

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Jan Ráček

Akumulace fenolických látek u řasy *Spirogyra* ve stresových podmínkách

Accumulation of phenolic compounds in *Spirogyra* in stress conditions

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Martina Pichrtová, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 4. 2022

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych rád předně poděkoval mé školitelce RNDr. Martině Pichrtové, Ph.D., která mě celou diplomovou prací provázela, poskytla mi řadu cenných rad a tipů pro její zdárné dokončení a rovněž byla hlavním zprostředkovatelem mé zahraniční stáže. Tímto bych rád vyjádřil svůj dík i Dr. Danielu Remiasovi za pomoc s analýzou vzorků prostřednictvím HPLC a také za jeho velmi přívětivý přístup, díky kterému mi mohla být zahraniční stáž velkým znalostním přínosem.

Můj velký dík patří rovněž doc. RNDr. Peteru Mojzešovi, CSc. z Fyzikálního ústavu MFF UK za pomoc s vyhodnocením naměřených dat z Ramanovy spektroskopie, zkontrolování textu týkajícího se její metodiky a veškeré podnětné připomínky ohledně této problematiky. Janě Pilátové bych rád poděkoval za zasvěcení do tajů Ramanovy spektroskopie a za podnětné diskuze, které vedly k odhalení Ramanova signálu náležícímu fenolickým látkám.

V neposlední řadě bych moc rád poděkoval mé přítelkyni a rodičům za kontrolu částí textu a veškerou psychickou podporu, kterou mi při psaní této práce poskytli.

Abstrakt

Fenolické látky představují jednu z velkých skupin sekundárních metabolitů vyšších rostlin, které hrají roli v celé řadě interakcí s biotickým a abiotickým prostředím. Mezi řasovými skupinami produkují tyto látky mimo jiné spájkivé řasy (*Zygnematophyceae*), které jsou v současné době považované za nejbližší žijící příbuzné vyšším rostlinám. Společnou funkcí fenolických látek je ochrana před škodlivými účinky ultrafialového záření, případně i přebytečnou mírou fotosynteticky aktivního záření, což bylo podpořeno i indukcí jejich syntézy po expozici UV záření v několika ekofyziologických studiích. Šíře aplikovaných stresových faktorů a jejich efekt na změny v hladině fenolů jsou však omezené. V této diplomové práci byl rod *Spirogyra*, u kterého je známá chemická struktura řady konkrétních fenolických látek, vystaven vybraným stresovým faktorům a sledován jejich vliv na morfologii buněk, maximální kvantový výtěžek F_v/F_m a kvantitu fenolických látek. Signifikantní nárůst byl zaznamenán po aplikaci UV-B záření, vyšší míry PAR, nízké teploty a osmotického stresu, zatímco u vysoké teploty tento efekt nebyl patrný. Zvýšená produkce při expozici UV-B dále podtrhuje důležitý význam fenolických látek v ochraně před tímto typem stresu u spájkivých řas, zatímco v případě ostatních stresových podmínek mohou fenoly zastávat podpůrnou antioxidantivní roli. Rovněž byl pozorován signifikantní nárůst molární koncentrace fenolických látek s přibývajícím stářím kultury a podpořen signifikantně vyšší hladinou fenolů při kultivaci bez zdroje dusíku. Pomocí konfokální Ramanovy spektroskopie bylo rovněž možné určit homogenní distribuci fenolických látek uvnitř buňky, která s podporou transmisní elektronové mikroskopie poukazuje na lokalizaci fenolů uvnitř velké, centrální vakuoly. V této práci byla poprvé ke kvantifikaci změn fenolických látek využita konfokální Ramanova spektroskopie, která umožňuje určit molární koncentraci fenolů přímo na buněčné úrovni.

Klíčová slova: fenolické látky, stresové faktory, *Spirogyra*, *Zygnematophyceae*, fluorescence chlorofylu, vakuola, Ramanova spektroskopie, kyselina gallová, kyselina tříslová

Abstract

Phenolic substances represent one of the major groups of secondary metabolites of higher plants that play a role in a number of biotic and abiotic interactions. Among algal groups, these substances are produced, for example, by conjugating algae (Zygnematophyceae), which are currently considered to be the closest living relatives of higher plants. The common function of phenolic substances is protection against the harmful effects of ultraviolet radiation, or even an excessive amount of photosynthetically active radiation, which was supported by the induction of their synthesis after exposure to UV radiation in several ecophysiological studies. However, the range of applied stress factors and their effect on changes in phenol levels is limited. In this diploma thesis, the genus *Spirogyra*, for which the chemical structure of a number of specific phenolic substances is known, was exposed to selected stress factors and their influence on cell morphology, maximum quantum yield F_v/F_m and quantity of phenolic substances was monitored. A significant increase was observed after application of UV-B radiation, higher level of PAR, low temperature and osmotic stress, while at high temperature this effect was not evident. Increased production upon UV-B exposure further underlines the importance of phenolic substances in protecting against this type of stress in conjugating algae, while in other stressful conditions, phenols may play a supporting antioxidant role. A significant increase in the molar concentration of phenolics was also observed with increasing age of the culture and supported by significantly higher levels of phenols when culturing without a nitrogen source. Using confocal Raman spectroscopy, it was also possible to determine a homogeneous distribution of phenolic substances within the cell, which, with the support of transmission electron microscopy, indicates the localization of phenols within a large, central vacuole. In this work, confocal Raman spectroscopy was used for the first time to quantify changes in phenolic substances, which allows to determine the molar concentration of phenols directly at the cellular level.

Key words: phenolic substances, stress factors, *Spirogyra*, Zygnematophyceae, chlorophyll fluorescence, vacuole, Raman spectroscopy, gallic acid, tannic acid

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Základní charakteristika třídy Zygnematophyceae.....	2
1.2 Molekulární fylogeneze třídy Zygnematophyceae se zaměřením na tradiční řád Zygnematales..	3
1.3 Rod Spirogyra.....	4
1.3.1 Tradiční taxonomie rodu a asociované problémy.....	5
1.3.2 Molekulární taxonomie rodu	6
1.4 Fenolické látky u třídy Zygnematophyceae	7
1.4.1 Chemická struktura a syntéza	7
1.4.2 Lokalizace v rámci buněk.....	10
1.4.3 Fotoprotektivní role	11
1.4.4 Specifické funkce	13
1.4.5 Potenciální funkce	14
1.4.6 Způsoby stanovení.....	14
1.4.6.1. Metoda Folin–Ciocalteu	15
1.4.6.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	15
1.4.6.3. Ramanova spektroskopie.....	16
2. Cíle práce.....	19
3. Metodika.....	20
3.1 Odběrová lokalita, izolace a kultivace.....	20
3.2 Světelná a fluorescenční mikroskopie	21
3.3 Elektronová mikroskopie	21
3.4 Genetická charakterizace.....	22
3.5 Experimentální design.....	24
3.5.1 Vliv stáří kultury na kvantitu fenolických látek	24
3.5.1.1. Průběžné stanovení koncentrace fenolických látek u jedné kultury	24
3.5.1.2. Porovnání obsahu fenolických látek mezi mladými a starými kulturami.....	25
3.5.2 Vliv stresových faktorů na koncentraci fenolických látek	25
3.6 Fluorescence chlorofylu	26
3.7 Stanovení kvantity fenolických látek	27
3.7.1 Ramanova spektroskopie.....	27
3.7.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	28
3.7.3 Folin–Ciocalteuova metoda.....	30
4. Výsledky.....	31
4.1 Vegetativní a generativní morfologie.....	31
4.2 Buněčná ultrastruktura	32
4.3 Genetická charakteristika	33

4.4 Chemická kompozice buněk.....	34
4.5 Postupné stárnutí buněk a jeho vliv na kvantitu fenolických látek	36
4.6 Rozdíl v kvantitě fenolických látek mezi mladými a starými kulturami.....	39
4.7 Stresové podmínky a jejich vliv na koncentraci fenolických látek	41
4.7.1 Vysokoteplotní stres	41
4.7.2 Nízkoteplotní stres.....	41
4.7.3 Světelný stres.....	42
4.7.4 Osmotický stres	42
4.7.5 Stres z UV-B záření.....	42
4.7.6 Absence dusíku.....	43
5. Diskuze.....	46
5.1 Identifikace kmene a vznik zygospor.....	46
5.2 Využití Ramanovy spektroskopie ke kvantifikaci a lokalizaci fenolických látek.....	47
5.3 Vliv stáří buněk na obsah a koncentraci fenolických látek	49
5.4 Vliv stresových faktorů na koncentraci fenolických látek	51
6. Závěr.....	54
7. Seznam použité literatury.....	56

1. Úvod

Fenolické látky představují obsáhlou a různorodou skupinu sekundárních metabolitů, které jsou rozšířené a dobře prozkoumané především u cévnatých rostlin. Jejich společným znakem je přítomnost alespoň jedné fenolové skupiny, kde je hydroxylová funkční skupina vázána k aromatickému benzenovému jádru. V současnosti je známo, že u rostlin figurují v celé řadě interakcí jak s biotickým, tak abiotickým prostředím. Notoricky známá je například funkce antokyanů, které jsou zodpovědné za modré, růžové nebo fialové zbarvení květů a plodů mnoha rostlin, čímž slouží jako atraktanty pro opylovače a šířitele semen (Taiz & Zeiger, 2006). Některé typy flavonoidů se akumulují v epidermálních buňkách listů a stonků za účelem ochrany aktivně fotosyntetizujících buněk ve spodních vrstvách před ultrafialovým (UV) zářením (Rozema et al., 2002). Jiné mají antioxidantní, antimikrobiální nebo alelopatické účinky, případně látky tríslovinového (taninového) charakteru odpuzují býložravce tím, že činí danou část rostliny chuťově nahořklou až svíravě trpkou (například nezralé plody před dozráním semen) (Haslam, 2007; Taiz & Zeiger, 2006).

Metabolity fenolické povahy jsou však přítomné i u některých skupin řas. Z chemického a funkčního hlediska jsou nejvíce prostudované florotaniny u chaluž (Phaeophyceae), kterým je věnována intenzivní pozornost již od 70. let 20. století a o nichž jsou informace shrnuté v mnoha přehledových člancích (např. Imbs & Zvyagintseva, 2018; Schoenwaelder, 2002, 2008). Naopak doposud velmi malému zájmu se těší kumariny u členů chlorofytí linie Dasycladaceae (Ulvophyceae), které jsou výhradně mořskou skupinou řas subtropických a tropických moří (Hartmann et al., 2018; Pérez-Rodríguez et al., 2003). Florotaniny i kumariny jsou podobně jako flavonoidy syntetizovány jako UV protektanty (Gómez et al., 1998; Pavia et al., 1997; Pérez-Rodríguez et al., 1998, 2003; Rozema et al., 2002; Schoenwaelder, 2002b), ale v kontrastu s nimi zastávají i další role, které se pojí se samotným vývojem a přežitím organismu (Schoenwaelder, 2008; Welling et al., 2011). Zygnematophyceae pak představuje třetí skupinu, která je v kontrastu s předešlými skupinami řas výhradně sladkovodní či semiterestrická (Hall & McCourt, 2017). Její součástí je i rod *Spirogyra*, modelový organismus této práce.

V úvodu je nejprve stručně charakterizována třída Zygnematophyceae a nastíněn současný stav poznání týkající se vnitřních fylogenetických vztahů v rámci tradičního řádu Zygnematales. Následně je představen samotný rod *Spirogyra*. Další část se věnuje problematice fenolických látek u Zygnematophyceae, s důrazem na jejich chemickou strukturu

a roli v ekologii daných zástupců. Nakonec jsou představeny tři způsoby kvantifikace fenolických látek, které byly v této práci využity.

1.1 Základní charakteristika třídy Zygnematophyceae

Třída Zygnematophyceae, česky spájkivé řasy, je monofyletickou skupinou zelených řas (Viridiplantae) v rámci linie Streptophyta. V současnosti převládá názor, že představují nepřibuznější žijící linii k vyšším rostlinám, skupině Embryophyta (Cheng et al., 2019; de Vries & Archibald, 2018; Wickett et al., 2014; Wodniok et al., 2011). Zygnematophyceae vyniká nejen svojí druhovou bohatostí, ale také z hlediska morfologické a ekologické variability. Zahrnuje především jednobuněčné a vláknité zástupce vyskytující se ve sladkovodním prostředí s neutrálním až kyselým pH, ale také v extrémních biotopech jako jsou periodicky vysychavé tůňky, borka stromů, půdní krusty nebo povrchy ledovců (Busch & Hess, 2022; Holzinger et al., 2009; Hoppert et al., 2004; McCourt et al., 1986; Williamson et al., 2019).

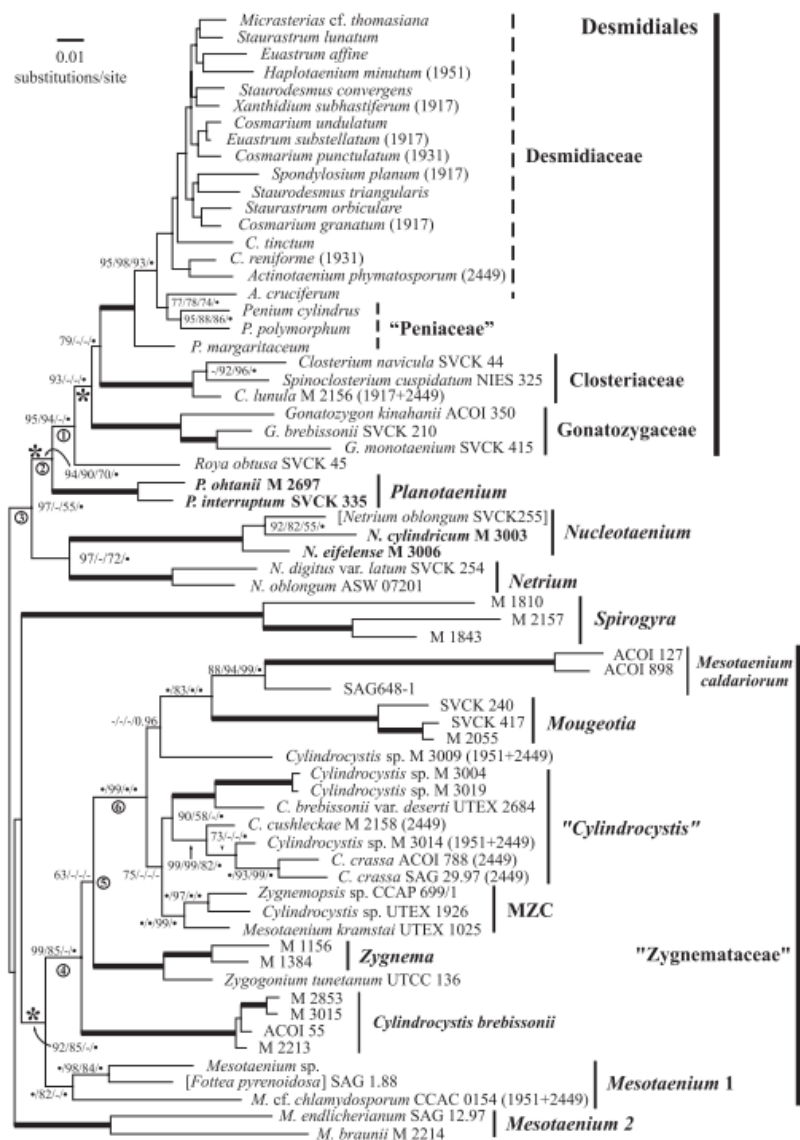
Pro všechny zástupce náležící do skupiny Zygnematophyceae je charakteristická kompletní absence bičíkatých stádií včetně centrozomů, což se promítá do jejich unikátního způsobu pohlavního rozmnožování, které se nazývá spájení (konjugace). Při tomto procesu, kterému předchází feromonová komunikace (Tsuchikane & Sekimoto, 2019), se buňky vzájemně spojují pomocí konjugačního kanálku. U vláknitých zástupců se takto propojí celá řada protilehlých buněk v paralelně uspořádaných vláknech, čímž vzniká struktura připomínající žebřík, odtud název skalariformní (žebříčková) konjugace. Následně jeden, případně oba protoplasty, které zde vystupují jako gamety, migrují amébovitým pohybem skrz vzniklý kanálek a splývají, v prvním případě v jedné z mateřských buněk (gametangiu), nebo uprostřed konjugačního kanálku (Graham et al., 2016; Hall & McCourt, 2017; Kadłubowska, 1984). Výsledkem je diploidní zygota, která se diferencuje v dormantní zygosporu se silnou stěnou, jejíž střední vrstva, zvaná mesospora, obsahuje rezistentní algenanový polymer (Pouličková et al., 2007; De Vries et al., 1983). Zygospory mají různý tvar, mohou být různě ornamentované, skulpturované a nejčastěji bývají zbarvené do hněda, oranžovohněda nebo dokonce do modra. Všechny tyto znaky jsou velmi důležité pro determinaci druhů a bez jejich přítomnosti identifikace není možná (Kadłubowska, 1984; Schagerl & Zwirn, 2015; Stancheva et al., 2012, 2013). V zygospoře pak dochází k meiotickému dělení a po přečkání nepříznivých podmínek zygospora praská a uvolňuje 1–4 nové jedince. V případě vláknitých rodů ze zygospory klíčí zpravidla jediné vlákno. Kromě skalariformní konjugace může u vláknitých rodů docházet i k vzácnější laterální (boční) konjugaci, při níž se vytváří konjugační kanálky mezi sousedními buňkami v rámci jednoho vlákna. Nepohlavně se spájkivky rozmnožují buď

prostým rozdělením na dvě dceřiné buňky (jednobuněční zástupci) nebo fragmentací vláken. Některé jsou rovněž schopné tvorby specializovaných buněk, které mají odolnou stěnu analogickou k pohlavně vzniklým zygosporám (Graham et al., 2016; Hoshaw & McCourt, 1988; Kadłubowska, 1984).

1.2 Molekulární fylogeneze třídy Zygnematophyceae se zaměřením na tradiční řád Zygnematales

Klasifikace spájkivek byla v tradičním pojetí založena na morfologických znacích, především typu buněčné organizace (jednobuněčnost, vláknitost), tvaru chloroplastu, strukturních detailech buněčné stěny a symetrii buněk. Podle ultrastruktury buněčné stěny byla třída Zygnematophyceae členěna do dvou řádů – 1) Desmidiales (krásivky) se 4 čeleděmi a 2) Zygnematales (jařmatky), která zahrnovala čeleď Mesotaeniaceae (tzv. nepravé krásivky)

Obr. 1: Fylogeneze třídy Zygnematophyceae detailněji vyobrazující vztahy mezi liniemi tradičního řádu Zygnematales. Strom je konstruovaný na základě konkatenovaného data setu složeného z jaderného genu SSU rDNA a dvou chloroplastových – LSU rDNA a *rbcl* (ML topologie). Čísla nad jednotlivými větvemi odpovídají bootstrapovým hodnotám (BP) pro metody ML (maximum likelihood), NJ (neighbour joining) a MP (maximum parsimony), případně posteriorní pravděpodobnosti (PP) pro metodu BI (Bayesian inference). Tučně zvýrazněné větve získaly 100 % ve všech metodách, resp. 1,00 PP pro BI. Plné kolečko indikuje nejvyšší možnou hodnotu v příslušné metodě, pomlčky méně než 50 % (BP), případně méně než 0,95 (PP). Převzato ze studie Gontcharov & Melkonian (2010).



s jednobuněčnými zástupci a Zygnemataceae s vláknitými (Gontcharov, 2008, Hall & McCourt, 2017).

V molekulárně fylogenetických analýzách vytváří Desmidiales skutečně monofyletickou a odvozenou skupinu v rámci spájkivých řas, zatímco Zygnematales jsou parafyletickým uskupením několika linií, v němž jsou jednobuněční a vláknití zástupci vzájemně promíchání, což činí z tradičně definovaných čeledí Mesotaeniaceae a Zygnemataceae umělé skupiny (Gontcharov & Melkonian, 2010; Gontcharov et al., 2003, 2004; Hall et al., 2008; McCourt et al., 2000). Nejběžnější vláknité spájkivky (*Spirogyra*, *Mougeotia*, *Zygnema*) tvoří monofyletické, byť vzájemně blíže nepříbuzné linie, zatímco nepravé krásivky rodu *Mesotaenium* a *Cylindrocystis* jsou silně polyfyletické (Barcytė et al., 2020; Busch & Hess, 2022; Gontcharov & Melkonian, 2010; Procházková et al., 2021). Od počátku nového tisíciletí byla publikována řada studií zabývajících se taxonomickou revizí skupiny Zygnematophyceae a jejích příslušných rodů, které vedly k definování několika zcela nových cladů v rámci Zygnematales (Obr. 1) (Garduño-Solórzano et al., 2020; Gontcharov & Melkonian, 2010; Hall et al., 2008; Procházková et al., 2021; Stancheva et al., 2014). I přes to, že stále nad mnoha fylogenetickými vztahy visí velký otazník, jsou tyto studie jasným dokladem, že fylogeneze řádu Zygnematales je mnohem komplexnější, než byla tradiční morfologií předpokládána.

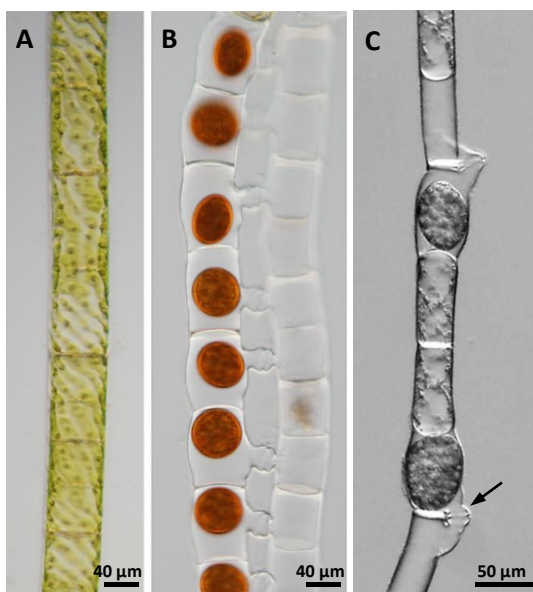
1.3 Rod *Spirogyra*

Spirogyra (Obr. 2), českým názvem šroubatka, je jednou z nejběžnějších vláknitých spájkivek. Mikroskopicky je to velmi dobře rozpoznatelný rod díky přítomnosti jednoho či několika (až 15) stužkovitých, spirálně stočených chloroplastů v každé buňce, které na rozdíl od plastidů ostatních vláknitých rodů (*Mougeotia*, *Zygnema*) zaujímají parietální pozici. V chloroplastech se nachází několik pyrenoidů, jež jsou dobře pozorovatelné díky zásobnímu škrobu, který se ukládá na jejich periferii. Relativně velké jádro je umístěné nejčastěji v centrální části buňky, zavěšené na cytoplasmatických provazcích, případně cytoplasmatickém můstku, jež jej spojují s kortikální



Obr. 2: *Spirogyra* sp. se dvěma spirálovitými plastidy a dobře viditelným jádrem uloženým v centru každé buňky. Od jádra pak vybíhají provazce cytoplasmy, které protínají objemnou vakuolu, dominantní strukturu buňky. Převzato z Graham et al. (2016).

vrstvou cytoplasmy. Velkou část buňky pak vyplňuje velká vakuola. Pohlavně se rozmnožuje skalariformní (Obr. 3B) či laterální konjugací (Obr. 3C), při nichž vzniká dormantní zygospora vždy jedné z mateřských buněk, nikoliv v konjugačním kanálku (Graham et al, 2016; Kadłubowska, 1984). *Spirogyra* je rozšířená kosmopolitně na všech kontinentech ve sladkovodních stojatých i mírně tekoucích vodách s širokým rozmezím konduktivity a neutrálním až mírně kyselém pH, zatímco v kyseljším prostředí (~ pod 5) ji nahrazují ostatní vláknité spájkivky (McCourt et al., 1986; Simons & van Beem, 1990; Stancheva et al., 2013). Často vytváří zelené, slizké nárosty nebo chomáče propletené mezi vodními rostlinami, spadlými větvemi či většími kameny. Někdy jsou pozorovatelné i celé nárosty této řasy volně plovoucí na hladině díky bublinám plynů zachycených v nárostu, jež vznikají činností fotosyntézy. Takové populace společně s populacemi z vysokohorských oblastí jsou vystaveny během vegetační sezóny vysokým denním dávkám slunečního záření, vysokým teplotám a rychlému úbytku živin včetně dusíkatých zdrojů (Hillebrand, 1983). *Spirogyra* přechází nepříznivé podmínky prostředí, tj. nízké teploty, případně nedostatek vody a živin, ve formě odolných zygospor, případně jiných specializovaných buněk, ale v některých případech může přežít mírné zimní období ve vegetativním stavu (Simons & van Beem, 1990).



Obr. 3: (A) *Spirogyra majuscula* ve svém vegetativním stavu a (B) vlákna, která prošla skalariformní konjugací. Protilehlé buňky jsou spojené konjugačními kanálky, přes které došlo k migraci "samčí" gamety. Zygospory s tlustou buněčnou stěnou vznikají u rodu *Spirogyra* vždy v mateřském gametangiu. Podle Takano et al. (2019). (C) Laterální konjugace u *S. castanacea*, při níž se spojují bočně utvářeným kanálkem dvě sousední buňky v rámci jednoho vlákna (šipka). Jejím produktem je zygospora se stejnými morfologickými znaky jako v případě skalariformní konjugace. Podle Ikegaya et al. (2012).

1.3.1 Tradiční taxonomie rodu a asociované problémy

V kontrastu se snadnou identifikací na úrovni rodu je druhová determinace velmi komplikovaná a doprovází ji celá řada problémů. Jedním z nich je vysoký počet tradičně popsaných druhů. Poslední velká monografie Kadłubowska (1984) čítá téměř 400 morfologicky definovaných druhů rodu *Spirogyra* včetně fylogeneticky neoddělitelného rodu *Sirogonium* (Stancheva et al., 2013; Takano et al., 2019), což z této linie činí druhově nejbohatší rod v rámci

vláknitých Zygnemataceae. Mezi nejdůležitější identifikační znaky náleží: šířka vláken, charakter příčných přepážek mezi buňkami, počet chloroplastů, jejich ornamentace a počet otáček na buňku a všechny znaky spojené s pohlavním rozmnožováním. Jedná se především o charakter gametangií, konjugačních kanálků a znaky spojené se zygosporami – jejich velikost, tvar, barva, počet vrstev a ornamentace mesospor, případně i vnější exospory (Kadłubowska, 1984). Bez přítomnosti generativních znaků přesná identifikace není možná. Tato zmíněná absolutní závislost představuje velkou překážku při určování, protože konjugující vlákna se zralými zygosporami se v přírodních populacích nacházejí poměrně zřídka (McCourt et al., 1986; Schagerl & Zwirn, 2015; Sherwood et al., 2018; Stancheva et al., 2013) a laboratorní experimenty indukující pohlavní rozmnožování se zatím shledávají s nepříliš velkou úspěšností, která zatím není dobře vysvětlená (Sherwood et al., 2018; Simons et al., 1984; Takano et al., 2020; Zwirn et al., 2013).

Další komplikací je, že řada znaků vykazuje nezanedbatelnou míru plasticity. Ve studii Schagerl & Zwirn (2015) a Pouličková et al. (2007) je v tomto ohledu poukazováno na nespolehlivost šířky vláken, tvaru a velikosti zygospor a míry zvětšení mateřského gametangia. Naopak za stabilní znaky považují charakter příčných přepážek, typ konjugace a zejména ornamentaci zygospor. Určitá variabilita v některých znacích může být spojená s existencí polyploidních druhových komplexů, které vznikají spontánní autopolyploidizací jak během vegetativního cyklu, tak při pohlavním rozmnožování (McCourt & Hoshaw, 1990). Bylo zjištěno, že vyšší stupeň euploidie vede k signifikantně širším typům vláken (tzv. morfotypům) a tento jev byl prokázán i v přírodních populacích (Hoshaw et al., 1985, 1987; Wang et al., 1986).

