

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Cytokininy v řasách

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Simona Juříková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne *podpis bakaláře*

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu, doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D., za odborné vedení mé bakalářské práce, za jeho čas a cenné rady, které mi při jejím vypracování věnoval. Poděkování patří také doc. RNDr. Petru Hašlerovi, Ph.D. za veškerou poskytnutou pomoc a ochotu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Simona Juříková
Název práce	Cytokininy v řasách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Doposud nebyl objasněn mechanismus biosyntézy aromatických cytokininů. Aby bylo možné jej studovat, je zapotřebí nalézt vhodný modelový organismus, který by produkoval dostatek těchto fytohormonů. Hlavní náplní této práce je tedy studium aromatických cytokininů v mikroasách. Teoretická část je věnována rostlinným hormonům. Dále pojednává o řasách, jejich kultivaci a využití. V praktické části této práce byl stanoven obsah volných aromatických cytokininů v řase *Chlorella sorokiniana*. Dále byla z biologického materiálu izolována tRNA, ve které byla poté sledována přítomnost vázaných cytokininů. Jako metoda koncové analýzy cytokininů byla zvolena ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. V kultivačním médiu nebyly přítomny žádné cytokininy. V buněčném extraktu byl nalezen oT. V tRNA byly detekovány oTR, cZR a iPR. Bylo zjištěno, že řasa *Chlorella sorokiniana* by mohla sloužit jako výchozí materiál pro studium biosyntézy aromatických cytokininů.

Klíčová slova	Cytokininy, řasy, biosyntéza, percepce
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Simona Juříková
Title	Cytokinins in algae
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2016

Abstract

It has not been elucidated the mechanism of aromatic cytokinins biosynthesis yet. To study it, there is a need to find a suitable model organism, which would produce enough of these phytohormones. The main content of this thesis is study of aromatic cytokinins in microalgae. The theoretical part is devoted to plant hormones. Further discusses the algae cultivation and the use. In the practical, the content of free aromatic cytokinins was determined in *Chlorella sorokiniana*. Hereafter, a tRNA was isolated from the biological material and then examined for the presence of bounded cytokinins. Ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry was chosen as a method of final cytokinins analysis. As a method of final cytokinins analysis was chosen ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Culture medium was free from any cytokinins. There was found *o*T in the cell extract. *o*TR, *c*ZR and *i*PR were detected in tRNA samples. After evaluation of the results, it was found that used cell culture could serve as a source material for the study of aromatic cytokinins biosynthesis.

Keywords	Cytokinins, algae, biosynthesis, perception
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

Cíle práce

- Vypracování literární rešerše obsahující klíčová slova: cytokininy, řasy, biosyntéza, percepce
- Identifikace aromatických cytokininů (volných a vázaných v tRNA) produkovaných vybranými řasami

Obsah

1	Úvod	8
2	Současný stav řešené problematiky	9
2.1	Rostlinné hormony	9
2.2	Metody chemické analýzy fytohormonů	12
2.2.1	Extrakce	12
2.2.2	Purifikace	13
2.2.3	Finální analýza	13
2.3	Cytokininy	15
2.3.1	Struktura cytokininů	15
2.3.2	Aromatické cytokinininy	17
2.3.2.1	Biologická aktivita a funkce aromatických cytokininů	18
2.3.2.2	Metabolismus aromatických cytokininů	19
2.3.2.3	Význam aromatických cytokininů	21
2.4	Řasy	22
2.4.1	Vzhled a morfologická rozmanitost řas	23
2.4.2	Rozmnožování řas	25
2.4.3	Kultivace řas	26
2.4.4	Využití řas	28
2.5	Zelené řasy	29
2.6	<i>Protococcus viridis</i>	30
2.7	<i>Chlorella sorokiniana</i>	31
3	Experimentální část	32
3.1	Použitý materiál a přístroje	32
3.1.1	Chemikálie	32
3.1.2	Biologický materiál	33
3.1.3	Použité přístroje a experimentální vybavení	33
3.2	Metody	35
3.2.1	Determinace buněčných kultur řas	35
3.2.2	Příprava tekutého živného média pro kultivaci	36
3.2.3	Kultivace řasy <i>Chlorella sorokiniana</i>	36
3.2.4	Příprava suspenzní buněčné kultury na extrakci a purifikaci	37
3.2.5	SPE purifikace cytokininů z kultivačního média	37
3.2.6	Extrakce cytokininů z buněk řasy <i>Chlorella sorokiniana</i>	38
3.2.7	SPE purifikace cytokininů z buněčného extraktu	39
3.2.8	Přečištění vzorků z média a buněk pomocí DEAE-Sephadexu a kolon C18	39
3.2.9	LC-MS analýza CK ve vzorcích z buněčného extraktu a média	40
3.2.10	Měření hmotnostního spektra oT	41
3.2.11	Stanovení návratnosti purifikace CK pomocí SPE kolon C18	41
3.2.12	Izolace tRNA z buněk řasy <i>Chlorella sorokiniana</i>	42
3.2.12.1	Extrakce tRNA z rostlinného materiálu	42
3.2.12.2	UV analýza vzorků tRNA	43
3.2.12.3	Elektroforéza vzorků tRNA	43
3.2.13	Hydrolýza tRNA a defosforylace nukleotidů	43
3.2.14	Purifikace CK z tRNA nukleotidů	44
3.2.15	LC-MS analýza CK ve vzorcích získaných z tRNA	44
4	Výsledky	45
4.1	Kapacita SPE kolon C18 pro purifikaci média	47
4.2	Screening aromatických CK v kultivačním médiu4	47

4.3	Screening aromatických CK v biologickém materiálu	47
4.4	Hmotnostní spektrum oT	48
4.5	Návratnost purifikace aromatických CK pomocí SPE kolon C18	50
4.6	Stanovení čistoty a koncentrace tRNA v biologickém materiálu	52
4.7	Identifikace CK vázaných v tRNA	54
4.8	Kvantifikace aromatických CK vázaných v tRNA	55
5	Diskuse	56
6	Závěr	58
7	Literatura	59
8	Seznam použitých zkratk	65

1 ÚVOD

Cytokininy jsou skupinou přírodních látek patřících mezi rostlinné hormony. Významným způsobem ovlivňují především dělení buněk, stimulují růst nadzemní části rostliny, větvení stonku a zpomalují senescenci listů (Zeiger a Taiz, 2002). Mají tedy skutečně široké spektrum působení, což je jedním z důvodů, proč jsou i po 60 letech od svého objevení centrem zájmu mnohých studií (Miller *et al.*, 1955a). Ani po takové době tedy ještě nejsou zodpovězeny všechny otázky, týkající se problematiky cytokininů. Tyto rostlinné hormony se dle své struktury dělí na dvě skupiny – isoprenoidní cytokininy (ISCK), o kterých je v současnosti známo mnohem více, a aromatické cytokininy (ARCK), jejichž význam, biochemický původ, ani percepce nebyly doposud popsány (Tarkowski, 2011).

Aby mohly být zodpovězeny otázky visící nad biosyntézou ARCK, musí být nalezen vhodný organismus pro tuto studii. V takovém organismu by měla syntéza aromatických cytokininů probíhat v dostatečném množství a ARCK by měly být přítomny jak ve formě volné, tak ve formě vázané. Vhodným kandidátem splňujícím dané požadavky by mohly být řasy, ve kterých byla přítomnost mnohých aromatických cytokininů již dříve detekována (Stirk *et al.*, 2003; Ördög *et al.*, 2004). Řasy jsou obecně organismy, které mají v oblasti vědy stále co nabídnout – důkazem toho je, že v posledních letech v nich bylo objeveno více než 15000 nových látek (Wolkers *et al.*, 2011).

Vhodnou metodou pro studium aromatických cytokininů je ultraúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí (Novák *et al.*, 2008), pomocí které byl analyzován obsah cytokininů i v této práci. Jako biologický materiál byla použita suspenzní buněčná kultura mikroskopické řasy *Chlorella sorokiniana*. Záměrem bylo stejným způsobem studovat i řasu *Protococcus viridis*, z důvodu kontaminace její kultury však nakonec tato řasa nemohla být použita při práci.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou přírodní látky, které hrají významnou roli v životním cyklu rostlin. Tyto sekundární metabolity mají velmi rozmanité oblasti působení – mají vliv například na růst rostliny, buněčné dělení, klíčení a dozrávání semen, diferenciaci buněk a stárnutí orgánů (Davies, 1995).

Správná funkce fytohormonů je tudíž klíčová pro zdraví rostlinného organismu. Již podle pozorování fenotypu nemocné rostliny se dá usoudit, k jaké hormonální poruše došlo. Takovéto odchylky ve funkci hormonů mohou být způsobeny například rostlinnými patogeny a mohou se projevovat předčasným stárnutím rostliny, tvorbou hálek, či produkcí prázdných lat při chorobě zvané bakanae (Grant a Jones, 2009). Jako rostlinné hormony je možné označit devět látek či skupin těchto látek – auxiny, cytokininy, ethylen, kyselinu salicylovou, kyselinu abscisovou, jasmonáty, gibbereliny, strigolaktomy a brassinosteroidy (Tab. 1; Fu *et al.*, 2011).

Auxiny, které byly objeveny nejdříve ze všech rostlinných hormonů, mají za úkol regulovat široké spektrum dějů v rostlinném organismu. Podporují dělení buněk, prodlužování stonku a apikální dominanci, regulují diferenciaci buněk a rostlinných pletiv, regulují rostlinné pohyby, kvetení, opad listů a stárnutí (Teale *et al.*, 2006). Auxin také napomáhá virulenci při biotrofických reakcích (Grant a Jones, 2009).

Cytokininy, jejichž hlavní funkcí je indukce buněčného dělení (Skoog a Miller, 1957), budou podrobně popsány později.

Ethylen je plynňý hormon, který ovlivňuje všechny stupně rostlinného vývoje. Účastní se klíčení semen a růstu semenáčků, prodlužování buněk a determinuje vývoj pohlaví u rostlin. Dále ethylen moduluje rychlost růstu a vývoje listů, kořenů, podporuje kvetení, vývoj a zrání plodů a celkové stárnutí rostliny. V neposlední řadě tedy urychluje opad listů, květů a plodů neboli abscisi. Ethylen má také klíčovou roli při reglaci odpovědi na abiotický a biotický stres (Solano a Ecker, 1998).

Kyselina salicylová (SA) v kombinaci s dalšími hormony reguluje vývoj rostliny a kvetení. Především však tento hormon zodpovídá za imunitní odpověď na patogeny. Určitý typ této odpovědi je však zprostředkován vždy buď kyselinou salicylovou, nebo kyselinou jasmínovou (JA) – nikdy ne oběma. Rovnováha mezi JA a SA tedy může

určit, zda rostlina podlehne infekci a některé patogeny dokonce umí ovlivnit poměr JA:SA ve svůj prospěch (Singh *et al.*, 2013; Grant a Jones, 2009).

Kyselina abscisová je rostlinný hormon, jehož hlavní funkcí není podle očekávání abscise, neboli opadávání, listů, květů a plodů, ale regulace dormance semen a otevírání a zavírání průduchů. Podstatnou funkcí této sloučeniny je také odpovídání na abiotický stres a ovlivňování vzájemné interakce mezi rostlinou a patogenem. Kyselina abscisová je tak nedílnou součástí obranných mechanismů rostlin (Patterson, 2001; Grant a Jones, 2009).

Kyselina jasmonová a od ní odvozené jasmonáty jsou sloučeniny, které hrají podstatnou roli při obranných reakcích, reprodukci a především senescenci (Seo *et al.*, 2001). Podpora senescence souvisí s inhibiční funkcí jasmonátů, která má na svědomí zabránění růstu kořene rostlin a postupný úbytek chlorofylu z listů rostlin (Toro *et al.*, 2003).

Gibereliny jsou klíčovými hormony regulujícími rostlinný růst a vývoj. Jsou tedy zapojeny do širokého spektra dějů, mezi které patří například klíčení semen, tvorba květů a plodů a zajištění jejich pigmentace či prodlužování stonku a výhonků. Tyto hormony také pomáhají vytvářet správný tvar listů a zpomalují jejich senescenci. Dále se gibereliny podílejí na mobilizaci zásobních látek uložených v semenech (Garciamartinez *et al.*, 1987; Hooley, 1994).

Brassinosteroidy jsou skupinou hormonů, jejichž funkce tkví především v podporování růstu rostlin a jejich ochraně proti abiotickému stresu. V neposlední řadě se však podílejí i na klíčení semen, vývoji kořenů, kvetení a senescenci (Rao *et al.*, 2002).

Nejmladší skupinou rostlinných hormonů jsou strigolaktony, které aktivují klíčení semen parazitních rostlin, podporují mykorhizní symbiosu a regulují větvení kořenového systému. Z tohoto důvodu se nacházejí především v kořenech, kořenových exudátech a výhoncích (Gomez-Roldan *et al.*, 2008).

Tab. 1 Třídy fytohormonů a jejich představitelé (převzato a upraveno z Fu *et al.*, 2011)

Kategorie hormonů	Strukturní vzorec zástupce	Název
Auxiny		Indolyl-3-octová kyselina (IAA)
Cytokininy		<i>trans</i> -Zeatin (<i>tZ</i>)
Ethylen	$H_2C=CH_2$	Ethylen
Kyselina salicylová		Kyselina salicylová (SA)
Kyselina abscisová		S-(+)-Abscisová kyselina (S-ABA)
Jasmonáty		(-)-Jasmonová kyselina ((-)-JA)
Gibereliny		Giberelin A ₁ (GA ₁)
Strigolaktony		2'- <i>epi</i> -5-Deoxylstrigol (<i>epi</i> -5DS)
Brassinosteroidy		Brassinolid (BR)

2.2 Metody chemické analýzy fytohormonů

Aby bylo možné studovat rostlinné hormony z hlediska jejich biosyntézy, transportu, metabolismu a regulačních mechanismů, je třeba tyto fytohormony analyzovat. Pro takovou analýzu platí několik klíčových bodů. Získaný rostlinný materiál musí bezpodmínečně zůstat v nezměněném stavu od sběru. Neméně důležitý je výběr rozpouštědla při extrakci, které zajistí kvantitativní převedení analytu do vzorku pro koncovou analýzu. Metody purifikace a zakoncentrování vzorku musí být optimalizovány a metody pro stanovení hladiny hormonů musí být dostatečně přesné a citlivé (Fu *et al.*, 2011).

Základním úskalím analýzy fytohormonů je fakt, že jejich endogenní hladiny jsou velice nízké – pohybují se v rozmezí okolo 0.1–50 ng na 1 g čerstvé hmoty. Jiné sekundární metabolity jako flavonoidy se však vyskytují v desetitisíckrát větším množství (Davies, 1995; Hao a Kang, 2005). Kromě fytohormonů se ve vzorku objevují fenolické látky, lipidy, proteiny a pigmenty, přičemž všechny tyto látky je třeba oddělit (Tarkovská *et al.*, 2014).

2.2.1 Extrakce

Nejprve je nutné homogenizovat rostlinný materiál rozrušením buněčné stěny, což se provádí většinou drcením materiálu ve třecí misce za pomoci tekutého dusíku (Harrison, 2011). Následuje rozpuštění ve vhodném solventu. Malá množství materiálu je také možné rozdrtit v plastové mikrozkuhavce pomocí korálek karbidu wolframu či oxidu zirkoničitého. Úkolem rozpouštědla je extrahovat analyt s co největší účinností a naopak zamezit extrakci jiných interferujících látek (Tarkovská *et al.*, 2014). Nejčastěji jsou pro tento účel používány látky jako methanol, aceton, propanol, acetonitril, popřípadě směs těchto solventů s vodnými roztoky kyseliny octové či mravenčí. Pro extrakci cytokininů a giberellinů je používána extrakční směs podle Bieleškiho o složení MeOH:CHCl₃:HCOOH:H₂O (12:5:1:2, v/v/v/v; Bieleški, 1964), respektive její upravené složení MeOH:HCOOH:H₂O (15:1:4, v/v/v/), které zabraňuje extrakci lipofilních molekul. Výhodou této extrakční směsi je, že inaktivuje fosfatasy, které by mohly hormony rozkládat. Abychom předešli enzymatické a chemické degradaci analyzovaných hormonů, je důležité udržovat po dobu extrakce nízkou teplotu (Fu *et al.*, 2011; Tarkovská *et al.*, 2014).

2.2.2 Purifikace

Výběr optimální metody purifikace závisí především na chemické povaze analyzovaného hormonu. Nejčastějšími metodami purifikace jsou extrakce kapalina-kapalina, SPE neboli extrakce na tuhé fázi a purifikace pomocí IAE – imunoafinitní extrakce.

Při použití extrakce kapalina-kapalina je využíváno rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné kapaliny na základě jejich rozpustnosti, přičemž se nejčastěji používá kombinace vody a organického rozpouštědla. Nevýhodou této metody je nutnost mnoha separačních kroků, časová náročnost a velká spotřeba rozpouštědel. S přihlédnutím k nepřilíživé vysoké účinnosti není použití tohoto typu extrakce příliš výhodné (Fu *et al.*, 2011).

Extrakce na tuhé fázi je naopak nejpoužívanější metodou purifikace. Kolonky využívané pro tuto metodu jsou plněny pevnými sorbenty, které vážou analyt na základě hydrofobních, polárních či iontových interakcí. Interferující látky jsou odstraněny promývacími činidly a rostlinný hormon je vytěsněn z kolonky elučním činidlem, které naruší vazby vzniklé mezi fytohormonem a tuhým sorbentem. Hojně využívané jsou SPE kolonky, které kombinují dva typy sorbentů, což šetří čas i materiál (Tarkovská *et al.*, 2014; Tab. 2).

Imunoafinitní purifikace je založena na interakci protilátka-antigen a poskytuje velmi vysokou mez detekce. Je tu však problém v tom, že fytohormony jako nízkomolekulární látky nemohou být rozpoznány specifickými antigeny. Řešení je tedy v navázání hormonů na makromolekuly, díky kterým se už mohou rostlinné hormony chovat jako antigen. Takovou molekulou může být například hovězí sérový albumin (Ulvskov *et al.*, 1987; Fu *et al.*, 2011).

2.2.3 Finální analýza

Klíčové pro analýzu fytohormonů jsou chromatografické metody. Dříve široce využívaná plynová chromatografie (GC) má několik nedostatků. Fytohormony nejsou těkavé látky, a tak je potřeba je derivatizovat. To je možné například pomocí etherického diazomethanu či chloridu boritého. Díky tomu je však GC časově náročná. Citlivost oproti HPLC je nižší a potřebné množství materiálu je vyšší (Tarkowski *et al.*, 2009; Podlešáková *et al.*, 2012).

Oproti GC je tedy HPLC nejvyžívanější metodou pro kvalitativní a kvantitativní analýzu fytohormonů. Kromě vysoké rychlosti a účinnosti je výhodou HPLC její snadné spojení s řadou technik finální analýzy jako ELISA, UV-spektrometrie a především hmotnostní spektrometrie (MS). Při HPLC-MS se nejčastěji používá ionizace elektrosprejem (ESI), která poskytuje nejcitlivější analýzu s nejmenším množstvím šumu v pozadí (Tarkowski *et al.*, 2004; Tarkowski *et al.*, 2009).

Inovovanou metodou kapalinové chromatografie je UHPLC – ultraúčinná kapalinová chromatografie. U této metody jsou chromatografické kolony naplněny částicemi o průměru menším než 2 μm , výsledkem čehož je lepší účinnost separace, citlivost a zhruba čtyřikrát menší časová náročnost (Novák *et al.*, 2008).

Tab. 2 Použití různých typů SPE pro analýzu fytohormonů (převzato a upraveno z Fu *et al.*, 2011)

Typ SPE	Použitý systém	Charakter	pH	Analyty
DEAE-celulosa	Aniontová výměna	Aniontový/středně polární	2-9,5	CK
SCX	Kationtová výměna	Kationtový/nepolární	2-8	CK
C ₁₈	Reverzní fáze	Nepolární/mírně polární	2-7,5	IA, ABA, IAA, IBA, GA, Z, BA, K, CK
Oasis HLB	Reverzní fáze	Nepolární/mírně polární	1-14	IAA, ABA, GA, CK
Oasis MAX	Reverzní fáze + kationtová výměna	Aniontový/nepolární	1-14	IAA, ABA, CK
Oasis MCX	Reverzní fáze + aniontová výměna	Kationtový/nepolární	1-14	IAA, ABA, GA, K, CK

2.3 Cytokininy

Cytokininy je souhrnné označení pro všechny sloučeniny, které vykazují určitou cytokininovou aktivitu, popřípadě jsou deriváty těchto aktivních forem (Galuszka *et al.*, 2008). Tyto fytohormony zastupují mnoho základních a důležitých funkcí v rostlinném organismu a proto stále patří mezi nejvíce studované skupiny těchto hormonů.

