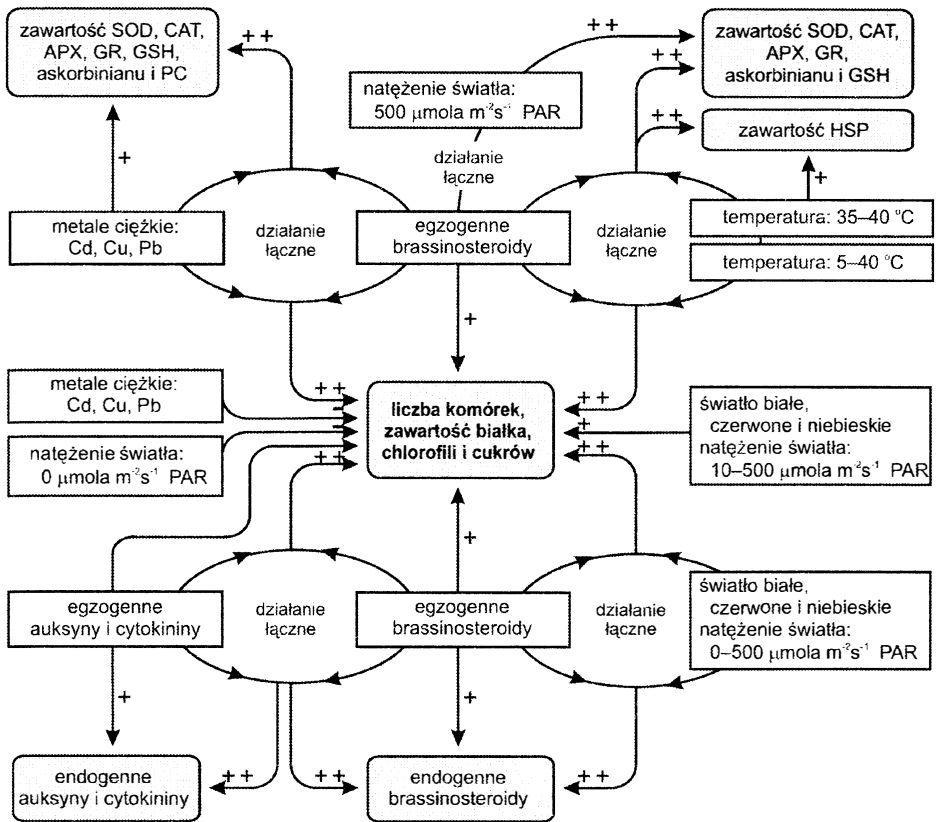
Niska ($5\text{--}15^{\circ}\text{C}$) i wysoka ($35\text{--}40^{\circ}\text{C}$) temperatura była czynnikiem ograniczającym wzrost i rozwój glonu, przy czym traktowanie kultur BL spowodowało podwyższenie aktywności *Chlorella vulgaris*. Najbardziej optymalną dla rozwoju glonu okazała się temperatura $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$. Bodziec cieplny był jednym z czynników determinujących syntezę specyficznych cząsteczek ochronnych – białek szoku termicznego (HSP). BL selektywnie stymulował syntezę odpowiednich polipeptydów. Pod wpływem BL w komórkach glonu, poddanych działaniu temperatury 30°C , zaobserwowano pojawienie się 6 polipeptydów o masie cząsteczkowej: 30, 40, 45, 70, 90 i 100 kDa, z tego 3 nowe: 30, 40 i 100 kDa w stosunku do kontroli. W temperaturze 35°C stwierdzono syntezę nowych polipeptydów o masie cząsteczkowej 27, 43 i 60 kDa. Natomiast w temperaturze 40°C stwierdzono syntezę dwóch innych polipeptydów (35 i 105 kDa). Odkryto, że BL zwiększał poziom niektórych polipeptydów, np. o masie 70 kDa, zaś inne indukował *de novo*, tj. 27, 35, 43 i 60 kDa.

Kultury *Chlorella vulgaris*, poddane działaniu metali ciężkich (kadm, ołów i miedź), charakteryzowały się zmniejszeniem liczby komórek i zawartości białek, chlorofili i cukrów. Inhibitorowa aktywność biologiczna metali ciężkich przedstawiała się następująco: kadm > ołów > miedź. Traktowanie kultur glonu BL, poddanych działaniu ww. metali, spowodowało wzrost liczby komórek oraz analizowanych składników chemicznych komórek. Dochodziło do całkowitego lub częściowego zniesienia hamującego wpływu metali cięż-

kich. Najniższą stymulację wzrostu i zawartości analizowanych składników chemicznych glonu traktowanych BL stwierdzono w kulturach poddanych działaniu metali w stężeniu 10^{-4} M, zaś największą w 10^{-6} M. Zawartość metali ciężkich w glonie *Chlorella vulgaris* zmieniała się wprost proporcjonalnie do użytego stężenia metalu ciężkiego. Najbardziej akumulującym się metalem była miedź, najsłabiej kadm. Kultury glonu, potraktowane mieszaniną metalu ciężkiego i BL, charakteryzowały się obniżeniem zawartości tych pierwiastków w komórkach. Obecność metali ciężkich w środowisku wzrostu glonu *Chlorella vulgaris* powodowała obniżenie wartości pH ze słabo kwaśnego (6,60) do silnie kwaśnego (3,10). Podanie BL kulturom glonu powodowało zmianę pH w kierunku słabo kwaśnego. Ponadto stwierdzono, że BL zwiększał syntezę fitochelatyn – peptydów biorących udział w detoksykacji metali ciężkich.

Stres oksydacyjny może być indukowany poprzez różne czynniki, np. metale ciężkie, niską lub wysoką temperaturę czy wysokie natężenie światła. Wzrasta wówczas poziom reaktywnych form tlenu takich, jak: wolnorodnikowy anion ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylowy. Organizmy są chronione poprzez antyoksydacyjny system obronny, na który składają się enzymy: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza askorbinianowa i reduktaza glutationowa oraz składniki nieenzymatyczne: askorbinian czy glutation. Wykazano, że kultury *Chlorella vulgaris* traktowane BL charakteryzowały się zwiększeniem syntezy ww. antyutleniaczy, najintensywniej w warunkach stresu świetlnego, działania metali ciężkich oraz wysokiej temperatury.

Podsumowując, w komórkach *Chlorella vulgaris* stwierdzono występowanie BR, określono ich szlak biosyntezy oraz wykazano synergistyczne współdziałanie z auktynami i cytokinami oraz antystresową rolę BR w odpowiedzi na działanie różnorodnych czynników środowiskowych: światła, metali ciężkich oraz niskiej i wysokiej temperatury (ryc. 5.1).



Ryc. 5.1. Wpływ brassinosteroidów na kultury glonu *Chlorella vulgaris*, poddane działaniu wybranych fitohormonów (auksyn i cytokinin) oraz czynników stresowych (światła o różnej barwie i intensywności, temperatury i metali ciężkich)

Objaśnienia skrótów: APX – peroksydaza askorbinianowa, CAT – katalaza, GR – reduktaza glutationowa, GSH – zredukowany glutation, HSP – białka szoku termicznego, PAR – promieniowanie fotosyntetyczne, PC – fitochelatyny, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, + / ++ działanie stymulujące, – działanie hamujące

6 SUMMARY

Influence of brassinosteroids on the *Chlorella vulgaris* cultures subjected to selected phytohormones and stressful factors

Brassinosteroids (BRs) are natural plant steroidal hormones that promote growth and affect a broad spectrum of physiological responses at nanomolar to micromolar concentrations. Subsequently, about sixty related plant compounds were shown to have brassinosteroid activity. BRs have been found to stimulate stem growth, inhibit root growth, promote xylem differentiation and retard leaf abscission. Observed physiological responses to BR application include ethylene biosynthesis through activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis, membrane hyperpolarisation through enhanced proton extrusion, enhanced DNA, RNA and protein synthesis, increased invertase activity, stimulation of photosynthetic activity, and changes in the balance of other endogenous phytohormones. Key observations in BR's interaction with other hormones in stem elongation include a synergistic response with auxins and an additive effect with gibberellins. In addition to their roles in plant development, BRs protect plants from various environmental stresses, including chilling, drought, salinity, herbicidal injury, and heat stress.

The experiments were conducted on the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (*Trebouxiophyceae*).

The first aim of this study was to examine the hormonal regulation of growth and development of *Chlorella vulgaris*, i.e.:

- the occurrence of auxins (AXs), cytokinins (CKs) and BRs;
- the pathways of BRs and their endogenous level under the influence of different conditions of light (intensity: 0, 10, 50, 100 and 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR and irradiation: white-, red- and blue-light);
- the influence of AXs (indole-3-acetic acid, IAA; indole-3-propionic acid, IPA; indole-3-butyric acid, IBA), CKs (*trans*-zeatin, kinetin, 1,3-diphenylurea) and BRs (brassinolide, BL; 24-epiBL; 28-homoBL; castasterone, CS; 24-epiCS i 28-homoCS) on the growth (expressed as number of cells) and chemical composition (content of chlorophyll, sugar and protein) of the green alga *C. vulgaris*;
- the effects of BRs mixed with AXs and CKs on the growth and chemical composition in *Chlorella vulgaris* cells;
- assignment the type of interaction between BRs and other phytohormones.

The second aim of this study was to examine the protective role of BRs against various kind of stresses on *Chlorella*-grown cultures, i.e.:

- the influence of light (intensity: 0, 10, 50, 100 and 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR and irradiation: white-, red- and blue-light);
- the influence of heavy metals (cadmium, lead, copper);
- the influence of temperature (5–40°C) on the growth (expressed as number of cells) and chemical composition (content of chlorophyll, sugar and protein) of the green alga *Chlorella vulgaris*;
- detoxification mechanisms (synthesis of heat shock proteins, phytochelatins, the level of antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidant compounds).

The following analytical methods have been used during experiments: microscopic (number of algal cells), spectroscopic (content of chlorophylls, sugar, protein, ascorbate peroxidase, catalase, glutathione reductase, superoxide dismutase, ascorbate), SDS-PAGE and western blotting (heat shock proteins analysis), AAS (content of heavy metals), HPLC (content of phytochelatins and glutathione), HPLC-MS (analysis of cytokinins), HPLC and GC-SIM-MS (analysis of auxins and BRs).

