

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jan Ráček

Fenolické látky u řas

Phenolic substances in algae

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Martina Pichrtová, Ph.D.

Praha, 2019

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, 8. 5. 2019

Podpis:

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat především své školitelce RNDr. Martině Pichrtové, Ph.D. za vedení práce, za její trpělivost a všechny cenné rady a připomínky, jež mi při psaní poskytla. Můj velký dík patří i mým rodičům a přítelkyni Tereze, kteří mě neustále podporovali a motivovali k dokončení této práce.

Abstrakt:

Fenolické látky jsou považovány za skupinu sekundárních metabolitů, známou především z vyšších rostlin (Embryophyta). Jejich funkcí je absorbovat škodlivé ultrafialové záření, chránit rostliny před okusem a přitahovat opylovače a šířitele semen. Tyto sloučeniny byly však popsány i u některých fylogeneticky nepříbuzných skupin řas, z nich nejvýznamnější jsou hnědé řasy (Phaeophyceae), sifonální zelené řasy z čeledi Dasycladaceae a spájkivé řasy (Zygnematophyceae). Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o fenolických látkách těchto skupin s důrazem na jejich význam pro biologii daných druhů. První část popisuje fenolické látky z obecného hlediska a rovněž nastiňuje způsob jejich biosyntézy. Další kapitoly se pak věnují zmíněným třem skupinám řas. Nejprozkoumanější v této oblasti jsou hnědé řasy, které ve svých stélkách obsahují unikátní typ taninů, zvaný florotaniny. Následují sifonální řasy z čeledi Dasycladaceae, které syntetizují sulfatované kumariny a poté spájkivé řasy, u nichž byly zjištěny fenolické látky založené na kyselině gallové. Společným znakem těchto látek je podobně jako u vyšších rostlin schopnost pohlcovat záření z ultrafialové části spektra a zhaset reaktivní formy kyslíku. Nicméně florotaniny a kumariny u hnědých, respektive sifonálních řas zastávají i několik funkcí spojených s vývojem organismu, což podtrhuje význam těchto látek a daleko přesahuje definici sekundárních metabolitů. Poslední kapitola se zabývá ligninem a flavonoidům, které, přestože byly velmi dlouho spojovány pouze s vyššími rostlinami, byly v nedávné době popsány i u řasových organismů.

Klíčová slova: fenolické látky, ochrana před UV zářením, florotaniny, kumariny, lignin, flavonoidy

Abstract:

Phenolic substances are considered to be a group of secondary metabolites, known primarily from land plants (Embryophyta). Their function is to absorb harmful ultraviolet radiation, to protect plants from grazing and to attract pollinators and seed spreaders. However, these compounds have also been reported in some phylogenetically unrelated algal groups, the most important of which are brown algae (Phaeophyceae), siphonous green algae from the Dasycladaceae family and conjugating algae (Zygnematophyceae). The aim of this work is to summarize the current knowledge about phenolic compounds of these groups with an emphasis on their significance for the biology of the species. The first part describes phenolic compounds in general and also outlines the way they are biosynthesized. The next chapters then deal with the three algae groups. The most explored ones in this area are brown algae, which contain a unique type of tannins called phlorotannins in their thallus. This is followed by green siphonous algae from the family Dasycladaceae, which synthesize sulphated coumarins and then conjugating algae in which gallic acid-based phenolic compounds have been found. The common feature of these substances is, as with land plants, the ability to absorb radiation from the ultraviolet part of the spectrum and to quench reactive oxygen species. However, phlorotannins and coumarins in brown and siphonous algae also have several functions associated with the development of the organism, which underlines the importance of these substances and far exceeds the definition of secondary metabolites. The last chapter deals with lignin and flavonoids, which, although they have long been associated only with land plants, have recently been described in algal organisms.

Key words: phenolic substances, UV protection, phlorotannins, coumarins, lignin, flavonoids

Seznam použitých zkratek:

DHyC = 6,7-dihydroxykumarin-3-sulfát

DNA = deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

DW = hmotnost sušiny (dry weight)

$\Delta F/F_m'$ = efektivní kvantový výtěžek fotochemie

F_v/F_M = maximální kvantový výtěžek fotochemie

FW = čerstvá hmotnost (fresh weight)

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

PAR = fotosynteticky aktivní záření (photosynthetically active radiation)

PSII = fotosystém II (photosystem II)

$rETR_{max}$ = maximální hodnota relativního elektronového transportu (relative electron transport rate)

ROS = reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

TEM = transmisní elektronový mikroskop

THyC = 3,6,7-trihydroxykumarin

UV = ultrafialové záření (ultra-violet)

VIS = viditelné záření (visible)

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Charakteristika fenolických látek.....	2
2.1. Třídění a syntéza fenolických látek u řas	2
2.2. Funkce fenolických látek u řas	4
3. Florotaniny u hnědých řas.....	5
3.1. Charakteristika florotaninů a jejich syntéza	5
3.2. Fysody – jejich lokalizace, biogeneze a pohyb	6
3.3. Primární funkce florotaninů.....	6
3.4. Sekundární funkce florotaninů	8
4. Kumariny u sifonálních zelených řas.....	9
4.1. Charakteristika kumarinů a jejich lokalizace na úrovni buňky	9
4.2. Role kumarinů v absorpci UV záření	11
4.3. Exkrece kumarinů do okolního prostředí	12
4.4. Funkce kumarinů v tvorbě ochranné zátky.....	13
4.5. Další možné funkce kumarinů	15
5. Fenolické látky u spájitvých řas.....	16
5.1. Charakteristika fenolických látek u spájitvých řas	16
5.2. <i>Mesotaenium berggrenii</i> a <i>Ancylonema nordenskiöldii</i>	17
5.3. <i>Zygnema</i>	19
5.4. <i>Zygnemopsis</i>	22
5.5. <i>Zygogonium ericetorum</i>	22
5.6. <i>Spirogyra</i>	25
6. Lignin a flavonoidy u řas	26
6.1. Lignin.....	26
6.2. Flavonoidy	28
7. Závěr	30
8. Bibliografické citace	31

1. Úvod

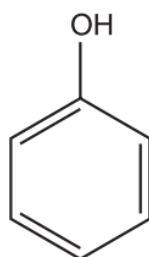
Sekundární metabolity jsou u vyšších rostlin (Embryophyta) početnou a z chemického hlediska velmi různorodou skupinou látek. Na rozdíl od primárních metabolitů, mezi které se řadí především proteiny, sacharidy a lipidy, se produkty sekundárního metabolismu přímo neúčastní růstu a vývoje organismu, ale významně zvyšují jeho šanci na přežití v daném prostředí. Sekundární metabolismus je velmi plastický a podléhá relativně rychlé evoluci v závislosti na měnících se okolních podmínkách. To je pravděpodobně důvodem obrovského spektra látek, které byly doposud z rostlin izolovány (více než 200 000 odlišných struktur). Některé z těchto látek dokonce v evoluci získaly ke své ekologické (sekundární) funkci i funkci související s vývojem organismu (primární funkce), například některé flavonoidy nebo lignin. Jiné, třeba primární karotenoidy, zastávají již jen funkci primární, přestože jsou produkovány v rámci biosyntetických drah sekundárního metabolismu (Hartmann, 2007). Z hlediska jejich biosyntézy lze rostlinné sekundární metabolity dělit do tří základních skupin (Bruneton, 2013): 1) izoprenoidy, 2) alkaloidy a dusíkaté deriváty a 3) fenolické látky.

Rostlinné fenolické látky (zkráceně fenoly) jsou z hlediska jejich syntézy a významu relativně dobře prozkoumané. Účastní se jak abiotických (ochrana před ultrafialovým zářením), tak biotických interakcí (odpuzování herbivorů, lákání opylovačů a šířitelů semen), podílí se na mechanické odolnosti buněčných stěn, ale slouží také jako signální a regulační molekuly na buněčné úrovni (Bravo, 1998; Harborne & Williams, 2000; Taiz & Zeiger, 2006). Tato skupina látek byla však také popsána i u tří vzájemně nepříbuzných skupin řas – u chaluh neboli hnědých řas (Phaeophyceae), které obsahují vysokomolekulární florotaniny (Imbs & Zvyagintseva, 2018), zelených sifonálních řas z čeledi Dasycladaceae, které syntetizují sulfatované kumariny (Hartmann, Ganzera, Karsten, Skhirtladze, & Stuppner, 2018) a u spájkivých řas (Zygnematophyceae), jejichž fenolické látky jsou založené na kyselině gallové (Niemetz & Gross, 2005). Jejich biologický význam je popsán především u chaluh, zatímco spájkivé řasy v tomto ohledu představují méně prozkoumanou oblast.

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o fenolických látkách především ve výše zmíněných skupinách řas. Zabývá se jejich chemickou podstatou, ale zejména jejich rolí v ekofyziologii řas a funkcí z hlediska růstu a vývoje. V poslední části je krátce probírána problematika ligninu a flavonoidů, jejichž přítomnost byla až do nedávné doby považována za charakteristickou jen pro vyšší rostliny.

2. Charakteristika fenolických látek

Fenolické látky jsou organické sloučeniny, pro něž je charakteristická přítomnost takzvané fenolové skupiny, ve které je hydroxylová skupina ($-OH$) vázaná na aromatické jádro (Obr. 1). Tato výchozí struktura může být modifikována různými dalšími substituenty, například další fenolovou skupinu, heterocyklem nebo postranními lineárními řetězci, což dává vznik různým skupinám fenolických látek od nízkomolekulárních fenolických kyselin po vysokomolekulární biopolymery jako je lignin nebo taniny. Ve vyšších rostlinách se často vyskytují konjugované s jednou nebo více molekulami cukrů, nejčastěji glukózou, což významně zvyšuje jejich rozpustnost ve vodě. Často jsou skladované ve vakuolách, ale některé, například fenolické kyseliny nebo již zmíněný lignin, jsou vázané ke složkám buněčných stěn (Bravo, 1998; Bruneton, 2013; Harborne & Williams, 2000).



Obr. 1: Chemická struktura fenolu. Podle Bruneton (2013).

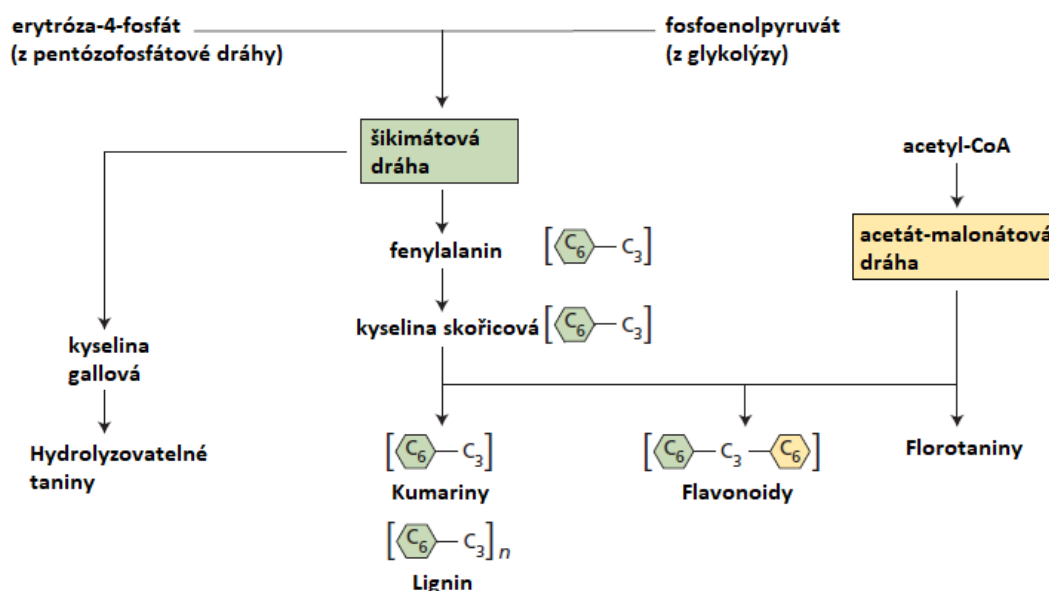
Podle Taiz & Zeiger (2006) bylo mezi rostlinami identifikováno více než 10 000 fenolických látek, které se třídí do mnoha skupin na základě jejich uhlíkaté kostry (Bravo, 1998). Mezi nejvýznamnější patří například flavonoidy zvané antokyany, které způsobují modré, fialové nebo růžové zbarvení květů a plodů, které tak činí rostlinné generativní orgány atraktivní pro živočichy. Navíc také chrání rostliny před škodlivými účinky ultrafialového záření (UV). Taniny (trísloviny) často činí vegetativní části rostlin nebo nezralé plody nechutné pro herbivory a rovněž vykazují antimikrobiální vlastnosti. Nakonec vysoce rezistentní lignin, který dodává pevnost vodivým pletivům a tvoří podstatnou součást dřevin (Bravo, 1998; Harborne & Williams, 2000; Labeeuw, Martone, Boucher, & Case, 2015).

2.1. Třídění a syntéza fenolických látek u řas

Fenolické látky jsou u rostlin a řas syntetizovány dvěma základními drahami: 1) šikimátovou a na ni navazující fenylypropanoidovou dráhou a 2) acetát-malonátovou dráhou (Obr. 2). Výchozími substráty šikimátové dráhy jsou meziproducty pentózofosfátové dráhy

(erytróza-4-fosfát) a glykolýzy (fosfoenolpyruvát), které dávají vznik kyselině šikimové. Konečným produktem této dráhy jsou tři proteinogenní aromatické aminokyseliny – tyrosin, tryptofan a fenylalanin (Taiz & Zeiger, 2006). V rámci této dráhy také vzniká kyselina gallová, která vede ke vzniku hydrolyzovatelných taninů (Niemetz & Gross, 2005). Zdá se, že tyto látky jsou charakteristické pro třídu Zygnematophyceae, jak vyplývá z jejich opakovaných nálezů v několika zástupcích (Newsome, Murphy, & van Breemen, 2013; Nishizawa, Yamagishi, Nonaka, Nishioka, & Ragan, 1985; Remias, Schwaiger, et al., 2012).