1.3.2 Molekulární taxonomie rodu

Rod *Spirogyra* tvoří samostatnou, monofyletickou linii v rámci třídy Zygnematophyceae (Obr. 1) a není tedy blíže příbuzný k ostatním vláknitým rodům jako je *Zygnema* a *Mougeotia* z tradiční čeledi Zygnemataceae (Drummond et al., 2005; Gontcharov & Melkonian, 2010; Gontcharov et al., 2003, 2004; Hall et al., 2008). Také jednobuněčný rod *Spirotaenia*, který byl často tradiční morfologií dáván do blízké příbuznosti se šroubatkou s ohledem na jejich spirálovitý tvar chloroplastu, se ukázal být blíže nepříbuzný (Cheng et al., 2019; Hoshaw & Hilton, 1966). *Spirogyra*, která v současné době zahrnuje i tradiční rod *Sirogonium* a *Temnogyra*, ve skutečnosti představuje bazálně se větvící linii v rámci celé třídy Zygnematophyceae, ale přesná pozice stále nenachází v analýzách vysokou podporu (Gontcharov & Melkonian, 2010; Gontcharov et al., 2004; Hall et al., 2008).

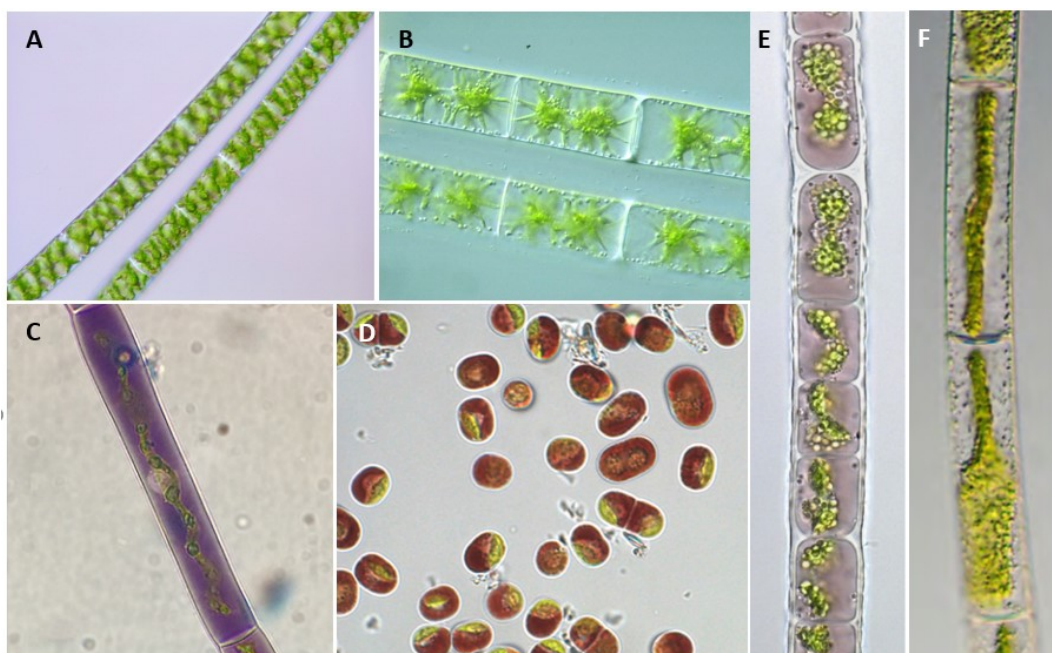
Relativně překvapivé zjištění přinesla studie Chen et al. (2012), v níž byla prokázána velmi vysoká genetická variabilita v rámci rodu *Spirogyra*, která však v rozporu s ní není reflektována fenotypovou variabilitou, tj. rod je morfologicky poměrně uniformní. V recentních molekulárně taxonomických revizích vytváří *Spirogyra* 7–8 velmi dobře podpořených cladů (Obr. 12), jejichž vzájemné genetické rozdíly převyšují i rozdíly mezi jednotlivými rody krásivek nebo mezi rody v rámci supercladu Zygnemataceae (Obr. 1) (Chen et al., 2012; Sherwood et al., 2018; Stancheva et al., 2013; Takano et al., 2019). Z tohoto důvodu někteří autoři navrhují, že by *Spirogyra* měla být rozdělena do několika rodů, například v souladu s identifikovanými clady (Chen et al., 2012; Stancheva et al., 2013). Nicméně stále méně než 10 % známých druhů bylo doposud podrobeno spolehlivé molekulárně fylogenetické revizi (Takano et al., 2019), a tak je povědomí o reálné diverzitě tohoto rodu stále velmi nejasné. Z molekulárně fylogenetických studií totiž současně plyne jak kryptická diverzita, tak genetická jednotnost některých tradičně definovaných druhů (Drummond et al., 2005; Stancheva et al., 2013; Takano et al., 2019).

1.4 Fenolické látky u třídy Zygnematophyceae

Přítomnost fenolických látek je v současné době známá u mnoha spájkivkových rodů, přičemž je zajímavé, že všechny jsou členy bývalého tradičního řádu Zygnematales (Obr. 4, Tab. 1), zatímco u krásivek je tato vlastnost zatím neznámá. Některé typy flavonoidů byly recentně identifikovány u *Penium margaritaceum* (Peniaceae, Desmidiaceae), ale jejich funkce je zatím neznámá, a proto v této práci nejsou dále uvažovány (Jiao et al., 2020). Nejstarší zmínka o fenolických látkách u třídy Zygnematophyceae pochází již z roku 1958, kdy Ralph E. Alston pomocí chemických důkazů demonstroval, že podstatou fialového vakuolárního pigmentu u druhu *Zygogonium ericetorum* by mohl být taninový komplex s železitými kationty (Alston, 1958). Jeho hypotéza byla o několik desítek let později zkoumána přesnějšími metodami analytické chemie a potvrzena ve studii Newsome et al. (2013).

1.4.1 Chemická struktura a syntéza

Všechny doposud identifikované fenolické látky u členů Zygnematophyceae jsou v různé míře deriváty kyseliny gallové (Obr. 5A). U rodu *Spirogyra* (Obr. 4A) se jedná o galloitaniny (Cannell et al., 1988; Han et al., 2012; Nishizawa et al., 1985), skupinu hydrolyzovatelných taninů, které jsou u vyšších rostlin přítomné například v listech a borce



Obr. 4: Zástupci třídy Zygnematophyceae obsahující fenolické sekundární metabolity: (A) *Spirogyra* (vlastní fotografie); (B) *Zygnema* (Protist Information Server); (C) *Temnogametum iztacalense* (Garduño-Solórzano et al., 2020); (D) *Ancytonema alaskana* (Remias et al., 2009); (E) *Zygonium ericetorum* (Herburger et al., 2016); (F) *Mougeotia* (Graham et al., 2016).

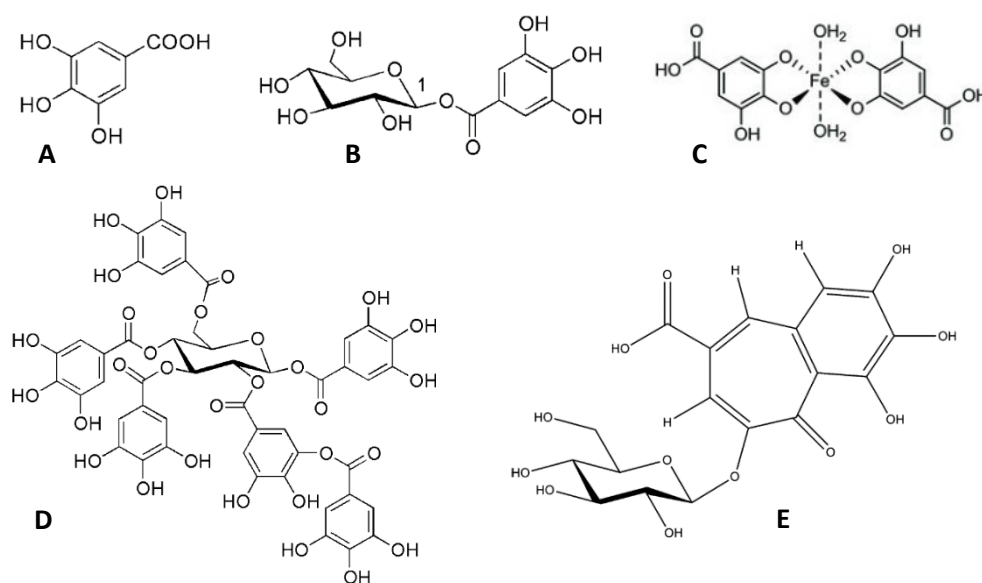
dřevin čeledi bukovité (Fagaceae), škumpy (*Rhus*) z čeledi ledviníkovité (Anacardiaceae) nebo v duběnkách (Haslam, 2007). Jejich základem je centrální molekula β -D-glukózy, jejíž hydroxylové skupiny jsou esterifikovány molekulami kyseliny gallové, případně *meta*-digallové, ve které jsou dvě molekuly kyseliny propojeny *m*-depsidovou vazbou (Niemetz & Gross, 2005). *Spirogyra* vytváří gallotaniny se čtyřmi až jedenácti jednotkami kyseliny gallové (s různými izomery) na jednu molekulu glukózy, přičemž průměrný počet činí 7,8 podjednotek (Obr. 5D) (Nishizawa et al., 1985).

Rod	Typ fenolů	Abs. spektrum	Reference
<i>Spirogyra</i>	gallotaniny	-	Cannell et al. (1988); Han et al. (2012); Nishizawa et al. (1985)
<i>Zygnema</i>	-	280–±500 nm	Holzinger et al. (2018); Pichrtová et al. (2013)
<i>Mougeotia</i>	-	-	Grolig & Wagner (1989)
<i>Zygonium</i>	řetězce glukózových jednotek se stopami kyseliny gallové, hydrolyzovatelné taniny	280–±450 nm	Aigner et al. (2013); Newsome et al., (2013)
<i>Temnogametum</i>	purpurový pigment vakuoly	-	Garduño-Solórzano et al. (2020)
<i>Zygnemopsis</i>	-	-	Figueroa et al. (2009)
<i>Ancytonema</i>	deriváty purpurogallinu	280–±700 nm	Procházková et al. (2021); Remias et al. (2011, 2012)

Tab. 1: Porovnání identifikovaných typů fenolických látek a publikovaných absorpčních spekter mezi zástupci Zygnematophyceae. Podle Holzinger & Pichrtová (2018).

Hydrolyzovatelné taniny byly zjištěny rovněž u *Zygonium ericetorum* (Obr. 4E) (Aigner et al., 2013), kde ale podstatou vlastního purpurového pigmentu je bohatě větvený polymer glukózy, v němž jsou esterifikovány molekuly kyseliny gallové vázající do komplexu Fe^{3+} ionty (Obr. 5C) (Newsome et al., 2013). Jejich poměr vůči železu je 2:1, tedy spolu tvoří gallát železitý (Newsome et al., 2013), podobnou sloučeninu, která je chemickou podstatou duběnkového inkoustu (Espina et al., 2022). Dalšími zástupci s růžovou až fialovou pigmentací jsou *Mesotaenium macrococcum* (Kaštovský et al., 2018), *Zygnema aplanosporum* (Stancheva et al., 2012) nebo mnohé druhy *Temnogametum* (Kadlubowska, 1984) včetně recentně osekvenovaného druhu *T. iztacalense* (Obr. 4C) (Garduño-Solórzano et al., 2020). Přestože jejich fenolický profil zatím analyzován nebyl, přinejmenším u posledně zmíněného druhu je habitat s extrémními podmínkami nápadně podobný jako u druhu *Z. ericetorum* (Holzinger et al., 2010), kde hraje purpurový pigment zásadní roli v přežití (viz dále), a proto se lze oprávněně domnívat, že jeho chemická podstata bude velmi podobná.

Tmavě hnědá pigmentace buněk zástupců ledovcových řas *Ancylonema nordenskiöldii* a příbuzné *A. alaskana* (dříve *Mesotaenium berggrenii* var. *alaskana*) (Obr. 4D) je zase způsobená hojným zastoupením purpurogallinové kyseliny, která je glykosylovaná jedním až dvěma molekulami β -D-glukózy (Obr. 5E) (Procházková et al., 2021; Remias et al., 2011, 2012;



Obr. 5: Chemické struktury vybraných fenolických látek identifikovaných u zástupců Zygnematophyceae: (A) kyselina gallová; (B) β -glukogallin, prekurzor pro vznik gallotaninů; (C) gallát železitý, podstata pupurového pigmentu u *Zygonium ericetorum* (Newsome et al., 2013); (D) 2-O-digalloyl-1,3,4,6-tetra-O-galloyl- β -D-glukóza, příklad gallotaninu izolovaného z řasy *Spirogyra*; (E) glykosylovaný derivát purpurogallinu, který je zodpovědný za tmavě hnědou pigmentaci vakuol ledovcových řas (Remias et al. 2011). Strukturální vzorce (A), (B), (D) byly převzaty z Niemetz & Gross (2005).

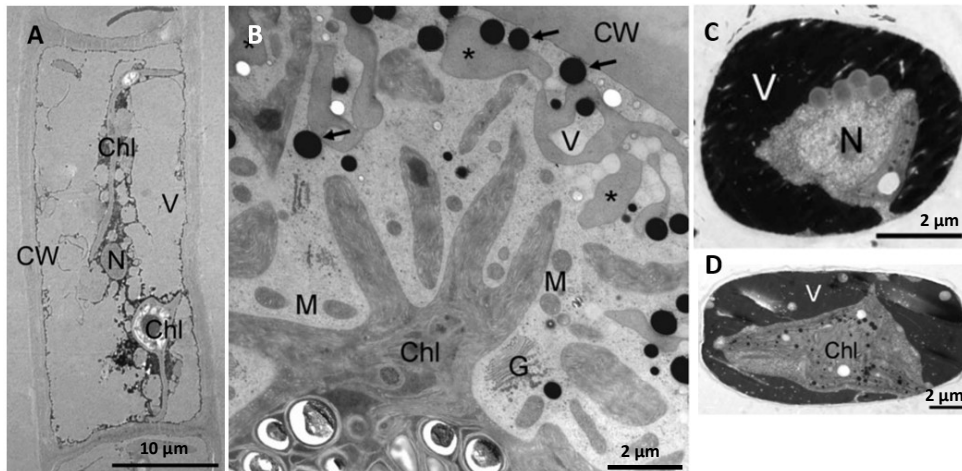
Williamson et al., 2020). Tato molekula je napříč všemi skupinami řas zcela unikátní. Podobně zbarvené buňky má i *Cylindrocystis brebissonii* var. *cryophila*, který ale nebyl z hlediska obsahu fenolických látek studován (Barcytė et al., 2020; Remias et al., 2009). Rody *Zygnema* (Obr. 4B), *Zygnemopsis* nebo *Mougeotia* (Obr. 4F) fenolické sekundární metabolity také obsahují, nicméně jejich konkrétní chemická struktura zatím stále nebyla objasněna (Figueroa et al., 2009; Grolig & Wagner, 1989; Pichrtová et al., 2013).

Všechny identifikované fenolické látky jsou velmi pravděpodobně syntetizovány podobně jako u vyšších rostlin pomocí šikimátové dráhy, jež je situována v chloroplastech. Tvorba kyseliny gallové funguje jako odbočka od hlavní metabolické linie, která jinak vede až ke kyselině chorismové, z níž vznikají aromatické aminokyseliny a celá řada dalších sekundárních metabolitů fenolového charakteru (Ossipov et al., 2003). Komparativními analýzami bylo zjištěno, že zelené řasy obsahují všechny homology šikimátové dráhy (Richards et al., 2006). Jeden z nich, bifunkční DHQ/SDH (3-dehydrochinát dehydratáza/šikimát dehydrogenáza), jehož produkt katalyzuje třetí a čtvrtý krok šikimátové dráhy, byl dokonce u řasy *Spirogyra varians* izolován (Han et al., 2009). Kyselina gallová je po svém vzniku esterifikována β -D-glukózou za vzniku β -glukogallinu (Obr. 5B), který je výchozí molekulou pro tvorbu složitějších gallotaninů dalším enzymaticky katalyzovaným připojováním galloylových zbytků (Niemetz & Gross, 2005). Na první pohled velmi odlišná struktura purpurogallinové kyseliny je pravděpodobně syntetizována podobnou cestou, tedy přes β -glukogallin, který byl v buňkách řasy *Ancylonema* pomocí analytických metod rovněž identifikován (Remias et al., 2012).

1.4.2 Lokalizace v rámci buněk

Přítomnost velkého množství polárních hydroxylových skupin ve výše popsaném typu fenolických látek je příčinou jejich hydrofilního charakteru, a tudíž jsou ukládány do prostředí vakuol. Tyto buněčné struktury byly pomocí transmisní elektronové mikroskopie identifikovány ve všech rodech, ale vzájemně se liší svojí velikostí. U rodu *Ancylonema* či purpurové morfy *Zygogonium* zabírají velké vakuoly značnou část buňky (Obr. 6A, C, D) a dokonale obklopují cytoplasmatickou část s jádrem a chloroplasty (Aigner et al., 2013; Remias et al., 2011; Stancheva et al., 2014). Mnoho rodů má kromě těchto vakuol v blízkosti chloroplastu, případně na periferii buněk drobnější (<2 μ m), sférická, elektron-denzní tělíška (Obr. 6B) (Aigner et al., 2013; Pichrtová et al., 2013; Tretyn et al., 1992), která nápadně připomínají fysody u chaluh, tj. membránové struktury, jež obsahují fenolické látky tříslavinového charakteru (Schoenwaelder, 2008). To vede mnoho autorů k hypotéze, že i tato

tělíska mohou být místem koncentrace fenolických sekundárních metabolitů. Další podporou pro toto tvrzení je také závěr pozorování, že jejich abundance po vystavení stresovým faktorům roste v souladu se zvýšením obsahu fenolických látek (Holzinger et al., 2018; Pichrtová et al., 2013).



Obr. 6: Lokalizace fenolických látek u vybraných zástupců Zygnematophyceae: (A) Buňka *Zygonium ericetorum* s velkými vakuolami, které zatlačují cytoplasmatickou část s jádrem a chloroplasty do centra buňky (Stancheva et al., 2014). (B) Detail periferní části buňky řasy *Zygnema* s elektron-denzními tělísky (šipky), která by mohla být vedle vakuol další místem koncentrace fenolických látek (Pichrtová et al., 2013). (C) + (D) Buňka rodu *Ancylonema* v příčném (C) a podélném průřezu (D) s jasně viditelnou dominancí vakuol (Remias et al., 2011). Použité zkratky ve fotografiích: *Chl* – chloroplast, *CW* – buněčná stěna, *G* – Golgiho aparát, *M* – mitochondrie, *N* – jádro, *V* – vakuola.

1.4.3 Fotoprotektivní role

Vzhledem k jejich aromatickému charakteru mají fenolické látky pasivní schopnost absorbovat záření v ultrafialové části spektra (Cockell & Knowland, 1999). V závislosti na komplexitě dané molekuly pak absorpční spektrum spadá pouze do oblasti UV-B (280–315 nm), kde se často nachází absorpční maximum fenolických látek, případně částečně i do UVA (315–400 nm) (Aigner et al., 2013; Espina et al., 2022; Holzinger & Lütz, 2006; Pichrtová et al., 2013). Takové látky jsou bezbarvé a jsou typické například pro rod *Spirogyra* (Nishizawa et al., 1985). U většiny dalších však byly identifikovány fenoly, jejichž absorpční spektrum pokrývá částečně, případně i zcela viditelnou část spektra (VIS) (400–700 nm) a dodává vakuolám pigmentaci – purpurovou (Aigner et al., 2013; Garduño-Solórzano et al., 2020), tmavě hnědou (Remias et al., 2011, 2012), případně žlutou (Pichrtová et al., 2013). Fenolické látky tedy díky těmto popsaným absorpčním vlastnostem a současně s jejich vhodnou lokalizací uvnitř buňky představují významné metabolity chránící důležité buněčné struktury, především jádro obsahující DNA a fotosyntetický aparát chloroplastů, před intenzivním

slunečním zářením. UV-A světlo může stát za vznikem oxidativního stresu, při kterém se generují nebezpečné reaktivní formy kyslíku (ROS), případně samotné UV-B přímým způsobem poškozují například strukturu DNA, proteinů nebo fotosyntetických pigmentů (Cockell & Knowland, 1999; Karsten, 2008). Podobně přebytečná míra fixované zářivé energie může vést k saturaci fotosyntetického řetězce a ke zvýšené míře vzniku ROS uvnitř chloroplastů (Barber & Andersson, 1992)

Fotoprotektivní role fenolických látek byla demonstrována na mnoha příkladech řas a je důležitá zejména v prostředí, kde je sluneční záření během vegetační sezóny stabilně vysoké, například ve vysokohorských biotopech nebo na povrchu polárních a alpinských ledovců. Purpurové morfy druhu *Zygonium ericetorum*, které rostou exponované silným světelným dávkám, syntetizují z kvalitativního i kvantitativního hlediska mnohem větší množství fenolických látek a taninů než zelené morfy, které velmi často rostou chráněné pod nárosty vláken s purpurou pigmentací. Díky vysokému obsahu fenolů tak při vyšších světelných intenzitách nedochází k fotoinhibici a aktivita fotosyntézy se může držet při svém maximu (Aigner et al., 2013; Herburger et al., 2016). Podobně je fotoprotekce fotosyntetického aparátu důležitá pro *Zygnemopsis decussata* ve vysokohorském, ultraoligotrofním jezeře La Caldera s vysokou průhledností (Figueroa et al., 2009) nebo pro rod ledovcových řas *Ancylonema*, u něž může silná pigmentace způsobená deriváty purpurogallinu (až 11× vyšší obsah oproti chlorofylu *a*) absorbovat až téměř 50 % dopadajícího záření (především UV a krátkovlnné VIS záření) v porovnání s ~1–2,4 % fixovanými pigmenty fotosyntetického aparátu (Williamson et al., 2020). Kromě analýzy přírodních vzorků byla syntéza fenolických látek také indukována v několika experimentálních studiích s vystavením vzorků řasy *Zygnema* zvýšené míře UV záření, což podává finální důkaz o jejich aktivním zapojení ve fotoprotekci (Holzinger et al., 2018; Pichrtová et al., 2013).

Jiné řasové organismy, které fenolické sekundární metabolity nesyntetizují, dokáží odstiňovat UV záření a přebytečnou míru zářivé energie produkcí jiných látek s podobnými absorpčními vlastnostmi. Mezi zelenými řasami k nejrozšířenějším látkám náleží sekundární karotenoidy (Bidigare et al., 1993; Harker et al., 1996; Remias et al., 2005) a mykosporinu podobné aminokyseliny (MAA) (Cockell & Knowland, 1999; Hartmann et al., 2020). Fenolické látky a sekundární karotenoidy jsou složeny pouze z atomů uhlíku, vodíku a kyslíku, což činí jejich produkci relativně „lacnou“ v porovnání s MAA, jejichž tvorba je závislá na dostupnosti dusíkatých zdrojů (Carreto and Carignan, 2011; Rozema et al., 2002). Schopnost

akumulace fenolických látek tak představuje dobrou adaptační výhodu v oligotrofních prostředích chudých na živiny, ve kterém se mnohé ze spájivých řas vyskytují.

1.4.4 Specifické funkce

Řasy *Zygonium* a *Temnogametum* jsou extremofilní řasy rostoucí v acidickém prostředí, kde se musí potýkat se zvýšeným obsahem rozpuštěných kationtů některých kovů, například železa, které je při vyšší koncentraci pro buňky toxické (Garduño-Solórzano et al., 2020; Herburger et al., 2016). U *Zygonium ericetorum* je tomuto riziku předcházeno hned třemi způsoby, z nichž nejdůmyslnějším je vazba železitého iontu do komplexů fenolických látek (Obr. 5C) a jejich bezpečné uskladnění uvnitř vakuol (Herburger et al., 2016; Newsome et al., 2013; Stancheva et al., 2014). Tím je nejen zabráněno nebezpečným účinkům železa na integritu buňky, ale také tím pigment získává svou purpurovou barvu a schopnost pohlcovat záření odpovídající viditelné části spektra (Aigner et al., 2013). Podobnou adaptaci lze přepokládat i u rodu *Temnogametum* s velmi podobnou pigmentací vakuol (Garduño-Solórzano et al., 2020). Poměrně zajímavé je zjištění, že laboratorně lze purpurový pigment vyvolat i u rodu *Spirogyra*, nicméně v tomto nepřírozeném stavu buňky nejsou dlouhodobě viabilní (Allen & Alston, 1959).

Velmi specifickou funkci s globálními důsledky mají deriváty purpurogallinu ledovcových řas (Williamson et al., 2019). Značné množství sluneční energie, které je zachyceno tmavě hnědým pigmentem, je následně buňkou předáno do jejího vnějšího okolí a využito k tání ledových krystalků. Tímto způsobem buňka získává metabolicky dostupnou kapalnou vodu, která je v trvale zmrzlém prostředí limitující, ale také potřebné živiny pro svůj růst a rozmnožování (Dial et al., 2018). Vzhledem k vysokým abundancím intenzivně pigmentovaných buněk přítomných na relativně velké ploše Grónského ledovce během letní sezóny přispívají ledovcové řasy zásadním způsobem k jeho zbarvení do tmavě šedé barvy, čímž snižují albedo (míru odrazivosti) povrchu (Williamson et al., 2018; Yallop et al., 2012). Více energie je tak přijato ledovcovou masou, což přispívá k urychlení jejího tání. To zároveň podporuje další kolonizaci a růst řas na ledovém substrátu, čímž se tak vytváří pozitivní zpětná vazba (Stibal et al., 2017; Yallop et al., 2012). V poslední době byla publikována celá řada studií zabývajících se tímto fenoménem, jejichž primárním cílem zájmu je odhad míry vlivu fotoautotrofních organismů na biologické snižování albeda (Cook et al., 2020; Dial et al., 2018; Stibal et al., 2017; Williamson et al., 2020).

1.4.5 Potenciální funkce

V souvislosti s fenolickými látkami se často rovněž zmiňuje o jejich schopnosti zhasět reaktivní formy kyslíku (Agati et al., 2013), které mohou vznikat v buňce v důsledku působení řady stresových faktorů (Barber & Andersson, 1992; Karsten, 2008; Pospíšil, 2016; Taiz & Zeiger, 2006), ale jen velmi málo studií se touto problematikou podrobněji zabývalo. Podle Agati et al. (2013) se flavonoidy u vyšších rostlin mohou kromě absorpce UV zářením podílet i na ochraně před tímto stresovým faktorem nepřímo, a to zhasením vznikajících ROS. Vzhledem však k jejich lokalizaci ve vakuolách představují v buňce „sekundární antioxidantní systém“, který se podílí na zhasení ROS uniklých především z chloroplastu, například peroxidu vodíku H_2O_2 (Mullineaux et al., 2006). Podle Bors & Michel (2002) vykazují gallotaniny výrazně vyšší antioxidantní vlastnosti než některé flavonoidy. V experimentální studii Han et al. (2012) byla pozorována zvýšená antioxidantní kapacita v methanolovém extraktu z řasy *Spirogyra varians*, která byla kultivována při 4 °C. Tento jev bylo možné přisoudit akumulaci řady galloyl derivátů, jejichž obsah za standardních kultivačních podmínek zůstal nezměněný. Důležitou roli fenolických látek v chladové aklimaci rovněž podporuje zvýšená exprese genu DHQ/SDH (Han et al., 2009), který je klíčovým genem v šikimátové dráze (Richards et al., 2006). Kumarinům u řas z čeledi Dasycladaceae je rovněž připisována silná antioxidantní kapacita, ale jejich produkce kromě UV záření nebyla zvýšena při vystavení stélek vysokým dávkám fotosynteticky aktivního záření (PAR), vyšší teplotě ani při zvýšené salinitě (Gómez et al., 1998; Pérez-Rodríguez et al., 2001). Schopnost zhasět ROS vykazují i mnohé florotaniny (Ahn et al., 2007; Connan et al., 2006) a jejich obsah ve stélkách chaluh narůstá především s intenzitou sluneční ozáření (Abdala-Díaz et al., 2006; Connan et al., 2004), zatímco vysoká teplota přes určité výjimky není hlavním faktorem indukujícím jejich syntézu (Abdala-Díaz et al., 2006; Cruces et al., 2012).