Plant hormones, such as AXs (indole-3-acetic acid, indole-3-pyruvate acid, indole-3-butyric acid, 4-chlorindole-3-acetic acid), BRs (brassinolide, BL; 24-epibrassinolide, 24-epiBL; 28-homobrassinolide, 28-homoBL; teasterone,

TE; 3-dehydroteasterone, 3-DT; 6-deoxy-3-dehydroteasterone, 6-deoxy-3-DT; 6-deoxoteasterone, 6-deoxyTE; typhasterol, TY; 6-deoxytyphasterol, 6-deoxyTY; catasterone, CT; 6-deoxocatasterone, 6-deoxyCT; castasterone, CS; 6-deoxocastasterone, 6-deoxyCS) and CKs (*trans*-zeatin, *cis*-zeatin) have been identified in *Chlorella vulgaris* cultures. Total quantity of BRs amount 13 various compounds (12 belong to C₂₈ type, one to C₂₉ type – 28-homoBL), among them five compounds belong to 6-oxo type (CS, TY, TE, 3-DT and CT), five belong to 6-deoxy type (6-deoxyCS, 6-deoxyTY, 6-deoxyTE, 6-deoxyCT and 6-deoxy-3-DT), three belong to 7-oxalactone type (BL, 24-epiBL and 28-homoBL). The highest concentration of BR has been detected in CS content, i.e. 0.329 fg cell⁻¹.

In *Chlorella*, isopentenyl diphosphate, the precursor of isoprenoids, is synthesized by pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate (non-mevalonate pathway). Early steps of BL biosynthesis were investigated using feeding of cell cultures of *Chlorella vulgaris* with ²H-labeled 6-deoxyCS, and the metabolites were analyzed by GC-SIM-MS. The cell cultures produced representatives of C₂₈ BRs, such as CT, TE, 3-DT, TY, CS and BL. The reactions are named the early C-6 oxidation pathway for C₂₈ BRs. The occurrence of 6-deoxyBRs such as 6-deoxyCS, 6-deoxyTE, 6-deoxyTY suggested that the parallel or/and alternative BR biosynthetic route exists. In addition to the early and the late C-6 oxidation pathways, cross-links between both branches seem exists. It was demonstrated by feeding with deuterium-labelled 6-deoxyTE, 3-dehydro-6-deoxyTE and 6-deoxyTY, in which TY was identified as a metabolite. Conversion of CS to BL was also detected. The biosynthesis of BRs was regulated by intensity of light (10-100 μmol m⁻²s⁻¹ PAR) and white-, red- and blue-light irradiation. In the dark-grown *Chlorella*, there is not conversion of CS to BL.

The influence of 7-oxalactone and 6-ketone type of BRs (10⁻¹⁵-10⁻⁶ M) upon the biological activity of algae has been presented. The results of the study indicate significant differences in the growth and metabolism of the cells of algae *Chlorella vulgaris*, caused by different chemical structure of BR used. The most significant differences in the stimulation of the growth and metabolites (chlorophyll, sugar and protein content) contained were caused by the difference in the structure of B ring of BR. It was found that in *Chlorella vulgaris* 7-oxalactone type of BRs (BL and its derivatives) are more active than 6-ketone type of BRs (CS and its derivatives). The most stimulating influence of BRs was shown at the concentration 10⁻⁸ M. The effects of BRs mixed with AXs and CKs on the growth and chemical composition in *Chlorella vulgaris* cells have also been studied. The synergism between BRs and other phytohormones was assigned (fig. 6.1).

BRs have a protective role against environmental stresses, i.e.: the influence of light, heavy metals and temperature on the growth and chemical composition (content of chlorophyll, sugar and protein) of the green alga *Chlorella vulgaris* (fig. 6.1). Application of BL to *Chlorella vulgaris* cultures reduced the impact of stresses on growth, prevented chlorophyll, sugar and protein loss and increased detoxification mechanisms. Cell treated with heavy metals alone showed a weaker increase of total phytochelatin (PC) content, but cultures treated with BRs and heavy metals show a higher PC content. The cultures of *Chlorella vulgaris* treated with BRs and heavy metals show a lower bioaccumulation of heavy metals than the cultures treated with metals alone. The inhibitory effect of BRs mixed with different heavy metals on their accumulation was arranged in the following order: cadmium > lead > copper. A stimulatory effect of BRs after blocking the accumulation of heavy metals on the growth and development of *Chlorella vulgaris* occurs. Application of BRs minimally increased freezing tolerance of by 5°C, but markedly enhanced cell viability following exposure to high (35–40°C) temperature stress. Thermotolerance in cultures of *Chlorella vulgaris* was induced by heat shock treatment at supraoptimal temperatures (35 and 40°C). According to electrophoretic analyses, the synthesis of proteins of 30, 40, 45, 70, 90, 100 and 105 kDa was only induced by heat shock treatment. The *de novo* synthesis of proteins (27, 35, 43 and 60 kDa) was induced by BL treatment in heat shock conditions. The synthesis of 70 kDa HSP was the most stimulated by BL at the 40°C. Algae *Chlorella vulgaris* respond to heavy metals, high intensity of light, and extreme temperature by induction of several antioxidants, including several enzymatic systems, and the synthesis of low molecular weight compounds. Treatment with BL was effective in increasing the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase and ascorbate peroxidase) and the content of ascorbic acid and glutathione.

BRs can act efficiently in plants as immunomodulators when applied at the appropriate concentration and at the correct stage of plant development. BR-regulated stress response as a result of complex sequence of biochemical reactions such as activation or suppression of key enzymatic reactions, induction of protein synthesis, and the production of various chemical defence compounds. BRs open up new approaches for *Chlorella* resistance against unfriendly environmental conditions.

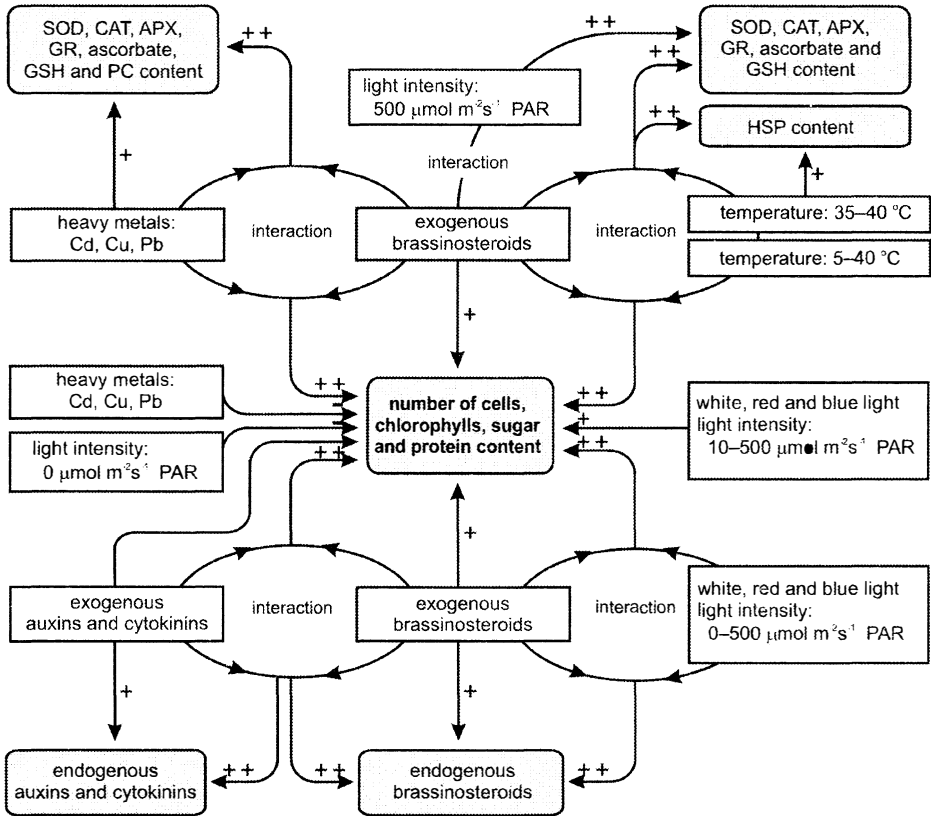


Fig. 6.1. Influence of brassinosteroids on the *Chlorella vulgaris* cultures subjected to selected phytohormones (auxins and cytokinins) and stressful factors (coloured light, intensity of light, temperature and heavy metals)

Abbreviations: APX – ascorbate peroxidase, CAT – catalase, GR – glutathione reductase, GSH – glutathione, HSP – heat shock proteins, PAR – photosynthetic active radiation, PC – phytochelatin, SOD – superoxide dismutase, + / ++ stimulatory effect, - inhibitory effect

7 WNIOSKI

1. W komórkach *Chlorella vulgaris* stwierdzono występowanie następujących fitohormonów z grupy:
 - auksyn – kwas indolilo-3-octowy, kwas indolilo-3-masłowy, kwas indolilo-3-pirogronowy i kwas 4-chloroindolilo-3-octowy;
 - brassinosteroidów – brassinolid, 24-epibrassinolid, 28-homobrassinolid, teasteron, 3-dehydroteasteron, 6-deokso-3-dehydroteasteron, 6-deoksoteasteron, tyfasterol, 6-deoksotyfasterol, katasteron, 6-deoksokatasteron, kastasteron i 6-deoksokastasteron;
 - cytokinin – *trans*-zeatyna i *cis*-zeatyna;
2. Określono szlak biosyntezy brassinosteroidów i jego regulację za pośrednictwem auksyn, cytokinin i światła o różnym natężeniu i barwie;
3. Stwierdzono działanie synergistyczne pomiędzy auksynami a brassinosteroidami, cytokinami a brassinosteroidami na wzrost i biochemizm *Chlorella vulgaris*;
4. Wykazano antystresową rolę brassinosteroidów w kulturach *Chlorella vulgaris*, narażonych na stres świetlny, termiczny, oksydacyjny i działanie metali ciężkich:
 - brassinosteroidy zwiększały liczbę komórek glonu i zawartość białek, chlorofili i cukrów;
 - brassinosteroidy przyspieszały syntezę fitochelatyn, białek szoku termicznego oraz enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów.