Název cytokininů je odvozen od jejich hlavní funkce, což je cytokineze neboli buněčné dělení (Skoog *et al.*, 1957). Velmi často však cytokinininy nepůsobí samostatně, ale spolupracují s dalšími druhy hormonů. Dále cytokinininy mobilizují minerální látky, oddalují stárnutí listů, inhibují apikální dominanci a zároveň stimulují větvení stonků, podporují druhotné tloušťnutí stonků a stimulují růst nadzemní části rostliny (Zeiger a Taiz, 2002).

Stejně jako jiné signální molekuly působí cytokinininy při velmi nízkých koncentracích – 1-50 pmol/g živé váhy (Galuszka *et al.*, 2008). Hladiny jednotlivých cytokininů se mohou výrazně lišit podle druhu rostliny, rostlinného pletiva, stádia vývoje rostliny a podle životních podmínek růstu. Zastoupení cytokininů v různých částech rostliny se odvíjí hlavně od jejich syntézy, degradace, inaktivace a transportu (Frébort *et al.*, 2011).

První objevený cytokinin byl kinetin. V roce 1955 určil jeho přítomnost C. O. Miller, který také ještě téhož roku určil i strukturu tohoto hormonu (Miller *et al.*, 1955a; Miller *et al.*, 1955b). Dnes je již známo okolo padesáti různých látek s cytokininovou aktivitou (Galuszka *et al.*, 2008).

2.3.1 Struktura cytokininů

Cytokininy se dělí na přirozeně se vyskytující a synteticky získané. Přirozené cytokinininy jsou N^6 substituované deriváty adeninu a podle chemické struktury tohoto vedlejšího řetězce jsou dále děleny na isoprenoidní cytokinininy (ISCK) a aromatické cytokinininy (ARCK; Tab. 3).

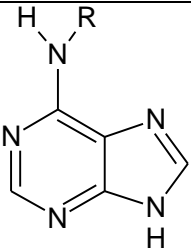
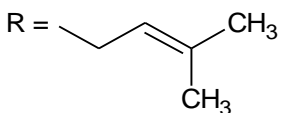
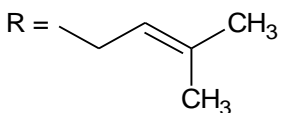
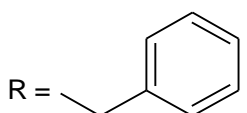
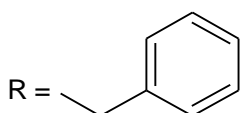
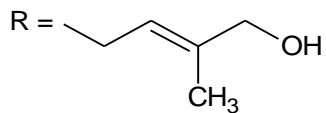
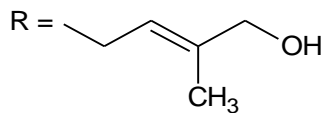
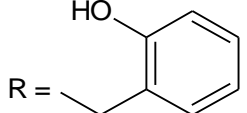
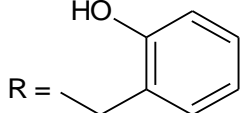
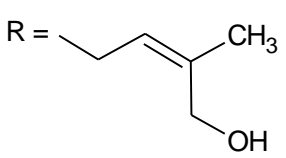
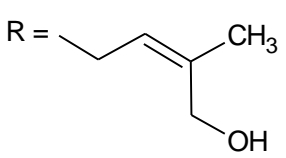
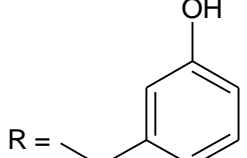
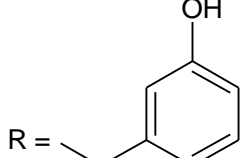
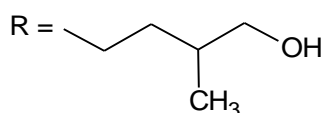
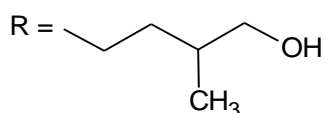
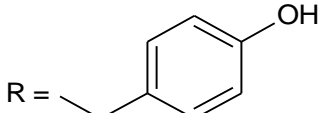
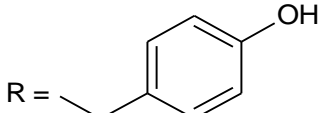
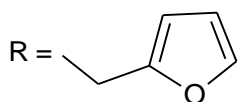
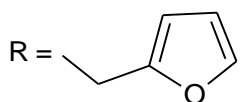
Isoprenoidní cytokinininy se vyskytují mnohem častěji, než aromatické. Jejich zástupce isopentenyladenin [N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenin] může být hydroxylovaný v poloze *trans* nebo *cis* za vzniku příslušného zeatinu. Dihydrozeatin je redukovanou formou zeatinu (Frébort *et al.*, 2011).

Mezi aromatické cytokininy patří benzyalaminopurin neboli benzyladenin a jeho hydroxylované deriváty zvané topoliny. Topoliny existují jako *ortho*, *meta* a *para* isomery, přičemž neaktivnější je *meta*-topolin (Strnad, 1997).

Cytokininy ovšem mohou mít na základní kostru navázány další struktury za tvorby nukleosidů (*N*⁹ ribosidů), nukleotidů, popřípadě *O*-glukosidů či *N*-glukosidů (Burrows *et al.*, 1970).

Vyhraněnou skupinou jsou díky své odlišné struktuře syntetické cytokininy. Ačkoliv vykazují cytokininovou aktivitu stejně jako přírodní cytokininy, nejsou odvozeny od adeninu, nýbrž od fenyльмоčoviny, popřípadě thidiazuronu (Galuszka *et al.*, 2008).

Tab. 3 Strukturální vzorce jednotlivých cytokininů, jejich názvy a používané zkratky

 Báze	
Isoprenoidní cytokininy	Aromatické cytokininy
 R =  isopentenyladenin (iP)	 R =  benzyladenin (BAP)
 R =  <i>trans</i> -zeatin (<i>tZ</i>)	 R =  <i>ortho</i> -topolin (<i>oT</i>)
 R =  <i>cis</i> -zeatin (<i>cZ</i>)	 R =  <i>meta</i> -topolin (<i>mT</i>)
 R =  dihydrozeatin (DHZ)	 R =  <i>para</i> -topolin (<i>pT</i>)
	 R =  kinetin (K)

2.3.2 Aromatické cytokininy

Díky méně častému výskytu oproti isoprenoidním cytokininům byly dlouhou dobu aromatické cytokininy, respektive benzylaminopurin (BAP) a jeho deriváty, považovány za výhradně syntetické látky.

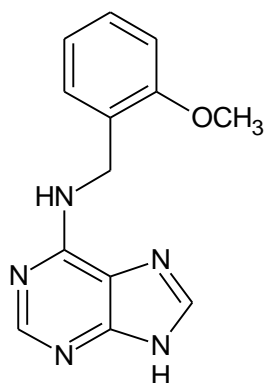
Zlomový byl však rok 1973, kdy Horgan *et al.* objevili v topolu (*Populus x canadensis* (cv. Robusta)) přirozeně se vyskytující aromatický cytokinin *ortho*-topolin ribosid (oTR; Horgan *et al.*, 1973) a o dva roky později jej identifikovali jako 6-(2-hydroxybenzylamino)-9- Δ -ribofuranosylpurin (Horgan *et al.*, 1975). Tato látka byla v roce 1980 opět izolována z kornoutnice africké známé též jako kala (*Zantedeschia aethiopica*). Ze stejné rostliny byl získán také 6-(2-hydroxybenzylamino)-2-methylthio-9- β - Δ -glucofuranosylpurin neboli 2-methylthio-*ortho*-topolin-9-glukosid (Chaves das Neves a Paiss, 1980a; Chaves das Neves a Paiss, 1980b). V roce 1983 izolovali Ernst *et al.* 6-benzylaminopurin ribosid z buněčné kultury anýzu (*Pimpinella anisum*) (Ernst *et al.*, 1983). Následoval objev 6-benzylaminopurinu neboli benzyladeninu (BAP) a jeho ribosidu, nukleotidu a 9-glukosidu v tumorech na stoncích rajčat způsobených *Agrobacterium tumefaciens* (Nandi *et al.*, 1989).

Pomocí metody kombinující vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s ELISA detekcí objevili Strnad *et al.* (1992) 6-(2-hydroxybenzylamino)purin. V roce 1994 byl detekován 9-glukosid této sloučeniny a v roce 1997 její isomer 6-(3-hydroxybenzylamino)purin. Podle topolu (*Populus x canadensis* cv. Robusta), ve kterém byly hydroxylované deriváty benzylaminopurinu poprvé detekovány, získaly tyto látky název topoliny (Strnad *et al.*, 1994; Strnad *et al.*, 1997).

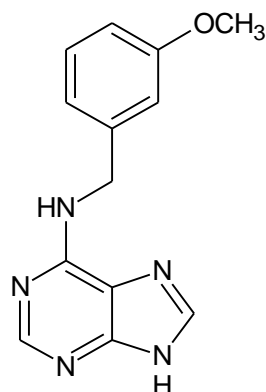
Aromatické cytokininy a jejich deriváty byly nalezeny také v palmě olejné (*Elaeis guineensis*; Jones *et al.*, 1996) či v kultivarech bramboru (*Solanum tuberosum*; Baroja Fernández *et al.*, 2002). Doležal *et al.* (2002) detekovali v merlíku (*Chenopodium rubrum*) dva deriváty oT - 6-[2-(β - Δ -glukopyranosyloxy)benzylamino]purin a 6-[2-(β - Δ -glukopyranosyloxy)-benzylamino]-2-methylthiopurin. Další ARCK a jejich metabolity byly nalezeny v kokosovníku ořechovém (*Cocos nucifera*; Sáenz *et al.*, 2003), v *Arabidopsis thaliana* a topolu (*Populus x canadensis* cv. Robusta), kde byly objeveny nové methoxy deriváty topolinu (Obr. 1; Tarkowská *et al.*, 2003).

Následoval objev cytokininů v mořských makrořasách (Stirk *et al.*, 2003), později pak i v mikrořasách rodů *Chlorella*, *Protococcus* a *Scenedesmus* (Ördög *et al.*, 2004). Von Schwartzenberg *et al.* (2007) našli ARCK v mechu *Physcomitrella patens*.

ortho-methoxytopolin



meta-methoxytopolin



Obr. 1 Strukturní vzorce dvou izomerů methoxytopolinů (převzato a upraveno z Tarkowská *et al.*, 2003).

2.3.2.1 Biologická aktivita a funkce aromatických cytokininů

Biologická aktivita aromatických i isoprenoidních cytokininů bývá testována pomocí nejrozličnějších standardních biotestů. Mezi nejznámější z nich patří test založený na indukcii růstu kalusu (kalusový test), test založený na zpomalení senescence listů obilovin (senescenční test), test založený na tvorbě červeného pigmentu betacyaninu (amarantový test) a bakteriální receptorový test (Galuszka, 2008).

Aktivita látek odvozených od benzylaminopurinu jsou ovlivněny především pozicí -OH skupiny na postranním řetězci molekuly. Této problematice se ve své práci věnovali Holub *et al.* (1998), kteří zjistili, že při tabákovém kalusovém biotestu zvyšovala hydroxylace v poloze *meta* aktivitu BAP i jeho ribosidu, kdežto hydroxylace v *ortho* poloze aktivitu snižovala. Nicméně, v amarantovém biotestu došlo při hydroxylaci v *meta* poloze k podstatnému poklesu biologické aktivity BAP. Obecně je však přijímána skutečnost, že aktivita hydroxylovaných derivátů BAP klesá v pořadí *meta*, *ortho* a *para* (Kamínek *et al.*, 1987).

Funkce aromatických cytokininů v rostlinném organismu se od funkce isoprenoidních cytokininů liší. Na rozdíl od isoprenoidních cytokininů nejspíše nehrají aromatické cytokininy podstatnou roli při klíčení a buněčném dělení. Působí však při mobilizaci živin, syntéze chlorofylu, ovlivňují metabolismus a růstové procesy zahrnující především morfogenezi (Kamínek *et al.*, 1987; Holub *et al.*, 1998; Stirk *et al.*, 2012). Skutečnost, že aromatické cytokininy mají rozdílnou funkci oproti isoprenoidním, je podpořena i předpokladem, že aromatické cytokininy mají jiný mechanismus *de novo* syntézy, než isoprenoidní cytokininy (Strnad, 1997).

2.3.2.2 Metabolismus aromatických cytokininů

Metabolity aromatických cytokininů tvoří velmi rozmanitou skupinu látek. Jedná se především o jejich ribosidy, nukleotidy, *N*-glukosidy, konjugáty s aminokyselinami, methoxyderiváty a látky od nich odvozené (Strnad, 1997; Sakakibara, 2006; Obr. 2).

Proces glukosylace aromatických cytokininů a s tím spojené interakce těchto látek s buněčným signálním systémem by měly být stejné, jako v případě isoprenoidních cytokininů. Obě tyto skupiny jsou totiž substrátem pro klíčové enzymy a receptory v těchto procesech zapojené (Sakakibara, 2006).

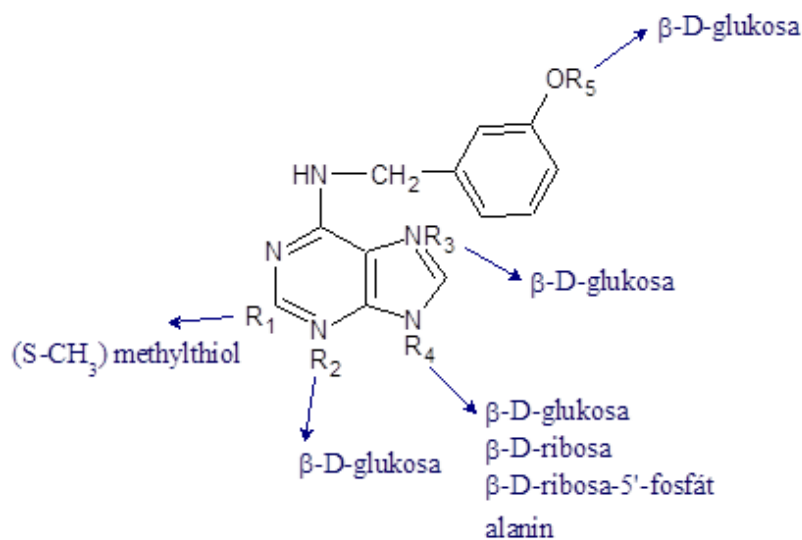
V případě, že se v molekule vyskytuje OH-skupina, mohou vznikat *O*-glukosidy. Procesu jejich vzniku se účastní stejné enzymy, jako při *O*-glukosidaci isoprenoidních cytokininů, tedy *O*-glukosyltransferasy, přičemž *trans*-zeatin-*O*- β - Δ -glukosyltransferasa glukosiduje *meta*-topolin a *cis*-zeatin-*O*- β - Δ -glukosyltransferasa glukosiduje *ortho*-topolin. Tento proces je reverzibilní a zpětný rozpad vzniklých konjugátů na volné báze katalizuje enzym β -glukosidasa (Mok *et al.*, 2005).

Glukosylace může probíhat také na atomech N^3 , N^7 a N^9 a zajišťuje ji enzym *N*-glukosyltransferasa (Sakakibara, 2006). V případě že jsou rostliny vystaveny vysokým koncentracím exogenně aplikovaných cytokininů, hlavní formou vzniklých konjugátů jsou N^7 glukosidy (Cowley *et al.*, 1978). Jelikož nejsou *N*-glykosidy substrátem pro β -glukosidasu jako je tomu v případě *O*-glukosidů, je proces jejich vzniku obecně považován za irreverzibilní (Sakakibara, 2006). Nicméně v případě N^3 -glukosidu kinetinu došlo při interakci s β -glukosidasou k odštěpení vázaného glukosidu. Při stejném pokusu s N^7 a N^9 glukosidy však k této reakci nedošlo (Brzobohatý, 1993). Kvůli skutečnosti, že *N*-glukosilaci dochází k inaktivaci funkce cytokininů, činí tento proces problémy při exogenní aplikaci cytokininů v zemědělství (Hocart *et al.*, 1991). Řešením může být podání inhibitorů *N*-glukosyltransferasy, což jsou například Olomoucín, Roskovitin či deriváty xantinu (Hou *et al.*, 2004; Blagoeva *et al.*, 2004).

Co se týká biosyntézy aromatických cytokininů, nebylo dodnes přesněji zjištěno, jakým způsobem probíhá. Existují ovšem domněnky, že aromatické cytokininy jsou odvozeny od fenolických látek (Strnad, 1997), a že v jejich biosyntéze sehrává roli enzym CYP735A nebo jiné enzymy z řady cytochromů P450 (Sakakibara, 2006). V případě potvrzení hypotézy, že jsou aromatické cytokininy odvozeny od fenolických látek, biosyntéza ARCK by se odvíjela od základních dvou biosyntetických drah fenolových látek – šikimátové dráhy a polyketidové dráhy.

Šikimátová dráha je klíčovou metabolickou drahou syntézy aromatických sloučenin jak u rostlin, tak i u hub a bakterií. Do této sedmikrokové metabolické dráhy probíhající v chloroplastech je zapojeno celkem 7 enzymů. Aromatické produkty šikimátové dráhy mají substituenty navázány v polohách *ortho* a *para*. Do této dráhy vstupují erythrosa-4-fosfát a fosfoenolpyruvát, které spolu kondenzují vlivem katalýzy enzymu 3-deoxy- Δ -arabino-hepulosonát-7-fosfát synthasa (zkráceně DAHP synthasa). Vzniklý produkt DAHP je poté metabolizován ve třech dalších krocích na šikimát, důležitý meziprodukt, ze kterého buď mohou vznikat fenolické kyseliny (PHA) – kyselina gallová a protokatechové. V jiném případě může šikimát pokračovat ve sledu metabolických reakcí šikimátové dráhy, kdy z něj vzniká chorismát. Konečnými produkty šikimátové dráhy jsou především aromatické aminokyseliny tryptofan, tyrosin a fenylalanin, popřípadě některé PHA (Herrmann, 1995).

Druhou cestou vedoucí ke vzniku aromatických látek je polyketidová dráha, která může mnohým připomínat syntézu mastných kyselin. Základní sloučeninou této dráhy je totiž acetyl-CoA, vznikající prostřednictvím malonyl-CoA. Tyto dvouuhlíkaté jednotky postupně kondenzují za vzniku poly- β -ketonického řetězce. Ten je dále upravován alkyací, hydroxylací a cyklizací na výsledné aromatické produkty. Podstatné je, že na rozdíl od šikimátové dráhy mají produkty vzniklé polyketidovou drahou substituenty v poloze *meta* (Macholán, 1998; Croteau *et al.*, 2000).



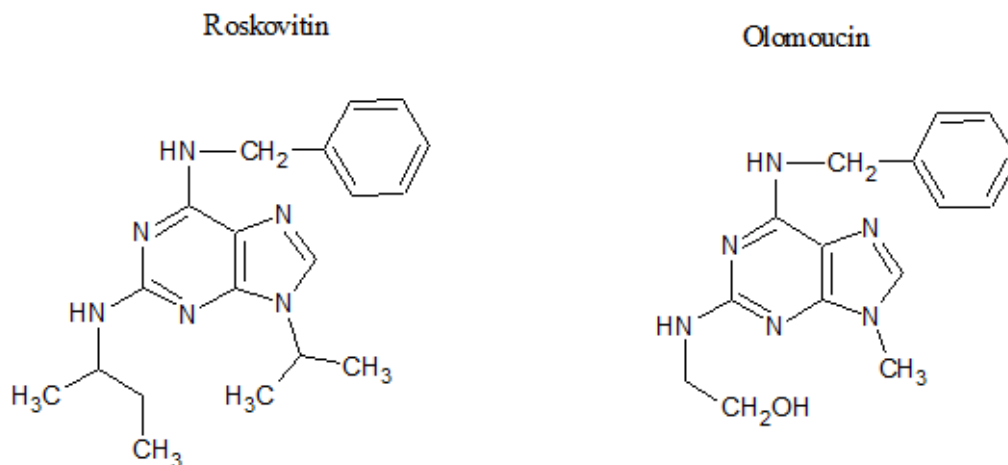
Obr. 2 Možné konjugáty aromatických cytokininů na příkladu *meta*-topolinu (převzato a upraveno ze Sakakibara, 2006).