Všechny doposud diskutované aspekty fenolických látek se týkaly pouze abiotických faktorů. Je však dobře známé, že hydrolyzovatelné taniny jsou u vyšších rostlin syntetizovány jako látky odpuzující herbivory (Haslam, 2007) a stejnou úlohu vedle mnoha dalších mohou vykonávat i florotaniny u chaluh (Geiselman & McConnell, 1981; Steinberg, 1984; Toth & Pavia, 2002). Tato práce se však věnuje pouze abiotickým stresovým faktorům, a proto tento aspekt není dále rozebírán.

1.4.6 Způsoby stanovení

Obsah fenolických látek přítomných v hydrofilním extraktu z řasové biomasy je možné kvantifikovat několika metodami. Mezi nejvyužívanější náleží spektrofotometrické stanovení

pomocí Folin–Ciocalteuovy kolorimetrické reakce (Abdala-Díaz et al., 2006; Aigner et al., 2013; Figueroa et al., 2009; Han et al., 2012; Pavia et al., 1997), případně více specifické vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Han et al., 2012; Hartmann et al., 2018; Holzinger et al., 2018; Nishizawa et al., 1985; Pichrtová et al., 2013). V této práci je rovněž ke stanovení koncentrace fenolických látek využita konfokální Ramanova spektroskopie, která u spájitých řas byla doposud využita jen k analýze chemické kompozice vegetativních buněk (Barcytė et al., 2020), případně pohlavních produktů – zygospor (Permann et al., 2021a, 2021b). Princip těchto tří metod je v navazujícím textu ve stručnosti popsán včetně jejich výhod a nevýhod ve vztahu k analýze fenolických látek.

1.4.6.1. Metoda Folin–Ciocalteu

Determinace obsahu fenolických látek pomocí Folin–Ciocalteuovou testu je relativně jednoduchá, levná a časově nenáročná. Její podstata spočívá v přenosu elektronů z fenolických látek na Folin–Ciocalteuovo činidlo (F–C činidlo), při kterém dochází k jeho redukci provázenou změnou barvy z původní žluté na modrou. Reakce probíhá v alkalickém prostředí, ve kterém se fenoly deprotonují a nachází se ve formě fenolátových aniontů schopných redukce. Absorbance vzniklého modrého komplexu je pak spektrofotometricky stanovena při určité vlnové délce a přepočítaná na koncentraci z rovnice kalibrační křivky pro standard, kterým je nejčastěji kyselina gallová (Singleton et al., 1999). Nevýhoda této široce používané metody spočívá v přítomnosti několika interferujících látek v hydrofilním extraktu, které mohou ke vzniku modrého produktu také přispívat, zejména vitamin C (kyselina L-askorbová) a redukující sacharidy (Sánchez-Rangel et al., 2013; Singleton et al., 1999), které mohou být v buňkách řas přítomné (Holzinger & Pichrtová, 2016).

1.4.6.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

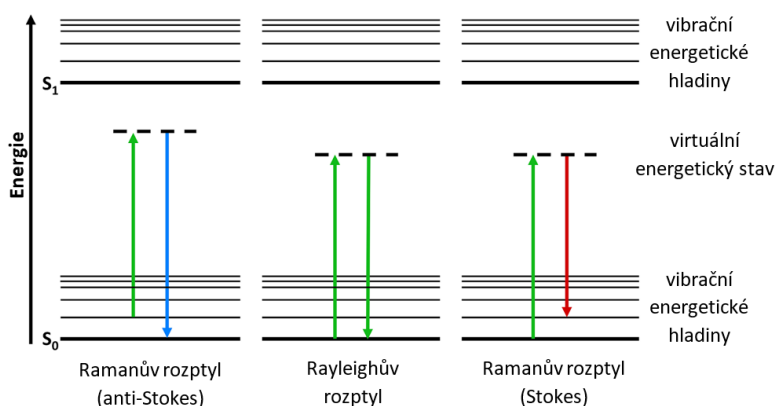
HPLC je jedním z typů chromatografických technik, při kterých dochází k separaci jednotlivých látek ze směsi na základě jejich odlišné afinity k mobilní a stacionární fázi. Vysokotlaké čerpadlo pumpuje vhodně zvolenou mobilní fázi se vzorky přes kolonu, v níž je uložená stacionární fáze. Pokud má mobilní fáze polární charakter a stacionární nepolární, hovoří se o tzv. HPLC v reverzním módu, které je využíváno i pro fenolické látky. Více polární látky v tomto případě tak budou eluovány dříve než méně polární. Při separaci nicméně kromě polaritativy hraje důležitou roli i molekulová hmotnost. Rozdělené analyty pak přecházejí přes detektor, který zaznamenává nejen jejich přítomnost, ale také množství, jež odpovídá intenzitě signálu. Obě informace se pak vykreslují ve formě chromatogramu, kde je každý pík charakterizován svým retenčním časem a absorpčním spektrem, jejichž porovnáním se

známými standardy lze určit identitu jednotlivých signálů, případně odečíst i kvantitu z kalibrační křivky (Dong, 2006). Výhodou této metody je oproti spektrofotometrické F–C reakci vyšší míra specifity při stanovování obsahu fenolických látek, nicméně HPLC vyžaduje relativně větší vhlad do dané problematiky (Holzinger & Pichrtová, 2016).

1.4.6.3. Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je od předešlých dvou metod velmi odlišná a využívá ke kvalitativní a kvantitativní analýze fyzikálního jevu, který byl nazván Ramanův rozptyl. Vzhledem k tomu, že touto analytickou metodou byla měřena většina dat, je její princip vysvětlen detailněji, byť ve zjednodušené podobě.

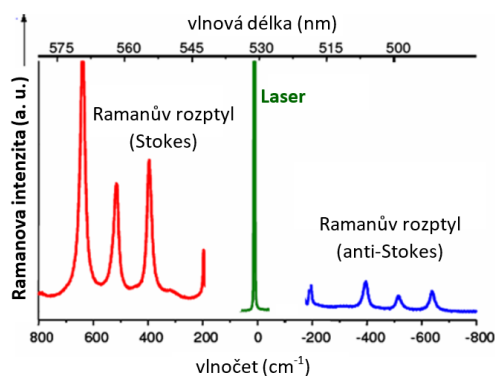
Při dopadu fotonu o určité vlnové délce na molekulu vzorku dochází k jejich interakci, která může vyvolat změny ve vibračních stavech molekul. Fotony jsou přitom rozptýleny, a to buď elasticky nebo neelasticky. Při dominantním elastickém (také Rayleighově) rozptylu mají fotony stejnou energii a vlnovou délku jako excitační fotony a pro Ramanovu spektroskopii nenesou žádnou informaci, zatímco při neelastickém (Ramanově) rozptylu, který nastává jen zhruba v jednom případě z deseti milionů, se rozptýlené fotony svojí energií liší. Při tzv. Stokesově Ramanově rozptylu je část energie fotonu předána vibrující molekule a rozptýlené fotony mají nižší energii a vyšší vlnovou délku, kdežto při anti-Stokesově Ramanově rozptylu je tomu přesně naopak – část energie je molekule odebrána a anti-Stokesovy fotony mají větší energii a nižší vlnovou délku (Obr. 7) (Ember et al., 2017, Smith & Dent, 2005).



Obr. 7: Diagramy znázorňující kvantované energetické přechody mezi vibračními hladinami molekul, které nastávají při elastickém (Rayleighově) a neelastickém (Ramanově) rozptylu světla. Virtuální energetický stav je označení pro nestabilní stav s krátkou životností, do kterého se molekula může dostat po interakci s dopadajícím fotonem, a v podstatě ihned zaniká emisí fotonu. S_0 vyznačuje základní (neexcitovanou) vibrační hladinu molekuly. Převzato z: edinst.com/fr/blog/what-is-raman-spectroscopy/

K vyvolání jinak slabého Ramanova rozptylu se v praxi využívají excitační paprsky, jejichž zdrojem je laser o přesné vlnové délce (velmi často 532 nm). Ramanovo rozptýlené záření pak může být po odfiltrování intenzivnějšího Rayleighova rozptylu detekováno citlivými detektory. Vzhledem k tomu, že většina molekul v daném souboru se nachází v základním, neexcitovaném stavu, je anti-Stokesův rozptyl relativně vzácnější a méně intenzivní, proto při konvenční Ramanově spektroskopii je zaznamenán prakticky pouze Stokesův Ramanův rozptyl. Rozdíl mezi energií rozptýleného světla a excitačního záření (Obr. 7) udává kvantovanou změnu energie konkrétní molekulární vibrace a tyto energetické rozdíly různých dalších vibrací jsou vykresleny v Ramanovo spektrum skládající se z píků o různé pozici a intenzitě (Obr. 8). Na ose x se místo vlnové délky vynáší Ramanův posun jako vlnčet v cm^{-1} , který je přímo úměrný energii a zároveň nezávislý na excitační vlnové délce. Jednotlivé píky charakterizované konkrétním Ramanovým posunem odpovídají určitým vibračním módům (například funkčních skupin), jejichž soubor záleží na chemickém složení dané látky (Ember et al., 2017, Smith & Dent, 2005). Každá látka má tedy své charakteristické Ramanovo spektrum a lze jej využít k jejich identifikaci, proto se často hovoří o Ramanově spektru jako o „chemickém otisku prstu“ dané molekuly (Barcytė et al., 2020; Moudříková et al., 2016; Pompeu et al., 2018; Wu et al., 2011). Vzhledem k tomu, že intenzita Ramanova signálu je přímo úměrná molární koncentraci, lze Ramanovu spektroskopii využít i pro kvantifikaci látek (Baranska et al., 2006; Gallego et al., 2011; Numata & Tanaka, 2011; Zheng et al., 2017).

Pomocí Ramanova konfokálního mikroskopu je možné měřit Ramanova spektra přímo v buňkách v reálném čase, čehož lze využít pro identifikaci buněčného chemického složení *in situ* a při znalosti vhodného standardu také k determinaci koncentrace dané látky. Výhodou této metody je snadná příprava vzorku, která nevyžaduje žádné barvicí techniky, a relativně rychlý způsob měření, který však může být komplikován interferencí autofluorescenčních látek (například chlorofylu) přítomných ve vzorku (buňkách) (Moudříková et al., 2016). Další aspekt, který odlišuje Ramanovu



Obr. 8: Ramanovo spektrum určité látky excitované laserem o vlnové délce 532 nm. Jednotlivé píky charakterizované svojí pozicí (vlnčetem) a intenzitou odpovídají určitým vibračním módům. Při konvenční Ramanově spektroskopii se využívá pouze intenzivnější Stokesův Ramanův rozptyl (červeně), zatímco Rayleighův rozptyl (zeleně) spolu s anti-Stokesovým Ramanovým rozptylem je odfiltrován. Převzato z Tarcea et al. (2008).

spektroskopii od předešlých dvou popsaných metod, je, že se měří molární koncentrace na úrovni buněk, zatímco jak při spektrofotometrické F–C metodě, tak při HPLC se stanovuje obsah sklizené biomasy jako celku. Tento podstatný rozdíl tak může mít určité důsledky pro variabilitu v obsahu stanovovaných látek, v případě této práce, fenolů.

2. Cíle práce

Z předchozí kapitoly o fenolických látkách je patrné, že převážná většina doposud publikovaných studií se snaží objasnit adaptační potenciál v akumulaci fenolických látek u extremofilních zástupců třídy Zygnematophyceae (Figueroa et al., 2009; Herburger et al., 2016; Hoppert et al., 2004; Williamson et al., 2020), zatímco běžné řasy, jako je například *Spirogyra*, zůstávají více opomíjené. Zároveň existuje překvapivě jen malé množství experimentálních prací, které se věnují aplikaci stresových faktorů a jejich vlivu na změny v hladině fenolických látek u této skupiny řas. Šíře stresorů je navíc omezená v podstatě jen na expozici řas UV záření (Holzinger et al., 2018; Pichrtová et al., 2013), případně kultivaci při nízké teplotě (Han et al., 2012).

Primárním cílem této práce je rozšíření spektra aplikovaných stresových faktorů u třídy Zygnematophyceae a sledování jejich vlivu na změny v kvantitě fenolických látek. K tomuto účelu byl vybrán nově izolovaný kmen málo studovaného rodu *Spirogyra*, u nějž je naopak detailně prozkoumané spektrum syntetizovaných látek (Cannell et al., 1988; Han et al., 2012; Nishizawa et al., 1985). Kromě stresových podmínek byly sledovány i změny v hladině fenolů během stárnutí kultury, které byly vyhodnoceny pomocí tří odlišných přístupů, z nichž Ramanova spektroskopie představuje novou metodu, která doposud ke kvantifikaci fenolických látek u Zygnematophyceae nebyla aplikována.

Konkrétní cíle této práce tedy jsou:

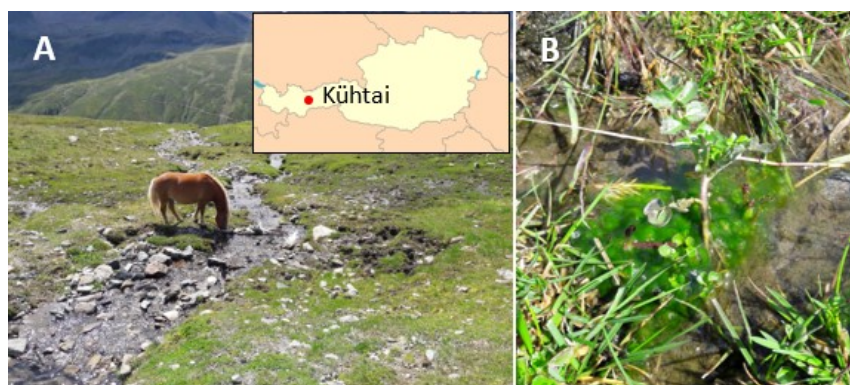
- 1) Morfologická charakteristika izolovaného kmene pomocí světelné, fluorescenční a transmisní elektronové mikroskopie, dále určení jeho genetické příslušnosti a determinace chemického složení buněk pomocí Ramanovy spektroskopie.
- 2) Morfologická a fyziologická charakteristika kmene během stárnutí kultury a jeho vliv na postupnou akumulaci fenolických látek.
- 3) Porovnání množství fenolických látek stanovených pomocí spektrofotometrické Folin–Ciocalteuovy metody, vysokoúčinné kapalinové chromatografie a Ramanovy spektroskopie na příkladu mladých a starých kultur.
- 4) Aplikace vybraných abiotických stresových faktorů a sledování jejich vlivu na koncentraci fenolických látek.

3. Metodika

3.1 Odběrová lokalita, izolace a kultivace

Nový kmen řasy *Spirogyra* byl izolován z přírodního vzorku, který byl odebrán z vysokohorského prostředí Stubaiských Alp (Rakousko) v létě 2019 autorem této práce. Tento biotop byl vybrán záměrně – vzhledem k obecně vyšší intenzitě UV záření ve vyšších polohách bylo předpokládáno, že *Spirogyra* v tomto prostředí bude obsahovat konstitutivně vyšší koncentraci fenolických látek. Chomáče zelených vláken byly odebrány z čistého potoka nad obcí Kühtai (47°13'19.7"N 11°01'35.7"E, cca 2300 m n. m, Obr. 9A, B) a jejich identita byla *in situ* určena pomocí kapesního mikroskopu (PEAK 2001, Peak Optics). Konduktivita ($78 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) a pH (6,8) vody byly změřeny přístrojem WTW 340i (WTW GmbH, Weilheim).

Izolace probíhala pomocí skleněných kapilár, které byly vytaženy nad plamenem kahanu ze skleněných Pasteurových pipet. Následně bylo na podložní sklíčko přeneseno několik vláken z odebraného vzorku, které byly pozorovány v mikroskopu bez přiklopeného krycího sklíčka. Sterilní kapilárou pak byl do připravených kapek sterilního média na jiném podložním sklíčku přemístěn menší shluk vláken a tento proces se opakoval, až v kapce zůstalo pouze jediné vlákno. To bylo následně očištěno v několika dalších kapkách, a nakonec přeneseno do plastových komůrek naplněných médiem. Jedna z uchycených kultur byla poté vybrána jako kmen pro experimenty této práce.



Obr. 9: (A) Odběrové místo s vloženou mapou Rakouska vyznačující přibližné umístění obce Kühtai; (B) Detail odebíraného nárůstu řasy *Spirogyra*.

Veškeré kultury byly uchovávány v tekutém Boldově bazálním médiu (BBM) v 250ml, případně 500ml Erlenmayerových baňkách naplněných zhruba z jedné třetiny a s hrdlem překrytým alobalovou fólií. Složení kultivačního média je uvedeno v publikaci Andersen (2005). Část kultur byla pěstována při kontinuálním osvětlení $10\text{--}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a teplotě $16 \text{ }^\circ\text{C}$ a část s nastaveným denním režimem 16:8 (den:noc), denní teplotou $20 \text{ }^\circ\text{C}$ a noční

16 °C. Osvětlení v tomto případě zajišťovala zářivka Osram Fluora L 18W/77 s větším podílem modré a červené části spektra pro rychlejší růst rostlin. Zhruba každý měsíc a půl až dva měsíce v závislosti na aktuálním stavu kultury probíhalo přeočkovávání do čerstvého média, aby tak byl zajištěn „mladý“ charakter vláken, který se ukázal být zcela stěžejní pro zamýšlené experimenty. Termínem „mladý“ jsou v této diplomové práci označovány buňky ve své růstové fázi, kdy se intenzivně dělí a rostou, zatímco „staré“ se nachází ve stacionární fázi růstu, nedělí se v takové míře a alokují většinu svých fotosyntetických produktů do zásobních látek.

3.2 Světelná a fluorescenční mikroskopie

Morfologie vegetativních vláken a pohlavně vzniklých zygospor, které během kultivace a v průběhu určitých experimentů vznikaly, byla pozorována světelným mikroskopem Leica DM 2000 LED s využitím Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC). Mikrofotografie byly pořízeny pomocí fotoaparátu Leica ICC50 W a následně upraveny (oříznutí fotografie a přidání měřítka) v programu Leica Application Suite (LAS X).

Detailnější pozorování struktury chloroplastu a jeho změn bylo umožněno fluorescenčním mikroskopem Olympus BX61 s kamerou Olympus DP73, přičemž autofluorescence chlorofylu byla excitována pomocí filtru FITC (excitace: 482/35 nm, emise: 536/40 nm). Lipidická tělíska byla vizualizována pomocí fluorescenční barvy Nile Red rozpuštěné v acetonu na koncentraci 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Objem 40 μl Nile Red byl pipetován do zhruba 4 ml média se shlukem vláken a po 10 minutách a řádném propláchnutí byla vlákna pozorována ve fluorescenčním mikroskopu s využitím filtru FITC. Fotografie byly zpracovány v programu cellSens Entry stejným způsobem popsaným výše.

3.3 Elektronová mikroskopie

Pro pozorování buněčné ultrastruktury pomocí transmisní elektronové mikroskopie byla vybrána dva měsíce stará kultura rostoucí za kontinuálního osvětlení při 16 °C. Z kultury byl odebrán shluk vláken, který nejprve bylo potřeba zafixovat. Do vzorku s médiem byl proto přidáván glutaraldehyd až do jeho konečné koncentrace 2 % a takto připravený vzorek byl ponechán přes noc v lednici ve 4 °C. Druhý den byl vzorek třikrát promyt fosfátovým (stabilizačním) pufrům o koncentraci 0,05 M a následně postfixován v 1% OsO_4 ve fosfátovém pufru po dobu 2 hodin při 4 °C. Vzorek byl následně znovu dvakrát promyt fosfátovým pufrům a posléze dvakrát deionizovanou vodou. Po důkladném odsátí supernatantu bylo k vláknům kápnuto malé množství 2% agarózy rozehráté na 45 °C. Vzorek byl pomocí pipety krátce promíchán a poté přenesen s několika vlákny na předchlazené podložní sklíčko. K zatuhnutí

byl vzorek na chvíli vložen do lednice a poté nakrájen pod stereomikroskopem na několik malých kousků tvaru kvádrů. Ty byly přeneseny do 1% uranylacetátu v 50% methanolu a inkubovány ve tmě po celou jednu hodinu. Dalším krokem bylo zbavení vzorku vody vzestupnou alkoholovou řadou – 70% EtOH (15 min), 96% EtOH (10 min), 100% EtOH (odvodněným pomocí CuSO₄) a nakonec znovu 100% EtOH, ve kterém byl vzorek ponechán v lednici přes noc. Další den byl pak postupně přenášán na dobu minimálně 30 minut do směsí 100% EtOH a 100% butanolu (odvodněného pomocí kuliček Nalsit) v definovaném poměru – 3:1, 1:1 a 1:3 a poté dvakrát do čistého butanolu. Takto upravené agarové bločky byly poté převáděny do pryskyřice s využitím zvyšující se koncentrace Spurrůva média (Spurr, 1969) v butanolu – 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 90%, 100%, přičemž vzorek byl v každém z roztoků ponechán po dobu 20 minut. Nakonec byl vzorek přendán do nového 100% Spurru a za pomalého míchání inkubován po dobu minimálně 12 hodin. Následující postup spočíval v dvojité výměně Spurru s přídavkem 2% dimethylaminoethanolu (DMAE) a uchování vzorku za pomalého míchání po dobu 6 hodin. Bločky byly nakonec přemístěny do silikonové formy na tuhnutí a sušeny 2 dny při teplotě 60 °C.

Nakonec byly na příslušném servisním pracovišti z připravených bloček zhotoveny ultratenké řezy (60–70 nm) pomocí diamantového nože na ultramikrotomu Reichert-Jung Ultracut E. Vzniklé řezy byly přemístěny na měděné sítky pokryté formvarovou blankou a dále kontrastovány roztokem citronanu olovnatého. Ultrastruktura buněk pak byla sledována pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL JEM-1011 vybaveného CCD kamerou Veleta.

3.4 Genetická charakterizace

Pro bližší genetické určení nového kmene byl vybrán gen *rbcL* kódující velkou ribozomální podjednotku, který je pro objasnění vnitrorodových vztahů rodu *Spirogyra* nejčastěji využíván (Drummond et al., 2005; Sherwood et al., 2018; Stancheva et al., 2013; Takano et al., 2019). Nejprve byl do 2ml zkumavky odebrán z jedné kultury svazek zelených vláken a odsáto maximální množství kultivačního média. Poté byl vzorek drcen pomocí dvou wolfram-karbidových kuliček v mlýnku Retsch MM 400 s frekvencí 30/s po dobu tří minut. Vlastní extrakce pak probíhala podle protokolu CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid) (Cubero et al., 1999). Do zkumavky bylo přidáno 700 µl extrakčního pufru a poté malé množství PVP (polyvinylpyrrolidon), které vytváří komplex s fenolickými látkami a zabraňuje tak jejich nežádoucímu působení na polymerázu během PCR (polymerázová řetězová reakce). Vzorek s reakční směsí byl poté inkubován 30 minut v předehřátém termobloku (Thermomixer

comfort, Eppendorf) na 60 °C s frekvencí míchání 1200 rpm. Dále bylo přidáno 500 µl směsi chloroform:izoamylalkohol v poměru 24:1 a vzorek pečlivě protřepán. Po pěti minutách byl obsah zkumavky stočen na centrifuze (6 minut, 13200 rpm) (Centrifuge 5415D, Eppendorf), čímž došlo k separaci polární (horní) a nepolární (spodní) fáze. Objem 500 µl vodné fáze byl přenesen do 1,5ml zkumavky a smíchán s 500 µl vychlazeného izopropanolu. Vzorek byl poté znovu protřepán a ponechán v -20 °C po dobu 30 minut, během které došlo k vysrážení DNA. Po stočení vzorku (13200 rpm, 3 min) byl odstraněn veškerý supernatant a na dně zkumavky byl patrný drobný pelet DNA. Dále bylo přidáno 400 µl 96% vychlazeného ethanolu a vzorek inkubován 15 minut v termobloku při 37 °C a 1200 rpm. Následovala centrifugace (13200 rpm, 3 min), po níž byl supernatant opět slit a nahrazen 200 µl 70% ethanolu. Po pěti minutách byl vzorek stočen (13200, 3 min) a odstraněn supernatant. Zcela suchá DNA byla rozpuštěna v 50 µl stabilizačního TE pufru (složení viz zmíněný protokol) a vzorek naposledy inkubován v termobloku 30 minut při 37 °C a 600 rpm. Kvůli potenciálně přetrvávající přítomnosti sekundárních metabolitů byl vzorek před PCR ještě přečištěn pomocí kitu AMPure XP podle protokolu výrobce a znovu rozpuštěn v 50 µl TE pufru.

Pro amplifikaci genu *rbcL* byly použity dvě kombinace primerů, v jedné ZygF (5'TATGTCAACCACAAAC3') a ZygR (5'GTATCAAATTCAAATTTA3') podle Pichrtová et al. (2018) a v druhé přímý primer RH1 (5'ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC3') a zpětný 1385R (5'AATTCAAATTTAATTTCTTTCC3') podle Drummond et al. (2005). V obou případech byla použita polymeráza MyTaq. Celé složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 2, přičemž izolovaná DNA byla pipetována jako poslední. Mikrozkumavky byly krátce zvortexovány a následně vloženy do cykleru (Mastercycler pro, Eppendorf), kde probíhala PCR podle protokolu popsáném v tabulce 3. Výsledek PCR byl zkontrolován pomocí elektroforézy na 1% TAE agarózovém gelu se vzorkem nabarveným ethidiumbromidem a vizualizovaným pomocí UV světla v Kodak Gel Logic 100. PCR produkt byl nakonec ještě přečištěn pomocí ExoSap-IT dle návodu výrobce.

Složka	Objem (µl)
ddH ₂ O	14,2
pufr MyTaq	4
primer přímý	0,3
primer zpětný	0,3
polymeráza MyTaq	0,2
DNA	1

Tab. 2: Složení reakční směsi pro PCR.

Fáze cyklu	Teplota	Čas	Opakování
iniciální denaturace	94 °C	2 min	1x
denaturace	94 °C	45 s	35×
annealing	40 °C	1 min	
elongace	72 °C	2 min	
finální elongace	72 °C	10 min	1x

Tab. 3: Protokol PCR.

Sekvence byla provedena firmou MacroGen, Inc. pomocí Sangerovy metody. Kontrola kvality přečtených sekvencí v přímém i opačném směru byla ověřena v programu SeqAssem (verze 7) a jejich porovnáním byla vytvořena konsenzuální sekvence o délce 1260 nukleotidů. Pomocí algoritmu BLAST byla následně prohledána databáze GenBank pro nalezení nejpodobnější publikované *rbcl* sekvence.

3.5 Experimentální design

3.5.1 Vliv stáří kultury na kvantitu fenolických látek

Efekt stárnutí na hladinu fenolických látek byl sledován ve dvou nezávislých experimentech. V prvním byla molární koncentrace determinována v průběhu stárnutí u jedné kultury, zatímco ve druhém byla kvantita fenolů porovnávána přímo mezi mladými a starými kulturami.