Spis rycin

Ryc. 1.1. Wzory strukturalne wybranych brassinosteroidów (wg Bajguz i Tretyn 2003a, b, Bajguz 2005, zmodyfikowano)	15
Ryc. 1.2. Różnorodne podstawniki w pierścieniach A i B oraz łańcucha bocznego naturalnie występujących brassinosteroidów (wg Bajguz i Tretyn 2003a, b)	19
Ryc. 1.3. Biosynteza brassinosteroidów typu C ₂₇ (wg Bajguz i Tretyn 2003a, Kim i inni 2005, zmodyfikowano)	27
Ryc. 1.4. Biosynteza kampesterolu do kampestanolu (wg Bajguz i Tretyn 2003a)	29
Ryc. 1.5. Biosynteza brassinosteroidów typu C ₂₈ (wg Bajguz i Tretyn 2003a, zmodyfikowano)	30
Ryc. 1.6. Miejsca w cząsteczce brassinosteroidu, które podlegają procesom metabolicznym (wg Bajguz 2005, 2007)	32
Ryc. 1.7. Aktywność biologiczna brassinosteroidów (wg Bajguz i Tretyn 2003a)	35
Ryc. 3.1. Wzory strukturalne auksyn, brassinosteroidów i cytokinin, stosowanych w doświadczeniach	47
Ryc. 4.1. Wzory strukturalne brassinosteroidów wyizolowanych z glonu <i>Chlorella vulgaris</i>	61
Ryc. 4.2. Wzory strukturalne inhibitorów biosyntezy brassinosteroidów (brassinazol, Brz 2001), szlaku niemewalonowego (klomazon) i mewalonowego (mewinolin)	62
Ryc. 4.3. Uproszczony niemewalonowy szlak biosyntezy steroli roślinnych w glonie <i>Chlorella vulgaris</i> (wg Bajguz i Asami 2004)	63
Ryc. 4.4. Wpływ klomazonu (Clo) na liczbę komórek glonu <i>Chlorella vulgaris</i> w odniesieniu do kultur kontrolnych i traktowanych brassinolidem (BL) w stężeniu 10 ⁻⁸ M w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)	64
Ryc. 4.5. Szlak biosyntezy brassinosteroidów w komórkach glonu <i>Chlorella vulgaris</i>	66
Ryc. 4.6. Wpływ brassinazolu (Brz) na liczbę komórek oraz zawartość chlorofili, cukrów i białka w glonie <i>Chlorella vulgaris</i> w odniesieniu do kultur kontrolnych i traktowanych brassinolidem w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)	68
Ryc. 4.7. Wpływ optymalnego stężenia brassinosteroidów na wzrost <i>Chlorella vulgaris</i> w trakcie 72-godzinnej hodowli (SE < 5%)	71
Ryc. 4.8. Wpływ różnych stężeń brassinosteroidów na wzrost <i>Chlorella vulgaris</i> podczas 48-godzinnej hodowli (SE < 5%)	72
Ryc. 4.9. Cykl rozwojowy komórek <i>Chlorella vulgaris</i> nietraktowanych (A) i traktowanych (B) egzogennymi brassinosteroidami	74

Ryc. 4.10. Kontrola cyklu komórkowego u roślin przez cykliny i kinazy zależne od cyklin (wg Horvath i inni 2003, zmodyfikowano).....	75
Ryc. 4.11. Wzory strukturalne auksyn i cytokinin, występujących w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i>	80
Ryc. 4.12. Zawartość brassinolidu (BL), kwasu indolilo-3-octowego (IAA), <i>trans</i> - i <i>cis</i> -zeatyny w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i> nietraktowanych i traktowanych 10^{-8} M BL w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)	80
Ryc. 4.13. Wpływ auksyn (AX) i cytokinin (CK) oraz ich oddziaływanie z brassinosteroidami na liczbę komórek <i>Chlorella vulgaris</i> w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)	83
Ryc. 4.14. Wpływ auksyn (AX) i cytokinin (CK) oraz ich oddziaływanie z brassinosteroidami na zawartość chlorofili w <i>Chlorella vulgaris</i> w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)	84
Ryc. 4.15. Wpływ auksyn (AX) i cytokinin (CK) oraz ich oddziaływanie z brassinosteroidami na zawartość cukrów w <i>Chlorella vulgaris</i> w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)	86
Ryc. 4.16. Wpływ auksyn (AX) i cytokinin (CK) oraz ich oddziaływanie z brassinosteroidami na zawartość białek w <i>Chlorella vulgaris</i> w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)	87
Ryc. 4.17. Porównanie współdziałania brassinosteroidów z auksynami i cytokininami w <i>Chlorella vulgaris</i> w optymalnych stężeniach w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)	89
Ryc. 4.18. Modele współdziałania białek BRI1 i BAK1 podczas łączenia brassinosteroidu z receptorem (wg Li 2003, zmodyfikowano)	99
Ryc. 4.19. Indukcja przez brassinosteroidy szlaku transdukcji sygnałów w <i>Arabidopsis thaliana</i> (wg Peng i Li 2003, Wang i He 2004, zmodyfikowano)	100
Ryc. 4.20. Wpływ brassinolidu (BL) na liczbę komórek, zawartość chlorofili, cukrów i białka w kulturach <i>Chlorella vulgaris</i> , poddanych działaniu światła o różnej intensywności promieniowania fotosyntetycznego czynnego (PAR) podczas 48-godzinnej hodowli (SE < 5%)	103
Ryc. 4.21. Wpływ brassinolidu (BL) na liczbę komórek, zawartość chlorofili, cukrów i białka w kulturach <i>Chlorella vulgaris</i> , poddanych działaniu światła o różnej barwie o intensywności $50 \mu\text{mola m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR podczas 48-godzinnej hodowli (SE < 5%).....	104
Ryc. 4.22. Wpływ światła o różnej intensywności na zawartość brassinosteroidów szlaku biosyntezy, występujących w komórkach glonu <i>Chlorella vulgaris</i> , które zostały poddane działaniu egzogenego brassinolidu (BL) w 48. godzinie hodowli.....	107
Ryc. 4.23. Wpływ światła i ciemności na zawartość brassinosteroidów szlaku biosyntezy, występujących w komórkach glonu <i>Chlorella vulgaris</i> nie traktowanych (a) i traktowanych (b) brassinolidem (BL) w 48. godzinie hodowli.....	108
Ryc. 4.24. Wpływ brassinosteroidów na liczbę komórek, zawartość chlorofili, cukrów i białka w kulturach <i>Chlorella vulgaris</i> , poddanych działaniu różnej temperatury w 48. godzinie hodowli (SE < 5%)	119
Ryc. 4.25. Rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE, western blotting) białek komórkowych kultury glonu <i>Chlorella vulgaris</i> , poddanego działaniu temperatury w zakresie 30–40°C pod wpływem 10^{-8} M brassinolidu (BL) w porównaniu do kontroli (K) w 3. godzinie hodowli.....	122
Ryc. 4.26. Aktywacja przez stres temperaturowy czynnika transkrypcyjnego białka szoku termicznego (HSF) (wg Bray i inni 2000, zmodyfikowano)	125

Ryc. 4.27. Wpływ brassinolidu na liczbę komórek, zawartość chlorofili, cukrów i białka w kulturach <i>Chlorella vulgaris</i> , poddanych działaniu metali ciężkich (kadmu, ołowiu i miedzi) podczas 48-godzinnej hodowli (SE < 5%)	129
Ryc. 4.28. Wpływ brassinolidu na zawartość ogólną fitochelatyn w kulturach <i>Chlorella vulgaris</i> , poddanych działaniu metali ciężkich (kadmu, ołowiu i miedzi) podczas 48-godzinnej hodowli (SE < 5%)	132
Ryc. 4.29. Biosynteza fitochelatyn i mechanizm detoksykacji metali ciężkich na przykładzie kadmu (wg Crawford i inni 2000, zmodyfikowano)	137
Ryc. 4.30. Wpływ 10 ⁻⁴ M brassinolidu na: a) enzymatyczny system antyoksydacyjny (aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinia-nowej i reduktazy glutationowej) oraz b) nieenzymatyczny system antyoksydacyjny (zawartość askorbinianu i glutationu) w kulturach <i>Chlorella vulgaris</i> poddanych działaniu różnorodnych czynników stresowych: światło (500 μmola m ⁻² s ⁻¹ PAR; 48 godz. hodowli; fotoperiod 16/8 godz.; 25°C), temperatura (5°C, 40°C; 5 godz. hodowli; fotoperiod 16/8 godz.; 50 μmola m ⁻² Pb i Cu; 48 godz. hodowli; fotoperiod 16/8 godz.; 50 μmola m ⁻² (SE < 5%)	143
Ryc. 4.31. Źródła stresu oksydacyjnego oraz powstawanie uszkodzeń na poziomie metabolicznym i komórkowym u roślin (wg Mostowska i Gwóźdź 1995, Bray i inni 2000, zmodyfikowano)	146
Ryc. 4.32. Mechanizmy obronne przeciwdziałające stresowi oksydacyjnemu u roślin (wg Bray i inni 2000, Mittler i inni 2004, zmienione)	147
Ryc. 5.1. Wpływ brassinosteroidów na kultury glonu <i>Chlorella vulgaris</i> , poddane działaniu wybranych fitohormonów (auksyn i cytokinin) oraz czynników stresowych (światła o różnej barwie i intensywności, temperatury i metali ciężkich)	157
Fig. 6.1. Influence of brassinosteroids on the <i>Chlorella vulgaris</i> cultures subjected to selected phytohormones (auxins and cytokinins) and stressful factors (coloured light, intensity of light, temperature and heavy metals)	163