Degradace aromatických cytokininů je uskutečňována pomocí cytokinin dehydrogenasy (CKX), dříve známé jako cytokinin oxidasa. Jedná se o stejný enzym, který degraduje také isoprenoidní cytokininy). Produkty reakce jsou adenin a příslušný aldehyd. Na rozdíl od isoprenoidních cytokininů se v případě degradace aromatických cytokininů uplatňuje výhradně oxidasová aktivita tohoto enzymu (Frébortová *et al.*, 2004).

2.3.2.3 Význam aromatických cytokininů

Obrovské využití nacházejí růstové regulátory, tedy i cytokininy, při mikropropagacích. V tomto procesu jde o vytvoření rostlinných explantátů a jejich růst *in vitro*, který může být následován přenosem rostliny do skleníku či na pole (Baroja-Fernández *et al.*, 2002). Díky své finanční dostupnosti a vysoké biologické aktivitě je k těmto účelům nejčastěji používaný benzylaminopurin (BAP; Galuszka *et al.*, 2008). Jeho použití má však mnohé nedostatky jako jsou například inhibice kořenění, špatná aklimatizace při transportu do skleníku či nekróza vrcholů výhonků. Tento negativní efekt je pravděpodobně způsoben přirozenou N^{β} -glukosylací BAP vedoucí ke vzniku neaktivních glukosidů (Plíhal *et al.*, 2013). Vhodnou alternativou pro užití BAP však může být *meta*-topolin (*mT*), jelikož tento cytokinin nevykazuje inhibiční aktivitu pro růst kořenů (Werbrouck *et al.*, 1996). Stejně pozitivní výsledky pro užití *mT* topolinu při mikropropagaci potvrdil i Baroja-Fernández *et al.* (2002). Podle Bairu *et al.* (2007) je tak *mT* nejvhodnějším cytokininem pro růst nadzemní části i kořenů. Na druhou stranu, při studiu kultivarů banánovníku se tato hypotéza nepotvrdila, jelikož *mT* inhiboval růst kořenů více než BAP (Bairu *et al.*, 2008).

V devadesátých letech se přišlo na to, že kinetin má pozitivní vliv na prodloužení vitality lidských fibroblastů, což jsou základní buňky vazivové tkáně (Rattan a Clark, 1994). Kromě toho vykazuje kinetin silnou antioxidační aktivitu (Olsen *et al.*, 1999). Díky těmto svým pozitivním vlastnostem se stal kinetin důležitou látkou pro kosmetický průmysl a je používán především v krémech pomáhajících proti stárnutí pleti (Galuszka *et al.*, 2008).



Obr. 3 Strukturální vzorce syntetických cytokininových derivátů Roskovitinu a Olomoucínu (převzato a upraveno z Galuszka, 2008).

Velmi přínosným bylo zjištění, že některé syntetické deriváty aromatických cytokininů jako Roskovitin a Olomoucín (Obr. 3), které byly zmíněny již výše, vykazují protinádorovou aktivitu (Hajduch *et al.*, 1999; Kryštof *et al.*, 2005). Díky své schopnosti inaktivovat cyklin dependní kinasy (enzymy regulující buněčný cyklus) mají totiž tyto sloučeniny cytostatické vlastnosti (Veselý *et al.*, 1994).

2.4 Řasy

Řasy jsou eukaryotické organismy, většinou drobného vzrůstu, jejichž rostlinné tělo není rozlišené a tvoří je tedy stélka. Z těchto důvodů patří řasy mezi nižší rostliny. Z hlediska metabolismu se jedná o fotoautotrofní, výjimečně o mixotrofní organismy (Pouličková a Jurčák, 2001).

Tato obrovská a rozmanitá skupina rostlin je téměř všudypřítomná. Řasy mohou osídlovat sladké vody stejně tak, jako mořské. Ve vodním sloupci se mohou nacházet v hloubce až 150 metrů. Existují ovšem i druhy suchozemské, které žijí v půdě, obývají povrchy skal, popřípadě žijí na jiných rostlinách či na zvířatech (Sharma, 1986; Van Den Hoek *et al.*, 1995).

Podle Guiry (2012) je popsáno téměř 44 tisíc druhů řas. Abychom se ovšem dostali k celkovému počtu druhů, musíme připočítat ty dosud nepopsané, čímž se dostáváme na hodnotu přesahující 72 tisíc druhů řas vyskytujících se na Zemi.

Podrobnější charakteristika bude uvedena v jednotlivých podkapitolách týkajících se tohoto tématu. V některých kapitolách mohou být zmíněny i sinice. Tyto organismy jsou z hlediska systému odlišné, ovšem vlastnostmi jsou mnohdy řasám natolik blízké, že mi přišlo vhodné je neopomenout pro komplexnost informací.

2.4.1 Vzhled a morfológická rozmanitost řas

Vzhledem ke skutečnosti, že jsou řasy neobyčejně rozmanitou skupinou, i jejich vzhled je značně různorodý.

Velikost řas se pohybuje od necelých mikrometrů u jednobuněčných mikrořas, až po několik desítek metrů u makrořas. Většina druhů má však mikroskopické rozměry a velmi často jsou takové druhy pouze jednobuněčné (Sharma, 1986). Pouhým okem je tedy možné vidět převážnou část řas jen v jejich mnohabuněčných seskupeních jako zelené či hnědé skvrny na kůře stromů, na kamenech nebo na skalách (Pouličková a Jurčák, 2001). Přesto, že jsou řasy tak drobné, podle Followse (2015) by za 90 dní pokryly celý povrch Země v případě, že by se jejich buňky každý den dvakrát zvětšily.

Součástí buněk řas mohou být různé specifické struktury, mezi které patří především bičíky, pulzující vakuola či stigma (Fritsch, 1948). Bičíky jsou bílkovinné útvary, které slouží buňce k pohybu. Vyrůstají z bazálních tělísek situovaných na povrchu protoplastu. Bičíky mohou být umístěny na buňce apikálně nebo laterálně a v případě, že jich vyrůstá více z jednoho bazálního tělíska, mohou být stejnoměrné nebo nestejnoměrné (Sharma, 1986). Stažitelná vakuola a stigma bývají přítomny také u pohyblivých druhů a slouží k vyrovnávání koncentračního spádu mezi buňkou a prostředím. Stigma neboli světločivná skvrna se obvykle nachází na frontální straně buňky a jeví se jako červená či hnědá tečka (Fritsch, 1948; Pouličková a Jurčák, 2001).

Důležitým poznávacím znakem je tvar buněk a těla řas. Existuje několik typů rostlinného těla neboli stélky. V případě jednobuněčných řas se mohou vyskytovat čtyři základní typy stélky. Monadoidní stélka bičíkovců má typický kapkovitý tvar a obsahuje stigma i pulzující vakuolu. Rhizopoidní stélka měňavek je specifická výskytem panožek. U kapsální stélky jsou buňky obaleny ve slizu a velmi se podobají bičíkovcům. Řasy s kokální stélkou často tvoří kolonie popřípadě cenobia. Mnohabuněčné řasy mohou mít vláknitou neboli trichální stélku, která se může a nemusí dále větvit. Velmi podobná je pletivná stélka, která je vývojově dokonalejší. U sifonkladální stélky sestává tělo z mnohojaderných buněk a u sifonální stélky pouze z jedné velké mnohojaderné buňky (Pouličková a Jurčák, 2001).

Morfologie jednotlivých druhů řas odpovídá podmínkám životního prostředí, ve kterém se vyskytují (Margalef, 1978). Kromě toho, že pomocí morfológických znaků můžeme pozorovat sezónní vlivy na buňku, stejným způsobem signalizuje vzhled řas také odchylky od normálu a narušení kvality životního prostředí. Na základě

různorodosti vzhledu řas byla také sestavena fylogenetická klasifikace těchto organismů (Naselli-Flores *et al.*, 2007). Pro řasy je také velmi důležitá velikost v tom smyslu, že čím jsou řasy menší, tím mají vyšší poměr povrch/objem. Co nejmenší velikost je tedy výhodou, jelikož se stoupající hodnotou zmíněného poměru vzrůstá efektivita fotosyntézy a zvyšuje se příjem živin na jednotku objemu (Morabito, 2007). V přirozených podmínkách zároveň druhy o různém tvaru a velikosti buněk kompetují o zisk těchto živin. Zajímavé je, že pokud jsou buňky kulovité, mají lepší konkurenceschopnost v případě, že jsou malé. Naopak u protáhlých buněk jsou v zisku živin úspěšnější buňky velké (Grower, 1989).

Řasy se kromě své stavby také výrazně odlišují svým zbarvením, které je dáno obsahem fotosyntetických barviv (Pouličková a Jurčák, 2001). Tato barviva jsou uložena v plastidech, konkrétně v chloroplastech, u kterých rozlišujeme tři linie. První linií jsou nejprimitivnější plastidy u skupiny řas *Glaucophyta*. Druhá – červená linie zahrnuje rhodoplasty červených řas a poslední linie dala vznik plastidům zelených řas z říše *Plantae* (Wise, 2006). Podle obsahu barviv je možné rozlišit jednotlivá oddělení či třídy řas, jelikož pouze chlorofyl *a* je univerzální pro všechny druhy. Chlorofyl *b*, *c*, *d*, fykobiliny, xantofyly či karotenoidy jsou speciální pro určité skupiny řas a udávají jejich výsledný odstín (Pouličková a Jurčák, 2001; Tab. 4). Pro barvu rostlin a obsah fotosyntetických barviv je ovšem velmi důležitá intenzita světla. Studie Pizarra a Stange (2009) prokázala, že světlo indukuje v rostlinách expresi genu pro syntézu karotenoidů, a že je tato syntéza vysoce regulována. Velmi zajímavé chování vykazují sinice, u kterých se v závislosti na světelných podmínkách mění poměr fotosyntetických barviv. Tento jev byl nazván jako komplementární chromatická adaptace. Důležité je také zmínit, že teplota nemá na barvu buněk vliv (Sargent 1934).

Tab. 4 Charakteristika některých skupin řas (převzato a upraveno z Pouličková a Jurčák, 2001)

Oddělení	Chlorofyl	Přídavná barviva zvláštního významu	Specifická barva buněk
Sinice	a	Fykocyanin, fykoerytrin	Modrozelená
Ruduchy	a, d	Fykocyanin, fykoerytrin	Červená
Skrytěnky	a, c	Fykocyanin, fykoerytrin	
Obrněnky	a, c	Fykocyanin, fykoerytrin, peridinin	
Hnědé řasy	a, c	Fukoxantin	Hnědožlutá
Krásnoočka	a, b		
Zelené řasy	a, b		Zelená

2.4.2 Rozmnožování řas

U řas jsou známy dva základní typy rozmnožování – pohlavní a nepohlavní. Ačkoliv je většinou chápáno pouze jako speciální druh rozmnožování nepohlavního, často se jako třetí typ vymezuje také rozmnožování vegetativní.

Jako vegetativní označujeme takové procesy množení buněk, při nichž se části rostlinného těla rozdělí za vzniku nových buněk, aniž by byly patrné jakékoliv změny v protoplastech (Fritsch, 1948). Nové buňky jsou tedy identické s buňkami původními – vznikají klony. Nejznámějším případem tohoto typu dělení je fragmentace, kdy se vlákna či kolonie rozpadnou na kratší úseky – fragmenty, které jsou schopné se vyvinout v nové jedince. Dalším typem vegetativního rozmnožování je vznik akinet, což jsou nepohyblivé silnostěnné buňky schopné přečkat nepříznivá období. Známa je také tvorba hormogonií – krátkých pohyblivých vláken, prosté dělení mateřské buňky na dvě dceřiné a tvorba adventivních stélek známá u hnědých řas (Fritsch, 1948; Sharma, 1986).

U nepohlavního rozmnožování se z buňky uvolní protoplast, ze kterého následně vzniká nový jedinec. Nejčastěji se tak děje díky vzniku různých typů spor jako například zoospor, autospor, aplanospor, synzoospor, hypnospor, auxospor, carpospor, teraspor, či cyst (Sharma, 1986). Nejčastější jsou zoospory pohyblivé, připomínající bičíkovce. Autospory jsou naopak nepohyblivé zmenšené kopie mateřské buňky (Pouličková a Jurčák, 2001). Synzoospory jsou zajímavé tím, že jsou mnohojaderné a mnohobičíkaté. Aplanospory jsou tenkostěnné, nepohyblivé zoospory a hypnospory jsou tlustostěnné aplanospory (Sharma, 1986).

Principem pohlavního rozmnožování je splynutí dvou buněk za vytvoření zygoty. Nejjednodušším způsobem tohoto typu rozmnožování je hologamie, u které se jedná o splývání vegetativních buněk. Pokud splývají specializované gamety, může docházet buď k izogamii, nebo anizogamii podle toho, zda jsou, nebo nejsou buňky velikostně a tvarově srovnatelné. Oogamie nastává v případě splynutí nepohyblivé, velké vaječné buňky s menší, pohyblivou buňkou spermatickou.

Většina řas ovšem není vyhraněna pouze určitým typem rozmnožování – během životního cyklu se buňky mohou až na výjimky množit jak pohlavně, tak nepohlavně. S tímto faktem souvisí skutečnost, že máme tři typy životních cyklů. Prvním typem je zygotický, kde převládá haploidní fáze a druhým typem je gametický, kde jsou buňky řas po většinu cyklu diploidní.

Třetím typem cyklu je rodozměna, která se vyskytuje u nejvyspělejších řas a dochází při ní ke střídání pohlavní a nepohlavní generace – gametofytu a sporofytu (Pouličková a Jurčák, 2001).

2.4.3 Kultivace řas

V dnešní době máme mnoho různých možností, jak kultivovat řasy. Pokud je řasa pěstována v laboratoři, účelem bývá její studium, popřípadě izolace určité látky z buněčné kultury. Pro zemědělství a další odvětví průmyslu je ovšem třeba pěstovat řasy ve velkém. K tomuto účelu slouží nejrůznější druhy bioreaktorů nebo otevřené plochy rybníků a nádrží.

Laboratorní kultivace je klíčová pro taxonomické určení mnohých druhů, sledování buněčného cyklu a mnohé fyziologické a biochemické pokusy. Při studiu je však třeba brát v potaz, že vytržení buněk z jejich přirozeného prostředí a umístění do uměle udržovaných podmínek může mít vliv na jejich velikost i tvar. Samotné kultivaci předchází odebrání kultury a zajištění její čistoty. Jednodruhová populace řas je velmi vzácná, proto je třeba za pomoci mikroskopu vyselektovat pouze druh, o který máme zájem a zbavit jej kontaminace. Veškerá manipulace vyžaduje zachování sterility prostředí a všech nástrojů. Řasy se dále kultivují ve zkumavce nebo Erlenmeyerově baňce s živnou půdou či roztokem. Kulturu je vhodné přeočkovat po 4 – 8 týdnech. Při potřebě většího množství biomasy je vhodné buněčnou suspenzi mechanicky promíchávat na třepačce, popřípadě probublávat přes filtr vzduchem (Hindák, 1978).

Mezi nejdůležitější parametry regulace růstu řas patří množství a kvalita živin, světlo, pH, teplota a obsah solí. Zobecněné optimální hodnoty těchto parametrů jsou uvedeny níže (Tab. 5). Důležité je zmínit, že jednotlivé faktory spolu souvisí a navzájem se tak ovlivňují (Dhert, 1996). Při kultivaci se v buňce odehrávají chemické reakce a fyzikální děje, přičemž se buňka množí a roste. Produkty metabolismu, které organismus nevyužívá, přecházejí do kultivačního roztoku (Hanika, 1997).

Tab. 5 Optimální hodnoty hlavních parametrů regulace růstu řas (převzato a upraveno z Dhert, 1996)

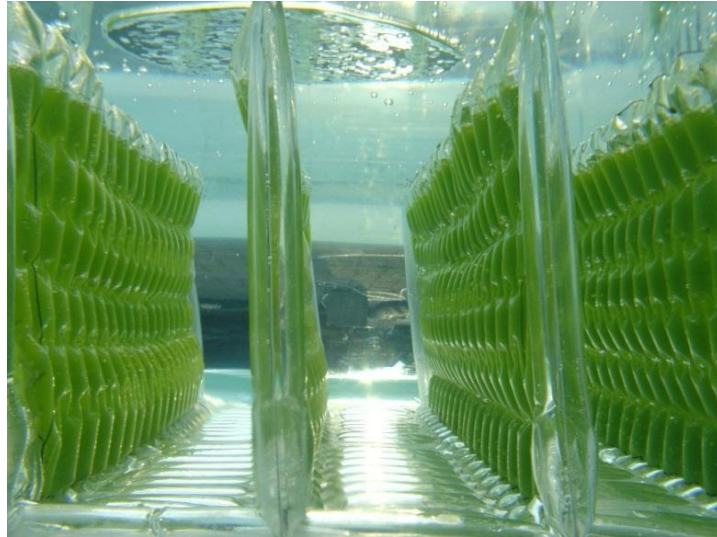
Parametr	Rozmezí	Optimum
Teplota (°C)	16-27	18-24
Obsah solí (g.l ⁻¹)	12-40	20-24
Intenzita světla (lux)	1000-10 000	2500-5000
Fotoperioda (světlo:tma, hod)		16:8 (minimum) 24:0 (maximum)
pH	7-9	8,2-8,7

Pro průmyslové pěstování řas jsou dnes využívány především čtyři kultivační systémy. Prvním z nich je kultivace v přirozeném prostředí rybníků a náhonů. Jde rozhodně o nejrozšířenější způsob pěstování řas a to především pro jeho nízké náklady. Jelikož jde ale o otevřený systém, je těžké udržet stálé podmínky pro růst. Problémem je především nerovnoměrný přísun světla napříč vodním sloupcem. Velkou nevýhodou je také náchylnost k infekcím. Tento způsob kultivace je tedy nejméně efektivní.

V jednovrstvých a horizontálních trubkových reaktorech už je zajištěn uzavřený systém. Produktivita těchto zařízení je již mnohem vyšší. Na rozdíl od otevřeného systému je zde problém spíše vysoká intenzita světla na povrchu trubek, což negativně ovlivňuje růst a relativně vysoká energetická náročnost, která souvisí s vyššími provozními náklady.

Velmi podobným kultivačním systémem jsou trojrozměrné trubkové reaktory. Jejich výhodou oproti jednovrstvým trubkovým reaktorům je, že trubice jsou uspořádány pod sebou a díky vzájemnému stínění netrpí řasy přílišnou světelnou intenzitou. Díky této konstrukci jsou tyto reaktory také mnohem lépe prostorově řešeny.

Posledním typem kultivačního systému je plochý deskový reaktor (Obr. 4). Uspořádání tohoto systému je oproti jiným lepší v tom, že se zde na rozdíl od trubkových reaktorů neakumuluje toxický kyslík a světlená intenzita je optimální. Nevýhodou zůstávají vysoké náklady na provoz. Rozhodně jde ovšem o nejvýhodnější kultivační systém z hlediska produktivity biomasy (Wolkers *et al*, 2011).



Obr. 4 Varianta deskového reaktoru (převzato z Wolkers *et al.*, 2011).

2.4.4 Využití řas

Řasy dnes patří mezi organismy, které nacházejí obrovské využití v řadě odvětví průmyslu. Jejich velká výhoda tkví v tom, že mohou být úspěšně pěstovány i v lokalitách, kde nejsou vhodné zemědělské podmínky. Výzkum řas je také velmi úspěšný – v posledních letech v nich bylo objeveno více než 15 000 nových chemických látek.

Díky vysokému obsahu proteinů, antioxidantů, škrobu, barviv a olejů se staly velmi důležitým materiálem pro potravinářský i chemický průmysl. Pro vysoký obsah omega 3 a omega 6 mastných kyselin mohou být řasy nejen chutnou, ale také velmi zdravou potravinou. Za jeden rok se pro tyto účely vyprodukuje 5000 tun řas (Wolkers *et al.*, 2011).

Velmi aktuálním tématem je využití řas jako zdroje biopaliva. Pro tento účel jsou důležité především oleje a škroby, které lze z řas získat. Využíváním biopaliva z řas by se snížila emise oxidu uhličitého až o 50-70 % oproti ropným palivům, což by bylo velmi výhodné především pro zlepšení kvality ovzduší (Ranjitha a Vijayalakshmi, 2015).

V neposlední řadě nacházejí řasy využití jako bio hnojiva. Zatím jsou tímto způsobem využívány hlavně sinice, které jsou schopny fixovat vzdušný dusík a poskytovat jej rostlině, se kterou žijí v symbióze. Polysacharidy řas hrají důležitou roli při stabilizaci půdy, jelikož agregují půdní částice. S tím souvisí také snížená eroze půdy, lepší provzdušňování, rozvoj kořenového systému rostlin a zvýšení jejich výnosů.