Na šikimátovou dráhu navazuje dráha fenylpropanoidová. U vyšších rostlin a některých streptofytních řas vystupuje v prvním kroku reakce fenylalanin, který je přeměněn na kyselinu skořicovou (de Vries, de Vries, Slamovits, Rose, & Archibald, 2017; Labeeuw et al., 2015). Přestože tato sloučenina byla nalezena i u mnoha jiných skupin řas (Goiris et al., 2014), příslušný homolog enzymu katalyzujícího tuto první reakci byl objeven jen u rodu *Klebsormidium* z linie Streptophyta (de Vries et al., 2017). Buď tento enzym, fenylalanin amoniak lyáza, mezi řasami stále čeká na objevení, nebo existuje jiný enzym s analogickou funkcí, nebo je možné, že některá z jiných aromatických aminokyselin stojí na počátku jejich fenylpropanoidové dráhy (de Vries et al., 2017; Labeeuw et al., 2015).



Obr. 2: Schematické znázornění dvou hlavních biosyntetických drah vedoucích k fenolickým látkám, šikimátové a acetát-malonátové. Kromě meziproductů jsou zde zmíněny nejvýznamnější látky, které jsou přítomné u řas a které jsou předmětem této práce. V závorkách jsou u některých z nich zjednodušeně naznačeny jejich chemické struktury i s počtem uhlíků. Upraveno podle Taiz & Zeiger (2006).

Nezávisle na první reakci vede fenylypropanoidová dráha ke vzniku velké skupiny fenolických látek, zvaných fenylypropanoidy. Jejich struktura je typická aromatickým jádrem substituovaným třetí uhlíkatou propenovou skupinou, počet uhlíku tedy odpovídá zápisu C_6-C_3 (Bravo, 1998; Taiz & Zeiger, 2006). Mezi tuto skupinu patří kumariny přítomné u sifonálních řas z čeledi Dasycladaceae (Menzel, Kazlauskas, & Reichelt, 1983) nebo monomery ligninu, který byl kromě vyšších rostlin identifikován rovněž u streptofytní řasy *Coleochaete* (Sørensen et al., 2011) a červené řasy *Calliarthron cheilosporioides* (Martone et al., 2009).

Druhá dráha, acetylmalonátová, vychází z acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) a vede ke vzniku florotaninů, skupině fenolických látek specifických pro chaluhy (Creis, Ar Gall, & Potin, 2018). Tyto dvě popsané dráhy se rovněž mohou kombinovat a dát vznik flavonoidům, které jsou významné zejména pro vyšší rostliny (Bravo, 1998; Taiz & Zeiger, 2006).

2.2. Funkce fenolických látek u řas

Stélky hnědých, sifonálních a spájivých řas jsou vzájemně morfologicky velmi odlišné a taková je i jejich fyziologie. Fenolické látky u těchto skupin často plní velmi specifické funkce, které jsou blíže popsány v příslušných kapitolách. Na druhou stranu jejich společný fenolický charakter jim propůjčuje dvě schopnosti – absorbovat UV záření a zhaset reaktivní formy kyslíku (ROS).

Ultrafialové záření (UV) se dělí zpravidla do čtyř úseků, přičemž pouze UV-A (310–400 nm) a UV-B (280–310 nm) představují pro organismy riziko (Cockell & Knowland, 1999). Jejich škodlivé účinky postihují především deoxyribonukleovou kyselinu (DNA), fotosyntetický aparát a cytoskelet (Cockell & Knowland, 1999; Pichrtová, Remias, Lewis, & Holzinger, 2013; Schoenwaelder, Wiencke, Clayton, & Glombitza, 2003). Především fotoautotrofní organismy jsou tímto stresovým faktorem zatíženy, poněvadž nevyhnutelně doprovází fotosynteticky aktivní záření (PAR), které pohání fotochemické procesy fotosyntézy. Díky přítomnosti π -elektronů aromatických skupin jsou fenolické látky schopné absorbovat v UV části spektra, čehož mnohé řasy využívají a tyto látky akumulují na periferii svých buněk k ochraně intracelulárních částí (Cockell & Knowland, 1999).

Oxidativní stres, ať je již způsoben nepřímo UV zářením, desikací nebo přítomností těžkých kovů, generuje ROS. Ty mohou reagovat s mnohými biopolymery a narušovat tak jejich funkci. Díky své struktuře jsou fenolické látky jednou ze skupin, která je schopné ROS vychytávat, a tak oxidativnímu stresu předcházet. Tuto schopnost řasy pravděpodobně také využívají, i když byla málo kdy testována (Fernando, Kim, Son, Jeong, & Jeon, 2016).

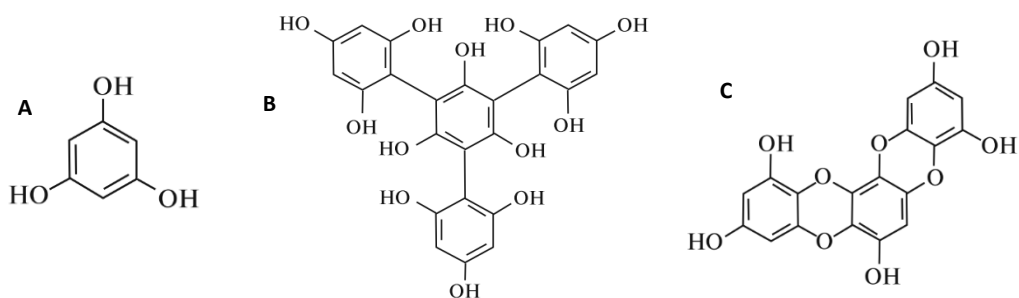
3. Florotaniny u hnědých řas

Nejvíce prostudovanou skupinou fenolických látek u řas jsou florotaniny. Jedná se o jeden ze tří typů taninů, který je zcela specifický pro hnědé řasy (Phaeophyceae) z linie Stramenopila, zatímco vyšší rostliny je vůbec neobsahují. Následující kapitola nejprve rozebírá florotaniny z jejich chemického hlediska, jejich rozšíření mezi hnědými řasami a lokalizaci na buněčné a organismální úrovni. Další část je pak věnována funkcím, které jsou s tímto typem látek spojené.

3.1. Charakteristika florotaninů a jejich syntéza

Florotaniny jsou z chemického hlediska polymerní struktury florogluciolu (1,3,5-trihydroxybenzen) o velmi variabilní molekulové hmotnosti (Obr. 3). Na základě typu vazeb mezi monomery se člení do čtyř základních skupin: 1) fuhaloly a floreoetholy (etherové vazby), 2) fukoly (fenylové vazby), 3) fukofloroetholy (etherové a fenylové vazby) a 4) eckoly (vazby typu dibenzo-1,4-dioxin), přičemž každý z těchto typů může být lineární nebo větvený (Imbs & Zvyagintseva, 2018; La Barre, Potin, Leblanc, & Delage, 2010). Jeden druh pak může obsahovat různé typy těchto látek a s různým stupněm polymerace. Důležitější je však skutečnost, že tyto struktury obsahují velké množství hydroxylových skupin, které činí tyto látky vysoce hydrofilní a schopné srážet proteiny vazbou do komplexů (Bravo, 1998; Imbs & Zvyagintseva, 2018). Tato vlastnost je pak pravděpodobně důležitá z hlediska deterenčních účinků florotaninů na jejich herbivory (viz dále).

Na syntéze florogluciolu se podílí acetylát-malonátová dráha, která vychází z molekul acetylkoenzymu A (acetyl-CoA). Nicméně další kroky v polymeraci florogluciolu do florotaninů zatím nejsou objasněné (Creis, Ar Gall, & Potin, 2018). Molekuly florotaninů mohou být rovněž halogenovány atomy chloru, bromu nebo jódu (La Barre et al., 2010).



Obr. 3: Chemická struktura florogluciolu (A) jakožto monomeru florotaninů; tetrafukolu (B), zástupce skupiny fukolů s fenylovými vazbami; eckolu (C), který obsahuje dibenzo-1,4-dioxinový typ vazby. Podle Imbs & Zvyagintseva (2018).

3.2. Fysody – jejich lokalizace, biogeneze a pohyb

Fenolické látky jsou u chaluhy obsaženy ve váčcích obalených membránou, které se nazývají fysody (Schoenwaelder, 2008). Ty se vyskytují ve velkém množství ve vajíčkách, zygotách a raně se vyvíjejícím embryu. V dospělosti jsou fysody obsaženy zejména v povrchových vrstvách stélky, v meristemické zóně, v holdfastech a také v buňkách kolem konceptákulí (Schoenwaelder, 2002b; Schoenwaelder & Clayton, 1998b; Schoenwaelder et al., 2003). Podle Schoenwaelder & Clayton (2000) jsou fysody s fenolickými látkami produkovány endoplazmatickým retikulem v oblasti kolem jádra a dále upravovány v cisternách Golgiho aparátu. Po své biogenezi jsou fysody do buňky dopravovány pomocí aktinového cytoskeletu. Mikrotubulární cytoskelet je pak důležitý z hlediska specifické akumulace florotaninových tělísek v místech aktivní tvorby buněčné stěny, například v rostoucích rhizoidech nebo tvořících se příčných přepážkách při cytokinezi (Schoenwaelder & Clayton, 1999b).

3.3. Primární funkce florotaninů

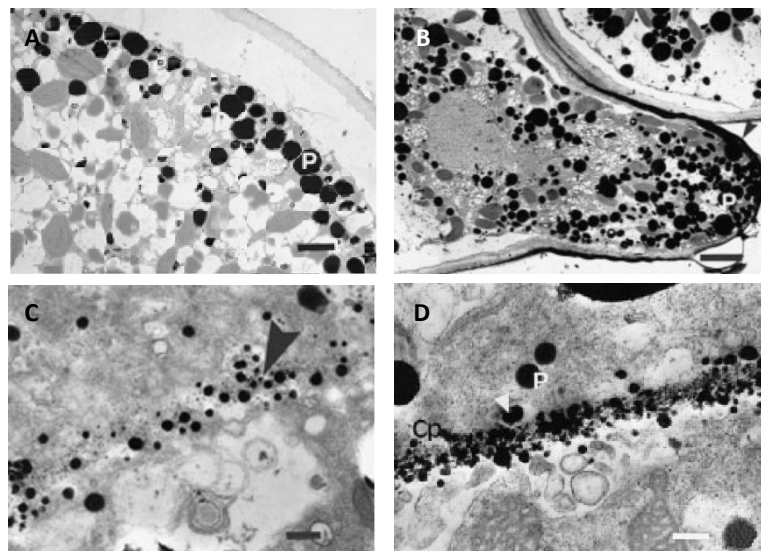
Florotaniny u hnědých řas jsou důležité nejen z hlediska jejich interakcí s prostředím, ale byla popsána také řada jejich rolí spjatých s růstem a vývojem organismu. Z tohoto hlediska spadají florotaniny spíše do kategorie primárních metabolitů, přestože jsou produkovány i k jiným účelům. Je však potřeba říci, že funkce fenolů ve vývoji jsou prozkoumané pouze u několika rodů z řádu Fucales (*Hormosira*, *Acrocarpia*, *Phyllospora*, *Himanthalia* a *Fucus*) a tak není jisté, zda je možné níže popsané funkce aplikovat i na další řády.

Fenolické látky obsažené ve fysodech plní zásadní role již od samého počátku života organismu. Po oplození vajíček spermatozoidem dochází k jejich výrazné sekreci skrze póry v membráně (Obr. 4A). Uvolněné fenoly jsou na povrchu oxidovány a spolupodílí se na stavbě stěny zygoty (Schoenwaelder & Clayton, 1998a, 1998b; Schoenwaelder & Wiencke, 2000). Zvažována je také jejich role v ochraně před polyspermií, která vede k abnormálními vývoji embrya a následně k nevyhnutelné smrti (Brawley, 1987). U druhu *Fucus serratus* a *Acrocarpia paniculata* bylo krátce po oplození pozorováno, že dochází ke snížení motility okolních spermatozoidů, a nakonec k jejich úplnému zastavení. Zatímco tento jev u řasy *Acrocarpia* probíhal souběžně s exkrecí fenolických látek, u rodu *Fucus* nikoliv. Zatím tedy zůstává nejasné, zda příčinou imobilizace samčích gamet jsou fenolické látky nebo nějaké jiné metabolity. Kromě jejich stavební funkce jsou vylučované fenoly společně s algináty hlavními složkami lepivého materiálu, který je zodpovědný za pevné uchycení mladého embrya k substrátu (Berglin, Delage, Potin, Vilter, & Elwing, 2004; Bitton et al., 2006; Schoenwaelder

& Clayton, 1998a; Schoenwaelder & Wiencke, 2000). Podle autorů Bitton et al. (2006) v přítomnosti vápenatých iontů, iontů bromu a peroxidázy tyto složky vytváří trojrozměrnou síť, které jsou přisuzovány silné adhezivní vlastnosti.

Fysody se také podílí na dalších vývojových fázích embrya, konkrétně na jeho polarizaci. Zhruba po 20 hodinách od oplození lze pozorovat masivní produkci fysodů v oblasti kolem jádra. Ty pak migrují podél aktinových a mikrotubulárních vláken k jednomu z pólů zygoty, který se začne protahovat a vyvíjet v rhizoid (Obr. 4B), zatímco druhý pól dá vznik samotné stélce (Schoenwaelder & Clayton, 1998a, 1998b; Schoenwaelder & Wiencke, 2000). Rhizoidy se v průběhu svého dalšího vývoje prodlužují, větví, přičemž každý z nich na své špičce udržuje vysoký počet fysodů, které přináší materiál na stavbu buněčné stěny (Schoenwaelder & Clayton, 1998a).

Nakonec přítomnost fysodů je nezbytná i pro tak zásadní proces, jakým je cytokineze. Tato tělíčka se po proběhlé karyokinezi akumulují v rovině mezi jádry a určují pozici budoucí buněčné přepážky (Obr. 4C; Schoenwaelder & Clayton, 1998a; Schoenwaelder & Wiencke, 2000). Přitom tento jev je znovu velmi závislý na cytoskeletu, bez jehož dynamiky k rozdělení buněk vůbec nedojde (Schoenwaelder & Clayton, 1999b). Kromě váčků s polysacharidy jsou do vznikající buněčné stěny rovněž dopravovány i fenolické látky (Obr. 4D), které se tak stávají jejich integrální součástí (Schoenwaelder & Clayton, 1998a, 1999a).