Spis tabel

Tabela 1.1. Podział brassinosteroidów w zależności od budowy pierścienia B i konformacji grup hydroksylowych, grupy ketonowej i epoksydowej przy węglach C-1, C-2, C-3 i C-6 w pierścieniu A (wg Bajguz i Tretyn 2003a, b)	17
Tabela 1.2. Podział brassinosteroidów ze względu na zróżnicowanie podstawników łańcucha bocznego (wg Bajguz i Tretyn 2003a, b).....	20
Tabela 1.3. Przykłady występowania brassinosteroidów u roślin (wg Bajguz i Tretyn 2003b).....	23
Tabela 1.4. Produkty przemian metabolicznych brassinosteroidów u roślin (wg Bajguz i Tretyn 2003a, Bajguz 2005, 2007).....	33
Tabela 3.1. Skład chemiczny pożywki Knopa (1865).....	44
Tabela 3.2. Egzogenne związki zastosowane w doświadczeniach	46
Tabela 3.3. Metody analityczne zastosowane w badaniach	48
Tabela 3.4. Procedura analizy zawartości askorbinianu	58
Tabela 4.1. Zawartość brassinosteroidów w komórkach glonu <i>Chlorella vulgaris</i>	62
Tabela 4.2. Porównanie liczby komórek <i>Chlorella vulgaris</i> w kulturach traktowanych mewnolinem (Mev) i/lub brassinolidem (BL) w odniesieniu do kultur kontrolnych (10^6 komórek ml^{-1} ; $P < 0,05$; $n = 20$; wartość średnia \pm SE).....	64
Tabela 4.3. Zawartość brassinosteroidów w komórkach glonu <i>Chlorella vulgaris</i> nietraktowanych i traktowanych inhibitorem biosyntezy brassinosteroidów – brassinazolem	67
Tabela 4.4. Średnica komórek gigantycznych <i>Chlorella vulgaris</i> (μm) w 48. godzinie działania brassinosteroidów.....	73
Tabela 4.5. Zawartość brassinosteroidów w komórkach glonu <i>Chlorella vulgaris</i> traktowanych kwasem indolilo-3-octowym (IAA) i <i>trans</i> -zeatyną (t-Z) w 48. godzinie hodowli	81
Tabela 4.6. Szacunkowa zawartość frakcji białek HSP glonu <i>Chlorella vulgaris</i> , poddanego działaniu temperatury w zakresie 30–40°C pod wpływem 10^{-8} M brassinolidu (BL) w porównaniu do kontroli (K) w 3. godzinie hodowli.....	123
Tabela 4.7. Wpływ metali ciężkich na pH pożywki kultur komórkowych <i>Chlorella vulgaris</i> , traktowanych brassinolidem (BL) (wartość średnia \pm SE; 48 godz.).....	130
Tabela 4.8. Wpływ egzogenne podawanych metali ciężkich na ich zawartość w komórkach (fg metalu kom^{-1}) w <i>Chlorella vulgaris</i> , traktowanym brassinolidem (wartość średnia \pm SE).....	131
Tabela 4.9. Wpływ brassinolidu na aktywność enzymatycznych i nieenzymatycznych antyutleniaczy w komórkach <i>Chlorella vulgaris</i> , potraktowanych metalami ciężkimi (24 godz. hodowli, 25°C, fotoperiod 16/8 godz., 50 $\mu mola m^{-2} s^{-1}$ PAR) (wartość średnia \pm SE).....	145

Piśmiennictwo

- Ahmad I., Hamid T., Fatima M., Chand H. S., Jain S. K., Athar M., Raisuddin S. (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctuatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Bioch. Biophys. Acta* 1523: 37–48.
- Almeida J. M., Fidalgo F., Confraria A., Santos A., Pires H., Santos I. (2005). Effect of hydrogen peroxide on catalase gene expression, isoform activities and levels in leaves of potato sprayed with homobrassinolide and ultrastructural changes in mesophyll cells. *Funct. Plant. Biol.* 32: 707–720.
- Apel K., Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55: 373–399.
- Arteca R. N., Bachman J. M., Mandava N. B. (1988). Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mung bean hypocotyl segments. *J. Plant Physiol.* 133: 430–435.
- Arteca R. N., Tsai D-S., Schlagnhauser C., Mandava N. B. (1983). The effect of brassinosteroid on auxin-induced ethylene production by etiolated mung bean segments. *Physiol. Plant.* 59: 539–544.
- 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.
- Asami T., Yoshida S. (1999). Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends Plant Sci.* 4: 348–353.
- Azpiroz R., Wu Y., LoCascio J. C., Feldmann K. A. (1998). An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell* 10: 219–230.
- Bajguz A. (1997). Zależność między strukturą chemiczną i aktywnością biologiczną brassinosteroidów w glonie *Chlorella vulgaris*. Uniwersytet Warszawski, Filia w Białymstoku. Praca doktorska.
- Bajguz A. (1999). Działanie brassinosteroidów na wzrost i rozwój roślin. *Kosmos* 48: 75–85.
- Bajguz A. (2000a). Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 209–215.
- Bajguz A. (2000b). Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 797–801.

- Bajguz A. (2000c). Ekdysteroidy w roślinach. *Kosmos* 49: 169–178.
- Bajguz A. (2002). Brassinosteroids and lead as stimulators of phytochelatin synthesis in *Chlorella vulgaris*. *J. Plant Physiol.* 159: 321–324.
- Bajguz A. (2005). Brassinosteroids: from distribution to metabolism in plants. [W:] Sharma S. K., Govil J. N., Singh V.K. (red.). *Recent Progress in Medicinal Plants*. Vol. 10. Phytotherapeutics. Studium Press LLC, Houston, s. 25–63.
- Bajguz A. (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 95–107.
- Bajguz A., Asami T. (2004). Effects of brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, on light- and dark-grown *Chlorella vulgaris*. *Planta* 218: 869–877.
- Bajguz A., Asami T. (2005). Suppression of *Wolffia arrhiza* growth by brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis and its restoration by endogenous 24-epibrassinolide. *Phytochemistry* 66: 1787–1796.
- 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.
- Bajguz A., Czerpak R. (1998). Physiological and biochemical role of brassinosteroids and their structure-activity relationship in the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae). *J. Plant Growth Regul.* 17: 131–139.
- Bajguz A., Dinan L. (2004). Effects of ecdysteroids on *Chlorella vulgaris*. *Physiol. Plant.* 121: 349–357.
- Bajguz A., Godlewska-Zylkiewicz B. (2004). Protective role of 20-hydroxyecdysone against lead stress in *Chlorella vulgaris* cultures. *Phytochemistry* 65: 711–720.
- Bajguz A., Tretyn A. (2003a). Brassinosteroidy – hormony roślinne. Wyd. UMK, Toruń.
- Bajguz A., Tretyn A. (2003b). The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 62: 1027–1046.
- Baldi B. G., Maher B. R., Slovin J. P., Cohen J. D. (1991). Stable isotope labeling, *in vivo*, of D- and L-tryptophan pools in *Lemna gibba* and the low incorporation of label into indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 95: 1203–1208.
- Baranowska-Morek A. (2003). Roślinne mechanizmy tolerancji na toksyczne działanie metali ciężkich. *Kosmos* 52: 283–298.
- Barbarino E., Lourenço S. O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *J. Appl. Phycol.* 17: 447–460.
- Barciszewski J., Siboska G., Clark B. F. C., Rattan S. I. S. (2000). Cytokinin formation by oxidative metabolism. *J. Plant Physiol.* 158: 587–588.

- Barnes S. A., McGrath R. B., Chua N.-H. (1997). Light signal transduction in plants. *Trends Cell. Biol.* 7: 21–26.
- Bartel B., LeClere S., Magidin M., Zolman B. K. (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *J. Plant Growth Regul.* 20: 198–216.
- Bartosz G. (2006). *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie.* Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
- Becerril J. M., Munoz-Rueda A., Aparicio-Tejo P., Gonzales-Murua C. (1988). The effects of cadmium and lead on photosynthetic electron transport in clover and lucerne. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 357–363.
- Becker E. W. (1994). *Microalgal biotechnology and microbiology.* Cambridge Acad. Publ., London.
- Bedell G. W., Darnall D. W. (1990). Immobilization of nonviable, biosorbent, algal biomass for the recovery of metal ions. [W:] Volesky B. (red.). *Biosorption of heavy metals.* CRS Press, Boca Raton, s. 313–326.
- Bilgrami K. S., Kumar S. (1997). Effects of copper, lead and zinc on phytoplankton growth. *Biol. Plant.* 39: 315–317.
- Binns A. N. (1994). Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 173–196.
- 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.
- Bohnert H. J., Nelson D. E., Jensen R. G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099–1111.
- Braun P., Wild A. (1984). The influence of brassinosteroid on growth and parameters of photosynthesis of wheat and mustard plants. *J. Plant Physiol.* 116: 189–196.
- Bray E. A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. (2000). Responses to abiotic stresses. [W:] Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (red.). *Biochemistry and molecular biology of plants.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, s. 1158–1203.
- Brosa C. (1999). Biological effects of brassinolide. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34: 339–358.
- Burzyński M. (1987). Wpływ ołowiu na procesy fizjologiczne roślin. *Wiad. Bot.* 31: 87–96.
- Cakmak I., Horst W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83: 463–468.

- Campanoni P., Nick P. (2005). Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol.* 137: 939–948.
- Canter-Lund H., Lund J. W. G. (1996). Freshwater algae. Their microscopic world explored. BioPress, Hong-Kong.
- Cao H., Chen S. (1995). Brassinosteroid-induced rice lamina joint inclination and its relation to indole-3-acetic acid and ethylene. *Plant Growth Regul.* 16: 189–196.
- Carr H. P., Cariño F. A., Yang M. S., Wong M. H. (1998). Characterization of the cadmium-binding capacity of *Chlorella vulgaris*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 433–440.
- Catterou M., Dubois F., Schaller H., Aubanelle L., Vilcot B., Sangwan-Norreel B. S., Sangwan R. S. (2001a). Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. I. Molecular, cellular and physiological characterization of the *Arabidopsis bull1* mutant, defective in the Δ^7 -sterol-C5-desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Planta* 212: 659–672.
- Catterou M., Dubois F., Schaller H., Aubanelle L., Vilcot B., Sangwan-Norreel B. S., Sangwan R. S. (2001b). Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the *bull1* mutant. *Planta* 212: 673–683.
- 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.
- Cerana R., Lado P., Anastasia M., Ciuffreda P., Allevi P. (1984). Regulating effects of brassinosteroids and of sterols on growth and H^+ secretion in maize roots. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 114: 221–225.
- Cerana R., Spelta M., Bonetti A., Lado P. (1985). On the effects of cholesterol on H^+ -extrusion and on growth in maize root segments: comparison with brassinosteroid. *Plant Sci.* 38: 99–105.
- Chen J.-G. (2001). Dual auxin signaling pathways control cell elongation and division. *J. Plant Growth Regul.* 20: 255–264.
- Chen K.-H., Miller A. N., Patterson G. W., Cohen J. D. (1988). A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to GC-SIM-MS analysis. *Plant Physiol.* 86: 822–825.
- Choe S. (2006). Brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *Physiol. Plant.* 126: 539–548.
- Choe S., 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 22α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 10: 231–243.