Použití koncentráту z mořských řas na plodiny má zase pozitivní vliv na klíčení semen, odolnost proti mrazu, plísním, hmyzu a zvyšuje příjem živin (Metting *et al.*, 1990).

Navzdory všem výhodám řas pro průmysl je nutno nezavírat oči před problémem, který by vznikl při jejich masovém používání jako hnojiva a zdroje pro výrobu biopaliva. Tímto problémem je eutrofizace. Pokud by byla veškerá nafta v evropských zemích nahrazena biopalivem z řas, je pravděpodobné, že by se v roce 2050 do evropských moří dostávalo až o 40 % více dusíku a fosforu, než tomu bylo v roce 2000. V řekách by se množství dusíku a fosforu dokonce zdvojnásobilo. Tomuto devastujícímu efektu na životní prostředí by se však dalo zabránit, pokud by byl zajištěn co nejlépe uzavřený systém při kultivaci řas a dostatečně účinné čištění odpadních vod (Blaaz a Kroeze., 2014).

2.5 Zelené řasy

Zelené řasy neboli *Chlorophyta* (v širším smyslu) je poměrně velké oddělení řas. Známe u něj totiž přibližně 8000 popsanych druhů a odhaduje se, že dalších 5000 druhů dosud není popsáno (Guiry, 2012). Pro zelené řasy je charakteristická přítomnost škrobu jako zásobní látky a obsah chlorofylů *a* a *b*. Tato fotosyntetická barviva jsou uložena v plastidech ohraničených dvojitou membránou, což napovídá, že zelené řasy jsou fotosyntetizující eukaryotické organismy. Mezi přídatná barviva patří karoten a xantofyly. Specifická je také přítomnost unikátní hvězdicové struktury, která spojuje devět párů mikrotubulí na bázi bičíků (Lewis a McCourt, 2004). Buněčná stěna je obvykle složená z celulosy (Graham a Wilcox, 2000).

Systém řas se v posledních letech velmi rychle mění díky dokonalejším technologiím, což ovšem vede k mnohým nejasnostem a neucelenosti celé taxonomie (de Clerk *et al.*, 2013). V této práci bude systém popsán dle Leliaerta *et al.* (2011). Zelené řasy v širokém slova smyslu se dělí na dvě vývojové linie – *Chlorophyta* (v užším smyslu) a *Streptophyta*.

Linie *Chlorophyta* je velmi rozmanitou skupinou zelených řas, které jsou součástí planktonu v oceánech, ale zároveň se vyskytují i na pobřežích a ve sladkých vodách. U jednotlivých zástupců se také dosti liší i životní cykly, fyziologické vlastnosti či stavba těla (Leliaert *et al.*, 2012). Tato linie se dělí na pět tříd. První z nich jsou *Prasinophytes*, což jsou jednobuněčné mořské řasy. *Prasinophytes* daly vznik skupině čtyř dalších tříd – *Chlorodendrophyceae*, *Ulvophyceae*, *Trebouxiceae* a *Chlorophyceae*,

přičemž poslední tři jmenované jsou hlavní (Leliaert *et al.*, 2012; Leliaert *et al.*, 2011). Mezi *Trebouxiceae* patří řasy pohyblivé i nepohyblivé, vodní i vzdušné. Často tvoří lišejníky díky symbióze s houbou (Friedl a Budel, 1996; Friedl a Bhattacharya, 2002). *Ulvophyceae* je třída mořských, sladkovodních i vzdušných řas, které najdeme ve stojatých i tekoucích vodách. *Chlorophyceae* neboli zelenivky bývají obvykle součástí planktonu stojatých vod a mají buněčnou či vláknitou stélku a vyskytují se u nich všechny tři základní typy rozmnožování (Pouličková a Jurčák, 2001).

Mezi *Streptophyta* patří naopak především sladkovodní druhy a druhy rostoucí na vlhkých pozemních stanovištích (McCourt *et al.*, 2004). Nejdůležitější třídou této linie z hlediska evoluce jsou *Charophyta*. Buňky těchto řas jsou schopné asymetrického dělení a diferenciace, mezi buňkami jsou plasmodesmata a jsou přítomny enzymy, které u jiných zelených řas chybí. V rostlinách se odehrávají specifické buněčné a biochemické procesy, které u jiných řas chybí (Graham *et al.*, 2000). Důsledkem těchto vlastností *Charophyt* došlo před 476-432 miliony let, při expanzi této třídy řas na souš, ke vzniku suchozemských rostlin (McCourt *et al.*, 2004).

2.6 *Protococcus viridis*

Pro rod *Protococcus* je možno použít český ekvivalent „zrněnka“ (Pouličková a Jurčák, 2001). Podle G. M. Smitha se jedná o nejznámější zelenou řasu na světě (Laundon, 1985). Kvůli stále se měnící a vyvíjející nomenklatuře je dnes možné najít zrněnku také pod názvy *Pleurococcus vulgaris*, *Pleurococcus viridis*, *Pleurococcus naegeli*, *Desmococcus olivaceus*, *Desmococcus viris*, popřípadě *Apatococcus lobatus* (Laundon, 1985; Pouličková a Jurčák, 2001). Původní název je ovšem právě *Protococcus viridis* a pochází z roku 1824, kdy byl tento kmen pojmenován a popsán C. S. Agardhem (Agardh, 1824). Po roce 1842 se stalo preferovaným označení *Pleurococcus*, které ovšem zahrnuje kromě zelených řas také řasy modro-zelené a ty patří mezi sinice. Pojmenovávání jednoho rodu tedy může být v případě řas dost zavádějící a je nutné znát původ jednotlivých názvů (Bessey, 1914).

Protococcus viridis je typická svou zelenou barvou, způsobenou přítomností chlorofylu a buňkami ve tvaru kuliček (Obr. 5; Agardh, 1824). Tyto buňky nejsou příliš velké, v průměru mají pouze okolo 5-14 µm. Málodky se vyskytují jednotlivě, častěji tvoří shluky. Ty mohou být tetradové připomínající balíčky, popřípadě vláknité bez slizu připomínající korálky na niti. Chloroplasty mohou být přítomny v počtu 1-4, jsou

přístěnné, diskovité až deskovité. Další vlastností zrněnky je, že obsahuje drobný pyrenoid, což je bílkovinné tělísko, které jiným řasám slouží k fixaci oxidu uhličitého při fotosyntéze za pomoci enzymu RUBISCO (Hindák, 1978; Rosypal, 2003).

Zrněnka je aerofytická neboli vzdušná řasa, což znamená, že žije mimo vodní prostředí (Pouličková a Jurčák, 2001). Nejčastěji tvoří povlaky na kůře stromů na skalách, kamenech, na starých plotech, ale může se vyskytovat i v pobřežním pásu vod, kde světlo prochází až na dno (Hindák, 1978). Obecně ale patří mezi řasy, které rostou na relativně suchých stanovištích (Ohba a Tsujimoto, 1996). Rozmnožování je u tohoto druhu pouze nepohlavní a probíhá dělením buněk na dvě části ve dvou až třech rovinách (Hindák, 1978).

2.7 *Chlorella sorokiniana*

Chlorella sorokiniana je jediný platný název zelené řasy, která nese své jméno po Dr. Sorokianovi, který ji poprvé izoloval v roce 1951. Její buňky jsou velmi malé, vegetativní buňky dosahují průměru 3,5 - 4,5 μm a spory bývají v průměru velké 2-3 μm . Pokud roste řasa v prostředí obohaceném o glukosu, mohou buňky dosahovat až 5,5 μm . Chromatofory, což jsou buňky obsahující barevné pigmenty, jsou miskového tvaru a obvykle jsou zbarveny sytě zeleně. Ve starých kulturách, v médiu bohatém na anorganické látky či glukosu, se však zelená barva mění na bílou. V buňkách je přítomen také pyrenoid. *Chlorella sorokiniana* se množí velice rychle – při teplotě 39 °C se dokáže dělit až devětkrát za den a roste velmi dobře na agaru bez přítomnosti organických živin, popřípadě v tekutém živném médiu obohaceném o látky anorganické (Shihira a Krauss, 1965). Tato řasa je primárně sladkovodní, může však růst i na pevném podkladu (Yoshida *et al.*, 2006; Chader *et al.*, 2011).

Zajímavostí a jistou výhodou této řasy je, že je velmi odolná k vysokým teplotám a je schopná odolat i extrémně vysoké světelné intenzitě (podmínkám jako na poušti). Tento rod *Chlorella* dokáže také velmi účinně eliminovat amoniak z odpadních vod (de Bashan *et al.*, 2008). Vzhledem k tomu, že je tato řasa také významným zdrojem antioxidantů, je hojně využívána v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu (Matsukawa *et al.*, 2000).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Alkalická fosfatasa 1u/μl (Fermentas, USA)
Amoniak (Merck, USA)
DEAE Sephadex A-25 (GE Healthcare, Švédsko)
Diethylpyrokarbonát (Sigma-Aldrich, USA)
Dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Lachner, ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachner, ČR)
Dusičnan sodný (Lachner, ČR)
Fenolový roztok, pH 8 (Sigma-Aldrich, USA)
GeneRuler™ DNA Ladder 1kb (Thermo Fisher Scientific, USA)
Heptahydrát síranu hořečnatého
Heptahydrát síranu zinečnatého (Lachner, ČR)
Heptahydrát síranu železnatého (Lachner, ČR)
Hexahydrát dusičnanu kobaltnatého (Lachner ČR)
Hexahydrát chloridu vápenatého (Lachner, ČR)
Hydrogenfosforečnan draselný (Lachner, ČR)
Hydroxid draselný (Lachner ČR)
Chlorid sodný (Lachner, ČR)
Chloroform (Lachner, ČR)
Kyselina boritá (Lachner, ČR)
Kyselina chlorovodíková (Lachner, ČR)
Kyselina mravenčí (PanReac AppliChem, Německo)
Kyselina octová (Lachner, ČR)
Kyselina sírová (Lachner, ČR)
Methanol (Lachner, ČR)
Methanol pro HPLC (Lachner, ČR)
m-kresol (Sigma-Aldrich, USA)
Octan draselný (Lachner, ČR)
Octan sodný (Lachner, ČR)
Pentahydrát síranu měďnatého (Penta s. r. o., ČR)

Tetrahydrát chloridu manganatého (Lachner ČR)

Tris (Sigma-Aldrich, USA)

Tris-acetát-EDTA pufr, 50x koncentrovaný (VWR International, USA)

Standardy cytokininů (Olchemin, ČR)

Směsi chemikálií

Bieleskiho extrakční pufr:	60 % MeOH
	25 % CHCl ₃
	10 % H ₂ O
	5 % HCOOH
SCX ekvilibrační roztok:	50 % MeOH
	2 % HCOOH
SCX eluční roztok:	60 % MeOH
	40 % NH ₄ OH o c = 4 mol.l ⁻¹
C18 eluční roztok:	80 % MeOH
	2 % CH ₃ COOH
C18 eluční roztok:	80 % MeOH
	2 % HCOOH

3.1.2 Biologický materiál

Pro experimentální část mé práce byla použita suspenzní buněčná kultura řasy *Chlorella sorokiniana*, kterou poskytl Prof. Dr. Vince Ördög, CSc., University of West Hungary – Faculty of Agricultural and Food Sciences.

Dále byla mikroskopována buněčná kultura řasy *Protococcus viridis*, zakoupená od Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), Scottish Marine institute, UK. Ta však nebyla kultivována z důvodu kontaminace.

3.1.3 Použité přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy XA 110/2x (Radwag, Polsko)

Centrifuga Jouan BR4i (Thermo Electron Corporation, USA)

Centrifuga Microspin 12 (Biosan, Litva)

Digitální fotoaparát Olympus E-410 (Olympus, Japonsko)

Flow box Safe Fast Elite (Faster, Itálie)

Gel Doc EZ systém (Bio Rad, USA)
LC-MS systém LC-MS-8050 (Shimadzu, Japonsko)
Magnetická míchačka MSH-300 (Biosan, Litva)
Mikroskop Axio Imager (Zeiss, Německo)
Mikroskop Primo Star (Zeiss, Německo)
Mikroskop BA 316 PC (Intraco Micro, ČR)
Orbital shaker – Inkubátor ES-20 (Biosan, Litva)
Oscilační kulový mlýn MM301 (Retsch, Německo)
pH metr CX505 (Elmetron, Polsko)
Předvážky Adventurer Pro AV 213 C (Ohaus, Švýcarsko)
Rotační vakuová odparka (Labconco, USA)
Rotátor Multi Bio RS-24 (Biosan, Litva)
Sada pipet Eppendorf Research (Eppendorf, Německo)
SPE kolony Bond Elut C18, 100 mg (Agilent Technologies)
SPE kolony Mega Bond Elut-SCX, 1g (Agilent Technologies)
SPE kolony Sep-Pak tC18, 1g (Waters, USA)
Spektrofotometr DS-11 (DeNovix, USA)
Total Recovery vialky (Waters, USA)
Třepačka SM-30 (Edmund Bühler GmbH, Německo)
Třepačka Vortex V-1 Plus (Biosan, Litva)
Ultrazvuková čistička Bandelin-Sonorex Digitec (Bandelin electronic, Německo)
Vakuová odparka se zahřívací lázní B-490 (BÜCHI Labortechnik AG, Švýcarsko)
Vakuový koncentrátor Concentrator plus (Eppendorf, Německo)

3.2 Metody

3.2.1 Determinace buněčných kultur řas

Před začátkem kultivace bylo nutné ověřit, zda první obdržená kultura odpovídá řase *Chlorella sorokiniana*. Bylo tedy zapotřebí řasu identifikovat. Při determinaci bylo důležité správně určit klíčové morfologické znaky a zaměřit se na životní cyklus řasy. Získané informace bylo třeba porovnat s klíčem k určování řas, který byl k dohledání v odborné literatuře (Komárek a Fott, 1983). Mezi hlavní znaky, díky kterým bylo možné řasu determinovat, patřily velikost a tvar buněk, velikost chloroplastu, přítomnost a počet pyrenoidů a přítomnost a počet škrobových zrn.

Pro stanovení klíčových znaků řasy byl použit binokulární mikroskop PrimoStar od firmy Zeiss. Kultura byla pozorována při celkovém zvětšení 1000x.

Pomocí mikroskopu Axio Imager od firmy Zeiss s vestavěnou HRc kamerou a nastavením objektivu 100x/1,46 NA byly vyhotoveny snímky kultury řasy. Pro dosažení lepšího kontrastu byla využita DIC mikroskopie (Differential interference contrast microscopy) s tzv. Nomarskiho kontrastem.

V případě druhé kultury řasy bylo ověřováno, zda se jedná o kulturu *Protococcus viridis*. Obdobně jako v případě kultury *C. sorokiniana* byly pozorovány charakteristické znaky této řasy, které byly porovnány s odbornou literaturou (Komárek a Fott, 1983).

Z důvodu technického selhání nemohly být pro determinaci *P. viridis* použity stejné přístroje, jako pro pozorování *Chlorelly*. K pozorování buněk a následnému vyhotovení snímků byl tedy použit binokulární mikroskop BA 316 PC (Intraco Micro) s kamerou Olympus E-410. Kultura byla pozorována při celkovém zvětšení 1000x.

3.2.2 Příprava tekutého živného média pro kultivaci

Pro kultivaci biologického materiálu bylo použito BBM médium (Bold's Basal Medium). Před každým pasážováním bylo toto médium připraveno čerstvé z deseti zásobních roztoků, jejichž složení je popsáno v níže uvedené tabulce (Tab. 6).

Tab. 6 Složení kultivačního BBM média

Složka		Zásobní roztok (200 ml)	Dávkování do média (ml/l média)
NaNO ₃		50 g	1
CaCl ₂ .2H ₂ O		5 g	1
MgSO ₄ .7H ₂ O		15 g	1
K ₂ HPO ₄		15 g	1
KH ₂ PO ₄		35 g	1
NaCl		5 g	1
H ₃ BO ₃		2,284 g	1
EDTA		10 g	1
KOH		6,2 g	1
FeSO ₄ .7H ₂ O		0,996 g	1
H ₂ SO ₄ (konc.)		0,2 ml	1
Mikroelementy	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,764 g	1
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,288 g	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,314 g	
	Co(NO ₃) ₂ .6 H ₂ O	0,098 g	

3.2.3 Kultivace řasy *Chlorella sorokiniana*

V prvním kroku kultivace byla původní kultura za sterilních podmínek přepasážována do čtyř 250 ml Erlenmeyerových baněk pomocí skleněných Pasteurových pipet. Tyto předem připravené baňky byly naplněny přibližně do $\frac{3}{4}$ svého objemu BBM médiem a následně byly autoklávovány. Hrdla baněk byla ucpána zátkami z buničité vaty. Následně byly baňky s kulturou umístěny do kultivační místnosti (Obr. 5). Zde byl nastaven světelný režim 16 h den/8 h noc (dlouhý den) a teplota odpovídala 17 °C. Kultury řas byly promíchávány na třepačce, aby nedocházelo k přilnutí řasy na sklo a jejímu následnému stresování. Pasážování bylo prováděno po dvou měsících, přičemž byla vždy rozpasážována jedna celá 250 ml baňka staré kultury do šesti 100 ml Erlenmeyerových baněk a šesti 250 ml Erlenmeyerových baněk.



Obr. 5 Kultivace řasy *Chlorella sorokiniana*.

3.2.4 Příprava suspenzní buněčné kultury na extrakci a purifikaci.

Aby mohla být kultura sklizena, bylo nejprve zapotřebí rozdělit suspenzní buněčnou kulturu na buněčný podíl a kultivační médium. K tomuto kroku bylo použito pět 250 ml Erlenmeyerových baněk a pět 100 ml Erlenmeyerových baněk se suspenzní buněčnou kulturou, jejíž kultivace probíhala po dobu dvou měsíců. Objem kultury ve 250 ml baňkách činil 200 ml a objem kultury ve 100 ml baňkách činil 80 ml. Dohromady bylo tedy zpracováno 1400 ml buněčné kultury řasy. Poté, co se buněčný podíl v jednotlivých baňkách usadil na dno, bylo co největší možné množství média opatrně odlito do připravené plastové nádoby. Zbýlé množství kultury v médiu bylo rozděleno do 50 ml plastových falkon. V nich byla následně kultura stočena na centrifuze při 18670 g po dobu 15 minut a při teplotě 23 °C. Po opatrném odlití supernatantu byl buněčný pelet zamrazen.

3.2.5 SPE purifikace cytokininů z kultivačního média

Před samotnou purifikací CK z média bylo zapotřebí ověřit, jestli po nanesení 10 ml média jako vzorku nebude překročena kapacita kolony. 100 ml média bylo tedy umístěno ve varné baňce na rotační odparku se zahřívací lázní, kde docházelo

k odpaření média při teplotě 50 °C a tlaku 35 mbar. Po odpaření kapaliny byla z baňky pomocí dusíku odstraněna vzdušná vlhkost a odparek byl zvážen.

Pro purifikaci byly použity kolony Sep-Pak tC18, 1 g (Waters, USA). Nejprve byl sorbent kolony aktivován 5 ml methanolu. Následovala ekvilibrace sorbentu pomocí 5 ml destilované vody. Poté byl na kolonu nanesen vzorek, který představovalo 10 ml média. Pro odstranění obsažených nečistot byly kolony promyty 10 ml destilované vody. Nakonec byly vzorky eluovány 5 ml roztoku eluce C18 (80 % MeOH, 2 % CH₃COOH) do připravených zkumavek. Závěrem eluce byl lehce zvýšen tlak ve vakuové komůrce a sorbent se nechal vysušit do sucha. Během purifikace bylo naopak nutné dbát, aby sorbent nevyschl. Rychlost průtoku kolonou při všech fázích purifikace byla udržována na jedné kapce za sekundu.

Po purifikaci byly eluáty ve zkumavkách odpařeny do sucha na rotační vakuové odparce. Následně byly zkumavky s odparky ponechány v mrazicím boxu při -20 °C až do doby dalšího zpracování.