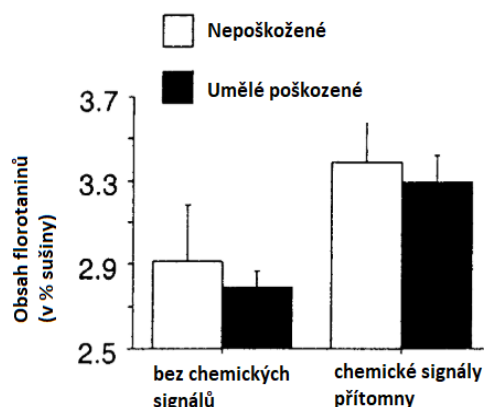


Obr. 4: Distribuce fysodů během raných vývojových fází embrya chaluh na snímcích z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). (A) Fysody na periferii mladé zygoty. Měřítko = 2 μm . (B) Fysody soustředěné ve špičce vyvíjejícího se rhizoidu. Měřítko = 5 μm . (C) Fysody se akumulují v rovině budoucí buněčné desky. Měřítko = 0,5 μm . (D) Fysody podílející se na tvorbě příčné přepážky. Měřítko = 0,5 μm . (A) *Fucus spiralis*. (B)–(D) *Hormosira banksii*. Zkratky: P fysody, Cp buněčná deska. Podle Schoenwaelder & Clayton (1998a); Schoenwaelder & Wiencke (2000).

3.4. Sekundární funkce florotaninů

Florotaniny se podílí i na řadě interakcí s biotickým a abiotickým prostředím. Jsou součástí konstitutivní obrany mnoha chaluh. Existuje řada studií, které prokázaly jejich deterentní účinek na mnoho herbivorů – mořských plžů, ježovek, krabů a také ryb (Anderson & Velimirov, 1982; Geiselman & McConnell, 1981; Steinberg, 1985). Experimentálně bylo prokázáno, že mnoho z těchto organismů upřednostňuje potravu s nižším obsahem fenolických látek. Například mořský plž *Tegula funebris*, který je považován za potravního generalistu, si přednostně vybírá kelpové chalupy z řádu Laminariales vzhledem k jejich průměrně nízkému obsahu fenolů (Steinberg, 1985). K preferenci dochází na úrovni druhu i jedince, kdy například generativní části stélky obsahují výrazně větší množství florotaninů než vegetativní části (Steinberg, 1984). Florotaniny, podobně jako hydrolyzovatelné a kondenzované taniny u vyšších rostlin, jsou schopné srážet proteiny jejich vazbou do komplexů. Váží jednak rozkladné enzymy herbivora, ale rovněž proteiny z rostlinné biomasy, čímž snižují přístup dusíku těmto organismům (Bravo, 1998). Bylo například pozorováno, že u ježovky rodu *Strongylocentrotus* při podávání chaluh s vyšším obsahem fenolů dochází ke zpomalení somatického růstu a menšímu objemu gonád (Larson, Vadas, & Keser, 1980). Zajímavé zjištění rovněž poskytla studie autorů Toth & Pavia (2002), podle které je řasa *Ascophyllum nodosum* schopná reagovat zvýšenou produkcí florotaninů na chemické látky uvolňované při spásání okolních jedinců (Obr. 5).

Významná je i jejich schopnost absorpce v UV části spektra. Například výsledky studie Pavia et al. (1997) ukázaly, že zvýšená intenzita UV-B záření může vést k signifikantnímu nárůstu florotaninů u řasy *Ascophyllum*, jejichž absorpční spektrum zasahovalo do této oblasti. S ohledem na výskyt fysoidů v periferních částech stélky, kolem konceptakul i v samotném vajíčku a následně vzniklém embryu lze předpokládat dobrou ochranu nejdůležitějším částem stélky (Schoenwaelder, 2002a).



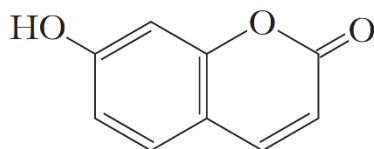
Obr. 5: Obsah florotaninů v poškozených a nepoškozených stélkách *A. nodosum* s přívodem vody z akvárií buď s nepoškozenými jedinci (bez chemických signálů) nebo s jedinci právě spásanými (chemické signály přítomny). Nezávisle na počátečním stavu stélek došlo k výrazné produkci florotaninů v přítomnosti chemických signálů. Podle Toth & Pavia (2002).

4. Kumariny u sifonálních zelených řas

Zelené řasy patří do sesterských řádů Bryopsidales a Dasycladales jsou charakteristické tím, že jejich tělo je tvořené jedinou obrovskou buňkou, která není přepažená příčnými buněčnými stěnami – jedná se o sifonální stélku (Menzel, 1980, 1988). Navzdory této zdánlivě omezující skutečnosti jsou stélky sifonálních zelených řas často makroskopické a tvarově diverzifikované (Menzel, 1988). Většinu buňky zabírá velká vakuola, která zatlačuje cytoplazmu do kortikální vrstvy pod cytoplazmatickou membránu (Menzel, 1988). V cytoplazmě se často nachází velké množství jader, ale u některých zástupců jako *Acetabularia* nebo *Dasycladus* je přítomno jen jedno (Menzel, 1988; Ross, Küpper, Vreeland, Herbert Waite, & Jacobs, 2005).

4.1. Charakteristika kumarinů a jejich lokalizace na úrovni buňky

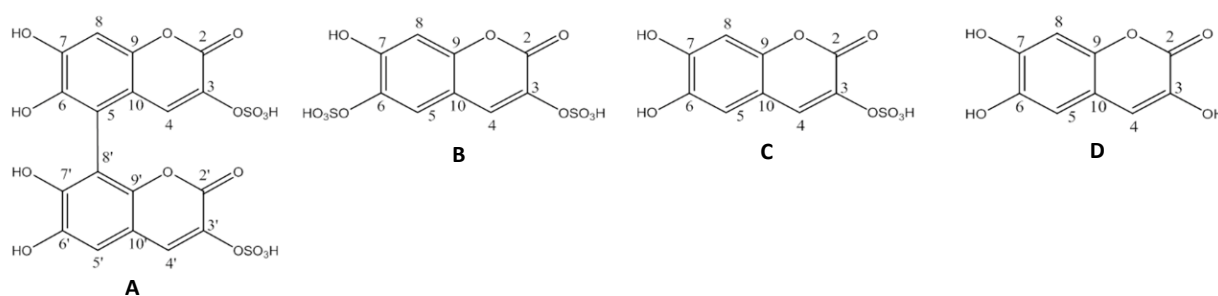
V 80. letech minulého století byly u některých zástupců čeledi Dasycladaceae z řádu Dasycladales poprvé mezi řasovými liniemi izolovány a identifikovány kumariny (Menzel et al., 1983). Kumariny jsou skupinou fenylypropanoidů (C₆-C₃), které vznikají z kyseliny skořicové hydroxylací a následnou intramolekulární esterifikací (laktonizací). Touto reakcí vzniká základní kumarin umbeliferon (Obr. 6), od kterého jsou všechny ostatní odvozeny (Sollai, Zucca, Sanjust, Steri, & Rescigno, 2008). Kumariny jsou mezi krytosemennými rostlinami značně rozšířené, velké množství, kvalitativní i kvantitativní, je nalézáno zejména u čeledi Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae a Fabaceae. Tyto látky chrání rostliny před okusem ze strany herbivorů a zamezují invazi bakteriálních a houbových patogenů (Matos, Santana, Uriarte, Abreu, Molina, & Yordi, 2015).



Obr. 6: Strukturální vzorec umbeliferonu (7-hydroxykumarin). Podle Hopkins & Hüner (2004).

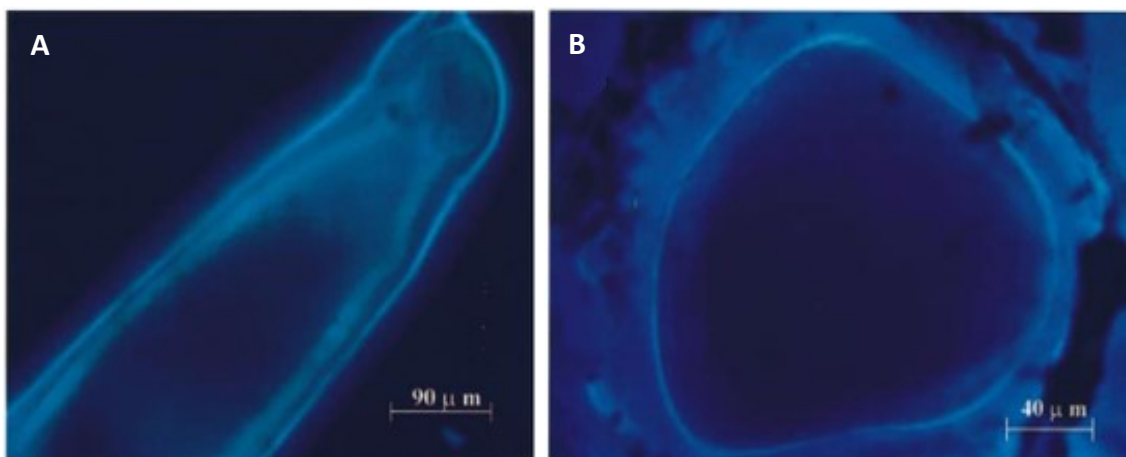
Lze konstatovat, že řasa *Dasycladus vermicularis* je modelovým druhem pro studium řasových kumarinů, nicméně tyto látky byly zjištěny i u druhu *Cymopolia barbata* a lze předpokládat, že je obsahuje i *Batophora oerstedii* (Kurth, Welling, & Pohnert, 2015; Menzel et al., 1983). Menzel et al. (1983) jako první izolovali z extraktu z *Dasycladus vermicularis* tři

hlavní kumariny (1, 2 a 3), jejichž kyselou hydrolyzou byly látky 1 a 2 kompletně přeměněny na sloučeninu 3, kterou autoři identifikovali jako 3,6,7-trihydroxykumarin (THyC). Nová studie Hartmann et al. (2018) však ukázala, že celková skladba kumarinů této řasy je komplexnější. Autoři izolovali z nepoškozených buněk čtyři kumariny – THyC; 6,7-dihydroxykumarin-3-sulfát (DHyCS); dasycladin A a dasycladin B (Obr. 7), přičemž dasycladin A představuje majoritně zastoupenou sloučeninu a THyC se vyskytuje jen ve stopových množstvích. Podle Welling et al. (2011) jsou sulfatované formy kumarinů stabilní součástí stélky, které jsou do aktivní formy přeměněny pomocí sulfatáz. Aktivní formou tyto autoři nazývají THyC, který zastává důležitou funkci při obnově integrity buňky (viz dále).



Obr. 7: Chemická struktura kumarinů izolovaných z *Dasycladus vermicularis*; (A) dasycladin A, (B) 7-hydroxykumarin-3,6-disulfát (dasycladin B), (C) 6,7-dihydroxykumarin-3-sulfát (DHyCS), (D) 3,6,7-trihydroxykumarin (THyC). Upraveno podle Hartmann et al. (2018).

Kumariny jsou u řasy *Dasycladus vermicularis* přítomny v relativně vysokých koncentracích, které se mění s hloubkou a i během roku, nicméně současná data neumožňují vyvozovat konečné závěry (Gómez, Pérez-Rodríguez, Viñegla, Figueroa, & Karsten, 1998; Hartmann et al., 2018). Stélky z hloubky 0,5 m z jižního Španělska obsahují kumariny zejména v apikálních částech stélky (průměrně 20 mg g⁻¹ FW), které jsou více vystavené slunečnímu záření, v bazálních částech je pak koncentrace o něco menší (průměrně 12 mg g⁻¹ FW; Gómez et al. 1998; Pérez-Rodríguez et al. 2001, 2003). Zdá se, že kumariny nejsou v této řase lokalizované ve specializovaných organelách, ale jsou soustředěné ve dvou vrstvách, v rámci buněčné stěny a okolo vakuolární membrány (Pérez-Rodríguez et al., 2003). Podobně jako jiné fenolické látky mají i kumariny schopnost autofluorescence v modré části spektra po jejich excitaci UV zářením, což usnadňuje jejich vizualizaci na úrovni buňky (Obr. 8).



Obr. 8: Autofluorescence kumarinů ve dvou odlišných vrstvách u *Dasycladus vermicularis*; (A) podélný řez, (B) příčný řez. Upraveno podle Pérez-Rodríguez et al. (2003).

Kumariny u druhu *D. vermicularis* zastávají více funkcí. Potvrzena byla jejich role v ochraně buněčných kompartmentů a fotosyntetického aparátu před nadměrným UV zářením a také spoluúčast na tvorbě zátek, které se vytváří jako reakce na mechanické poškození (Pérez-Rodríguez et al., 2003; Welling et al., 2011). Dále byly u těchto látek nastíněny jejich antioxidantní a antibakteriální vlastnosti, a nakonec potenciální schopnost odpuzovat herbivory (Menzel et al., 1983; Pérez-Rodríguez et al., 2001).

4.2. Role kumarinů v absorpci UV záření

Dasycladus vermicularis je mořský druh rostoucí v mělkých vodách tropických a subtropických oblastí, známý například z Kanárských ostrovů, ostrovů v Karibském moři, Austrálie, Taiwanu a také z příbřeží Středoziemního moře (Guiry & Guiry, 2019; Huang & Lu, 2006). Tato řasa je často součástí společenstev, které jsou vystaveny vysokým denním dávkám slunečního záření. Hodnoty PAR mohou v letních měsících v Mediteránu dosahovat i 2 000 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nad vodní hladinou, zatímco denní dávky UV záření často převyšují 1 000 kJ m^{-2} (Gómez et al., 1998). Studie ukazují, že fotosyntetický aparát této řasy je na vysokou míru ozáření dobře adaptován. Toto tvrzení podporují například malé poklesy efektivního kvantového výtěžku fotochemie PSII ($\Delta F/F_m'$) během letních dní (nižší než 30 %) a současně jejich úplná obnova během odpoledne (Gómez et al. 1998, Pérez-Rodríguez et al. 1998).

Jako ochranu před relativně vysokými dávkami UV záření *D. vermicularis* syntetizuje kumariny (Gómez et al., 1998; Pérez-Rodríguez et al., 1998). Izolované THyC má absorpční maximum v UV-A oblasti (342 nm) a menší pík v UV-B (265 nm), podobně jako zbylé dvě získané sloučeniny (Menzel et al., 1983; Ross, Küpper, et al., 2005). Podobné výsledky získali

i Pérez-Rodríguez et al. (1998), kteří pomocí techniky HPLC izolovali také 3 sloučeniny (blíže nespecifikované), absorbující v UV-A (podle extrakčního činidla v rozmezí 332–360 nm) a méně pak v UV-B oblasti (309 nm). Nicméně THyC se u nepoškozených buněk vyskytuje jen ve velmi nízkých koncentracích, a tak za absorpci UV světla jsou zodpovědné sulfatované formy kumarinů, např. DHyCS, které má podobné absorpční vlastnosti jako THyC (Welling et al., 2011). Podle studie Pérez-Rodríguez et al. (2003) absorbují obě vrstvy kumarinů zhruba 88 % dopadajícího záření o vlnové délce 346 nm, tzn. jen 1,5 % z celkového záření prochází do vakuoly. Vzhledem ke stále vysokým intracelulárním koncentracím kumarinů, jejich distribuci a schopnosti absorbovat zejména v UV-A oblasti jsou kumariny považovány za příčinu zmíněné nízké fotoinhibice této řasy (Gómez et al., 1998; Pérez-Rodríguez et al., 2003, 2001).