3.5.1.1. Průběžné stanovení koncentrace fenolických látek u jedné kultury

Změny v morfologii, fyziologii a koncentraci fenolických látek byly sledovány u jedné vybrané kultury, která byla přeočkována do 250ml Erlenmayerovy baňky naplněné zhruba z jedné třetiny BBM médiem a následně pěstována při konstantních podmínkách – teplotě 20 °C a osvětlení 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. V jednotlivých časových bodech – 12, 19, 32, 54, 96 a 188 dní od přeočkování byla kultura zkontrolována ve světelném a fluorescenčním mikroskopu, kterým byly vizualizovány chloroplasty a lipidická tělíska uvnitř buněk. Zároveň bylo odebráno malé množství biomasy ke změření relativního elektronového transportu ($n=4$) a v bodech 19 ($n=12$), 32 ($n=12$), 96 ($n=33$) a 188 ($n=31$) stanovena koncentrace fenolických látek Ramanovou spektroskopií. Veškerá data získaná v tomto experimentu (koncentrace fenolů, rETR parametry) byla statisticky testována v programu PAST pomocí jednorozměrné analýzy rozptylu (ANOVA) a Tukeyho testem s hladinou významnosti 0,01.

3.5.1.2. Porovnání obsahu fenolických látek mezi mladými a starými kulturami

Pro srovnání výsledků získaných průběžným měřením u jedné kultury byl také analyzován rozdíl v množství fenolických látek mezi mladými, čerstvě přeočkovanými kulturami a kulturami starými 70 dní (kultivační podmínky přitom byly shodné s předchozím experimentem). Stanovení probíhalo třemi metodami – vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ($n=5$), spektrofotometricky metodou Folin–Ciocalteu ($n=4$ pro mladé, $n=6$ pro staré kultury) a Ramanovou spektroskopií ($n=7$, $n=17$). Rozdíl v datových souborech pro jednotlivé metody byl testován dvouvýběrovým t -testem s hladinou signifikance 0,01. Při HPLC byly rovněž z kvalitativního hlediska analyzovány fotosyntetické pigmenty.

3.5.2 Vliv stresových faktorů na koncentraci fenolických látek

Stresové podmínky byly navozeny v sérii jednoduchých pokusů, které vždy zahrnovaly efekt pouze jednoho faktoru. Mezi aplikované stresory byla vybrána vysoká a nízká teplota, zvýšená míra ozáření, expozice UV-B, osmotický stres a nutriční stres vyvolaný nedostatkem dusíkatého zdroje. Experimentální design byl ve všech případech podobný. Vlákna z jedné kultivační nádoby (pěstované buď při kontinuálním osvětlení nebo nastaveném denním cyklu) byla vždy rozdělena do 4 opakování pro kontrolu a 4 pro vzorek vystavený změně v daném faktoru a přemístěna do plastových sérologických destiček naplněných 5 ml BBM. Na počátku každého experimentu a dále v jeho průběhu byl v určitých časových intervalech stanoven maximální kvantový výtěžek F_v/F_m ($n=4$). Biomasa do experimentů byla vybírána velmi pečlivě, aby byl počáteční stav vláken co nejmladší a současně maximální kvantový výtěžek F_v/F_m podobný napříč opakováními. Přestože se i tak počáteční hodnoty mezi opakováními lehce lišily, byly hodnoty přepočteny na procenta. Na závěr experimentu byly z jednoho opakování pořízeny mikrofotografie vláken k zachycení případných změn v morfologii buněk. Zbylá biomasa ze stejného opakování byla následně využita ke stanovení koncentrace fenolických látek Ramanovou spektroskopií. Efekt faktoru byl statisticky testován dvouvýběrovým t -testem na hladině signifikace 0,01.

Stres z vysoké a nízké teploty (30 °C, resp. 4 °C) byl vyvolán ve dvou nezávislých experimentech, přičemž kontrolní vzorky byly v obou případech ponechány ve 20 °C. Kultivace probíhala s nastaveným denním cyklem den:noc (16:8) a denní světelnou intenzitou kolem 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. V případě vysoké teploty byla doba experimentu 23 dní a počet opakování při stanovení koncentrace Ramanovou spektroskopií činil $n=27$ pro kontrolu, $n=23$ pro stresový faktor. Nízké teplotě byly vzorky vystaveny 15 dní a počet opakování byl $n=30$.

Při vyšší míře ozáření byl zajištěn celodenní kontinuální osvit $430 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vyvolávající stres a $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pro kontrolu. Okolní teplota byla udržována klimatizací při $16 \text{ }^\circ\text{C}$. Po 10 dnech byla změřena molární koncentrace s počtem opakování $n=22$ pro kontrolu a $n=23$ pro stresový faktor.

Osmotický stres byl navozen přidavkem polyethylenglykolu-6000 (PEG-6000) do BBM média podle Lin & Wu (2014). Po pilotním pokusu s koncentrační řadou byla zvolena k dalšímu experimentu 10% (w/v) koncentrace. Vzorky byly kultivovány při kontinuálním osvětlení $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a teplotě $16 \text{ }^\circ\text{C}$ po krátkou dobu 7 dní. Počet opakování změřených Ramanovou spektroskopii byl v obou případech $n=15$.

Při stresu z UV-B záření byly vzorky vystaveny vedle $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR každý den po dobu 30 minut velmi vysokým dávkám UV-B, které dosahovaly $11,6 \text{ W m}^{-2}$. Kontrolní vzorky byly překryty ochrannou fólií filtrující ultrafialovou část spektra, a nikoliv viditelné záření. Po 10 dnech byla změřena koncentrace fenolických látek s počtem opakování $n=17$ pro kontrolu a $n=21$ pro UV-B.

V posledním experimentu byly vzorky vystaveny vysoké intenzitě záření ($430 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ale vzájemně se lišily přítomností, resp. absencí NaNO_3 jakožto zdroje dusíku v médiu BBM. Po 31 dnech byla změřena koncentrace fenolů s počtem opakování $n=29$ pro dusík a $n=30$ pro kultivaci bez dusíku.

3.6 Fluorescence chlorofylu

Veškerá měření spojená s *in vivo* fluorescencí byla měřena pomocí PAM fluorimetru (*pulse amplitude modulation*) (FluorCam, Photon Systems Instruments). Maximální kvantový výtěžek F_v/F_m je široce užívaným indikátorem fyziologického stavu buněk, který se vždy měří po předcházející době zatemnění k „relaxaci“ fotosyntetického aparátu (Baker, 2008; Ralph & Gademann, 2005). F_m je hodnota maximální fluorescence a F_v představuje tzv. variabilní fluorescenci, která je rozdílem mezi maximální hodnotou fluorescence F_m a minimální fluorescencí F_0 . Před každým měřením byla destička se vzorky zatemněna 30 minut.

Relativní elektronový transport (rETR) jakožto ukazatel aktivity fotosyntetického aparátu při různých světelných intenzitách fotosynteticky aktivního záření byl určen podle Herburger et al. (2015): $\text{rETR} = \Phi_{\text{PSII}} \cdot \text{PAR}$, kde Φ_{PSII} je efektivní kvantový výtěžek fotosystému II, který udává množství fixované energie investované do fotochemických procesů na světlo, a PAR je intenzita fotosynteticky aktivního záření v $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Efektivní kvantový výtěžek PSII byl změřen pomocí fluorimetru ve 13 krocích se zvyšující se světelnou intenzitou (měřeno

luxmetrem ULM-500, Walz) v rozsahu od 1,7 po 1647 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR. Každý krok trval 1 minutu, aby bylo dosaženo stabilního stavu při každé intenzitní hladině, a na jeho konci byl aplikován saturační záblesk. Před prvotním měřením Φ_{PSII} byl vzorek vystaven po dobu 3 minut počáteční intenzitě 1,7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ k minimalizaci Kautského indukčního efektu po předchozím zatemnění vzorku (15 minut) (Ralph & Gademann, 2005). Relativní elektronový transport byl pak vynesena proti intenzitě PAR jako obdoba P–I křivek (*photosynthesis–irradiance*) a fitován podle modelu autorů Webb et al. (1974) nebo Walsby (1997) v závislosti na tom, zda docházelo k fotoinhibici, či nikoliv.

3.7 Stanovení kvantity fenolických látek

3.7.1 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie byla využita pro determinaci chemického složení buněk a následně ke kvantifikaci fenolických látek v jednotlivých experimentech. Příprava vzorku pro měření spočívala v rozprostření shluku vláken mezi křemenné podložní a krycí sklíčko, které bylo uzavřeno pomocí laku CoverGrip (Biotium Inc.) k uchování vodního prostředí ve vzorku pro déle trvající měření. V případě měření reprezentativních Ramanových chemických map byla využita imobilizace vláken v 1% (*w/v*) agaróze s nízkým bodem tání, aby bylo zabráněno pohybu vlákna během skenování. Vlastní Ramanův signál agarózy při této koncentraci je zanedbatelný.

Veškerá měření byla provedena prostřednictvím konfokálního Ramanova mikroskopu WITec alpha300 RSA s využitím softwaru WITec Control FIVE s laserem o excitační vlnové délce 532 nm a výkonem zhruba 20 mW v rovině zaostření. Před vlastním měřením byl v dané oblasti nejprve potlačen silný autofluorescenční signál chlorofylu, který značně překrývá signál z Ramanova rozptylu. To bylo dosaženo ozářením měřené oblasti a jejího okolí rozostřeným excitačním paprskem, kdy plošná hustota fotonového toku v rovině vzorku dosahuje pouze 10^{-5} hodnot v ohnisku. Tento jednoduchý a praktický způsob plošného ozáření vzorku vedl k vybělení chloroplastu (*photobleaching*). Data byla následně získána buď měřením Ramanových spekter ve vybraných místech vzorku (tzv. bodová spektra) s integračním časem 0,5 s a 20 akumulacemi, případně Ramanových dvourozměrných map se skenovacím krokem 200 nm v obou směrech, velikostí voxelu 1 μm^3 a integračním časem 0,07 s na voxel. Ve všech případech byl k pozorování buněk využit vodní imerzní objektiv UPlanSApo, 60 \times , NA 1,2 (Olympus). Každá měřená buňka byla před svým bělením a ihned po něm vyfocena k zachycení její morfologie.

Ke kvantifikaci fenolických látek uvnitř buněk byla vytvořena koncentrační řada roztoků kyseliny tříslové ($\geq 86\%$, P-LAB) jakožto standardní látky v rozmezí od 1–100 mM. Jednotlivé roztoky byly následně zaneseny mezi podložní a krycí sklíčko způsobem popsaným výše a měřeny jako dvourozměrné Ramanovy mapy kvůli snazšímu odstraňování artefaktů.

Data byla zpracována v prostředí softwaru WITec Project FIVE Plus v5.1, ve kterém byly u všech získaných měření provedeny následující kroky: odstranění signálu kosmického záření, oříznutí koncových částí spekter, které jsou zatíženy chybami detektoru, a odstranění pozadí. V případě Ramanových map spočíval další krok v rozložení na jednotlivé komponenty, jejichž signál byl následně zprůměrován k získání finálního spektra s optimálním poměrem signálu k stochastickému šumu. Takto ošetřená spektra získaná z buněk a odpovídající kyselině tříslové a spektra standardů byly normalizována na pás valenčních vibrací vody (tzv. vnitřní intenzitní standard) a dále analyzována v prostředí Matlab pomocí programů vytvořených k tomuto účelu Mgr. Janem Palackým na Fyzikálním ústavu MFF UK. Postup je detailně popsán v Moudříková et al. (2016). Na základě koncentrační řady kyseliny tříslové byla sestavena kalibrační křivka, podle níž bylo možné stanovit přímo molární koncentraci kyseliny tříslové lokalizované v jednotlivých buňkách.

3.7.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Postup zpracovávání biomasy byl pro HPLC a F–C metodu zpočátku obdobný – biomasa z kultivačních nádob (n =počet nádob) byla přefiltrována za sníženého tlaku přes skleněné filtry (Whatman GF/A, průměr 47 mm pro HPLC, resp. 25 mm pro spektrofotometrii) a spolu s ním zabalena do alobalové fólie a ihned vložena do tekutého dusíku. Vzorky byly následně lyofilizovány po dobu 24 hodin a ve výsledném vysušeném stavu uchovávány v mrazáku při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v sáčku s vysušeným silikagelem, aby se předešlo degradaci fotosyntetických pigmentů a fenolických látek a zároveň se zabránilo opětovnému navlhčení lyofilizované biomasy.

Extrakce a následná kvalitativní a kvantitativní analýza fenolických látek společně s fotosyntetickými pigmenty pomocí HPLC proběhla v rámci zahraniční stáže na rakouské vysoké škole „University of Applied Sciences Upper Austria“ ve Welsu. Jednotlivé zvážené vzorky společně se skleněnými filtry byly rozstříhány nůžkami a pečlivě rozdrceny na malé kousky až prášek v přítomnosti zhruba 10 ml směsi chloroformu a dichlormethanu (2:1) za pomoci porcelánového tloučku a hmoždíře, které byly na pár minut před manipulací vloženy do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Veškerá zelená tekutá fáze a zbylý pelet byly přeneseny do plastových 15 ml zkumavek. Hmoždíř a tlouček byly poté omyty malým množstvím (méně než 2 ml) 5%

ethanolu, aby byly získány zbytky polárních látek, které jsou oproti snadno viditelným fotosyntetickým pigmentům bezbarvé, a přeneseny do jiných 15 ml zkumavek. Po centrifugaci (5000 rpm, 5 min; Centrifuge 5804 R, Eppendorf) byl lipofilní supernatant (směs chloroformu a dichlormethanu) přenesen do nových zkumavek a zbylý pelet s minimálním množstvím rozpouštědla ponechán zhruba hodinu k vysušení při pokojové teplotě. K suchému peletu byly pak pipetovány 2 ml 5% ethanolu a zkumavky byly ponechány přes noc ve 4 °C kvůli extrakci fenolických látek. Lipofilní extrakt byl znovu stočen (5000 rpm, 5 min) a následně byla provedena fázová separace s 2 ml 5% ethanolu. Dobře uzavřené zkumavky byly několikrát převráceny a následně zcentrifugovány stejným způsobem. Do horní vodné fáze se přesunuly polární látky včetně fenolických látek, ve spodní, nepolární fázi zelené barvy zůstávají fotosyntetické pigmenty. Vodná fáze byla poté odejmuta a spojena se zbylými dvěma vodnými extrakty. Následovala další centrifugace (5000 rpm, 5 min) a změření objemu v odměrném válci pro finální výpočty. Polární extrakty byly po centrifugaci (5000 rpm, 5 min) připraveny pro analýzu. Malé množství extraktu bylo přeneseno do skleněných vialek a vloženo do HPLC přístroje. Nepolární fázi bylo před chromatografickou analýzou potřeba nahradit čistým methanolem. Z toho důvodu byly tyto extrakty odpařeny pomocí rotační vakuové odparky (Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4010) při teplotě lázně 35 °C a rychlosti otáček 150/min. Vzniklá suspenze byla rozpuštěna v 5 ml 100% methanolu mícháním v ultrasonické vaně (EMAG Emmi-40 HC). Rozpuštěný vzorek byl následně pipetován do 15ml zkumavek, a nakonec před samotnou analýzou znovu centrifugován za stejných podmínek. Malé množství zeleného extraktu bylo poté přeneseno malých vialek a vloženo do přístroje pro analýzu.

Analýza fenolických látek probíhala pomocí HPLC systému Agilent ChemStation 1100 s využitím kolony YMC-Triart C18 o rozměrech 150×3 mm s velikostí částic 3 µm. Teplota kolony byla nastavena na 70 °C. Využity byly dvě mobilní fáze: (A) deionizovaná voda s 1% kyselinou mravenčí (v/v) a (B) acetonitril s 1% kyselinou mravenčí (v/v). Separace tedy probíhala v reverzním módu. Systém začal izokratickou elucí s 95% fází A (5 min), poté pokračoval lineárním gradientem od 0 do 5% A (13 min) a byl zakončen izokratickou elucí s 5% A (4 min). Následujících 8 minut probíhalo očištění systému 95% fází A před dávkováním dalšího vzorku. Rychlost průtoku byla nastavena na 0,5 ml/min a dávkovaný objem byl 40 µm. Separované fenolické látky byly zaznamenány pomocí detektoru diodového pole (DAD) při vlnové délce 280 nm a pro každý pík byla opatřena i absorpční spektra mezi 200–700 nm. Kvantifikace fenolů pak byla provedena integrací plochy pod hlavními separovanými píky výsledného chromatogramu v programu ChemStation a vynesena proti standardní křivce

získané kalibrační kyseliny gallové. Výsledný obsah fenolických látek byl tedy vyjádřen v ekvivalentech kyseliny gallové a vztažen na suchou hmotnost vzorku.

Fotosyntetické pigmenty byly detekovány systémem HPLC Agilent ChemStation 1200 vybaveným kolonou YMC Carotenoid C30 s rozměry 250×4,6 mm a velikostí částic 5 µm. Mobilní fázi zajišťovaly tři roztoky: (A) methanol; (B) 20% (v/v) methanol s 0,2% octanem amonným (w/v) a (C) *tert*-butylmethylether (MTBE). Teplota kolony byla nastavena na 25 °C, rychlost průtoku na 1ml/min a objem dávky vzorku činil 40 µl. Systém pak běžel následovně: 0-12 min: 95% A, 5% B, 0% C; 12 min: 80% A, 5% B, 15% C; pak pokračoval lineárním gradientem od 13 po 30 min do hodnot 30%A, 5% B, 65% C a v tomto poměru mobilních fází běžel až do 40 min. Následně byl po dobu 25 min systém očištěn prvním použitým roztokem – methanolem. Pigmenty byly detekovány pomocí DAD při 440 nm a jejich absorpční spektrum bylo zaznamenáno mezi 400 a 700 nm. Identifikace píků probíhala podle retenčních časů a absorpčních spekter. Kvantifikace pigmentů z důvodu problémů s kalibračními rovnicemi zde není zahrnuta.

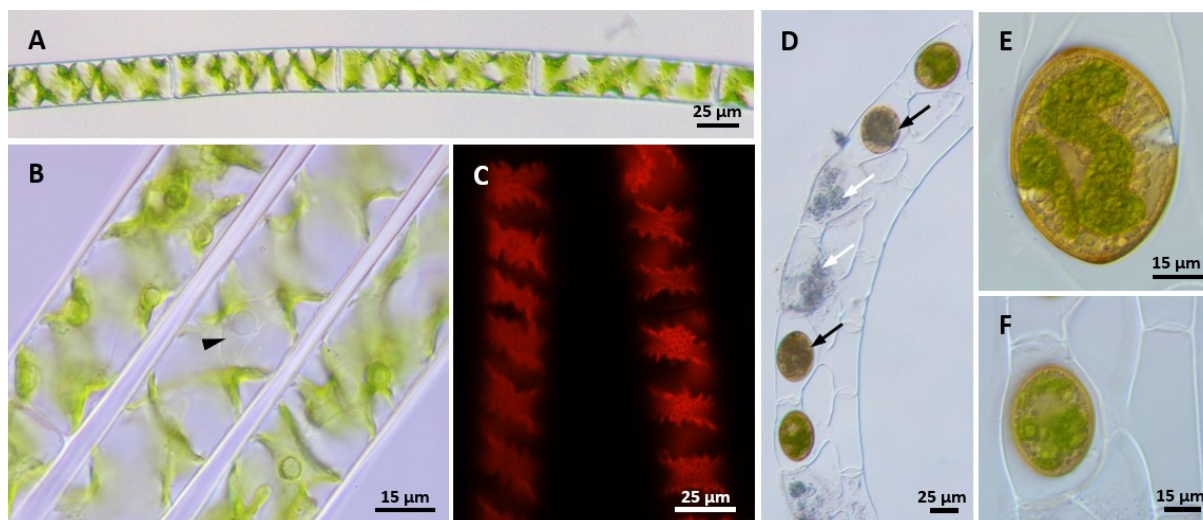
3.7.3 Folin–Ciocalteuova metoda

Zvážené lyofilizované vzorky na filtrech byly nadrceny na prášek v drtičce Retsch MM 400 s frekvencí 30/s za pomoci skleněných kuliček a následně extrahovány velmi podobným postupem a s využitím stejných chemikálií jako v případě analýzy pomocí HPLC. Extrakce v 5% ethanolu probíhala po dobu 12 hodin při 4 °C a mimo dosah světla. Následná kvantifikace byla provedena podle Aigner et al. (2013) s určitými modifikacemi. Z každého vzorku, případně standardu kyseliny gallové o definované koncentraci, bylo odebráno 0,25 ml a tento objem smíchán s 0,125 ml Folinova činidla (2M). Po 5 minutách bylo k reakční směsi přidáno 0,625 ml 20% Na₂CO₃ (w/v) a vzorky řádně protřepány. Zhruba po 40 minutách byla pomocí přístroje NanoDrop1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) změřena absorbance při vlnové délce 725 nm u blanku a všech standardů a vzorků (*n*=5). Z absorbance standardů pak byla sestavena kalibrační křivka, na jejímž základě bylo možné dopočítat obsah fenolů jakožto hmotnost ekvivalentů kyseliny gallové vztažených na suchou hmotnost vzorku.

4. Výsledky

4.1 Vegetativní a generativní morfologie

Izolovaný kmen řasy *Spirogyra* sp. zcela odpovídá svou morfologií charakteristice daného rodu (Obr. 10A). Vlákna jsou tvořena válcovitými buňkami o šířce 22,5–30 μm a variabilní délce 40–130 μm (v závislosti na fázi dělení buňky), které jsou od sebe odděleny plochými příčnými přehrádkami. V každé buňce se nachází jeden, případně méně často dva spirálovitě stočené páskovité chloroplasty, jejichž okraj je členěný do krátkých zubatých výběžků, což je zřetelné zejména při pozorování ve fluorescenčním mikroskopu (Obr. 10C). Tento znak je možné sledovat především u zdravých vláken, zatímco při stresových podmínkách často dochází k jeho ztrátě a chloroplast se jeví celokrajně. V chloroplastu je dále v pravidelných rozestupech přítomno několik pyrenoidů často s dobře patrnou škrobovou obálkou. Poměrně velké, kulovité jádro je uloženo v centrální části buňky a zavěšené na cytoplasmatickém můstku (Obr. 10B). Mimo tyto nejvýraznější buněčné orgány byly uvnitř buněk sledována různá mobilní tělíska, která však nebylo možné světelným mikroskopem blíže identifikovat. V některých případech byla zaregistrována tvorba rhizoidových výrůstků, kterými se vlákna pevně přichycovala ke stěnám plastových komůrek.

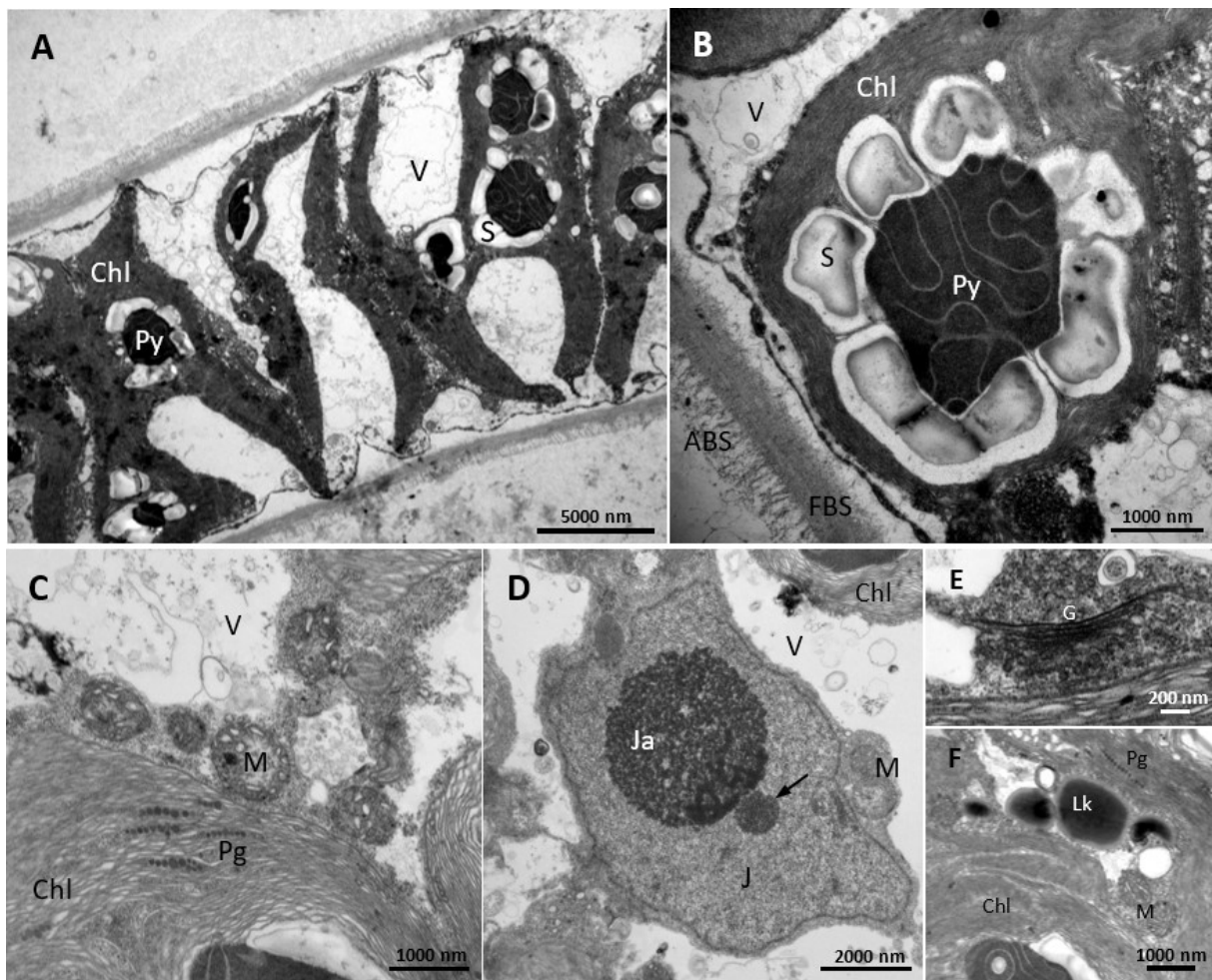


Obr. 10: Vegetativní a generativní morfologie izolovaného kmene *Spirogyra* sp.: (A) Mladé vegetativní vlákno s jedním chloroplastem na buňku. (B) Detail vegetativních vláken s dobře viditelnými pyrenoidy a jádrem umístěným v cytoplasmatickém můstku prostředního vlákna (černý trojúhelník). (C) Autofluorescence chlorofylu zvyrazňující strukturální detaily chloroplastového okraje. (D) Skalariformní konjugace mezi dvěma vlákny, nahnědlé zygospor bez známek zelených chloroplastů jsou ve fázi před svým kolapsem (černé šipky), zatímco zbytky disintegrovaných zygospor jsou již viditelné v některých gametangiích (bílé šipky). (E) Detail zygospory se silnou, vícevrstevnou mesosporou a kondenzovaným chloroplastem. (F) Detail konjugace a samičího gametangia se zygosporou.