3.2.6 Extrakce cytokininů z buněk řasy *Chlorella sorokiniana*

K buněčnému peletu v plastových falkonách byl přidán 1 ml Bieleskiho extrakčního roztoku (60 % MeOH, 25 % CHCl₃, 5 % HCOOH, 10 % H₂O). Následně byl buněčný pelet v extrakčním pufru přepipetován do plastových mikrozkušavek. Poté, co byla do mikrozkušavek vložena vždy jedna mlecí kulička, byl buněčný materiál homogenizován po dobu 4 minut na kulovém oscilačním mlýnu při frekvenci 25 Hz. Zhomogenizovaný materiál byl uložen na 24 hodin do mrazicího boxu (-20 °C). Další den byly vzorky zvortexovány a opět umístěny do mrazicího boxu na jednu hodinu. Po uplynutí této doby bylo do mikrozkušavek přidáno 300 µl ekvilibračního SCX roztoku (50 % MeOH, 2 % HCOOH). Vzorky byly stočeny na centrifuze při 12400 g na 15 minut při teplotě 4 °C. Supernatant ze všech mikrozkušavek (celkem 12) byl převeden do dvou centrifugačních zkumavek, ve kterých byl tento supernatant opět stočen na centrifuze při 18670 g na 10 minut při teplotě 4 °C. Takto získaný výsledný Supernatant byl již připraven na SPE purifikaci.

3.2.7 SPE purifikace cytokininů z buněčného extraktu

Pro purifikaci byly použity SPE kolony Mega Bond Elut – SCX, 1 g (Agilent Technologies). Nejprve byl sorbent kolony aktivován 5 ml methanolu a poté ekvilibrován 8 ml roztoku SCX ekvilibrace. V této fázi byl sorbent připraven na nanesení 7,5 ml vzorku, který představoval buněčný extrakt. Následovalo promytí sorbentu 5 ml Bieleškiho pufru a poté dalšími 5 ml methanolu. Když byl touto cestou analyt zachycený na sorbentu zbaven nežádoucích látek, mohl být eluován. K eluci byly použity 4 ml SCX elučního roztoku (60 % MeOH, 40 % NH_3 o $c = 4 \text{ mol.l}^{-1}$). Eluáty, které byly jímány do připravených zkumavek, byly následně odpařeny do sucha na rotační vakuové odparce. Odparky byly ponechány v mrazicím boxu až do doby dalšího zpracování.

3.2.8 Přečištění vzorků z média a buněk pomocí DEAE-Sephadexu a kolon C18

Nejprve byl připraven Sephadexový gel. 5 ml tohoto sorbentu uchovávaného v 50% alkoholu bylo na Büchnerově nálevce promyto destilovanou vodou a pufrém mravenčanu amonného o $c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$. Promytý gel byl převrstven dvojnásobným množstvím zmíněného pufru a takto ponechán přes noc. Dalšího dne byly prázdné rezervoáry kolon naplněny 1 ml připraveného DEAE-Sephadexu. Následovalo promytí 4 ml mravenčanu amonného o $c = 1 \text{ mol.l}^{-1}$. V mezičase byly aktivovány 100 mg kolony BondElut C18 (Agilent Technologies). Poté byly kolony C18 přeplněny o nadbytečnou kapku, aby nedocházelo k případnému zavzdušnění adaptéru, pomocí něhož byly ke kolonám C18 připojeny rezervoáry s DEAE-Sephadexem. Obě kolony byly takto naekvilibrovány 10 ml roztoku mravenčanu o $c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$. Následně byl aplikován vzorek, který byl po SPE purifikaci odpařen a pro čištění na Sephadexu opět rozpuštěn ve 4 ml roztoku mravenčanu o $c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$. Poté byly kolony promyty 2 ml destilované vody. Nakonec byly přečištěné frakce eluovány pomocí 4 ml C18 eluce do připravených zkumavek. Eluáty byly odpařeny do sucha na rotační vakuové odparce a odparky již byly připraveny pro LC-MS analýzu.

3.2.9 LC-MS analýza CK ve vzorcích z buněčného extraktu a média

Vzorky získané z buněčného podílu řasy *Chlorella sorokiniana* a jejího kultivačního média BBM byly analyzovány pomocí LC-MS systému Shimadzu-LC-MS-8050. Odpařené vzorky po purifikaci byly nejprve rozpuštěny ve 30 μl mobilní fáze (10 % MeOH v 90% mravenčanu amonného o pH 4) a převedeny do total recovery vialek. Pro analýzu byla použita kolona Acquity C18 UPLC BEH (1,7 μm , 2,1 x 100 μm), která byla termostatována na 40 °C. Analýza trvala 17,5 minut. Dávkováno bylo 10 μl vzorku. Jako mobilní fáze A sloužil 15 mmol.l⁻¹ roztok mravenčanu amonného o pH 4 a jako mobilní fáze B sloužil methanol. Chromatografie probíhala v systému reverzních fází s gradientovou elucí při stálém průtoku mobilní fáze 0,25 ml.min⁻¹, přičemž měnící se poměr mobilních fází v čase je uveden v Tab. 7.

Tab. 7 Průběh gradientové eluce

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0,10	90	10
0,50	90	10
12,00	57	43
15,00	0	100
16,00	0	100
16,50	90	10

Tab. 8 MRM přechody a kolizní energie CK v metodě

Cytokinin	CE (eV)	Přechod m/z
BAP	-23	226,20 > 91,00
BAPR	-22	358,10 > 226,20
<i>m</i> T	-22	242,20 > 107,05
<i>m</i> TR	-21	374,20 > 242,15
<i>o</i> T	-16	242,20 > 136,15
<i>o</i> TR	-30	374,20 > 136,15
MeoT	-33	256,20 > 90,25
D-BAP	-24	233,20 > 98,10
D-BAPR	-21	365,10 > 233,20
15N- <i>o</i> T	-16	246,15 > 140,05
15N- <i>p</i> T	-15	246,15 > 140,05
15N-MemT	-21	260,05 > 121,15
15N- <i>m</i> T-9G	-24	408,05 > 246,10
15N- <i>m</i> T-9R	-21	378,05 > 246,10
15N- <i>o</i> T-9G	-31	408,05 > 139,95
15N- <i>o</i> T-9R	-31	378,05 > 140,05
15N- <i>p</i> T-9G	-32	408,05 > 140,05
15N- <i>p</i> T-9R	-30	378,05 > 140,05
<i>i</i> P	-30	204,00 > 119,10
<i>t</i> Z	-17	220,10 > 136,15

Detekce pomocí hmotnostního spektrometru probíhala v MRM módu (multiple reaction monitoring) s ESI+ ionizací. Napětí na kapiláře bylo 4 kV, teplota zdroje 400 °C, teplota desolvatace 250 °C a průtok desolvatačního plynu byl 3 l.min⁻¹. Ve výše uvedené tabulce (Tab. 8) jsou shrnuty MRM přechody a kolizní energie sledovaných cytokininů.

3.2.10 Měření hmotnostního spektra *o*T

Pro potvrzení přítomnosti *o*T ve vzorku získaného z buněčného extraktu bylo změřeno hmotnostní spektrum *o*T v tomto vzorku a pro porovnání také hmotnostní spektrum *o*T standardu o koncentraci 1.10⁻⁷ mol.l⁻¹. 10 µl obou vzorků bylo dávkováno do systému Shimadzu-LC-MS-8050 v mobilní fázi (10 % MeOH v 90% mravenčanu amonného o pH 4). Jako mobilní fáze A byl zvolen 15 mmol.l⁻¹ roztok mravenčanu amonného o pH 4 a jako mobilní fáze B byl zvolen methanol. Chromatografie probíhala v systému reverzních fází s gradientovou elucí (Tab. 7) při stálém průtoku mobilní fáze 0,25 ml.min⁻¹. Doba analýzy byla 17,5 minut. Detekce proběhla v PIS módu (product ion scan) v *m/z* rozmezí 242-70, s kolizní energií -35 V, ionizací ESI+, napětím na kapiláře 4 kV, teplotou zdroje 400 °C, desolvatační teplotou 250 °C a průtokem desolvatačního plynu 3 l.min⁻¹.

3.2.11 Stanovení návratnosti purifikace CK pomocí SPE kolon C18

Pro zjištění návratnosti kolon Sep-Pak tC18, 1 g (Waters, USA) byly přečištěny vzorky stejným způsobem, který je popsán v kapitole 3.2.6, s tím rozdílem, že do média bylo přidáno 30 µl směsi ARCK standardů o koncentraci 1.10⁻⁵ mol.l⁻¹. Pro zhodnocení, zda má biologická matrice vliv na návratnost purifikace, byly dále přečištěny vzorky, ve kterých bylo médium, nanášené spolu se standardem jako vzorek, nahrazeno vodou. Po odpaření byly vzorky rozpuštěny ve 30 µl mobilní fáze (10 % MeOH v 90% mravenčanu amonného o pH 4) a převedeny do total recovery vialek.

Takto byly vzorky připraveny pro koncovou analýzu pomocí LC-MS systému Shimadzu-LC-MS-8050, přičemž byla použita stejná kolona a parametry metody, jako je popsáno v kapitole 3.2.9.. Zároveň byly stejným způsobem analyzovány nepurifikované vzorky ARCK standardů, přičemž v nástřiku bylo obsaženo 100 pmol analytu (stejně jako v případě purifikovaných vzorků).

3.2.12 Izolace tRNA z buněk řasy *Chlorella sorokiniana*

Při izolaci tRNA bylo klíčové vyvarovat se kontaminaci veškerého použitého materiálu a vzorku RNAsami. Veškeré vodné roztoky použité při práci tedy byly připraveny z vody ošetřené inhibítorem RNAsové aktivity – diethylpyrokarbonátem (DEPC), přičemž koncentrace DEPC ve vodě byla 0,1% (v/v). Připravená voda byla přes noc promíchávána a následujícího dne byla autoklávována.

3.2.12.1 Extrakce tRNA z rostlinného materiálu

K izolaci tRNA bylo použito 300 ml suspenzní buněčné kultury řasy, jejíž kultivace probíhala 40 dní. Po usazení buněčného podílu na dno baňky bylo opatrně odlito největší možné množství média. Zbytek kultury byl převeden do 50 ml plastových falkon a v nich stočen na centrifuze při 18670 g na 15 min při 23 °C. Buněčný pelet byl přepipetován do plastových mikrozkušavek, do kterých bylo poté přidáno 500 µl Tris/HCl pufru o pH 7,5. Po přidání mlecí kuličky do každé z mikrozkušavek byly vzorky homogenizovány na oscilačním kulovém mlýnu po dobu 4 minut při frekvenci 25 Hz. Následně bylo do mikrozkušavek napipetováno 500 µl fenolu a 63 µl *m*-kresolu, načež byly vzorky důkladně protřepány na vortexu. Protřepané vzorky byly stočeny na centrifuze při 11520 g na 15 min při teplotě 4 °C. Supernatant byl opatrně přepipetován do čistých mikrozkušavek, kde k nim bylo přidáno 50 µl 20% octanu draselného a 1250 µl ethanolu. Po zvortexování se nechaly vzorky precipitovat přes noc v mrazicím boxu.

Následujícího dne byly vzorky s precipitátem stočeny na centrifuze při 18670 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl odpipetován a pelet na dně zkumavky se nechal volně sušit ve FlowBoxu po dobu 30 minut. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200 µl octanu sodného ($c = 3 \text{ mol.l}^{-1}$) a mikrozkušavky byly umístěny na 6 hodin na horizontální třepačku při teplotě 4 °C. Po uplynutí zmíněné doby byly vzorky zcentrifugovány při 18670 g po dobu 45 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl přepipetován do čistých zkumavek, do kterých bylo poté přidáno 200 µl redestilované vody a 800 µl ethanolu. Po zvortexování byly vzorky ponechány přes noc v mrazicím boxu, aby došlo k precipitaci.

Dalšího dne byl precipitát stočen na centrifuze při 18 670 g na 30 minut při teplotě 4 °C. Po odpipetování supernatantu se nechal pelet volně sušit ve FlowBoxu po dobu

20 minut. Po uplynutí dané doby byl pelet rozpuštěn ve 100 μl redestilované vody. Následně byly vzorky umístěny na 20 minut na horizontální třepačku při 4 °C.

3.2.12.2 UV analýza vzorků tRNA

Na spektrofotometru byl zvolen program pro stanovení koncentrace nukleových kyselin. Nejprve byl na terčík spektrofotometru napipetován 1 μl destilované vody, která sloužila jako blank. Poté byl stejným způsobem napipetován vždy 1 μl vzorku tRNA, přičemž pro každý vzorek bylo měření opakováno 3x.

3.2.12.3 Elektroforéza vzorků tRNA

Jelikož elektroforéza probíhala na agarosovém gelu, bylo nejprve třeba si připravit 1% roztok agarosy v 1x koncentrovaném TAE pufru. Ve 40 ml pufru tedy bylo rozpuštěno 400 μg agarosy. Poté, co byla malá elektroforetická komůrka umístěna do stojánku, bylo na ni naneseo 30 μl ethidium bromidu. Následně byl do komůrky nalit rozehrátý agarosový roztok, který v ní byl promíchán hřebínkem. Po 30 minutách tuhnutí byl připravený gel přenesen do aparatury. Do jamek gelu bylo napipetováno po 5 μl vzorků a markeru smíchaných s 1 μl barvičky. Gel se vyvíjel asi 40 minut při napětí 100 V. Nakonec byl gel přenesen na UV Tray a vyfocen pomocí systému Gel Doc.

3.2.13 Hydrolýza tRNA a defosforylace nukleotidů

Ke zbylým vzorkům tRNA bylo přidáno 30 μl KOH ($c = 2 \text{ mol.l}^{-1}$) a takto byly vzorky ponechány přes noc. Následujícího dne bylo ke vzorkům přidáno 30 μl 10% HClO₄ pro neutralizaci. Vzorky se vzniklou sraženinou byly stočeny na centrifuze při 10000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Poté byl supernatant převeden do čistých mikrozkušavek. Následně bylo třeba defosforylovat nukleotidy z rozložené tRNA. Ke vzorkům bylo přidáno 500 μl NaHCO₃ pufru o pH 9,6. Po zvortexování byl do mikrozkušavek přidán 1 μl alkalické fosfatasy (1U) a takto se vzorky nechaly inkubovat 2 hodiny při 37 °C. Poté bylo ke vzorkům přidáno 2,5 násobné množství ethanolu a vzorky byly stočeny na centrifuze při 9408 g po dobu 10 minut při 4 °C. Supernatant byl převeden do čistých mikrozkušavek a pro následnou purifikaci k němu bylo přidáno 30 μl směsi těžce

značených standardů CK o koncentraci $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ a 1,5 ml mravenčanu amonného o $c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$.

3.2.14 Purifikace CK z tRNA nukleotidů

Pro purifikaci byly použity 100 mg kolony BondElut C18, které byly nejprve aktivovány 2 ml methanolu a ekvilibrovány 4 ml mravenčanu amonného o $c = 10 \text{ mmol.l}^{-1}$. Následně byl aplikován vzorek rozpuštěný v 1,5 ml mravenčanu amonného a stejným množstvím mravenčanu byly zkumavky promyty. Následně byla kolona promyta 2 ml destilované vody. Nakonec byly analyty eluovány z kolony pomocí roztoku C18 eluce (80 % MeOH, 2 % HCOOH) a eluáty byly v připravených zkumavkách odpařeny do sucha pomocí vakuové rotační odparky.

3.2.15 LC-MS analýza CK ve vzorcích získaných z tRNA

Pro koncovou analýzu cytokininů bylo využito LC-MS systému Shimadzu-LC-MS-8050. Odpařené vzorky po purifikaci byly rozpuštěny ve 30 μl mobilní fáze (10 % MeOH, 90% mravenčan amonný o pH 4) a převedeny do total recovery vialek. Pro analýzu byla použita kolona Acquity C18 UPLC BEH (1,7 μm , 2,1 x 100 μm) a zvoleny byly stejné chromatografické podmínky a podmínky detekce na hmotnostním spektrometru, jako při analýze CK v kapitole 3.2.9. s tím rozdílem, že do metody byly vloženy navíc m/z přechody a kolizní energie isoprenoidních cytokininů uvedených v tabulce níže (Tab. 9).

Tab. 9 MRM přechody a kolizní energie dalších isoprenoidních CK přidanych do metody

Cytokinin	CE (eV)	Přechod m/z
cZR	-18	352,30 > 220,20
iPR	-20	336,30 > 204,20
tZR	-18	352,3 > 220,20

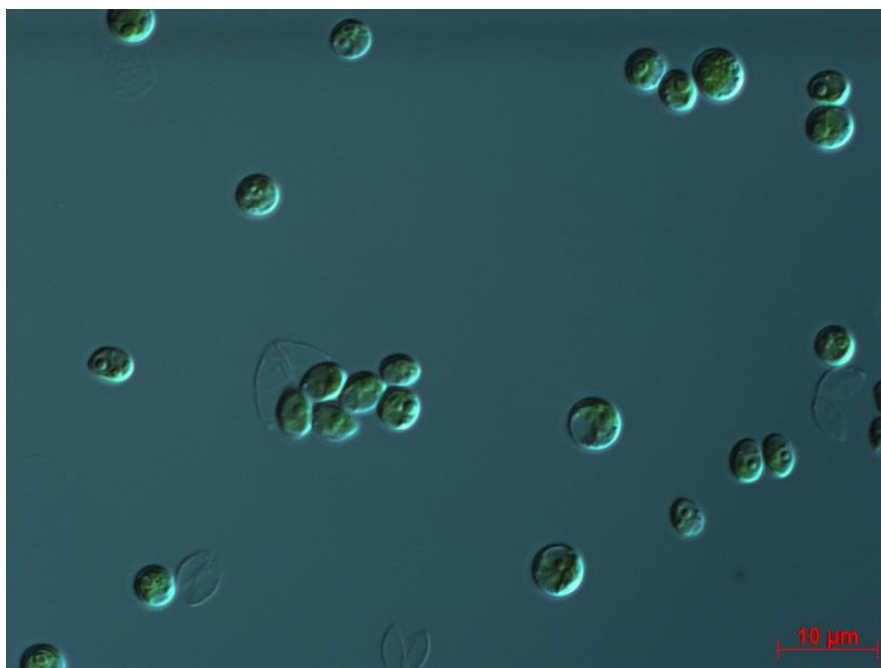
4 VÝSLEDKY

4.1 Taxonomická determinace rostlinného materiálu

K určení znaků klíčových pro determinaci řasy byl použit binokulární mikroskop PrimoStar od firmy Zeiss. Kultura byla pozorována při celkovém zvětšení 1000x. Patrné byly dva typy buněk – buňky vegetativní a autospory. Vegetativní buňky měly klasický kokální tvar a jejich naměřený průměr dosahoval hodnoty 5 μm . Oproti tomu spory byly spíše oválné a jejich rozměry činily okolo 3x5 μm . Vegetativní buňky obsahovaly chloroplast, jehož objem zabíral okolo 2/3 objemu buňky. Dále byl ve vegetativních buňkách patrný výrazný pyrenoid. Aby bylo možné rozpoznat počet málo výrazných škrobových zrn obklopujících pyrenoid, musel být preparát obarven methylenovou modří (bez fotodokumentace). Po provedení tohoto kroku se ukázalo, že kolem pyrenoidů jsou situována dvě škrobová zrna. Dobře pozorovatelná byla také sporangia, což jsou útvary, ve kterých se vyvíjejí spory. Velikost sporangia a počet spor v něm jsou neméně významnými znaky pro určení kultury. Sporangia v mé kultuře měřila přibližně 8 μm a obsahovala 4-6 spor.

Po srovnání všech získaných informací s výše uvedenou literaturou bylo potvrzeno, že kultura svými znaky odpovídá řase s názvem *Chlorella sorokiniana*.

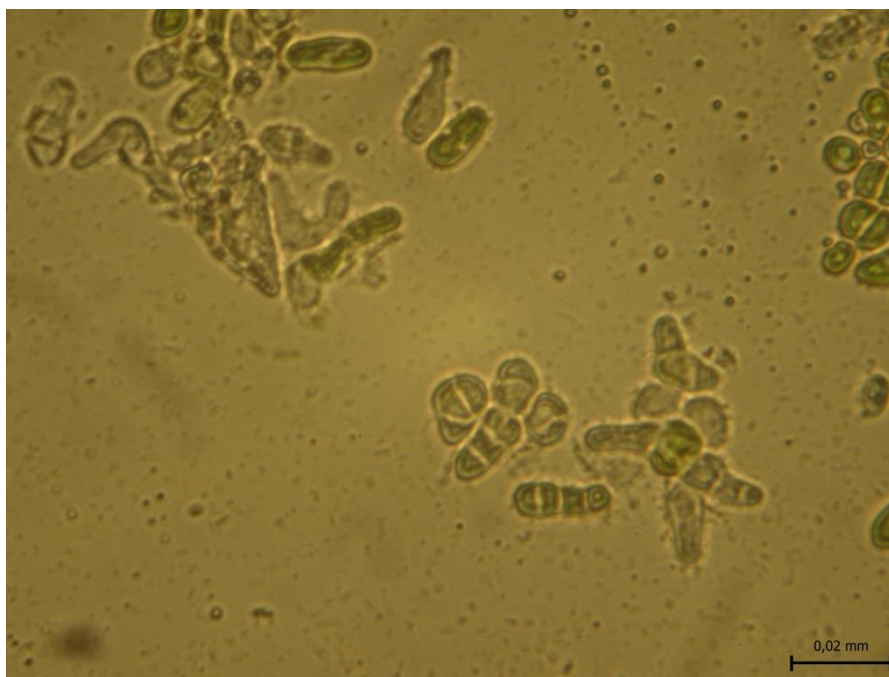
Na dalším obrázku (Obr. 6) je zachycen rozpad sporangia na šest osamocených spor. Patrné jsou také rozdíly co do velikosti a tvaru mezi vegetativními buňkami (kulovité, větší) a sporama (oválné, menší).