Stimulem syntézy kumarinů je navzdory odlišným absorpčním vlastnostem podle Gómez et al. (1998) hlavně UV-B záření. V této studii autoři pozorovali nižší hodnoty absorbance (a tedy nižší koncentraci kumarinů) u vzorků vystavených přirozenému záření s odfiltrovaným UV-B světlem během časných odpoledních hodin (denní dávky: PAR 11 000 kJ m⁻², UV-A 1 411 kJ m⁻², UV-B 16,2 kJ m⁻²). Na druhou stranu vysoký obsah kumarinů byl zjištěn i u vzorků vystavených po několik dní nízkým hodnotám PAR (80 μmol fotonů m⁻² s⁻¹).

4.3. Exkrece kumarinů do okolního prostředí

Kumariny nejsou jen intracelulární součástí řasy, ale jsou rovněž vylučovány nepoškozenými buňkami do okolního prostředí v závislosti na několika abiotických faktorech (Menzel et al., 1983; Pérez-Rodríguez et al., 2001, 1998). Koncentrace exkretovaných kumarinů jsou oproti intracelulárním koncentracím mnohem nižší (<0,4 mg g⁻¹ DW), přesto jsou jejich hodnoty dostatečně vysoké na to, aby byly příčinou hnědozeleného zbarvení okolní mořské vody. Exkrece je rovněž provázena posunem v absorpčním maximu z 332–352 nm na 388 nm, což naznačuje určitou změnu ve struktuře (Pérez-Rodríguez et al., 2001).

Míru exkrece kumarinů do prostředí ovlivňuje několik faktorů. Pérez-Rodríguez et al. (1998) provedli pokus, ve kterém tři skupiny stélek *D. vermicularis* vystavili po dobu 72 hodin třem různým kombinacím PAR (32 μmol fotonů m⁻² s⁻¹), UV-A (52,04 W m⁻²) a UV-B (2,81 W m⁻²): (1) PAR + UV-A + UV-B (PAB); (2) PAR + UV-A (PA); (3) PAR (P). Současně s tím měřili v určitých intervalech maximální kvantový výtěžek (F_v/F_m) a míru exkrece kumarinů. Výsledky ukázaly, že výrazná exkrece nastala po 24 hodinách u stélek vystavených PAB a samotnému PAR, které byly více stresované (vykazovaly nižší F_v/F_m) než stélky vystavené

PAR + UV-A. Z toho plyne, že stimulem pro exkreci kumarinů může i v tomto případě být UV-B záření, ale rovněž nízké hodnoty PAR, které nedosahovaly ani kompenzačního bodu fotosyntézy.

Tímto fenoménem se zabývala i práce Pérez-Rodríguez et al. (2001), ve které autoři vystavili stélky různým intenzitám PAR, teploty a salinity po dobu 24 hodin. Vysoká míra exkrece ($<0,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) byla především pozorována při vysokých ($650 \text{ } \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a naopak nízkých ($97 \text{ } \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) hodnotách PAR, což částečně potvrzuje výsledky minulé studie. V případě vysoké hodnoty kvantové ozáření, byla zvyšující se exkrece korelována se značným poklesem efektivního kvantového výtěžku $\Delta F/Fm'$, nicméně za nízké kvantové ozáření zůstal poměr $\Delta F/Fm'$ relativně vysoký. Zvýšená teplota a zvýšená salinita jsou dalšími indukujícími faktory, nicméně příslušné hodnoty $\Delta F/Fm'$ nenasvědčovaly, že by při daných podmínkách byly fotochemické procesy inhibovány. Navíc koncentrace exkretovaných kumarinů byly v obou případech nižší než při experimentech s PAR.

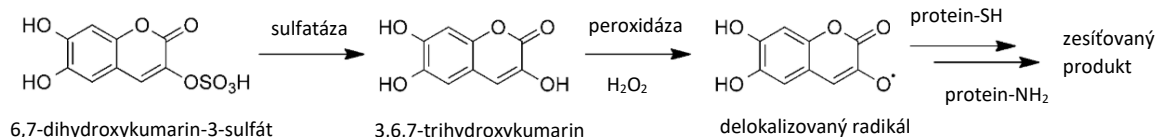
Jaký význam má exkrece pro samotný druh však zatím není dostatečně jasné. Podle Pérez-Rodríguez et al. (1998) by pozorována změna v absorpčním maximu mohla naznačovat strategii, jakou řasa rozšiřuje rozsah vlnových délek, které je schopná absorbovat. Žádné vysvětlení pro exkreci za vysokých a naopak nízkých hodnot PAR však zatím nebylo podáno. Z pohledu biotických interakcí by podle Menzel et al. (1983) vylučované kumariny mohly na povrchu stélky dosáhnout takových koncentrací, které by inhibovaly růst epifytických mikroorganismů a zabraňovaly vniku patogenů. Tuto domněnku částečně podporují zjištěné antibakteriální účinky THyC proti řadě terestrických a mořských bakterií (Menzel et al., 1983). Nicméně bylo zjištěno, že vylučované kumariny mohou být díky svým absorpčním vlastnostem prospěšné pro okolní makrořasy a mořské vyšší rostliny. Podle Pérez-Rodríguez et al. (2003) se při odlivu tyto látky mohou kumulovat ve vznikajících tůních a významně snižovat intenzitu UV záření, která se k vegetaci dostane. To potvrzují i výsledky pokusu této studie, ve které autoři vystavili zástupce z různých řasových linií (Phaeophyceae, Rhodophyta, Chlorophyta) a jeden druh mořské trávy přímému slunečnímu záření po dobu jedné hodiny a jež byly chráněné různými koncentracemi THyC. Se zvyšující se koncentrací THyC v roztoku vykazovaly řasy nižší míru fotoinhibice, což dokládají vyšší hodnoty $\Delta F/Fm$.

4.4. Funkce kumarinů v tvorbě ochranné zátky

Vzhledem k sifonální morfologii stélky je pro tyto zelené řasy životně důležité mít k dispozici mechanismus, kterým lze pohotově reagovat na mechanické poškození a zabránit

tak velkým ztrátám cytoplasmatického obsahu a invazi patogenů (Menzel, 1980, 1988; Ross, Küpper, et al., 2005; Ross, Vreeland, Herbert Waite, & Jacobs, 2005). Tímto mechanismem je tvorba přechodné zátky, pod jejíž ochranou dochází následně k obnově buněčné stěny. Zátky rovněž prostorově oddělují gametangia, sporangia a u některých druhů i postranní větve od zbytku stélky, kterou následně chrání po degeneraci těchto struktur (Menzel, 1980).

Proces tvorby zátky lze shrnout do dvou fází (Ross, Vreeland, et al., 2005). V první fázi se v místě poranění vytváří gelovitá struktura, která je pak ve druhé fázi dále zpevňována. Látky, které se podílejí na tomto procesu jsou mezi skupinami odlišné. U druhu *Dasycladus vermicularis* se prvotní gelovitá zátka vytváří během první minuty od poškození a je založena zejména na interakcích lektinů s jejich příslušnými cukry (hlavně glukózou a galaktózou), k nimž se postupně přidávají další interakce, např. sulfátové můstky sulfatovaných sacharidů (Ross, Vreeland, et al., 2005). Po 35–45 minutách nastává druhá fáze, ve které dochází k zesíťování proteinů pomocí oxidovaných molekul kumarinů. To vede k hnědnutí a dalšímu zpevňování původně gelovité zátky. Welling et al. (2011) předpokládají, že mechanické narušení integrity buňky má za následek uvolnění sulfatáz z jejich kompartmentů, jež posléze interagují s neaktivními (sulfatovanými) formami kumarinů (dasycladin A a B). Ty jsou tak přeměněny nejprve na monosulfatovaný kumarin (DHyCS) a posléze na aktivní THyC (Hartmann et al., 2018). Tyto molekuly pak slouží společně s peroxidem vodíku, produkovaném při oxidativním vzplanutí, jako substrát pro peroxidázu, jejíž aktivita byla v oblasti poškození také potvrzena (Menzel, 1980; Ross, Küpper, et al., 2005). Výsledkem jsou oxidované molekuly THyC, které pak mohou reagovat s thiolovými skupinami (–SH), příp. aminoskupinami (–NH₂) některých aminokyselin (cystein, lyzin), které jsou součástí peptidů a proteinů, a vytvářet tak trojrozměrnou síť dodávající zátce potřebnou pevnost (Welling, Pohnert, Küpper, & Ross, 2009; Welling et al., 2011). Proces druhé fáze je shrnut na Obr. 9. Analogický průběh tvorby zátky lze vysledovat i u ostatních sifonálních řas, ale na procesu se podílejí jiné látky než kumariny. Např. *Caulerpa taxifolia* z řádu Bryopsidales využívá acetylovaný seskviterpen caulerpenyn, který je při mechanickém poškození přeměněn v reaktivnější sloučeninu, jež pak odpovídá za propojování proteinů do rigidního biopolymeru (Adolph, Jung, Rattke, & Pohnert, 2005).



Obř. 9: Sulfatované kumariny (zde zastoupeny DHyCS) jsou v prvním kroku přeměněny pomocí sulfatázy na THyC. Ty jsou následně peroxidázou oxidovány za vzniku reaktivních produktů, které jsou schopné reagovat s některými funkčními skupinami aminokyselinových zbytků nacházejících se v proteinech. Výsledkem je síť proteinů vzájemně provázaných pomocí kumarinových molekul. Upraveno podle Welling et al. (2011).

4.5. Další možné funkce kumarinů

Pérez-Rodríguez et al. (2001) se také domnívají, že by kumariny mohly být součástí antioxidantního systému, kterým se řasa brání reaktivním formám kyslíku, jež mohou ve větší míře vznikat při vysokých dávkách slunečního záření a zvýšené teplotě. Jejich práce potvrzuje významné antioxidantní vlastnosti extrahovaných kumarinů *in vitro* a přirovnává je k antioxidantním vlastnostem kyseliny askorbové. Na druhou stranu jsou kumariny v buňkách řasy *Dasycladus* přítomně ve specifických vrstvách, a tak není jisté, zda se jejich antioxidantní potenciál může *in vivo* realizovat (Pérez-Rodríguez et al., 2003).

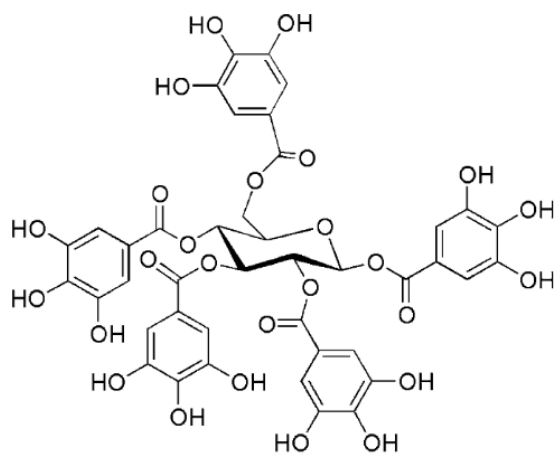
Vzhledem k vysokým intracelulárním koncentracím nelze vyloučit ani jejich možné deterrentní účinky na některé herbivory. Toto potvrzují i pozorování ze španělské Almerie, kde se řasa vyskytovala spolu s četnými populacemi mořských ježků (Pérez-Rodríguez et al., 2001).

5. Fenolické látky u spájevých řas

Zygnematophyceae neboli spájevité řasy jsou skupinou sladkovodních zelených řas patřící do skupiny Streptophyta. Jsou zároveň druhově nejbohatší skupinou streptofytních řas, zahrnující vláknité rody jako *Spirogyra* nebo *Zygnema* a jednobuněčné krásivky. Jejich životní cyklus se vyznačuje absencí pohyblivých stádií a speciálním typem pohlavního rozmnožování – konjugací, jejímž výsledkem je vznik rezistentní a dormantní zygospory (Stancheva, Sheath, & Hall, 2012). Jsou kosmopolitně rozšířené ve stojatých i tekoucích vodách, v rašeliništích, ale i v extrémních biotopech, které často vyžadují specifické adaptace, například na površích půd (Holzinger, Tschaikner, & Remias, 2010), v polárních hydro-terestrických biotopech (Holzinger, Roleda, & Lütz, 2009) nebo na povrchu ledovců (Remias, 2012).

5.1. Charakteristika fenolických látek u spájevých řas

Zejména v průběhu tohoto desetiletí se objevuje čím dál tím více studií potvrzující přítomnost fenolických látek u zygnetofytních řas. Některé z těchto sloučenin byly rovněž strukturně charakterizovány, jindy byla určena jen jejich fenolická povaha. Fenolické látky byly doposud zjištěny u rodu *Spirogyra* (Nishizawa et al., 1985), *Zygnema* (Pichrtová et al., 2013), *Zygnemopsis* (Figueroa et al., 2009) a druhů *Zygonium ericetorum* (Aigner, Remias, Karsten, & Holzinger, 2013), *Mesotaenium berggrenii* (Remias, Schwaiger, et al., 2012) a *Ancylonema nordenskiöldii* (Remias, Holzinger, Aigner, & Lütz, 2012). Často se opakujícím motivem je kyselina gallová, která může být součástí glukózového polymeru (Newsome et al., 2013), nebo může vytvářet tzv. gallotaniny (Obr.10), ve kterých jsou molekuly kyseliny vázány k centrální molekule glukózy (Nishizawa et al., 1985).



Obr. 10: Příklad chemické struktury gallotaninu izolovaného z řasy *Spirogyra*. Podle Niemetz & Gross, 2005.