Skalariformní konjugace a vznik zygospor byly v ojedinělých případech zaznamenány během rutinního prohlížení stavu kultur a také při experimentu s vyšší intenzitou světla. Mezi buňkami zpravidla dvou, ale i třech paralelně seřazených vláken docházelo ke vzniku konjugačních kanálků, na jejichž tvorbě se podílela pouze samčí gametangia (Obr. 10D). Samičí gametangia byla v různé míře zduřelá, ve všech případech značně konkávní na straně konjugačního kanálku, zatímco odvrácená strana byla v tomto ohledu více variabilní (obr. 10F). Vzniklé zygospory byly elipsovité až oválné, s rozměry 30–47 μm \times 42–64 μm . Uvnitř se nacházel zelený chloroplast a velké množství zásobních látek. Stěna zygospory byla vyvinutá, hnědá až oranžovohnědá, mesospora vícevrstevná – vnější oranžovohnědá a vnitřní béžová (obr. 10E). Při pozorování ve fluorescenčním mikroskopu byl kromě červené autofluorescence chloroplastu viditelný i slabší zelený signál vycházející z vlastní stěny zygospory. Žádné zygospory, které byly pozorovány, nikdy nedokončily svůj vývoj a krátce po vzniku odolné stěny docházelo k jejich samovolnému zániku (obr. 10D). Z tohoto důvodu nebylo možné určit s přesností charakter mesospor, který je klíčový pro druhovou determinaci.

4.2 Buněčná ultrastruktura

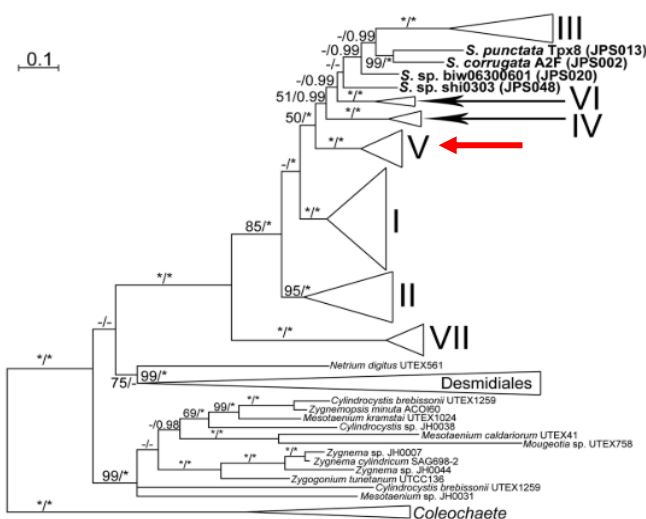
Na snímcích z elektronového mikroskopu je dobře patrný charakter buněčné stěny – vnější vrstva je slizovitá (amorfní) a vnitřní celulózní (fibrilární) (Obr. 11B). Příčné buněčné přepážky rozdělující jednotlivé buňky jsou pak tvořeny dvěma vrstvami fibrilární stěny, mezi nimiž se nachází střední lamela odlišné kompozice. V chloroplastu jsou četné, paralelně probíhající thylakoidní membrány, ale není zde patrné jejich navrstvení do granálních útvarů, což je dané zřejmě úhlem řezu, kterým byl preparát zhotoven. Některé z thylakoidů procházejí i napříč pyrenoidem, jež je velmi nápadnou, elektron-denzní strukturou uvnitř chloroplastu (Obr. 11B). Kolem něj se nachází často věnec několika samostatných škrobových zrn. Další zásobní látkou v plastidech jsou poměrně četné plastoglobuly, tj. kulovitá, lipidová tělíška uspořádaná za sebou nebo tvořící větší uskupení. V centru buňky je dále vidět jádro obalené dvojitou jadernou membránou a velmi nápadné jádérko (obr. 11D). Kolem jádra a plastidů je pak tenká vrstva cytoplasmy, kde se nacházejí četné mitochondrie, diktyozomy Golgiho aparátu, lipidové kapénky a váčky nejrůznější velikosti a charakteru (Obr. 11C–F). Zbytek buňky vyplňuje vakuola (Obr. 11A), která je vzhledem k cytoplasmě elektron-translucentní.



Obr. 11: Ultrastruktura vegetativních buněk: (A) Celkový pohled na podélný řez buňkou a chloroplastem s několika pyrenoidy. Ze snímku je patrná rovněž velká vakuola. (B) Detail pyrenoidu obklopeného obálkou z jednotlivých škrobových zrn, některé thylakoidy procházejí matrix pyrenoidu. (C) Detail chloroplastu a přiléhající části cytoplasmy obsahující četné mitochondrie. (D) Jádro s prominentním sférickým jadérkem a zvláštní neidentifikovanou strukturou (černá šipka). (E) Diktyzom Golgiho aparátu. (F) Lipidové kapénky v cytoplasmě. Použité zkratky ve fotografiích: ABS – amorfní buněčná stěna, FBS – fibrilární buněčná stěna, Chl – chloroplast, Py – pyrenoid, S – škrobové zrnko, Pg – plastoglobuly, M – mitochondrie, V – vakuola, J – jádro, Ja – jadérko, G – Golgiho aparát, Lk – lipidové kapénky.

4.3 Genetická charakteristika

Konsenzuální nukleotidová sekvence genu *rbcl* o délce 1260 nukleotidů byla porovnána s databází GenBank (NCBI) algoritmem BLAST a jako nejpodobnější (99,8 %, rozdíl 3 bází) byla určena sekvence náležící kmenu *Spirogyra* sp. nag 201 s nepřirazeným taxonomickým názvem (Takano et al., 2019). Oba kmeny spolu sdílejí podobnou šířku vláken (22–28 μm), počet chloroplastů na buňku (převážně 1), jež jsou oddělené plochými přehrádkami, avšak pohlavní rozmnožování u kmene nag 201 nebylo popsáno, a tak je další srovnání velmi limitované. V rámci linie *Spirogyra* náleží obě sekvence do cladu V (Obr. 12).



Obr. 12: Zjednodušený fylogenetický strom linie *Spirogyra* s vyobrazením vztahů mezi jednotlivými clady (I–VII) převzatý z Takano et al. (2019). Červená šipka indikuje příslušnost zkoumaného kmene v této práci. Strom byl konstruován na základě konkatenovaného datasetu genů *rbcl* a *atpB* (ML topologie). Čísla nad jednotlivými větvemi udávají bootstrapové hodnoty (>50 %) pro ML, případné posteriorní pravděpodobnost (0,90 a vyšší) pro BI.

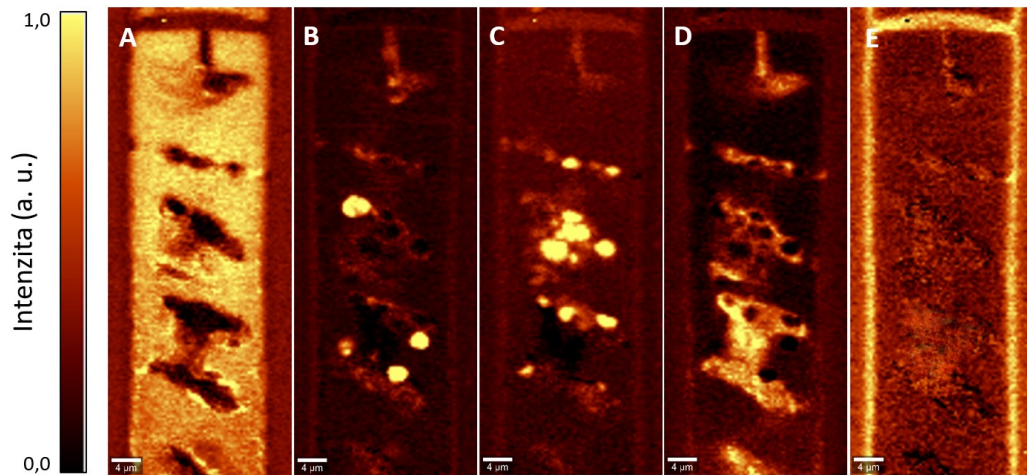
Zajímavé je, že kmen nag 201 byl odebrán z malého jezírka ve městě Nagano (Japonsko), tedy z místa vzdáleného od obce Kühtai více než 9000 km (měřeno vzdušnou čarou).

4.4 Chemická kompozice buněk

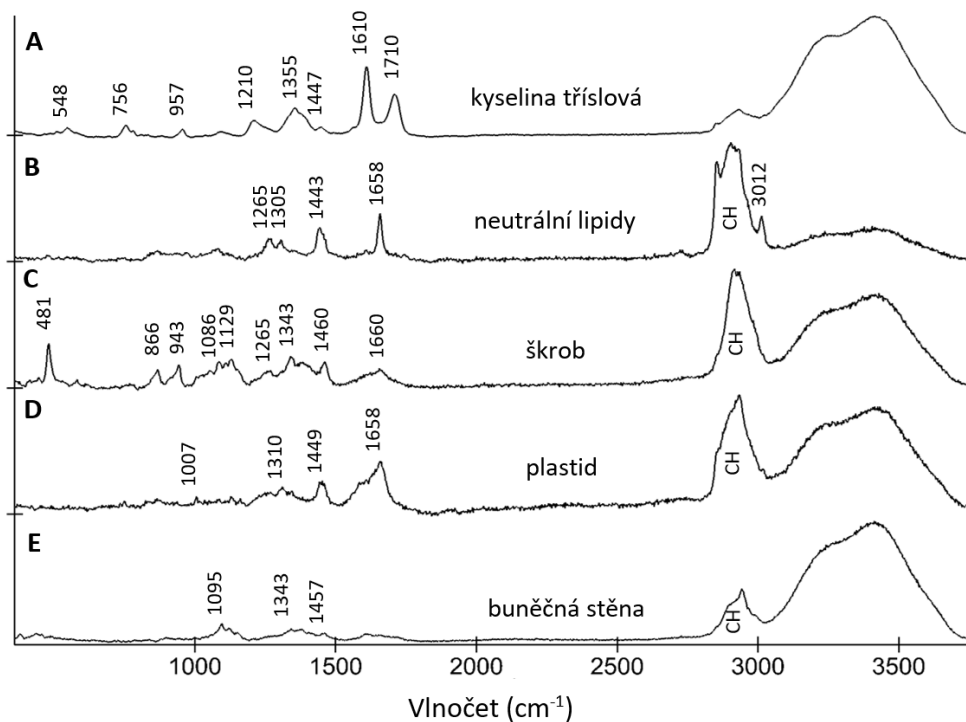
Detailní chemické složení buněk bylo určeno pomocí konfokální Ramanovy spektroskopie. Vzhledem k silné autofluorescenci, která významně interferuje s Ramanovým signálem, bylo nutné chloroplast před každým měřením pečlivě vybělit pomocí laseru zaostřeného mimo rovinu měření. To bylo poměrně obtížné zejména u mladě vypadajících buněk, které obsahovaly více chlorofylu. Vybělování u nich bylo zdlouhavé a během procesu nezdřídka docházelo k jejich spálení, čímž se staly nevhodnými pro navazující měření. Naopak velmi dobře a rychle byla autofluorescence potlačena u buněk se starší morfologií (viz dále).

V průběhu této práce bylo změřeno několik stovek bodových spekter a chemických map, které odhalily několik nezávislých Ramanových spekter příslušících konkrétním látkám, případně komplexnějším buněčným strukturám. Jejich identita byla následně určena porovnáním charakteristických pásů s publikovanou literaturou. Na obrázku 13A–E je k vidění několik exemplárních chemických map nejběžnějších buněčných komponent, které ilustrují intenzitu příslušného signálu a jeho lokalizaci v buňce. Kromě celulózní buněčné stěny a chloroplastu bylo možné od sebe odlišit i chemickou povahu zásobních tělísek – škrobová zrna s velmi charakteristickým pásem okolo 481 cm^{-1} a lipidová tělíska sestávající se z neutrálních lipidů, které obsahují jak nasycené mastné kyseliny (pásky 1305 , 1443 a $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$), tak i nenasyčené (1265 , 1658 , 3012 cm^{-1}). Z jejich chemické mapy je patrné, že se nalézají v blízkosti chloroplastu.

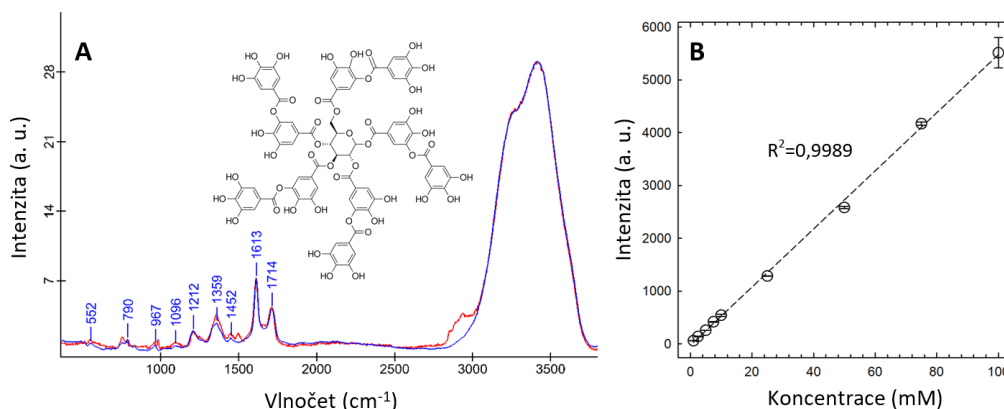
Dominantní buněčnou komponentu tvořila látka se spektrem 13A, s charakteristickým silným pásem kolem 1610 cm^{-1} a o něco slabším, ale stále velmi výrazným a širším pásem 1710 cm^{-1} . Mezi středně silné pásy náleží 1355 cm^{-1} a 1210 cm^{-1} a pak jsou zde další pásy, které při menší koncentraci látky nejsou dostatečně výrazné. Porovnáním tohoto neznámého spektra s literaturou a současně s ohledem na identifikované látky u řasy *Spirogyra* (např. Nishizawa et al., 1985) bylo jako nejpodobnější určeno Ramanovo spektrum příslušející kyselině tříslové (Espina et al., 2022; Huguenin et al., 2015; Pompeu et al., 2018). Změřením



Obr. 13: Ramanovy chemické mapy nejběžnějších buněčných komponent (nahore) a k nim příslušející Ramanova spektra (dole): (A) Kyselina tříslová (gallotaniny – fenolické látky) s relativně homogenní distribucí uvnitř buňky; (B) neutrální lipidy ve formě lipidických kapének; (C) škrobová zrna situovaná v chloroplastu; (D) chloroplast; (E) buněčná stěna. Intenzita signálu dané komponenty je v mapách zobrazena pomocí barevné škály. U Ramanových spekter je zobrazen i široký pás valenčních vibrací vody (zcela vpravo), který sloužil jako vnitřní intenzitní standard.



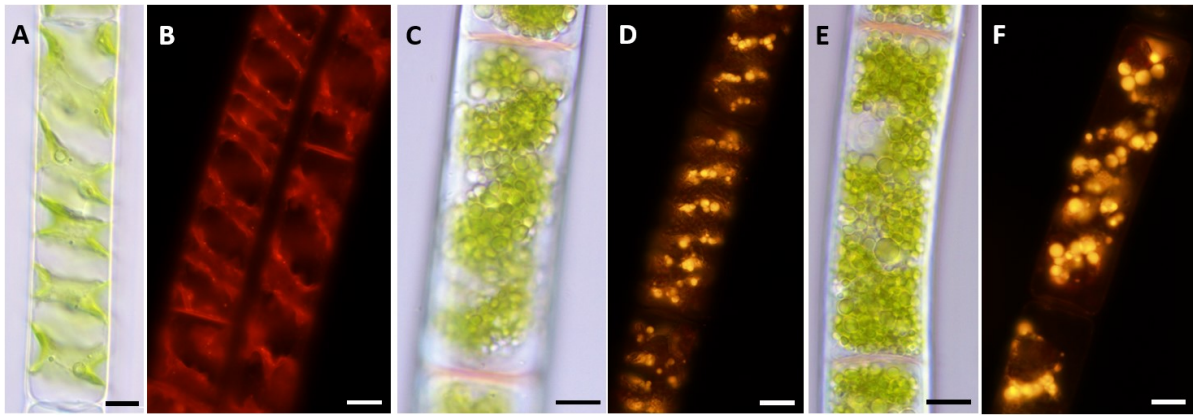
vlastního standardu této látky a porovnáním s Ramanovým spektrem naměřeným v buňkách většina pásů velmi dobře souhlasila (Obr. 14A). Protože intenzita Ramanova signálu je lineární s koncentrací dané látky, byla vytvořena koncentrační řada roztoků kyseliny tříslové, na jejímž základě byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 14B). Z příslušné Ramanovy chemické mapy je také patrné, že je signál kyseliny tříslové (fenolických látek) rozprostřen homogenně v celé buňce mimo chloroplast.



Obr. 14: (A) Porovnání Ramanova spektra 10 mM standardu kyseliny tříslové (modře) a spektra naměřeného v buňce mimo chloroplast (červeně) ukazuje velmi dobrou shodu jen s drobnými odchylkami (pás kolem 1500 cm^{-1} přísluší spektru jiné látky). Vložený strukturální vzorec zobrazuje kyselinu tříslovou, která se také řadí mezi gallotaniny. (B) Kalibrační křivka kyseliny tříslové, která byla využita pro kvantifikaci koncentrace fenolických látek během experimentů.

4.5 Postupné stárnutí buněk a jeho vliv na kvantitu fenolických látek

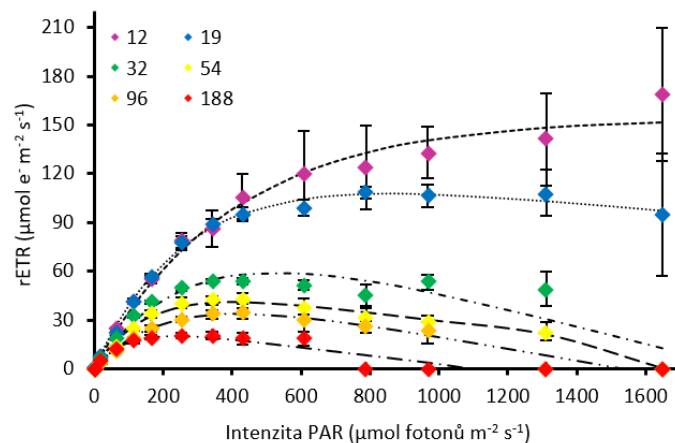
Morfologie mladých, čerstvě přeočkovaných buněk byla již charakterizována v první části této kapitoly. V buňkách nejsou téměř patrné žádné zásobní látky a fluorescenční barvení pomocí Nile Red odhalilo jen drobné a ojedinělé lipidové kapénky (Obr. 15A, B). S přibývajícím stářím kultury dochází k viditelným změnám – buňky akumulují škrobová zrna a lipidová tělíška, z počátku na úrovni chloroplastu (15C, D) a poté vyplňují celou buňku (15E, F). Charakter zásobních tělíšek bylo možné od sebe odlišit barvením pomocí Nile Red, která je specifická pro neutrální lipidy. Z fluorescenčních fotek je rovněž patrné, že také velikost tukových kapének se s přibývajícím stářím zvětšuje. Kromě mikroskopických projevů bylo možné pozorovat i makroskopické změny v morfologii vláken. Mladá, zdravá vlákna tvořila svazky, které se orientují směrem ke zdroji světla, zatímco starší vlákna svazky netvoří, ale jsou uspořádána v chomáčích bez znatelné reakce na světlo.



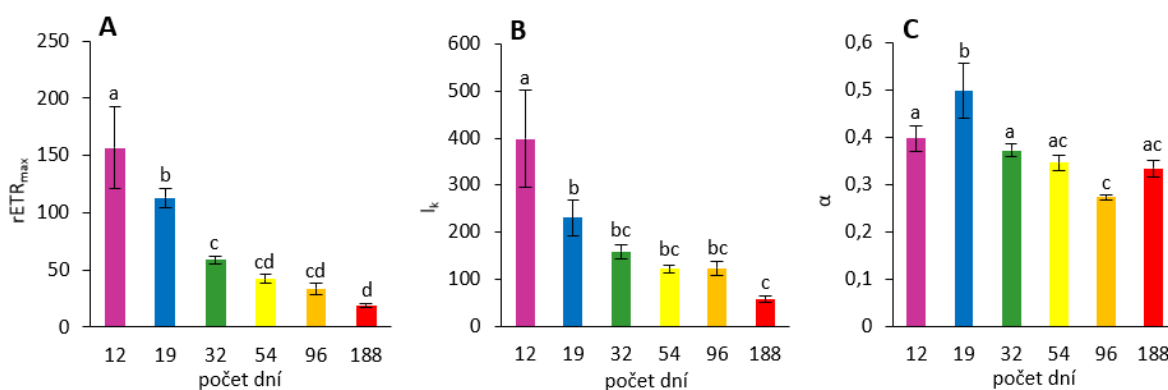
Obr. 15: Změny v morfologii vláken v závislosti na stáří kultury pozorované ve světelném (A, C, E) a fluorescenčním (B, D, F) mikroskopu se vzorkem barveným pomocí Nile Red. (A), (B) – 12 dní od přeočkování; (C), (D) – 96 dní; (E), (F) – 188 dní. Měřítka (A, C, E) 10 μm , (B, D, F) 15 μm .

Graf na obrázku 16, ve kterém je vynesena relativní elektronový transport jako funkce intenzity záření, odhalil jasné změny ve fotofyziologii sledované u jedné kultury v průběhu jejího stárnutí. Nejvyšší hodnota $rETR_{max}$ ($156,56 \pm 35,86 \mu\text{mol elektronů m}^{-2} \text{s}^{-1}$) byla naměřena u kultury v prvním bodě měření, tj. 12 dní od přeočkování, a s postupujícím stářím buněk se tento parametr poměrně rychle a kontinuálně signifikantně snižoval ($p < 0,05$) až na hodnotu $19,02 \pm 2,08 \mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ u kultury v čase 188 dní od přeočkování (Obr. 16A). Současně u kultury v nejmladší fázi nebyla ani při nejvyšších hodnotách PAR pozorována fotoinhibice, tj. pokles křivky v důsledku saturace fotosyntetického elektronového transportního řetězce. Kultura v čase 19 dní od přeočkování vykazuje rovněž relativně vysokou hodnotu $rETR_{max}$ ($113,05 \pm 8,30 \mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ale při světelné intenzitě nad $800 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ již dochází k fotoinhibici. Kultura v časových bodech 32, 54 a 96 dní se vzájemně svou hodnotou $rETR_{max}$ signifikantně neliší a pokles křivky je patrný zhruba od $400 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, zatímco u nejstarší kultury (188 dní) nastává nad $250 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Velmi podobný trend je možné sledovat také u koeficientu minimální saturační ozáření I_k (Obr. 16B), který je signifikantně nejvyšší u kultury krátce po přeočkování ($398,33 \pm 102,51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($p < 0,01$)

Obr. 16: Vliv zvyšující se intenzity fotosynteticky aktivního záření (PAR) na míru relativního elektronového transportu (rETR) měřeného u jedné a té samé kultury v různých časových bodech (12, 19, 32, 54, 96 a 188 dní) od přeočkování ($n=4$, průměrné hodnoty \pm SD). rETR křivky byly fitovány podle modelů práce Walsby (1997) nebo Webb (1974) v závislosti na výskytu fotoinhibice.

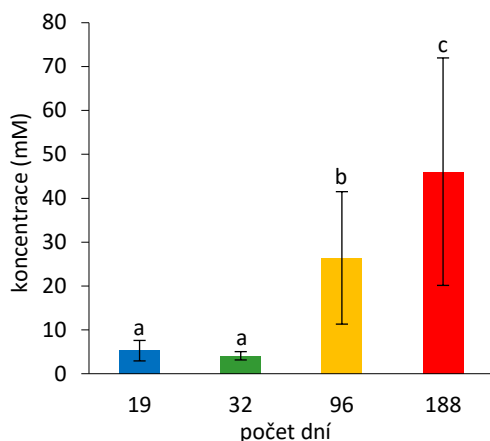


a s přibývajícím stářím klesá až k hodnotám $57,20 \pm 7,35 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Počáteční směrnice rETR křivky v oblasti limitované světlem, parametr α , se s přibývajícím stářím kultury rovněž snižuje, ale tento trend není tak výrazný (Obr. 16C). Signifikantně nejvyšší hodnotu α ($0,50 \pm 0,06$ elektron foton $^{-1}$) má kultura 19 dní od přeočkování ($p < 0,01$), zatímco nejnižší α ($0,27 \pm 0,01$ elektron foton $^{-1}$) má kultura v časovém bodě 96, která se ale signifikantně neodlišuje od kultury měřené v časovém bodě 54 a 188.



Obr. 16: Parametry odvozené z rETR křivek. (A) Maximální relativní elektronový transport $rETR_{max}$ ($\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (B) koeficient minimální saturační ozáření I_k ($\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (C) iničiální směrnice rETR křivky ve světlem limitované oblasti α (elektron foton $^{-1}$). Počet opakování $n=4$, průměrné hodnoty \pm SD. Signifikance mezi jednotlivými měřeními byla testována pomocí jednorozměrné ANOVy následované Tukeyho testem, $p < 0,05$. Datové soubory, které spolu nesdílí společné písmeno, se svými hodnotami liší signifikantně.

Pomocí Ramanovy spektroskopie byla v časových bodech 19, 32, 96 a 188 dní od přeočkování změřena koncentrace fenolických látek (Obr. 17). Nejnižší molární koncentrace byly naměřeny u mladých vláken 19 a 32 dní od přeočkování bez vzájemného signifikantního rozdílu. Jejich průměrné hodnoty koncentrací činily $5,25 \pm 2,35$ mM, resp. $4,1 \pm 0,94$ mM. S přibývajícím stářím molární koncentrace kyseliny tříslové v buňkách signifikantně vzrostla ($p < 0,01$), a to jak v časovém bodě 95, tak i po 188 dnech a tento nárůst byl signifikantní i mezi těmito dvěma časovými body ($p < 0,01$). Průměrná molární koncentrace u 95 dní starých vláken byla stanovena na $26,41 \pm 15,10$ a u nejstarších $46,05 \pm 25,91$ mM.

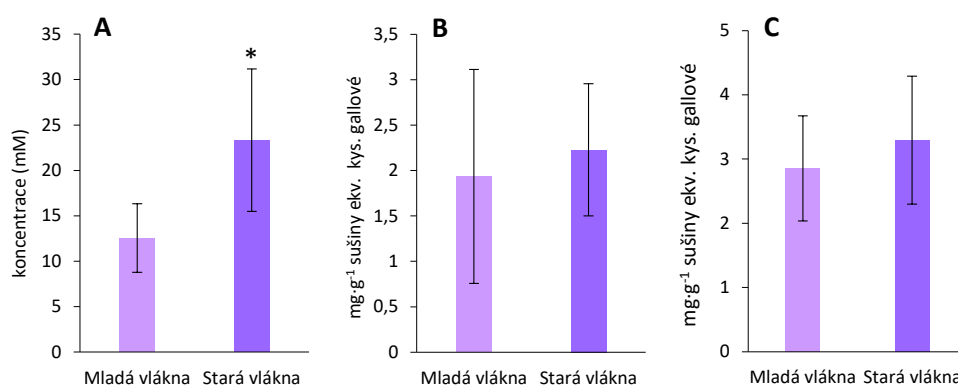


Obr. 17: Změny v molární koncentraci fenolických látek stanovené u jedné kultury v průběhu jejího stárnutí – měřeno v časových bodech 19 ($n=12$), 32 ($n=12$), 96 ($n=33$) a 188 ($n=31$) od přeočkování do čerstvého média. Rozdíly mezi skupinami byly analyzovány jednorozměrnou analýzou rozptylu a Tukeyho testem ($p < 0,01$).

4.6 Rozdíl v kvantitě fenolických látek mezi mladými a starými kulturami

V tomto experimentu byl stanovován rozdíl v hladině fenolických látek přímo mezi kulturami s mladými vlákny a kulturami starými 70 dní. Nicméně při pozorování ve světelném mikroskopu bylo patrné, že většina vláken z „mladých“ kultur odpovídá svojí morfologií spíše vláknům v pokročilejším stupni stárnutí, tj. s více zásobními látkami v buňkách. Ve všech třech způsobech stanovení (pomocí Folin–Ciocalteuovy reakce, HPLC a Ramanovy spektroskopie) byl rozdíl mezi datovými soubory relativně malý a v některých případech byla velmi vysoká i variabilita v hladině fenolů.

Ramanovou spektroskopií (Obr. 18A) byla zjištěna vysoká variabilita zejména ve starších vláknech, ale zároveň v porovnání s předchozím experimentem mladá vlákna obsahovala relativně vyšší koncentraci fenolických látek ($12,99 \pm 5,99$ mM) než vlákna v časovém bodě 19 a 32 dní od přeočkování (viz předchozí kapitola). Ovšem po odstranění extrémních hodnot, tj. minimálních a maximálních koncentrací z obou souborů dat, vychází rozdíl statisticky signifikantně ($p < 0,01$) s hodnotami koncentrací $12,56 \pm 3,78$ mM pro mladá kultury a $23,34 \pm 7,85$ mM pro staré.



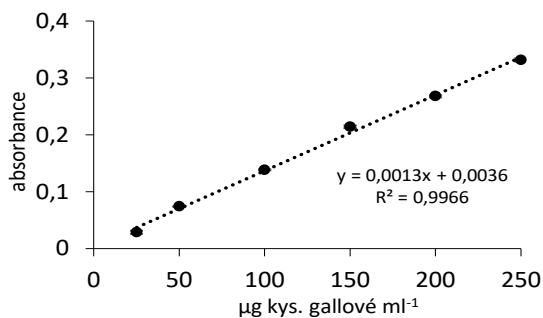
Obr. 18: Rozdíl v hladině fenolických látek mezi mladými a starými kulturami stanovený pomocí (A) Ramanovy spektroskopie, (B) Folin–Ciocalteuovy metody, (C) vysokoučinné kapalinové chromatografie. Počet opakování: A ($n=7$ pro mladá vlákna, $n=17$ pro stará vlákna), B ($n=6$, $n=4$), C ($n=5$). Signifikance byla ověřena pomocí dvouvýběrového t -testu ($p < 0,01$) a v grafu je vyznačena hvězdičkou.

Přes zjevně podobný trend u zbylých dvou metod statisticky signifikantní rozdíl u nich nebylo možné prokázat. Po sestavení kalibrační křivky kyseliny gallové (Obr. 19) bylo množství fenolických látek vypočítáno z příslušných hodnot absorbancí naměřených Folin–Ciocalteuovou metodou a vyneseno do grafu na Obr. 18B. Mladá vlákna vykazovala relativně vysoké hodnoty fenolů, které byly rovněž provázány extrémní variabilitou. Relativně vysoké hodnoty fenolů byly u mladých kultur naměřeny i pomocí HPLC (Obr. 18C). Porovnáním těchto dvou metod, které byly provedeny stejným způsobem a s využitím podobných

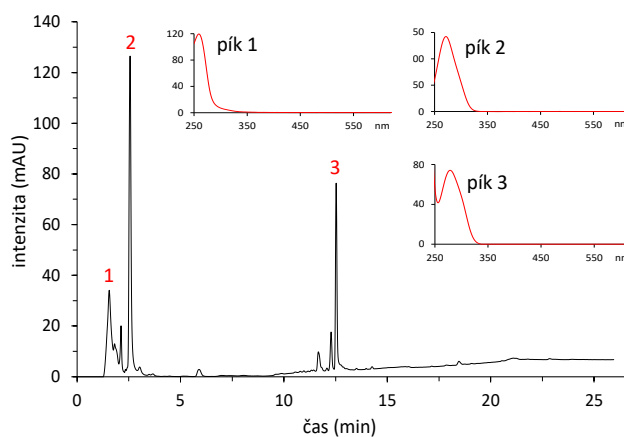
chemikálií, je patrné, že obsah fenolických látek u Folin–Ciocalteuovy reakce v obou datových souborech nižší než při stanovení pomocí HPLC.

Na Obr. 20 je zobrazen reprezentativní HPLC chromatogram fenolických látek, ze kterého je možné vyčíst přítomnost několika individuálních sloučenin lišících se vzájemně svojí chemickou strukturou. Všechny tyto látky vykazovaly podobná absorpční spektra, s maximem v UV-B oblasti a některé zasahující i částečně do UV-A. U žádné sloučeniny však nebyla pozorována absorpce ve viditelné části spektra.

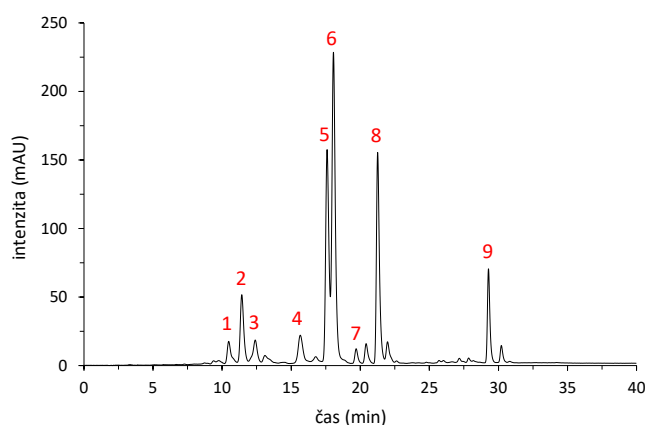
Prostřednictvím HPLC bylo rovněž identifikováno složení fotosyntetických pigmentů (Obr. 21). Vzhledem k technickým problémům s HPLC přístrojem byly lipofilní extrakty analyzovány až s určitým odstupem, během kterého došlo k degradaci některých pigmentů, což činilo následné vyhodnocení komplikovanější. Přesto se všechny klíčové pigmenty podařilo podle jejich retenčních časů a absorpčních spekter identifikovat, konkrétně chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a z karotenoidů neoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin, lutein a jeho epoxidovaný derivát taraxanthin a β -karoten.



Obr. 19: Kalibrační křivka kyseliny gallové využitá pro kvantifikaci fenolických látek metodou Folin–Ciocalteu ($n=5$, průměrné hodnoty \pm SD).



Obr. 20: Reprezentativní HPLC chromatogram fenolických látek detekovaných při vlnové délce 280 nm u jedné ze starých kultur. Pro nejvýraznější píky je vloženo i jejich absorpční spektrum v rozmezí od 250 do 650 nm.



Obr. 21: Reprezentativní HPLC chromatogram fotosyntetických pigmentů detekovaných při 440 nm: (1) neoxanthin, (2) violaxanthin, (3) taraxanthin (lutein-5,6-epoxid), (4) antheraxanthin, (5) chlorofyl *b*, (6) lutein, (7) zeaxanthin, (8) chlorofyl *a*, (9) β -karoten. Ostatní píky nebylo možné identifikovat, nebo se jednalo o degradované formy pigmentů.

4.7 Stresové podmínky a jejich vliv na koncentraci fenolických látek

Vzhledem k tomu, že vlákna se starší morfologií buněk vykazují vedle akumulace zásobních tělísek i vyšší fenolický obsah, byl tento poznatek brán v úvahu a během stresových reakcí byla vyvinuta velká snaha o počáteční mladý stav buněk. To se ukázalo být v mnoha případech komplikované, protože v kultivačních nádobách se tyto dva typy vláken často vyskytují spolu a pojí je dohromady sliz, který buňky produkují. Z toho důvodu byly některé experimenty opakovány, aby byl počáteční morfologický a fyziologický charakter buněk mezi opakováními stejný. Současně se ukázalo být poněkud obtížné zdánlivě banální rozdělení biomasy z tekutého média do čtyř opakování pro kontrolu a stresové podmínky. K tomu bylo zapotřebí poměrně velké množství biomasy, kterého bylo v kultivačních nádobách dosaženo jen málokdy. Navíc mladá vlákna tvořila dobře spojené slizové svazky, které bylo pracné oddělit od sebe za uchování sterilních podmínek.

4.7.1 Vysokoteplotní stres

Porovnáním s kontrolou při stresu vyvolaném vysokou teplotou 30 °C vlákna na konci experimentu vykazovala změny v morfologii, které jsou dobře viditelné na Obr. 22A. U mnoha buněk byl spirálovitý chloroplast rozvolněn a nezděná se objevovaly i jakési kulaté nebo oválné „zelené bubliny“, jež byly někdy uspořádané i ve větším počtu ve shlucích nebo v řadě za sebou. Přes tyto abnormality však maximální kvantový výtěžek coby indikátor stresu vycházel u stresového faktoru stabilně vyšší než u kontroly, a to až do konce experimentu ($0,53 \pm 0,05$ pro vysokou teplotu vs. $0,40 \pm 0,01$ pro kontrolu) (Obr. 23A). Rozdíl průměrných molárních koncentrací fenolických látek mezi datovými soubory činil 2,75 mM, ale variabilita ve vzorcích vystavených vysoké teplotě byla velmi vysoká ($SD \pm 10,93$) (Obr. 23B), proto efekt vysoké teploty nebyl statisticky podpořen ($p=0,25$).

4.7.2 Nízkoteplotní stres

Určitá stresová zátěž byla zjištěna u vláken vystavených nízké teplotě 4 °C. Z grafu vývoje maximálního kvantového výtěžku na Obr. 23C je patrný pokles tohoto parametru u stresového faktoru na průměrných 51 % původní hodnoty (zhruba $0,27 \pm 0,01$), který vytrval až do konce experimentu. Žádné zásadní rozdíly v morfologii mezi kontrolou a vzorky vystaveným nízké teplotě však nebyly pozorovány (obr. 22B). Přes relativně nízký rozdíl v koncentraci fenolů (3,71 mM) mezi datovými soubory byl efekt nízké teploty statisticky signifikantní ($p < 0,01$) (obr. 23D).

4.7.3 Světelný stres

V experimentu se zvýšenou intenzitou světla ($430 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) došlo po 10 dnech k signifikantnímu nárůstu ($p < 0,01$) v koncentraci fenolických látek z průměrné hodnoty $5,35 \pm 2,29 \text{ mM}$ na $10,70 \pm 6,65 \text{ mM}$ (obr. 23F). U vzorků vystavených vyšším dávkám záření klesl maximální kvantový výtěžek F_v/F_m 3. den na průměrných 60 % ($0,36 \pm 0,05$) původní hodnoty a dále se snižoval až na finálních 43 % ($0,26 \pm 0,03$), zatímco u kontrolních vláken zůstal parametr F_v/F_m na původní hodnotě ($0,62 \pm 0,02$) (obr. 23E). Na konci experimentu vypadaly buňky velmi podobně jako kontrolní, bez změn v jejich morfologii, případně morfologií plastidů (obr. 22C). Zajímavé je, že ve všech čtyřech opakováních vystavených zvýšené intenzitě světla došlo ke skalariformní konjugaci mnoha vláken, jejímž produktem byly zygosporý v mateřském gametangiu. Naopak u kontrolních vzorků nebylo pozorováno jediné pohlavně se rozmnožující vlákno. Avšak žádná ze zygospor, jak již bylo popsáno v kapitole 4.1, nevyklíčila a během svého zrání samovolně zanikala.

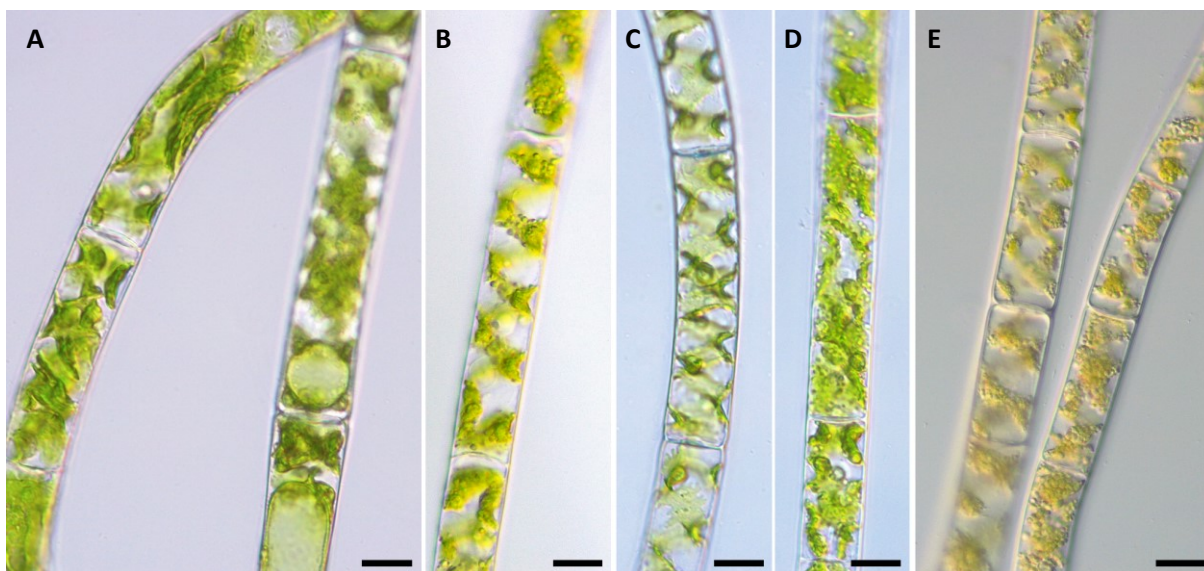
4.7.4 Osmotický stres

S využitím 10% (w/v) roztoku polyethylenglykolu-6000 v BBM médiu byl u buněk vyvolán osmotický stres. Tato koncentrace byla zvolena po předcházejícím pilotním pokusu s koncentrační řadou zahrnující koncentrace PEG 0, 5, 10, 20 a 30 %, kdy u nejvyšších koncentrací byly buňky po 8 dnech ve velké míře poškozené a plasmolyzované. Z poklesu parametru F_v/F_m je určitý stres u 10% PEG také patrný – hodnota na konci experimentu se rovnala 59 % původní hodnoty, tj. $0,45 \pm 0,04$ (obr. 23G), ovšem nevedl k drastickým změnám v morfologii buněk a chloroplastu (obr. 22D) a plasmolýza byla pozorována jen zřídka. V mnoha vláknech se také začaly objevovat drobná tělíška, která na počátku experimentu byla pozorována jen ojediněle a v kontrolních vzorcích přítomná nebyla. Rozdíl v průměrné koncentraci fenolických látek mezi kontrolou a vzorky vystaveným osmotickému stresu byl $6,62 \text{ mM}$ (Obr. 23H) a efekt byl prokázán jako statisticky signifikantní ($p < 0,001$).

4.7.5 Stres z UV-B záření

Při experimentu s UV-B, kterému byla vlákna vystavena denně 30 minut, byla využita velmi vysoká intenzita, která se v přirozených podmínkách nevyskytuje. Silná stresová reakce byla reflektována značným poklesem maximálního kvantového výtěžku F_v/F_m hned po dvou dnech na 42 % původní hodnoty (vyjádřeno absolutně: $0,27 \pm 0,02$ z původních $0,64 \pm 0,03$), který se dále kontinuálně snižoval až na finálních 16 % ($0,10 \pm 0,06$), přičemž u jednoho opakování nebyla 10. den fluorescence vůbec detekovatelná (obr. 23I). Nemalá část buněk byla viditelně poškozená či s téměř prázdným buněčným obsahem, ale buňky, které silný stres

přežily, vykazovaly v buňkách vyšší zastoupení tělísek podobně jako buňky vystavené osmotickému stresu (obrázek není k dispozici). Efekt UV-B záření byl statisticky signifikantní ($p < 0,01$), s rozdílem koncentrací mezi soubory 11,84 mM. Průměrná hodnota molární koncentrace u UV-B ošetřených vláken dosahovala $19,43 \pm 12,87$ mM v porovnání s $7,59 \pm 4,30$ mM u kontrolního datasetu. Variabilita hodnot u stresového faktoru byla vysoká, nejnižší zaznamenaná koncentrace byla 3,20 mM a nejvyšší 53,15 mM (obr. 23J).

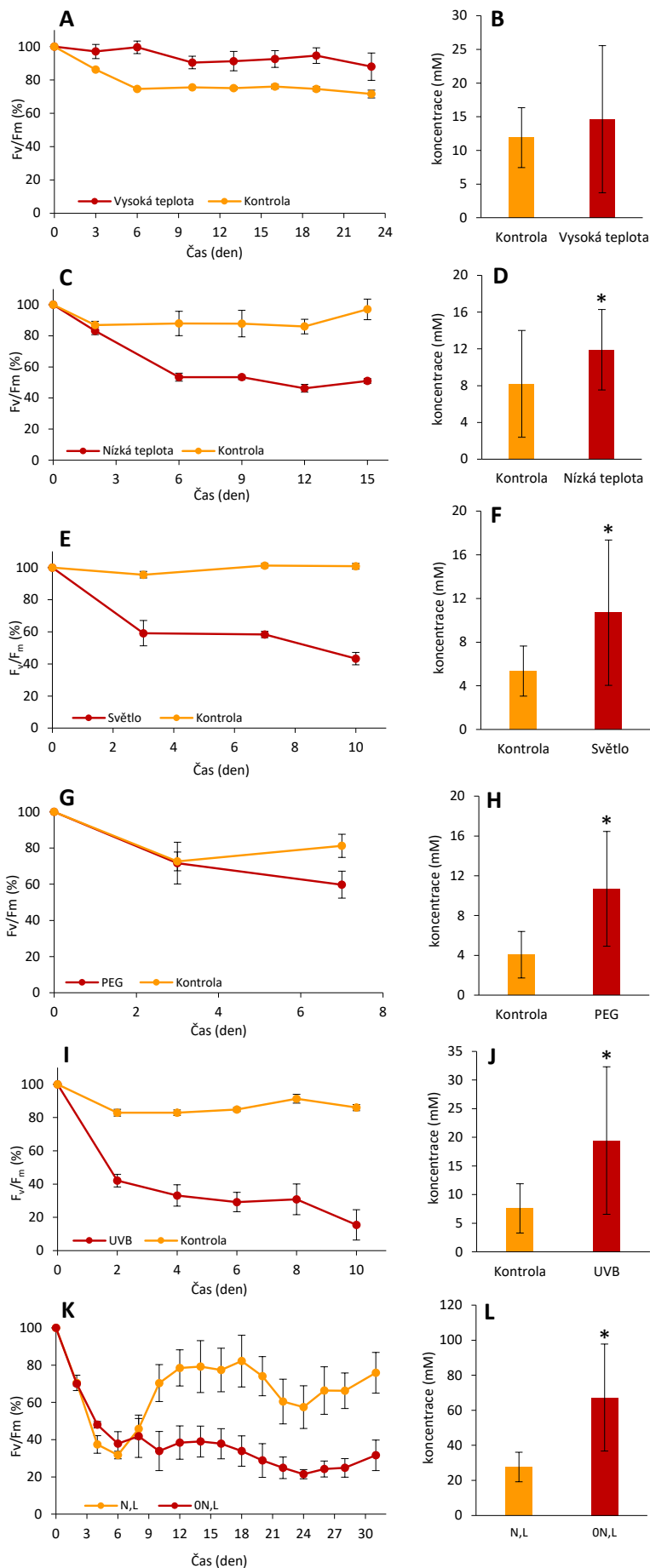


Obr. 22: Morfologie vláken na konci jednotlivých experimentů ilustrující buněčné změny především na úrovni chloroplastů a v přítomnosti drobných tělísek: (A) vysoká teplota; (B) nízká teplota; (C) vyšší ozáření; (D) osmotický stres; (E) absence dusíku (morfologie vláken kultivovaných v médiu s NaNO_3 byla velmi podobná). Měřítka 20 μm .

4.7.6 Absence dusíku

Z původně komplexnějšího experimentu kombinujícího nízkou a vysokou intenzitu PAR a přítomnost, resp. absenci zdroje dusíku (NaNO_3), byly ve finále použitelné pouze vzorky vystavené vysokým dávkám světla ($430 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), které se vzájemně lišily přítomností dusíku v živném médiu. V prvních dnech se u obou vzorků podobným způsobem projevil stres ze silné intenzity světla, kdy F_v/F_m kontinuálně klesal až na průměrných 32 % původní hodnoty u vzorků s dusíkem a 38 % u vzorků bez dusíku. Následně však u vzorků, které měly k dispozici zdroj dusíku, došlo k částečné obnově F_v/F_m a přes vyšší míru variability dosahoval tento parametr na konci experimentu průměrných hodnot 76 % ($0,33 \pm 0,06$). V kontrastu s tím se u vláken kultivovaných v médiu bez dusíku maximální kvantový výtěžek nezvýšil a byl relativně stabilně nízký (zhruba 32 %) až do měření kvantity fenolů (obr. 23K). Vlákná z obou typů ošetření byla viditelně žlutější barvy pozorovatelné na makroskopické i mikroskopické úrovni, ale u vzorků kultivovaných bez dusíku bylo přítomno i velké množství tmavých vláken, které se ukázaly být mrtvými buňkami. Společným výrazným buněčným charakterem kromě

nažloutlého chloroplastu, kterého bylo možné velmi dobře při Ramanově spektroskopii vybělovat, byla početná zásobní tělíska kolem chloroplastu (Obr. 22E). Molární koncentrace fenolických látek byly v obou vzorcích relativně vysoké (Obr. 23L), s průměrnými hodnotami $27,65 \pm 8,48$ mM pro buňky v médiu s dusíkem a $67,28 \pm 30,48$ mM pro buňky kultivované bez dusíku. Velmi vysoké hodnoty byly naměřeny zejména v buňkách, které se vyznačovaly velmi aktivním pohybem buněčného obsahu. Tyto buňky byly pozorovány pouze v některých vláknech kultivovaných bez NaNO_3 a jejich hodnoty přesahovaly molární koncentrací i 100 mM. Nejvyšší zaznamenanou koncentrací byla hodnota 158,25 mM, což byla maximální hodnota vůbec naměřená během celé diplomové práce. Průměrný rozdíl koncentrací mezi datovými soubory byl 39,62 mM a prokázal se být statisticky signifikantní ($p < 0,001$).



Obr. 23: Souhrn grafů vztahujících se k experimentům se stresovými faktory: **A, B** – vysoká teplota; **C, D** – nízká teplota; **E, F** – vysoká ozářenost; **G, H** – osmotický stres; **I, J** – UVB záření; **K, L** – absence dusíku. Grafy v levém sloupci ilustrují průběh maximálního kvantového výtěžku F_v/F_m v čase (indikátor míry stresu, průměrné hodnoty \pm SD), zatímco sloupcové grafy vpravo kvantitu fenolických látek stanovenou pomocí Ramanovy spektroskopie a vyjádřenou v jednotkách molární koncentrace kyseliny tříslové (průměrné hodnoty \pm SD). Počet opakování pro jednotlivé experimenty byl variabilní a je zmíněn v metodice experimentu. Signifikance efektu stresového faktoru na koncentraci fenolů byla analyzována pomocí dvouvýběrového t-testu ($p < 0,01$) a v grafech je vyznačena hvězdičkou.

5. Diskuze

5.1 Identifikace kmene a vznik zygospor

Konjugující vlákna společně se zralými zygosporami jsou v přírodních vzorcích relativně zřídka nacházena, což v souvislosti s jejich kritickým významem pro druhovou determinaci působí značné potíže (např. McCourt et al., 1986; Sherwood et al., 2018; Stancheva et al., 2013). Zcela klíčovým znakem je ornamentace mesospory v době její zralosti, zatímco jiné znaky, například tvar a velikost zygospor nebo míra zvětšení mateřského gametangia, jsou poměrně plastické (Pouličková et al., 2007; Schagerl & Zwirn, 2015), což bylo potvrzeno i v této práci. Vzhledem k tomu, že zygospory byly pozorovány výhradně ve svém nezralém stavu, nebylo možné s využitím identifikačního klíče izolovanému kmeni řasy *Spirogyra* přiřadit druhový název z hlediska tradiční taxonomie.

Na základě genetické analýzy s využitím genu pro *rbcL* byl kmen přiřazen do cladu V do blízké příbuznosti kmene nag 201. V rámci tohoto cladu se nachází řada identifikovaných druhů většinou s 1–2 chloroplasty, plochými příčnými přepážkami a relativně úzkými vlákny, což jsou charakteristiky společné pro kmen nag201 i kmen této práce. Nicméně tyto vegetativní znaky jsou velmi nespecifické a vyskytují se i v mnoha jiných cladech (s výjimkou cladu VII) (Drummond et al., 2005; Stancheva et al., 2013; Takano et al., 2019). Samotný nag201, izolovaný z malé tůňky poblíž města Nagasaki v Japonsku, nebyl morfologickým přístupem určen (Takano et al., 2019), tudíž ani touto cestou nebylo možné kmeni této práce přiřadit druhové jméno. Nejbližším pojmenovaným kmenem je *S. varians* chi0102 (Takano et al., 2019), ale jeho sekvence se liší již ve 21 bázích (98% podobnost).

Pro účely této práce nebylo druhové určení nezbytně nutné. Rod *Spirogyra* je velmi komplexní rod, u kterého stále probíhá taxonomická revize komplikovaná stovkami tradičně definovaných druhů na jedné straně a množstvím geneticky charakterizovaných kmenů bez přiřazeného druhového názvu na druhé (Chen et al., 2012; Drummond et al., 2005; Sherwood et al., 2018; Stancheva et al., 2013; Takano et al., 2019). Podobná situace se nachází i u dalších vláknitých spájivek (Pichrtová et al., 2018; Stancheva et al., 2012), ale pro potřeby experimentálních studií nemá druhový název velký význam a je tedy možné pracovat i s kmeny bez přiřazeného taxonomicky platného jména (Holzinger et al., 2018; Pichrtová et al., 2013).

Důvod, proč zygospory podléhaly samovolné desintegraci, nebylo možné v rámci této práce objasnit. Je však možné, že izolovaný kmen je ve skutečnosti heterotalický (Takano et al., 2020), schopný se pohlavně rozmnožovat, ale inkompatibilita se projevuje až na úrovni

formujících se zygospor. Podmínky, při kterých k pohlavnímu rozmnožování docházelo, jsou rovněž složitě uchopitelné. Světelná intenzita společně s limitací dostupnosti dusíku jsou považovány za nejčastější indukční faktory (Permann et al., 2021b; Simons et al., 1984; Takano et al., 2019; Zwirn et al., 2013), ale nízká úspěšnost laboratorních experimentů poukazuje spíše na interakci několika vnějších faktorů (Simons et al., 1984; Zwirn et al., 2013) a případně i roli vnitřních (Permann et al., 2021b). V této práci byly konjugující vlákna se zygosporami pozorovány na konci experimentu se zvýšenou intenzitou ozáření (10. den), který byl proveden během září, zatímco v dalším, který kombinoval zvýšenou míru ozáření s přítomností, resp. absencí dusíkatého zdroje a byl měřen během března, ke konjugaci nedošlo. Permann et al. (2021b) indukovali konjugaci kultivací na agarových miskách s médiem chudým na živiny a se současnou expozicí zvýšené intenzitě světla u druhu *S. mirabilis*, který byl izolován ze stejného alpinského prostředí jako kmen této práce (Kühtai, Stubaiské Alpy), ale geneticky náleží do odlišného cladu (IV). Úspěšnou konjugaci však bylo možné popsány podmínkami vyvolat pouze v jarním období, zatímco dále během sezóny indukce nebyla úspěšná, což je zcela v kontrastu s experimenty v této práci. Nicméně je nutné zmínit, že vznik zygospor byl pozorován i v kulturách během května nezávisle na provedených experimentech, což poukazuje na nepodchycené faktory, které hrají roli v pohlavním rozmnožování spájkivých řas.

5.2 Využití Ramanovy spektroskopie ke kvantifikaci a lokalizaci fenolických látek

V této diplomové práci byla konfokální Ramanova spektroskopie využita zcela poprvé ke kvantifikaci fenolických látek přímo na buněčné úrovni, a to na modelu spájkivé řasy *Spirogyra*. Stanovení množství fenolů bylo doposud touto metodou provedeno pouze u extraktů z rostlinného materiálu (Numata & Tanaka, 2011; Zheng et al., 2017), sušených vzorků (Baranska et al., 2006) nebo potravinářských produktů, například vín (Gallego et al., 2011), ale nikoliv samotných buněk. Pro ekofyziologii spájkivých řas je tato metoda kvantifikace rovněž nová. Ve většině studií je hladina fenolů determinována pomocí spektrofotometrické metody Folin–Ciocalteu využívající kolorimetrickou reakci s F–C činidlem (Aigner et al., 2013; Figueroa et al., 2009; Han et al., 2012), případně s využitím více specifické vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Aigner et al., 2013; Holzinger et al., 2018; Pichrtová et al., 2013).

Jako vhodný standard pro kvantifikaci fenolických látek u řasy *Spirogyra* byla zvolena látka s komerčním názvem kyselina tříslová (Obr. 14A), která je komplexním gallotaninem s deseti molekulami kyseliny gallové na centrální molekulu glukózy (penta-*m*-digalloyl- β -D-glukóza) (Díaz Hidalgo et al., 2018). To je v kontrastu s ostatními metodami,

Folin–Ciocalteuovou reakcí, tak i HPLC, kde je jako standard při stanovení celkového obsahu fenolických látek široce využívána kyselina gallová (Aigner et al., 2013; Singleton et al., 1999). Ramanovo spektrum vycházející z prostoru měřených buněk však přes určité společné rysy Ramanovu spektru roztoku kyseliny gallové zcela neodpovídá (Espina et al., 2022; Huguenin et al., 2015). Mezi sdílené pásy náleží především výrazný pás kolem 1610 cm^{-1} , který poukazuje na aromatický charakter látek (symetrické C–C valenční vibrace fenylu) a relativně široký pás s píkem kolem 1355 cm^{-1} , který je u kyseliny gallové užší, ale v obou případech odpovídá deformačním vibracím C–OH ve fenolové skupině. V Ramanově spektru vodného roztoku kyseliny gallové se však objevují další pásy, které přísluší vibračním módům karboxylové skupiny, která se v gallotaninech vzhledem k její esterifikaci (reakci mezi karboxylovou a hydroxylovou skupinou) nevyskytuje. Naopak pro kyselinu tříslovou je typický pás kolem 1710 cm^{-1} , který je o něco slabší a širší než 1610 cm^{-1} , a další menší, ale stále poměrně výrazný pás 1210 cm^{-1} , které společně indikují přítomnost esterové skupiny v chemické struktuře (Espina et al., 2022; Huguenin et al., 2015; Pompeu et al., 2018). Z tohoto srovnání plyne, že kyselina gallová není vhodnou standardní látkou pro kvantifikaci fenolických látek u řasy *Spirogyra* pomocí Ramanovy spektroskopie a její funkci je možné nahradit kyselinou tříslovou.

Je však potřeba zmínit, že kyselina tříslová jako taková nebyla u řasy *Spirogyra* doposud identifikována (Cannell et al., 1988; Han et al., 2012; Nishizawa et al., 1985). Současně komerčně prodávaná kyselina tříslová se sumárním vzorcem $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ a molekulovou hmotností $1701,20\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ve skutečnosti tomuto složení zcela neodpovídá a je směsí gallotaninů s různým stupněm polymerace (Díaz Hidalgo et al., 2018). Avšak vzhledem ke stejnému strukturnímu motivu mezi jednotlivými gallotaniny, které se v podstatě liší jen počtem molekul kyseliny gallové připadajících na centrální molekulu glukózy, lze předpokládat obecně velmi podobné Ramanovo spektrum pro tyto látky, a tudíž je možné jejich molární koncentraci charakterizovat jednotným standardem kyseliny tříslové. Jak plyne z kalibrační křivky vodných roztoků kyseliny tříslové (Obr. 14B), se zvyšující se molární koncentrací se lineárním způsobem zvyšuje intenzita Ramanova signálu a tento vztah je charakterizován vysokou hodnotou koeficientu determinace: $R^2=0,9989$, což umožnilo relativně spolehlivou kvantifikaci fenolických látek v buňkách řasy *Spirogyra* v jednotlivých experimentech.

Variabilita buněčné koncentrace fenolických látek napříč měřeními ze všech experimentů byla vysoká. Zaznamenány byly jak prakticky nulové molární koncentrace, tak rovněž takové, které přesahovaly i hodnotu 100 mM. To implikuje, že existují určité faktory, které mají vliv na produkci fenolů a jejich syntéza není jen konstitutivní, jak již dokládají

publikované experimentální studie u rodu *Spirogyra* (Han et al., 2012) a *Zygnema* (Holzinger et al., 2018; Pichrtová et al., 2013).

Z Ramanovy chemické mapy na Obr. 13A je patrná relativně homogenní distribuce signálu kyseliny tříslové v buňce. Vzhledem k tomu, že látky tříslavinového charakteru, jakým jsou galotaniny, mají tendenci reagovat s proteiny a srážet je do neaktivních forem (Haslam, 2007, Taiz & Zeiger, 2006), musí být lokalizované v prostoru vakuol. U rodu *Spirogyra* velkou část buňky zabírá jedna centrální vakuola, která je světelným mikroskopem špatně rozeznatelná, nicméně z ultrastrukturních snímků pořízených transmisí elektronovou mikroskopií je patrná jako elektron-translucentní oblast (Obr. 11A), kde nejsou přítomné žádné jiné buněčné struktury, jako například mitochondrie, diktyozomy Golgiho aparátu nebo lipidové kapénky (Fowke & Pickett-Heaps, 1969). Ty se nacházejí v relativně více elektron-denzní cytoplasmě v tenké vrstvě kolem chloroplastu a centrálně uloženého jádra. Velké vakuoly obsahující fenolické sekundární metabolity jsou přítomné například u druhu *Zygonium ericetorum* (Aigner et al., 2013; Holzinger et al., 2010; Stancheva et al., 2014) nebo *Ancylonema alaskana* (Procházková et al., 2021; Remias et al., 2011). Současně by fenoly mohly být akumulovány v malých (<2 μm), sférických, elektron-denzních tělískách, která byla dokumentována v blízkosti chloroplastu u *Z. ericetorum* (Aigner et al., 2013) nebo rodu *Mougeotia* (Tretyn et al., 1992) a na periférii buněk rodu *Zygnema* (Holzinger et al., 2018; Pichrtová et al., 2013). Podobné struktury však při prohlížení vlastních ultrastrukturních řezů nebyly u izolovaného kmene zaznamenány a ani při revizi dostupné literatury, ve které bylo využito podobného způsobu kontrastování řezů, nebyl tento typ tělísek u řasy *Spirogyra* identifikován (Dawes, 1965; Fowke & Pickett-Heaps, 1969, 1971). Z toho lze usuzovat, že fenolické látky jsou u řasy *Spirogyra* po své syntéze lokalizovány výhradně do prostředí vakuol, kde dochází k jejich akumulaci.

5.3 Vliv stáří buněk na obsah a koncentraci fenolických látek

V této práci bylo podáno několik důkazů, že s přibývajícím stářím buněk dochází k akumulaci fenolických látek. Vyplývá to nejen ze signifikantního nárůstu koncentrace při sledování jedné kultury v procesu stárnutí, ale také z experimentu, při kterém byla část vzorků pěstována bez zdroje dusíku v živném médiu, kterým lze efekt stáří nahradit. Tento vliv však nebylo možné statisticky potvrdit Folin–Ciocalteuovou metodou ani pomocí HPLC v experimentu, který zahrnoval stanovení rozdílu v kvantitě fenolů mezi mladými kulturami a kulturami starými 70 dní. Srovnáním průměrných hodnot molárních koncentrací mladých vláken z tohoto experimentu ($12,99 \pm 5,99$ mM) s průměrnými koncentracemi naměřenými

v datovém souboru vláken starých 19 ($5,25 \pm 2,35$ mM) a 32 dní ($4,1 \pm 0,94$ mM) z předchozího experimentu je zřejmý značný rozdíl, který poukazuje na to, že „mladá“ vlákna v experimentu se třemi metodami byla ve skutečnosti v pokročilejším stupni stárnutí. Tento úsudek podporovalo i pozorování ve světelném mikroskopu, kdy mnoho vláken z „mladých“ kultur obsahovalo v buňkách zásobní tělíska, jejichž přítomnost bylo velmi často možné korelovat s vyššími hodnotami molární koncentrace kyseliny tříslivé. Nicméně vzhledem k nedostatku další biomasy a současně k plánované zahraniční stáži bylo nutné pro srovnání obsahu, resp. koncentrace fenolů pomocí tří různých metod využít biomasu, která byla k dispozici.

Akumulace fenolických látek v závislosti na stáří buněk doposud nebyla u spájivých řas zkoumána. Předpokládá se, že vláknité spájivky na konci své vegetační sezóny vytvářejí jako svá dormantní stádia především zygospory, případně jiné specializované buňky, které vznikají ve vláknech nepohlavním způsobem a vykazují analogickou rezistentní buněčnou stěnu zygosporám (Costas & Rodas, 1991; Hoshaw & McCourt, 1988; De Vries et al., 1983). Při vlastním pozorování přírodních vzorků sbíraných během srpna, ze kterých byl kmen izolován, nebyly zygospory ani jiná odolná stádia pozorovány, přestože průzkum nebyl zcela detailní. Některé spájivé řasy jsou však schopné přezimovat i ve formě vegetativních buněk, například tzv. pre-akinet (Holzinger & Pichrtová, 2016). Spíše než o specializovaný typ buněk se jedná o modifikované vegetativní buňky, které vznikají v důsledku limitace dostupnosti dusíkatých látek v prostředí (Herburger et al., 2015; Pichrtová et al., 2014a). Pre-akinetky jsou charakterizovány akumulací lipidických tělísek a škrobových zrn (Herburger et al., 2015; Pichrtová et al., 2016) a také utlumenou fotosyntetickou aktivitou, která vyplývá z relativně nižších hodnot $rETR_{max}$ v porovnání s hodnotami naměřenými u mladých vláken (Herburger et al., 2015). Tyto znaky byly pozorovány i v této práci – větší množství zásobních látek bylo možné sledovat v buňkách s přibývajícím časem od přeočkování (Obr. 15A–F) a současně s tím docházelo k signifikantnímu poklesu $rETR_{max}$. U starších kultur byl rovněž prokázán signifikantní pokles parametru I_k , což poukazuje na nižší světelné nároky starších vláken, které při vyšších intenzitách vedou k poklesu $rETR$ křivek a fotoinhibici (Herburger et al., 2015; Ralph & Gademann, 2005). Pre-akinetky u řasy *Zygnema* vykazují oproti starým buňkám řasy *Spirogyra* tlustší buněčnou stěnu a vyšší toleranci k desikačnímu stresu (Pichrtová et al., 2014a, 2014b), ale tento efekt nebyl doposud u starých buněk rodu *Spirogyra* testován. Akumulace fenolických látek v průběhu stárnutí je zřejmě naopak charakteristická pro spájivku *Spirogyra*, kdežto *Zygnema* tento znak nesdílí (Holzinger et al., 2018). Obecně hromadění fenolických sekundárních metabolitů může být spojeno s účinnější ochranou buněk před

různými stresovými faktory, které jsou probírané v další kapitole. Zda však tato forma vegetativních buněk u řasy *Spirogyra* představuje jen tranzientní stádium v době vegetační sezóny nebo dokáže v tomto stavu i přezimovat, však není jasné a mohlo by být předmětem dalších studií.

5.4 Vliv stresových faktorů na koncentraci fenolických látek

Přestože experimentální design využívající UV záření jako stresový faktor byl značně technicky omezený (nízká flexibilita volby intenzity a kombinace UV-A/UV-B), byl u vláken exponovaných UV-B prokázán signifikantní nárůst molární koncentrace kyseliny tříslové. Podobný efekt na obsah fenolů, vyvolaný kombinací UV-A a UV-B, byl statisticky prokázán také u několika kmenů řasy *Zygnema* izolovaných z polárních a temperátních oblastí (Holzinger et al., 2018; Pichrtová et al., 2013). Použitá intenzita UV v těchto ekofyziologických pracích však byla mnohonásobně menší, a tudíž pokles parametru F_v/F_m nebyl tak drastický, ba dokonce v některých případech došlo i po počátečním poklesu k jeho postupné obnově, která může být dána do souvislosti právě s produkcí fenolických látek (Holzinger et al., 2018). Současně nebyly v těchto experimentech zaznamenány žádné morfologické změny pozorovatelné pomocí světelného mikroskopu (Holzinger et al., 2018; Pichrtová et al., 2013).

V kontrastu s tím vysoká intenzita UV-B ($11,6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) využitá v této práci evidentně vyvolala značný stres indikovaný výrazným poklesem F_v/F_m , který byl provázen smrtí mnoha vláken a abnormálními tvary chloroplastu. Škodlivé účinky UV-B záření spočívají zejména v jeho absorpci různými molekulami, například DNA, aromatickými aminokyselinami v proteinech nebo fotosyntetickými pigmenty, což může vést k jejich poškození a ztrátě funkčnosti (Cockell & Knowland, 1999; Holzinger & Lütz, 2006; Karsten, 2008). Vzhledem k velkému významu všech těchto biomolekul je zjevné, že se UV-B negativně projevuje na všech základních buněčných procesech včetně fotosyntetické aktivity a je nezbytné se mu nějakým způsobem aktivně bránit – například produkcí ochranných UV-absorbujících sloučenin (Cockell & Knowland, 1999; Karsten, 2008).

Fenolické sekundární metabolity ze své chemické podstaty jsou schopné pohlcovat záření v ultrafialové části světelného spektra a dále v závislosti na velikosti molekuly a přítomnosti dalších substituentů v chemické struktuře dochází k posunům absorpčního spektra do vyšších vlnových délek (Cockell & Knowland, 1999). Samotný β -glukogallin, který je relativně malou molekulou a zároveň prekurzorem pro syntézu gallotaninů, představuje v HPLC chromatogramu na Obr. 20 zřejmě první pík, soudě podle jeho retenčního času a absorpčního maxima posunutého k nižším vlnovým délkám UV-B oblasti (Aigner et al., 2013;

Remias et al., 2012; Daniel Remias, osobní sdělení). U složitějších gallotaninů (pík 2 a 3) se absorpční vlastnosti dále rozšiřují i do UV-A oblasti, ale nikdy nepřesahují do viditelné části spektra (Espina et al., 2022), což je zásadní rozdíl oproti fenolickým látkám u jiných spájkivých řas (Aigner et al., 2013; Pichrtová et al., 2013; Remias et al., 2011). Zmíněné absorpční schopnosti a také potvrzení, že produkci fenolických látek je možné po expozici UV záření indukovat, jsou podle Cockell & Knowland (1999) silným důkazem toho, že fenolické látky plní důležitou a aktivní roli látek odstiňujících UV záření (vedle například algenanu, který je také schopný absorpce UV záření, ale je syntetizován konstitutivně ve vznikajících zygosporách).

Syntéza celé řady fenolických látek je důležitou adaptací zejména extremofilních spájkivých řas, které jsou ve svém přirozeném prostředí vystaveny vysokým denním dávkám slunečního záření během vegetační sezóny, například v ultraoligotrofních jezerech a tůňkách ve vyšších nadmořských výškách (Aigner et al., 2013; Figueroa et al., 2009; Garduño-Solórzano et al., 2020), exponovaných půdních krustách (Hoppert et al., 2004) nebo na povrchu ledovců (Remias et al., 2012; Williamson et al., 2020). Z tohoto hlediska je důležitá pozice vakuol, případně menších tělísek na periférii buňky, čímž mohou být chráněny všechny důležité buněčné struktury, zejména jádro a chloroplast (Garduño-Solórzano et al., 2020; Pichrtová et al., 2013; Remias et al., 2011; Stancheva et al., 2014). V tomto ohledu je zřejmě *Spirogyra* výjimkou, protože její chloroplast je uložen v buňce parietálně (Obr. 10A), z čehož vyplývá, že fenoly akumulované ve velké, centrální vakuole chrání především jádro a organely v jeho blízkosti (mitochondrie, endomembránový systém), zatímco chloroplast musí být chráněn jiným způsobem. Při ochraně proti vyšší míře ozáření obecně se u řas uplatňuje tzv. samozastínění, při kterém horní vrstvy stélek nárůstu chrání spodní. *Spirogyra* může vytvářet velké množství biomasy především ve stojatých vodách a při intenzivní fotosyntetické aktivitě se původně bentické, případně metafytonní nárůsty mohou dostat zachycenými plyny k vodní hladině, kde jsou vystaveny mimo jiné i vysokým slunečním intenzitám (Hillebrand, 1983). Ochrana samozastíněním se v takové populaci může uplatňovat podobně jako například u nárůstů řasy *Zygnema* (Rippin et al., 2019) nebo *Ulva* (Bischof et al., 2002). Další ochranu může chloroplastu propůjčovat efektivní viola-zeaxanthinový xantofylový cyklus, který je obecnou vlastností zelené linie rostlin (Viridiplantae), včetně spájkivých řas (Garduño-Solórzano et al., 2020; Hall & McCourt, 2017; Pichrtová et al., 2013)

U všech ostatní stresových faktorů s výjimkou vysoké teploty byl patrný pokles F_v/F_m relativně ke kontrole, který byl současně provázený i signifikantním nárůstem koncentrace

kyseliny tříslivé. Vzhledem k tomu, že tyto stresové podmínky nebyly z pohledu produkce fenolů u spájkivých řas aplikovány, je srovnání a implikace jejich funkce složitá. Každý z nich působí na buňku jiným způsobem, ale z hlediska vlastností fenolických látek je důležitý jeden z jejich společných mechanismů působení, a tím je ochrana před reaktivními formami kyslíku (ROS) (Taiz & Zeiger, 2008). Při dlouhodobě zvýšené intenzitě fotosynteticky aktivního záření dochází k saturaci elektronového transportního řetězce v thylakoidních membránách chloroplastů, čímž dochází k častějšímu přenosu elektronu na molekulu kyslíku za vzniku singletového kyslíku, případně celé řady kyslíkových radikálů, které mohou poškozovat membránové proteiny nebo lipidy (Barber & Andersson, 1992; Pospíšil, 2016). Nízké a vysoké teploty společně s osmotickým stresem narušují důležitou rovnováhu mezi primárními a sekundárními procesy fotosyntézy, což rovněž může vést k produkci vysoce reaktivních radikálů (Pospíšil, 2016; Taiz & Zeiger, 2006; Wise, 1995).

Vedle nejrůznějších enzymů slouží u vyšších rostlin k tzv. zhášení ROS neenzymatické látky jako například primární karotenoidy, kyselina L-askorbová, tokoferoly nebo flavonoidy (Agati et al., 2013). Kyselina gallová a od ní odvozené galloyl deriváty vykazují dokonce výrazně vyšší antioxidantní schopnosti, které vychází jednak z jejich aromatické struktury a jednak z přítomnosti mnoha hydroxylových skupin (Bors & Michel, 2002). Podobně jako flavonoidy jsou však tyto látky skladované ve vakuole, tedy mimo primární místo vzniku reaktivních forem kyslíku (Taiz & Zeiger, 2006). Ukazuje se však, že některé z ROS, především peroxid vodíku H_2O_2 , který má poměrně vysokou životnost, se může dostat v buňce i na relativně velké vzdálenosti a vstoupit do vakuoly (Agati et al., 2013; Mullineaux et al., 2006). Vzhledem k tomu, že H_2O_2 může stát i za poškozením jaderné DNA (Mullineaux et al., 2006), mohla by vakuola s fenolickými látkami u řasy *Spirogyra* představovat jakousi antioxidantní bariéru proti ROS uniklým z chloroplastu, která chrání nejdůležitější, centrálně umístěnou strukturu buňky, zatímco pro periferně umístěný chloroplast samotná zřejmě nemá velkou funkci (Agati et al., 2013). Tuto teorii podporuje signifikantní nárůst molární koncentrace u stresu vyvolaného vysokou ozářeností ($430 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), osmotickým stresem (10 % PEG-6000) a nízkou teplotou (4 °C). Podobně ve studii Han et al. (2012) byl zaznamenán signifikantní nárůst gallotaninů u druhu *Spirogyra varians* kultivovaného při 4 °C, jenž byl současně provázen zvýšenou antioxidantní kapacitou hydrofilního extraktu.

Zvláštní kombinace výsledků bylo dosaženo v případě tepelného stresu (30 °C). Přestože většina buněk na konci experimentu vykazovala nejvýraznější změny v morfologii chloroplastu ze všech případů (obr. 22A), maximální kvantový výtěžek zůstával stabilně vyšší

vůči kontrole. Drastické změny v morfologii chloroplastu sledovali při tepelném stresu i autoři de Vries et al. (2020), ale jeho vliv na kvantový výtěžek nebyl zkoumán. Rozdíl v koncentraci fenolických látek v případě stresu vyvolaného vysokou teplotou v této práci nebyl signifikantní, přestože i při těchto podmínkách dochází k tvorbě ROS (Pospíšil, 2016; Taiz & Zeiger, 2006). Podobně aplikací vyšší teploty nebyly pozorovány změny v obsahu florotaninů u tří druhů zkoumaných chaluž, zatímco jejich obsah narostl po expozici stélek UV záření (Cruces et al., 2012), a ve studii Abdala-Díaz et al. (2006) nebylo možné korelovat roční maximální obsah florotaninů ve stélkách chaluhy *Cystoseira tamariscifolia* s povrchovou teplotou vody, nýbrž s intenzitou slunečního záření.

6. Závěr

V této diplomové práci byl sledován vliv vybraných stresových faktorů na kvantitativní změny fenolických látek u řasy *Spirogyra*. Izolovaný kmen byl pomocí genu *rbcL* zařazen do cladu V v rámci tohoto rodu, ale bez zřetelné ornamentace mesospory nebylo možné kmeni přiřadit druhový název z hlediska tradičního morfologického přístupu.

Spojením detekovaného Ramanova signálu vycházejícího z prostředí buňky se standardem kyseliny tříslové bylo možné ke kvantifikaci fenolických látek využít konfokální Ramanovu spektroskopii, a to přímo na buněčné úrovni. Z homogenní distribuce signálu fenolických látek mimo chloroplast a s podporou elektronové transmisní mikroskopie bylo možné dojít k závěru, že tyto látky jsou lokalizované ve velké centrální vakuole.

Signifikantní nárůst molární koncentrace fenolických látek byl pozorován s přibývajícím stářím vláken a při absenci dusíku v živném médiu, kterým je možné nahradit efekt stárnutí. Tento trend bylo možné statisticky potvrdit Ramanovou spektroskopií i při porovnání mladých a starých kultur, ale nebyl podpořen při stanovení obsahu fenolů pomocí Folin–Ciocalteuovy spektrofotometrické metody ani HPLC. Důvodem byl však zřejmě ne zcela čerstvý stav vláken u „mladých“ kultur, který se projevil srovnatelně vysokou hladinou fenolů jako u starých. Se stářím buněk se kromě akumulace fenolických látek tvoří zásobní látky (škrob, lipidová tělíska), dochází k útlumu fotosyntetické aktivity a snížení nároků na světelné podmínky, jak indikují signifikantní poklesy parametrů $rETR_{max}$, α a I_k odvozených z rETR křivek.

Ze stresových faktorů mělo signifikantní vliv na koncentraci fenolů UV-B světlo, zvýšená intenzita fotosynteticky aktivního záření, nízká teplota a osmotický stres, které se všechny současně projevíly snížením parametru F_v/F_m . V případě UV-B bylo možné spojit

pozorovaný nárůst s ochrannými absorpčními vlastnostmi, které jednotlivé látky separované pomocí HPLC vykazovaly. Z hlediska jejich lokalizace však u řasy *Spirogyra* chrání především jádro a buněčné kompartmenty v jeho blízkosti. V případě ostatních typů stresů není v této práci možné přímo podat přímý důkaz, jakou ochrannou funkci fenoly v jejich případě poskytují. Jedním z vysvětlení pro jejich vyšší produkci by mohla být zvýšená potřeba buňky zhaset reaktivní formy kyslíku, které při aplikovaných stresových podmínkách vznikají. Vzhledem k jejich lokalizaci ve vakuole by však mohly chránit pouze před ROS, které nejsou tak reaktivní a dokáží se v buňce dostat i do větších vzdáleností od primárního centra svého vzniku. Naopak vysoká teplota nevedla ke zvýšené produkci fenolických látek, a dokonce byla pozorován stabilně vyšší parametr F_v/F_m oproti kontrole, přestože vlákna vykazovala značné změny v morfologii chloroplastu. Obecně vysoká teplota nevede u řas z různých skupin k vyšší produkci fenolických látek, ale přesný důvod není jasný.

7. Seznam použité literatury

- Abdala-Díaz, R.T., Cabello-Pasini, A., Pérez-Rodríguez, E., Conde Álvarez, R.M., & Figueroa, F.L. (2006). Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.* 148, 459–465.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., & Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiol. Biochem.* 72, 35–45.
- Ahn, G.N., Kim, K.N., Cha, S.H., Song, C.B., Lee, J., Heo, M.S., Yeo, I.K., Lee, N.H., Jee, Y.H., Kim, J.S., et al. (2007). Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H₂O₂-mediated DNA damage. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 71–79.
- Aigner, S., Remias, D., Karsten, U., & Holzinger, A. (2013). Unusual phenolic compounds contribute to ecophysiological performance in the purple-colored green alga *Zygonium ericetorum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) from a high-alpine habitat. *J. Phycol.* 49, 648–660.
- Allen, A., & Alston, R.E. (1959). Formation of purple pigment in *Spirogyra pratensis* cultures. *Nature* 183, 1064–1065.
- Alston, R.E. (1958). An investigation of the purple vacuolar pigment of *Zygonium ericetorum* and the status of “algal anthocyanins” and “phycoporphyrins.” *Am. J. Bot.* 45, 688–692.
- Andersen, R. A., ed. (2005). *Algal culturing techniques*, 1st edition (Burlington, USA: Elsevier Academic Press).
- Baker, N.R. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 89–113.
- Baranska, M., Schulz, H., Joubert, E., & Manley, M. (2006). In situ flavonoid analysis by FT-Raman spectroscopy: Identification, distribution, and quantification of aspalathin in green rooibos (*Aspalathus linearis*). *Anal. Chem.* 78, 7716–7721.
- Barber, J., & Andersson, B. (1992). Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17, 61–66.
- Barcytė, D., Pilátová, J., Mojzeš, P., & Nedbalová, L. (2020). The Arctic *Cylindrocystis* (Zygnematophyceae, Streptophyta) Green Algae are Genetically and Morphologically Diverse and Exhibit Effective Accumulation of Polyphosphate. *J. Phycol.* 56, 217–232.

- Bidigare, R., Ondrusek, M.E., Kennicutt II, M.C., Iturriaga, R., Harvey, H.R., Hoham, R.W., & Macko, S.A. (1993). Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids for snow algae. *J. Phycol.* *29*, 427–434.
- Bischof, K., Peralta, G., Kräbs, G., Van de Poll, W.H., Pérez-Lloréns, J.L., & Breeman, A.M. (2002). Effects of solar UV-B radiation on canopy structure of *Ulva* communities from southern Spain. *J. Exp. Bot.* *53*, 2411–2421.
- Bors, W., & Michel, C. (2002). Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *957*, 57–69.
- Busch, A., & Hess, S. (2022). Sunscreen mucilage: a photoprotective adaptation found in terrestrial green algae (Zygnematophyceae). *Eur. J. Phycol.* *57*, 107–124.
- Cannell, R.J., Farmer, P., & Walker, J.M. (1988). Purification and characterization of pentagalloylglucose, and alpha-glucosidase inhibitor/antibiotic from the freshwater green alga *Spirogyra varians*. *Biochem. J.* *255*, 937–941.
- Carreto, J.I., & Carignan, M.O. (2011). Mycosporine-like amino acids: Relevant secondary metabolites. chemical and ecological aspects. *Mar. Drugs* *9*, 387–446.
- Chen, C., Barfuss, M.H.J., Pröschold, T., & Schagerl, M. (2012). Hidden genetic diversity in the green alga *Spirogyra* (Zygnematophyceae, Streptophyta). *BMC Evol. Biol.* *12*.
- Cheng, S., Xian, W., Fu, Y., Marin, B., Keller, J., Wu, T., Sun, W., Li, X., Xu, Y., Zhang, Y., et al. (2019). Genomes of Subaerial Zygnematophyceae Provide Insights into Land Plant Evolution. *Cell* *179*, 1057–1067.
- Cockell, C.S., & Knowland, J. (1999). Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* *74*, 311–345.
- Connan, S., Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E., & Gall, E.A. (2004). Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Bot. Mar.* *47*, 410–416.
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E., & Ar Gall, E. (2006). Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot. Mar.* *49*, 39–46.
- Cook, J.M., Tedstone, A.J., Williamson, C., McCutcheon, J., Hodson, A.J., Dayal, A., Skiles, M., Hofer, S., Bryant, R., McAree, O., et al. (2020). Glacier algae accelerate melt rates on the south-western Greenland Ice Sheet. *Cryosphere* *14*, 309–330.
- Costas, E., & Rodas, V.L. (1991). Evidence for an annual rhythm in cell ageing in *Spirogyra insignis* (Chlorophyceae). *Phycologia* *30*, 579–599.

- Cruces, E., Huovinen, P., & Gómez, I. (2012). Phlorotannin and antioxidant responses upon short-term exposure to UV radiation and elevated temperature in three south Pacific kelps. *Photochem. Photobiol.* 88, 58–66.
- Cubero, F.O., Crespo, A., Fatehi, J., & Bridge, P.D. (1999). Plant Systematics DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Syst. Evol.* 216, 243–249.
- Dawes, C.J. (1965). An ultrastructure study of *Spirogyra*. *J. Phycol.* 1, 121–127.
- Dial, R.J., Ganey, G.Q., & Skiles, S.M. (2018). What color should glacier algae be? An ecological role for red carbon in the cryosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94.
- Díaz Hidalgo, R.J., Córdoba, R., Nabais, P., Silva, V., Melo, M.J., Pina, F., Teixeira, N., & Freitas, V. (2018). New insights into iron-gall inks through the use of historically accurate reconstructions. *Herit. Sci.* 6, 1–15.
- Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for practicing scientists* (Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc.).
- Drummond, C.S., Hall, J., Karol, K.G., Delwiche, C.F., & McCourt, R.M. (2005). Phylogeny of *Spirogyra* and *Sirogonium* (Zygnematophyceae) based on rbcL sequence data. *J. Phycol.* 41, 1055–1064.
- Ember, K.J.I., Hoeve, M.A., McAughtrie, S.L., Bergholt, M.S., Dwyer, B.J., Stevens, M.M., Faulds, K., Forbes, S.J., & Campbell, C.J. (2017). Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *Npj Regen. Med.* 2.
- Espina, A., Sanchez-Cortes, S., & Jurašková, Z. (2022). Vibrational study (Raman, SERS, and IR) of plant gallnut polyphenols related to the fabrication of iron gall inks. *Molecules* 27, 1–17.
- Figuerola, F.L., Korbee, N., Carrillo, P., Medina-Sánchez, J.M., Mata, M., Bonomi, J., & Sánchez-Castillo, P.M. (2009). The effects of UV radiation on photosynthesis estimated as chlorophyll fluorescence in *Zygnemopsis decussata* (Chlorophyta) growing in a high mountain lake (Sierra Nevada, Southern Spain). *J. Limnol.* 68, 206–216.
- Fowke, L.C., & Pickett-Heaps, J.D. (1969). Cell division in *Spirogyra*. I. Mitosis. *J. Phycol.* 5, 240–259.
- Fowke, L.C., & Pickett-Heaps, J.D. (1971). Conjugation in *Spirogyra*. *J. Phycol.* 7, 285–294.
- Gallego, Á.L., Guesalaga, A.R., Bordeu, E., & González, Á.S. (2011). Rapid measurement of phenolics compounds in red wine using Raman spectroscopy. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* 60, 507–512.

- Garduño-Solórzano, G., Martínez-García, M., Hentschke, G.S., Lopes, G., Branco, R.C., Vasconcelos, V.M.O., Campos, J.E., López-Cano, R., & Quintanar-Zúñiga, R.E. (2020). The phylogenetic placement of *Temnogametum* (Zygnemataceae) and description of *Temnogametum iztacalense* sp. nov., from a tropical high mountain lake in Mexico. *Eur. J. Phycol.* 1–15.
- Geiselman, J.A., & McConnell, O.J. (1981). Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *J. Chem. Ecol.* 7, 1115–1133.
- Gómez, I., Pérez-Rodríguez, E., Viñegla, B., Figueroa, F.L., & Karsten, U. (1998). Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from southern Spain. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 47, 46–57.
- Gontcharov, A.A. (2008). Phylogeny and classification of Zygnematophyceae (Streptophyta): current state of affairs. *Fottea* 8, 87–104.
- Gontcharov, A.A., & Melkonian, M. (2010). Molecular phylogeny and revision of the genus *Netrium* (Zygnematophyceae, Streptophyta): *Nucleotaenium* gen. nov. *J. Phycol.* 46, 346–362.
- Gontcharov, A.A., Marin, B., & Melkonian, M. (2003). Molecular phylogeny of conjugating green algae (Zygnemophyceae, Streptophyta) inferred from SSU rDNA sequence comparisons. *J. Mol. Evol.* 56, 89–104.
- Gontcharov, A.A., Marin, B., R., & Melkonian, M. (2004). Are Combined Analyses Better Than Single Gene Phylogenies? A Case Study Using SSU rDNA and rbcL Sequence Comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta). *Mol. Biol. Evol.* 21, 612–624.
- Graham, L. E., Graham J. M., Wilcox, L. W. (2016). *Algae*, 3rd edition (USA: LJLM Press).
- Grolig, F., & Wagner, G. (1989). Characterization of the isolated calcium-binding vesicles from the green alga *Mougeotia scalaris*, and their relevance to chloroplast movement. *Planta* 177, 169–177.
- Hall, J.D., Karol, K.G., McCourt, R.M., & Delwiche, C.F. (2008). Phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data. *J. Phycol.* 44, 467–477.
- Hall, J. D., McCourt, R. M. (2017). Zygnematophyta. In *Handbook of the protists*, 2nd edition, Archibald, J. M, Simpson, A. G. B., Slamovits, Claudio H., eds. (Cham, Switzerland: Springer), pp. 135–163.
- Han, J.W., Lee, K.P., Yoon, M., Kang, S.H., & Kim, G.H. (2009). Cold stress regulation of a bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase (DHQ/SDH)-like gene in the freshwater green alga *Spirogyra varians*. *Bot. Mar.* 52, 178–185.

- Han, J.W., Yoon, M., Kupper, F.D., Klochkova, T.A., Oh, J.S., Rho, J.-R., & Kim, G.H. (2012). Accumulation of galloyl derivatives in a green alga, *Spirogyra varians*, in response to cold stress. *J. Appl. Phycol.* *24*, 1279–1286.
- Harker, M., Tsavalos, A.J., & Young, A.J. (1996). Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* *55*, 207–214.
- Hartmann, A., Ganzera, M., Karsten, U., Skhirtladze, A., & Stuppner, H. (2018). Phytochemical and analytical characterization of novel sulfated coumarins in the marine green macroalga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser. *Molecules* *23*, 2735.
- Hartmann, A., Glaser, K., Holzinger, A., Ganzera, M., & Karsten, U. (2020). Klebsormidin A and B, Two New UV-Sunscreen Compounds in Green Microalgal *Interfilum* and *Klebsormidium* Species (Streptophyta) From Terrestrial Habitats. *Front. Microbiol.* *11*, 1–12.
- Haslam, E. (2007). Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* *68*, 2713–2721.
- Herburger, K., Lewis, L.A., & Holzinger, A. (2015). Photosynthetic efficiency, desiccation tolerance and ultrastructure in two phylogenetically distinct strains of alpine *Zygnema* sp. (Zygnematophyceae, Streptophyta): role of pre-akinete formation. *Protoplasma* *252*, 571–589.
- Herburger, K., Remias, D., & Holzinger, A. (2016). The green alga *Zygonium ericetorum* (Zygnematophyceae, Charophyta) shows high iron and aluminium tolerance: Protection mechanisms and photosynthetic performance. *FEMS Microbiol. Ecol.* *92*, 1–15.
- Hillebrand, H. (1983). Development and dynamics of floating clusters of filamentous algae. *Periphyt. Freshw. Ecosyst.* 31–39.
- Holzinger, A., & Lütz, C. (2006). Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* *37*, 190–207.
- Holzinger, A., & Pichrtová, M. (2016). Abiotic stress tolerance of charophyte green algae: new challenges for omics techniques. *Front. Plant Sci.* *7*, 1–17.
- Holzinger, A., Roleda, M.Y., & Lütz, C. (2009). The vegetative arctic freshwater green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. *Micron* *40*, 831–838.
- Holzinger, A., Tschakner, A., & Remias, D. (2010). Cytoarchitecture of the desiccation-tolerant green alga *Zygonium ericetorum*. *Protoplasma* *243*, 15–24.
- Holzinger, A., Albert, A., Aigner, S., Uhl, J., Schmitt-Kopplin, P., Trumhová, K., & Pichrtová, M. (2018). Arctic, Antarctic, and temperate green algae *Zygnema* spp. under UV-B stress: vegetative cells perform better than pre-akinetes. *Protoplasma* *255*, 1239–1252.

- Hoppert, M., Reimer, R., Kemmling, A., Schröder, A., Günzl, B., & Heinken, T. (2004). Structure and reactivity of a biological soil crust from a xeric sandy soil in Central Europe. *Geomicrobiol. J.*
- Hoshaw, R.W., & Hilton, R.L. (1966). Observations on the sexual cycle of the saccoderm desmid *Spirotaenia condensata*. *J. Arizona Acad. Sci.* 4, 88–92.
- Hoshaw, R.W., & McCourt, R.M. (1988). The Zygnemataceae (Chlorophyta): a twenty-year update of research. *Phycologia* 27, 511–548.
- Hoshaw, R.W., Wang, J.-C., McCourt, R.M., & Hull, H.M. (1985). Ploidal changes in clonal cultures of *Spirogyra communis* and implications for species definition. *Am. J. Bot.* 72, 1005–1011.
- Hoshaw, R.W., Wells, C. V., & McCourt, R.M. (1987). A polyploid species complex in *Spirogyra maxima* (Chlorophyta, Zygnemataceae), a species with large chromosomes. *J. Phycol.* 23, 267–273.
- Huguenin, J., Hamady, S.O.S., & Bourson, P. (2015). Monitoring deprotonation of gallic acid by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* 46, 1062–1066.
- Imbs, T.I., & Zvyagintseva, T.N. (2018). Phlorotannins are polyphenolic metabolites of brown algae. *Russ. J. Mar. Biol.* 44, 263–273.
- Jiao, C., Sørensen, I., Sun, X., Sun, H., Behar, H., Alseekh, S., Philippe, G., Palacio Lopez, K., Sun, L., Reed, R., et al. (2020). The *Penium margaritaceum* Genome: Hallmarks of the Origins of Land Plants. *Cell* 181, 1–15.
- Kadłubowska, J. Z. (1984). Conjugatophyceae I. Chlorophyta. VIII Zygnematales. In *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauser, D, eds. (Jena: VEB Gustav Fischer Verlag), pp. 1–532.
- Kaštovský, J., Hauer, T., Geriš, R., Chattová, B., Juráň, J., Lepšová-Skácelová, O., Pitelková, P., Puzstai, M., Škaloud, P., Šťastný J. et al. (2018). Atlas sinic a řas České republiky 2 (České Budějovice, CZ: Jihočeská univerzita).
- Lin, C.-S., & Wu, J.-T. (2014). Tolerance of soil algae and cyanobacteria to drought stress. *J. Phycol.* 50, 131–139.
- McCourt, R.M., & Hoshaw, R.W. (1990). Noncorrespondence of breeding groups, morphology, and monophyletic groups in *Spirogyra* (Zygnemataceae: Chlorophyta) and the application of species concepts. *Syst. Bot.* 15, 69–78.
- McCourt, R.M., Hoshaw, R.W., & Wang, J. (1986). Distribution, morphological diversity and evidence for polyploidy in North American Zygnemataceae (Chlorophyta). *J. Phycol.* 22, 307–313.

- McCourt, R.M., Karol, K.G., Bell, J., Helm-Bychowski, K.M., Grajewska, A., Wojciechowski, M.F., & Hoshaw, R.W. (2000). Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnemophyceae) based on *rbcL* sequences. *J. Phycol.* *36*, 747–758.
- Moudříková, Š., Mojzeš, P., Zachleder, V., Pfaff, C., Behrendt, D., & Nedbal, L. (2016). Raman and fluorescence microscopy sensing energy-transducing and energy-storing structures in microalgae. *Algal Res.* *16*, 224–232.
- 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.
- Newsome, A.G., Murphy, B.T., & van Breemen, R.B. (2013). Isolation and characterization of natural blue pigments from underexplored sources. *Phys. Methods Food Anal.* *1138*, 105–125.
- Niemetz, R., & Gross, G.G. (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* *66*, 2001–2011.
- Nishizawa, M., Yamagishi, T., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., & Ragan, M.A. (1985). Gallotannins of the freshwater green alga *Spirogyra* sp. *Phytochemistry* *24*, 2411–2413.
- Numata, Y., & Tanaka, H. (2011). Quantitative analysis of quercetin using Raman spectroscopy. *Food Chem.* *126*, 751–755.
- Ossipov, V., Salminen, J.P., Ossipova, S., Haukioja, E., & Pihlaja, K. (2003). Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochem. Syst. Ecol.* *31*, 3–16.
- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A., & Åberg, P. (1997). Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *157*, 139–146.
- Pérez-Rodríguez, E., Gómez, I., Karsten, U., & Figueroa, F.L. (1998). Effects of UV radiation on photosynthesis and excretion of UV-absorbing compounds of *Dasycladus vermicularis* (Dasycladales, Chlorophyta) from southern Spain. *Phycologia* *37*, 379–387.
- Pérez-Rodríguez, E., Aguilera, J., Gómez, I., & Figueroa, F.L. (2001). Excretion of coumarins by the Mediterranean green alga *Dasycladus vermicularis* in response to environmental stress. *Mar. Biol.* *139*, 633–639.
- Pérez-Rodríguez, E., Aguilera, J., & Figueroa, F.L. (2003). Tissular localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser: a photoprotective role? *J. Exp. Bot.* *54*, 1093–1100.

- Permann, C., Herburger, K., Niedermeier, M., Felhofer, M., Gierlinger, N., & Holzinger, A. (2021a). Cell wall characteristics during sexual reproduction of *Mougeotia* sp. (Zygnematophyceae) revealed by electron microscopy, glycan microarrays and RAMAN spectroscopy. *Protoplasma* 258, 1261–1275.
- Permann, C., Herburger, K., Felhofer, M., Gierlinger, N., Lewis, L.A., & Holzinger, A. (2021b). Induction of conjugation and zygospore cell wall characteristics in the alpine *Spirogyra mirabilis* (Zygnematophyceae, charophyta): Advantage under climate change scenarios? *Plants* 10.
- Pichrtová, M., Remias, D., Lewis, L.A., & Holzinger, A. (2013). Changes in phenolic compounds and cellular ultrastructure of Arctic and Antarctic strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after exposure to experimentally enhanced UV to PAR ratio. *Microb. Ecol.* 65, 68–83.
- Pichrtová, M., Kulichová, J., & Holzinger, A. (2014a). Nitrogen limitation and slow drying induce desiccation tolerance in conjugating green algae (Zygnematophyceae, Streptophyta) from polar habitats. *PLoS One* 9, 1–12.
- Pichrtová, M., Hájek, T., & Elster, J. (2014b). Osmotic stress and recovery in field populations of *Zygnema* sp. (Zygnematophyceae, Streptophyta) on Svalbard (High Arctic) subjected to natural desiccation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 89, 270–280.
- Pichrtová, M., Arc, E., Stögl, W., Kranner, I., Hájek, T., Hackl, H., & Holzinger, A. (2016). Formation of lipid bodies and changes in fatty acid composition upon pre-akinete formation in Arctic and Antarctic *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, 1–9.
- Pichrtová, M., Holzinger, A., Kulichová, J., Ryšánek, D., Šoljaková, T., Trumhová, K., & Nemcova, Y. (2018). Molecular and morphological diversity of *Zygnema* and *Zygnemopsis* (Zygnematophyceae, Streptophyta) from Svalbard (High Arctic). *Eur. J. Phycol.* 53, 492–508.
- Pompeu, D.R., Larondelle, Y., Rogez, H., Abbas, O., Pierna, J.A.F., & Baeten, V. (2018). Characterization and discrimination of phenolic compounds using Fourier transform Raman spectroscopy and chemometric tools. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 22, 13–28.
- Pospíšil, P. (2016). Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. *Front. Plant Sci.* 7, 1–12.
- Pouličková, A., Žižka, Z., Hašler, P., & Benada, O. (2007). Zygnematalean zygospores: Morphological features and use in species identification. *Folia Microbiol. (Praha)*. 52, 135–145.
- Procházková, L., Řezanka, T., Nedbalová, L., & Remias, D. (2021). Unicellular versus filamentous: The glacial alga *Ancylonema alaskana* comb. et stat. nov. and its ecophysiological relatedness to *Ancylonema nordenskiöldii* (Zygnematophyceae, Streptophyta). *Microorganisms* 9, 1–18.

- Ralph, P.J., & Gademann, R. (2005). Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquat. Bot.* *82*, 222–237.
- Remias, D., Lütz-Meindl, U., & Lütz, C. (2005). Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *Eur. J. Phycol.* *40*, 259–268.
- Remias, D., Holzinger, A., & Lütz, C. (2009). Physiology, ultrastructure and habitat of the ice alga *Mesotaenium berggrenii* (Zygnemaphyceae, Chlorophyta) from glaciers in the European Alps. *Phycologia* *48*, 302–312.
- Remias, D., Holzinger, A., Aigner, S., & Lütz, C. (2011). Ecophysiology and ultrastructure of *Ancylonema nordenskiöldii* (Zygnematales, Streptophyta), causing brown ice on glaciers in Svalbard (high arctic). *Polar Biol.* *35*, 899–908.
- Remias, D., Schwaiger, S., Aigner, S., Leya, T., Stuppner, H., & Lütz, C. (2012). Characterization of an UV- and VIS-absorbing, purpurogallin-derived secondary pigment new to algae and highly abundant in *Mesotaenium berggrenii* (Zygnematophyceae, Chlorophyta), an extremophyte living on glaciers. *FEMS Microbiol. Ecol.* *79*, 638–648.
- Richards, T.A., Dacks, J.B., Campbell, S.A., Blanchard, J.L., Foster, P.G., Mcleod, R., & Roberts, C.W. (2006). Evolutionary origins of the eukaryotic shikimate pathway: gene fusions, horizontal gene transfer, and endosymbiotic replacements †. *5*, 1517–1531.
- Rippin, M., Pichrtová, M., Arc, E., Kranner, I., Becker, B., & Holzinger, A. (2019). Metatranscriptomic and metabolite profiling reveals vertical heterogeneity within a *Zygnema* green algal mat from Svalbard (High Arctic). *Environ. Microbiol.* *21*, 4283–4299.
- Rozema, J., Björn, L.O., Bornman, J.F., Gaberšček, A., Häder, D.P., Trošt, T., Germ, M., Klisch, M., Gröniger, A., Sinha, R.P., et al. (2002). The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems—An experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* *66*, 2–12.
- Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Heredia, J.B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D.A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* *5*, 5990–5999.
- Schagerl, M., & Zwirn, M. (2015). A brief introduction to the morphological species concept of *Spirogyra* and emanating problems. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* *148*, 67–86.
- Schoenwaelder, M.E.A. (2002a). The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia* *41*, 125–139.

- Schoenwaelder, M.E.A. (2002b). Physode distribution and the effect of “thallus sunburn” in *Hormosira banksii* (Fucales, Phaeophyceae). *Bot. Mar.* 45, 262–266.
- Schoenwaelder, M.E.A. (2008). The biology of phenolic containing vesicles. *Algae* 23, 163–175.
- Sherwood, A.R., Neumann, J.M., Dittbern-Wang, M., & Conklin, K.Y. (2018). Diversity of the green algal genus *Spirogyra* (Conjugatophyceae) in the Hawaiian Islands. *Phycologia* 57, 331–344.
- Simons, J., and & Beem, A.P. (1990). *Spirogyra* species and accompanying algae from pools and ditches in The Netherlands. *Aquat. Bot.* 37, 247–269.
- Simons, J., Van Beem, A.P., & De Vries, P.J.R. (1984). Induction of conjugation and spore formation in species of *Spirogyra* (Chlorophyceae, Zygnematales). *Acta Bot. Neerl.* 33, 323–334.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178.
- Smith, E., Dent, G. (2005). *Modern Raman spectroscopy: a practical approach* (Hoboken, USA: Wiley).
- Spurr, A.R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Res.* 26, 31–43.
- Stancheva, R., Sheath, R.G., & Hall, J.D. (2012). Systematics of the genus *Zygnema* (Zygnematophyceae, Charophyta) from californian watersheds. *J. Phycol.* 48, 409–422.
- Stancheva, R., Hall, J.D., Mccourt, R.M., & Sheath, R.G. (2013). Identity and phylogenetic placement of *Spirogyra* species (Zygnematophyceae, Charophyta) from California streams and elsewhere. *J. Phycol.* 49, 588–607.
- Stancheva, R., Hall, J.D., Herburger, K., Lewis, L.A., Mccourt, R.M., Sheath, R.G., & Holzinger, A. (2014). Phylogenetic position of *Zygogonium ericetorum* (Zygnematophyceae, Charophyta) from a high alpine habitat and ultrastructural characterization of unusual aplanospores. *J. Phycol.* 50, 790–803.
- Steinberg, P.D. (1984). Algal chemical defense against herbivores: allocation of phenolic compounds in the kelp *Alaria marginata*. *Science* (80-.). 223, 405–407.
- Stibal, M., Box, J.E., Cameron, K.A., Langen, P.L., Yallop, M.L., Mottram, R.H., Khan, A.L., Molotch, N.P., Christmas, N.A.M., Cali Quaglia, F., et al. (2017). Algae drive enhanced darkening of bare ice on the Greenland ice sheet. *Geophys. Res. Lett.* 44, 11,463-11,471.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*, 3rd edition (Sunderland, USA: Sinauer Associates).

- Takano, T., Higuchi, S., Ikegaya, H., Matsuzaki, R., Kawachi, M., Takahashi, F., & Nozaki, H. (2019). Identification of 13 *Spirogyra* species (Zygnemataceae) by traits of sexual reproduction induced under laboratory culture conditions. *Sci. Rep.* *9*, 1–11.
- Takano, T., Ikegaya, H., Nozaki, H., & Sakayama, H. (2020). Induction of sexual reproduction reveals the presence of heterothallic *Spirogyra* strains (Zygnematophyceae, Streptophyta). *Phycol. Res.* *68*, 263–268.
- Toth, G.B., & Pavia, H. (2002). Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 14418–14420.
- Tretyn, A., Grolig, F., Magdowski, G., & Wagner, G. (1992). Electron microscopic characterization of calcium-binding physodes in the green alga *Mougeotia scalaris*. *Histochemistry* *97*, 487–492.
- Tsuchikane, Y., & Sekimoto, H. (2019). The genus *Closterium*, a new model organism to study sexual reproduction in streptophytes. *New Phytol.* *221*, 99–104.
- de Vries, J., & Archibald, J.M. (2018). Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytol.* *217*, 1428–1434.
- de Vries, J., de Vries, S., Curtis, B.A., Zhou, H., Penny, S., Feussner, K., Pinto, D.M., Steinert, M., Cohen, A.M., von Schwartzberg, K., et al. (2020). Heat stress response in the closest algal relatives of land plants reveals conserved stress signaling circuits. *Plant J.* *103*, 1025–1048.
- De Vries, P.J.R., Simons, J., & Van Beem, A.P. (1983). Sporopollenin in the spore wall of *Spirogyra* (Zygnemataceae, Chlorophyceae). *Acta Bot. Neerl.* *32*, 25–28.
- Walsby, A. E. (1997). Numerical integration of phytoplankton photosynthesis through time and depth in a water column. *New Phytologist* *136*, 189–209
- Wang, J.-C., Hoshaw, R.W., & McCourt, R.M. (1986). A polyploid species complex of *Spirogyra communis* (Chlorophyta) occurring in nature. *J. Phycol.* *2*, 102–107.
- Webb, W. L. (1974). Carbon dioxide Exchange of *Alnus rubra*: a mathematical model. *Oecologia* *17*, 281–291
- Welling, M., Ross, C., & Pohnert, G. (2011). A desulfatation-oxidation cascade activates coumarin-based cross-linkers in the wound reaction of the giant unicellular alga *Dasycladus vermicularis*. *Angew. Chemie Int. Ed.* *50*, 7691–7694.
- Wickett, N.J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Barker, M.S., Burleigh, J.G., Gitzendanner, M.A., et al. (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 4859–4868.

- Williamson, C.J., Anesio, A.M., Cook, J., Tedstone, A., Poniecka, E., Holland, A., Fagan, D., Tranter, M., & Yallop, M.L. (2018). Ice algal bloom development on the surface of the Greenland Ice Sheet. *FEMS Microbiol. Ecol.* *94*, 1–10.
- Williamson, C.J., Cameron, K.A., Cook, J.M., Zarsky, J.D., Stibal, M., & Edwards, A. (2019). Glacier algae: A dark past and a darker future. *Front. Microbiol.* *10*.
- Williamson, C.J., Cook, J., Tedstone, A., Yallop, M., McCutcheon, J., Poniecka, E., Campbell, D., Irvine-Fynn, T., McQuaid, J., Tranter, M., et al. (2020). Algal photophysiology drives darkening and melt of the Greenland Ice Sheet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *117*, 5694–5705.
- Wise, R.R. (1995). Chilling-enhanced photooxidation> the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth. Res.* *45*, 79–97.
- Wodniok, S., Brinkmann, H., Glöckner, G., Heidel, A.J., Philippe, H., Melkonian, M., & Becker, B. (2011). Origin of land plants: do conjugating green algae hold the key? *BMC Evol. Biol.* *11*, 1–10.
- Wu, H., Volponi, J. V., Oliver, A.E., Parikh, A.N., Simmons, B.A., & Singh, S. (2011). In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3809–3814.
- Yallop, M.L., Anesio, A.M., Perkins, R.G., Cook, J., Telling, J., Fagan, D., MacFarlane, J., Stibal, M., Barker, G., Bellas, C., et al. (2012). Photophysiology and albedo-changing potential of the ice algal community on the surface of the Greenland ice sheet. *ISME J.* *6*, 2302–2313.
- Zheng, X., Hu, Y., Anggreani, E., & Lu, X. (2017). Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of blueberries using Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy and Raman spectroscopy. *J. Food Meas. Charact.* *11*, 1909–1918.
- Zwirn, M., Chen, C., Uher, B., & Schagerl, M. (2013). Induction of sexual reproduction in *Spirogyra* clones - Does an universal trigger exist? *Fottea* *13*, 77–85.