Obr. 6 Snímek řasy *Chlorella sorokiniana*.

V případě druhé obdržené kultury bylo ověřováno, že se jedná o kulturu *Protococcus viridis*. Stejným způsobem, jako v případě kultury *C. sorokiniana*, byly pozorovány charakteristické znaky této řasy, které byly porovnávány s literaturou (Komárek a Fott, 1983). Pod mikroskopem byly patrné několikabuněčné balíčkovité shluky až složitě větvená vlákna, místy dokonce pseudoparenchymotní útvary. Tvar buněk byl kulovitý, eliptický až lehce cylindrický, místy nepravidelný. Buňky měly v průměru 5-12 μm a obsahovaly obvykle jeden nástěnný chloroplast s jedním malým a špatně pozorovatelným pyrenoidem. Kromě vegetativních buněk byly v kultuře přítomny také podlouhlé autospory, které slouží řase k nepohlavnímu rozmnožování.

Vzhledem ke všem pozorovatelným morfologickým znakům a vlastnostem kultury bylo potvrzeno, že se skutečně jedná o řasu *Protococcus viridis*. Z důvodu rozsáhlé bakteriální kontaminace, které je patrná i z pořízené fotografie (Obr. 7), však nemohla být řasa dále kultivována a nebylo možné s ní provést plánované experimenty.



Obr. 7 Snímek řasy *Protococcus viridis*.

4.2 Kapacita SPE kolon C18 pro purifikaci média

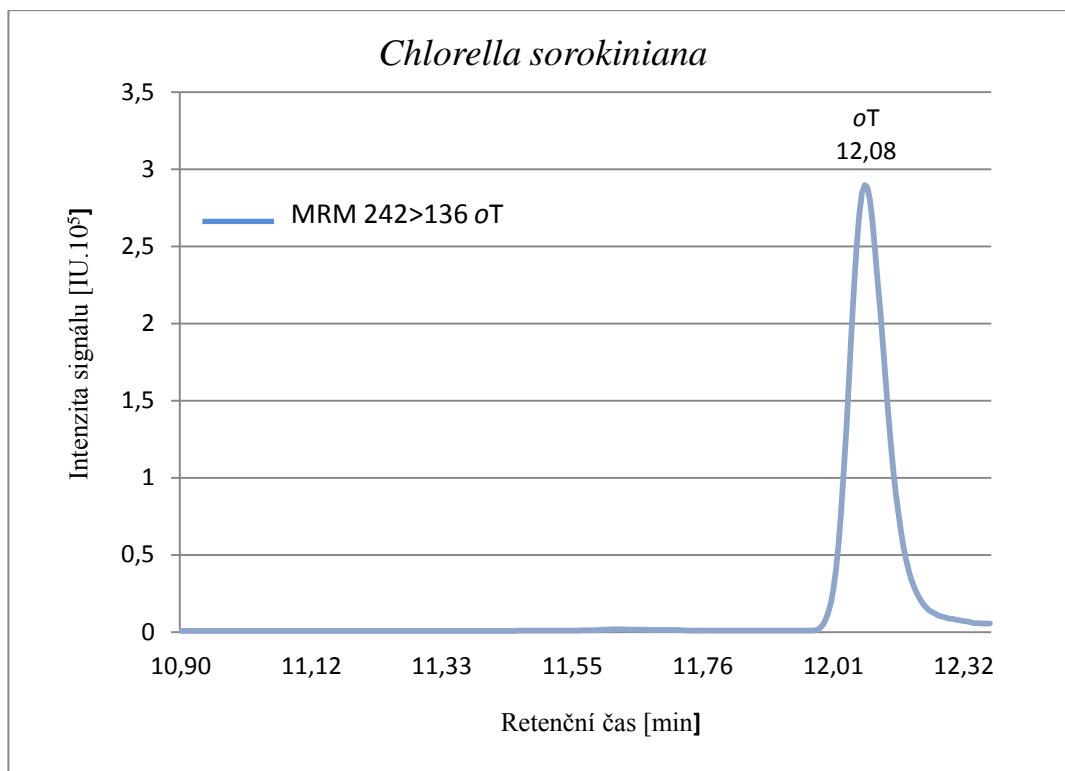
Zvážení hmotnosti odparku ve 100 ml kultivačního média bylo zjištěno, že v 1 ml média, ve kterém probíhala kultivace řasy po dobu dvou měsíců, je obsaženo 0,59 mg suché hmoty. Pro purifikaci bylo používáno 10 ml média na jeden vzorek, který tedy obsahoval 5,9 mg suché hmoty. Na kolony je z hlediska její kapacity možno nanést pouze 1 % hmotnosti jejího sorbentu, což bylo v případě mnou užitých 1g kolon 10 mg. Z toho plyne, že při purifikaci bylo využito pouze 59 % kapacity kolony. Kapacita kolony tedy nebyla překročena.

4.3 Screening aromatických CK v kultivačním médiu

Analýza volných aromatických cytokininů v médiu byla provedena pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí v selektivním módu MRM. V kultivačním médiu BBM řasy *Chlorella sorokiniana* nebyly identifikovány žádné aromatické cytokininy, ani žádný ze dvou sledovaných isoprenoidních cytokininů.

4.4 Screening aromatických CK v biologickém materiálu

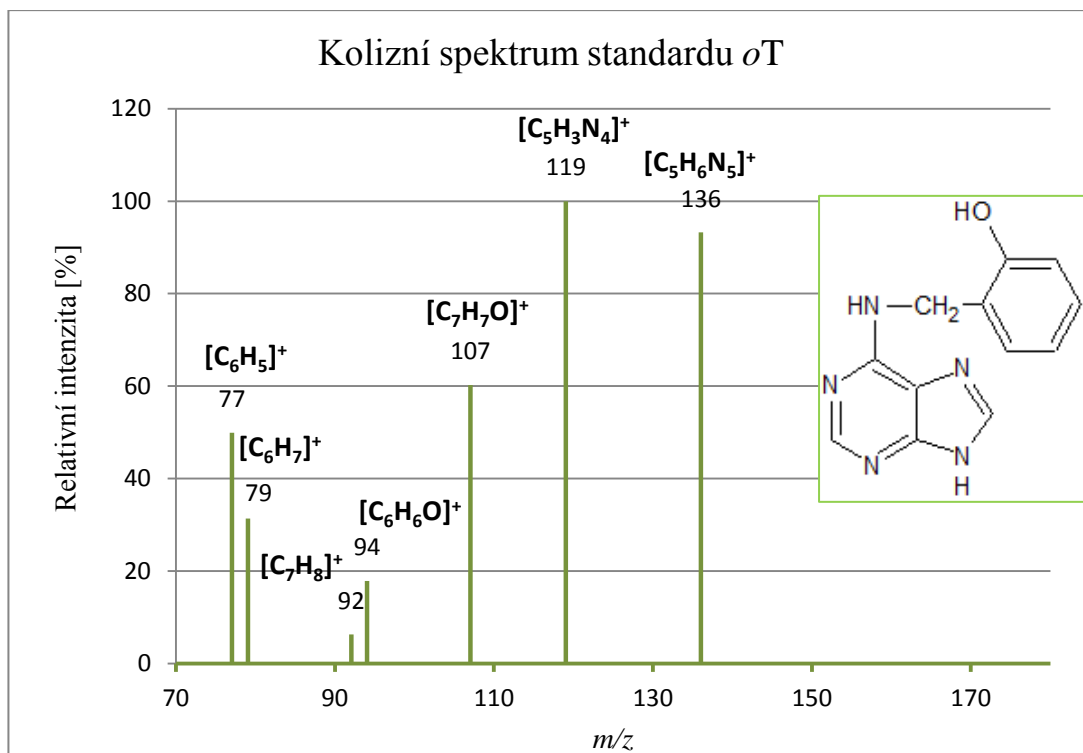
Analýza volných aromatických cytokininů ve vzorku buněčného extraktu byla provedena pomocí stejné metody jako v případě analýzy aromatických cytokininů v médiu. Vyhodnocením chromatogramu bylo zjištěno, že v buněčném extraktu řasy *Chlorella sorokiniana* se nachází aromatický cytokinin oT (Obr. 8). Poměrně překvapivý byl fakt, že se ve vzorku nepotvrdila přítomnost žádného ze dvou isoprenoidních cytokininů.



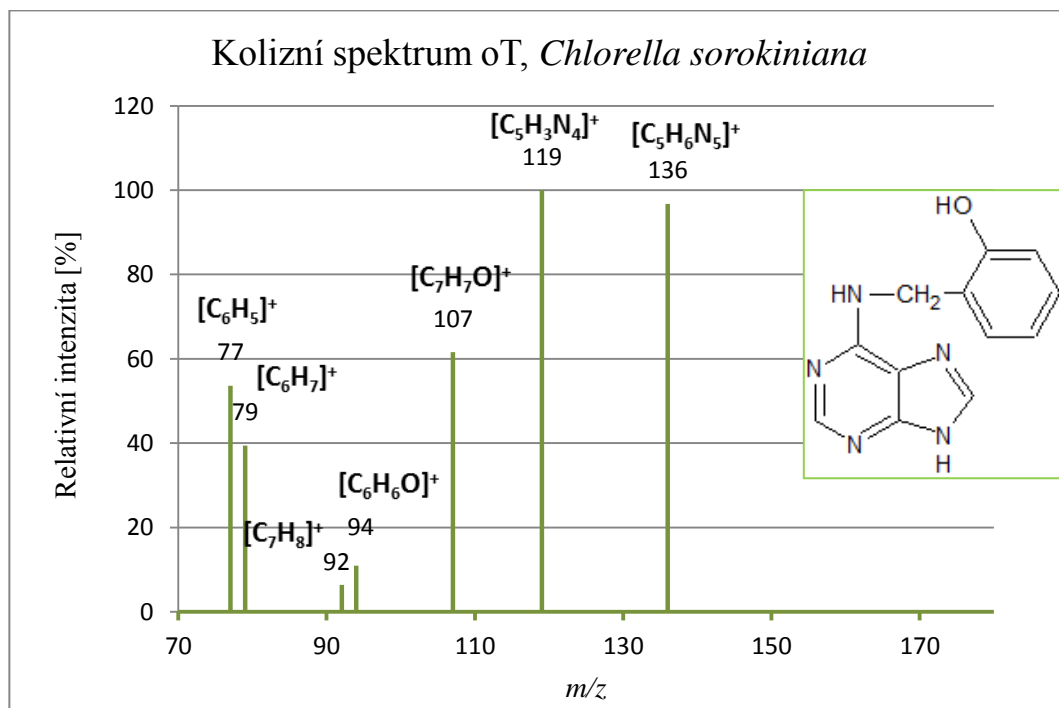
Obr. 8 UHPLC-MS chromatogram separace *oT* ve vzorku buněčného extraktu řasy *Chlorella sorokiniana*.

4.5 Hmotnostní spektrum *oT*

Pro ověření přítomnosti *oT* ve vzorcích buněčného extraktu řasy *Chlorella sorokiniana* byla změřena kolizní hmotnostní spektra pro *oT* ve vzorku (Obr. 10) a pro *oT* standard ($c = 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$) (Obr. 9). Měření bylo provedeno pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí v selektivním módu PIS. U standardu *oT* se kvazimolekulární ion $[M+H]^+$ s hodnotou m/z 242 rozpadl na 7 fragmentů s hodnotami m/z 136, 119, 107, 94, 92, 79 a 77. Pro *oT* detekovaný ve vzorku bylo rozpadem iontu o m/z 242 získáno také 7 fragmentů, které byly s fragmenty *oT* standardu zcela totožné. Největší naměřenou intenzitu vykazoval fragment o m/z 119 a nejnižší intenzitu fragment o m/z = 92. Retenční čas a hmotnostní kolizní spektrum *oT* ve vzorku a *oT* standardu si navzájem odpovídaly, čímž byla potvrzena přítomnost volného *oT* v buněčném extraktu.



Obr. 9 Hmotnostní kolizní spektrum *oT* standardu. CE = -35 V



Obr. 10 Hmotnostní kolizní spektrum *oT* detekovaného v buněčném extraktu řasy *Chlorella sorokiniana*. CE = -35 V

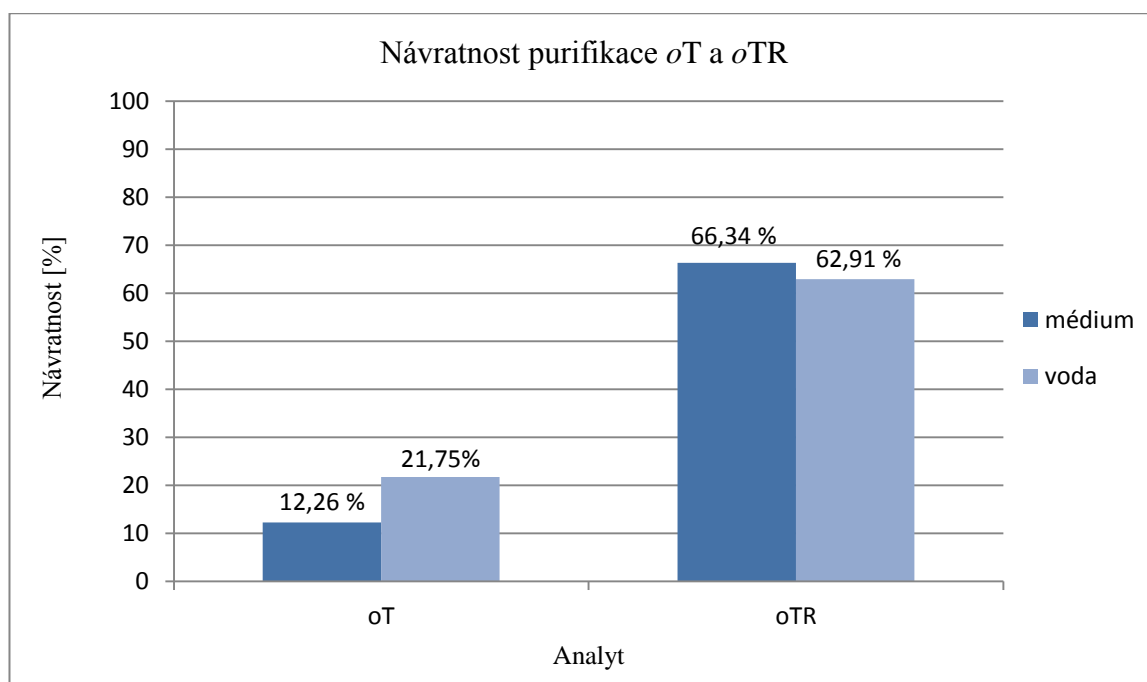
4.6 Návratnost purifikace aromatických CK pomocí SPE kolon C18

Návratnost SPE purifikace CK byla testována pomocí směsi ARCK standardů, který obsahoval *o*T, *o*TR, BAP, BAPR, *m*T, *m*TR a Me*o*T. Vyhodnocení bylo provedeno porovnáním ploch píků purifikovaných a nepurifikovaných standardů. Experiment byl proveden jednak purifikací standardů nanesených na kolony v kultivačním médiu a jednak purifikací standardů v destilované vodě, čímž měl být prověřen vliv biologické matrice na vazbu CK, a tedy i na návratnost jejich purifikace. Využito bylo předchozího zjištění, že v samotném médiu nejsou žádné CK obsaženy (viz kapitola 4.2).

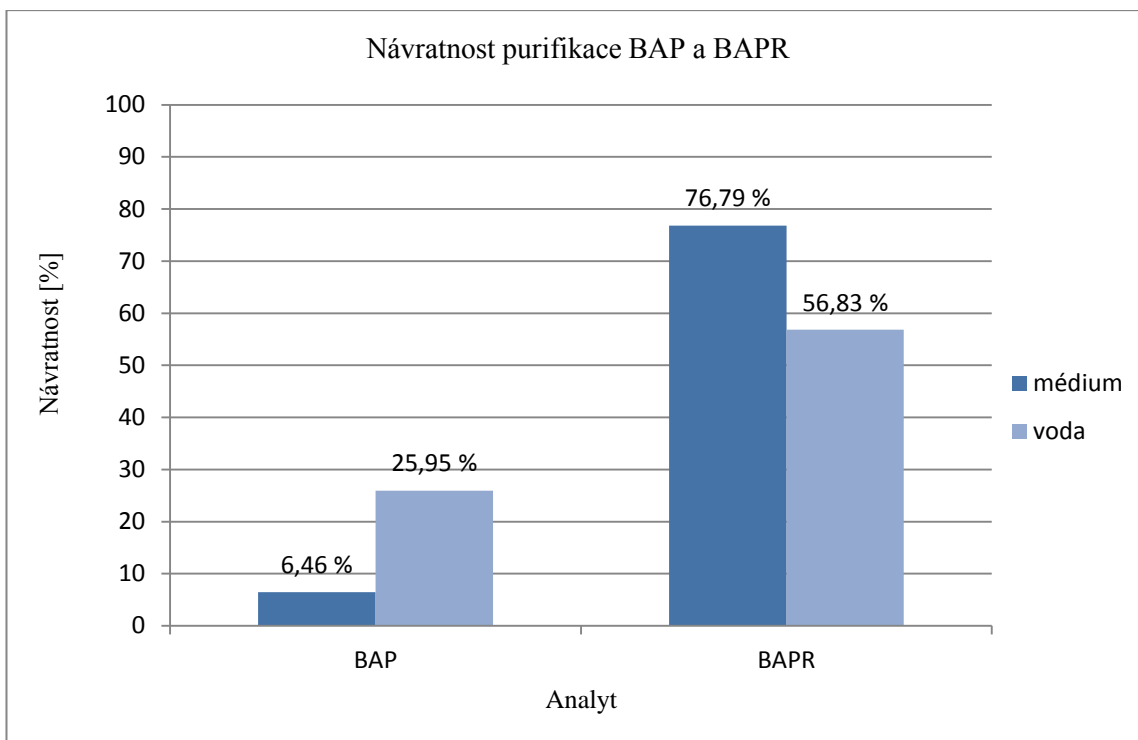
Bylo zjištěno, že všechny testované ribosidy měly vyšší hodnoty návratnosti (jak v médiu, tak ve vodě), než jim odpovídající volné báze cytokininů. Me*o*T se při purifikaci choval obdobně jako volné CK báze (*o*T, BAP a *m*T), přičemž nejbližší mu byl výslednými hodnotami návratnosti *m*T (Obr. 11,12,13).

Zřejmé je, že návratnost purifikace jednotlivých ARCK byla velmi různorodá. Pro purifikaci testovaných CK v médiu se pohybovala od 6,46 % (BAP) do 96,35 % (*m*TR). Pro purifikaci CK z vody byla návratnost v rozmezí od 21,75 % (*o*T) do 62,91 % (*o*TR).