Jejich funkce spočívá zejména v předcházení negativních účinků UV záření nebo detoxifikaci nadměrného množství iontů železa v prostředí (např. Herburger, Remias, & Holzinger, 2016; Pichrtová et al., 2013). Nelze vyloučit ani jejich roli v ochraně před reaktivními formami kyslíku, jejichž formace může předchozí zmíněné stresory doprovázet, nebo před potenciálními herbivory (Remias, Holzinger, et al., 2012; Remias, Schwaiger, et al., 2012). Syntéza fenolických látek je pro tyto řasy, obývající často živinami chudé biotopy, výhodná (Aigner et al., 2013). Vzhledem k tomu, že jejich struktura je složená převážně z atomů uhlíku, není jejich akumulace náročná na další zdroje, především dusík. Ten je naopak integrální součástí mykosporinu podobných aminokyselin, které mnohé jiné řasy využívají jako UV absorbující sloučeniny (Aigner et al., 2013; Herburger et al., 2016; Karsten, Friedl, Schumann, Hoyer, & Lembecke, 2005; Pichrtová et al., 2013; Remias, Holzinger, & Lütz, 2009).

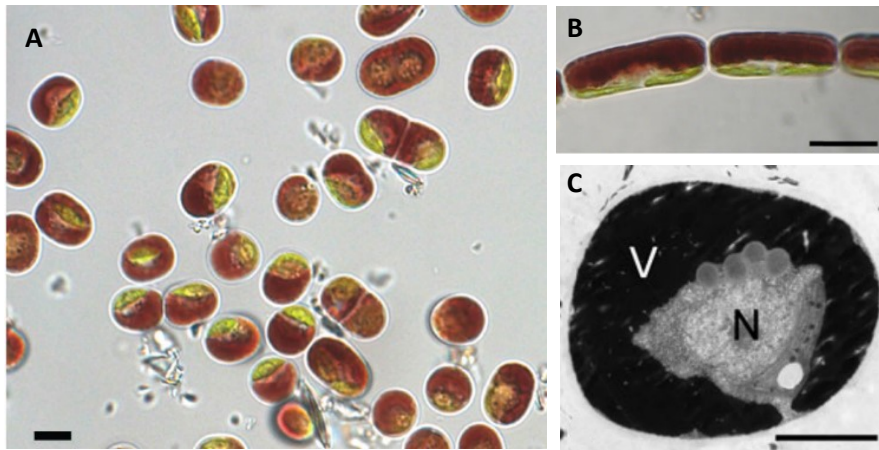
Následující podkapitoly se zabývají jednotlivými zástupci, u kterých byly fenolické látky identifikovány. Kromě chemického charakteru těchto látek je zdůrazněna jejich role v ekofyziologii daného druhu.

5.2. *Mesotaenium berggrenii* a *Ancylonema nordenskiöldii*

Řasy *Mesotaenium berggrenii* a *Ancylonema nordenskiöldii* jsou psychrofilní organismy, které porůstají holé ledovcové plochy v mnoha polárních i alpinských oblastech (Remias, 2012; Remias, Holzinger, Aigner, & Lütz, 2012; Remias, Holzinger, & Lütz, 2009). Příznačně se jim také říká ledovcové řasy, z angl. *ice algae*. *M. berggrenii* je jednobuněčná kokální řasa, která obsahuje 1–2 chloroplasty a několik vakuol naplněných tmavě hnědým hydrofilním pigmentem (Obr. 11A; Remias et al., 2009; Remias, Schwaiger, et al., 2012). *A. nordenskiöldii* je naopak vláknitá řasa, jejíž buňky obsahují dva parietální chloroplasty a prominentní hnědé vakuoly kryjící jádro, plastidy a další organely (Obr. 11B, 11C; Remias, Holzinger, et al., 2012). U obou řas bylo pozorováno, že pigmentace vakuol v laboratorních podmínkách (nízké hodnoty PAR) postupně slábne (Remias, Schwaiger, et al., 2012).

Ve svém přirozeném prostředí se ledovcové řasy potýkají s celou řadou abiotických stresových faktorů, na které se musely v průběhu evoluce adaptovat. Těmi hlavními jsou celoročně nízké teploty, nízká dostupnost vody a živin a krátká vegetační sezóna, která je omezena jen na několik týdnů během léta, kdy táním sněhové pokrývky začíná být voda pro řasy znovu dostupná (Remias, 2012; Remias et al., 2009; Remias, Schwaiger, et al., 2012). Ve větších nadmořských výškách mohou zvýšené hodnoty PAR a UV záření představovat další

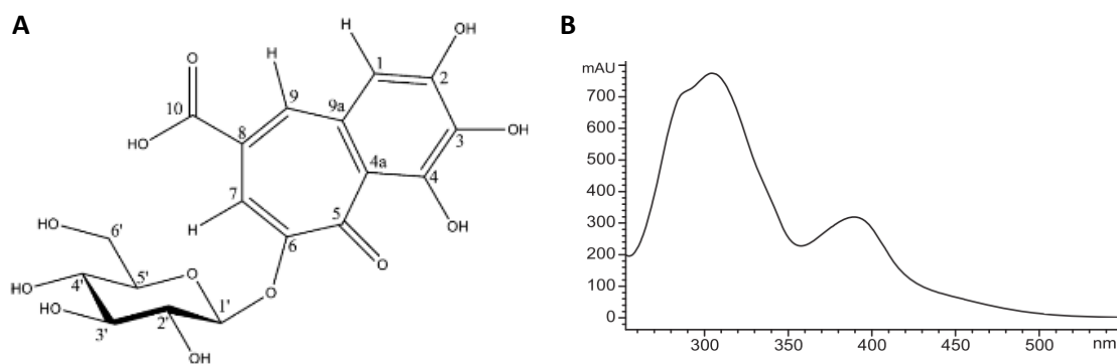
překážku pro život organismů. Např. Remias et al. (2009) naměřili na ledovci Tiefenbach v Rakouských Alpách (3000 m n. m.) v polovině července hodnoty PAR dosahující 2 000 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a maximální dávky UVA a UVB, které činily 61,54 W m^{-2} a 0,286 W m^{-2} . Experimenty měřící fotosyntetickou aktivitu však nezaznamenaly pokles v důsledku fotoinhibice ani při vysokých hodnot PAR (1 378 pro *M. berggrenii* a 1 900 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ pro *A. nordenskiöldii*; Remias, Schwaiger, et al., 2012).



Obr. 11: (A) Buňky *Mesotaenium berggrenii* var. *alaskana* s jedním chloroplastem a silnou pigmentací. Měřítko = 10 μm . Podle Remias et al. (2009). (B) Postranní pohled na vlákno řasy *Ancylonema nordenskiöldii* se dvěma chloroplasty chráněnými intenzivní pigmentací. Měřítko = 10 μm . (C) Příčný řez řasou *A. nordenskiöldii* na snímku z TEM. Vakuoly s UV absorbujícími sloučeninami dokonale obklopují jádro a chloroplast. Měřítko = 2 μm . Zkratky: V vakuola, N jádro. Podle Remias, Holzinger, et al. (2012).

Jednou z adaptací ledovcových řas na popsané podmínky prostředí je akumulace hnědého hydrofilního pigmentu ve vakuolách. Jeho podstatou je u *M. berggrenii* převážně monoglykosid kyseliny purpurogalinové (Obr. 12), v menší míře je pak zastoupen i její diglykosid. Tyto látky absorbují v celé šíři UV-A a UV-B oblasti a částečně i ve viditelné části spektra (Remias, Schwaiger, et al., 2012). Porovnáním absorpčních spekter extraktů fenolických látek z obou řas je pravděpodobné, že stejné látky jsou součástí vakuolárního pigmentu i u *A. nordenskiöldii* (Remias, Holzinger, et al., 2012). Vzhledem k jejich absorpčním charakteristikám a lokalizaci vakuol v buňkách obou druhů je zřejmé, že tyto látky chrání buněčné kompartmenty a fotosyntetický aparát před škodlivými účinky UV záření a přemírou fixované energie (Remias, Holzinger, et al., 2012; Remias, Schwaiger, et al., 2012). Na druhou stranu populace *M. berggrenii* a *A. nordenskiöldii* z polárních oblastí vykazují podobnou míru pigmentace, přestože hodnoty UV jsou podstatně nižší. Například Remias, Holzinger, et al. (2012) naměřili hodnoty PAR 2x, UV-A 2,6x a UV-B 4,5x nižší oproti hodnotám na ledovci

Tiefenbach (viz výše). Je tedy možné, že identifikované fenolické látky slouží i k dalším účelům. Remias, Schwaiger, et al. (2012) se domnívají, že by se mohlo jednat o chemickou obranu před potenciálními spásáči (chvostokoky), kteří se v polárních ledovcových oblastech běžně vyskytují (Remias, 2012; Remias, Schwaiger, et al., 2012). Nakonec jejich syntéza může představovat způsob, jakým se tyto organismy vypořádávají s přemírou fixované energie, kterou vzhledem k nízké dostupnosti živin nelze investovat do růstu nebo rozmnožování (Remias, Schwaiger, et al., 2012).

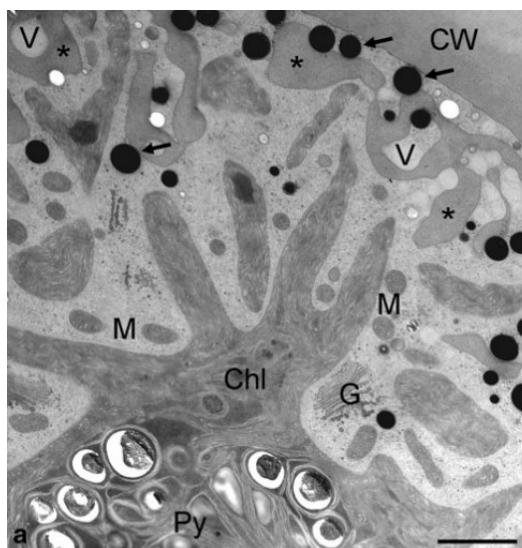


Obr. 12: Chemická struktura kyseliny pupurogalinové-6-O-β-D-glukopyranosidu (A) a její absorpční spektrum zasahující do celé oblasti UV a části VIS spektra (B). Podle Remias, Schwaiger, et al. (2012).

5.3. Zygnema

Akumulace fenolických látek byla rovněž prokázána u rodu *Zygnema*, jehož vegetativní buňky jsou charakteristické dvěma hvězdotvými chloroplasty (Pichrtová et al., 2013). Tato řasa se vyskytuje kosmopolitně, dokonce i v polárních oblastech, kde roste v mělkých tůních, potocích nebo polo-terestricky na povrchu mokřých půd, čímž je vystavena přímému světelnému záření (Holzinger et al., 2009). Pomocí techniky HPLC byla zjištěna přítomnost několika fenolických sloučenin u tří polárních kmenů a jednoho z temperátní oblasti, nicméně jejich konkrétní chemická struktura zatím zůstává nejasná (Holzinger et al., 2018; Pichrtová et al., 2013). Proměření absorpčních spekter hlavních sloučenin ukázalo, že tyto látky absorbují v UV-A a v UV-B oblasti, a u jedné byla zjištěna absorbance dokonce i v části VIS spektra (Pichrtová et al., 2013). Tito autoři se rovněž domnívají, že identifikované fenoly jsou skladovány na periferii buňky ve vakuolách a kulatých elektrondenzních těliscích o průměru 400–600 nm (Obr. 13), které vzhledem připomínají fysody přítomné u chaluh a které rovněž obsahují látky fenolického charakteru (Pichrtová et al., 2013).

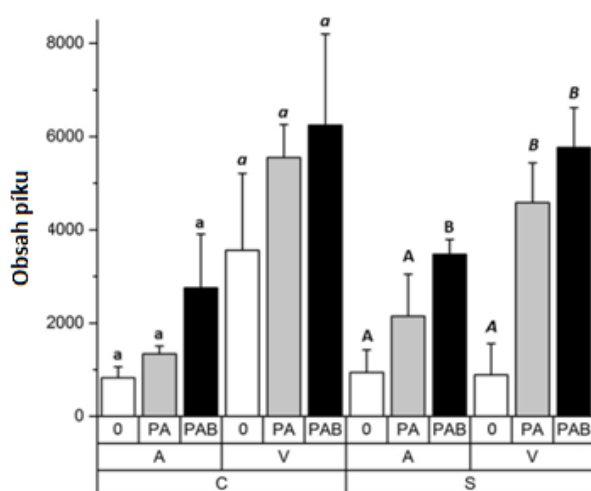
Autoři Pichrtová et al. (2013) ve svém experimentu vystavili 3 polární kmene (B, E, G) zvýšenému poměru UV ku PAR s převládajícím UV-A zářením po 7 dnů (průměrné hodnoty činily $38.1 \pm 3.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, $3.22 \pm 1.69 \text{ W m}^{-2}$ UV-A and $0.018 \pm 0.015 \text{ W m}^{-2}$ UV-B). Přestože stresová odpověď byla mezi jednotlivými kmeny do určité míry odlišná, ve všech případech byl pozorován pokles fluorescenčního parametru F_v/F_m a nárůst obsahu fenolických látek, který byl však signifikantní jen u kmene E. Ten i zároveň vykazoval celkově nejvyšší hodnoty F_v/F_m , což společně se známkami nepozměněné ultrastruktury a lokalizaci elektrondenzních tělísek na periferii poukazuje na roli fenolických látek jako efektivních UV protektantů. Navíc by mohly chránit buněčné komponenty i před nadměrným fotosynteticky aktivním zářením, které může rovněž stát za fotoinhibicí a produkcí ROS. *Zygnema* však k tomuto účelu zřejmě využívá i dalších mechanismů jako např. produkci extracelulárního slizu. Tento jev byl patrný u kmene B, který zároveň obsahoval celkově nejnižší hodnoty fenolických látek na jednotku hmotnosti, ale hodnoty F_v/F_m naznačovali jen nízkou míru fotoinhibice. Na druhou stranu relativně vysokých obsah fenolických látek byl v tomto pokusu naměřen už u kontrolních vzorků kmene G, který, jak vyplývá z relativně nízkých hodnot F_v/F_m , byl značně stresován. Je tedy pravděpodobné, že k akumulaci fenolických látek může docházet i za jiných podmínek, např. v důsledku nízkých hodnot PAR, při kterých byla pozorován zvýšený obsah kumarinů u sifonální řasy *Dasycladus vermicularis* (Pérez-Rodríguez et al., 2001). Aplikace UV měla pak za následek změny v ultrastruktuře mitochondrií a rozpad chloroplastů. Dalším adaptačním mechanismem, jakým se *Zygnema* může bránit UV je tvorba nárostů, kde horní vlákna poskytují ochranu vláknům ležícím v nižších vrstvách (Holzinger et al., 2009).



Obř. 13: Ultrastruktura řasy *Zygnema* kmene B na snímku z TEM. Fenolické látky jsou pravděpodobně skladovány ve vakuolách (V) a elektrondenzních tělískách (šipky). Zkratky: Chl chloroplast, CW buněčná stěna, G Golgiho komplex, M mitochondrie, Py pyrenoid. Měřítko = 2 μm . Podle Pichrtová et al. (2013).

Rod *Zygnema* je rovněž schopný tvořit tzv. pre-akinetu. Jedná se o modifikované vegetativní buňky, které se vyznačují se ztloustlou buněčnou stěnou, vysokým počtem lipidických tělísek v cytoplazmě a schopností se aklimovat na desikační podmínky, kterým

Zygnema v polárních oblastech musí čelit (Pichrtová, Hájek, & Elster, 2014). Na druhou stranu studie Holzinger et al. (2018) prokázala vyšší UV toleranci vegetativních buněk v porovnání s pre-akinetami. Autoři zde mladé vegetativní buňky a pre-akinetu tří kmenů (z Antarktidy, Arktidy a temperátu) po dobu 3 dnů hodnotám PAR (400 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$) v kombinaci s UV-A (5,7 W m^{-2} ; PA), nebo PAR současně s UV-A a UV-B (10,1 a 1,0 W m^{-2} ; PAB). Výsledky potvrdily pozorování předešlé studie, tedy že UV záření iniciuje syntézu fenolických látek, a to v případě vegetativních buněk i pre-akinet (Obr. 14). Avšak díky aktivnímu metabolismu byl obsah fenolů u vegetativních buněk signifikantně vyšší. Tyto mladé buňky byly tak lépe chráněny před škodlivými účinky UV záření, což také potvrzuje skutečnost, že u vegetativních buněk došlo k výraznější obnově počátečních hodnot F_v/F_M po jejich prvotním poklesu. Rozdíl v obsahu fenolických látek mezi PA a PAB nebyl signifikantní, nicméně ve většině případů byly průměrně hodnoty vyšší v případě PAB ošetření, což potvrzuje i pozorovaný vyšší počet elektronodenních tělísek v buňce, které podle Pichrtová et al. (2013) mohou obsahovat zmíněné UV absorbující sloučeniny. Avšak díky aktivnímu metabolismu byl obsah fenolů u vegetativních buněk signifikantně vyšší. Tyto mladé buňky byly tak lépe chráněny před škodlivými účinky UV záření, což také potvrzuje skutečnost, že u vegetativních buněk došlo k výraznější obnově počátečních hodnot F_v/F_M po jejich prvotním poklesu. Rozdíl v obsahu fenolických látek mezi PA a PAB nebyl signifikantní, nicméně ve většině případů byly průměrně hodnoty vyšší v případě PAB ošetření, což potvrzuje i pozorovaný vyšší počet elektronodenních tělísek v buňce, které podle Pichrtová et al. (2013) mohou obsahovat zmíněné UV absorbující sloučeniny.



Obr. 14: Celkový obsah fenolických látek, vyjádřený jako integrovaný obsah píku z příslušného chromatogramu, u *Zygnema* sp. C (C) a *Zygnema* sp. S (S). Zkratka A reprezentuje pre-akinetu, V vegetativní mladá vlákna. Obsah fenolických látek byl u vegetativních buněk i pre-akinet vždy vyšší po aplikaci UV záření oproti kontrolním vzorkům. Celkový obsah fenolů byl však vyšší u vegetativních vláken. Upraveno podle Holzinger et al. (2018).

5.4. Zygnemopsis

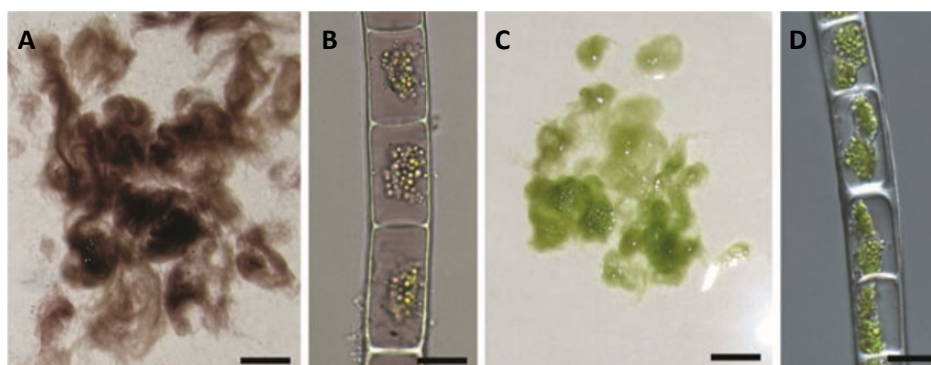
Rod *Zygnemopsis* je morfologicky velmi podobný rodu *Zygnema*, přesto si nejsou blíže příbuzné (Pichrtová, Kulichová, & Holzinger, 2014). Existuje pouze jediná studie zabývající se fenolickými látkami u tohoto rodu (Figuroa et al., 2009). Autoři zde sledovali míru adaptace druhu *Zygnemopsis decussata* z vysokohorského jezera La Caldera (3 050 m n. m.) v jižním Španělsku na vysoké hodnoty ozáření. Ty jsou navíc při průchodu světla vodou jen mírně zeslabovány, protože lokální koncentrace rozpuštěných organických částic je velmi nízká, a tudíž je *Zygnemopsis* předmětem vysokých dávek záření. Například v této studii byly kolem poledních hodin v průběhu července naměřeny hodnoty $1670 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, $47,56 \text{ W m}^{-2}$ UV-A a $1,88 \text{ W m}^{-2}$ UV-B. Nejvyšší obsah fenolických látek byl naměřen u stélek z 0,5 m hloubky (zhruba 9 mg g^{-1} DW), které navíc vykazovaly nejvyšší fotosyntetickou aktivitu (vysoké hodnoty maximálního ETR a počátečního sklonu indukční křivky) a nízkou míru fotoinhibice během dne (vysoké hodnoty F_v/F_m), což poukazuje na fenoly jako na účinnou ochranu fotosyntetického aparátu před UV zářením. Podobné výsledky navíc získali i Pichrtová et al. (2013) u rodu *Zygnema* kmene E, který dosahoval nejvyšších hodnot F_v/F_m a zároveň obsahoval největší množství fenolů. Maximální hodnoty ETR byly u stélek z 0,1 m a 1 m hloubky mnohem nižší (cca 5x), stejně jako jejich obsah fenolických látek ($<2 \text{ mg g}^{-1}$ DW). První případ je možné vysvětlit pomocí fotoinhibice, kdy záření v 0,1 m hloubky je průchodem vodním prostředím jen mírně zeslabeno a působí negativně na fotosyntetický aparát, zatímco na poklesu fotosyntetické aktivity v druhém případě se podílejí odlišné aspekty, které autoři dostatečně nevysvětlují. Rovněž není jasné, proč stélky v 0,1 m rovněž neakumulují UV absorbující sloučeniny, když jsou pod mnohem větším stresem z nadměrného ozáření v porovnání se stélkami z 0,5 m. Koncentrace fenolických látek byla navíc stanovována pomocí spektrofotometrické metody (Folin-Ciocalteu), která je oproti metodě HPLC méně spolehlivá, takže výsledné koncentrace nemusí být přesné (Pichrtová et al., 2013).

5.5. Zygogonium ericetorum

Zygogonium ericetorum je extremofilní organismus, který má k dispozici řadu mechanismů, které mu umožňují obývat biotopy jako jsou půdní krusty (Holzinger et al., 2010; Hoppert et al., 2004), kyselé tůňky s vysokým obsahem kovových iontů (Herburger et al., 2016) nebo vysokohorské vysychavé potoky (Aigner et al., 2013). V těchto podmínkách je nutné chránit se zejména před vysokou intenzitou VIS a UV záření, pravidelnou desikací nebo rizikem

toxicity, které kovové kationty (Fe^{3+} , Al^{3+} , Zn^{2+}) v nadměrném množství představují (Aigner et al., 2013; Herburger et al., 2016; Holzinger et al., 2010).

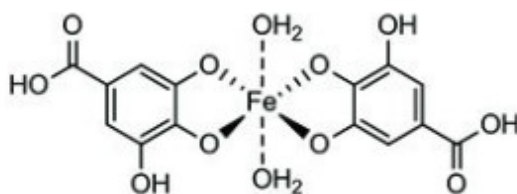
Bylo pozorováno, že tato řasa vytváří v různých podmínkách dva fyziologicky odlišné typy vláken (nazývané také morfotypy): 1) tmavě purpurová až hnědá vlákna, která se vyskytují především v kyslejších prostředí a která jsou vystavená přímému slunečnímu záření (Obr. 15A, 15B) a 2) zelená vlákna (Obr. 15C, 15D), jež se nachází uložená pod vrstvou purpurových vláken nebo rostou společně s dalšími spájitými řasami (*Zygnema*, *Spirogyra*) v prostředí s neutrálním pH (Aigner et al., 2013; Herburger et al., 2016). V oblasti horského potoka, kde byly příkladné nárosty purpurových a zelených vláken pozorovány, naměřili Aigner et al. (2013) vysoké hodnoty PAR a UV záření ($2\ 100\ \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ PAR, $59,6\ \text{W m}^{-2}$ UV-A a $0,38\ \text{W m}^{-2}$ UV-B). Vzhledem k těmto popsaným skutečnostem tito autoři předpokládali efektivní fotoprotekci zejména u purpurových vláken. Jejich hypotézu potvrdilo měření fotosyntetické aktivity (PI křivka vyjádřená jako rETR vs. PAR). Oproti zelenému morfotypu byla u purpurových vláken hodnota rETR_{max} 3x vyšší, podobně jako saturační bod fotosyntézy, indikující vyšší světelné nároky. Fotoinhibice nebyla pozorována ani při nejvyšších aplikovaných hodnotách PAR ($406\ \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$), zatímco pokles fotosyntetické aktivity byl u zeleného morfotypu pozorován už při $100\ \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Světelnou adaptaci purpurového morfotypu rovněž svým měřením potvrdili i Herburger et al. (2016).



Obr. 15: Purpurový morfotyp – makroskopický vzhled (A) a snímek z mikroskopu (B). Zelený morfotyp – makroskopický vzhled (C) a snímek z mikroskopu (D). Měřítka: X, Y = 1 cm; X, Y = 20 μm . Podle Aigner et al. (2013).

Za fotoprotekci stojí zejména fenolické látky, které jsou po kvalitativní i kvantitativní stránce více zastoupeny v purpurovém morfotypu. Pozitivní výsledek metody Folin-Ciocalteu ukázal, že část z těchto fenolů představují hydrolyzovatelné taniny, konkrétně gallotaniny (Aigner et al., 2013). Molekuly kyseliny gallové jsou rovněž součástí bohatě větveného glukózového polymeru, v rámci kterého jsou schopné vázat Fe^{3+} ionty do komplexů (Obr. 16).

Vzniklý gallátový komplex je schopný absorbovat v UV-AB oblasti a také ve VIS části spektra a je rovněž příčinou purpurového zbarvení pigmentu (Newsome et al., 2013). Také další izolované sloučeniny byly schopné UV absorpce (Aigner et al., 2013). Všechny tyto látky jsou lokalizované v různé velikých vakuolách, které na snímcích z TEM od autorů Aigner et al. (2013) dokonale obklopují centrální cytoplasmatickou část s jádrem, chloroplasty a dalšími organelami. Vzhledem k tomuto uspořádání je tak procházející světelné záření (VIS i UV) do jisté míry zeslabeno a poškození buněčných struktur minimalizováno (Aigner et al., 2013). Kromě vakuol by mohly fenoly obsahovat i elektrondenzní tělíska o průměru kolem 1 μm , které byly nalézány v blízkosti chloroplastů (Aigner et al., 2013; Holzinger et al., 2010). Tyto struktury byly rovněž pozorovány u rodu *Zygnema* a vzhledem připomínají florotaniny obsahující fysody u hnědých řas (Pichrtová et al., 2013). Schopnost zelených vláken tolerovat vysokou míru VIS a UV záření je naproti tomu relativně nízká. Jejich adaptací se zdá být růst v nižších vrstvách nárostů pod purpurovým vlákny, kde je záření UV absorbujícími látkami zeslabeno (Aigner et al., 2013). Tuto domněnku podporují pozorování z polárních oblastí, kde *Zygnema* tvoří podobné několika vrstevnaté nárosty (Holzinger et al., 2009).



Obr. 16: Komplex dvou molekul kyseliny gallové a železitého iontu jako součást glukózového polymeru. Podle Newsome et al. (2013).

Vazba Fe^{3+} iontů do gallátových komplexů a jejich uskladnění ve vakuolách rovněž představuje detoxifikační mechanismus, kterým *Zygonium* snižuje riziko buněčného poškození v důsledku nadměrné koncentrace těchto iontů cytoplazmě (Herburger et al., 2016). Železo je biogenní prvek, který je ve stopovém množství důležitý pro funkci mnoha enzymů. Na druhou stranu jeho vysoká koncentrace v buňkách způsobuje oxidativní stres formací reaktivních forem kyslíku, například v procesu Fentonovy reakce (Winterbourn, 1995). Protože se tato řasa běžně nalézá v acidických prostředích, představují kovové ionty včetně železa potenciální nebezpečí (Herburger et al., 2016). Kromě zmíněné chelatace využívá *Zygonium* ještě tvorbu aplanospor, které při svém vzniku v rodičovských buňkách vytlačují purpurový pigment s Fe^{3+} ionty mimo svůj obsah a následně klíčí jako zelená vegetativní vlákna (Herburger et al., 2016; Stancheva et al., 2014). Fenolické látky mohou rovněž plnit roli

antioxidativních látek, které zháší ROS vzniklé at' už při nadměrném ozáření nebo v důsledku působení kovových iontů (Herburger et al., 2016).

5.6. *Spirogyra*

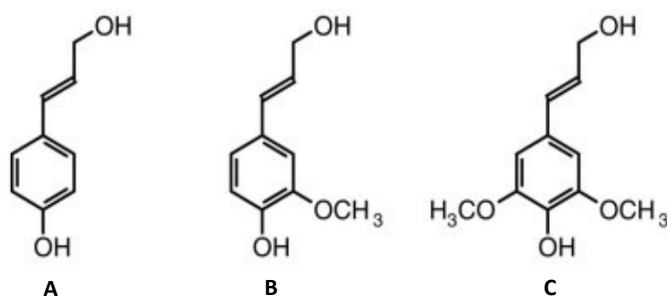
U řasy *Spirogyra* byly jako vůbec u první zelené řasy identifikovány fenolické látky (Nishizawa et al., 1985). Tito autoři současně objasnili, že se jedná o směs gallotaninů, kde jsou molekuly kyseliny gallové, příp. digallové, esterově vázané v různém počtu k centrální molekule glukózy. Některé z těchto látek vykazují např. antibakteriální vlastnosti (Cannell, Farmer, & Walker, 1988), nicméně ekofyziologická stránka fenolických látek u této řasy zůstává zcela nepopsaná. Je však zajímavé, že v přítomnosti železa *Spirogyra* rovněž produkovala purpurový pigment jako v případě *Zygonium ericetorum* (Allen & Alston, 1959). Zřejmě za to může tvorba podobného komplexu pomocí gallových kyselin, ale *Spirogyra* se zdá být mnohem více senzitivní na zvýšenou koncentraci tohoto kovu, jak vyplývá z pozorování těchto autorů.