- Chory J., Li J. (1997). Gibberellins, brassinosteroids and light-regulated development. *Plant Cell Environ.* 20: 801–806.
- Claiborne A. (1985). Catalase activity. [W:] Greenwald R. A. (red.). *CRC Handbook of methods in oxygen radical research*. CRC Press Inc., Boca Raton, s. 283–284.
- Clouse S. D. (2002). Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. *Mol. Cell* 10: 973–982.
- Clouse S. D., Feldmann K. A. (1999). Molecular genetics of brassinosteroid action. [W:] Sakurai A., Yokota T., Clouse S. D. (red.). *Brassinosteroids: steroidal plant hormones*. Springer-Verlag, Tokyo, s. 163–190.
- Cobbett C. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123: 825–832.
- Cobbett C., Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159–182.
- Cohen J. D., Meudt W. J. (1983). Investigations on the mechanisms of the brassinosteroid response. I. Indole-3-acetic acid metabolism and transport. *Plant Physiol.* 72: 691–694.
- Cohen J. D., Slovin J. P., Hendrickson A. M. (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 8: 197–199.
- Collins M. (1978). Algal toxins. *Microbiol. Rev.* 42: 725–746.
- Crawford N. M., Kahn M. L., Leustek T., Long S. R. (2000). Nitrogen and sulfur. [W:] Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (red.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, s. 786–849.
- Cymers J., Niemiałtowski M. (2004). Białka szoku cieplnego. *Molekularne *perpetuum mobile**. *Post. Biol. Kom.* 31: 331–352.
- Czarna M., Jarmuszkiewicz W. (2006). Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowaną śmiercią komórki. *Post. Bioch.* 52: 145–156.
- CzERPak R. (1993). Fotokontrola wzrostu, rozwoju i metabolizmu glonów. *Kosmos* 42: 599–612.
- CzERPak R., Bajguz A. (1993). Effect of auxins and cytokinins on protein and saccharides extracellular excretion in *Chlorella pyrenoidosa*. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 40: 249–254.
- CzERPak R., Bajguz A. (1997). Stimulatory effect of auxins and cytokinins on carotenes, with differential effects on xanthophylls in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick. *Acta Soc. Bot. Pol.* 66: 41–46.

- Czerpak R., Bajguz A., Białecka B., Wierzchołowska L. E., Wolańska M. M. (1994). Effect of auxin precursors and chemical analogues on the growth and chemical composition in *Chlorella pyrenoidosa* Chick. Acta Soc. Bot. Pol. 63: 279–286.
- Czerpak R., Piotrowska A. (2003). Cytokininy, ich struktura, metabolizm i aktywność biologiczna. Kosmos 52: 203–215.
- D'Agostino I. B., Kieber J. J. (1999). Molecular mechanism of cytokinin action. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 359–364.
- Davies K. L., Davies M. S., Francis D. (1991). The influence of an inhibitor of phytochelatin synthesis on root growth and root meristematic activity in *Festuca rubra* L. in response to zinc. New Phytol. 118: 565–570.
- Davies P. J. (red.). (2004). Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action! Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
- De Filippis L. F., Pallaghy C. K. (1976). The effect of sublethal concentrations of mercury and zinc on *Chlorella*. III. Development and possible mechanisms of resistance to metals. Z. Pflanzenphysiol. 79: 323–335.
- De Knecht J. A., Van Dillen M., Koevoets P. L. M., Schat H., Verkleij J. A. C., Ernst W. H. O. (1994). Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. Plant Physiol. 104: 255–261.
- De Michelis M. I., Lado P. (1986). Effects of a brassinosteroid on growth and on H⁺-extrusion in isolated radish cotyledons: comparison with the effects of benzyladenine. Physiol. Plant. 68: 603–607.
- Del Pozo J. C., Lopez-Matas M. A., Ramirez-Parra E., Gutierrez C. (2004). Hormonal control of the plant cell cycle. Physiol. Plant. 123: 173–183.
- Del Rio L. A., Sandalio L. M., Corpas F. J., Palma J. M., Barroso J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. Plant Physiol. 141: 330–335.
- Dharmasiri N., Estelle M. (2004). Auxin signaling and regulated protein degradation. Trends Plant Sci. 9: 302–308.
- Dhaubhadel S., Browning K. S., Gallie D. R., Krishna P. (2002). Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. Plant J. 29: 681–691.
- Dhaubhadel S., Chaudhary S., Dobinson K. F., Krishna P. (1999). Treatment of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. Plant Mol. Biol. 40: 333–342.
- Disch A., Schwender J., Müller C., Lichtenthaler H. K., Rohmer M. (1998). Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. Biochem. J. 333: 381–388.

- Durrieu C., Tran-Minh C. (2002). Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 51: 206–209.
- Elstner E. F., Heupel A. (1976). Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Ann. Biochem.* 70: 616–620.
- Eun J-S., Kuraishi S., Sakurai A. (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.
- Fargašová A. (1993). Effect of five toxic metals on the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Biologia* 48: 301–304.
- Feldmann K. A., Marks M. D., Christianson M. L., Quatrano R. S. (1989). A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science* 243: 1351–1354.
- Franklin N. M., Stauber J. L., Markich S. J., Lim R. P. (2000). pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp). *Aquat. Toxicol.* 48: 275–289.
- Frankowski K., Kęsy J., Kopcewicz J. (2001). Fitochrom i transdukcja sygnału świetlnego. *Post. Bioch.* 47: 184–191.
- Friedrichsen D., Chory J. (2001). Steroid signaling in plants: from the cell surface to the nucleus. *BioEssays* 23: 1028–1036.
- 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.
- 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.
- Fujioka S., Noguchi T., Sekimoto M., Takatsuto S., Yoshida S. (2000a). 28-Norcastasterone is biosynthesized from castasterone. *Phytochemistry* 55: 97–101.
- Fujioka S., Noguchi T., Watanabe T., Takatsuto S., Yoshida S. (2000b). Biosynthesis of brassinosteroids in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 53: 549–553.
- Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S. (2002). An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 130: 930–939.

- Fujioka S., Yokota T. (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 137–164.
- Gächter R., Máreš A. (1979). Effect of increased heavy metal loads on phytoplankton communities. MELIMEX an Experimental Heavy Metal Pollution Study 770: 229–246.
- Gamoh K., Takatsuto S. (1994). Liquid chromatographic assay of brassinosteroids in plants. *J. Chromatogr. A* 658: 17–25.
- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D. M., Thorpe T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 32: 272–289.
- Gregory L. E., Mandava N. B. (1982). The activity and interaction of brassinolide and gibberellic acid in mung bean epicotyls. *Physiol. Plant.* 54: 239–243.
- Greider R. J., Osborne B. A. (1992). *Algal photosynthesis*. Chapman and Hall, New York.
- Grill E., Winnaker E.-L., Zenk M. H. (1985a). Phytochelatins, a class of heavy-metals-binding peptides from plants are functionally analogous to methallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 439–443.
- Grill E., Winnaker E.-L., Zenk M. H. (1985b). Phytochelatins: The principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674–676.
- Grove M. D., Spencer G. F., Rohwedder W. K., Mandava N., Worley J. F., Warthen Jr J. D., Steffens G. L., Flippen-Anderson J. L., Cook Jr J. C. (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281: 216–217.
- Gumiński S. (1990). *Fizjologia glonów i sinic*. Wyd. Uniw. Wroc., Wrocław.
- Gwóźdź E. A. (1996). Molekularne podstawy odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe. [W:] Barciszewski J., Łastowski K., Twardowski T. (red.). *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej*. Wyd. Sorus, Poznań, s. 469–492.
- Gwóźdź E. A., Przymusiński R., Rucińska R., Deckert J. (1997). Plant cell responses to heavy metals: molecular and physiological aspects. *Acta Physiol. Plant.* 19: 459–465.
- Hampp A. D., Lenzian K. (1974). Effect of lead ion on chlorophyll synthesis. *Naturwissenschaften* 61: 218–219.
- Harberer G., Kieber J. J. (2002). Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol.* 128: 354–362.
- Hare P. D., Cress W. A., van Staden J. (1997). The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regul.* 23: 79–103.
- Harmens H., Den Hartog P. R., Ten Bookum W. M., Verkleij J. C. A. (1993). Increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke is not due to increased production of phytochelatins. *Plant Physiol.* 103: 1305–1309.

- He R.-Y., Wang G.-J., Wang X.-S. (1991). Effect of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings. [W:] Cutler H. G., Yokota T., Adam G. (red.). *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications*. American Chemical Society, Washington, s. 220–230.
- He Z., Wang Z.-Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Ronald P., Chory J. (2000). Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BR11. *Science* 288: 2360–2363.
- Hellingwerf K. J., Hoff W. D., Crieleard W. (1996). Photobiology of microorganisms: how photosensors catch a photon to initialize signaling. *Mol. Microbiol.* 21: 683–693.
- Hetmann A., Kowalczyk S. (2004a). Roślinne receptory światła niebieskiego i UV-A pośredniczące w reakcjach fototropicznych, fotomorfogenezie i nastawianiu zegara biologicznego. *Post. Biol. Kom.* 31: 441–463.
- Hetmann A., Kowalczyk S. (2004b). Szlaki sygnałowe aktywowane przez fitochromy, roślinne receptory światła czerwonego i dalekiej czerwieni. *Post. Biol. Kom.* 31: 155–176.
- Hewitt B. R. (1958). Spectrophotometric determination of protein in alkaline solution. *Nature* 182: 4630.
- Holden M. J., Patterson G. W. (1982). Taxonomic implication of sterol composition in the genus *Chlorella*. *Lipids* 17: 215–219.
- Holzwarth A. R. (1991). Structure-function relationships and energy transfer in phycobiliprotein antennae. *Physiol. Plant.* 83: 518–528.
- Horvath D. P., Anderson J. V., Chao W. S., Foley M. E. (2003). Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci.* 8: 534–540.
- Hosono H., Uemura I., Takumi T., Nagamune T., Yasuda T., Kishimoto M., Nagashima H., Shimomura N., Natori M., Endo I. (1994). Effect of culture temperature shift on the cellular sugar accumulation of *Chlorella vulgaris* SO-26. *J. Ferment. Bioeng.* 78: 235–240.
- Hotta Y., Tanaka T., Bingshan L., Takeuchi Y., Konnai M. (1998). Improvement of cold resistance in rice seedlings by 5-aminolevulinic acid. *J. Pesticide Sci.* 23: 29–33.
- Hörtensteiner S. (1999). Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cell. Mol. Life Sci.* 56: 330–347.
- Hu Y., Boa F., Li J. (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induced pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24: 693–701.
- Hwang I., Sheen J. (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383–389.
- Iba K. (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 225–245.

- Ilangovan K., Salazar M., Dash S., Monroy O., Ramos A. (1992). Interaction of cadmium, copper and zinc in *Chlorella pyrenoidosa* Chick. Environ. Technol. 13: 195–199.
- Ivanova M., Todorov I., Pashankov P., Kostova L., Kaminek M. (1992). Estimation of cytokinins in the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. [W:] Kaminek M., Mok D. W. S., Zažimalová E. (red.). Physiology and biochemistry of cytokinins in plants. SPB Acad. Publ., The Hague, s. 483–485.
- Jablonski P. P., Anderson J. W. (1978). Light-dependent reduction of oxidised glutathione by ruptured chloroplasts. Plant Physiol. 61: 221–225.
- Jakubowska A. (2004). Mechanizmy regulacji poziomu IAA w roślinach. Wyd. UMK, Toruń.
- Kacperska A. (1995). Udział hormonów roślinnych w odpowiedzi roślin na stresowe czynniki środowiska. Kosmos 44: 623–637.
- Kacperska A. (2002). Reakcje roślin na abiotyczne czynniki stresowe. [W:] Kopcewicz J., Lewak S. (red.). Fizjologia roślin. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, s. 612–678.
- Kakimoto T. (2003). Biosynthesis of cytokinins. J. Plant Res. 116: 233–239.
- Kalimuthu K., Sivasubramanian R. (1990). Physiological effects of heavy metals on *Zea mays* (maize) seedlings. Indian J. Plant Physiol. 33: 242–244.
- Kaminek M., Mok D. W. S., Zázimalová Z. E. (red.). (1992). Physiology and biochemistry of cytokinins in plants. SPB Acad. Publ., The Hague.
- Kaminek M., Motyka V., Vaňkova R. (1997). Regulation of cytokinin content in plant cells. Physiol. Plant. 101: 689–700.
- Kamiya A. (1998). Signal transduction in blue-induced oxygen uptake in *Chlorella* cells. Physiol. Plant. 104: 50–55.
- Kampfenkel K., Van Montagu M., Inze D. (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. Anal. Biochem. 225: 165–167.
- 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.
- Katsumi M. (1985). Interaction of a brassinosteroid with IAA and GA₃ in the elongation of cucumber hypocotyl sections. Plant Cell Physiol. 26: 615–625.
- Katsumi M. (1991). Physiological modes of brassinolide action in cucumber hypocotyl growth. [W:] Cutler H. G., Yokota T., Adam G. (red.). Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications. American Chemical Society, Washington, s. 246–254.

- Kauschmann A., Jessop A., Koncz C., Szekeres M., Willimitzer L., Altmann T. (1996). Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant J.* 9: 701–713.
- Kawecka B., Eloranta P. V. (1994). *Zarys ekologii glonów wód słodkich i środowisk lądowych*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
- Kende H., Zeevaart J. A. D. (1997). The five „classical” plant hormones. *Plant Cell* 9: 1197–1210.
- Kessler E. (1986). Limits of growth of five *Chlorella* species in the presence of toxic heavy metals. *Arch. Hydrobiol.* 73: 123–128.
- Kevei E., Nagy F. (2003). Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiol. Plant.* 117: 305–313.
- Kim S.-K., Chang S. C., Lee E. J., Chung W.-S., Kim Y.-S., Hwang S., Lee J. S. (2000). Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize. *Plant Physiol.* 123: 99–1004.
- 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 brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 17: 2397–2412.
- Kim Y.-S., Kim T.-W., Chang S., Pharis R. P., Lee J. S., Han T.-J., Takatsuto S., Cheong H., Kim S.-K. (2006). Regulation of castasterone level in primary roots of maize, *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 127: 28–37.
- Kinoshita T., Cano-Delgado A., Seto H., Hiranuma S., Fujioka S., Yoshida S., Chory J. (2005). Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433: 167–171.
- Klahre U., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Yokota T., Nomura T., Yoshida S., Chua N.-H. (1998). The *Arabidopsis* *DIMINUTO/DWARF1* gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *Plant Cell* 10: 1677–1690.
- Knop W. (1865). Quantitative untersuchungen über die ernährungsprozesse der pflanzen. *Landwirtsch. Vers. Stn.* 7: 93–107.
- 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.
- Konstantinova O. V., Antonchick A. P., Oldham N. J., Zhabinskii V. N., Khripach V. A., Schneider B. (2001). Analysis of underivatized brassinosteroids by HPLC/APCI-MS. Occurrence of 3-epibrassinolide in *Arabidopsis thaliana*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 66: 1729–1734.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.). (2002). *Fizjologia roślin*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.

- Kopcewicz J., Tretyn A., Cymerski M. (1992). *Fitochrom i morfogeneza roślin*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
- Kowalczyk S., Hadowska E., Piekarska A. (2005). Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach, kluczowymi elementami hormonalnych szlaków sygnałowych. *Post. Bioch.* 51: 171–187.
- Krishna P. (2003). Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.* 22: 289–297.
- Krupa Z., Baszyński T. (1995). Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus – direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiol. Plant.* 17: 177–190.
- Kulaeva O. N., Burkhanova E. A., Fedina A. B., Khokhlova V. A., Bokebayeva G. A., Vorbrodth H. M., Adam G. (1991). Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultra-structure under stress conditions. [W:] Cutler H. G., Yokota T., Adam G. (red.). *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications*. American Chemical Society, Washington, s. 141–157.
- Kuyucak N., Volesky B. (1990). Biosorption by algal biomass. [W:] Volesky B. (red.). *Biosorption of heavy metals*. CRS Press, Boca Raton, s. 173–198.
- Kwak J. M., Nguyen V., Schroeder J. I. (2006). The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol.* 141: 323–329.
- Ladygin V. G. (2000). Biosynthesis of carotenoids in the chloroplasts of algae and higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 47: 796–814.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lam P. K. S., Wut P. F., Chan A. C. W., Wu R. S. S. (1999). Individual and combined effects of cadmium and copper on the growth response of *Chlorella vulgaris*. *Environ. Toxicol.* 14: 347–353.
- Lee C.-G., Palsson B. Ø. (1996). Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to red light from light-emitting diodes leads to autospore release following each cellular division. *Biotechnol. Prog.* 12: 249–256.
- Lee Y.-K., Tan H.-M., Hew C.-S. (1985). The effect of growth temperature on the bioenergetics of photosynthetic algal cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 555–561.
- Lewak S. (1995). Hormony roślinne – kierunki badań ostatniego dziesięciolecia. *Kosmos* 44: 601–622.
- Lewis S., Handy D., Cordi B., Billinghamurst Z., Depledge M. H. (1999). Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8: 351–368.
- Lexa M., Genkov T., Malbeck J., Macháčková I., Brzobohaty B. (2003). Dynamics of endogenous cytokinin pools in tobacco seedlings: a modelling approach. *Ann. Bot.* 91: 585–597.

- Leyser O. (2002). Molecular genetics of auxin signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 377–398.
- Li J. (2003). Brassinosteroids signal through two receptor-like kinases. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 494–499.
- Li J. (2005). Brassinosteroid signaling: from receptor kinases to transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 526–531.
- Li J., Chory J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929–938.
- Li J., Chory J. (1999). Brassinosteroid actions in plants. *J. Exp. Bot.* 50: 275–282.
- Li J., Jin H. (2007). Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends Plant Sci.* 12: 37–41.
- Li J., Nagpal P., Vitart V., McMorris T. C., Chory J. (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272: 398–401.
- Li L., van Staden J. (1998a). Effects of plant growth regulators in drought resistance of two maize cultivars. *South Afr. J. Bot.* 64: 116–120.
- Li L., van Staden J. (1998b). Effects of plant growth regulators on the antioxidant in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regul.* 24: 55–66.
- Li L., van Staden J., Jäger A. K. (1998). Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regul.* 25: 81–87.
- Lichtenthaler H. K. (2000). Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 785–789.
- Lin C. (2000). Plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* 5: 337–342.
- Liscum E., Hodgson D. W., Campbell T. J. (2003). Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins. So that's what the blue is all about. *Plant Physiol.* 133: 1429–1436.
- Lowry P. H., Rosebrough N. J., Furr A. L., Randall P. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Ludwig-Müller J. (2000). Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regul.* 32: 219–230.
- Ma J. F. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminium in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41: 383–390.
- Macfie S. M., Tarmohamed Y., Welbourn P. M. (1994). Effects of cadmium, cobalt, copper and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influence of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 454–458.

- Maeda S., Kusadome K., Arima H., Ohki A., Naka K. (1992). Biomethylation of arsenic and its excretion by the alga *Chlorella vulgaris*. *Appl. Organom. Chem.* 6: 407–413.
- Małecka A., Tomaszewska B. (2005). Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. *Post. Biol. Kom.* 32: 311–325.
- Mallick N. (2004). Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *J. Plant Physiol.* 161: 591–597.
- Mandava N. B., Sasse J. M., Yopp J. H. (1981). Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. II. Activity in selected gibberellin and cytokinin bioassays. *Physiol. Plant.* 53: 453–461.
- Mazur H., Konop A., Synak R. (2001). Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *J. Appl. Phycol.* 13: 35–42.
- Mazurek U. (1993). Changes of C18 fatty acids content in phospholipids of synchronously cultured *Chlorella vulgaris*. *Acta Biochim. Pol.* 40: 120–122.
- Mesmar M. N., Jaber K. (1991). The toxic effect of lead on seed germination, growth, chlorophyll and protein content. *Acta Biol. Hungarica.* 42: 331–334.
- Meuwly P., Thibault P., Schwan A. E., Rauser W. E. (1995). Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J.* 7: 391–400.
- Michalczuk L., Ribnicky D. M., Cooke T. J., Cohen J. D. (1992). Regulation of indole-3-acetic biosynthesis pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* 100: 1346–1353.
- Miernyk J. A. (1997). The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *Trends Plant Sci.* 2: 180–187.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405–410.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490–498.
- Mok D. W. S., Mok M. C. (2001). Cytokinins metabolism and actions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Biol.* 52: 89–119.
- Mok M. C., Martin R. C., Mok D. W. S. (2000). Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 36: 102–107.
- Mostowska A., Gwóźdź E. A. (1995). Reakcje aparatu fotosyntetycznego na stres oksydacyjny. *Post. Biol. Kom.* 22: 43–63.
- Mueller C., Schwender J., Zeidler J., Lichtenthaler H. K. (2000). Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 792–793.
- Mullineaux P. M., Karpinski S., Baker N. R. (2006). Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. *Plant Physiol.* 141: 346–350.

- Müssig C., Altmann T. (2003). Genomic brassinosteroid effects. *J. Plant Growth Regul.* 22: 313–324.
- Nakano Y., Asada K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in *Spinach* chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867–880.
- Napier R. M. (2001). Models of auxin binding. *J. Plant Growth Regul.* 20: 244–254.
- Napier R. M., David K. M., Perrot-Rechenmann C. (2002). A short history of auxin-binding proteins. *Plant Mol. Biol.* 49: 339–348.
- Neff M. M., Fankhause C., Chory J. (2000). Light: an indicator of time and place. *Gene Dev.* 14: 257–271.
- Nemhauser J. L., Mockler T. C., Chory J. (2004). Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* 2: 1460–1471.
- Nicolov N. N. (1997). Asynchronous nuclear and cell division as a natural biological process in unicellular green alga. *Endocytobiosis Cell. Res.* 12: 71–82.
- Nishikawa N., Toyama S., Shida A., Futatsuya F. (1994). The uptake and transport of ¹⁴C-labeled epibrassinolide in intact seedlings of cucumber and wheat. *J. Plant Res.* 107: 125–130.
- 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.
- Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Yoshida S., Yuan H., Feldmann K. A., Tax F. E. (1999). Brassinosteroid-insensitive dwarf mutant of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol.* 121: 743–752.
- Nomura T., Bishop G. J., Kaneta T., Reid J. B., Chory J., Yokota T. (2003). The *LKA* gene is a *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1* homolog of pea. *Plant J.* 36: 291–300.
- 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.
- Nomura T., Sato T., Bishop G. J., Kamiya Y., Takatsuto S., Yokota T. (2001). Accumulation of 6-deoxocathasterone and 6-deoxocastasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis. *Phytochemistry* 57: 171–178.
- Normanly J. (1997). Auxin metabolism. *Physiol. Plant.* 100: 431–442.
- Normanly J., Cohen J. D., Fink G. R. (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10355–10359.
- Noutoshi Y., Ito Y., Kanetani S., Fujie M., Usami S., Yamada T. (1998). Molecular anatomy of a small chromosome in the green alga *Chlorella vulgaris*. *Nucl. Acids Res.* 26: 3900–3907.

- Núñez M., Mazzafera P., Mazorra L. M., Siqueira W. J., Zullo M. A. T. (2003). Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. *Biol. Plant.* 47: 67–70.
- Ogbonna J. C., Tanaka H. (1996). Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/night cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 558–564.
- Oka A. (2003). New insights into cytokinins. *J. Plant Res.* 116: 217–220.
- Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R., Bechara E. J. H., Colepicolo P. (2001). Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40: 18–24.
- Özdemir F., Bor M., Demiral T., Türkan I. (2004). Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regul.* 42: 203–211.
- Park S.-H., Han K.-S., Kim T.-W., Shim J.-K., Takatsuto S., Yokota T., Kim S.-K. (1999). *In vivo* and *in vitro* conversion of teasterone to typhasterol in cultured cells of *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* 40: 955–960.
- Parks B. M. (2003). The red side of photomorphogenesis. *Plant Physiol.* 133: 1437–1444.
- Pawlik-Skowrońska B. (2002). Tajemnice odporności glonów i sinic na metale ciężkie. *Kosmos* 51: 175–184.
- Pawlik-Skowrońska B., Kaczorowska R., Skowroński T. (1997). The impact of inorganic tin on the planktonic cyanobacterium *Synechocystis aquatilis*: the effect of pH and humic acid. *Environ. Poll.* 97: 65–69.
- Pawlik-Skowrońska B., Kaczorowska R., Skowroński T. (1998). The impact of some organotins on the unicellular cyanobacterium *Synechocystis aquatilis*. *Oceanol. Stud.* 1: 79–90.
- Peng P., Li J. (2003). Brassinosteroid signal transduction: a mix of conservation and novelty. *J. Plant Growth Regul.* 22: 298–312.
- Piechalak A., Tomaszewska B. (2004). Rola związków tiolowych w roślinach w stresie wywołanym metalami ciężkimi. *Post. Biol. Kom.* 31: 717–733.
- Piotrowska A., Czerpak R. (2004). Molekularne mechanizmy działania cytokinin. *Post. Biol. Kom.* 31: 93–115.
- Pirson A., Lorenzen H. (1966). Synchronized dividing algae. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 17: 439–458.
- Podbielkowski Z. (1996). *Glony*. Wyd. WSiP, Warszawa.
- Porankiewicz J., Gwóźdź E. A. (1993). Białka szoku termicznego i ich rola w komórkach roślinnych. *Post. Biol. Kom.* 20: 155–170.

- Poskuta J. W., Parys E., Romanowska E. (1996). Toxicity of lead to photosynthesis, accumulation of chlorophyll, respiration and growth of *Chlorella pyrenoidosa*. Protective role of dark respiration. *Acta Physiol. Plant.* 18: 165–171.
- Pratt W. B., Krishna P., Olsen L. J. (2001). Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends Plant Sci.* 6: 54–58.
- Przymusiński R., Gwóźdź E. A. (1994). Increased accumulation of the 16×10^3 Mr polypeptide in lupin roots exposed to lead, copper and nitrate ions. *Environ. Exp. Bot.* 34: 63–68.
- Przymusiński R., Sychała M., Gwóźdź E. A. (1991). Inorganic lead changes, growth and polypeptide pattern of lupin roots. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 187: 51–57.
- Rachlin J. W., Grosso A. (1993). The growth response of the green alga, *Chlorella vulgaris* to combined divalent cation exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24: 16–20.
- Rai L. C., Gaur M. J., Po H. D. (1981). Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev.* 56: 99–151.
- Rai L. C., Raizada M., Mallick N., Yashmin-Husaini A., Singh A. K., Dubey S. K. (1990). Effects of four heavy metals on the biology of *Nostoc muscorum*. *Biol. Metals* 2: 229–234.
- Rakwal R., Agrawal G. K., Tamogami S., Yonekura M., Agrawal V. P., Iwahashi H. (2003). Novel insight into kinetin-inducible stress responses in rice seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 453–457.
- Rapparini F., Cohen J. D., Slovin J. P. (1999). Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Lemna gibba* studied using stable isotope labeled anthranilate and tryptophan. *Plant Growth Regul.* 27: 139–144.
- Rayle D. L., Cleland R. E. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99: 1271–1274.
- Rhoads D. M., Umbach A. L., Subbaiah C. C., Siedow J. N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signalling. *Plant Physiol.* 141: 357–366.
- Riefler M., Novak O., Strnad M., Schömlling T. (2006). *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* 18: 40–54.
- Roddick J. G. (1994). Comparative root growth inhibitory activity of four brassinosteroids. *Phytochemistry* 37: 1277–1281.
- Rodriguez-Concepción M., Boronat A. (2002). Elucidation of the methylerythriol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* 130: 1079–1089.

- Roitsch T., Balibrea M. E., Hofmann M., Proels R., Sinha A. K. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* 54: 513–524.
- Roshchina V. V. (2001). Neurotransmitters in plant life. Science Publ., Inc., Enfield, New Hampshire.
- Rucińska R., Waplak S., Gwóźdź E. A. (1999). Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 187–194.
- Rüegsegger A., Schmutz D., Brunold C. (1990). Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* 93: 1579–1584.
- Sagi M., Fluhr R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* 141: 336–340.
- Sakai N., Sakamoto Y., Kishimoto N., Chihara M., Karube I. (1995). *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. *Energy Convers. Mgmt.* 36: 693–696.
- Sakakibara H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 431–449.
- Sakurai A., Fujioka S., Saimoto H. (1991). Production of brassinosteroids in plant-cell cultures. [W:] Cutler H. G., Yokota T., Adam G. (red.). *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications*. American Chemical Society, Washington, s. 97–106.
- Salomé P. A., To J. P. C., Kieber J. J., McClung C. R. (2006). *Arabidopsis* response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. *Plant Cell* 18: 55–69.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. CSH Lab. Press, New York.
- Sandau E., Sandau P., Pulz O. (1996). Heavy metal sorption by microalgae. *Acta Biotechnol.* 16: 227–235.
- Sasse J. M. (1985). The place of brassinolide in the sequential response to plant growth regulators in elongating tissue. *Physiol. Plant.* 63: 303–308.
- Sasse J. M. (1990). Brassinolide-induced elongation and auxin. *Physiol. Plant.* 80: 401–408.
- Sasse J. M. (1991a). The case for brassinosteroids as endogenous plant hormones. [W:] Cutler H. G., Yokota T., Adam G. (red.). *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications*. American Chemical Society, Washington, s. 158–166.
- Sasse J. M. (1991b). Brassinolide-induced elongation. [W:] Cutler H. G., Yokota T., Adam G. (red.). *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications*. American Chemical Society, Washington, s. 255–264.

- Sayed O. H., El-Shahed A. M. (2000). Growth, photosynthesis and circadian patterns in *Chlorella vulgaris* (Chlorophytae) in response to growth temperature. *Cryptogamie, Algol.* 21: 283–290.
- Schat H., Kalf M. M. A. (1992). Are phytochelatins involved in differential metal tolerance or do they merely reflect metal-imposed strain? *Plant Physiol.* 99: 1475–1480.
- Schlaghaufer C. D., Artega R. N., Yopp J. H. (1984). A brassinosteroid-cytokinin interaction on ethylene production by etiolated mung bean segments. *Physiol. Plant.* 60: 347–350.
- Schumacher K., Chory J. (2000). Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 79–84.
- Schwender J., Gemünden C., Lichtenthaler H. K. (2001). Chlorophytae exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythriol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta* 212: 416–423
- Schwender J., Zeidler J., Gröner R., Müller C., Focke M., Braun S., Lichtenthaler F. W., Lichtenthaler H. K. (1997). Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytyl by higher plants and algae. *FEBS Lett.* 414: 129–134.
- Sharma A., Matsuoka M., Tanaka H., Komatsu S. (2001). Antisense inhibition of a BRI1 receptor reveals additional protein kinase signaling components downstream to the perception of brassinosteroids in rice. *FEBS Lett.* 507: 346–350.
- Shen H., Lee Y. K. (1997). Thermotolerance induced by heat shock in *Chlorella*. *J. Appl. Phycol.* 9: 471–475.
- Shubert L. E. (1984). *Algae as ecological indicators*. Academic Press, London.
- Singh I., Shono M. (2005). Physiological and molecular effect of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato. *Plant Growth Regul.* 47: 111–119.
- Slaveykova V. I., Wilkinson K. J. (2003). Effect of pH on Pb biouptake by the freshwater alga *Chlorella kesslerii*. *Environ. Chem. Lett.* 1: 185–189.
- Słowik D. (1999). Wpływ ołowiu na fotosyntezę. *Wiad. Bot.* 43: 41–49.
- Smirnoff N. (red.). (1995). *Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation*. BIOS Sci. Publ. Ltd., Oxford.
- Somogyi M. (1954). Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19–23.
- Stanisz A. (1998). *Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA PL na przykładach z medycyny*. Wyd. StatSoft, Kraków.
- Stiborova M., Doubrovova M., Brezinova A. (1986). Effect of heavy metals ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Photosynthetica* 20: 418–425.

- Stirk W. A., Novák O., Strnad M., van Staden J. (2003). Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regul.* 41: 13–24.
- Stirk W. A., van Staden J. (2003). Occurrence of cytokinin-like compounds in two aquatic ferns and their exudates. *Environ. Exp. Bot.* 49: 77–85.
- Stroiński A., Kozłowska M. (1997). Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. *Acta Soc. Bot. Pol.* 66: 189–195.
- Suárez-López P., Coupland G. (1998). Plants see the blue light. *Science* 279: 1323–1324.
- Sung D.-Y., Kaplan F., Lee J.-J., Guy C. L. (2003). Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci.* 8: 179–187.
- Suzuki H., Fujioka S., Takatsuto S., Yokota T., Murofushi N., Sakurai A. (1993). 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. (1995b). 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. (1995a). 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.
- Synková H., Semorádová Š., Burketová L. (2004). High content of endogenous cytokinins stimulates activity of enzymes and proteins involved in stress response in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 79: 169–179.
- Szekeres M., Nemeth K., Koncz-Kalman Z., Mathur 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 de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85: 171–182.
- Takamura N., Hatakeyama S., Sugaya Y. (1990a). Seasonal changes in species composition and production of periphyton in a urban river running through an abandoned copper mining region. *Jpn. J. Limnol.* 51: 225–235.
- Takamura N., Kasai F., Watanabe M. M. (1989). Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *J. Appl. Phycol.* 1: 39–52.

- Takamura N., Kasai F., Watanabe M. M. (1990b). Unique response of *Cyanophyceae* to copper. *J. Appl. Phycol.* 2: 293–296.
- Takatsuto S. (1994). Brassinosteroids: distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 658: 3–15.
- Takatsuto S., Abe H., Gamoh K. (1990). Evidence for brassinosteroids in strobilus of *Equisetum arvense* L. *Agric. Biol. Chem.* 54: 1057–1059.
- Takeno K., Pharis R. P. (1982). Brassinosteroid-induced bending of the leaf lamina of dwarf rice seedlings: an auxin-mediated phenomenon. *Plant Cell Physiol.* 23: 1275–1281.
- Tewari R. K., Kumar P., Sharma P. N. (2006). Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. *Planta* 223: 1145–1153.
- Thümmler F., Rüdiger W. (1984). Chromophore structure in phytochrome intermediates and bleached forms of phytochrome. *Physiol. Plant.* 60: 378–382.
- Tolbert N. E. (1997). The C₂ oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48: 1–25.
- Tretyn A., Wiśniewska J. (1999). Budowa, właściwości i mechanizm działania kryptochromów – eukariotycznych fotoreceptorów światła niebieskiego. *Post. Biol. Kom.* 26: 343–358.
- Tukendorf A. (1993). The role of glutathione in detoxification of cadmium and excess copper in spinach plants. *Acta Physiol. Plant.* 15: 175–183.
- Tukendorf A., Rauser W. E. (1990). Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Sci.* 70: 155–166.
- Vílchez C., Garbayo I., Lobato M. V., Vega J. M. (1997). Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme Microb. Technol.* 20: 562–572.
- Vert G., Chory J. (2006). Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* 441: 96–100.
- Vert G., Nemhauser J. L., Geldner N., Hong F., Chory J. (2005). Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 177–201.
- Vögeli-Lange R., Wagner G. J. (1990). Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 92: 1086–1083.
- Volesky B. (red.). (1990). Biosorption of heavy metals. CRC Press, Boca Raton.
- Wakasugi T., Nagai T., Kapoor M., Ssugita M., Ito M., Ito S., Tsudzuki J., Nakashima K., Tsudzuki T., Suzuki Y., Hamada A., Ohta T., Inamura A., Yoshinaga K., Sudiura M. (1997). Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Plant Biol.* 94: 5967–5972.

- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244–252.
- Wang X., Chory J. (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BK11, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* 313: 1118–1122.
- Wang X., Goshe M. B., Soderblom E. J., Phinney B. S., Kuchar J. A., Li J., Asami T., Yoshida S., Huber S. C., Clouse S. D. (2005). Identification and functional analysis of *in vivo* phosphorylation sites of the *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell* 17: 1685–1703.
- Wang Z.-Y., He J.-X. (2004). Brassinosteroid signal transduction – choices of signals and receptors. *Trends Plant Sci.* 9: 91–96.
- Wellburn A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307–313.
- Weyers J. D. B., Paterson N. W. (2001). Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytol.* 152: 375–407.
- Wilde E. W., Benemann J. R. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnol. Adv.* 11: 781–812.
- 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.
- Wilson K. E., Król M., Huner N. P. A. (2003). Temperature-induced greening of *Chlorella vulgaris*. The role of the cellular energy balance and zeaxanthin-dependent nonphotochemical quenching. *Planta* 217: 616–627.
- Woeste K. E., Vogel J. P., Kieber J. J. (1999). Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 105: 478–484.
- Wong S. L., Nakamoto L., Wainwright J. F. (1997). Detection of toxic organo-metallic complexes in wastewaters using algal assays. *Arch. Environ. Contam. Toxic.* 32: 358–366.
- Wong S. L., Nakamoto L., Wainwright J. F. (1994). Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of wastewaters. *J. App. Phycol.* 6: 405–414.
- Woźny A. (red.). (1995). Ołów w komórkach roślinnych. Pobieranie – reakcje – odporność. Wyd. Sorus, Poznań.
- Yi H. C., Joo S., Nam K. H., Lee J. S., Kang B. G., Kim W. T. (1999). Auxin and brassino-steroid differentially regulate the expression of three members of the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Mol. Biol.* 41: 443–454.

- Yokota T. (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* 2: 137–143.
- Yokota T., Higuchi K., Kosaka Y., Takahashi N. (1992). Transport and metabolism of brassinosteroids in rice. [W:] Karssen C. M., Van Loon L. C., Vereugdenhil D. (red.). *Progress in Plant Growth Regulation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 298–305.
- Yokota T., Kim S. K., Fukui Y., Takahashi N., Takeuchi Y., Takematsu T. (1987). Brassinosteroids and sterols from a green alga, *Hydrodictyon reticulatum*: configuration at C-24. *Phytochemistry* 26: 503–506.
- Yokota T., Nomura T., Kitasaka Y., Takatsuto S., Reid J. B. (1997). Biosynthetic lesions in brassinosteroid-deficient pea mutants. *Proc. Plant Growth Reg. Soc. Am.* 24: 94.
- 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., Sato T., Takeuchi Y., Nomura T., Uno K., Watanabe T., Takatsuto S. (2001). Roots and shoots of tomato produce 6-deoxo-28-cathasterone, 6-deoxo-28-nortyphasterol and 6-deoxo-28-norcastasterone, possible precursors of 28-norcastasterone. *Phytochemistry* 58: 233–238.
- Yopp J. H., Mandava N. B., Sasse J. M. (1981). Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. I. Activity in selected auxin bioassays. *Physiol. Plant.* 53: 445–452.
- Zhang W., Yamane H., Takahashi N., Chapman D. J., Phinney B. O. (1989). Identification of a cytokinin in the green alga *Chara globularis*. *Phytochemistry* 28: 337–338.
- Zhang X.-P., Glase E. (2002). Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.* 7: 14–21.
- Zielińska E., Kowalczyk S. (2000). Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego. *Post. Biol. Kom.* 27: 155–184.
- Zurek D. M., Clouse S. D. (1994). Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiol.* 104: 161–170.
- Zych M., Burczyk J. (1998). Glony źródłem substancji biologicznie czynnych. *Wiad. Ziel.* 4: 11–12.