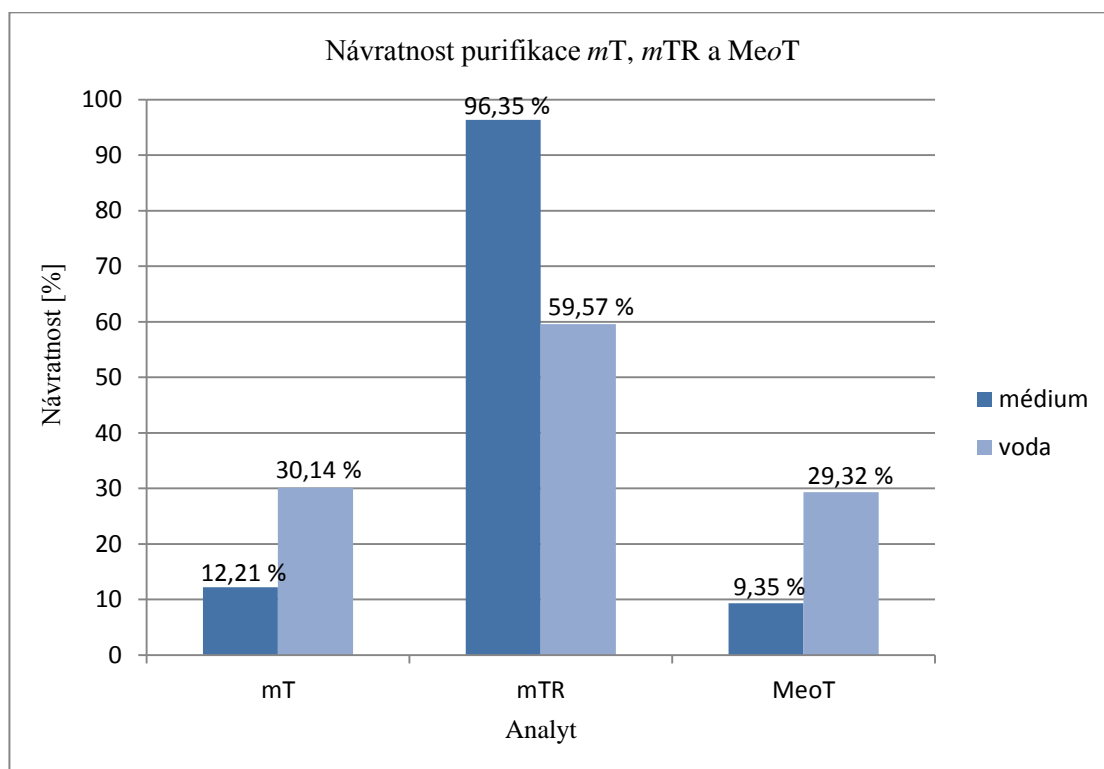
Experiment by ovšem bylo vhodné opakovat s větším počtem měření jednotlivých vzorků, aby bylo dosaženo objektivnějších výsledků.



Obr. 11 Návratnost SPE purifikace *o*T a *o*TR na SPE kolonách C18.



Obr. 12 Návratnost SPE purifikace BAP a BAPR na SPE kolonách C18.



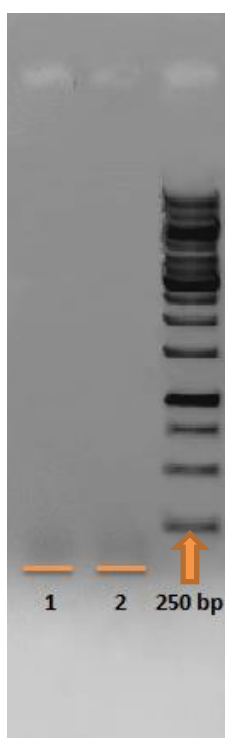
Obr. 13 Návratnost SPE purifikace *mT*, *mTR* a *MeoT* na SPE kolonách C18.

4.7 Stanovení čistoty a koncentrace tRNA v biologickém materiálu

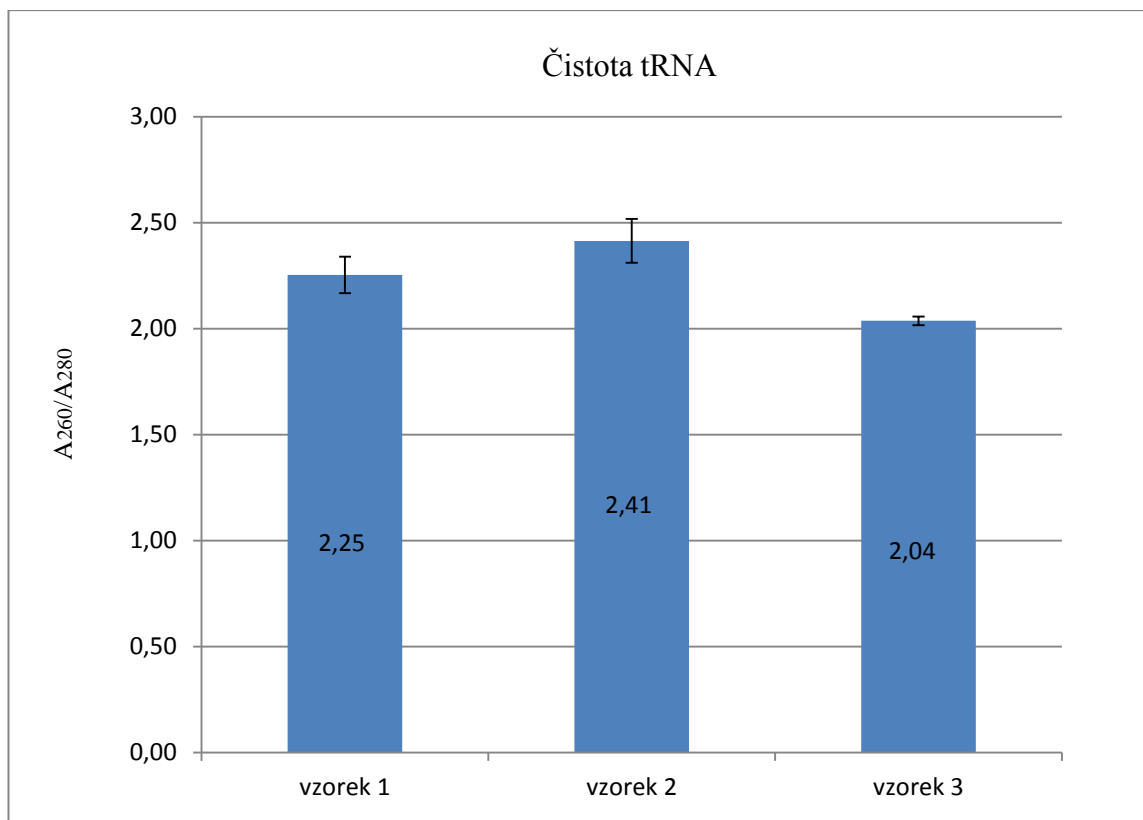
Úspěšnost izolace tRNA byla potvrzena pomocí elektroforézy na agarosovém gelu (Obr. 14). Bandy nanesených vzorků neodpovídají žádnému z bandů jednotlivých frakcí naneseného markeru, jelikož tRNA sestává pouze ze 76-90 párů bází (Sharp *et al.*, 1985) a velikost nejmenší frakce použitého markeru byla 250 párů bází.

Koncentrace tRNA v jednotlivých vzorcích byla poměrně nízká, o čemž vypovídá i slabá viditelnost bandů na elektroferogramu (Obr. 14). Koncentrace tRNA ve vzorcích byly v rozmezí 94,79-122,53 ng/μl. Jeden vzorek byl získán z 50 ml suspenzní buněčné kultury, avšak nebylo možné zajistit, aby v každém z těchto vzorků bylo zcela totožné množství buněčného podílu.

O čistotě tRNA vypovídá poměr absorbancí A_{260}/A_{280} . V případě izolace tRNA v čistém stanovuje poměr A_{260}/A_{280} větší, než 2. Pokud by byla naměřená hodnota nižší, jednalo by se o znečištění tRNA proteiny či fenolem, který je v procesu izolace používám (Wilfinger *et al.*, 1997). Ve všech měřených vzorcích byla hodnota A_{260}/A_{280} větší, než dva, což znamená, že se podařilo izolovat čistou tRNA (Obr. 15).



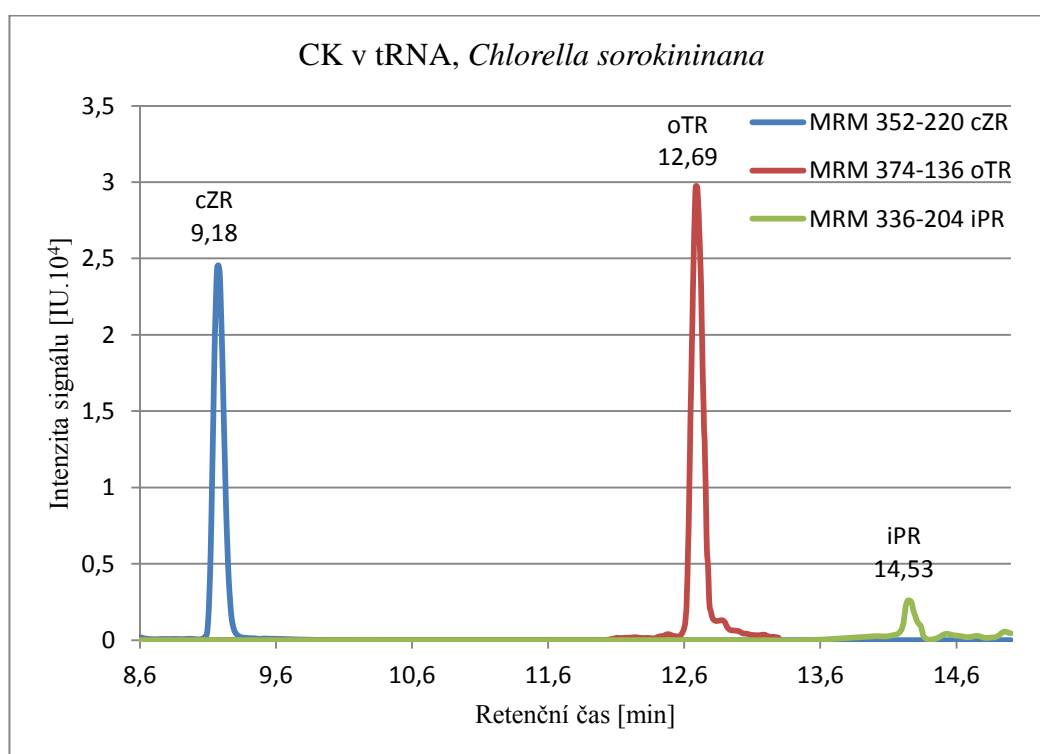
Obr. 14 Elektroferogram tRNA izolované z buněk řasy *Chlorella sorokiniana*.



Obr. 15 Čistota tRNA jednotlivých vzorků, vyjádřená poměrem A_{260}/A_{280} .

4.8 Identifikace CK vázaných v tRNA

Screening cytokininů vázaných v tRNA byl proveden pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí v selektivním módu MRM. Jak je patrné z níže uvedeného chromatogramu (Obr. 16), ve vzorcích byly identifikovány tři cytokininy – cZR, oTR a iPR. Největší intenzita signálu byla naměřena pro oTR, tedy aromatický cytokinin. Ze dvou zbývajících isoprenoidních cytokininů vykazoval poměrně vysokou intenzitu signálu také cZR, o poznání nižší intenzita byla naměřena pro iPR. Žádné další cytokininy vázané v tRNA, izolované z řasy *Chlorella sorokiniana*, identifikovány nebyly.



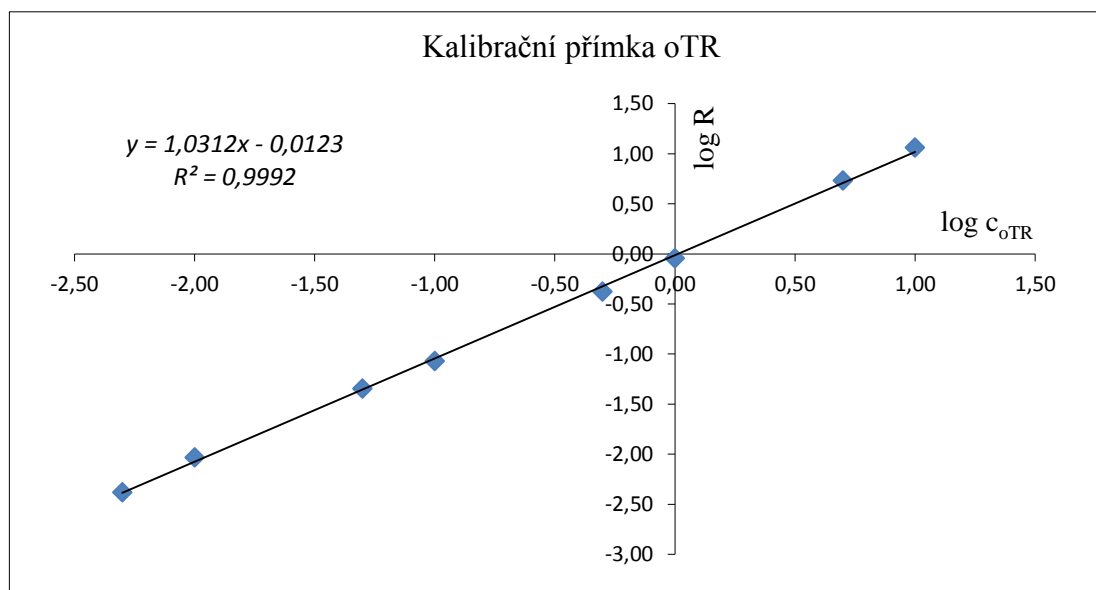
Obr. 16 UHPLC-MS chromatogram separace cZR, oTR a iPR ve vzorku hydrolyzované tRNA, izolované z řasy *Chlorella sorokiniana*.

Ověření přítomnosti oTR ve vzorcích bylo provedeno porovnáním ploch píků konfirmačních přechodů pro oTR ve vzorku a pro oTR standard. U oTR standardu plocha konfirmačního přechodu o m/z 374-242 zaujímala 65,28 % plochy kvantifikačního píku a plocha přechodu o m/z 374-119 zaujímala 15,27 % plochy kvantifikačního píku. U oTR ve vzorku plocha přechodu o m/z 374-242 zaujímala průměrně 68,21 % a plocha přechodu o m/z 374-119 zaujímala 14,05 %. Poměry ploch píků konfirmačních přechodů standardu a oTR vzorku si odpovídají. V tRNA řasy se tedy skutečně vyskytoval vázaný oTR.

4.9 Kvantifikace aromatických CK vázaných v tRNA

Jediný aromatický cytokinin vázaný v tRNA, *o*TR, byl kvantifikován metodou interních standardů. Pro vytvoření kalibrační přímky bylo třeba vypočítat odezvu R (response) jako podíl ploch píků endogenního a interního standardu vynásobeného koncentrací interního standardu. Kalibrační přímka poté byla sestrojena jako závislost logaritmu R na logaritmu koncentrace endogenního standardu. Lineární regresí byla nakonec zjištěna rovnice kalibrační přímky. Na níže uvedeném obrázku (Obr. 17) je uvedena kalibrační přímka *o*TR. Limit detekce *o*TR je 4,35 fmol (LabSolutions verze 5.72, Shimadzu).

Následně byla vypočtena a logaritmována odezva *o*TR ve vzorcích. Po dosažení získané hodnoty do rovnice kalibrační přímky byla vypočtena orientační koncentrace *o*TR v biologickém materiálu. Díky naměřeným koncentracím tRNA v jednotlivých vzorcích na spektrofotometru mohlo být také vypočtena koncentrace *o*TR v tRNA (Tab. 10). Koncentrace *o*TR v jednotlivých vzorcích nejsou zcela totožné, což je nejspíše způsobeno rozdílným množstvím buněčného podílu ve vzorcích. I z tohoto důvodu je tedy naměřená koncentrace *o*TR v biologickém materiálu pouze orientační.



Obr 17 Kalibrační přímka *o*TR.

Tab. 10 Orientační koncentrace *o*TR v biologickém materiálu a koncentrace *o*TR v tRNA.

Vzorek	<i>o</i> TR (pmol/g čerstvé hmoty)	<i>o</i> TR (ng/μg tRNA)
1	1,1592	0,003836
2	1,2700	0,005152
3	0,3259	0,001096

5 DISKUSE

Analýzou volných aromatických cytokininů v buněčném extraktu řasy *Chlorella sorokiniana* byla potvrzena přítomnost pouze jediného cytokininu a to *oT*. Zajímavé je, že nebyly naměřeny signály pro žádné isoprenoidní cytokininy, jejichž výskyt v buněčném extraktu se dal na základě výsledků předchozích studií očekávat (Stirk *et al.*, 2003; Ördög *et al.*, 2004). V tomto směru tedy námi získaná data nekorespondují s dříve publikovanými výsledky. Možné však je, že během purifikace došlo ke znatelným ztrátám analytů. Vzhledem k tomu, že v mé práci ke vzorkům při analýze volných cytokininů nebyly přidány interní standardy, není možné ověřit, zda nebyly v buněčném extraktu obsaženy ISCK a další ARCK v malém množství, které bylo během purifikace ztraceno. Experiment by tedy bylo vhodné zopakovat s přidavkem příslušných interních standardů.

Ördög *et al.* (2004) použili ve své práci i jinou metodu purifikace cytokininů. V jejich případě byly buněčné extrakty přečištěny pomocí kombinace kolon s DEAE-Sephadexem, kolon C18 a kolon imunoafinitních. Metoda imunoafinitní purifikace je založena na interakci cytokininů se svými protilátkami. Je extrémně rychlá, poskytuje návratnosti okolo 80 % a může být úspěšně využita při stopových analýzách (McDonald a Morris, 1985). Užití této metody by tedy mohlo být pro purifikaci cytokininů z buněčného extraktu řas vhodnější, než užití SPE kolon C18.

Oproti naší práci dále měřili Ördög *et al.* (2004) růstové křivky. Podařilo se jim tak kulturu sklídit na počátku stacionární fáze růstu, kdy kultura obsahovala převážně velké, nedělící se buňky. Tato fáze mohla být z hlediska produktivity sekundárních metabolitů a tedy i cytokininů výhodnější, než fáze, ve které jsme sklízeli kulturu my. Tuto hypotézu však není možné potvrdit, jelikož fáze růstu je významně ovlivněna kultivační teplotou (Goldman a Carpeno, 1974), která byla v případě práce Ördög *et al.* (2004) o 8 °C vyšší. Jelikož ve zmíněné práci není uvedeno, po jaké době byla kultura sklizena, není možné kriticky porovnat růstovou fázi mnou užitě řasy s růstovou fází řasy užitě v publikaci Ördög *et al.* (2004).

Na druhou stranu, v případě dvou rodů mikrořas ze tří (*Chlorella minutissima*, *Protococcus viridis*) analyzovaných dříve (Ördög *et al.*, 2004) byl dominantním zástupcem volných cytokininů v extraktech řas právě *oT*, stejně jako tomu je v této práci. Z toho plyne, že by *oT* mohl patřit mezi nejrozšířenější volné cytokininy syntetizované mikrořasami.

Jediným detekovaným aromatickým cytokininem vyskytujícím se v tRNA řasy *Chlorella sorokiniana* byl v mé práci oTR. Intenzita jeho signálu dokonce převyšovala signály isoprenoidních cytokininů cZR a iPR, jejichž výskyt v rostlinné tRNA byl potvrzen již dříve v několika studiích (Miyawaki *et al.*, 2006; Yevdakova, 2007; Stirk *et al.*, 2011). Zajímavé je, že ve volné formě se v práci Ördög *et al.* (2004) naopak oTR vyskytoval v téměř nulových koncentracích.

Kvantifikací oTR bylo zjištěno, že ve vzorcích tRNA izolované z řasy se oTR nacházel průměrně v koncentraci 0,00336 ng/μg tRNA. Tato naměřená hodnota je o celé dva řády nižší, než v případě oTR izolovaného stejnou metodou z tRNA *Populus deltoides*, kdy dosahovala koncentrace oTR 0,336 ng/μg tRNA (Dosedělová, 2016). Miyawaki *et al.*, (2006) ve své práci kvantifikovali cZR a iPR v *Arabidopsis thaliana*, kdy pro cZR naměřili koncentraci 2,13 ng/μg tRNA a pro iPR koncentraci 0,0740 ng/μg tRNA. Je tedy zřejmé, že ačkoliv se v řase *Chlorella sorokiniana* vyskytují cytokininy vázané v tRNA, existují organismy syntetizující CK z tRNA v mnohem vyšších množstvích. Oproti řasám však patří *Populus deltoides* i *Arabidopsis thaliana* mezi vyšší rostliny.

Nevýhodou užití *C. sorokiniana* jako výchozího materiálu pro studium biosyntézy ARCK je relativně nízká rychlost růstu, která se ovšem dá zvýšit kultivací při vyšší teplotě. Zmíněná řasa je velmi odolná k vyšším teplotám a při 39 °C se dokáže dělit až devětkrát za den (Shihira a Krauss, 1965). Pro užití takové teploty je však nutné mít kulturu bez výchozí bakteriální kontaminace. Toto je důležité zejména pro kultivaci v bioreaktorech při použití heterotrofních kultur, kdy je kultivační médium obohaceno sacharidy.