6. Lignin a flavonoidy u řas

Tato kapitola se věnuje fenolickým sloučeninám, které byly po dlouhou dobu spojovány pouze s vyššími rostlinami – ligninu a flavonoidům. Obě tyto skupiny zcela jistě sehrály důležitou roli v evoluci vyšších rostlin v terestrickém prostředí, které klade zcela odlišné nároky na život (de Vries & Archibald, 2018). Přitom se zdá, že schopnost syntézy ligninu a flavonoidů není výsadní vlastností embryofyt, ale pravděpodobně jde, alespoň v případě flavonoidů, o vlastnost velmi konzervovanou (Goiris et al., 2014). V poslední době se objevuje čím dál tím více studií, jejichž cílem je objasnit počátky biosyntetické dráhy zmíněných látek. Využívají k tomu celou řadu různých metod – od vysoce citlivých chromatografických metod, po cytochemické a genetické analýzy, jejichž snahou je identifikace homologických genů fenylypropanoidové a flavonoidové dráhy mezi řasami a rostlinami. V těchto dvou následujících podkapitolách je pozornost věnována především těm studiím, které přímo potvrzují přítomnost ligninu a flavonoidů v řasách.

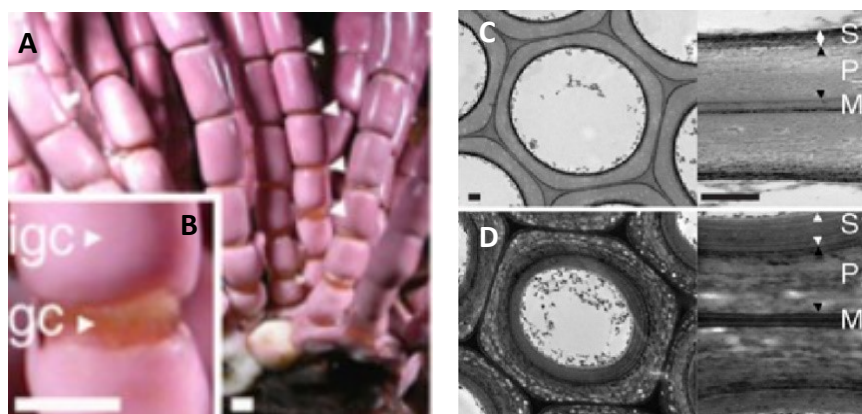
6.1. Lignin

Lignin je velmi pevná a odolná látka, která se ukládá především v sekundárních buněčných stěnách sklerenchymu a xylémových buňkách vodivých pletiv. Jeho přítomnost umožňuje rostlinám vzpřímený růst, ale také kontinuální průtok transpiračního proudu z kořenů do vrcholových částí rostlin i pod vysokým tlakem. Z chemického hlediska je lignin velmi složitý trojrozměrný polymer skládající se ze tří základních monolignolů (Obr. 17). Ty náleží mezi fenylypropanoidy, skupinu fenolických látek s počtem uhlíku C₆-C₃, které jsou syntetizovány fenylypropanoidovou drahou v cytoplazmě. Po jejich transportu do buněčné stěny jsou monolignoly oxidovány pomocí peroxidáz a následně podstupují radikálovou polymeraci, která vede k jejich vzájemnému propojování a rovněž propojování s dalšími složkami polysacharidové buněčné stěny (Hatfield & Vermerris, 2001; Labeeuw et al., 2015).



Obr. 17: Tři základní monolignoly podílející se na stavbě ligninu: (A) *p*-kumarylalkohol, (B) koniferylalkohol, (C) sinapylalkohol. Podle Hatfield & Vermerris (2001).

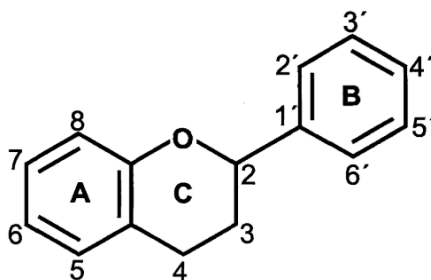
Mezi řasovými liniemi byl lignin spolehlivě identifikován u dvou vzdáleně příbuzných zástupců ze skupiny Coleochaetophyceae (Streptophyta) a Florideophyceae (Rhodophyta). V případě sladkovodní zelené řasy *Coleochaete* byl lignin identifikován u všech tří zkoumaných druhů. Přestože jeho množství bylo minimální ($25 \mu\text{g g}^{-1}$ buněčné stěny oproti 25mg g^{-1} u *Arabidopsis thaliana*), použité metody jasně prokazují, že monolignoly v buněčných stěnách podstupují radikálovou polymeraci typickou pro lignifikaci (Sørensen et al., 2011). Druhým případem je mořská koralinní ruducha *Calliarthron cheilosporiodes*, která, na rozdíl od *Coleochaete*, obsahuje všechny tři základní monolignoly a ty stejně tak i zde podstupují lignifikaci. Výsledný lignin je zde lokalizován především v buněčných stěnách buněk, které se nachází na periférii nekalcifikovaných genikulů (Obr. 18). Tyto buňky neobvykle pro řasové organismy ukládají po ukončení svého růstu sekundární buněčnou stěnu, která obsahuje zhruba 1 miligram ligninu na gram buněčné stěny. Podle autorů se lignifikace u této řasy vyvinula jako reakce na mechanický stres vyvolaný aktivitou vln v intertidálu. Ten je nejvýraznější v periferních částech genikulu, na což *Calliarthron* odpovídá ukládáním silnější vrstvy sekundární buněčné stěny (Martone et al., 2009). Otázka, zda schopnost syntézy ligninu představuje starobylý znak, který byl přítomen alespoň u společného předka červené a zelené linie, či jde o znak vzniklý konvergencí, zatím zůstává nezodpovězena.



Obr. 18: Morfologie a ultrastruktura řasy *Calliarthron cheilosporiodes*. (A) Habitus stélky, šipky označují pohyblivá spojení zvaná genikuly. Měřítko = 1 mm. (B) Detail stélky. Měřítko = 1 mm. (C) Příčný řez mladými buňkami genikulu se slabou vrstvou sekundární buněčné stěny na snímku z TEM. Vpravo detail jednotlivých vrstev buněčné stěny. Měřítko = 0,5 μm . (D) Příčný řez staršími buňkami genikulu se silnou vrstvou sekundární buněčné stěny na snímku z TEM, vpravo detail vrstev. Měřítko = 0,5 μm . Zkratky: *igc* intergenikulum, *gc* genikulum, *M* střední lamela, *P* primární buněčná stěna, *S1* vrstva sekundární buněčné stěny. Upraveno podle Martone et al. (2009).

6.2. Flavonoidy

Flavonoidy představují u vyšších rostlin velmi heterogenní skupinu sekundárních metabolitů. Jejich výchozí strukturou jsou dvě aromatická jádra propojená tří uhlíkatým řetězcem, který vytváří kyslíkatý heterocyklus (Obr. 19). Na jejich syntéze se přitom podílí jak dráha šikimátová, respektive fenylpropanoidová (kruh B, C), tak dráha acetát-malonátová (kruh A). Člení se do mnoha skupin a podskupin, které se vyznačují různými vlastnostmi a slouží k různým funkcím. Některé chrání rostliny před UV zářením, další vykazují antimikrobiální aktivitu, jiné způsobují modré až červené zbarvení květů a plodů (Bravo, 1998; Harborne & Williams, 2000).



Obr. 19: Základní struktura flavonoidů a systém jejího číslování. Kruhy B a C vychází z šikimátové dráhy, kruh A z acetát-malonátové. Podle Bravo (1998).

Má se za to, že schopnost syntézy flavonoidů jako účinných UV protektantů se vyvinula v souvislosti s přechodem rostlin na souš. Nové studie však ukazují, že řada skupin flavonoidů je přítomná i u řas z různých vývojových linií (Rhodophyta, Chlorophyta, Haptophyta, Ochrophyta) a také u sinic (Goiris et al., 2014; Klejdus, Lojková, Plaza, Šnóblová, & Štěrbová, 2010). Oproti vyšším rostlinám jsou jejich koncentrace velmi nízké (ng g^{-1} DW) a k jejich detekci je potřeba velmi citlivé techniky. Studie, které využívají k tomuto účelu HPLC-UV podle Goiris et al. (2014) podávají nepřesné výsledky, ve kterých koncentrace flavonoidů v řasách převyšují ty u vyšších rostlin (Kováčik, Klejdus, & Bačkor, 2010; Schmidt et al., 2012).

Nejdůležitější prací zabývající se přítomností flavonoidů u sinic a řas je zmíněná studie od autorů Goiris et al. (2014), kteří na základě klíčových intermediátů a konečných produktů sestavili pro každého zkoumaného zástupce biosyntetickou dráhu vedoucí k různým třídám flavonoidů. Podobné komplexity jako u vyšších rostlin dosáhla dráha u *Diacronema lutheri* (Pavlovophyceae, Haptophyta) a *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Chlorophyta), jehož flavonoidy byly z velké části glykosylovány, což je velmi podobné situaci u vyšších rostlin (Bravo, 1998; Goiris et al., 2014). Dokonce i u sinic *Arthrospira* (Goiris et al., 2014)

a *Nostoc* (Klejdus et al., 2010) je základ flavonoidové syntetické dráhy přítomen. Z toho vyplývá, že schopnost syntézy flavonoidů byla již v základu přítomna u předků převážně většiny dnešních plastidů (sinic) a v průběhu evoluce docházelo k jejímu zdokonalování (Goiris et al., 2014). Původní funkcí flavonoidů pravděpodobně není ochrana před UV zářením, poněvadž u řas a sinic jsou přítomné v takových koncentracích, které by efektivní ochranu nezajišťovaly. Spíše se nabízí ta možnost, že slouží jako signální a regulační molekuly (Goiris et al., 2014; Stafford, 1991). Teprve až když došlo ke zdokonalení enzymů a vzniku možnosti skladování ve vakuolách, mohly tyto sloučeniny získat funkci ochranných látek proti UV záření, patogenům a herbivorům (Harborne & Williams, 2000; Stafford, 1991).

7. Závěr

Fenolické látky představují široké spektrum metabolitů, které jsou produkovány především vyššími rostlinami (Embryophyta). Velký význam mají ale i pro mnohé zástupce řas, sdružené do tří vzájemně nepříbuzných skupin. Jedná se o hnědé řasy (Phaeophyceae), sifonální řasy z čeledi Dasycladaceae a spájkivé řasy (Zygnematophyceae). Jejich fenolické látky jsou do značné míry také odlišné. Hnědé řasy syntetizují vysokomolekulární florotaniny, které jsou obsažené v těliscích zvaných fycody. Sifonální řasy obsahují sulfatované kumariny v buněčné stěně a kolem membrány vakuol a spájkivé řasy akumulují své fenolické látky založené na kyselině gallové ve vakuolách a pravděpodobně i dalších těliscích.

Jednotícím znakem těchto tří skupin látek je jejich schopnost do značné míry pohlcovat ultrafialové záření. Díky tomu mohou zmíněné organismy přežívat v prostředí s vysokou mírou ozáření jako jsou intertidální zóny, vysokohorské oblasti, půdní krusty nebo povrchy ledovců. Absorpční spektrum některých fenolů rovněž zasahuje do viditelné části spektra, čímž tyto látky chrání fotosystémy před přemírou fixované energie. Na druhou stranu mohou fenoly sloužit i k velmi specifickým funkcím, které jsou spojené s vývojem organismu. Florotaniny u hnědých řas jsou integrální součástí buněčných stěn a jsou nezbytné pro správný průběh cytokineze. Jsou důležité i pro rané vývojové fáze embrya, především pro jeho polarizaci, adhezi k substrátu a k vývoji rhizoidů. Kumariny u sifonálních řas se účastní velmi rychlého reparačního procesu, kterým je tvorba zátky. Ta je životně důležitá pro řasy se sifonální morfologií, protože významně snižuje důsledky mechanického narušení. Nejméně prozkoumanou skupinou jsou fenolické látky u spájkivých řas. Kromě zmíněné schopnosti absorbovat UV, případně VIS záření, využívá řasa *Zygonium ericetorum* molekuly kyseliny gallové k detoxifikaci nadměrného množství železa v místech svého výskytu.

Přítomnost ligninu u červené řasy *Calliarthron* společně s nálezem flavonoidů u několika fylogeneticky nepříbuzných skupin řas a sinic vyvolává řadu otázek ohledně starobylosti jejich syntézy. Přitom tyto látky byly do nedávné doby spojované pouze s vyššími rostlinami.

Z těchto závěrů plyne obrovský význam fenolických látek pro zmíněné skupiny řas, které jim umožňují osidlovat řadu extrémních biotopů. Jsou důležité nejen pro jejich interakci s prostředím, ale u hnědých a sifonálních řas ze skupiny Dasycladaceae plní životně důležité funkce spojené s vývojem organismu.

8. Bibliografické citace

- Adolph, S., Jung, V., Rattke, J., & Pohnert, G. (2005). Wound closure in the invasive green alga *Caulerpa taxifolia* by enzymatic activation of a protein cross-linker. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 2806–2808. <https://doi.org/10.1002/anie.200462276>
- 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. *Journal of Phycology*, 49, 648–660. <https://doi.org/10.1111/jpy.12075>
- Allen, A., & Alston, R. E. (1959). Formation of purple pigment in *Spirogyra pratensis* cultures. *Nature*, 183, 1064–1065. <https://doi.org/10.1038/1831064b0>
- Anderson, R. J., & Velimirov, B. (1982). An experimental investigation of the palatability of kelp bed algae to the sea urchin *Parechinus angulosus* LESKE. *Marine Ecology*, 3(4), 357–373. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1982.tb00284.x>
- Berglin, M., Delage, L., Potin, P., Vilter, H., & Elwing, H. (2004). Enzymatic cross-linking of a phenolic polymer extracted from the marine alga *Fucus serratus*. *Biomacromolecules*, 5, 2376–2383. <https://doi.org/10.1021/bm0496864>
- Bitton, R., Ben-Yehuda, M., Davidovich, M., Balazs, Y., Potin, P., Delage, L., ... Bianco-Peled, H. (2006). Structure of algal-born phenolic polymeric adhesives. *Macromolecular Bioscience*, 6, 737–746. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600073>
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Brawley, S. H. (1987). A sodium-dependent, fast block to polyspermy occurs in eggs of fucoid algae. *Developmental Biology*, 124, 390–397. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90491-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90491-X)
- Bruneton, J. (2012). Principles of herbal pharmacology. In J. Bone & S. Mills (Eds.), *Principles and practice of phytotherapy: Modern herbal medicine* (2nd ed., 45–82). doi: 10.1016/B978-0-443-06992-5.00002-5
- Cannell, R. J. P., Farmer, P., & Walker, J. M. (1988). Purification and characterization of pentagalloylglucose, and alpha-glucosidase inhibitor/antibiotic from the freshwater green alga *Spirogyra varians*. *Biochemical Journal*, 255, 937–941. <https://doi.org/10.1042/bj2550937>
- Cockell, C. S., & Knowland, J. (1999). Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews*, 74, 311–345. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00189.x>
- de Vries, J., & Archibald, J. M. (2018). Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytologist*, 217, 1428–1434. <https://doi.org/10.1111/nph.14975>
- de Vries, J., de Vries, S., Slamovits, C. H., Rose, L. E., & Archibald, J. M. (2017). How embryophytic is the biosynthesis of phenylpropanoids and their derivatives in streptophyte algae? *Plant and Cell Physiology*, 58(5), 934–945. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx037>

- Fernando, I. P. S., Kim, M., Son, K.-T., Jeong, Y., & Jeon, Y.-J. (2016). Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach. *Journal of Medicinal Food*, *19*(7), 1–14. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3706>
- Figueroa, 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). *Journal of Limnology*, *68*(2), 206–216. <https://doi.org/10.3274/JL09-68-2-05>
- 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*. *Journal of Chemical Ecology*, *7*(6), 1115–1133. <https://doi.org/10.1007/BF00987632>
- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., E Baart, G. J., & De Cooman, L. (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of Phycology*, *50*, 483–492. <https://doi.org/10.1111/jpy.12180>
- Gómez, I., Pérez-Rodríguez, E., Viñebla, 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. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *47*, 46–57. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00199-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00199-7)
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. 2019. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 29 March 2019.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, *55*, 481–504. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.1.96>
- 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. <https://doi.org/10.3390/molecules23112735>
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, *68*, 2831–2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Hatfield, R., & Vermerris, W. (2001). Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology*, *126*, 1351–1357. <https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1351>
- Herburger, K., Remias, D., & Holzinger, A. (2016). The green alga *Zygogonium ericetorum* (Zygnematophyceae, Charophyta) shows high iron and aluminium tolerance: protection mechanisms and photosynthetic performance. *FEMS Microbiology Ecology*, *92*, 1–15. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw103>
- 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.

<https://doi.org/10.1007/s00709-018-1225-1>

- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.06.008>
- Holzinger, A., Tschalkner, A., & Remias, D. (2010). Cytoarchitecture of the desiccation-tolerant green alga *Zygonium ericetorum*. *Protoplasma*, *243*, 15–24. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0048-5>
- Hopkins, W. G. & Hüner, N. P. A. (2004). *Introduction to plant physiology* (3rd ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- 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. *Geomicrobiology Journal*, *21*, 183–191. <https://doi.org/10.1080/01490450490275433>
- Huang, S.-F., & Lu, C.-K. (2006). *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser (Chlorophyta, Dasycladales, Dasycladaceae), a new record for Taiwan. *Taiwania*, *51*(4), 279–282.
- Imbs, T. I., & Zvyagintseva, T. N. (2018). Phlorotannins are polyphenolic metabolites of brown algae. *Russian Journal of Marine Biology*, *44*(4), 263–273.
<https://doi.org/10.1134/s106307401804003x>
- Karsten, U., Friedl, T., Schumann, R., Hoyer, K., & Lembcke, S. (2005). Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae: *Prasiola* and its relatives from the Trebouxiophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, *41*, 557–566. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00081.x>
- Klejdus, B., Lojková, L., Plaza, M., Šnóblová, M., & Štěrbová, D. (2010). Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1217*, 7956–7965. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.020>
- Kováčik, J., Klejdus, B., & Bačkor, M. (2010). Physiological responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C light. *Photochemistry and Photobiology*, *86*, 612–616.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00708.x>
- Kurth, C., Welling, M., & Pohnert, G. (2015). Sulfated phenolic acids from Dasycladales siphonous green algae. *Phytochemistry*, *117*, 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.010>
- La Barre, S., Potin, P., Leblanc, C., & Delage, L. (2010). The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine Drugs*, *8*, 988–1010. <https://doi.org/10.3390/md8040988>
- Labeeuw, L., Martone, P. T., Boucher, Y., & Case, R. J. (2015). Ancient origin of the biosynthesis of lignin precursors. *Biology Direct*, *10*, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0052-y>
- Larson, B. R., Vadas, R. L., & Keser, M. (1980). Feeding and nutritional ecology of the sea urchin *Strongylocentrotus drobachiensis* in Maine, USA. *Marine Biology*, *59*, 49–62.

<https://doi.org/10.1007/BF00396982>

- Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C., & Ralph, J. (2009). Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Current Biology*, *19*, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.031>
- Matos, M. J., Santana L., Uriarte, E., Abreu, O. A., Molina, E., & Yordi, E. G. (2015). Coumarins – an important class of phytochemicals. In V. Rao, & L. Rao (Eds.), *Phytochemicals: Isolation, characterisation and role in human health* (113–140). doi:10.5772/59982
- Menzel, D. (1980). Plug formation and peroxidase accumulation in two orders of siphonous green algae (Caulerpales and Dasycladales) in relation to fertilization and injury. *Phycologia*, *19*(1), 37–48. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-19-1-37.1>
- Menzel, D. (1988). How do giant plant cells cope with injury?—The wound response in siphonous green algae. *Protoplasma*, *144*, 73–91. <https://doi.org/10.1007/BF01637240>
- Menzel, D., Kazlauskas, R., & Reichelt, J. (1983). Coumarins in the siphonaeal green algal family Dasycladaceae Kützing (Chlorophyceae). *Botanica Marina*, *26*, 23–29. <https://doi.org/10.1515/botm.1983.26.1.23>
- Newsome, A. G., Murphy, B. T., & van Breemen, R. B. (2013). Isolation and characterization of natural blue pigments from underexplored sources. *Physical Methods in Food Analysis*, *1138*, 105–125. <https://doi.org/10.1021/bk-2013-1138.ch008>
- Niemetz, R., & Gross, G. G. (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry*, *66*, 2001–2011. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.01.009>
- Nishizawa, M., Yamagishi, T., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., & Ragan, M. A. (1985). Gallotannins of the freshwater green alga *Spirogyra* sp. *Phytochemistry*, *24*(10), 2411–2413. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83053-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83053-8)
- 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*. *Marine Ecology Progress Series*, *157*, 139–146. <https://doi.org/10.3354/meps157139>
- Pérez-Rodríguez, E., Aguilera, J., & Figueroa, F. L. (2003). Tissular localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser: a photoprotective role? *Journal of Experimental Botany*, *54*(384), 1093–1100. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg111>
- 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. *Marine Biology*, *139*, 633–639. <https://doi.org/10.1007/s002270100588>
- 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*(5), 379–387. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-37-5-379.1>
- Pichrtová, M., Hájek, T., & Elster, J. (2014). Osmotic stress and recovery in field populations of

- Zygnema* sp. (Zygnematophyceae, Streptophyta) on Svalbard (High Arctic) subjected to natural desiccation. *FEMS Microbiology Ecology*, *89*, 270–280. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12288>
- Pichrtová, M., Kulichová, J., & Holzinger, A. (2014). Nitrogen limitation and slow drying induce desiccation tolerance in conjugating green algae (Zygnematophyceae, Streptophyta) from polar habitats. *PLoS ONE*, *9*(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113137>
- 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. *Microbial Ecology*, *65*, 68–83. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0096-9>
- Remias, D. (2012). Cell structure and physiology of alpine snow and ice algae. In C. Lütz (Ed.), *Plants in alpine regions: Cell physiology of adaptation and survival strategies* (175-185). doi:10.1007/978-3-7091-0136-0
- Remias, D., Holzinger, A., Aigner, S., & Lütz, C. (2012). Ecophysiology and ultrastructure of *Ancylonema nordenskiöldii* (Zygnematales, Streptophyta), causing brown ice on glaciers in Svalbard (high arctic). *Polar Biology*, *35*, 899–908. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1135-6>
- Remias, D., Holzinger, A., & Lütz, C. (2009). Physiology, ultrastructure and habitat of the ice alga *Mesotaenium berggrenii* (Zygnematophyceae, Chlorophyta) from glaciers in the European Alps. *Phycologia*, *48*(4), 302–312. <https://doi.org/10.2216/08-13.1>
- 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 Microbiology Ecology*, *79*, 638–648. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01245.x>
- Ross, C., Küpper, F. C., Vreeland, V., Herbert Waite, J., & Jacobs, R. S. (2005). Evidence of a latent oxidative burst in relation to wound repair in the giant unicellular chlorophyte *Dasycladus vermicularis*. *Journal of Phycology*, *41*, 531–541. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04072.x>
- Ross, C., Vreeland, V., Herbert Waite, J., & Jacobs, R. S. (2005). Rapid assembly of a wound plug: stage one of a two-stage wound repair mechanism in the giant unicellular chlorophyte *Dasycladus vermicularis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, *41*, 46–54. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04071.x>
- Schmidt, É. C., Pereira, B., dos Santos, R. W., Gouveia, C., Costa, G. B., Faria, G. S. M., ... Bouzon, Z. L. (2012). Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aquatic Botany*, *100*, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2012.03.004>
- Schoenwaelder, M. E. A. (2002a). Physode distribution and the effect of “thallus sunburn” in *Hormosira banksii* (Fucales, Phaeophyceae). *Botanica Marina*, *45*, 262–266.

<https://doi.org/10.1515/BOT.2002.025>

- Schoenwaelder, M. E. A. (2002b). The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia*, *41*(2), 125–139. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-41-2-125.1>
- Schoenwaelder, M. E. A. (2008). The biology of phenolic containing vesicles. *Algae*, *23*(3), 163–175. <https://doi.org/https://doi.org/10.4490/algae.2008.23.3.163>
- Schoenwaelder, M. E. A., & Clayton, M. N. (1998a). Secretion of phenolic substances into the zygote wall and cell plate in embryos of *Hormosira* and *Acrocarpia* (Fucales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, *34*, 969–980. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340969.x>
- Schoenwaelder, M. E. A., & Clayton, M. N. (1998b). The secretion of phenolic compounds following fertilization in *Acrocarpia paniculata* (Fucales, Phaeophyta). *Phycologia*, *37*(1), 40–46. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-37-1-40.1>
- Schoenwaelder, M. E. A., & Clayton, M. N. (1999a). The presence of phenolic compounds in isolated cell walls of brown algae. *Phycologia*, *38*(3), 161–166. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-38-3-161.1>
- Schoenwaelder, M. E. A., & Clayton, M. N. (1999b). The role of the cytoskeleton in brown algal physode movement. *European Journal of Phycology*, *34*, 223–229. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736282>
- Schoenwaelder, M. E. A., & Clayton, M. N. (2000). Physode formation in embryos of *Phyllospora comosa* and *Hormosira banksii* (Phaeophyceae). *Phycologia*, *39*(1), 1–9. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-39-1-1.1>
- Schoenwaelder, M. E. A., & Wiencke, C. (2000). Phenolic compounds in the embryo development of several Northern Hemisphere fucoids. *Plant Biology*, *2*, 24–33. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9178>
- Schoenwaelder, M. E. A., Wiencke, C., Clayton, M. N., & Glombitza, K. W. (2003). The effect of elevated UV radiation on *Fucus* spp. (Fucales, Phaeophyta) zygote and embryo development. *Plant Biology*, *5*, 366–377.
- Sollai, F., Zucca, P., Sanjust, E., Steri, D., & Rescigno, A. (2008). Umbelliferone and esculetin: inhibitors or substrates for polyphenol oxidases? *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *31*(12), 2187–2193. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.2187>
- Sørensen, I., Pettolino, F. A., Bacic, A., Ralph, J., Lu, F., O'Neill, M. A., ... Willats, W. G. T. (2011). The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *The Plant Journal*, *68*, 201–211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04686.x>
- Stafford, H. A. (1991). Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiology*, *96*, 680–685. <https://doi.org/10.1104/pp.96.3.680>
- Stancheva, R., Hall, J. D., Herburger, K., Lewis, L. A., Mccourt, R. M., Sheath, R. G., & Holzinger, A. (2014). Phylogenetic position of *Zygonium ericetorum* (Zygnematophyceae, Charophyta) from a high alpine habitat and ultrastructural characterization of unusual aplanospores. *Journal*

- of Phycology*, 50, 790–803. <https://doi.org/10.1111/jpy.12229>
- Stancheva, R., Sheath, R. G., & Hall, J. D. (2012). Systematics of the genus *Zygnema* (Zygnematophyceae, Charophyta) from californian watersheds. *Journal of Phycology*, 48, 409–422. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01127.x>
- Steinberg, P. D. (1984). Algal chemical defense against herbivores: allocation of phenolic compounds in the kelp *Alaria marginata*. *Science*, 223, 405–407. <https://doi.org/10.1126/science.223.4634.405>
- Steinberg, P. D. (1985). Feeding preferences of *Tegula funebris* and chemical defenses of marine brown algae. *Ecological Monographs*, 55(3), 333–349. <https://doi.org/10.2307/1942581>
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2006) *Plant Physiology*. (4th ed.). Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Toth, G. B., & Pavia, H. (2002). Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14418–14420. <https://doi.org/10.1073/pnas.250226997>
- Welling, M., Pohnert, G., Küpper, F. C., & Ross, C. (2009). Rapid biopolymerisation during wound plug formation in green algae. *The Journal of Adhesion*, 85, 825–838. <https://doi.org/10.1080/00218460903291452>
- 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*. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 7691–7694. <https://doi.org/10.1002/anie.201100908>
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 82–83, 969–974. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X)