6 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byla zpracována literární rešerše pojednávající o rostlinných hormonech, metabolismu a významu aromatických cytokininů a o řasách.

V experimentální části byly identifikovány aromatické cytokininy v mikroskopické řase *Chlorella sorokiniana*. V použitém rostlinném materiálu byla detekována přítomnost aromatických cytokininů, přičemž *oT* se vyskytoval ve volné formě a *oTR* se vyskytoval v tRNA ve formě vázané. V tRNA byly také nalezeny dva isoprenoidní cytokininy – *cZR* a *iPR*. V kultivačním médiu BBM nebyl naměřen signál pro žádné aromatické či isoprenoidní cytokininy. Použitá izolační a purifikační metoda ovšem nemusela být zcela vhodná a je tedy možné, že se v užitém rostlinném materiálu mohou vyskytovat také další cytokininy. V dalších experimentech bude pravděpodobně nutné použití imunoafinitní purifikace.

Díky obsahu ARCK ve volné i vázané formě se řasa *Chlorella sorokiniana* jeví jako vhodný modelový organismus pro studium biosyntézy aromatických cytokininů.

7 LITERATURA

- Agardh C. S. (1824): Ordo II Nostochinae. In: *Systema algarum*. Lundæ, Literis Berlingianis, Berlin, 13.
- Bairu M. W., Stirk W. A., Doležal K., Van Staden J. (2007): Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **90**, 15–23.
- Bairu M. W., Stirk W. A., Doležal K., Van Staden J. (2008): The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars “Williams” and “Grand Naine” (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **95**, 373–379.
- Baroja-Fernández E., Aguirreolea J., Martinková H., Hanuš J., Strnad M. (2002): Aromatic cytokinins in micropropagated potato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 217–224.
- Bessey C. E. (1914): *Protococcus*, not *Pleurococcus*. *Science* **39**, 790-791.
- Bielecki R. L. (1964): The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry* **9**, 431–442.
- Blaaz H., Kroeze C. (2014): Possible future effects of large-scale algae cultivation for biofuels on coastal eutrophication in Europe. *Science of the total environment* **496**, 45-53.
- Blagoeva E., Dobrev P. I., Malbeck J., Motyka V., Strnad M., Hanuš J., Vaňkova R. (2004): Cytokinin N-glucosylation inhibitors suppress deactivation of exogenous cytokinins in radish, but their effect on active endogenous cytokinins is counteracted by other regulatory mechanisms. *Physiologia Plantarum* **121**, 215-222.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **12**, 1051-1054.
- Burrows W. J., Armstrong D. J., Kamínek M., Skoog F., Bock R. M., Hechs S. M., Dammann L. G., Leonard N. J., Oocolowitch J. (1970): Isolation and identification of four cytokinins from wheat germ transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **9**, 1867-1872.
- Cowley D. E., Duke C. C., Liepa A. J., MacLeod J. K., Letham D. S. (1978): The Structure and Synthesis of Cytokinin Metabolites. 1. The 7- and 9- β -D-Glucosides and Pyranosides of Zeatin and 6-Benzylaminopurine *Australian Journal of Chemistry* **31**, 1095-1111.
- Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. (2000): Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists **24**, 1250–1318.
- Davies P. J. (1995): In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer, 1–104.
- de Bashan L. E., Trejo A., Huss V. A. R., Hernandez J., Bashan Y. (2008): *Chlorella Sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology* **11**, 4980-4989.
- de Clerck O., Guiry M. D., Leliaert F., Samyn Y., Verbruggen H. (2013): Algal Taxonomy: A Road to Nowhere? *Journal of Phycology* **49**, 215-225.
- Dhert P. (1996): In: *Manual of the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper, Rome, 10-14.
- Doležal K., Ástot C., Hanuš J., Holub J., Peters W., Beck E., Strnad M., Sandberg G. (2002): Identification of aromatic cytokinins in suspension cultured photoautotrophic cells of *Chenopodium rubrum* by capillary liquid chromatography/frit–fast atom bombardment mass spectrometry. *Plant Growth Regulation* **36**, 181–189.
- Dosedělová V. (2016): *Izolace cytokininů z tRNA*. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, ČR.
- Ernst D., Schaffer W., Oesterhelt D. (1983): Isolation and identification of a new, naturally occurring cytokinin (6-benzylaminopurine riboside) from anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.). *Planta* **159**, 222–225.
- Follows M. (2015): If algae doubles in size every day, in 90 days it would easily cover the surface of Earth. *New Scientist* **225**, 57.

- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431-2452.
- Frébortová J., Fraaije M. W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K. D., English J. T., Frébort I. (2004): Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121–130.
- Friedl T., Bhattacharya D. (2002): Origin and evolution of green lichen algae. In: *Symbiosis*, Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands. 341–357.
- Friedl T., Budel B. (1996): Photobionts. In: *Lichen Biology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 8–23.
- Fritsch F. E. (1948): In: *The structure and reproduction of algae*. Cambridge University Press, London, 28-51.
- Fu J. H., Sun X. H., Wang J. D., Chu J. F., Yan C. Y. (2011): Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science Bulletin* **56**, 355-366.
- Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signalling, cell differentiation and plant development. In: *Studies in Natural Products Chemistry vol. 34*, 1. vydání., Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko, 203-252.
- Garciamartinez J. L., Sponsel V. M., Gaskin P. (1987): Gibberellins in developing fruits of *Pisum sativum* cv alaska - studies on their role in pod growth and seed development. *Planta* **170**, 130-137.
- Goldman J. C., Carpente E. J. (1974): Kinetic approach to effect of temperature on algal growth. *Limnology and Oceanography* **19**, 756-766.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer P. B., Puech-Pagčs V., Dun E. A., Pillot J. P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J. C., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge C. A., Rameau C., Rochange S. F. (2008): Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189–194.
- Graham L. E., Cook M. E., Busse J. S. (2000): The origin of plants: Body plan changes contributing to a major evolutionary radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4535–4540.
- Graham L. E., Wilcox L. W. (2000): In: *Algae*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA, 1-22.
- Grant M. R., Jones J. D. G. (2009): Hormone (Dis)harmony Moulds Plant Health and Disease. *Science* **324**, 750-752.
- Grower J. P. (1989): Influence of cell shape and size on algal competitive ability. *Journal of Phycology* **25**, 402-405.
- Guiry M. D. (2012): How many species of algae are there? *Journal of Phycology* **48**, 1057-1063.
- Hajduch M., Havlíček L., Veselý J., Novotný R., Mihal V., Strnad M. (1999): Synthetic cyclin dependent kinase inhibitors - New generation of potent anti-cancer drugs. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **457**, 341-353.
- Hanika J. (1997): 8. Biochemické reaktory. In: *Vicéfázové reaktory*, 1. vydání, VŠCHT v Praze, 103.
- Hao J. J., Kang C. L. (2005): In: *Plant Biology*. Chemical Industry Press, Peking, 160.
- Harrison S. T. L. (2011): In: *Comprehensive biotechnology*, 2. vydání. Elsevier, Oxford, 619–640.
- Herrmann K. M. (1995): The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology* **107**, 7–12.
- Hindák F. (1978): In: *Sladkovodné riasy*, 1. vydání, Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava, 21-575.
- Hocart C. H., Letham D. S. and Parker C. W. (1991): Inhibitors of cytokinin metabolism .4. substituted xanthines and cytokinin analogs as inhibitors of cytokinin N-glucosylation. *Phytochemistry* **30**, 2477-2486.
- Holub J., Hanuš J., Hanke D. E., Strnad M. (1998): Biological activity of cytokinins derived from *ortho*- and *meta*-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* **26**, 109–115.

- Hooley R. (1994): Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Molecular Biology* **26**, 1529–1555.
- Horgan R., Hewett E. W., Purse J. G., Wareing P. F. (1973): A new cytokinin from *Populus x robusta*. *Tetrahedron Letters* **30**, 2827–2828.
- Horgan R., Hewett E. W., Horgan J. M., Purse J. G., Wareing P. F. (1975): A new cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry* **14**, 1005–1008.
- Hou B., Lim E. K., Higgins G. S., Bowles D. J. (2004): N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 47822–47832.
- Chader S., Mahmah B., Chetehouna K., Mignolet E. (2011): Biodiesel production using *Chlorella sorokiniana* a green microalga. *Rev Energies Renouvel* **14**, 21–26.
- Chaves das Neves H. J., Paiss M. S. S. (1980a): Identification of a spathe regreening factor in *Zantedeschia aethiopica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **95**, 1387–1392.
- Chaves das Neves H. J., Paiss M. S. S. (1980b): A new cytokinin from the fruits of *Zantedeschia aethiopica*. *Tetrahedron Letters* **21**, 4390–4398.
- Jones L. H., Martínková H., Strnad M., Hanke D. E. (1996). Occurrence of aromatic cytokinins in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J. Plant Growth Regulation* **15**, 39–49.
- Kamínek M., Vaněk T., Motyka V. (1987): Cytokinin activities of *N*₆-benzyladenosine derivatives hydroxylated on the side-chain phenyl ring. *Journal of Plant Growth Regulation* **6**, 113–120.
- Komárek J., Fott B. (1983): In: *Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie*. E. Schweizerbart'sche verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 589–591.
- Kryštof V., McNae I. W., Walkinshaw M. D., Fischer P. M., Müller P., Vojtesek B., Orság M., Havlíček L., Strnad M. (2005): Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**, 1763–1771.
- Laundon J. R. (1985): *Desmococcus-olivaceus* - the name of the common subaerial green-alga. *International Association for Plant Taxonomy (IAPT)* **34**, 671–672.
- Leliaert F., Verbruggen H., Zechman F. W. (2011): Into the deep: New discoveries at the base of the green plant phylogeny. *BioEssays* **33**, 683–692.
- Leliaert F., Smith D., Moreau H., Herron M. D., Verbruggen H., Delwiche C. F., de Clerck O. (2012): Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**, 1–46.
- Lewis L. A., McCourt R. M. (2004): Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany* **91**, 1535–1556.
- McDonald E. M. S., Morris R. O. (1985): Isolation of cytokinins by immunoaffinity chromatography and analysis by high-performance liquid chromatography radioimmunoassay. *Methods in Enzymology* **110**, 347–358.
- Macholán L. (1998): In: *Sekundární metabolismy*. 1. vydání, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, 150 stran.
- Margalef, R. (1978): Life forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta* **1**, 493–509.
- Matsukawa R., Hotta M., Masuda Y., Chihara M., Karube I. (2000): Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology* **12**, 263–267.
- McCourt R. M., Delwiche C. F., Karol K. G. (2004): Charophyte algae and land plant origins. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 661–666.
- Metting B., Zimmerman W. J., Crouch I., Van Staden J. (1990): Agronomic uses of seaweed and microalgae. In: *Introduction to applied phycology*. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands, 589–628.
- Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. (1955a): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392.
- Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., von Saltza M. H., Strong F. M. (1955b): Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 2662–2663.

- Miyawaki K., Trkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato K., Sato S., Tarkowská D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006): Roles of Arabidopsis ATP:ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **44**, 16598-16603
- Mok M. C., Martin R. C., Dobrev P. I., Vanková R., Ho P. S., Yonekura-Sakakibara K., Sakakibara H., Mok D. W. S. (2005): Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives are substrates of cytokinin O-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant Physiology* **137**, 1057–1066.
- Morabito G., Oggioni A., Caravati E., Panzani P. (2007): Seasonal morphological plasticity of phytoplankton in Lago Maggiore (N. Italy). *Hydrobiologia* **578**, 47–57.
- Nandi S. K., Letham D. S., Palni L. M. S., Wong O. C., Summons R. E. (1989): 6-benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. *Plant Science* **61**, 189-196.
- Naselli-Flores L., Padisák J., Albay M. (2007): Shape and size in phytoplankton ecology: do they matter? *Hydrobiologia* **578**, 157-161.
- Novák O., Hauserova E., Amakorov P., Doležal K., Strnad M. (2008): Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-2224.
- Ohba N., Tsujimoto Y. (1996): Soiling of external materials by algae and its prevention .1. Situation of soiling and identification of algae. *Mokuzai Gakkaishi* **42**, 589-595.
- Olsen A., Siboska G. E., Clark B. F., Rattan S. I. (1999): N(6)-Furfuryladenine, kinetin, protects against Fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **265**, 499-502.
- Ördög V., Stirk W. A., Van Staden J., Novák O., Strnad M. (2004): Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the *Chlorophyta*. *Journal of Phycology* **40**, 88-95.
- Pizarro L., Stange C. (2009): Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e Investigación Agraria* **36**, 143-161.
- Plíhal O., Szüčová L., Galuszka P. (2013): N9-substituted aromatic cytokinins with negligible side effects on root development are an emerging tool for in vitro culturing. *Plant signaling & behavior* **8**, e24392.
- Podlešáková K., Tarkowská D., Penčík A., Oklešťková J., Turečková V., Floková K., Trkowski P. (2012): Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chemické listy* **106**, 373-379.
- Pouličková A., Jurčák J. (2001): In: *Malý obrazový atlas našich sinic a řas*. 1. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, 9-63.
- Ranjitha J., Vijayalakshmi S. (2015): Micro-algae as a substrate for biofuel production. *Research journal of biotechnology* **10**, 99-107.
- Rao S. S. R., Vardhini B. V., Sujatha E., Anuradha S. (2002): Brassinosteroids - A new class of phytohormone. *Current Science* **82**, 1239-1245.
- Rattan S. I., Clark B. F. (1994): Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**, 665-672.
- Rosypal S. (2003): In: *Nový přehled biologie*, 1. vydání, Scientia, Praha, 184.
- Sáenz L., Jones L. H., Oropeza C., Vláčil D., Strnad M. (2003): Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinin in different plant parts of *Coccos nusifera* (L.). *Plant Growth Regulation* **39**, 205-215.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-449.
- Sargent M. C. (1934): Causes of color change in blue-green algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **20**, 251-253.
- Seo H. S., Song J. T., Cheong J. J., Lee Y. H., et al. (2001): Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. U. S. A. **98**, 4788-4793.
- Sharma O. P. (1986): In: *Textbook of algae*, Tata McGraw-Hill, New Delhi, 1-20.
- Sharp S. J., Schaack J., Cooley L., Burke D. J., Soll D. (1985): Structure and Transcription of Eukaryotic tRNA Genes. *Critical Reviews in Biochemistry* **19**, 107–144.

- Shihira I., Krauss R. W. (1965): In: *Chlorella. Physiology and taxonomy of forty-one isolates*. Maryland, University of Maryland, College Park, 30-31.
- Singh V., Roy S., Giri M. K., Chaturvedi R., Chowdhury Z., Shah J., Nandi A. K. (2013): *Arabidopsis thaliana* flowering locus D is required for systemic acquired resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 1979-1988.
- Skoog F., Miller C. O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **11**, 118-131.
- Solano R., Ecker J. R. (1998): Ethylene gas: perception, signaling and response. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 393-398.
- Stirk W. A., Novák O., Strnad M., Van Staden J. (2003): Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regulation* **41**, 13-24.
- Stirk W. A., Václavíková K., Novák O., Gajdošová S., Kotland O., Motyka V., Strnad M., van Staden J. (2011): Involvement of *cis*-zeatin, dihydrozeatin and aromatic cytokinins in germination and seedlings establishment of maize, oats and lucerne. *Journal of Plant Growth Regulation* **3**, 392-405.
- Stirk W. A., Václavíková K., Novák O., Gajdošová S., Kotland O., Motyka V., Strnad M., van Staden J. (2012): Involvement of *cis*-Zeatin, Dihydrozeatin, and Aromatic Cytokinins in Germination and Seedling Establishment of Maize, Oats, and Lucerne. *Journal of Plant Growth Regulation* **31**, 392-405.
- Strnad M., Peters W., Kamínek M. (1992): Immunodetection and identification of N6-(*o*-hydroxybenzylamino)purine as naturally occurring cytokinin in *Populus x canadensis* cv Robusta leaves. *Plant Physiology* **99**, 74-80.
- Strnad M., Peters W., Hanuš J., Beck E. (1994): *Ortho*-topolin-9-glucoside, and aromatic cytokinin from *Populus x canadensis* cv Robusta leaves. *Phytochemistry* **37**, 1059-1062.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.
- Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Astot C., Holub J., Fuksová K., Schmulling T., Sandberg G., Strnad M. (2003): Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum* **117**, 579-590.
- Tarkowská D., Novak O., Flokova K., Tarkowski P., Tureckova V., Gruz J., Rolcik J., Strnad M. (2014): Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* **240**, 55-76.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004): Analytické metody studia cytokininů. *Chemické listy* **98**, 834-841.
- Tarkowski P., Ge L. Y., Yong J. W. H., Tan S. N. (2009): Analytical methods for cytokinins. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **28**, 323-335.
- Tarkowski P. (2011): *Bioanalytické metody studia cytokininů a jejich aplikace*. Habilitační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, ČR.
- Teale W. D., Paponov I. A., Palme K. (2006): Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 847-859.
- Toro F. J., Martin-Closas L., Pelacho A. M. (2003): Jasmonates promote cabbage (*Brassica oleracea* L. var *Capitata* L.) root and shoot development. *Plant and Soil* **255**, 77-83.
- Ulvskov P., Marcussen J., Rajagopal R., Prinsen E., Rudelsheim P., Van Onckelen H. (1987) Immunoaffinity purification of indole-3-acetamide using monoclonal antibodies. *Plant Cell Physiology* **28**, 937-945.
- Van Den Hoek C., Mann D. G., Jahns, H. M. (1995): Foreword. In: *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, England, xiii-xiv.
- Veselý J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J. Y., Détivaud L., Leclerc S., Meijer L. (1994): Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine derivatives. *European Journal of Biochemistry* **224**, 771-786.
- von Schwartzenberg K., Nunez M. F., Blaschke H., Dobrev P. I., Novák O., Motyka V., Strnad M. (2007): Cytokinins in bryophyte *Physcomitrella patens*: Analyses of activity, distribution, and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiology* **145**, 786-800.

- Werbrouck S. P. O., Strnad M., Van Onckelen H. A., Debergh P. C. (1996): Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum* **98**, 291–298.
- Wilfinger W. W., Mackey K., Chomczynski P. (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectro-photometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**, 474-481.
- Wise R. R. (2006): The diversity of plastid form and function. *Advances in Photosynthesis and Respiration* **23**, 3-26.
- Wolkers H, Barbosa M. J., Kleinegris D. M. M., Bosma R., Wijffels R. H., Harmsen P. F. H. (2011): In: *Microalgae: the green gold of the future? Large-scale sustainable cultivation of microalgae for the production of bulk commodities*. Wageningen UR, Wageningen, 9-31.
- Yevdakova N. A. (2007): *Molecular and biochemical evidence for tRNA-dependent cytokinin biosynthesis in the ancient land plant Physcomitrella patens (Hedw.) B.S.G.* Disertační práce, University of Hamburg, Německo.
- Yoshida N., Ikeda R., Okuno T. (2006): Identification and characterization of heavy metal-resistant unicellular alga isolated from soil and its potential for phytoremediation. *Bioresource Technologies*. **97**, 1843-1849.
- Zeiger E., Taiz L. (2002): In: *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Sunderland, England, 493-517.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ARCK	aromatické cytokininy
BAP	benzylaminopurin
BAPR	benzyladenosin
BR	brassinolid
C18	oktadecylsilan
CE	kolizní energie
CK	cytokininy
CKX	cytokinindehydrogenasa
CYP735A	cytochrom P450 monooxygenasa
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
DAHP	3-deoxy-D-arabino-hepulosonát-7-fosfát
DEAE	diethylaminoethyl celuloza
DEPC	diethylpyrokarbonát
DHZ	dihydrozeatin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	enzymová imunoanalýza
epi-5DS	2'- <i>epi</i> -5-Deoxylstrigol
ESI	ionizace elektrosprejem
GA ₁	giberelin A ₁
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IAE	imunoafinitní extrakce
iP	isopentenyladenin
iPR	isopentenyladenosin
ISCK	isoprenoidní cytokininy
JA	kyselina jasmonová
K	kinetin
LC	kapalinová chromatografie
MeoT	<i>ortho</i> -methoxytopolin
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
<i>mTR</i>	<i>meta</i> -topolin ribosid
<i>oT</i>	<i>ortho</i> -topolin
<i>oTR</i>	<i>ortho</i> -topolin ribosid
PHA	fenolové kyseliny
PIS	product ion scan
<i>pT</i>	<i>para</i> -topolin
RUBISCO	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa
SA	kyselina salicylová
SCX	silný kationtový iontoměnič
SPE	extrakce na pevné fázi
TAE	tris-acetát-EDTA
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie