Zajímavé přednášky z chemie a biologie pro SŠ pedagogy

Ludmila Zajoncová a kolektiv

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta

Olomouc 2013

Oponenti: Mgr. Hana Lovětínská
Mgr. Lada Macháčová

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv
a může zakládat občanskoprávní, správněprávní, popř. trestněprávní odpovědnost.

1. vydání

© Ludmila Zajoncová a kolektiv, 2013
© Univerzita Palackého v Olomouci, 2013

ISBN 978-80-244-3670-8

Obsah

Předmluva 5
Ludmila Zajoncová

Barevné hry se světlem – co nám mohou říci o biomolekulách? 7
Martin Kubala

Rostlinné hormony – malé molekuly s velkým významem 19
Petr Tarkowski

Nanotechnologie – principy a aplikace na příkladu nanočástic stříbra ... 31
Libor Kvítek

Tajuplný svět mechorostů 44
Zbyněk Hradílek

Botanická zahrada Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci 55
David Cigánek

Proces kriminalistické identifikace pomocí DNA profilování 66
Jiří Drábek

Zajímavý svět sinic a řas 76
Petr Hašler

Molekulární markery využívané při studiu variability rostlin 93
Miloslav Kitner

Předmluva

Cílem projektu Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů – Přírodní vědy v 21. století, řešeného v rámci Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost, je podpořit zájem SŠ studentů o přírodní vědy, především chemii a biologii a zvýšit kvalitu vzdělávání v těchto oborech. Výstupem je sada experimentů z chemie a biologie na tři různá témata pro soutěže školních kolektivů, kolekce experimentů vhodných pro praktická cvičení středoškolských studentů pořádaná na pracovištích vysoké školy a soubor přednášek, které proběhly během projektu pro středoškolské pedagogy.

V rámci projektu byla vytvořena troje skripta na tři různá témata pro práci přírodovědných kroužků na středních školách, dále skriptum experimentů, které mohou studenti provádět v laboratořích vysoké školy, a miniskriptum přednášek pro středoškolské pedagogy. Skripta jsou určena středoškolským pedagogům pro obohacení experimentální výuky v předmětech chemie a biologie a pro práci přírodovědných kroužků.

Olomouc, 2013

doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
hlavní řešitelka projektu

Barevné hry se světlem – co nám mohou říci o biomolekulách?

Martin Kubala

Katedra biofyziky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Přednáška proběhla dne 31. ledna 2011.

Úvod

Zhruba 80 % podnětů, které dostáváme, získáváme pomocí zraku. Naše vnímání je tedy do velké míry závislé na vizuálních vjemech a pro naše chápání světa je důležité věci vidět. V přírodě se běžně setkáváme s objekty, jejichž rozměry se liší o několik řádů. Dá se říci, že pohodlně vnímáme objekty, které se příliš neliší od velikosti nás samých (jednotky m), zhruba od 10^4 m (krajinné prvky) do 10^{-4} m (tloušťka lidského vlasu). V živé přírodě nás však zajímají objekty ještě mnohem menší. Při sledování buněk (10^{-5} m) nebo jejich organel (10^{-6} m) ještě můžeme našemu zraku vypomoci optickým mikroskopem, ale při pokusu o další zvětšování obrazu začneme narážet na vlnové vlastnosti světla. Díky difrakci se začne bod jevit jako kroužek a další zvětšování obrazu už tedy ztrácí smysl. Tzv. Rayleighovo kritérium udává, že abychom dokázali rozlišit v mikroskopu dva body, musí být tyto body vzdáleny alespoň o vzdálenost d, přičemž

$$d = \frac{0{,}61\lambda}{NA}$$

kde λ je vlnová délka světla a NA je numerická apertura objektivu (což v praxi bývá číslo blízké 1). Uvažujeme-li rozsah viditelného světla v intervalu zhruba 390–790 nm, snadným dosazením zjistíme, že pro sledování objektů menších než zhruba 250 nm už našemu zraku nepomůže ani mikroskop.

Současným trendem ve všech přírodních vědách je ale chápání přírody na molekulárním základě. Zde se však dostáváme k rozměrům mnohem menším, např. typická tloušťka buněčné membrány je 4–10 nm a nejmenší

důležitou vzdáleností je v chemii vzdálenost mezi dvěma atomy v molekule (např. délka vazby C-C je zhruba 0,15 nm). Jak už bylo zmíněno výše, na tyto objekty je těžké se podívat přímo a často jsme vděčni i za jakoukoliv dílčí informaci z nanosvěta.

Velmi efektivním způsobem, jak tyto informace získat, je sledovat odezvu molekul na interakci se světlem. Výhodou těchto metod je, že jsou neinvazivní (tj. nezasahují do zkoumaného vzorku) a nedestruktivní, a proto je možné zkoumat molekuly nejen izolované ve zkumavce, ale v mnoha případech i *in vivo*.

Vnitřní energie molekul

Každá molekula je charakterizována složením a prostorovým uspořádáním svých atomů (to je to, co bychom chtěli vidět!). Části molekuly se vůči sobě neustále pohybují a od těchto pohybů se odvíjí vnitřní energie molekuly. Jedná se především o vibrace ($\sim 4 \cdot 10^{-20}$ J) a rotace ($\sim 4 \cdot 10^{-22}$ J) atomových jader. Pokud dojde ke změně ve struktuře elektronového obalu ($\sim 4 \cdot 10^{-19}$ J), hovoříme o přechodu molekuly do excitovaného stavu. Podle kvantového modelu se může molekula nacházet jen v určitých stavech a přechod z jednoho stavu do druhého vyžaduje přijetí nebo odevzdání energetického kvanta, jehož velikost je rovna právě rozdílu energií mezi počátečním a konečným stavem. Soubor energetických stavů molekuly označujeme jako **spektrum**.

Spektrum charakterizuje molekulu a její stav a slouží nám k identifikaci molekul stejně jako otisky prstů k identifikaci člověka. Je třeba ovšem upozornit, že vztah mezi strukturou a spektrem je podobný vztahu předmětu a jeho stínu a je do značné míry jednosměrný. Pokud známe strukturu, umíme teoreticky předpovědět, jak bude vypadat spektrum; ale pokud známe spektrum, není jednoduché určit z něho strukturu molekuly. V praxi tedy často spočítáme spektra pro více možných konformací molekuly a změřením spektra reálného vzorku rozhodneme, která z nich je správná (popř. určíme poměrné zastoupení více komponent).

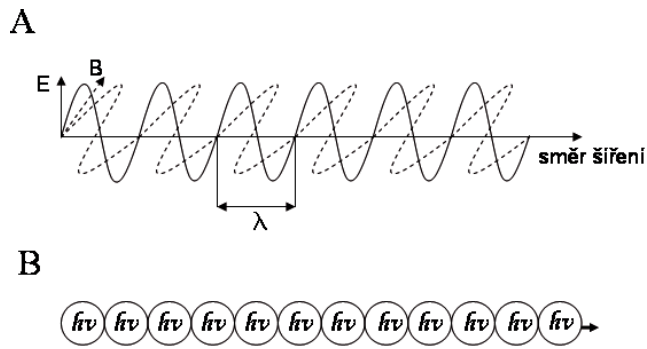
Energie světla

Na světelný paprsek můžeme nahlížet jako na elektromagnetickou vlnu, která se šíří prostorem, nebo jako na proud částic, kterým říkáme fotony

(tzv. vlnově-korpuskulární dualismus, Obr. 1). Energie E jednoho fotonu (kvanta energie) souvisí s vlnovou délkou λ podle vztahu

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

kde h je Planckova konstanta a c rychlost světla ve vakuu. Vidíme tedy, že energie fotonu je nepřímo úměrná vlnové délce světla. Dosazením do tohoto vzorce se snadno přesvědčíme, že např. pro λ = 500 nm dostáváme $E = 4 \cdot 10^{-19}$ J, tedy energii, která je nutná pro přechod molekuly do excitovaného stavu. Použitím světla ve viditelné oblasti spektra tedy můžeme způsobit změny v elektronovém obalu molekuly.



Obr. 1 Vlastnosti světla. (A) Světlo jako elektromagnetické vlnění, ve kterém kmitají vektory elektrického (E) a magnetického (B) pole ve směru kolmém na směr šíření světla (vektory E a B jsou navzájem taktéž kolmé). Vlna je charakterizována vlnovou délkou λ a intenzitou elektromagnetického pole. (B) Světlo jako proud částic (fotonů), z nichž každá nese kvantum energie o velikosti hν, kde h je Planckova konstanta a ν je vlnočet (počet vln na 1 metr). Světlo je charakterizováno energií jednoho fotonu a jejich počtem

Spektrální omezení

V praxi mají přístroje trochu posunuté hranice své použitelnosti na obou stranách spektra. Na krátkovlnné straně jsme omezení absorpcí dvouatomových molekul (O_2, N_2) pod 190 nm, u levnějších přístrojů také propustností optiky, neboť pod 360 nm začíná absorbovat sklo (pro oblast 190–360 nm musíme používat dražší křemennou optiku). Na dlouhovlnné straně nás omezuje absorpce vodní páry a CO_2 nad 900 nm (to je možné řešit profu-

kováním aparatury dusíkem) a dále spektrální rozsah detektoru, přičemž běžně používané detektory mají dlouhovlnný limit mezi 820 nm a 1100 nm.

Interakce světla s hmotou

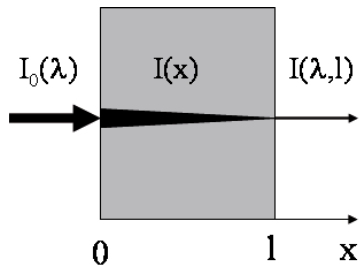
Při interakci světla s hmotou může docházet k několika druhům interakcí. Při interakcích jako je elastický rozptyl nebo odraz dochází pouze ke změně směru světla, ale nedochází ke změnám energie a těmito jevy se zde zabývat nebudeme. Dále pojednáme o případech, kdy molekula pohltí světlo (absorpce) a dojde ke zvýšení její vnitřní energie, tj. dostane se do excitovaného stavu, a o jevu opačném, kdy molekula při přechodu z excitovaného stavu zpět do základního vyzáří foton (emise).

Absorpce

Při průchodu světla látkou dochází díky absorpci k postupnému zeslabování intenzity světla (Obr. 2) podle Lambert-Beerova zákona:

$$I(\lambda, l) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) cl}$$

kde I_0 je intenzita dopadajícího svazku, I intenzita prošlého svazku, ε je molární absorpční koeficient, jehož hodnota a závislost na vlnové délce charakterizuje danou látku, c je molární koncentrace vzorku a l je délka optické dráhy.



Obr. 2 Absorpce světla vzorkem. Při průchodu světla vzorkem dochází k exponenciálnímu poklesu intenzity v závislosti na tloušťce vzorku l, jeho koncentraci c a na vlnové délce světla λ

V praxi přístroje většinou udávají hodnotu absorbance A

$$A(\lambda) = -\log\frac{I(\lambda,l)}{I_0(\lambda)} = \varepsilon(\lambda)\cdot c\cdot l$$

To je veličina velmi praktická, neboť je přímo úměrná koncentraci vzorku. Pokud navíc měříme ve standardní kyvetě s optickou dráhou 1 cm a molární absorpční koeficient máme udaný v jednotkách $mol^{-1}\cdot l\cdot cm^{-1}$, pak prostým podílem A/ε obdržíme koncentraci vzorku v jednotkách $mol\cdot l^{-1}$.

V praxi nejprve zjistíme I_0 měřením intenzity světla bez vzorku (většinou umístíme do svazku kyvetu s čistým rozpouštědlem) a poté vložíme do svazku kyvetu se vzorkem a odečteme hodnotu I. Z těchto dvou hodnot potom spočítáme absorbanci, přičemž většina přístrojů to provádí automaticky. Pomocí tabelovaných hodnot ε potom spočítáme koncentraci. Měření absorbance je tedy velmi rychlé a jednoduché, a proto je to nejčastěji užívaná metoda pro stanovení koncentrace látek v roztocích.

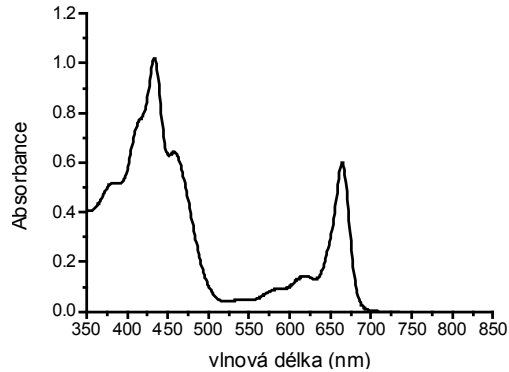
Kromě samotné hodnoty molárního absorpčního koeficientu je důležitou charakteristikou každé látky závislost molárního absorpčního koeficientu (nebo absorbance) na vlnové délce. Tuto závislost označujeme jako absorpční spektrum a můžeme pomocí něj látku identifikovat. Je třeba upozornit na to, že absorpční spektrum se může měnit při interakcích s dalšími molekulami. Tento fakt na jednu stranu klade nároky na přesnou specifikaci podmínek experimentu, na druhou stranu ho často využíváme při studiu molekulárních interakcí.

Jak vnímáme barvy

Na sítnici našeho oka máme čtyři typy detektorů. Tyčinkami vnímáme pouze intenzitu světla, barvy pak vnímáme třemi typy čípků, které podle barvy světla, jež pohlcují, označujeme jako modré (λ_{max} = 420 nm), zelené (λ_{max} = 530 nm) a červené (λ_{max} = 560 nm).[1] Integrace signálu z těchto tří receptorů v gangliových buňkách potom určuje, jak vnímáme barvu předmětu. Zajímavostí je, že u všech receptorů je pigmentem 11-cis-retinal, který po absorpci fotonu přejde do all-trans konformace, a receptory se od sebe liší sekvencí proteinů, které retinal váží.

[1] Je vidět, že vlnová délka maxima přesně neodpovídá označení barvy, přesný tvar absorpčních spekter jednotlivých receptorů je např. na http://www.unm.edu/~toolson/human_cone_response.htm.

Při vnímání barev předmětů je třeba si uvědomit, že vnímáme to světlo, které se dostane do našeho oka. Jinými slovy, vidíme právě ty barvy, které předmět nepohlcuje, ale odráží! Pokud předmět nepohlcuje žádnou část viditelného rozsahu spektra, vnímáme ho jako bílý nebo průhledný, pokud naopak absorbuje všechno viditelné světlo, vnímáme ho jako černý. Pokud část viditelného světla předmět pohlcuje a část odráží, vnímáme ho jako barevný. Příkladem může být absorpční spektrum zeleného pigmentu rostlin chlorofylu, kde vidíme silné absorpční pásy v modro-fialové a červené části spektra, zatímco v zelené části je absorpce slabá (Obr. 3).



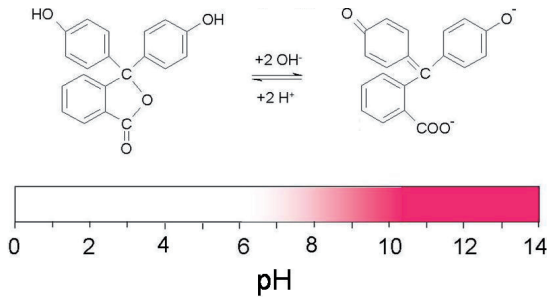
Obr. 3 Absorpční spektrum extraktu listu ječmene v 80% acetonu. Absorpční pásy okolo 435 nm a 665 nm přísluší chlorofylu

Barevné efekty v přírodě

Vztah mezi absorpčním spektrem a strukturou molekuly je poměrně složitý, ale ukazuje se, že fotony ve viditelné nebo blízké UV oblasti spektra mají dostatečnou energii na to, aby přivedly do excitovaného stavu π-elektrony, čili molekuly, které obsahují aromatické cykly nebo systémy konjugovaných dvojných vazeb.[2] Z biologicky významných molekul může být příkladem již výše zmíněný chlorofyl nebo např. NADH, FAD, hemoglobin či karotenoidy. Vidíme tedy, že pokud je organická molekula barevná (což znamená, že absorbuje někde ve viditelné části spektra), můžeme bez dalších informací o její struktuře říci, že obsahuje dvojné vazby.

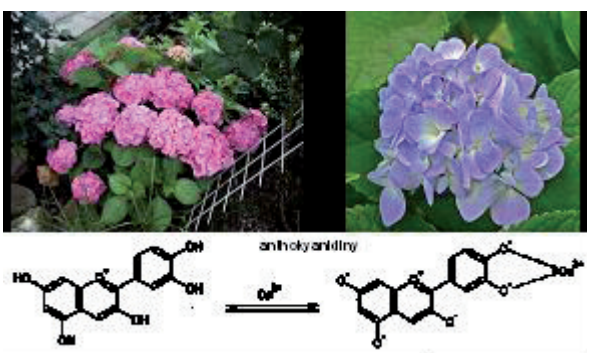
[2] Organické molekuly, které obsahují pouze jednoduché vazby, typicky absorbují světlo o vlnových délkách kratších než 200 nm.

Nyní si můžeme vysvětlit např. chování barevného indikátoru pH fenolftaleinu, který je v kyselém prostředí bezbarvý, zatímco v zásaditém prostředí se barví do červena (Obr. 4). Červená barva zásadité formy ukazuje, že molekula nepohlcuje červenou část spektra, a absorpční pás se nachází v modré části spektra. Protonace v kyselém prostředí má za následek posun spektra o několik desítek nm a absorpční pás se posune do UV oblasti. Ve viditelné oblasti spektra již k absorpci nedochází a vzorek nám proto připadá bezbarvý.



Obr. 4 Barevné přechody fenolftaleinu

S podobným efektem se můžeme setkat i v našich zahradách. Květy hortenzií mají při růstu na kyselé půdě růžovou barvu, zatímco v zásaditých půdách se barví do modro-fialova (Obr. 5). Je to proto, že květy obsahují barviva anthokyanidiny, které mohou v zásadité formě koordinovat kationty Ca^{2+}, což má za následek posun absorpčního spektra.



Obr. 5 Změna barvy květů hortenzie podle kyselosti půdy

Zajímavá je také reakce některých jednobuněčných organizmů na světlo. Rozlišujeme tři druhy reakcí:

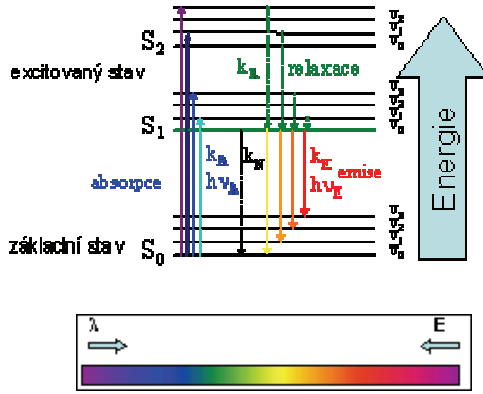
1. fotokineze – pohyb závisí na intenzitě světla, nezávisle na tom, odkud přichází,
2. fotofobní reakce – jedná se o úlekovou reakci, která se projevuje náhlou a jen přechodnou změnou pohybu (libovolným směrem),
3. fototaxe – orientovaný pohyb ve směru, nebo proti směru, ze kterého přichází světlo, např. u bakterie *Rhodospirillum centenum* bylo zjištěno, že se pohybuje od světla při osvětlení pod 650 nm, ale ke světlu při osvětlení nad 650 nm.

Emise

Některé molekuly se mohou při přechodu z excitovaného stavu zpět do základního zbavit přebytečné energie tím, že vyzáří foton, a obecně tyto jevy označujeme jako luminescence (z lat. lumen = světlo). Podle způsobu, jakým se molekula dostala do excitovaného stavu, pak přidáváme ještě různé předpony a mluvíme např. o katodoluminiscenci (vzniká po dopadu elektronů např. v televizních obrazovkách), elektroluminiscenci (vzniká při průchodu elektrického proudu např. v LED diodách), rentgenoluminiscenci (vzniká po dopadu rentgenového záření), termoluminiscenci (je vyvolaná ohřevem), chemiluminiscenci (když jeden z produktů exotermní reakce vzniká v excitovaném stavu) atd. Z hlediska zkoumání biomolekul jsou nejvýznamnější případy fotoluminiscence, kdy molekula je přivedena do excitovaného stavu po absorpci fotonu.

Fluorescence a fosforescence

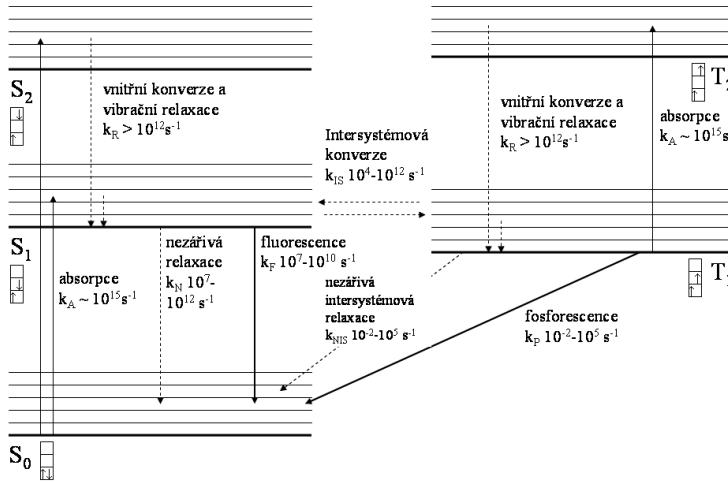
Velice zajímavým fenoménem je to, že u fotoluminiscencí má vyzářené světlo jinou vlnovou délku než světlo absorbované. Populárně tedy můžeme říci, že některé molekuly mají schopnost měnit barvu světla. Dnes si tento proces vysvětlujeme podle tzv. Jablońského diagramu (Obr. 6).



Obr. 6 Zjednodušený Jablońského diagram. Tlusté čáry označují nejnižší energie elektronových stavů, tenčí čáry pak příslušné vyšší vibrační stavy. Plné šipky označují procesy spojené s absorpcí nebo emisí fotonu, přerušované šipky označují nezářivé přechody

Absorpce fotonu s energií $h\nu_A$ přivede molekulu ze základního stavu S_0 do excitovaného stavu S_n, přičemž molekula může přejít na libovolnou vibrační hladinu libovolného vyššího excitovaného stavu. Poté dochází k velmi rychlým vnitřním relaxacím (řádově ps) na nejnižší vibrační hladinu prvního excitovaného stavu, která je metastabilní (doba života typicky ns). Odtud potom dochází k přechodu do základního stavu, což může být spojeno s vyzářením (emisí) fotonu o energii $h\nu_E$. Protože relaxace znamenají z energetického hlediska ztráty energie, má vyzářený foton vždy menší energii a tedy větší vlnovou délku než foton absorbovaný (tzv. Stokesův posuv).

Při fotoluminescenci hraje důležitou roli spinový stav molekuly. Většina molekul má základní stav singletní, tzn., že celkový spin je rovný 0 a tedy průmět spinu do osy z může nabývat pouze jedné hodnoty (0). Pokud se všechny uvedené procesy odehrávají jen v systému singletních stavů, je celý proces velmi rychlý (typicky řádově ns) a nazýváme ho fluorescencí. Pokud však molekula po excitaci přeskočí do systému tripletních stavů (celkový spin 1, a tedy možné průměty do osy z –1, 0, 1), je pro molekulu obtížné vrátit se zpět do základního stavu. Musí totiž dojít k současné změně dvou parametrů (spinu a elektronového stavu), což je málo pravděpodobné a celý proces probíhá velmi pomalu (typicky μs až desítky s). Tento jev nazýváme fosforescencí (Obr. 7).



Obr. 7 Rozšířené Jablońského schéma. Legenda je stejná jako u Obr. 6, S označuje singletní stavy, T tripletní stavy

Využití fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopie je unikátní svou extrémní citlivostí. Díky tomu, že světlo, které molekuly excituje, má jinou vlnovou délku než světlo emitované, můžeme ho pomocí monochromátorů nebo optických filtrů velmi dobře eliminovat a emisi vzorku potom měříme proti (teoreticky) nulovému pozadí. V běžně dostupných přístrojích můžeme detekovat až femtomolární koncentrace látek, existují ale i metody, ve kterých je možné sledovat jednotlivé molekuly!

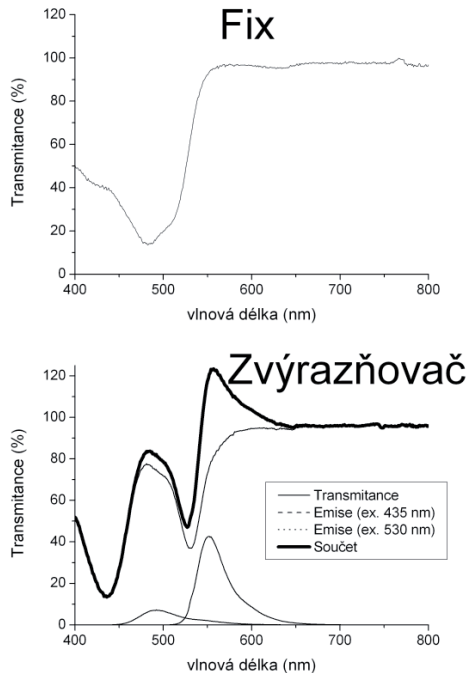
Mezi nejčastěji sledované parametry patří intenzita fluorescence pro dané vlnové délky excitace a emise, excitační spektrum (tj. závislost intenzity fluorescence na vlnové délce excitace), emisní spektrum (tj. závislost intenzity fluorescence na vlnové délce excitace) a doba života excitovaného stavu. Díky většímu množství nezávislých parametrů, které můžeme sledovat, máme k dispozici pestrou škálu experimentálních technik a identifikace molekul je jednoznačnější.

Další výhodou je to, že molekuly, které mohou vyzařovat měřitelnou fluorescenci i za pokojové teploty, jsou relativně vzácné a často jsme schopni dosáhnout situace, kdy ve vzorku emituje pouze jeden druh molekul. Změny fluorescenčních parametrů potom reflektují změny v okolí fluoroforu,

přičemž díky jednoduchosti signálu je jednoduchá i interpretace dat, a to i při analýze velmi složitých systémů, jako jsou např. buňky. Fluorescenční značky a sondy nám pak mohou poskytnout informace např. o pH či koncentraci jiných iontů, o polaritě okolního prostředí, membránovém potenciálu či interakci dvou molekul. Pomocí některých technik můžeme získat i dílčí informace o struktuře biomolekul.

Aplikace v běžném životě

S fluorescencí a fosforescencí se běžně setkáváme v každodenním životě. Fluorescenční barviva mají na svědomí výrazné barvy např. některých nápojů, oděvů atd. Princip jejich fungování nám přiblíží srovnání oranžového fixu a oranžového zvýrazňovače (Obr. 8).



Obr. 8 Srovnání oranžového fixu a oranžového zvýrazňovače. Transmitance je doplňkovou veličinou k absorbanci a je definovaná jako poměr intenzity světla prošlého k intenzitě světla dopadajícího (I/I_0), tzn. nízká transmitance značí vysokou absorbanci a opačně

Zatímco barvivo v obyčejném fixu pouze absorbuje krátkovlnnou část spektra a dlouhovlnnou odráží či propouští, u zvýrazňovače navíc dochází díky fluorescenci ke konverzi fotonů modré a zelené časti spektra na fotony ze žlutooranžové části spektra a díky tomu se nám oranžová barva u zvýrazňovače zdá jasnější než u fixu.

Fluorescenci poznáme podle toho, že když vypneme zdroj budícího světla, okamžitě zhasne i fluorescence. V případě fosforescence pozorujeme, že k emisi světla dochází i dlouho po vypnutí zdroje světla. S fosforeskujícími látkami se můžeme setkat např. na ručičkách budíků nebo dekorativních hvězdičkách.

Závěr

Barevné molekuly nabízejí fascinující podívanou, která si zaslouží naši pozornost. Ve výuce umožňují přitažlivým způsobem přiblížit abstraktní pojmy jako např. foton, základní a excitovaný stav nebo spin. V moderní vědě potom tvoří most, který spojuje fyziku s chemií a biologií, a aplikace, které jsou založeny na hrách s barvami, nás provázejí v každodenním životě.

Rostlinné hormony – malé molekuly s velkým významem

Petr Tarkowski

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Přednáška proběhla dne 6. února 2013.

Růst, diferenciace a vývoj rostlin

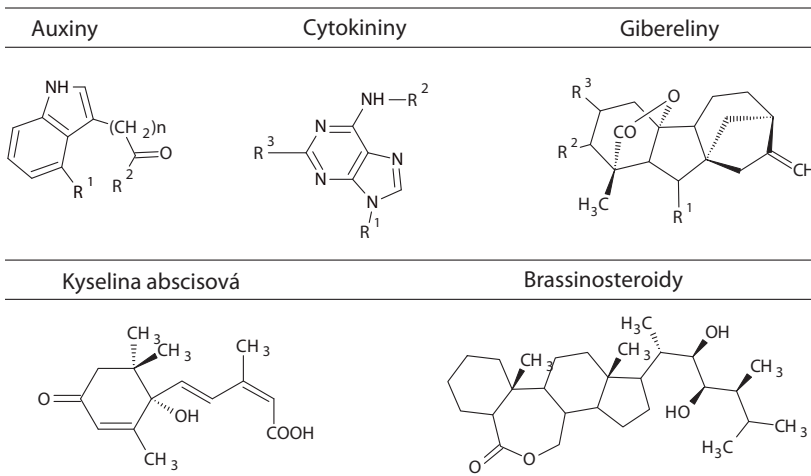
Rostliny jsou mnohobuněčné organizmy, které v průběhu života mění svoji podobu jinak, než je tomu u živočichů. Rostliny jsou schopny měnit nejen svůj tvar a velikost, ale i počet orgánů, a to v průběhu prakticky celého životního cyklu (u živočichů je počet orgánů dán již v průběhu vývoje zárodku jedince). Rostliny se tak přizpůsobují vnějším podmínkám. Reagují na dostupnost vody, živin a světla, stejně jako na přítomnost jiných organizmů. **Růst** je typickým projevem živých organizmů. Při tomto procesu dochází k přibývání hmoty a objemu, což je dáno současným nárůstem objemu buněk a jejich počtu. Takto definovaný růst postihuje pouze kvantitativní (množstevní) změny. Růst je však neoddělitelně spojen s diferenciací. **Diferenciace** je proces, při němž jsou nespecializované buňky změněny na buňky specializované pro určitá pletiva, orgány a funkce. Časový sled růstových a diferenciačních změn označujeme jako **vývoj**.

Rostlinné hormony – integrátory signálů

Vývoj rostliny prochází několika fázemi. Každá vývojová fáze je více, či méně závislá na vnitřních a vnějších podnětech. Rostlinné hormony (fytohormony) slouží jako signální molekuly, které integrují (spojují) vnější podněty (světlo a teplo) s podněty uvnitř organizmu. Prostřednictvím fytohormonů komunikují mezi sebou nejenom jednotlivé buňky, ale i orgány. Takto fytohormony regulují všechny důležité vývojové procesy od formování embrya, přes klíčení semen, růst a architekturu jednotlivých orgánů, až po kvetení, zrání plodů a stárnutí rostliny (senescenci). Regulace vývojových procesů je většinou výsledkem působení několika různých hormonů současně, při-

čemž někdy působí hormony proti sobě, jindy společně. Například plynný hormon ethylen urychluje stárnutí a opadávání listů, zatímco cytokininy tyto procesy brzdí. V mnoha případech jde tedy o to, v jakém poměru jsou dané fytohormony přítomny. Navíc je důležitá i absolutní koncentrace, neboť rostlinné hormony mají schopnost při určité koncentraci stimulovat růstovou reakci, zatímco při vyšší koncentraci působí proti ní – reakci brzdí (inhibují).

Označení hormony si tyto signální molekuly vysloužily proto, že jsou v některých ohledech podobné živočišným hormonům. Především tím, že regulují významné procesy, přestože se v organizmu vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Na rozdíl od živočišných hormonů, které jsou produkovány specializovanými orgány, mohou fytohormony vznikat na více místech v rostlině. Navíc fytohormony regulují hned několik různých procesů (nikoliv jeden) a jeden proces je regulován obvykle více než jedním fytohormonem. Podle jejich původu a chemické struktury dělíme fytohormony na: **auxiny**, **cytokininy**, **gibereliny**, **kyselinu abscisovou**, **ethylen** a nově i **brassinosteroidy**, **jasmonáty** a **strigolaktony**. Mimo ně se v rostlinách vyskytují další látky s regulační aktivitou. Ty ale mezi hormony neřadíme, protože účinkují ve vyšších koncentracích či neznáme dostatečně obecnost jejich působení. Řadíme sem polyaminy a velkou skupinu fenolových látek.



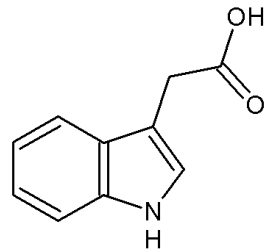
Obr. 1 Základní strukturní vzorce pěti klasických skupin fytohormonů

Auxiny

Auxin je nejdéle známým rostlinným hormonem. Objev auxinu vyšel ze studia **fototropizmu** a **gravitropizmu**. Fototropizmus je termín popisující ohyb rostlin (nebo jejich částí) za světlem. Rostliny mění svůj růst tak, aby listy a ostatní části rostlin, ve kterých probíhá fotosyntéza (a potřebují světlo), byly osvětleny co nejvíce. Gravitropizmus pak popisuje orientaci rostlinných orgánů. Pozitivně gravitropické orgány rostou dolů (kořeny), negativně gravitropické orgány rostou vzhůru (prýt). Rostlinný hormon auxin reguluje tyto tropismy. Struktura molekuly auxinu byla určena v první polovině 20. století. Auxin je kyselina indolyl-3-octová. Dalšími přirozeně se vyskytujícími auxiny jsou kyseliny indolyl-3-máselná, 4-chlorindolyl--3-octová a fenyloctová. Rostlinná pletiva obsahují kromě těchto auxinů i jejich cukerné a aminokyselinové konjugáty a různé oxidační produkty (O-[indolyl-3-acetyl]-β-D-glukóza; oxindolyl-3-octová kyselina). Biosyntéza auxinů vychází z aminokyseliny L-tryptofanu. Auxiny, stejně jako všechny ostatní fytohormony, se v rostlinách vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (desítky až stovky pmol v jednom gramu čerstvé hmoty). Koncentrace však není ve všech částech rostliny stejná. Obecně platí, že nejvyšší koncentrace je u vrcholu. Auxin je transportován směrem dolů (bazipetálně) od vrcholu k bázi. Dále je syntetizován v mladých listech, květních orgánech a vyvíjejících se plodech, zejména semenech.

Mezi hlavní fyziologické účinky auxinů patří **stimulace prodlužovacího růstu (tropismy)**, **ovlivňování apikální dominance**, **stimulace dělení buněk** a **stimulace zakořeňování**. Se stimulací dlouživého růstu souvisí role auxinů v regulaci tropismů. Auxin se hromadí v místech, kde v důsledku působení gravitace či jednostranného osvětlení dochází k nerovnoměrnému růstu (ohybu). **Apikální dominanci** lodyhy můžeme popsat jako nadvládu vrcholu lodyhy nad postranními pupeny. Vrcholový pupen produkuje velké množství auxinu, které brání postranním pupenům v růstu. Určuje tedy, do jaké míry se bude rostlina rozvětvovat. U některých druhů vrcholový pupen zadržuje růst postranních pupenů zcela (hrách setý), u jiných umožňuje normální větvení. Existují i druhy, u nichž se vliv vrcholového pupenu nevyskytuje vůbec. Obdobně je tomu u dominance plodů. Auxin je z plodu transportován dolů k dalším plodům a brzdí tak jejich další růst. Auxin významně stimuluje dělení buněk a zakořeňování. Toho se využívá v moderních biotechnologiích pěstování a množení rostlin (tkáňové kul-

tury). Přípravky obsahující auxin se v zahradnictví používají ke stimulaci zakořeňování řízků.



Obr. 2 Kyselina indolyl-3-octová (auxin)

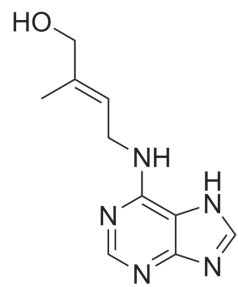
Cytokininy

Před sto lety rakouský botanik Gottlieb Haberlandt zveřejnil výsledky experimentů věnovaných buněčnému dělení. Vyslovil tehdy domněnku, že rostliny obsahují „rozpustný faktor", který může stimulovat buněčné dělení. V padesátých letech byl tento faktor izolován z autoklávované DNA spermatu mořského sledě v laboratoři Folke Skooga a nazván kinetin. Byl popsán jako látka stimulující, v přítomnosti auxinu, buněčné dělení rostlinných buněk. Látky s touto biologickou aktivitou, původně označené jako kininy, byly později přejmenovány na cytokininy, aby nedocházelo k jejich záměně s látkami známými z fyziologie živočichů. Jako cytokininy jsou dnes označovány jak látky s danou biologickou aktivitou, tak i sloučeniny s obdobnou chemickou strukturou. Z tohoto důvodu lze v odborné literatuře nalézt informace o cytokininech bez cytokininové aktivity (např. cukerné konjugáty), či látkách strukturně zcela odlišných od přirozených cytokininů, avšak s cytokininovou aktivitou (deriváty fenylmočoviny), přičemž všechny tyto sloučeniny jsou jako cytokininy označovány. První přirozeně se vyskytující cytokinin, zeatin, byl objeven nezávisle na sobě Lethamem a Millerem, kteří tento objev publikovali v letech 1963 a 1965.

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou odvozeny od adeninu. Postranní řetězec má buď isoprenoidní (alifatický), nebo aromatický charakter. Právě tento postranní řetězec udílí cytokininům jejich aktivitu. Dnes je známo více než padesát různých přírodních cytokininů a jejich derivátů. Jednotlivé složeniny se mezi sebou liší nejen biologickou aktivitou, ale i fyzikálně-che-

mickými vlastnostmi. Mezi hlavní zástupce isoprenoidních cytokininů patří isopentenyladenin a zeatin, mezi aromatické pak patří 6-benzylaminopurin a jeho hydroxylované deriváty zvané topoliny (poprvé izolovány z topolu kanadského). Isoprenoidní cytokininy jsou syntetizovány z adenosinových nukleotidů (AMP, ADP, ATP) a isoprenoidního prekurzoru (isopentenylpyrofosfát, iPP). Biosyntéza aromatických cytokininů zatím nebyla objasněna. Cytokininy jsou syntetizovány prakticky ve všech orgánech rostlinného těla, především v kořeni, mladých vyvíjejících se listech, ale i plodech. Jejich koncentrace jsou řádově stokrát nižší, než je tomu u auxinů (obvykle jednotky pmol v jednom gramu čerstvé hmoty, ale i méně). Cytokininy mohou být v případě potřeby transportovány z kořene do prýtu a naopak.

Hlavními fyziologickými účinky cytokininů jsou **stimulace buněčného dělení**, **regenerace orgánů**, **inhibice stárnutí pletiv** a **potlačování apikální dominance**. První dva jmenované účinky se využívají při pěstování a množení rostlin ve sterilních podmínkách (tkáňové kultury). Použití fytohormonů cytokininů jako složek kultivačních médií spočívá zejména v jeho schopnosti iniciovat růst nadzemní části rostliny (za určitých podmínek i kořene) z jakékoliv uříznuté části rostliny (list, stonek, kořen). Navíc je možné pomocí cytokininu regulovat odnožování. Takto se dá z jedné mateřské rostlinky velmi efektivně namnožit i několik tisíc naprosto identických jedinců. Cytokininy dále inhibují stárnutí pletiv. To znamená, že brání rozkladu chlorofylu a potažmo nukleových kyselin a proteinů. Rostliny se zvýšeným obsahem cytokininů zůstávají dlouho zelené. V neposlední řadě tyto fytohormony působí jako antagonisté auxinu, tj. potlačují apikální dominanci. Uřízneme-li rostlině vrchol lodyhy, zvýší se koncentrace cytokininů v úžlabních pupenech. Dojde tak k větvení stonku.



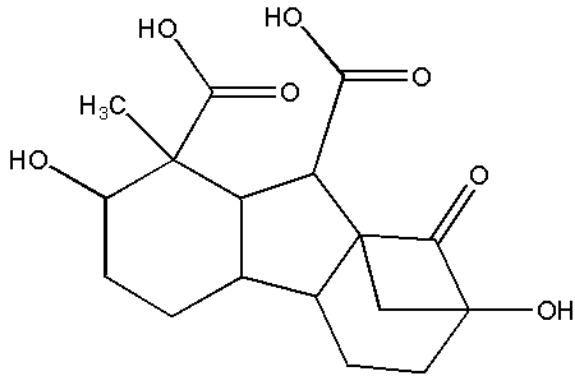
Obr. 3 *Trans*-zeatin

Gibereliny

Gibereliny jsou známy od třicátých let minulého století jako původci choroby rýže zvané *bakanae*. Choroba je vyvolána houbou *Gibberella fujikuroi*. Napadené rostliny mají dlouhé slabé stonky světle žluté barvy (etiolované), poléhají a netvoří zrna. Dnes je známo více než 130 giberelinů, aktivních je však jen velmi málo. Všechny ostatní jsou jejich degradačními produkty nebo meziprodukty biosyntézy. Ta vychází, podobně jako mnoha ostatních terpenoidů, z kyseliny mevalonové. Po strukturní stránce jsou gibereliny tetracyklické diterpenoidní karboxylové kyseliny obsahující 19 nebo 20 uhlíků. Gibereliny se tvoří pravděpodobně ve všech rostlinných orgánech. Nejvyšší hladiny lze nalézt v místech aktivního růstu a nově se tvořících orgánů. Jejich hladiny jsou podobně nízké, jako je tomu u cytokininů. Chemická analýza je nesmírně obtížná nejen proto, že koncentrace jsou velmi nízké, ale také proto, že jednotlivých giberelinů v rostlinných pletivech je vysoký počet a jsou si navzájem velmi podobné.

Podobně jako auxiny, stimulují i gibereliny **dlouživý růst**. Dále **indukují kvetení** a **stimulují klíčení**. Na rozdíl od auxinů však gibereliny mají vliv pouze na růst nadzemní části, nikoliv růst kořene. Stimulace dlouživého růstu je dána součtem zvýšeného prodlužování buněk a jejich zvýšeného dělení. Gibereliny indukují kvetení u rostlin s přízemní růžicí listů. Silné účinky byly pozorovány u vysoce polárních derivátů s vysokým počtem hydroxylových skupin. Dále ovlivňují pohlaví květů – u mnoha rostlin vede jejich aplikace k tvorbě samčích květů a potlačení tvorby květů samičích. Dalším důležitým vývojovým procesem, který je regulován fytohormony, je klíčení. Pozitivně ovlivňují klíčení gibereliny, zatímco opačně působí kyselina abscisová. Gibereliny jsou uloženy v semeni ve formě vázané. V průběhu bobtnání semene se z této vázané formy uvolní a indukují tvorbu enzymu α-amylasy. Ta je zodpovědná za štěpení škrobu a zajišťuje tak přísun energie pro klíčící semeno do doby, než je začne rostlinka syntetizovat sama prostřednictvím fotosyntézy.

Gibereliny se nejvíc využívají v ovocnářství, ke zvýšení nasazování plodů. Ve sladovnictví se pak využívá schopnosti kyseliny giberelové indukovat tvorbu α-amylasy. U cukrové třtiny výrazně zvyšují výnos cukru.



Obr. 4 Giberelin

Kyselina abscisová

Kyselina abscisová představuje fytohormon, jehož účinky lze označit za inhibiční. Zatímco auxiny, cytokininy a gibereliny mají na růstové procesy vliv spíše stimulační, u kyseliny abscisové je tomu právě naopak. Tato látka byla objevena v sedmdesátých letech minulého století. Byla izolována z javoru a opadlých mladých listů plodů bavlníku. Kyselina abscisová je seskviterpen s 15 uhlíkovými atomy a cyklickou částí v molekule. Podle orientace karboxylové skupiny na C2 uhlíku rozlišujeme *cis*- a *trans*-izomery. Fyziologicky aktivní je pouze její (+)-*S*-izomer. Její koncentrace se pohybují v řádech desítek až stovek pmol v jednom gramu čerstvé hmoty. Jsou tedy srovnatelné s auxiny. Nejvíce kyseliny se tvoří v dormantních orgánech (pupenech, semenech, hlízách), ale i v rychle rostoucích pletivech. Dormantní jsou takové orgány, v nichž jsou přechodně zastaveny nebo omezeny fyziologické pochody. Například dormantní semeno čeká na vhodné vnější podmínky pro klíčení. V okamžiku kdy je dostatečně dlouhý den, vhodná teplota a dostatek vláhy, nárůst koncentrace giberelinů a pokles koncentrace kyseliny abscisové vede k uvolnění semene z dormance (klidu) a započíná proces klíčení. Tvorba kyseliny abscisové je vyšší za krátkého dne a silně stoupá při nedostatku vláhy. Biosyntéza probíhá prostřednictvím stejných biochemických drah jako biosyntéza giberelinů. Liší se až ve finálních krocích, kdy jsou prekurzory kyseliny abscisové – karotenoidy – štěpeny fotolyticky a produkty této reakce jsou posléze oxidovány.

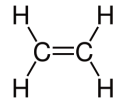
Jak již bylo uvedeno, kyselina abscisová inhibuje růstové a vývojové procesy v rostlinách. Zasahuje do vývoje rostliny např. tam, kde nejsou optimální podmínky pro daný vývojový proces. **Prodlužovací růst** je kyselinou abscisovou inhibován proti účinku auxinů a giberelinů. Naopak stimulačně působí na růst buněk opadové zóny. Způsobuje tak **opad listů a plodů** (stejně jako ethylen). Proti účinku cytokininů, ale společně s ethylenem, působí ve zralých pletivech, kde **urychluje stárnutí**. V neposlední řadě reguluje vodní režim rostlin. Při nedostatku vody například zvýší hydraulickou vodivost kořenů a uzavírá průduchy tak, aby došlo ke snížení odparu vody z listů. Nejvyšší praktické využití asi nacházejí analoga kyseliny abscisové, kterými lze zvýšit odolnost rostlin vůči nedostatku vody a působení nízkých teplot.

Ethylen

Ethylen je doposud jediným známým plynným hormonem, což jej zásadním způsobem odlišuje od všech ostatních rostlinných hormonů. Zařazení tohoto uhlovodíku je správné. Reguluje významné vývojové procesy ve velmi nízkých koncentracích, a to po interakci se svým receptorem (silně hydrofobní bílkovina). Vliv svítiplynu na opad listů byl popsán již na konci 19. století. Ethylen je složkou svítiplynu, která je za opad listů (a plodů) zodpovědná. Ve třicátých letech minulého století bylo prokázáno, že rostliny produkují vlastní ethylen, a mezníkem ve studiu ethylenu se stal rok 1959, kdy byla poprvé k určení koncentrace ethylenu použita plynová chromatografie. Ethylen vzniká z aminokyseliny L-methioninu. Přímým prekurzorem je kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová. Auxin pozitivně reguluje produkci ethylenu. Deaktivace ethylenu probíhá prostřednictvím jeho přeměny na ethylenoxid a CO_2. Koncentrace ethylenu v buňkách je dána jeho rozpustností v cytoplazmě. Většina ethylenu difunduje do mezibuněčných prostor a dále průduchy ven do atmosféry.

Mezi nejvýznamnější fyziologické účinky ethylenu patří **inhibice prodlužovacího růstu** a **stimulace růstu radiálního (tloustnutí)**. Dobře známým je rovněž vliv ethylenu na **zrání plodů** – mnohonásobné zvýšení koncentrace ethylenu vede k nastartování biochemických procesů, které vedou k rozkladu celulózy, pektinů a škrobu (měknutí buněčné stěny, sládnutí plodů). Obdobně u stárnutí listů působí ethylen jako faktor způsobující rozpad buněčných stěn. Praktické použití ethylenu je omezené, s výjimkou dozrávání ovoce v kontrolované atmosféře. Antagonisté ethylenu, stříbrné

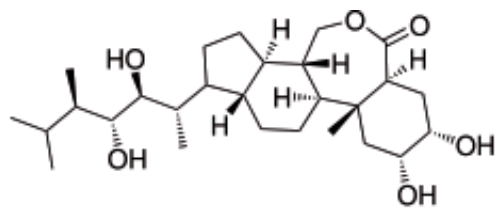
ionty, se používají při skladování řezaných květů. V obilnářství se pak používají jako retardanty přípravky, z nichž se ethylen uvolňuje současně s dalšími složkami.



Obr. 5 Ethylen

Brassinosteroidy

V roce 1979 byl izolován první brassinosteroid z pylu řepky (latinsky *Brassica napus*) – brassinolid. V následujících letech bylo objeveno asi 70 dalších látek strukturně podobných tomuto steroidu, s podobnou biologickou aktivitou, nebo bez ní. Kromě reprodukčních orgánů jsou jejich hladiny prakticky nedetekovatelné. Jejich syntéza probíhá stejně jako u všech ostatních steroidů z isopentenylpyrofosfátu. K nejrozšířenějším patří castasteron a typhasterol. Pro biologickou aktivitu je nutný 7-oxolaktonový kruh či 6-ketonový kruh a sousedící (vicinální) hydroxylové skupiny jak v kruhu A, tak i v postranním řetězci. Brassinosteroidy se podílejí na **stimulaci růstu rostlin i dělení buněk**, **růstu mladých vegetativních pletiv**, **indukují kvetení, zrání plodů, klíčení semen, tvorbu a růst kořenů**, **zvyšují rezistenci proti stresu**.

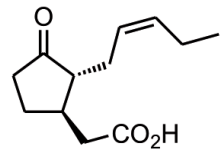


Obr. 6 Brassinolid

Jasmonáty

Kyselina jasmonová a její deriváty, souhrnně nazývány jasmonáty, tvoří další novou skupinu fytohormonů. Obdobně jako u brassinosteroidů byly receptory, bílkoviny interagující s příslušným fytohormonem, nalezeny

docela nedávno. Předtím byly tyto látky označovány jako látky s regulační aktivitou, nikoliv hormony. Po chemické stránce jsou jasmonáty sloučeniny s cyklopentanovým kruhem nesoucím keto- či hydroxyskupiny na pozici C6. Methylace karboxylové skupiny a tvorba konjugátů s izoleucinem patří mezi nejčastější reakce metabolizmu kyseliny jasmonové. Tyto hormony se účastní **inhibice růstu kořene**, **regulují vývoj pylu a prašníků**, **účastní se obranných mechanizmů vůči škůdcům, patogenům** a **odezvy na mechanické poškození rostliny**.

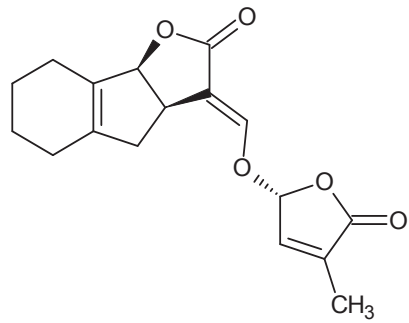


Obr. 7 Kyselina jasmonová

Strigolaktony

Strigolaktony reprezentují další skupinu docela nových fytohormonů. Na rozdíl od ostatních skupin rostlinných hormonů není známo široké spektrum fyziologických procesů, které ovlivňují. O **apikální dominanci** lze hovořit v souvislosti s auxiny a cytokininy. Překvapivě je tento fenomén dán jistou rovnováhou mezi třemi, nikoliv pouze dvěma skupinami fytohormonů. Jak již bylo uvedeno, auxin podporuje vznik a růst orgánů v hlavním pupenu a současně potlačuje, při svém transportu dolů, růst postranních pupenů. Proti němu působí cytokinin, který podporuje růst pupenů. Pomocí studia mutantních rostlin, které se vyznačovaly mimořádně silným větvením, bylo zjištěno, že těmto rostlinám pravděpodobně chybí doposud neznámá látka. Tato látka putuje z kořenů do lodyhy a potlačuje růst pupenů. Jak se ukázalo později, není tato látka biologům tak zcela neznámá. Již dříve objevený strigolakton byl popsán jako sloučenina, která stimuluje klíčení parazitických rostlin. Původní význam strigolaktonu je však zcela jiný. Pokud se rostlinám nedostává fosforu, který potřebují pro svůj růst, vysílají signál (v podobě vyloučení strigolaktonu kořeny), který má přilákat půdní houby. Ty pak vytvoří s rostlinou oboustranně výhodné společenství, v jehož rámci si rostlina s houbou vyměňují látky nezbytné pro jejich růst. Toho však využívají parazitické rostliny, které po zachycení strigolaktonového signálu hostitelskou rostlinu napadnou a nechají se jí živit.

Strigolaktony jsou odvozeny od karotenoidů. Jedná se o tricyklické laktony (kruh A, B a C), které jsou spojeny hydrolyzovatelnou etherickou vazbou s butenolidovou skupinou (kruh D). Kruh A obvykle nese jednu nebo dvě methylové skupiny, a jednu nebo více hydroxylových či dalších skupin na kruzích A a B. Je pozoruhodné, že jejich vliv na klíčení parazitických rostlin je možné pozorovat již od koncentrace $1 \cdot 10^{-15}$ mol/l.



Obr. 8 Obecný strukturní vzorec strigolaktonů

Metody studia fytohormonů

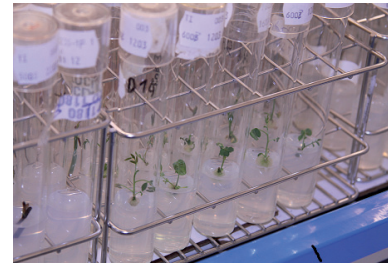
Studium fytohormonů je mezioborová záležitost. Pochopení významu těchto malých molekul v regulaci vývoje rostlin vyžaduje společné úsilí biologů i chemiků. V minulém století se v klasické fyziologii a biochemii používalo ke studiu rostlinných hormonů narušení vnějších podmínek, celistvosti rostliny, inhibice konkrétních enzymů, či aplikace fytohormonů na různé části rostliny. V posledních desetiletích byl rejstřík přístupů rozšířen o moderní metody molekulární biologie a genetiky. Společně s moderními přístupy chemické analýzy jsou objasňovány molekulární mechanizmy účinků fytohormonů, jejich biosyntéza a metabolizmus, receptorové vnímání a přenos hormonálního signálu. Molekulárně-biologické přístupy umožňují pomocí selektivního „vymazání" genu zjistit jeho význam ve studovaném organizmu. Mikroskopické techniky umožňují sledovat vývojové procesy na úrovni buněk a chemická analýza objasňuje otázky výskytu jednotlivých fytohormonů, jejich syntézy, vzájemných přeměn a transportu.

Perspektivy

V minulém století byly fyziologické účinky fytohormonů studovány na úrovni celé rostliny či jejich orgánů. Dnes máme metodiky a přístrojové vybavení k tomu, abychom byli schopni detailněji popsat tyto účinky na úrovni pletiv, či dokonce jednotlivých buněk.

Znalosti získané základním výzkumem rostlinných hormonů nacházejí pochopitelně uplatnění i v praxi. Rostlinné hormony se používají v zahradnictví při množení rostlin *in vitro* (ve zkumavkách), ve sladovnictví, ovocnářství apod. Mutantní rostliny s vylepšenými agronomickými parametry jsou ale studovány až v posledních letech. Téměř veškeré snažení v této oblasti vědy směřuje k produkci plodin s vyššími výnosy, selekci rostlin lépe odolávajícím nepříznivým povětrnostním vlivům (sucho, mráz, intenzita slunečního svitu), či dokonce k plodinám s vylepšenými nutričními parametry. To vše by nebylo možné získat bez pokroku v základním výzkumu.

Obr. 9 Pěstební komora s rostlinkami pěstovanými na kultivačním médiu ve sterilních podmínkách



Obr. 10 Detail rostlin pěstovaných ve zkumavce (*in vitro*)

Nanotechnologie – principy a aplikace na příkladu nanočástic stříbra

Libor Kvítek

Katedra fyzikální chemie a Regionální centrum pro pokročilé materiály a technologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Přednáška proběhla dne 6. února 2013.

Abstrakt

Nanotechnologie, resp. nanomateriály, se ve vědeckých a později i výzkumných laboratořích objevují od počátku 80. let 20. stol. Největší zájem v tomto období vyvolaly uhlíkové nanomateriály – zejména pak fullereny a uhlíkové nanotrubičky. Společně s grafenem objeveným na počátku 21. století jsou tyto uhlíkové nanomateriály zajímavé díky svým unikátním elektrickým vlastnostem, na jejichž základě budou v blízké budoucnosti postaveny zcela nové typy elektronických součástek. Na počátku 21. století se vedle uhlíkových nanomateriálů dostaly do popředí zájmu kovové nanomateriály, především nanomateriály na bázi stříbra, které se díky svým unikátním biologickým vlastnostem objevily v poslední době v mnoha výrobcích denní potřeby lidí, hlavně pak v textilních materiálech. Nanočástice stříbra navíc představují jednu z možných alternativ za penicilinová antibiotika z pohledu neexistující rezistence bakterií vůči jejich baktericidním účinkům při současné nízké toxicitě vůči vyšším organizmům.

Úvod

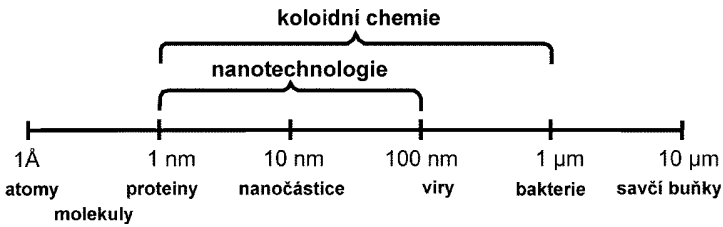
Nanotechnologie představují jeden z hlavních výzkumných a vývojových směrů rozvoje vědy a průmyslu ve 21. století, ovšem základy tohoto oboru byly položeny již v padesátých letech 20. století jedním z nejvýznamnějších fyziků své doby – profesorem Richardem Feyenmanem. Ten na své slavné přednášce s názvem „There's Plenty of Room at the Bottom" („Tam dole je spousta místa")[1–3] přednesené 29. prosince 1959 na California Institute of Technology (Caltech) nastínil možnosti nových technologií umožňu-

jících cílenou manipulaci s jednotlivými atomy či molekulami. Ovšem je nutno poznamenat, že obor nanotechnologie se nezrodil jen tak zčista jasna a obdobně jako v jiných oblastech lidského bádání i zde existoval postupný vývoj, který gradoval právě ve zrození nového oboru. Jakýmsi předchůdcem nanotechnologií se stala koloidní chemie – obor, jehož počátky jsou přibližně o sto let starší a který se zabývá studiem specifických vlastností hmoty rozptýlené do částic neviditelných v optickém mikroskopu, ovšem stále tak velkých, aby si podržely základní rysy samostatné fáze ve vícefázovém systému. Zjednodušeně lze říci, že koloidní chemie se zabývá studiem vlastností objektů o rozměrech od cca 1 nm (10^{-9} m) až do cca 1 μm (10^{-6} m), zatímco nanotechnologie pracují s objekty v zúženém rozsahu velikostí od cca 1 nm až po cca 100 nm. Z tohoto pohledu lze nanotechnologie chápat jako podobor koloidní chemie. Ovšem takovéto pojetí nanotechnologie není úplně přesné. I když tento obor převzal mnoho poznatků a postupů právě z oblasti koloidní chemie, je jeho pojetí chování materiálů v tak malých částečkách výrazně komplexnější, protože na rozdíl od koloidní chemie pracují nanotechnologie s jevy v koloidní chemii nepopsanými. Typicky se jedná o změny elektrických, magnetických a optických vlastností látek související s právě tak malými rozměry částic, tedy s vlastnostmi látek, které klasická koloidní chemie považovala za neměnné.

Vymezení oboru Nanotechnologie

V předchozí části textu bylo naznačeno, že hlavním oborem nanotechnologií je studium přípravy, vlastností a aplikačních možností materiálů rozmělněných do částeček o rozměrech menších než 100 nm, ale větších než přibližně 1 nm. Tato nejjednodušší definice oboru nanotechnologie má ovšem svá úskalí. To, co je rozhodující z hlediska zařazení dané částice hmoty mezi nanomateriály, spíše než její velikost, je její chování. Některé výjimečné fyzikálně chemické vlastnosti typické pro nanomateriály vykazují i částečky hmoty větší než 100 nm, či naopak menší než 1 nm. Jako příklad mohou posloužit částice oxidu titaničitého, které vykazují neobvyklou fotokatalytickou aktivitu, typickou pro řadu nanomateriálů, i při velikosti částic TiO_2 daleko za hranici 100 nm. Proto je vhodnější výše uvedenou definici, založenou pouze na rozměrech částic nanomateriálů, rozšířit o jejich specifické chování, zejména jejich schopnost samoorganizace do větších objektů, tak jak to provedla evropská komise pro životní prostředí v rámci směrnice REACH pro bezpečné zacházení s chemickými látkami.[4, 5]

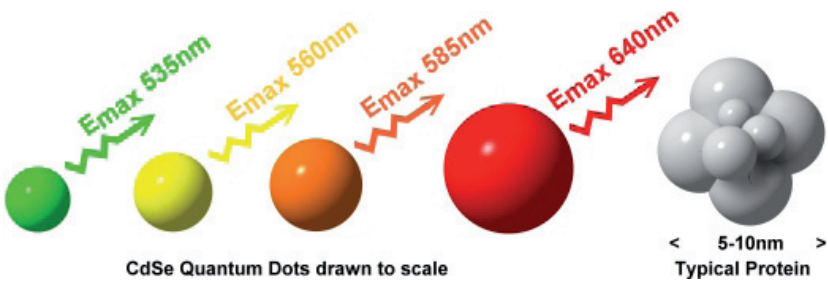
Je tedy zřejmé, že zásadním rysem nanomateriálů, tedy základních objektů studia v oblasti nanotechnologií, jsou jejich neobvyklé fyzikální, chemické a nutno dodat i biologické vlastnosti. Tato třetí oblast, bezprostředně se dotýkající našeho každodenního života, je aktuálně tou nejdiskutovanější v souvislosti s rostoucím důrazem na bezpečnost nanotechnologií a nanomateriálů. Že se jedná o jednu z přirozených vlastností nanomateriálů plyne již z toho, na jakých základech stojí život na Zemi – samotná příroda využívá nanomateriálů (proteiny, enzymy, DNA atd.) jako základních stavebních jednotek živých organizmů (viz Obr. 1). Již z této podobnosti rozměrů plyne zcela logicky intenzivní interakce mezi základními stavebními jednotkami živé hmoty a syntetickými (člověkem připravenými) nanomateriály. A podobně, jako dochází k samovolné organizaci základních stavebních jednotek živé hmoty, tak i tyto syntetické nanomateriály vykazují samoorganizující schopnosti směřující k tvorbě vyšších celků nejen z hlediska jejich rozměrů, ale i z hlediska jejich funkce.



Obr. 1 Škála rozměrů nanomateriálů a příbuzných objektů

Biologické vlastnosti nanomateriálů jsou tedy úzce spojeny s jejich rozměry. Vysvětlení této souvislosti je poměrně jednoduché. Malý objem nanočástic vzhledem k jejich základním stavebním jednotkám (atomy, molekuly) způsobuje, že vysoké procento těchto jednotek je umístěno na povrchu nanočástic a má tudíž menší počet sousedů, než je tomu u jednotek v objemu částice. Nutně pak chybějící přitažlivé interakce vedou ke zvýšenému energetickému stavu atomů (molekul) na povrchu částice, a tudíž pak ke zvýšené interakci nanočástic s okolím, ať už vzájemně mezi sebou (samoorganizace) nebo i s okolní hmotou – i částicemi živé hmoty (proteiny, viry, bakterie, buňky). Je tedy zřejmé, že nanočástice budou ze stejných důvodů velmi intenzivně interagovat i s neživou hmotou ve svém okolí – jejich ohromný povrch na jednotku hmotnosti vede k silné adsorpci látek ze svého okolí, což je důležitý předpoklad pro vysokou katalytickou aktivitu mnohých nanomateriálů,

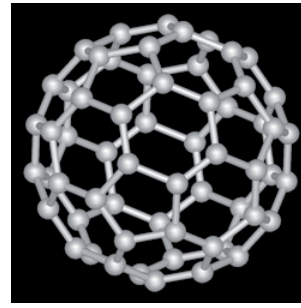
zejména těch odvozených od obecně katalyticky aktivních přechodných kovů. Vysoká katalytická aktivita nanočástic platiny tak může při zvýšení výkonu razantně snížit ceny elektrod palivových článků a způsobit tak malou revoluci v dosavadním nepříliš hospodárném využívání energie fosilních paliv. Biologická a chemická aktivita tedy úzce souvisí s velkým povrchem nanočástic, výjimečné fyzikální vlastnosti nanomateriálů však mají odlišnou příčinu. Se zmenšováním počtu atomů v nanočástici klesá počet vhodných atomových orbitalů pro tvorbu vazebných molekulových orbitalů, a tak se v těchto částicích začínají rozpadat klasické elektronové struktury typické pro makroskopické částice – rozpadají se valenční a vodivostní pásy a elektrony tak mají k dispozici jen omezené možnosti vhodných energetických hladin. Typicky u polovodičových materiálů dochází se zmenšováním částice ke zvětšování zakázaného pásu a pro přechod elektronů z valenčního do vodivostního pásu (či na jinou vhodnou energetickou hladinu) je třeba stále větší energie – tedy foton s kratší vlnovou délkou. A tak dochází se zmenšováním částic ke změnám jejich optických vlastností, což je nejdramatičtěji pozorováno u nanočástic o velikosti jednotek nm, kdy změna velikosti o několik málo procent vede k výrazné změně jejich barevnosti (obvykle fluorescence – viz Obr. 2). Takové objekty, u kterých všechny tři rozměry klesají k jednotkám nanometrů, důsledkem čehož pak pozorujeme neobvyklé optické vlastnosti, jsou nazývány kvantové tečky (quantum dots).[6, 7]



Obr. 2 S klesajícím rozměrem nanočástice („quantum dot“) dochází k posunu emise záření při fluorescenci ke kratším vlnovým délkám[8]

Uhlíkové nanomateriály

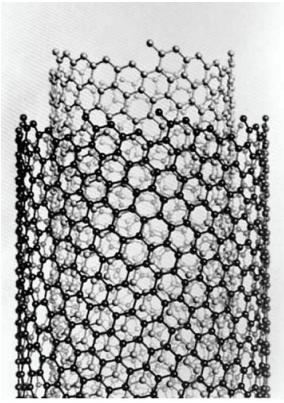
Pokud pomineme tvořivou sílu přírody (život jako produkt „nature" nanotechnologií) a starší neuvědomělé pokusy člověka (např. zlatý koloid připravený v roce 1856 M. Faradayem obsahoval nanočástice zlata o rozměru[9] cca 15 nm), pak jeden z prvních syntetických nanomateriálů cíleně připravených člověkem v roce 1985 má za svůj základ uhlík, podobně jako tomu bylo v případě přírody. Ovšem tento syntetický nanomateriál je tvořen pouze uhlíkovými atomy spojeným vzájemnými vazbami do konstrukce nápadně připomínající fotbalový míč, či konstrukci kopule projektované americkým architektem Buckminsterem Fullerem, přítelem jednoho z objevitelů základní formy tohoto nanomateriálu sumárního vzorce C_{60} (viz Obr. 3) a nazvaného buckminsterfullerene.[10] Fullerenů je dnes známa celá řada od C_{20} až po C_{100} a jejich vlastnosti jsou intenzivně studovány. Lze je mnohým způsobem chemicky modifikovat, ovšem nejzajímavější možnosti nabízí dutina uvnitř fullerenové koule, kam lze umístit vhodnou molekulu a fulleren použít jako dopravce této molekuly na předem určené místo. To je princip cílené dopravy léčiv v těle, ovšem otázkou zůstává, zda budou fullereny v této roli někdy použity, mimo jiné i kvůli jejich toxicitě.



Obr. 3 Buckminster-fullerene[11] C_{60}

Daleko zajímavější praktické aplikace nabízí další dvě nové formy uhlíku, opět připravené ve formě nanomateriálů. V roce 1991 prof. S. Iijima zveřejnil v časopise Nature objev nové formy uhlíku, kterou původně nazval „graphitic tubule", ovšem záhy se ujal název „carbon nanotube" (uhlíková nanotrubička).[12] Záhy se ukázalo, že existuje řada modifikací uhlíkových nanotrubiček – jednostěnné (Single Wall Carbon NanoTubes – SWCNT) či s více stěnami ve stylu ruské skládací panenky matrjoška (Multi Wall

Carbon NanoTubes – MWCNT, viz Obr. 4). I když jsou jednotlivé atomy propojeny do pravidelné šestiúhelníkové sítě, jejich uspořádání ve stěně trubičky vede k různým izomerům (židličkové, zig-zag a helikální uspořádání).[13, 14] Uhlíkové nanotrubičky jsou výjimečné svými mechanickými vlastnostmi. Vlákno upletené z uhlíkových nanotrubiček je tisíckrát pevnější než pavoučí vlákno stejného průřezu. Uhlíkové nanotrubičky ale jsou aplikačně zajímavé i z hlediska svých výjimečných elektrických vlastností. Jejich vodivost je diametrálně rozdílná ve směru osy trubičky a kolmo na tento směr. Využití této vlastnosti vedlo ke konstrukci nejmenšího tranzistoru (polovodičového prvku s řízeným průchodem proudu) na světě. A s pomocí těchto nových polovodičových prvků bude možno konstruovat v budoucnosti ještě menší a ještě výkonnější počítače a další elektronické přístroje.



Obr. 4 Schematický obrázek MWCNT (vícestěnné uhlíkové nanotrubičky)[14]

Nanočástice stříbra – úvod

V předchozí části textu je uvedeno, že jedním z prvních nanomateriálů byly fullereny. O nanočásticích stříbra, společně s nanočásticemi zlata, lze s velkou jistotou tvrdit, že jsou to úplně první člověkem vytvořené, tedy umělé, nanomateriály. Navíc lze k tomuto tvrzení přidat, že jde i o první v praxi využívané nanomateriály. Už v antickém světě byly tyto nanomateriály využívány pro barvení skla a keramiky. Ovšem stříbro samotné je od dávnověků známé svou vysokou biologickou aktivitou zejména vůči mikrorganizmům, díky čemuž se stalo jedním z prvních antibakteriálních

a konzervačních prostředků využívaných lidstvem. Až do objevu penicilinu bylo stříbro, ať už v koloidní podobě nebo i v podobě sloučenin, používáno v humánní medicíně pro léčbu infekčních onemocnění. Objev penicilinových antibiotik znamenal velký útlum využití stříbra v medicíně, kde se udrželo pouze v několika specifických aplikacích – např. sulfadiazin stříbra pro léčbu těžkých popálenin či koloidní stříbro stabilizované proteiny (Targesine) ve formě očních či nosních kapek.[15] Konec 20. století v medicíně je spojen se stále rostoucím nebezpečím nekontrolovaného nárůstu rezistence patogenních bakterií vůči penicilinovým antibiotikům. Hledání nových antibiotik, odolných tomuto negativnímu vývoji v oblasti bakteriální rezistence, navrátilo na počátku 21. století zájem medicínského výzkumu zpět ke stříbru a jeho sloučeninám, přičemž jako jedna z nejvhodnějších aplikačních forem se v rámci tohoto výzkumu projevují právě nanočástice stříbra. To má několik důvodů, mezi hlavní však patří minimální riziko vzniku rezistence vůči této formě stříbra a nízká toxicita ve srovnání s iontovými sloučeninami stříbra.

Nanočástice stříbra – příprava a fyzikální vlastnosti

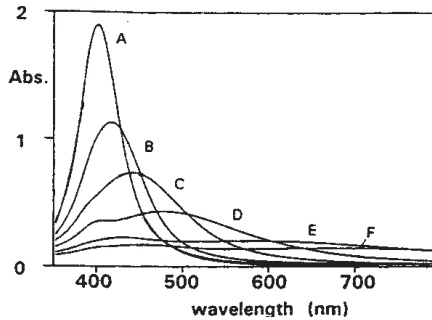
Již uvedený rozvoj výzkumu v oblasti bioaplikací nanočástic stříbra na počátku 21. století je spojen s ohromným rozvojem metod jejich přípravy. Z obecného pohledu lze nanočástice připravovat dvěma základními postupy, v angličtině výstižně nazývanými „top-down" a „bottom-up". Metoda „top-down" vychází z makroskopického materiálu, který je vhodným postupem rozmělněn až na nanometrické částice. Nejtypičtější postup představuje mletí, které ovšem v případě kovových materiálů, a tedy i stříbra, díky jejich mechanickým vlastnostem (kujnost, tažnost) nevede k přípravě nanočástic. Proto prakticky jedinou aplikovatelnou metodou z této oblasti představuje metoda laserové ablace, při níž je stříbrný plíšek ponořený ve vhodném kapalném prostředí ozařován laserem. Vysoká energie světelného paprsku soustředěná do malého bodu způsobuje lokální přehřátí, kdy se atomy kovu odtrhávají z povrchu a v kapalině kondenzují za vzniku nanočástic. Touto metodou lze připravit velmi čisté nanočástice stříbra, ovšem nelze dosáhnout jejich vysoké koncentrace v disperzi a i efektivita produkce je velmi nízká. Proto jsou nanočástice stříbra pro praktické aplikace (tedy ve velkém množství) připravovány metodami „bottom-up", z nichž převažují metody založené na chemické redukci iontů stříbra v roztoku za vzniku nanočástic.

Stříbro jakožto elektropozitivní kov je velmi snadno redukováno i slabými redukčními činidly, takže v současnosti je popsána řada metod přípravy nanočástic stříbra při nichž jsou, vedle klasických silných redukčních činidel jako je tetrahydridoboritan sodný ($NaBH_4$), hydrazin, hydroxylamin či vodík, i slabší redukční činidla jako je citrát, redukující cukry či různé přírodní látky (např. flavonoidy, polyfenoly).[16] Jako velmi efektivní, dobře reprodukovatelnou a spolehlivou metodu přípravy nanočástic stříbra lze využít klasickou Tollensovu reakci, při níž vzniká povlak kovového stříbra na aktivovaném povrchu skla, tzv. stříbrné zrcátko.

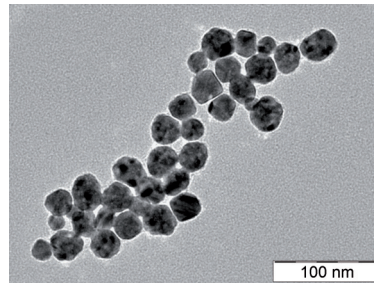
$$[Ag(NH_3)_2]^+ + \text{red. cukr} \rightarrow Ag^o + 2\ NH_3 + \text{ox. produkty}$$

Při vhodné úpravě koncentrace reaktantů místo makroskopického kovového povlaku vznikají nanočástice stříbra, které jsou ve vodné disperzi stabilizovány svým povrchovým nábojem zabezpečujícím jejich vzájemné odpuzování, bránící spojování nanočástic do větších, sedimentačně nestálých agregátů.

Vznik nanočástic stříbra je při reakci snadno detekovatelný podle intenzivně žlutooranžového zabarvení disperze. Tato intenzivní absorpce světla v modré části spektra nanočástic stříbra je způsobena jevem zvaným povrchový plasmon. Zjednodušeně lze tento jev popsat jako kolektivní oscilaci vodivostních elektronů uzavřených v prostorově omezené nanočástici na frekvenci souhlasící s dopadajícím zářením, které je tak pohlcováno a energie pohlceného fotonu je konvertována na zvýšení kinetické energie vodivostních elektronů. Absorpce světla je tak intenzivní, že v 1cm kyvetě lze pouhým okem pozorovat žluté zabarvení vyvolané přítomností nanočástic stříbra i při koncentraci stříbra okolo 1 ppm. S rostoucí velikostí částic se absorpce světla posouvá směrem k vyšším vlnovým délkám a při velikosti částic stříbra nad 100 nm již výsledná disperze pohlcuje světlo v celé oblasti viditelného spektra prakticky jednotně, takže výsledkem je černé či černošedé zabarvení disperze (Obr. 5). Upravená Tollensova metoda umožňuje připravit téměř kulové nanočástice stříbra o velikosti přibližně 30 nm (Obr. 6) s nízkou polydisperzitou (všechny částice mají podobnou velikost).



Obr. 5 Experimentálně změřená spektra disperzí nanočástic stříbra o velikosti 38 nm (A), 56 nm (B), 75 nm (C), 110 nm (D), 162 nm (E) a 173 nm (F)[17]

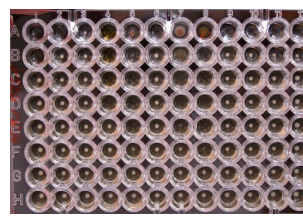


Obr. 6 Elektronmikroskopický snímek nanočástic stříbra připravených modifikovanou Tollensovou metodou

Nanočástice stříbra – biologická aktivita

Již v úvodu bylo naznačeno, že nanomateriály mohou díky svým rozměrům obdobným základním stavebním částicím živé hmoty intenzivně interagovat s živými organizmy. A pokud samotná látka i bez nanorozměrů vykazuje biologickou aktivitu, pak je zřejmé, že výsledné nanočástice budou mít o to zajímavější biologické vlastnosti. To je právě případ nanočástic stříbra, kde nanorozměry výrazně zvyšují antibakteriální aktivitu kovového stříbra, a přitom se navíc ukazuje, že toxicita těchto nanočástic vůči vyšším organizmům je výrazně nižší, než je tomu u podobně aktivních sloučenin stříbra. Biologická aktivita nanočástic stříbra je studována především za využití tzv. „in vitro" metod, tedy experimenty ve zkumavce. Biologické experimenty „in vitro" se v principu realizují dvěma základními postupy podle toho,

zda je živné médium pro mikroorganizmy či buňky v tekutém stavu, nebo v tuhém stavu (gelu). Experimenty v kapalném živném médiu poskytují přesnější výsledky, provedení experimentu na povrchu tuhého gelu (obvykle agarového) je zase snadnější. Základním parametrem pro kvantifikaci biologické aktivity nanočástic stříbra vůči patogenním mikroorganizmům je minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je koncentrace nanočástic stříbra v živném médiu, která právě zastavuje růst testovaného mikroorganizmu. Pro stanovení hodnoty MIC se obvykle používá tzv. mikrodiluční metoda. Při této metodě se do řady jamek v testovací destičce (Obr. 7) pipetuje živné médium s definovaným množstvím mikroorganizmů a přidává se testovaná látka tak, že v každé další jamce je její koncentrace poloviční. Po 24hodinové inkubaci při 37 °C se vyhodnotí růst mikroorganizmů jednoduše podle viditelných kolonií mikroorganizmů rostoucích v jamkách, kde koncentrace testované látky byla nižší než hodnota MIC. Následně se provádí další pokus, při kterém se ověřuje, zda zjištěná hodnota MIC odpovídá i hodnotě MBC (minimální baktericidní koncentrace – mikroorganizmy jsou usmrceny testovanou látkou). K tomu postačuje obtisknout testovací destičku na agarovou desku a po další 24hodinové kultivaci při 37 °C se vyhodnocuje, zda mikroorganizmy narostly i v případě, kdy bylo dosaženo v prvém pokusu inhibice jejich růstu (Obr. 8).



Obr. 7 Mikrotitrační destička při vyhodnocování hodnoty MIC po 24hodinové inkubaci při 37 °C

Obr. 8 Otisk mikrotitrační destičky na agaru pro vyhodnocení hodnoty MBC po 24hodinové inkubaci při 37 °C

Výsledky „in vitro" testů antibakteriální aktivity nanočástic stříbra provedené jak na UP Olomouc, tak i na dalších světových pracovištích, ukázaly, že hodnoty MIC jsou u nanočástic srovnatelné s hodnotami zjištěnými pro iontové stříbro, obzvláště za situace, kdy jsou nanočástice vhodně modifikovány povrchově aktivní látkou či polymerem. V takovém případě hodnoty MIC klesají až pod koncentraci na úrovni 1 ppm. Zajímavé přitom je, že na rozdíl od penicilinových antibiotik nelze u nanočástic stříbra vysledovat jasnou souvislost mezi typem bakterie a hodnotami MIC.

Další pozitivum z hlediska antibakteriální aktivity nanočástic stříbra vyplývá z faktu, že se dosud nepodařilo prokázat, zda jsou si bakterie schopny vybudovat rezistenci vůči antibakteriálním účinkům nanočástic stříbra, tak jak tomu nastalo u penicilinových antibiotik. Důvodem pro tuto skutečnost je velmi pravděpodobně fakt, že na rozdíl od penicilinových antibiotik nanočástice stříbra působí na více buněčných úrovních. Předpokládá se jednak to, že nanočástice se adsorbují na buněčnou stěnu bakterie a destruují ji, rovněž mohou interagovat s enzymy a DNA uvnitř buňky a degradovat je. Velmi pravděpodobný je i mechanizmus účinku spojený s generováním volných radikálů, které rovněž přispívají k degradaci buňky.

Nanočástice stříbra velmi efektivně působí i proti dalším patogenním mikroorganizmům, jako jsou kvasinky (např. kvasinky rodu *Candida*) a houby. V tomto případě ovšem na rozdíl od bakterií nesouhlasí vzájemně hodnoty MIC a MFC (minimální fungicidní koncentrace). To je velmi pravděpodobně způsobeno tím, že tento druh mikroorganizmů již patří do skupiny eukaryot na rozdíl od bakterií, které patří do vývojově starší skupiny prokaryot. V tomto případě je MIC (na úrovni 1 ppm) přibližně o řád nižší než MFC (asi 15–20 ppm). V této souvislosti se dostáváme k otázce toxického vlivu nanočástic stříbra na vyšší organizmy. Obdobně jako v případě testování antibakteriální aktivity i zde převládají „in vitro" metody nad „in vivo" metodami. I když zejména pro testování environmentální toxicity (nejen nanočástic stříbra) mají vědci k dispozici i standardizované testy na jednoduchých organizmech, typicky například na jednoduchých vodních organizmech, jako jsou nitěnky, perloočka, ale i řasy.[18] Velmi jednoduché testy lze provést na prvocích, typicky na organizmu *Trepka velká* (*Paramecium caudatum*), který je velmi citlivý zejména vůči znečistění vod těžkými kovy.[19] V případě vyšších organizmů je provedení testů toxicity již podstatně složitější, takže první informace jsou opět získávány za pomoci „in vitro" testů na vybraných buněčných liniích. Typicky pro nanočástice

stříbra a jeho topické aplikace (aplikace na kůži či sliznice) jsou používány buněčné linie fibroblastů. Provedené testy toxicity pak ukazují, že biologická aktivita nanočástic stříbra (toxické limity) se vůči nižším (prokaryotickým) organizmům projevuje při koncentracích přibližně o řád nižších, než je tomu u vyšších (eukaryotických) organizmů či buněk (viz Tabulka 1).

Z Tabulky 1 je zřejmý významný rozdíl v biologické aktivitě nanočástic stříbra a iontového stříbra. Biologická aktivita (toxicita) iontového stříbra je prakticky stejná pro nižší i vyšší organizmy. Z hlediska aplikace nanočástic stříbra, resp. sloučenin stříbra v praxi tak jednoznačně vyplývá výhodnost použití nanočástic stříbra, které mají vysokou antibakteriální aktivitu a přitom o řád nižší toxicitu vůči vyšším organizmům.

Tabulka 1 Srovnání toxických koncentrací nanočástic stříbra a iontového stříbra vůči různým typům organizmů[20]

	NanoAg	**Ag^+**
Antibakteriální aktivita (MIC; 24 hod)	1–7 mg/L	1–2 mg/L
Antifungální aktivita (MIC; 36 hod)	1 mg/L	1 mg/L
Cytotoxicita (lidské fibroblasty)	25 mg/L	1 mg/L
P. caudatum	39 mg/L	0.4 mg/L
Ekotoxicita *S. subspicatus* (LC50; 48 hod)	> 30 mg/L	5 mg/L
D. melanogaster (LC50)	20 mg/L	n.a.

Závěr

Nanotechnologie představují obor lidské činnosti, který díky specifickým vlastnostem nanomateriálů vede ke vzniku zcela nových přístrojů, zařízení a metod, které nejsou realizovatelné klasickými postupy. Nanomateriály přináší nové možnosti do oblasti průmyslové technologie, jako je tomu v případě uhlíkových nanomateriálů majících velmi zajímavé elektrické i mechanické vlastnosti. Mimo průmysl ovšem nacházejí nanomateriály zajímavé uplatnění i v dalších oborech lidské činnosti, velmi důležité jsou jejich aplikace v medicíně. Nanočástice stříbra jsou schopny zabíjet i bakterie rezistentní vůči klasickým antibiotikům a představují tak jednu z alternativ budoucího boje proti těmto nebezpečným mikroorganizmům.

Použitá literatura a informační zdroje

1. R. Feyenman: http://www.youtube.com/watch?v=4eRCygdW--c (staženo 11. 2. 2013).
2. http://feynman.caltech.edu/plenty.html (staženo 11. 2. 2013).
3. *Nature Nanotechnology* 4, 781 (2009). http://www.nature.com/nnano/journal/v4/n12/full/nnano.2009.356.html.
4. V. Balzani: *Pure and Applied Chemistry* 80(8), 1631 (2008). http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/2008/pdf/8008x1631.pdf.
5. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/#definition (staženo 11. 2. 2013).
6. http://www.umt.edu/ethics/Debating%20Science%20Program/ODC/Nano-ODC/Intro/Properties/Physical_Emergent_Properties.aspx (staženo 20.2. 2013).
7. A. Hlaváček, P. Skládal: *Chemické listy* 105, 611 (2011). http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_611–615.pdf.
8. http://nanocluster.mit.edu/research.php (staženo 20. 2. 2013).
9. http://aveburybooks.com/faraday/catalog.html (staženo 22. 2. 2013).
10. http://portal.acs.org/portal/PublicWebSite/education/whatischemistry/landmarks/fullerenes/CNBP_028991 (staženo 22. 2. 2013).
11. http://cs.wikipedia.org/wiki/Fullereny (staženo 22. 2. 2013).
12. S. Iijima: *Nature* 354, 56 (1991). http://www.nature.com/nature/journal/v354/n6348/pdf/354056a0.pdf.
13. http://www.pa.msu.edu/cmp/csc/nanotube.html (staženo 22. 2. 2013).
14. S. Iijima: *Physica B* 323, 1 (2002). http://research.physics.unc.edu/project/lcqin/group/qin/refs/2002-Iijima-PhysicaB.pdf.
15. http://www.laboratorios-argenol.com/fi-targesinai.htm (staženo 5. 3. 2013).
16. R. Prucek, L. Kvítek, J. Hrbáč: Acta UPOL Chemica **43**, 59 (2004). http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/Veda/AUPO/AUPO_CHEMICA43.pdf?q=autory#page=59.
17. S. Schneider; P. Halbig; H. Grau; U. Nickel: *Photochemistry and Photobiology* 60, 605 (1994).
18. http://www.rybarstvi.eu/dok%20rybari/toxicita.pdf (staženo 15. 3. 2013).
19. M. Vaníčková, J. Soukupová, L. Kvítek: Chemické listy 104, 945 (2010). http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_10_945–949.pdf
20. http://www.nanosafe.org/home/liblocal/docs/Nanosafe%202010/2010_oral%20presentations/O4b-1_Kvitek.pdf (staženo 15. 3. 2013).

Tajuplný svět mechorostů

Zbyněk Hradílek

Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Přednáška proběhla dne 18. ledna 2011.

Úvod

Mechorostům je v učebnicích biologie věnováno zpravidla jen několik stránek, nejvýše jedna kapitola. Protože jsou ale tyto rostliny prakticky všude okolo nás, dovolili jsme si připravit rozšiřující informace (tedy nad rámec učebnic) o této nepříliš nápadné skupině rostlin.

Charakteristika mechorostů

Mechorosty jsou obvykle řazeny mezi tzv. **vyšší rostliny**, tedy **embryo tvořící rostliny**. Ze všech současných skupin vyšších rostlin jsou mechorosty pravděpodobně nejstarší, neboť se objevily na souši možná už před více než 400 miliony let. Nejstarší nepochybný fosilní doklad mechorostu je známý z devonu (před 410–360 miliony let), což je období prvohor. Jde o fosílii játrovky *Hepaticites devonicus*.

Odhaduje se, že na Zemi v současnosti roste asi 19–25 000 druhů, přičemž v Evropě je to přibližně 1 700–1 800 druhů. V České republice roste nebo v nedávné minulosti rostlo 863 taxonů mechorostů (4 hlevíky, 207 játrovek, 652 mechů).

Mechorosty se vyskytují ve všech vegetačních pásmech a s výjimkou nivální zóny i ve všech výškových stupních. Rostou i tam, kde jsou extrémní podmínky pro život, např. v horkých pramenech. Najdeme je na holé zemi, na skalách, kůře stromů, vodní hladině, v hlubokých jezerech i na tlejících zbytcích rostlin a živočichů.

Mechorosty jsou mnohobuněčné, zelené (tedy fotosyntetizující), výtrusné, primárně suchozemské, stélkaté rostliny, v jejichž životním cyklu velikostí i trváním převažuje gametofytní (haploidní) generace nad sporofytní (diploidní) generací. Sporofyt mechorostů je závislý na gametofytu.

Základní znaky
Jsou to **zelené rostliny** (kombinace chlorofylů a a b), buňky mají **celulózní stěny** a zásobní látkou je **škrob**.

Jejich vodivé buňky (jsou-li vůbec přítomné) neobsahují lignin – nejsou tedy totožné s vodivými buňkami cévnatých rostlin (cévami a cévicemi). **Mechorosty nejsou cévnaté rostliny!** Navíc nedokonalá vodivá pletiva, která jinak často mají i opornou funkci, neumožňují větší vzrůst rostlin (mechorosty jsou veliké od 0,5 mm do několika desítek cm).

Gametofyt má 2 fáze: (i) většinou vláknitá fáze (tzv. **prvoklíček**, **protonema**), která vzniká vyklíčením výtrusu, a (ii) vlastní mechová rostlinka (tzv. **gametofor**). Všechny buňky gametofytu mají haploidní (tedy poloviční) sadu chromozomů (n). Gametofytní generace končí vytvořením pohlavních buněk (gamet), kterými jsou u mechorostů **spermatozoidy** (samčí gamety se 2 bičíky, tvoří se ve velkém množství v orgánech zvaných pelatky = antheridia) a **vaječné buňky** neboli **oosféry** (samičí gamety, tvoří se po jedné v orgánech zvaných zárodečníky = archegonia). U víceletých mechorostů, kterých je ovšem většina, samozřejmě založením gametangií mechová rostlinka nezaniká, nýbrž pokračuje v dalším růstu.

K oplození (a tedy k tvorbě štětu s výtrusnicí) **může dojít jedině ve vodním prostředí** (někdy stačí i kapka rosy). Nedávno byl experimentálně prokázán i přenos spermatozoidů prostřednictvím bezobratlých živočichů žijících v hrabance, např. chvostoskoků. Jak často k němu ale dochází v přírodě, zatím nevíme.

První buňkou **sporofytu** (tj. diploidní generace, základní sada chromozomů všech buněk je 2n) je **zygota** vzniklá spojením pohlavních buněk v procesu **oplození**. Jejím dělením vzniká **zárodek** (embryo). Sporofyt mechorostů je zpravidla rozlišen na nohu, štět a výtrusnici (nesprávně tzv. tobolka). Ve výtrusnici redukčním dělením (meioticky) vznikají **výtrusy** (spory). Zralý výtrus je zároveň **první buňkou gametofytní generace!**

Postavení mechorostů v systému rostlin

Říše: Regnum vegetabile (Plantae) – rostlinná říše (rostliny).
Podříše: Chlorobionta – zelené rostliny.
Vývojový stupeň: Bryophytae – mechorosty.
Oddělení: Anthocerotophyta – hlevíky.
Oddělení: Marchantiophyta – játrovky.
Oddělení: Bryophyta – mechy.

V dnešní době jsou tři tradiční skupiny mechorostů (hlevíky, játrovky a mechy) považovány za samostatná **oddělení**. Podle současných názorů je nejpůvodnější skupina hlevíků a mechy jsou sesterskou skupinou k cévnatým rostlinám.

Hlevíky (Anthocerotopsida)

Existuje asi 300 popsaných druhů rozšířených hlavně v tropech. Naši 4 zástupci jsou jednoleté rostlinky, které z roku na rok přežívají pomocí výtrusů. Jsou to tedy sezónní rostliny u nás nejsnáze pozorovatelné od léta do konce podzimu. Rostou na obnažené hlíně na vlhkých březích řek a vodních nádrží, časté jsou na polích s pícninami (jeteloviny, vojtěška) a na strništích po sklizeném obilí. U nás rostou dva běžné druhy: hlevík rolní (*Anthoceros agrestis*) a hlevíček karolínský (*Phaeoceros carolinianus*); dále dva poměrně hodně vzácné druhy – vycpálka okrouhlá (*Notothylas orbicularis*) a hlevík Neesův (*Anthoceros neesii*), který je dokonce středoevropským endemitem.

Charakteristika skupiny
Růžicovitá stélka má jednoduchou vnitřní stavbu, zpravidla není větší než 3 cm, každá buňka gametofytu má jen 1 veliký chloroplast, na kterém je umístěno **bílkovinné tělísko**, tzv. pyrenoid (tyto znaky přibližují hlevíky ke spájivým zeleným řasám), na spodní straně stélky jsou dutiny, které často osidlují kolonie symbiotických sinic rodu *Nostoc*. **Gametangia** (pohlavní orgány) **jsou ponořena ve stélce** a mají jednoduchou stavbu. **Sporofyt** tvoří jen noha a výtrusnice, která **má tyčinkovitý tvar**, štět se nevyvíjí, celý sporofyt je zelený a sám se podílí na výživě, tím pádem je jen málo závislý na gametofytu, ve stěně výtrusnice jsou pravé průduchy, středem výtrusnice prochází tzv. **sloupek** (kolumela), kromě výtrusů uvnitř vznikají ještě jedno- až několikabuněčné útvary – nedokonalé **mrštníky** (tzv. pseudoelatery).

Játrovky (Marchantiopsida, Hepaticae)

Existuje asi 8 000 druhů. U nás roste přibližně 207 druhů. Jsou to jedno- až víceleté rostliny rostoucí na různém podkladu (hlína, skály, kůra stromů, tlející dřevo), rostou ale i ve vodě nebo plavou na hladině vodních nádrží, v tropech a v mlžných lesích rostou i na povrchu listů stále zelených dřevin (tzv. epifylní játrovky). U nás rostou převážně v horách. Své jméno získaly

v minulosti, kdy se věřilo, že odvar ze stélek pomáhá při onemocnění jater. To se však nezakládá na pravdě a obvykle tato víra pramenila z pouhé podobnosti tvarů pentlicovitých stélek některých velkých játrovek s tvarem tělesných orgánů – v tomto případě s laloky jater (játra = latinsky *hepar*). Odtud i starší vědecké jméno játrovek – *Hepaticae*.

Charakteristika skupiny
Stélka je buď **pentlicovitá** (tzv. frondózní, často je dichotomicky větvená) nebo je rozlišena na **lodyžku a lístky** (tzv. foliosní stélka). Většinou dorůstají malých rozměrů (od 1 mm do asi 20 cm, jen málokdy ale přesáhnou velikost 10 cm). Stélka játrovek (ať už pentlicovitá nebo listnatá) je téměř vždy **zploštělá**, lze tedy rozlišit jejich břišní a hřbetní stranu, **prvoklíček** je velmi **redukovaný**, je tvořen jen 2–3 buňkami, **příchytná vlákna** (rhizoidy) jsou jednobuněčná. Lístky (u játrovek s foliosní stélou) vyrůstají na lodyžce ve 2–3 řadách a **nemají žebro**, buňky játrovek obsahují tzv. **silična tělíska**, u některých druhů způsobují jejich intenzivní vůni. Sporofyt je velmi krátkodobý, výtrusnice **nemá** rozlišeno **víčko ani obústí** (jako mají mechy), uvnitř kromě výtrusů vznikají ještě **mrštníky** (elatery), nemají **sloupek**.

Mechy (Bryopsida, Musci)

Existuje asi 10 000 druhů. U nás roste nebo v minulosti rostlo 652 druhů. Jsou to jedno- až víceleté druhy rostoucí na nejrůznějším podkladu. Jedná se o nejpočetnější a velmi rozmanitou skupinu mechorostů.

Charakteristika skupiny
Stélka je rozlišena na **příchytná vlákna** (rhizoidy, u mechů jsou vícebuněčná), **lodyžku** (kauloid) a **lístky** (fyloidy), je **radiálně symetrická** (tzn., že lístky jsou většinou na lodyžce uspořádány v mnoha řadách nebo ve spirále). **Prvoklíček** je většinou vláknitý a připomíná porost zelených řas (od řas se ale liší šikmými buněčnými přepážkami). **Lístky** (fyloidy) mají téměř vždy žebro, jejich buňky neobsahují siličná tělíska. Sporofyt je zpravidla **dlouhodobý**, rozlišen na **nohu**, **štět** a **výtrusnici**, výtrusnice má často ve stěně pravé průduchy, uvnitř **sloupek**, mrštníky se netvoří. Výtrusnice se většinou otevírá **víčkem** a okolo ústí má často 1–2 řady zubů (tzv. **obústí**), mladou a ještě uzavřenou výtrusnici kryje **čepička** (kalyptra).

Mají zvláštní jména

Studium mechorostů se u nás rozvíjí už více než 200 let. Zpočátku se používala německy psaná literatura a německá jména i terminologie. Prvních 9 českých jmen mechorostů vytvořil **F. M. Opiz** v zapomenutém rukopisu z roku 1808 – jedním z nich je „mnohowlasek" pro dnes známý mech ploník nebo „zlatowlasek" pro dnešní šurpek. Tato jména se neprosadila, a tak jako první se do povědomí dostalo až tiskem vydané jmenosloví **J. S. Presla** zveřejněné v knize „Wšeobecný rostlinopis" (1846) – 93 druhů mechorostů s českými binomy. Dodnes se používá 24 z nich – např. ploník, měřík, rašeliník, dvouhrotec, zkrutek, hlevík, porostnice atd. Další autoři postupně doplňovali české ekvivalenty vědeckých jmen, a tak máme v dnešní době česká jména pro všechny u nás rostoucí druhy, poddruhy a variety mechorostů. Pravda, některá z nich, jako např. šikoušek, štíhlík, psízubec, chudozubík, mrtník, ždírnice, nalžovka či pařezníček, možná vyvolají lehký úsměv, ale koneckonců kromě těch nejznámějších, které se objevují v učebnicích biologie, se vlastně příliš (nebo přesněji vůbec) nepoužívají.

J. S. Presl je také autorem morfologických termínů jako pelatka, štět, pošwička, čepička, víčko, mrštníky a další. Položil tak základy české bryologické terminologie.

Rozšíření mechorostů

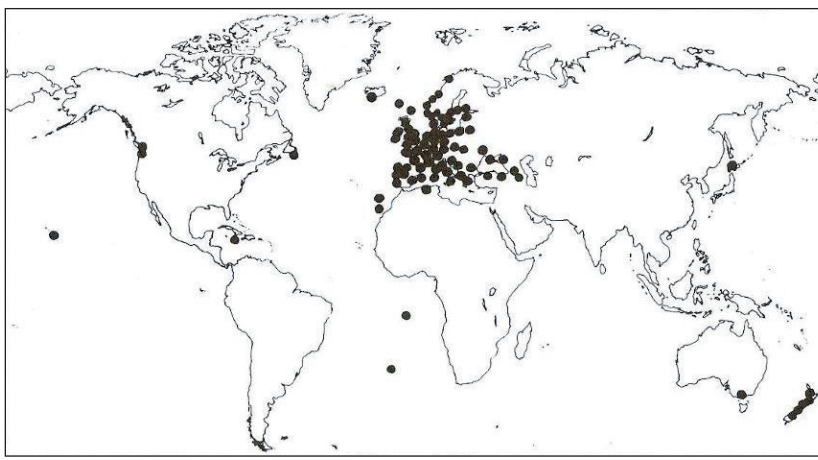
Rozšířením mechorostů se zabývá obor **bryogeografie**. Až do začátku 20. století panoval mylný názor, že mechorosty jako výtrusné rostliny se volně šíří a rostou prakticky všude. Teprve až **T. K. G. Herzog** (1880–1961) v knize Bryogeographie der Moose (1926) postavil základy oboru, který zkoumá zákonitosti rozšíření mechorostů. Fylogenetické stáří mechorostů a jejich biologické vlastnosti způsobily jisté odlišnosti v jejich rozšíření, např. ve srovnání s kvetoucími rostlinami:

1. Areály druhů mechorostů jsou obecně větší než areály druhů kvetoucích rostlin.
2. Mechorosty mají vysoký stupeň disjunktivnosti areálů.
3. Hodně kosmopolitů (ploník, lesklec, šurpek, …).

Na rozšíření mechorostů se podílí i člověk. Aktivita lidí na jedné straně vede k destrukci celých biotopů, takže je možné, že mnohé druhy vymizely ještě

před jejich poznáním. Na druhé straně se přičiněním člověka mechorosty šíří. U mechorostů připadá do úvahy spíše neúmyslné šíření mechorostů:

1. Apofytizace – proces týkající se původních druhů rostlin. Ty by ale bez přičinění člověka byly mnohem vzácnější, než jsou nyní, člověk jim vytvořil nové biotopy (např. zdi, hradby, střechy, chodníky, pole, záhonky atp.). Na těchto nepůvodních stanovištích jsou pak tyto druhy hojnější než na stanovištích přirozených. Takovými apofyty ze skupiny mechorostů jsou např. porostnice mnohotvárná (*Marchantia polymorpha*), zkrutek vláhojevný (*Funaria hygrometrica*), kroucenec zední (*Tortula muralis*), rohozub nachový (*Ceratodon purpureus*) a mnohé další. Například kroucenec zední je původní na přirozených skalních výchozech, dnes jej spolehlivě najdeme na střechách domů, zídkách, hradbách atd.
2. Neúmyslná introdukce – např. mech dutolistec čistý (*Scleropodium purum*) byl díky svému mohutnému vzrůstu a bohatým populacím používán jako obalový materiál pro transporty křehkých předmětů nebo pro zasílání živých oddenků aj. částí rostlin, aby zůstaly po dobu transportu vlhké. V místě doručení se mech vyhodil do přírody, kde přežívá. Tento původně evropský druh dnes roste na většině kontinentů, ale obvykle zůstává v místě zavlečení a příliš se nerozšiřuje (viz Obr. 1). Obdobně byla zřejmě se zahradnickou zeminou či výpěstky do střední Evropy zavlečena játrovka lunatka křížatá (*Lunularia cruciata*).



Obr. 1 Světové rozšíření mechu *Scleropodium purum* (Schofield 1985)

Bohužel i u mechorostů známe případy, kdy do území zavlečený druh se chová velice agresivně, jde o tzv. **invazní druhy**. U nás stojí za zmínku aspoň dva – rovnozub čárkovitý (*Orthodontium lineare*), na území ČR byl objeven v roce 1964 ČR, a křivonožka vehnutá (*Campylopus introflexus*), nalezená v ČR v roce 1988. Oba mechy pocházejí z jižní polokoule. Od svých prvních nálezů se šíří naším územím a zejména rovnozub čárkovitý je ve své invazi velmi rychlým a konkurenčně silným druhem. Na kyselých skalách a na tlejícím dřevě je schopen vytlačovat méně schopné domácí druhy mechorostů. Dnes známe na území Čech stovky jeho lokalit, na Moravě je počítáme zatím na desítky.

Praktické využití mechorostů

Mechorosty jsou jen málo využitelné rostliny. Mají velmi nízkou produktivitu (tzn., že rostou velmi pomalu). Vyskytují se tedy, ve srovnání např. s dřevinami, jen v malých množstvích. Nejvíce organické hmoty (biomasy) tvoří rašeliníky. Ty jsou také nejvíce člověkem využívány. Na severu naší polokoule jsou obrovské zásoby rašeliny, která se často využívá jako palivo. Rašeliníky (i ostatní mechorosty) se např. v dobách válečných přidávaly do jídla, ale jejich výživná hodnota je velmi nízká. Z vyšších býložravých živočichů se výhradně nebo převážně mechorosty neživí prakticky žádný z nich.

Rašeliníky mají ovšem prokazatelné baktericidní účinky a spolu s jejich značnou nasáklivostí se využívaly k obvazování v dobách nedostatku jiného zdravotnického materiálu. Také v nejnovější době rašeliníky (samozřejmě dokonale upravené) využívají i renomované firmy na výrobu hygienických potřeb. I dnes se dají koupit např. vložky do bot s vrstvou z rašeliníku.

V minulosti se některé větší mechy přidávaly do polštářů – věřilo se, že vyvolávají sny (odtud např. vědecké jméno jednoho z nejhojnějších druhů u nás – rokyt (rod *Hypnum* – hypnóza, spánek). Mechy statného vzrůstu odedávna sloužily jako izolační materiál mezi trámy dřevěnic v Podkrkonoší či na Valašsku.

Některé mechy jsou velmi dekorativní a v různých dobách se používaly k ozdobným účelům – např. jako ozdoba dámských kloboučků (mech drabík – *Climacium*, zpeřenka – *Thuidium*).

Mechorosty většinou nemají pokožku (epidermis) a přijímají vodu a v ní rozpuštěné látky celým svým povrchem. Této vlastnosti se využívá při tzv. bioindikacích nebo při monitorování např. atmosférického nebo vodního

znečištění některými prvky, příp. k prospekci rud. Možnosti využití mechorostů nejsou ještě zdaleka vyčerpané.

Význam v přírodě

Díky svým některým vlastnostem rostou mechorosty na místech, kde jiné rostliny nemohou růst. Spolu s lišejníky patří k tzv. **pionýrským organizmům**. Rychle pokrývají obnažený povrch půdy, např. stržených břehů, půdních sesuvů nebo povrch lávových polí po sopečných erupcích. Snižují tak erozi, příp. vytvářejí základ nových půd, které pak už mohou osídlit cévnaté rostliny.

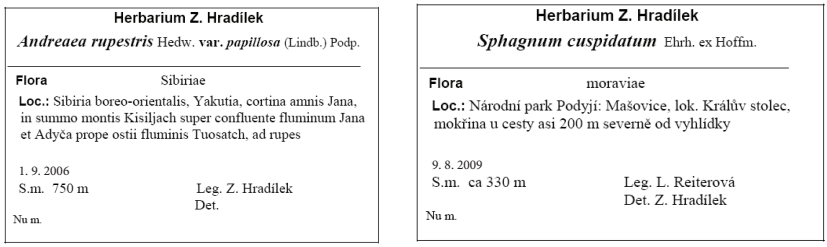
V polštářích mechů panuje čilý život. Na jejich stélkách rostou např. řasy a sinice, žijí na nich prvoci z různých skupin a celá řada bezobratlých živočichů v nich prožije celý svůj životní cyklus, jiní se pod jejich ochranou rozmnožují nebo je využívají jako útočiště např. v obdobích sucha (pod mechy je vždy vlhčeji než na holém povrchu půdy). Někteří bezobratlí se jimi i živí – např. slimáci, larvy hmyzu, červi a někteří brouci.

Četní ptáci využívají mechy jako výstelku svých hnízd a někteří dokonce staví svá hnízda převážně z mechů – např. králíček obecný.

Jak mechorosty sbírat a herbarizovat

Sbírat a preparovat mechorosty pro herbář je jednoduší, než herbarizovat ostatní vyšší rostliny. Odpadá totiž starost s lisováním, mechorosty se totiž nelisují. Sebraný vzorek jen mezi dlaněmi stlačíme a uložíme do provizorní obálky (nejlépe z novinového papíru), kde necháme mech vyschnout při pokojové teplotě. Jednodušší je i následná údržba a ochrana mechového herbáře. Mechorosty jsou většinou ušetřeny náletů fytofágního hmyzu a není třeba je vymrazovat ani chemicky ošetřovat. Budeme-li je ovšem skladovat spolu s herbářem cévnatých rostlin, vyplatí se stejná údržba, jakou věnujeme ostatním rostlinám. Pro účely herbarizace (primárně jde o pořízení dokladu o výskytu druhu na lokalitě) sbíráme vzorek přibližně o velikosti dlaně a pokud možno jen jednoho druhu (tato podmínka nejde vždy splnit). Po určení a vysušení předěláme vzorek do definitivní obálky (Obr. 2) a opatříme etiketou. Etiketa neboli scheda (viz níže) je v podstatě stejná, jako ty které používáme pro cévnaté rostliny. Liší se pouze informací o substrátu, na němž sebraný mechorost rostl. Tato informace je ostatně důležitá u všech kryptogamických rostlin.

Podrobnější postup je např. v textech Pilous & Duda (1960) nebo Kříša & Prášil (1989).



Herbarium Z. Hradílek

Andreaea rupestris Hedw. **var.** ***papillosa*** (Lindb.) Podp.

Flora Sibiriae

Loc.: Sibiria boreo-orientalis, Yakutia, cortina amnis Jana, in summo montis Kisiljach super confluente fluminum Jana et Adyča prope ostii fluminis Tuosatch, ad rupes

1. 9. 2006
S.m. 750 m
Leg. Z. Hradílek
Det.

Nu m.

Herbarium Z. Hradílek

Sphagnum cuspidatum Ehrh. ex Hoffm.

Flora moraviae

Loc.: Národní park Podyjí: Mašovice, lok. Králův stolec, mokřina u cesty asi 200 m severně od vyhlídky

9. 8. 2009
S.m. ca 330 m
Leg. L. Reiterová
Det. Z. Hradílek

Nu m.

Obr. 2 Příklady vyplněných etiket (sched)

Určování mechorostů

Určování (determinace) mechorostů je naopak o něco složitější. K určování je třeba mít kromě terénní lupy (alespoň 10× zvětšující) ještě i mikroskop opatřený okulárovým měřítkem a v optimálním případě také stereomikroskop. Navíc dnes není dostupný česky psaný klíč k určování mechorostů České republiky, pouze zahraniční literatura. Dalším problémem je obrovská variabilita morfologických znaků. V klíčích je většina znaků jednoznačných (jinak by nemělo smysl klíče vydávat), ale realita bývá často jiná. Typických rostlin jednoznačně určitelných podle klíče bývá málo. Poznatky o proměnlivosti skupin a druhů si musí každý, kdo mechorosty určuje, nakonec udělat sám. Proto bývá efektivnější určovat najednou vždy jen zástupce jednoho rodu – např. baňatky, poté třeba trněnky atp. Také je třeba počítat s tím, že se zpočátku nepodaří určit i většina sebraného materiálu. Takový materiál ale nevyhazujeme, vrátíme se k němu za pár měsíců nebo za půl roku, kdy už „budeme chytřejší“. Zpočátku je nutná spolupráce s již zkušeným bryologem, který potvrdí správnost určení, nebo materiál zreviduje. Takový revidovaný materiál je velmi cenný a použijeme ho k budování tzv. **srovnávacího herbáře**. V budoucnu při jakékoli nejistotě určení porovnáváme naše sběry s těmito revidovanými „standardy“ pro kontrolu.

Použitá literatura a internetové zdroje

Hradílek Z. & Koval Š. (2011): Skrytá krása mechorostů. – Naše příroda, 2:59–65.
Hradílek Z. (2012): 5.9.3 Mechy, játrovky, hlevíky. – In: Machar I. & Drobilová L. [eds.], Ochrana přírody a krajiny v České republice. Vybrané aktuální problémy a možnosti jejich řešení. 1. a 2. – Univerzita Palackého v Olomouci, 2:554–562.
Hradílek Z. & Koval Š. (2012): Půvab omšelé krásy. – Příroda, 6:44–48.
Kalina T. & Váňa J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. – Karolinum, Praha, 606p.
Křísa B. & Prášil K. (1989): Sběr, preparace a konzervace rostlinného materiálu. – SPN Praha, 230p.
Kučera J. (2012): Mechorosty České republiky. – Živa, 4:165–167.
Kučera J. & Váňa J. (2005): Seznam a červený seznam mechorostů České republiky (2005). – Příroda, Praha, 23:1–104.
Kučera J., Váňa J. & Hradílek Z. (2012): Bryophyte flora of the Czech Republic: updated checklist and Red List and a brief analysis. – Preslia, 84:813–850.
Kubešová S., Musil Z., Novotný I., Plášek V. & Zmrhalová M. (2009): Mechorosty, součást naší přírody. – Hořepník, Prostějov, 83p.
Pilous Z. & Duda J. (1960): Klíč k určování mechorostů ČSR. – Academia, Praha, 569p.
Schofield W. B. (1985): Introduction to bryology. – New York, 431p.
Soldán Z. (1996): Tajemství mechorostů: 1. Entomochorie. – Živa, 2:55–56.
Soldán Z. (1996): Tajemství mechorostů: 2. Obři, trpaslíci a další nej… – Živa, 4:150–151.
Soldán Z. (1997): Tajemství mechorostů: 3. Symbiósa a saprofytismus. – Živa, 3:104–105.
Soldán Z. (1997): Tajemství mechorostů: 4. Světélkující mech. – Živa, 4:150–151.
Soldán Z. (1998): Tajemství mechorostů: 5. Obyčejný rašeliník. – Živa, 6:252–254.
Soldán Z. (2000): Tajemství mechorostů: 6. Měděné mechorosty. – Živa, 2:57–58.
Soldán Z. (2002): Tajemství mechorostů: 7. Invaze nehrozí. – Živa, 1:9–10.
Soldán Z. (2004): Tajemství mechorostů: Siličná tělíska („Hic sunt leones“). – Živa, 2:57–58.
Soldán Z. (2010): Tajemství mechorostů: underground. – Živa, 1:10–11.
Soldán Z. & Váňa J. (1995): Machorasty. – In: Kotlaba F. [ed.], Červená kniha ohrozených a vzácnych druhov rastlín a živočíchov SR a ČR, 4 (Sinice a riasy, huby, lišajníky, machorasty), pp. 157–192. Príroda, Bratislava.
Váňa J. (2006): Obecná bryologie. – Karolinum, Praha, 187p.
Váňa J. (2006): Speciální bryologie I. Marchantiophyta, Anthocerotophyta. – Karolinum, Praha, 149p.
Váňa J. (2006): Speciální bryologie II/1. Bryophyta (1. část). – Karolinum, Praha, 47p.

Váňa J. (2007): Speciální bryologie II/2. Bryophyta (2. část). – Karolinum, Praha, 92p.
http://botanika.bf.jcu.cz/BLS/ – Bryologicko-lichenologická sekce České botanické společnosti (vč. informačního bulletinu Bryonora).
http://botanika.bf.jcu.cz/bryoweb/klic/index.php – elektronický klíč k určování cca 2/3 mechorostů ČR, Seznam a červený seznam mechorostů (Kučera & Váňa 2005) v pdf formátu.

Obr. 3 Hlevíček karolínský (Phaeoceros carolinianus) – častý druh na polích a obnažených březích řek

Obr. 4 Zkrutek vláhojevný (Funaria hygrometrica) – běžný mech na starých ohništích a narušených místech

Botanická zahrada Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

David Cigánek

Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Přednáška proběhla dne 15. května 2013.

Úvod

Podle dostupných informací je olomoucká botanická zahrada nejstarší botanickou zahradou na Moravě, v českých zemích ji pak svým stářím předstihuje pouze univerzitní botanická zahrada v Praze. První písemná zmínka o existenci botanické zahrady v Olomouci pochází z roku 1787. Tehdy sloužila k výuce na medicínsko-chirurgickém učilišti, které bylo součástí olomoucké univerzity; v roce 1874 zanikla v souvislosti s jeho zrušením. Už v roce 1898, tedy o 24 let později, byl v Olomouci založen botanický spolek (*Botanischer Verein in Olmütz*), díky jehož iniciativě bylo na jaře 1901 zahájeno budování nové botanické zahrady v místech, kde se nachází dodnes. První rostliny do nových skleníků darovali správci zahrad ve Vídni-Schönbrunnu a v Lednici na Moravě. Mimořádný podíl na budování zahrady měli lékárník Edmund Tuma a městský zahradník Karel Pohl. Spolek měl v té době již přes 600 členů, pořádal časté přednášky a v roce 1913 vydal dokonce i průvodce botanickou zahradou. Zahrada zůstala v podstatě v nezměněném stavu až do roku 1948, kdy byla předána městu po odsunu německého obyvatelstva a zániku spolku. Od roku 1956 už je zahrada spojována s působností vysokých škol v Olomouci a v roce 1959 se stala součástí Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého, která ji spravuje dodnes. Kromě výuky botaniky je dnes využívána i pro další obory univerzitního studia a ve vegetační sezóně je přístupná také široké veřejnosti.

Přírodní podmínky

Areál zahrady má rozlohu jen málo přes půl hektaru. Leží v rovinatém terénu o nadmořské výšce asi 210 m, na čtvrtohorních naplaveninách řeky

Moravy, které byly zejména v době likvidace olomouckého pevnostního systému vydatně převrstveny navážkami (štěrk, suť, škvára). Vrstva vysýchavé písčitohlinité zeminy je poměrně tenká, leckdy nepřesahuje 20 cm. Hladina podzemní vody se nachází v hloubce 4,5–7,0 metrů.

Klimaticky patří území do teplé, mírně vlhké oblasti s mírnou zimou. Průměrná roční teplota se blíží 9 °C a srážky dosahují 562 mm.

Z pěstitelského hlediska je pozitivním faktorem chráněná poloha a oteplené městské mikroklima. Naopak v letních měsících se plně projevují negativa výslunné jižní expozice kombinované s mělkou výsušnou půdou. Zvládnutí situace je pak podmíněno rozumným plánováním výsadeb a samozřejmě i využitím závlah.

Plochu zahrady lze rozdělit na tři části, které se výrazně liší ekologickými podmínkami a způsobem využití.

Parková část

Parková část s travnatým podrostem a hajní květenou představuje stinnou partii, v níž se můžeme setkat jak s našimi domácími keři a stromy, tak i s různými exoty. Tato část přiléhá ke skleníkovému areálu Flóry Olomouc a navazuje na rozsáhlý park ve Smetanových sadech. Barevně výrazný je zejména jarní aspekt s bohatě kvetoucími drobnými cibulovinami, které rychle využijí zbytků zimní vláhy a po olistění korun stromů s nástupem léta zatahují. Prvními jarními druhy jsou zde talovín zimní (*Eranthis hyemalis*), sněženka podsněžník (*Galanthus nivalis*) s o něco časnější a mohutnější sněženkou Elwesovou (*G. elwesii*), bledule jarní (*Leucojum vernum*), následují modré ladoňky (*Scilla* sp. div.) a ještě později i tulipány plané (*Tulipa sylvestris*) původem z jižní Evropy.

Systematická část

Centrální část zahrady je tvořena téměř padesáti záhony s velkým množstvím rostlinných druhů uspořádaných podle jednotlivých čeledí botanického systému. Jedná se o slunné vysýchavé záhony, takže druhy stinných stanovišť zde většinou nejsou pěstovány. Ty jsou začleňovány do celkové kompozice zahrady na ekologicky vhodnější místa, zejména v parkové části. Kromě trvalek, vázaných svým výskytem na místo původní výsadby, se zde ale setkáme i s jednoletými druhy. Mnohé z nich zde natolik zdomácněly, že se jejich populace každoročně obnovuje spontánním samovýsevem. To

platí jak pro běžné plevele, tak i pro některé vzácné a ve volné přírodě velmi zřídka vídané.

Okrajová část

Tato část zahrady zahrnuje několik partií. Především je to dlouhý pruh při železniční trati osázený zejména exotickými keři a liánami, s podrostem nižších trvalek. Najdeme zde také rozpínavý bambus *Arundinaria pygmaea*, který dorůstá jen asi půlmetrové výšky a za silných mrazů omrzá až ke kořenům.

Slatiniště

Další významnou plochu představuje slatiniště, na němž byla shromážděna živá sbírka květeny slatinných mokřadů. Je zde např. velký porost kriticky ohrožené přesličky různobarvé (*Hippochaete variegata*), velmi vzácná mařice pilovitá (*Cladium mariscus*), ze střední Evropy vymizelé rozložité keře břízy nízké (*Betula humilis*), která ještě začátkem minulého století rostla u Černovíra v Litovelském Pomoraví coby glaciální relikt. Efektní je množství tři metry vysokých lodyh mléče bahenního (*Sonchus palustris*). Ukázalo se však, že bez prostorové izolace si mnohé druhy nadměrně konkurují a méně expanzivní a citlivější druhy mají tendenci vymizet. Podobná situace se ostatně projevila i na někdejším černovírském slatiništi, které začalo vysychat po výstavbě parní vodárny. Snížení hladiny podzemní vody tehdy také vedlo k postupnému vytlačení konkurenčně slabé slatinné vegetace lužním lesem.

Vodní plochy

Přitažlivou partií je oválné jezírko – bazének s nápadným porostem řezanu pilolistého (*Stratiotes aloides*) trochu připomínajícího světle zelenou vodní aloe, drobnými kultivary leknínů (*Nymphaea* sp.), stolístkem klasnatým (*Myriophyllum spicatum*) a lakušníkem vodním (*Batrachium aquatile*). Lem bazénku je tvořen sérií oddělených sekcí s mokřadními rostlinami, z nichž lze jmenovat například velmi aromatický puškvorec obecný (*Acorus calamus*), různé druhy ostřic (*Carex* sp. div.) nebo dekorativní a v přírodě ohrožený kosatec sibiřský (*Iris sibirica*). Bazének je po celý rok atraktivní také

díky drobným živočichům, z nichž se pozornosti nejmladších návštěvníků těší hlavně čolci (*Triturus vulgaris*) a plovatky (*Lymnaea stagnalis*).

Další dvě vodní plochy najdeme na rozhraní systematické a parkové části. Starší z nich, a vlastně nejstarší vodní plochou v zahradě vůbec, je takzvané klkaté jezírko pojmenované podle mnoha výběžků (klků) svého okraje. Nízká hladina vody (< 30 cm) v zimě zamrzá až ke dnu, v letním období se naopak velmi rychle přehřívá. Jezírko proto využívají spíše skokani a ropuchy jako vítané refugium v jinak suché zahradě a ideální místo k rozmnožování. Pozvolna se svažující bažinatý břeh klkatého jezírka okupuje porost orobince sítinovitého (*Typha laxmannii*), v navazující mírně vlhké části pak nalezneme sběratelsky zajímavé druhy prvosenek (*Primula* sp. div.). V těsné blízkosti klkatého jezírka byl poměrně nedávno vybudován model říčního ramene Litovelského Pomoraví – tzv. smuhy. Její hloubka se blíží dvěma metrům a voda se i díky částečnému zástinu nepřehřívá ani za parného léta. Dominantním druhem je zde ďáblík bahenní (*Calla palustris*), který se silně rozrůstá. I přesto, že jde o chráněný a ohrožený druh, úspěšně konkuruje na druhé straně jezírka rostoucí vachtě trojlisté (*Menyanthes trifoliata*). Oba druhy mají atraktivní květy – vachta nezapře příbuznost s hořcovitými rostlinami, ďáblík je pak i podle toulcovitého květenství zřejmým zástupcem čeledi áronovitých. V průběhu léta zarůstá každá ploška volné hladiny rychle se rozmnožujícím okřehkem menším (*Lemna minor*).

Skalky

Mezi zahradním domkem a hájovou partií se nachází původní skalka vybudovaná v době zakládání zahrady. Její více než stoleté stáří je zjevné už při pohledu na vzrostlé stromy, které ji porůstají, stejně jako z archaické ornamentální skladby kamenů vytvářejících různě vyvýšené záhony. Základním stavebním materiálem je zde droba. V důsledku silného zápoje stromového patra nad skalkou je však v dnešní době použitelná jen ke kultivaci odolných stínomilných druhů, které zároveň tolerují prakticky neustálé sucho. Proto byla nedávno postavena druhá skalka, která odděluje volný prostor kolem oválného jezírka od venkovní posluchárny. Ta je zbudována v okrouhlém tvaru, z břidlice, a v teplých dnech její okraj slouží zároveň i k posezení návštěvníků zahrady. Právě sem je nyní umísťována většina nových přírůstků alpínské květeny z celého světa.

Obr. 1 Nová břidlicová skalka, v pozadí bývalá kotelna zrušeného skleníku (dnes užívaná jako sušárna a příležitostná čajovna)

Pěstované rostliny

Aktuálně v zahradě roste asi 1 500 druhů rostlin; počet zůstává přibližně stabilní nebo se mírně zvyšuje. Každoročně vydáváme Index Seminum s nabídkou semen k výměně s jinými botanickými zahradami. V rámci projektu BotanGIS se postupně vytváří kompletní seznam pěstovaných druhů včetně jejich lokalizace v on-line geografickém informačním systému.

V současné době jsou v zahradě pouze venkovní expozice, skleník zde chybí. Mezi pěstovanými druhy najdeme velkou část středoevropské květeny, druhy běžně i méně často pěstované v okrasných zahradách a parcích, a to z celého světa. Vzhledem k relativně teplému klimatu, otevřenosti zahrady k jihu a chráněnosti od severu (Smetanovy sady), se zde dobře daří i relativně teplomilné květeně z jižních oblastí mírného pásma. Dokladem je např. každoročně bujně rostoucí keř submediteránního trnovce (*Paliurus spina-christi*), pěkně se rozrůstající pupalka (*Oenothera speciosa*) z jižní části USA nebo samovýsevem se šířící svíčkovec (*Gaura lindheimeri*) z Texasu. Značná pozornost je věnována květeně severovýchodní části Sev. Ameriky. Klimatické podmínky přibližně souhlasí v obou oblastech a zvláště květena

vysokobylinných prérií je překvapivě odolná vůči letnímu suchu. Její barevná pestrost a druhová rozmanitost společně s morfologickými rozdíly oproti květeně středoevropské přinášejí zajímavé zpestření. Lokální půdní podmínky a častá letní sucha však nesvědčí zástupcům lesní květeny a mnohé druhy zde hynou i přes častou závlahu. Celkově vzato, preferovány jsou rostliny vytrvalé, neboť z hlediska způsobu obhospodařování zahrady lze jen obtížně soustavně udržovat jednoleté kultury. Povšimneme-li si blíže významnějších druhů, nelze opomenout úspěšnou kulturu mnoha druhů severoamerických pupalek, např. velmi ozdobné pupalky *Oenothera organensis* s květy 15–18 cm dlouhými a až 10 cm v průměru, která je svým výskytem v přírodě omezena jen na malou přírodní rezervaci v Novém Mexiku (USA). Druhy prérijní květeny upoutávají pozornost zejména koncem léta, kdy se v zahradách projevuje útlum mezi kvetoucími rostlinami. Tehdy se dominantami výsadeb stávají různé hvězdnice (*Aster* sp. div., *Symphyotrichum* sp. div.) s bílými až fialově modrými květy, žlutě kvetoucí druhy rodu Verbesina, rovněž žlutě až žlutooranžově kvetoucí třapatky (*Rudbeckia* sp. div.), nachově až purpurově kvetoucí zástupci rodu *Vernonia*, fialově kvetoucí *Verbena stricta* a *Amorpha canescens*. Žlutě kvetou také různé druhy rodů krásnoočko (*Coreopsis*) a zlatobýl (*Solidago*). S některými druhy obou rodů se často setkáváme v zahradách, expanzní druhy zlatobýlů (*Solidago canadensis*, *S. gigantea*) jsou dnes běžným prvkem i v ruderální vegetaci opuštěných a zanedbaných ploch. Z dalších žlutě kvetoucích rostlin zaujme svou vzdušností a světlou barvou velkých květů *Ratibida pinnata*, která bývá až 2 m vysoká.

Obr. 2 Česnek ozdobný (*Allium christophii*) – detail květu

Kostru zahradní kompozice tvoří samozřejmě dřeviny. S ohledem na mikroklimatické podmínky pak především dřeviny snášející sucho, mnohdy i značně teplomilné – jako v případě už zmiňovaného trnovce Kristova nebo u nás na Moravě populárnější révy vinné (*Vitis vinifera*). Vchod do zahradního domku z obou stran rámují bohatě kvetoucí popínavé dřeviny: vistárie čínská (*Wisteria sinensis*) s dlouhými hrozny modrofialových květů a trubač kořenující (*Campsis radicans*) s velkými červenooranžovými květy. Oba druhy rychle dorůstají značných rozměrů a střešní okapy je před jejich bujnými výhony nutné chránit každoroční prořezávkou. Stromovou dominantou zahrady je bezesporu mohutný dub letní (*Quercus robur*) pamatující nejen postupné budování zahrady na samém začátku minulého století, ale i dobu dávno předtím. V souvislém zápoji okolní hájové partie stojí za zmínku ořechovec hořký (*Carya cordiformis*), blízce příbuzný mateřskému stromu pekanových ořechů, ovšem nejedlý (jak druhové jméno napovídá). Vedle něj najdeme další z ořechů – ořešák černý (*Juglans nigra*), který bývá někdy používán jako odolná podnož pro roubování vlašského ořešáku a místy se s ním můžeme setkat i v lesních výsadbách. V podrostu hájové partie figuruje hned na několika místech drobnokvětý šeřík karpatský (*Syringa josikaea*), častěji pěstovaný šeřík obecný (*S. vulgaris*) najdeme v růžovofialovém kultivaru na ploše okrajové části, v sousedství ruje vlasaté (*Cotinus coggygria*) a modřínu japonského (*Larix leptolepis*). Vstup do zahrady zastiňuje vzrostlá, leč už silně prosychající lípa srdčitá (*Tilia cordata*), zleva vítá návštěvníky skupina jehličnanů s dominantní borovicí černou (*Pinus nigra*). Jejím protějškem pak jsou dvě statné sosny – borovice lesní (*Pinus sylvestris*) ve skalce přímo pod okny zahradního domku. U plně vyvinutých exemplářů je dobře patrný rozdíl ve stavbě koruny a zbarvení borky u obou druhů. Zajímavým způsobem růstu a nepřehlédnutelnými růžovými květy, které se objevují ještě před olistěním, upoutá rozsáhlý keř (polykormon) mandloně nízké (*Amygdalus nana*). Za ním, směrem k plotu železniční tratě, se pod severoamerickou borovicí těžkou (*Pinus ponderosa*) krčí drobné keříky exotických zástupců rodu lýkovec (*Daphne*).

Celoročně zajímavou skupinou jsou trávy, které mnohdy představují vítanou okrasu i v zimě. Dominantami záhonů vyhrazených čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) jsou i v suchých podmínkách mohutné proso prutnaté (*Panicum virgatum*) a vousatka Gerardova (*Andropogon gerardii*), v podrostu najdeme nižší trsnaté až polštářovité kostřavy (*Festuca* sp. div.) a přitiskle plazivou východoasijskou *Arthraxon hispidum*. Tato širokolistá tráva je sice jednoletá, ale v našich podmínkách se sama každoročně úspěšně přesévá.

Zvláštní záhon je věnován kolekci různých ekotypů našich bezkolenců (*Molinia* sp. div.), která vznikla v průběhu zpracování tohoto rodu pro Květenu České republiky. Jako doplněk jiných výsadeb a podrost dřevin samozřejmě nalezneme trávy ve všech částech zahrady – nízký troskut prstnatý (*Cynodon dactylon*) ze sešlapávaných stanovišť teplých oblastí má vymezený životní prostor hned v prvním záhonu před vstupní bránou, živorodá lipnice cibulkonosná (*Poa bulbifera*) ozvláštňuje hajní partii, žlutozeleně pruhovaná ozdobnice čínská (*Miscanthus sinensis* ‚Zebrina') vévodí vstupu do zahradního domku a zmenšená forma rákosu obecného (*Phragmites australis*) vyčnívá nad hladinu oválného jezírka.

Na záhonech se porůznu daří udržovat vzácné polní plevele, se kterými se v přírodě téměř nesetkáme – dejvorec velkoplodý (*Caucalis platycarpos*), vochlici hřebenitou (*Scandix pecten-veneris*), koukol polní (*Agrostemma githago*), prorostlík okrouhlolistý (*Bupleurum rotundifolium*), pochybek největší (*Androsace maxima*), vranožku šupinatou (*Coronopus squamatus*) nebo zběhovec trojklanný (*Ajuga chamaepitys*), otočník evropský (*Heliotropium europaeum*), ibišek trojdílný (*Hibiscus trionum*), merlík hroznový (*Chenopodium botrys*) nebo pro naši flóru už nezvěstný pochybek největší (*Androsace maxima*). Z lesních druhů jsou zajímavé např. statná vikev *Vicia sparsiflora* se vzpřímeným růstem a velkými žlutobělavými květy pocházející z nejsevernější (a dnes již zřejmě zaniklé) lokality tohoto druhu ve Štiavnických vrších (Slovensko). Ozdobný je též hrachor sedmihradský (*Lathyrus transsilvanicus*), který se lokálně vyskytuje v malé oblasti Slovenska (okolí Rožňavy), s květy při rozkvětu žlutobělavými a později se zbarvujícími do rezava. Takřka historický je každoroční výskyt kavkazského krtičníku zlatožlutého (*Scrophularia chrysantha*) s měkce šedě chlupatými listy a sytě žlutými květy, který je v naší botanické zahradě zaznamenáván téměř od začátku minulého století a stále se spontánně udržuje.

Nedílnou součástí zahrady jsou i druhy významné z hlediska užitkového, tzn. kulturní, léčivé a aromatické rostliny. Druhy běžně pěstované (ořešák vlašský, máta peprná, paprika roční) jsou doplněny druhy méně známými (meloun cukrový, temnoplodec černoplodý, mochyně peruánská, routa vonná) či pozapomenutými (kdouloň obecná, pelyněk brotan, žito lesní). Samostatnou skupinu tvoří barvířské rostliny, jejichž pěstování bylo zatlačeno do pozadí už v průběhu 19. století s rozvojem chemické výroby. Do dnešní doby jejich někdejší využití připomíná jen zplanění v místech původních kultur a druhové epiteton „barvířský/-á/-é" (*tinctorius*/-*a*/-*um*). Vytrvalé

druhy používané tradičně v lidovém léčitelství i kuchyni najdeme porůznu mezi ostatními planými rostlinami na příslušných záhonech systematické části. Jednoleté užitkové rostliny, které často vyžadují i předpěstování sadby ve skleníku (teplomilné zeleniny), jsou pak soustředěny na část středového záhonu u zahradního domku, kde si stálí návštěvníci botanické zahrady mohou po dohodě i vyzkoušet péči o nejzajímavější zeleniny, které v domácích zahrádkách prakticky nenajdeme. V roce 2012 měla například velký úspěch kolekce pálivých chilli papriček, kterou stále rozšiřujeme o formy a kultivary zajímavé svým vzrůstem, olistěním a tvarem i barvou plodů. Protipólem zahradní zeleniny jsou typicky polní plodiny – obiloviny, vláknodárné (přadné) rostliny, olejniny a technické plodiny. S nimi se lze seznámit v druhé části středového záhonu nabízejícího mimo jiné i srovnání moderních kulturních odrůd s jejich staršími předchůdci a příbuznými planými druhy.

Akce botanické zahrady

Hlavním způsobem seznamování s bohatstvím pěstovaných rostlin zůstává odedávna prohlídka botanické zahrady, ať už s komentářem zasvěceného průvodce, či bez něj. Naše návštěvníky ovšem také příležitostně zveme na speciální akce v zahradě i mimo ni. Každá z nich je zaměřena trochu jinak, koná se v jiném období, pro jinou skupinu účastníků.

První velkou zatěžkávací zkoušku v nové sezóně absolvuje botanická zahrada v době jarní etapy veletrhů Flora Olomouc. Tehdy se stává organickou součástí výstavního areálu a poskytuje klidný kout stovkám návštěvníků obtěžkaných nakoupenými rostlinami a potřebami pro zahrádkáře. Pro školní výpravy, které se výstav hojně účastní, poskytujeme zdarma průvodcovskou službu, na požádání můžeme nabídnout tematicky zaměřené pracovní listy a problémem není ani zajištění odborného doprovodu na univerzitní pracoviště nebo přírodovědně zajímavé lokality v okolí Olomouce. Návštěvám žáků a studentů se ovšem věnujeme v průběhu celého roku – vždyť především pro ně tu zahrada je. Studenty prvních ročníků odborného studia na PřF UP tak střídají budoucí učitelé středoškolské biologie; se svými třídami přicházejí učitelé základních škol, profesoři gymnázií a specializovaných středních škol se zemědělským a zahradnickým zaměřením.

Skvělou příležitostí k návštěvě je Den fascinace rostlinami pořádaný každoročně krátce po polovině května, tedy v době, kdy už nehrozí jarní mrazíky a je možné demonstrovat i teplomilné druhy přivezené na letně-

ní ze skleníků katedry botaniky v Olomouci-Holici. Nechat se fascinovat rostlinami je v tento den snadnější prostřednictvím všech smyslů, protože součástí programu bývá tradičně i útulná čajovna s ochutnávkou.

Začátkem června už naplno probíhají terénní exkurze, na kterých se studenti PřF UP seznamují s flórou a vegetací střední Evropy. Ty směřují na botanicky významné lokality po celé Moravě (příležitostně i v zahraničí) a samozřejmě také do botanické zahrady, kde je i díky nastupujícímu období školních výletů obzvlášť živo.

V letních vedrech představuje zahrada mnohdy spíš ukázku důsledků globálního oteplení. Prosperita rostlin závisí na každodenní závlaze, vegetace se zpomaluje, jezírka se stávají vyhledávanými oázami pro mnoho druhů ptáků. O prázdninách, kdy Olomouc přichází o desítky tisíc svých studentských obyvatel, poskytuje zahrada útočiště účastníkům příměstských táborů. Konec léta pak předznamenává druhá, letní etapa veletrhu Flora Olomouc.

Se začátkem nového školního a akademického roku se do zahrady opět vrací studentský život. Znovu probíhají exkurze využívající posledních příležitostí k bezprostřednímu setkávání s rostlinami, pedagogové sbírají materiál pro praktická cvičení, studenti pořizují fotodokumentaci. Většinou ještě dostatečně teplá noc na začátku posledního zářijového víkendu je Nocí vědců. Zahrada je v tento den otevřena přes půlnoc a přicházející návštěvníci mají příležitost poznat hravou stránku vědy a vyzkoušet si mnoho technik a experimentů na vlastní kůži.

Úplný závěr sezóny, po podzimní etapě Flory Olomouc, je v režii studentů pedagogické fakulty. Ti v rámci přípravy na své učitelské povolání pořádají akci zvanou Podzimní veselí určenou pro předškolní a školní děti. Areál zahrady se před zazimováním a uzavřením naposledy propojí s přilehlými sbírkovými skleníky výstaviště Flora Olomouc.

Kromě pravidelných každoročních akcí jmenovaných v předcházejících odstavcích probíhají samozřejmě i akce příležitostné pořádané ze zájmu některé z kateder Univerzity Palackého nebo spolupracujících institucí. Díky nim tak můžeme v botanické zahradě absolvovat třeba meditační sezení, naučit se aranžování květin, zahrát si „hru na hrdiny“ (LARP) nebo oslavit židovský Svátek stánků. Všem, kteří nechtějí propásnout některou z pořádaných akcí, proto velmi doporučujeme sledovat webové stránky botanické zahrady PřF UP!

Otevírací doba

Botanická zahrada je veřejnosti přístupná ve všední dny od dubna do října. V sezóně je navíc otevřeno i každý první víkend v měsíci. Provozní hodiny jsou následující:

květen–září	8:00–18:00
duben, říjen	8:00–16:00

Návštěvu mimo uvedenou dobu lze dohodnout e-mailem nebo telefonicky. Hromadné exkurze je vhodné ohlásit předem – pak lze na požádání poskytnut i odborný výklad.

Kontakt

Botanická zahrada je situována v centru města ve Smetanových sadech mezi sbírkovými skleníky Flory Olomouc a železniční tratí místní dráhy, v ulici příznačně pojmenované „U Botanické zahrady".

Podrobné informace o ní je možné získat na http://garden.upol.cz, e-mail: garden@upol.cz, telefon: +420 585 634 832, +420 585 413 705.

Proces kriminalistické identifikace pomocí DNA profilování

Jiří Drábek

Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Československá společnost pro forenzní genetiku

Přednáška proběhla dne 12. ledna 2012.

DNA profilování tvoří v současné době pilíř kriminalistické praxe, kdy pomáhá nejen určit pachatele závažných trestných činů, jako je vražda nebo znásilnění, ale také řešit méně závažné trestné činy jako je krádež. Sledováním televizních seriálů řady CSI a jejich obměn by mohl laik získat nesprávný názor, že DNA analýza je všeřešící a jediný možný způsob získávání důkazů z místa činu. Přestože identifikační schopnosti DNA profilování jsou jedinečné, srovnatelné jen s otisky prstů, důkazní síla DNA je podmíněna splněním určitých podmínek.

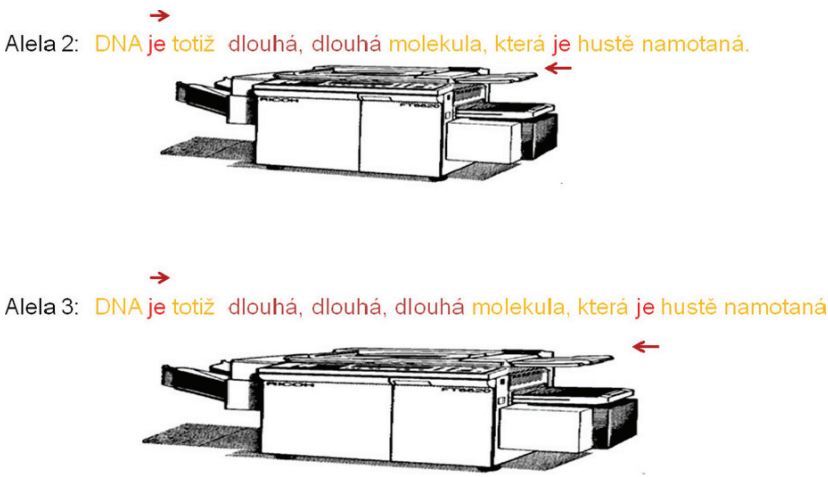
Tento dokument zodpovídá na otázky, z čeho se skládá důkazní řetězec, co se v DNA vyšetřuje a v čem je DNA nepřekonatelná a zároveň jaká jsou omezení použití DNA důkazů.

Nejprve vysvětlení některých pojmů týkajících se forenzní DNA analýzy:

- *Adenin (A)*, *tymin (T)*, *cytozin (C)*, *guanin (G)* – nukleotidy, písmena genetické abecedy.
- *Alela* – konkrétní forma genu.
- *Amplikon* – produkt PCR.
- *Elektroforeogram* – graf složený z píků a pocházející z přístroje pro kapilární elektroforézu.
- *Fenotyp* – soubor pozorovatelných vlastností a znaků organizmu (někdy význam omezen na zkoumaný znak či znaky).
- *Genotyp* – soubor veškerých genetických informací organizmu (někdy význam omezen na zkoumaný znak či znaky).
- *Heterozygot* – jedinec, který má na daném lokuse po otci a matce rozdílné alely.

- *Homozygot* – jedinec, který má na daném lokuse po otci i matce stejnou alelu.
- *Lokus* – genetická adresa, umístění v rámci genomu.
- *PCR* – polymerázová řetězová reakce, způsob namnožení určitého úseku DNA (vymezeného specifickými oligonukleotidy, primery) ve zkumavce cyklickou změnou teploty.
- *Pík* – vrchol křivky elektroforeogramu odpovídající signálu konkrétní alely.
- *Polymeráza* – enzym použitý v PCR (pocházející převážně z bakterie *Thermus aquaticus*).
- *Stutter* – artefakt prokluzu polymerázy.

Vyšetření DNA v rámci vyšetřování trestného činu se provádí takzvaným DNA profilováním (Obr. 1).



Obr. 1 Symbolické znázornění aplikace PCR pro DNA profilování pomocí typizace mikrosatelitů

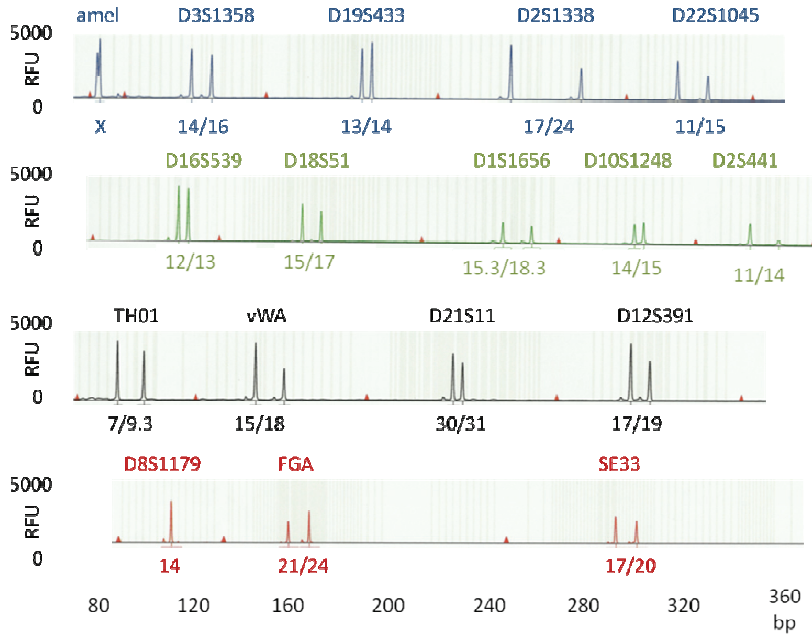
Toto DNA profilování umožňuje zodpovědět na otázku, zda:
- stopy pocházejí ze stejného zdroje (opakovaná trestná činnost),
- stopa a srovnávací vzorek pocházejí ze stejného zdroje (stopa na místě činu, ale také identifikace pohřešovaných a unesených osob dle biologických stop na jejich osobních věcech nebo kontrolního vzorku odebraného jako vojenská „psí známka“),

- stopa a údaj v kriminalistické databázi zločinců pocházejí ze stejného zdroje (zásahy naslepo, tzv. „cold hits“),
- dané osoby jsou příbuzné (otcovství u znásilnění nebo incestu, ale také identifikace pohřešovaných a unesených osob dle jejich příbuznosti s identifikovanými osobami a identifikace obětí hromadných a válečných neštěstí, např. teroristický útok na newyorská Dvojčata 9/11 nebo Tsunami v roce 2004 v Thajsku),
- stopu zanechal někdo jiný než podezřelý (vyvinění podezřelých, příkladem budiž Innocence project).[1]

Pro DNA profilování se jako standardní metoda používá zjišťování variant genů (alel) délkových polymorfismů, mikrosatelitů (krátkých tandemových repetic) na autozomálních (nepohlavních) chromozomech.[2] Forenzně využívané mikrosatelity jsou nekódující, čtyřnukleotidové, tandemově se opakující repetice. Variabilita v populaci je délková, daná počtem repetic. Výhodou mikrosatelitů je:

- Vysoká diskriminační schopnost (vystačuje pro identifikaci a databázování).
- Propracované pravděpodobnostní modely pro výpočet síly důkazu (vyjádřené věrohodnostním poměrem).
- Kompetitivní cena.
- Snadná interpretace za splnění určitých předpokladů.
- Standardnost (mezinárodní policejní databáze) a zároveň rozmanitost.
- Slučování testů do jedné zkumavky (multiplexing).
- Citlivost (< 1 ng DNA), robustnost zvládající i některé směsi a degradované vzorky.
- Používané forenzní mikrosatelity nejsou ve vazbě s nemocemi (nezjistíme citlivou informaci, která není důležitá pro vyšetřování).
- Malé nároky na odběr a na vzorek.

Mikrosatelitů je v lidském genomu mnoho tisíc, ale ve forenzní praxi se využívají jen čtyři desítky, přičemž základem mezinárodní databáze CODIS je jen 13 mikrosatelitů: TPOX, D3S1358, FGA, D5S818, D7S820, D8S1179, TH01, vWA, CSF1PO, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11 (Obr. 2). Tyto lokusy (mikrosatelitové markery) byly Američany vybrány jako databázový základ.[3, 4] Shoda ve 13 lokusech mezi dvěma vzorky DNA znamená, že vzorky pocházejí ze stejného zdroje (s výjimkou jednovaječných dvojčat).

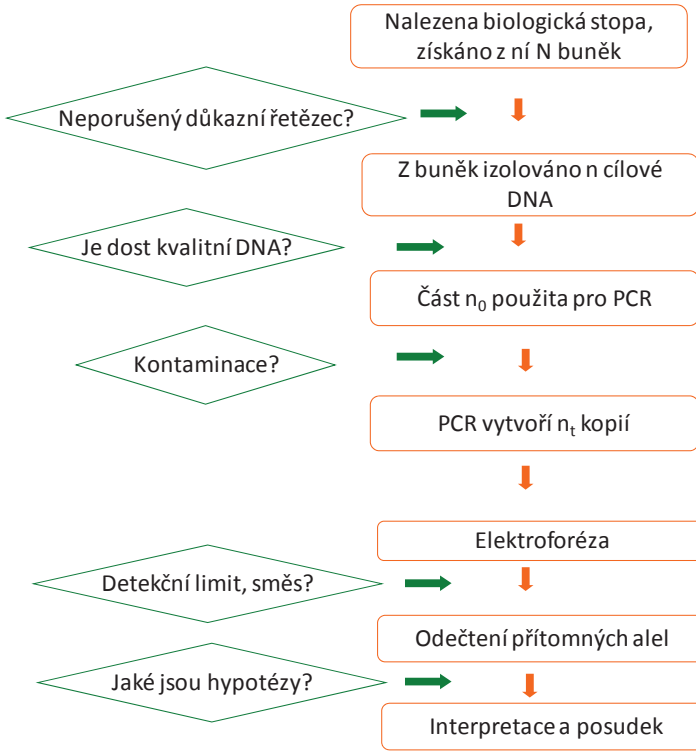


Obr. 2 Vzorový DNA profil

Vyšetření mikrosatelitů sestává z několika kroků:

- Získání vzorku (z místa činu nebo získání porovnávacího vzorku výtěrem ústní dutiny).
- Přesun vzorku do laboratoře.
- Izolace a kvantifikace DNA.
- Namnožení pomocí molekulární kopírky – polymerázové řetězové reakce[5] (PCR).
- Kapilární elektroforéza.
- Detekce a určení genotypu.
- Interpretace (zodpovězení otázky, zda-li se jedná o důkaz, který podporuje verzi obžaloby, nebo verzi obhajoby, a jak silný je to důkaz; provádí se výpočtem věrohodnostního poměru).
- Referování výsledku (expertní posudek, svědčení u soudu).

Každý z kroků je doprovázený signovanou dokumentací (Obr. 3).



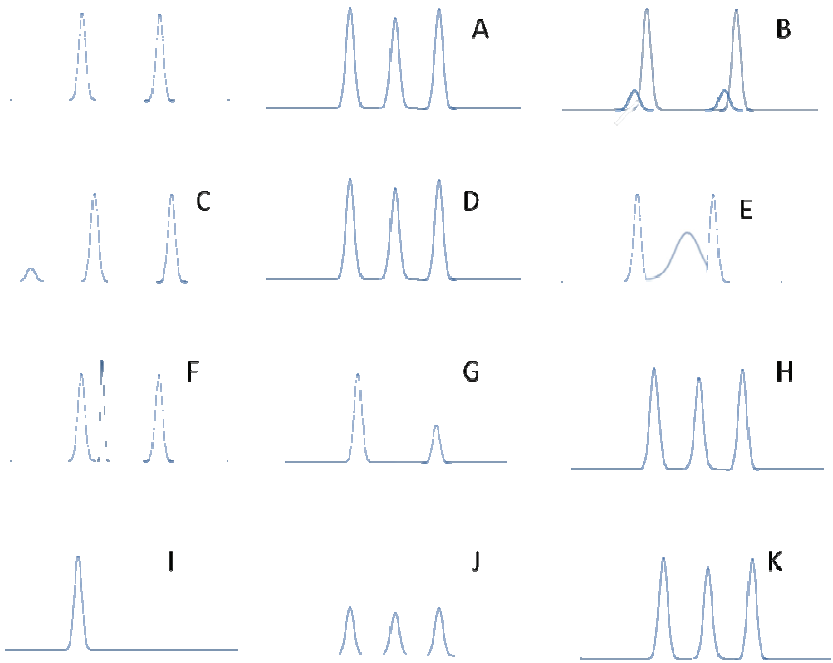
Obr. 3 Schematické znázornění procesních kroků DNA profilování

Obhájci v mediálním případu O. J. Simpsona[6] a jiných bohatých prominentů prokázali, že zaváhání v jakémkoliv kroku forenzního využití DNA je možno úspěšně právnicky napadnout (platí, že důkazní řetězec je tak silný, jako jeho nejslabší článek). Uznávaným přístupem pro řízení kvality v laboratoři je získání formálního uznání kvality – akreditace od Českého institutu pro akreditace[7] dle mezinárodní normy ISO17025. Principem této normy je, že přijetí vzorku laboratoří k vyšetření provádí proškolená a externě kontrolovaná osoba s nezbytnými znalostmi a zkušenostmi, dle standardního operačního protokolu, ve vhodné laboratoři, za použití kalibrovaných přístrojů a validovaných metod; výsledky interpretuje dle odborných doporučení.

Kromě narušení celistvosti důkazního řetězce mohou výpovědní hodnotu DNA důkazů snížit nebo anulovat další komplikace vyšetření (Obr. 4):

A) Kontaminace (znečištění jiným vzorkem; může k ní dojít na místě činu i nedbalostí v laboratoři nebo u dodavatele spotřebního materiálu pro laboratoř). Odečteme více než dva píky na jednom lokuse nebo odečteme píky i tehdy, pokud vzorek neobsahoval lidskou DNA.
B) Artefakt způsobený nedokonalým přidáním beztemplátového adeninu. Polymeráza u třetího cyklu a dalších cyklů PCR dojde na konec vzorové, templátové DNA a přidá ještě jeden adenin. Kromě správného píku pak odečteme i pík o jeden nukleotid delší. Podmínky PCR se většinou nastavují tak, aby adenin „navíc" byl u všech DNA molekul. Nicméně u některých molekul se to nepodaří.
C) Artefakt způsobený polymerázou, která poskočí na svém templátu stejným mechanizmem, jako když proklouzne řetěz na kole (anglicky stutter). Kromě správného píku lze odečíst také pík odpovídající alele o jednu jednotku repetice kratší (výjimečně o jednotku repetice delší).
D) Artefakt způsobený příliš silným signálem a nedokonalou softwarovou filtrací spektrálního překryvu fluorescenčních značek v detekčním systému, přetečení (pull-up). Odečteme nesprávně pík i v jiných barevných kanálech.
E) Šum (noise) a kaňky (uvolněné fluorescenční značky, dye blobs). Správné píky mohou být šumem nebo kaňkou zacloněné (nevíme, jestli jsou, nebo nejsou přítomny).
F) Elektrický výboj (spike). Pokud nejsme pozorní a nesledujeme tvar píku, tak můžeme spike zaměnit za pík.
G) Nevyvážené píky. U heterozygota nejsou píky na lokuse stejně vysoké (nižší pík může být přehlédnut nebo zaměněn za artefakt).
H) DNA směsi. Více než dva píky na více než dvou lokusech. U více než tří osob je DNA profil nerozklíčovatelný.
I) Neúplný DNA profil kvůli degradaci stopy. Chybějící signál u heterozygota (alelický drop-out) nebo dokonce chybějící signál na celém lokuse (lokusový drop-out). Alelický drop-out má stejný projev jako „nulová alela", kdy polymorfismus v místě vazby primeru na templát znemožní amplifikaci alely a signál není generován.
J) Arteficiální signál u degradovaných vzorků při limitu citlivosti metody (drop-in).

K) Tři signály na lokuse (nejedná se o trisomii chromozomu nebo o kontaminaci, ale o duplikaci chromozomové oblasti bez fenotypového projevu). Pečlivému pozorovateli obrázku 4 neunikne, že komplikace A, D, H, J a K mohou mít stejný projev na elektroforeogramu.



Obr. 4 Schematické elektroforeogramy při komplikacích vyšetření

Je nutné si uvědomit, že síla DNA důkazu je podmíněná, závisí na okolnostech. V některých případech je DNA profilování zbytečné (DNA profilování vaginálního výtěru u znásilnění manželem nepřinese žádnou použitelnou informaci, protože pravděpodobnost nalezení DNA profilu manžela v pochvě manželky je stejná, ať byl sex konsenzuální, nebo se jednalo o znásilnění). Jindy zase není vyloučen sekundární (popřípadě terciární) přenos DNA z jednoho předmětu na jiný nebo z jedné osoby na druhou osobu nebo předmět. Díky citlivosti metod mohou důsledky přenosu biologického materiálu nabírat i bizarní podoby: krevní stopa na stropě v hotelovém pokoji, kde byl nalezen zavražděný, odpovídala osobě, kterou píchl komár

v jiném pokoji, a která neměla se zločinem nic společného.[12] Podívejme se na jeden zahraniční, mediálně prezentovaný případ, který byl uzavřen v roce 2011 – vraždu Meredith Kercher. Tento případ názorně ukazuje některá omezení forenzní DNA analýzy.

Nejprve představení aktérů: Meredith Kercher – oběť vraždy, Amanda Knox – obviněná, Raffaele Sollecito – obviněný přítel Amandy Knox, Rudy Guede – odsouzený vrah Meredith Kercher. A nyní chronologicky, co se v případu odehrávalo.[8]

2007, srpen	Meredith Kercher přijíždí do italské Perugie.
2007, 10. září	Kercher si spolu se dvěma Italkami pronajímá byt na Via della Pergola 7.
2007, 20. září	Amanda Knox si pronajímá čtvrtý pokoj na Via della Pergola.
2007, říjen	Rudy Guede potkává Kercher a Knox.
2007, 25. října	Knox chodí s Raffaelem Sollecito.
2007, 1. listopadu	Kercher brutálně zavražděna nožem ve svém pokoji.
2007, 2.–6. listopadu	Knox a Sollecito vyslýcháni jako svědci (bez přítomnosti advokátů).
2007, 6. listopadu	Na otázku, kdo by mohl být vrahem, Knox jmenuje svého zaměstnavatele v baru – Patricka Lumumbu. Knox, Sollecito a Lumumba jsou zatčeni.
2007, 19. listopadu	Otisky prstů na místě činu byly ztotožněny s Guedem. Pozdější srovnání DNA profilu z místa činu (mezi jinými z nespláchnutého exkrementu v záchodové míse) s porovnávacím vzorkem ztotožnění potvrzuje.
2007, 20. listopadu	Guede zatčen v Německu, Lumumba propuštěn z vazby.
2008, 1. dubna	Italský Nejvyšší soud potvrzuje uvalení vazby na Knox, Sollecito, Guede.
2008, 29. října	Guede odsouzen na 30 let, Knox a Sollecito obviněni z vraždy a sexuálního útoku.
2009, 16. ledna	Začíná soudní přelíčení s Knox a Sollecito.
2009, 18. listopadu	Začíná odvolací soud Guede.
2009, 21. listopadu	Obžaloba požaduje doživotní trest pro Knox a Sollecito a navíc 9 měsíců samotky pro Sollecito.

2009, 4. prosince	Knox odsouzena na 26 let, Sollecito na 25 let.
2009, 22. prosince	Guedův rozsudek zmírněn na 16 let.
2010, květen	Guede podává druhé odvolání.
2010, 24. listopadu	Začíná odvolací soud Knox a Sollecito.
2010, prosinec	Kasační soud (poslední odvolací instance v Itálii) potvrzuje rozsudek pro Guedeho.
2011, 29. ledna	Nezávislí experti zpochybnili důkazy proti Knox a Sollecito (zpráva Carla Vecchioti a Stefano Conti).
2011, 3. října	Sollecito a Knox omilostněni v celém rozsahu.

Na základě jakých důkazů byli Knox a Sollecito nejprve odsouzeni a poté propuštěni? Dle informací z médií, z přednášky prof. Grega Zampikiana na konferenci[9, 10] Forensica 2012 a z Conti-Vecchiotti reportu[11] byly hlavními důkazy dvě položky:

- Důkazní položka číslo 36, nůž nalezený v pokoji Sollecita v kuchyňské zásuvce, ze kterého měl být získán DNA profil Kercher z čepele a DNA profil Knox ze střenky.
- Důkazní položka číslo 165, přezka podprsenky Kercher nalezená utržená a zakrvácená na místě činu. Z ní měl být získán DNA profil Sollecita.

Jak se mohly tyto důkazy nakonec ukázat jako nepřesvědčivé?

Z nože byl získán DNA profil Knox s velmi nízkým signálem, pod interpretačním limitem. Sérologické testy neprokázaly, že DNA Kercher pochází z krve. Není zřejmé, proč policisté považovali tento nůž za vražedný nástroj. Bodné rány na hlavě zavražděné tomuto noži neodpovídaly. Zajištění důkazu nebylo provedeno s dostatečnými protikontaminačními opatřeními: při odvolacím stání byly v soudní síni promítány videozáběry natočené při zajištění tohoto důkazu. Přestože policisté tvrdili, že si mění rukavice mezi jednotlivými vzorky, v záběru kamery se ukáže rukavice, na které je viditelná špína.

Přezka byla zajištěna až po uplynutí 46 dní od zločinu (!) v prostředí, které nebylo zajištěné a vnikli do něj lovci senzací a také Sollecito. Přestože policisté dokumentovali zajištění všech důkazních položek, zajištění tohoto důkazu dokumentováno nebylo. Naopak se při odvolacím stání ukázalo, že si policisté svou chybu uvědomili a přezku znovu položili na původní místo, aby mohli její zajištění dokumentovat. Nebyla provedena negativní kontrola kontaminačního pozadí místa činu. Na přezce byl majoritní DNA

profil oběti a minoritní profil interpretovaný policií jako patřící Sollecito. Nezávislý expert ale nalezl směsný DNA profil složený z DNA nejméně tří mužů. Policie si nastavila tentokrát detekční limit tak, že některé píky na elektroforeogramu byly odfiltrovány a nedostaly se do zprávy.

Pro omilostnění posloužily tyto argumenty:

- Porušení lidských práv (Knox byla vyslýchána bez překladatele a bez advokáta).
- Nepořádek v dokumentaci policie, chyby při zajištění důkazního materiálu znehodňující dva základní důkazy.
- Nedostatečné kontroly kontaminace.
- Špatná interpretace síly důkazu – nedostatečné zhodnocení možnosti transferu biologického materiálu.

Více informací týkajících se forenzní genetiky je na webových stránkách Československé společnosti pro forenzní genetiku[12] ČSSFG a na stránkách výukového projektu, financovaného grantem[10] OPVK.

Použitá literatura a informační zdroje

1. http://www.innocenceproject.org/ (staženo 10. 7. 2012).
2. http://www.woodrow.org/teachers/esi/2002/Biology/Projects/p3/definition.htm (staženo 10. 7. 2012).
3. http://www.cstl.nist.gov/strbase/fbicore.htm (staženo 10. 7. 2012).
4. http://www.fbi.gov/news/stories/2011/november/dna_112311 (staženo 10. 7. 2012).
5. http://www.youtube.com/watch?v=HMC7c2T8fVk (staženo 10. 7. 2012).
6. http://en.wikipedia.org/wiki/O._J._Simpson (staženo 10. 7. 2012).
7. http://www.cai.cz/default.aspx?id=70&webCat=16 (staženo 10. 7. 2012).
8. http://en.wikipedia.org/wiki/Murder_of_Meredith_Kercher (staženo 10. 7. 2012).
9. www.forensica2012.org (staženo 10. 7. 2012).
10. www.4N6gen.org (staženo 10. 7. 2012).
11. http://knoxdnareport.wordpress.com (staženo 10. 7. 2012).
12. www.cssfg.org (staženo 10. 7. 2012).
13. Šimková H. Breviář forenzní genetiky: forenzní analýza v otázkách a odpovědích. 1 ed. Brno: Tribun EU, s. r. o.; 2012.

Zajímavý svět sinic a řas
Sinice a řasy ve výuce základních a středních škol

Petr Hašler

Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Přednáška proběhla dne 19. ledna 2012.

Obecný úvod

Sinice a řasy představují jednoduché mikroskopické až makroskopické fotosyntetické organizmy, které jsou tvořeny nerozlišeným tělem **stélkou**. Tvar a typ stélky patří mezi rozhodující faktory při determinaci sinic a řas na úrovni druhů až vyšších taxonomických celků. Mezi základní typy stélek řadíme: **kokální**, která je tvořena jednotlivými buňkami, zpravidla kulovitého, vejčitého nebo protáhlého tvaru, které žijí samostatně nebo v koloniích, přičemž mezi výrazné organely patří chloroplast; **bičíkaté**, které jsou tvořeny jednotlivými buňkami žijícími jednotlivě nebo v koloniích, buňky jsou zpravidla kulovité, kapkovité nebo vejčité, mezi výrazné organely patří bičíky, stigma a chloroplast; **vláknité**, které jsou tvořeny stélkou protáhlého tvaru z řad jednotlivých buněk, které jsou navzájem propojeny do fyziologicky propojeného celku, stélka se může větvit do morfologicky stejných nebo odlišných větviček; **sifonální** a **sifonokladální**, které se podobají vláknitým stélkám, nicméně vykazují odlišnosti v uspořádání buňky, které jsou mnohojaderné s obvykle velkým množství drobných chloroplastů, stélka se může větvit nebo tvořit složitější uspořádání.

V životě sinic a řas a jejich determinaci hraje důležitou roli způsob jejich rozmnožování a typ životního cyklu. Za základní cestu rozmnožování můžeme považovat nepohlavní cestu, která se vyskytuje u všech skupin. Jedná se o prosté buněčné dělení, fragmentaci stélky až produkci specifických bičíkatých, nebo nebičíkatých výtrusů. Pohlavní rozmnožování je provázeno tvorbou gamet, které se mohou v rámci druhu lišit velikostí, tvarem nebo mohou být naprosto identické. U velké skupiny řas je dominantní haploidní část života a jediné, co je diploidní, je zygota. U některých řas dochází ke střídání haploidní a diploidní fáze, tedy dochází k rodozměně. Haploidní a diploidní rostliny se mohou morfologicky lišit, nebo mohou být totožné.

Evoluce a vztahy uvnitř sinic a řas

První zárodky vzniku fotosynteticky aktivních organizmů dnešní doby, ze kterých se postupně vyvinuly sinice, se objevily přibližně před 3,5–3 mld. let. Objev sinic na Zemi měl pro vývoj dalšího života zásadní význam. V době jejich vzniku panovaly na Zemi poměrně extrémní podmínky, zejména velmi nízké koncentrace kyslíku. Sinice jako první organizmy s fotosyntézou dnešního typu hrály klíčovou roli v obohacení atmosféry kyslíkem. Postupem času sinice vstupovaly do řady vztahů s ostatními organizmy, což vyústilo ve vznik dalších skupin eukaryotických řas. Tyto vztahy a vznik řasových skupin jsou založeny na endosymbiotických procesech. V prvním okamžiku byly sinice pravděpodobně pouhou potravou pro drobné organizmy typu prvoků. Z dosud ne přesně zjištěných příčin některé sinice nebyly stráveny a staly se součástí hostitelského organizmu. V prvním okamžiku si sinice uvnitř hostitele zachovala svoji vnitřní strukturu a autonomii. Postupně však svoji autonomii ztrácela a došlo i ke zjednodušení struktury, čímž se ze sinice stal chloroplast. V tomto okamžiku vznikly dvě vývojové linie primárních řas – zelené a červené. Tento evoluční krok se opakoval a kořistí predátora byla zelená nebo rudá řasa. Vznikla druhá skupina tzv. sekundárních řas – např. skrytěnky, obrněnky, krásnoočka a hnědé řasy.

Ekologie sinic a řas

Sinice a řasy žijí na Zemi stamiliony až miliardy let. Za tuto dobu se stačily specializovat na celou škálu životních prostředí. Mnohé druhy sinic a řas jsou na určitý typ prostředí a jeho kvalitu tak silně adaptované, že této vlastnosti se využívá v **biomonitoringu**. Druhy nazýváme **bioindikační** a velká část z nich patří mezi rozsivky. Výhodou rozsivek je vlastnost jejich pevné buněčné stěny, kdy jsme schopni i ze starých sedimentů izolovat zbytky schránek rozsivek, a tím odhadovat ekologické podmínky daných lokalit. Podle typu životního prostředí rozlišujeme společenstva sinic a řas na: **planktonní** – vznášející se organizmy ve vodním sloupci; **perifytická** – porůstají ponořené substráty a předměty, podle typu je dělíme na epifytická – na rostlinách, epipelická – na povrchu bahnitých sedimentů, epilitická – na povrchu kamenů, epizoická – na povrchu živočichů; **aerofytická** – druhy využívají vzdušnou vlhkost; **subaerofytická** – druhy jsou periodicky smáčeny vodou. Některé skupiny sinic a řas vytváří v přírodě charakteristické populace.

Mnohé planktonní sinice na vodní hladině vytváří patrnou hmotu ve formě vloček, jehliček až souvislých povlaků, kterou nazýváme **vodní květ**. Vznik tohoto nepříjemného fenoménu je spojený s eutrofizací vod, tedy se zvýšením jejich úživnosti. Do vodního ekosystému vstupují rozličné živiny (např. dusičnany, fosforečnany) přírodní cestou (eroze, organický opad vegetace, výkaly vodního ptactva a ryb) nebo působením člověka (odpadní vody z domácností, průmyslu a zemědělství). Zvýšený živinový vstup následně podporuje rozvoj sinic vodního květu, jejichž populace velmi často produkují nebezpečné **cyanotoxiny**. Za bezvětrných parných dní můžeme na vodní hladině pozorovat různobarevné povlaky, kterým říkáme **neustonická blanka**. Tvoří ji zástupci ze skupin zlativek, krásnooček nebo zelených řas. Specifické populace řas žijících na povrchu sněhové pokrývky nazýváme sněžné řasy. Vyskytují se v horských a severských oblastech. Sníh je zabarvený podle jednotlivých druhů, např. zeleně nebo červeně. Některá aerofytická společenstva žijí v omítkách domů nebo vzácných historických freskách a jeskynních malbách. Svojí metabolickou činností tyto substráty rozrušují a způsobují jejich dlouhodobou erozi. Masivní populace některých druhů mají geologický význam. Ze stélek parožnatek vznikala hornina travertin, který se využívá ve stavebnictví. Ze sedimentovaných schránek planktonních rozsivek vznikla hornina křemelina (křemitá hlinka, křemelina). Z mnohých mořských řas vznikly mocné vápenaté sedimenty (*Corallina officinalis*).

Využití sinic a řas

Řada sinic a řas se využívá ve farmacii, potravinářství a biotechnologii. Zelené řasy rodu *Haematococcus* a *Dunaliella* jsou významnými producenty biologicky aktivních karotenů, které mají protinádorové účinky. Sinice *Arthrospira* a zelená řasa *Chlorella* jsou významnými producenty biomasy, která je doplňkovým zdrojem výživy. Pojídání těchto preparátů obohacuje výživu člověka o proteiny, stopové prvky a vitamíny. V přímořských státech se hojně pojídají makroskopické mořské ruduchy (*Porphyra*), chaluhy (*Laminaria*) a zelené řasy (*Ulva*). Pojídání řas je populární zejména v přímořských státech Asie (Nori – produkt při výrobě suši). Ze spalování makroskopických stélek mořských chaluh se získával jód. V současné době jsou sinice a řasy předmětem intenzivního technologického výzkumu za účelem produkce biopaliv. Výzkum se zaměřuje na kmeny s vysokou produkcí olejnatých inkluzí, jako např. ze skupin rozsivek. Řasy jsou předmětem výzkumu a technologie již delší dobu. Alfred Nobel roku 1866 použitím křemité

hlinky stabilizoval nitroglycerin a vynalezl tím dynamit. V pozůstalosti odkázal svůj majetek nadaci, ze které se každoročně vyplácí Nobelova cena.

Přehled významných skupin sinic a řas

Sinice (Cyanophyta, Cyanobacteria)

Sinice (Obr. 1–4) jsou jednoduché organizmy, jejichž stélka může být jednobuněčná nebo vláknitá, přičemž buňky i vlákna se mohou sdružovat v koloniích. Buňky sinic vykazují bakteriální (prokaryotickou) strukturu. Nenacházíme u nich pravé oblaněné organely jako u eukaryotických buněk. Buněčný obsah vyplňují thylakoidy (váčkovité útvary s fotosyntetickými pigmenty), nukleové kyseliny, ribozomy a četná zásobní granula. Kromě běžných fotosyntetických pigmentů jako je chlorofyl, jsou na povrchu thylakoidů umístěny specifické bílkovinné pigmenty **fykobiliny**. Tyto mohou využívat zbytkové osvětlení, které by například chlorofyl již nebyl schopen využít. Z toho je patrné, že sinice jsou schopny přežívat za světelně nepříznivých podmínek (např. v hlubokých vodách nebo jeskyních). Fykobiliny jsou dvojího typu (modrý fykocyanin a červený fykoerytrin), přičemž podle kvality světla v prostředí mají sinice schopnost měnit poměr zastoupení těchto pigmentů. Zabarvení buněk sinic je pak dáno kombinací jednotlivých pigmentů a může být proměnlivé od žlutavých buněk, přes zelené, modrozelené, hnědé, červené po odstíny šedavé. Na povrchu buněk bývá přítomno velmi často větší množství slizu, který může mít podobu řídce se rozplývající hmoty, nebo jasně ohraničené průhledné vrstvy. Sliz hraje v životě mnohých sinic důležitou roli. Chrání buňky proti nadměrnému vysychání nebo proti zvýšenému ozáření. Sliz bývá také velmi často zabarvený (červený, žlutý, modrý, fialový, hnědý).

Některé typy sinic mohou vytvářet specifické metamorfované buňky, které vznikají přeměnou (metamorfózou) buněk vegetativních. Jako **akinety** označujeme silnostěnné kulovité nebo oválné buňky u vláknitých typů sinic, které slouží k přežití nepříznivých podmínek. Obsah akinet je zpravidla výrazněji granulovaný (zásobní granula). Jako **heterocyty** označujeme zpravidla kulovité buňky s čirým obsahem, které se tvoří rovněž u vláknitých typů. V jejich buněčném obsahu dochází k fixaci plynného dusíku a jeho přeměně na amonné ionty, které následně vstupují do metabolizmu aminokyselin. Ve vegetativních buňkách planktonních sinic můžeme pozorovat tmavá nepravidelná zrníčka, kterým říkáme **aerotopy**. Díky nim se mohou

sinice vznášet na vodní hladině a při svém přemnožení v eutrofních vodních nádržích tvoří **vodní květ**.

Rozmnožování sinic je velmi jednoduché. Děje se prostým amitotickým buněčným dělením, přičemž se mohou vytvářet specifické rozmnožovací útvary, např. jednotlivé kulovité spory nebo tyčinkové úlomky.

V průběhu dlouhé evoluce se sinice adaptovaly na celou řadu rozličných prostředí. Nacházíme je od teplých rovníkových po chladné arktické oblasti. Volně se vznáší ve vodách, stejně tak porůstají ponořené substráty nebo se vyskytují v suchozemském prostředí na povrchu skal, stromů, na historických památkách jakou jsou kašny, kostely nebo freskové malby. Po vydatných deštích se objevují některé sinice v podobě slizovitých povlaků na povrchu půdy mezi stébly trávy. V přetrvávajících kalužinách se na jejich dně vyskytují populace sinic v podobě zelených, zelenomodrých nebo šedavě zelenavých povlaků. Občas se tyto populace utrhnou ze dna kalužiny a vznáší se hladině v podobě chomáčovitého trsu. Sinice lze snadno vzorkovat sběrem kolonií nebo oškrábnutím ze substrátů a lze je snadno udržovat v rozvlhčeném stavu.

Mezi typické rody sinic patří:

Chroococcus – kokální sinice s typickými vrstevnatými slizovými obaly. Kolonie obsahují obvykle menší množství buněk (2–8). Vyskytuje se v rašeliništích, na ponořených substrátech apod. (Obr. 1–2). Celosvětově hojný rod.

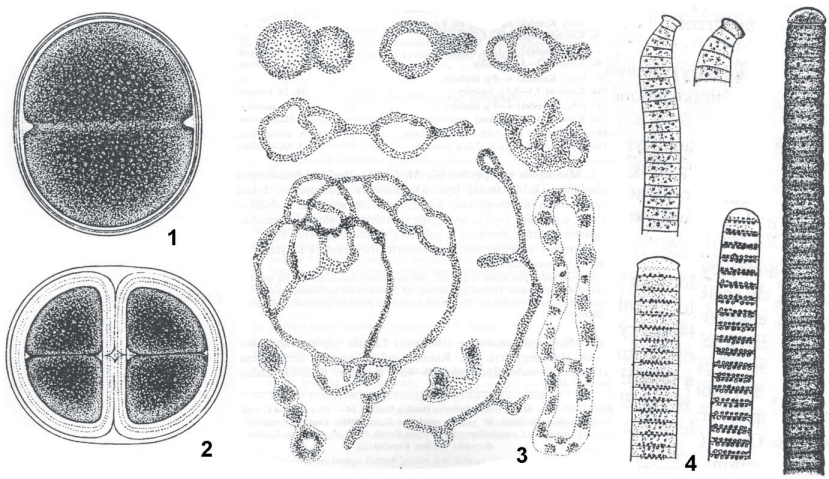
Microcystis – koloniální kokální sinice s velkým množstvím drobných buněk, které jsou uloženy ve slizu. Buňky obsahují velké množství aerotopů. Často tvoří masivní vodní květy v našich stojatých vodách (Obr. 3). Celosvětově hojný rod.

Oscillatoria – vláknitý typ s plochými buňkami. U příčných přehrádek jsou často uložena zásobní granula. Vlákna vykazují charakteristický drkavý pohyb. Častý rod na povrchu sedimentů našich vod (Obr. 4). Celosvětově hojný rod.

Spirulina – spirálovitě stočená vláknitá stélka. Porůstá ponořené substráty, jako jsou sedimenty, kameny nebo rostliny. Z podobného rodu *Arthrospira* se vyrábí výživový doplněk pod jménem Spirulina. Celosvětově hojný rod.

Nostoc – obvykle slizovité mikroskopické až makroskopické kolonie na povrchu vlhké půdy, na kamenech nebo ponořených předmětech. Vlákna jsou různě zkroucená, obalená slizovými pochvami, obsahují akinety a heterocyty. Celosvětově rozšířený a velmi hojný rod. Některé druhy jsou jedlé a využívají se zejména v asijské kuchyni.

Anabaena – jednovláknová sinice s akinetami a heterocyty, které leží vedle sebe nebo v těsné blízkosti. Vlákna jsou rovná nebo stočená, planktonní druhy mají velké množství aerotopů. Někdy tvoří vodní květy. Bentické druhy porůstají ponořené substráty. Celosvětově hojný rod.



Obr. 1–4 Běžní zástupci našich sinic: 1–2 *Chroococcus* – kokální rod s jasně viditelnými slizovými obaly, 3 *Microcystis aeruginosa* – kokální rod tvořící pouhým okem viditelné kolonie, 4 *Oscillatoria* – vláknitý typ s výrazně plochými buňkami

Ruduchy (Rhodophyta)

Ruduchy (Obr. 5–8) představují vývojově starobylou skupinu řas. Jejich stélka je velmi variabilní. Může být jednobuněčná, vláknitá i pletivná. Vláknité stélky bývají často větvené s morfologicky odlišnými postranními částmi. Pletivné stélky jsou rozlišeny v rhizoid, kauloid a fyloid. Typickou organelou je načervenalý, červenohnědý až červenozelený chloroplast, přičemž počet chloroplastů se může lišit podle typu ruduchy (jeden nebo více chloroplastů). Mezi fotosyntetická barviva ruduch patří chlorofyl a, d a fykobiliny. Buněčné stěny bývají výrazné, někdy zeslizovatělé. Vláknité typy ruduch mají otvory v příčných přehrádkách, které bývají uzavřené peptidoglykanovou zátkou. Tímto znakem se ruduchy podobají některým houbám. V životě ruduch hraje velmi důležitou úlohu rodozměna. Jejich životní cyklus je rozdělen do gametofytní a sporofytní fáze. Obvykle si gametofytní a sporofytní

rostliny nejsou morfologicky podobné, tudíž hovoříme o tzv. rodozměně heteromorfické.

Ruduchy se velmi často vyskytují v mořích, kde porůstají pobřežní oblasti. Mohou zde sestupovat i do značných hloubek, kde je již velmi nízká intenzita ozáření, a díky přítomným fykobilinům využívají zbytkové světlo pro svůj růst. Kromě mořských prostředí, která jsou pro ruduchy typická, se též vyskytují ve vnitrozemí ve sladkých vodách. V České republice je nacházíme obvykle ve velmi chladných a čistých vodách jako jsou rychle tekoucí horské a podhorské říčky. Sekundárně se mohou vyskytovat pod přehradními nádržemi, kde je po určité délce toku chladná voda z hlubinných výpustí těchto přehrad. V těchto lokalitách ruduchy tvoří husté porosty v podobě chomáčů a vlasovitých struktur.

Ruduchy jsou předmětem širokého zájmu, protože nachází využití v řadě oblastí. V přímořských státech jsou tradičně využívány jako zdroj potravy. Zejména asijské země mají v tomto dlouho trvající tradici a ruduchy nacházíme v jídelníčku již tisíce let. Některé ruduchy, jako např. *Porphyra*, se pěstují v pobřežních oblastech a vyrábí se z nich produkt pod názvem Nori. Sušené stélky ruduch si lze snadno opatřit ve specializovaných obchodech se zdravou výživou. Jiné mořské ruduchy (*Gelidium*, *Chondrus*) se využívají pro extrakci gelovitých látek, které známe pod názvem agar a karagén. Agar je důležitou složkou mikrobiologických kultivačních medií. Karagén se využívá v potravinářství.

Mezi základní rody ruduch patří:

Batrachospermum – sladkovodní typ, který u nás obývá chladné proudící vody. Žije na kamenech v podobě několik centimetrů dlouhých vláknitých svazků. Stélky jsou větvené hnědavé až hnědočervené (Obr. 5–6).

Lemanea – vlasovitě vyhlížející ruducha našich horských toků s kolénkovitými rozšířeninami ve stélce. Porůstá kameny v rychle tekoucích vodách (Obr. 7–8).

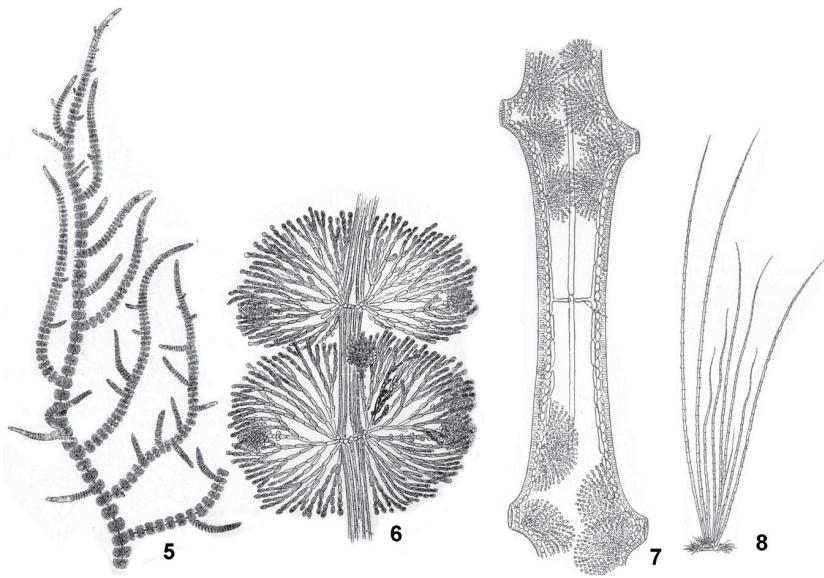
Hildebrandia – vytváří červené kožovité povlaky na kamenech v rychle tekoucích vodách. Buňky na sebe velmi těsně doléhají a připomínají parenchymatické pletivo.

Porphyra – ploše listovitá mořská ruducha, která obývá pobřežní oblasti.

Gelidium – keříčkovitě vyhlížející mořská ruducha.

Corallina – hustě větvená a silně inkrustovaná mořská ruducha. Je velmi významná při tvorbě vápenatých hornin.

Compsopogon – vláknitá ruducha modravé až hnědavé barvy. U nás bývá častá v akváriích, kam se dostává s akvarijními rostlinami, na kterých vytváří chomáčovité povlaky.



Obr. 5–8 Zástupci našich ruduch: 5, 6 *Batrachospermum* – bohatě větvená řasa, 7, 8 *Lemanea* – vlasovitě vyhlížející řasa periodicky se rozšiřující

Rozsivky (Bacillariophyceae, Diatomae)

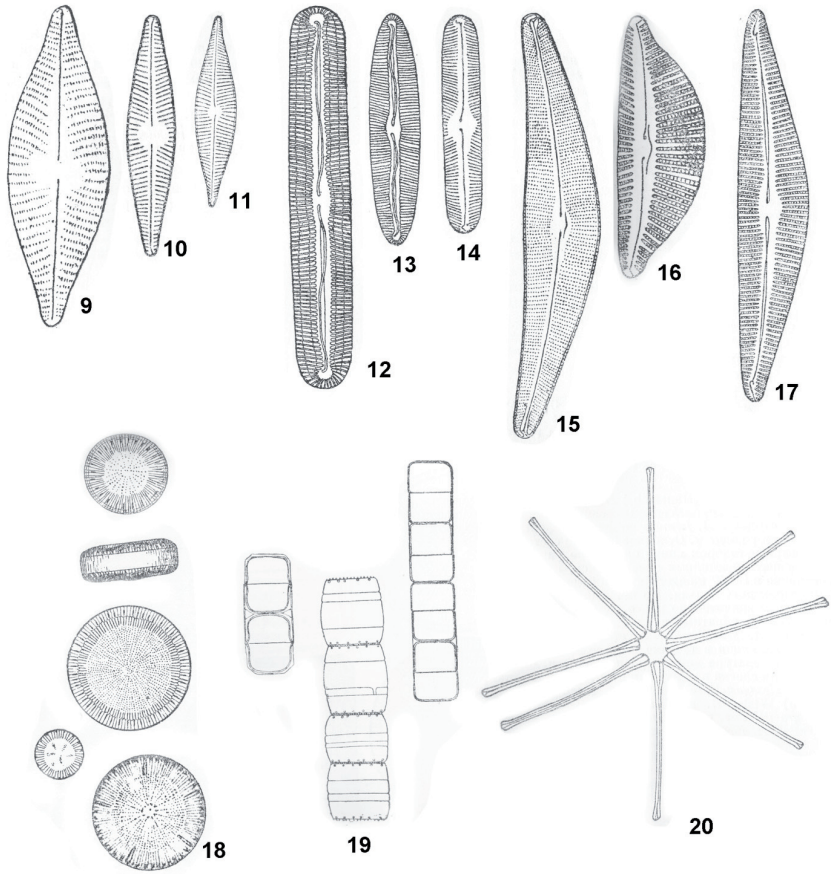
Skupina rozsivek (Obr. 9–20) zaujímá ve světě sinic a řas velmi významné postavení. Jedná se o jednobuněčné řasy se specifickým buněčným obalem, kterému říkáme **frustula**. Tento obal je svojí charakteristikou naprosto unikátní. Základní stavební jednotkou je oxid křemičitý, který dává obalu velkou pevnost. Buňky rozsivek díky tomuto obalu získávají předem definovaný tvar, který má zásadní význam při taxonomické determinaci. Povrch frustuly je rozbrázděn různými otvory a rýhami, které mají rovněž taxonomický význam. Frustula se skládá ze dvou částí (misek). Při růstu se buňka rozpadá a dorůstá jí nová část křemičité frustuly, která je vždy menší. Tímto se velikost buněk v populaci zmenšuje. Po dosažení určité kritické velikosti dochází k pohlavnímu rozmnožování, kdy po vzniku a rychlém

růstu zygoty dochází k obnově původní velikosti buněk v populaci. Mezi typické organely patří výrazně hnědavé chloroplasty, které jasně naznačují příbuznost s ostatními hnědými řasami. Zabarvení rozsivek je dáno přítomností chlorofylu a, c a fukoxanthinu. Zásobní látkou je chrysolaminaran, který se nebarví jodovými roztoky do fialova. Mezi další významné zásobní látky patří olejové inkluze.

Rozsivky mají velký ekologický význam. Jsou celosvětově rozšířené a mnohé druhy nám svojí přítomností indikují kvalitu životního prostředí. Analýzy rozsivkových společenstev hrají důležitou roli v biomonitoringu. Rozsivky celosvětově vytváří velmi početnou populaci, která je rovněž velmi důležitým producentem kyslíku. Biomasa rozsivek je mimo jiné významnou složkou potravního řetězce. Ze sedimentovaných schránek rozsivek vznikla hornina křemelina (diatomit), která má řadu technologických využití. Používá se jako brusivo, náplň některých filtračních zařízení nebo byla využita při stabilizaci nitroglycerinu a vynálezu dynamitu Alfredem Nobelem. V současné době jsou rozsivky v centru zájmu díky pokrokům v biotechnologickém výzkumu. Přítomnost velkého množství olejových inkluzí dělá z rozsivek objekt širokého komerčního zájmu. Předpokládá se, že vysoceprodukční druhy by mohly napomoci řešit budoucí nedostatek ropných látek v průmyslu a dopravě, proto se hledají vhodné druhy a technologie, které by s vysokou efektivitou doplnily chybějící zdroje.

Mezi základní rody patří:
Navicula – článkovitě vyhlížející rozsivka s výrazným žebrováním frustuly. Žije na ponořených substrátech jako sedimenty a kameny (Obr. 9–11).
Pinnularia – oválná protáhlá rozsivka s hrubými žebry, velmi často větších rozměrů (Obr. 12–14).
Cymbella – polokruhovitá rozsivka s výrazným žebrováním frustuly. Žije na ponořených substrátech jako sediment, kameny, vodní rostliny. Hojný výskyt společně s rodem Navicula. Často je součástí hustých, tmavě hnědých společenstev na kamenech (Obr. 15–17).
Cyclotella – na ploše kruhovitá rozsivka, která se nejčastěji vznáší ve vodním sloupci. V našich vodách je velmi hojná. Na jaře a na podzim může vytvářet bohaté populace (Obr. 18).
Asterionella – hvězdicovitě vyhlížející kolonie protáhlých buněk rozsivek, které žijí v planktonu (Obr. 20).
Aulacoseira – vláknitě vyhlížející kolonie planktonních rozsivek. Na podzim tvoří velmi bohaté populace.

Melosira – vláknitě vyhlížející kolonie bentických rozsivek stojatých i tekoucích vod (Obr. 19).



Obr. 9–20 Zástupci našich rozsivek: 9–11 *Navicula*, 12–14 *Pinnularia*, 15–17 *Cymbella*, 18 *Cyclotella*, 19 *Melosira*, 20 *Asterionella*

Chaluhy (Phaeophyceae)

Hnědé řasy ze skupiny chaluh (Obr. 21–24) patří k jedněm z nejdokonalejších. Jejich stélky vykazují již vysoký stupeň organizace. Obvykle se dělí na rhizoid, kauloid a fyloid s tím, že uvnitř stélek můžeme nacházet náznaky pletiv. Stélka chaluh může být obrovských rozměrů a může do-

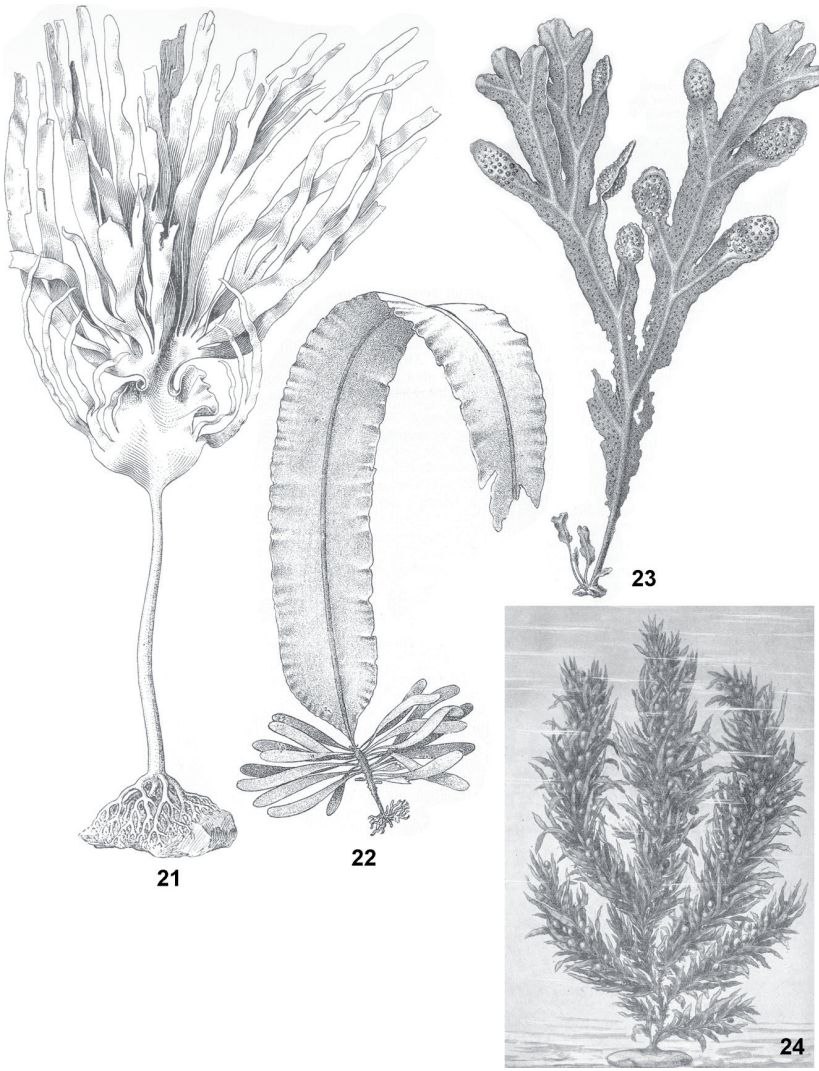
sahovat několika metrů až několika desítek metrů. Tyto ohromné a těžké stélky jsou pak ve vodách nadnášeny systémy **plovacích měchýřků**. Buňky chaluh obsahují výrazně **hnědé chloroplasty**, ve kterých dominují stejné pigmenty jako u rozsivek (chlorofyl a, c, fukoxanthin). Zásobní látkou je chrysolaminaran. Mimo jiné jsou chaluhy producenty zajímavých farmakologických látek s protizánětlivým a baktericidním účinkem. Rozmnožování je poměrně komplikované. Kromě vegetativního rozmnožování pomocí fragmentů stélky hraje zde významnou roli rodozměna neboli metageneze. Dochází ke střídání pohlavní a nepohlavní fáze v životě chaluh, které jsou reprezentovány dvěma samostatnými rostlinami. U nejdokonalejších typů dochází k téměř úplnému potlačení gametofytu, který již neexistuje jako samostatná rostlina, a gamety jsou produkovány ve specifických rozmnožovacích kupkách **konceptakulech**.

Chaluhy jsou typické mořské řasy, přičemž mnohé druhy mají geograficky vymezené areály svého výskytu. Porůstají dno šelfových moří, pobřežní skaliska nebo lidské stavby jako přístaviště apod. Husté populace chaluh tvoří tzv. podmořské lesy, které jsou domovem pro řadu mořských živočichů. Chaluhy mají široké praktické využití již po tisíce let. Jejich obrovské stélky se běžně sbírají nebo komerčně těží. Získané stélky se pak suší, konzervují nebo se z nich vyrábí různé kosmetické a farmakologické produkty. Ze stélek chaluh se extrakcí získává jód.

Mezi základní rody patří:
Laminaria – makroskopická, až několik metrů dlouhá řasa s dělením stélky na rhizoidy, masivní protáhlý kauloid a ploše listovité fyloidy (Obr. 21).
Sargassum – liánovitá chaluha, která roste v oblasti tzv. Sargasového moře. Stélka je nadnášena plovacími měchýřky, které jsou v hroznovitých shlucích (Obr. 24).
Fucus – ploše listovitá, dichotomicky větvená stélka se středním žebrem uvnitř fyloidu. Podél středního žebra se nachází po párech drobné plovací měchýřky (Obr. 23).

Krásnoočka (Euglenophyta)

Bičíkovci ze skupiny krásnooček (Obr. 25–30) zaujímají v systému zvláštní postavení. Některými znaky jsou příbuzní zeleným řasám, jinými naopak prvokům. Charakteristickými součástmi buněk jsou **bičíky** (2, jeden je velmi často zakrnělý) a výrazná **stigma**, která je uložena v apikální části



Obr. 21–24 Zástupci chaluh: 21 *Laminaria*, 22 *Alaria*, 23 *Fucus*, 24 *Sargassum*

buňky v blízkosti tzv. ampule, tedy místa ukotvení bičíků. Buněčný povrch krásnooček je kryt elastickou **pelikulou** (plazmatická membrána s vyztužovacími proteiny) nebo pevnou **lorikou** (hnědavá inkrustovaná schránka). Chloroplasty jsou obvykle drobné a četné, mezi nimi se nachází průhledná

zrnka zásobní látky, které říkáme paramylon. Významným fotosyntetickým barvivem je chlorofyl a, b. Buňky mají obvykle vřetenovitý, kapkovitý, oválný až kulovitý tvar.

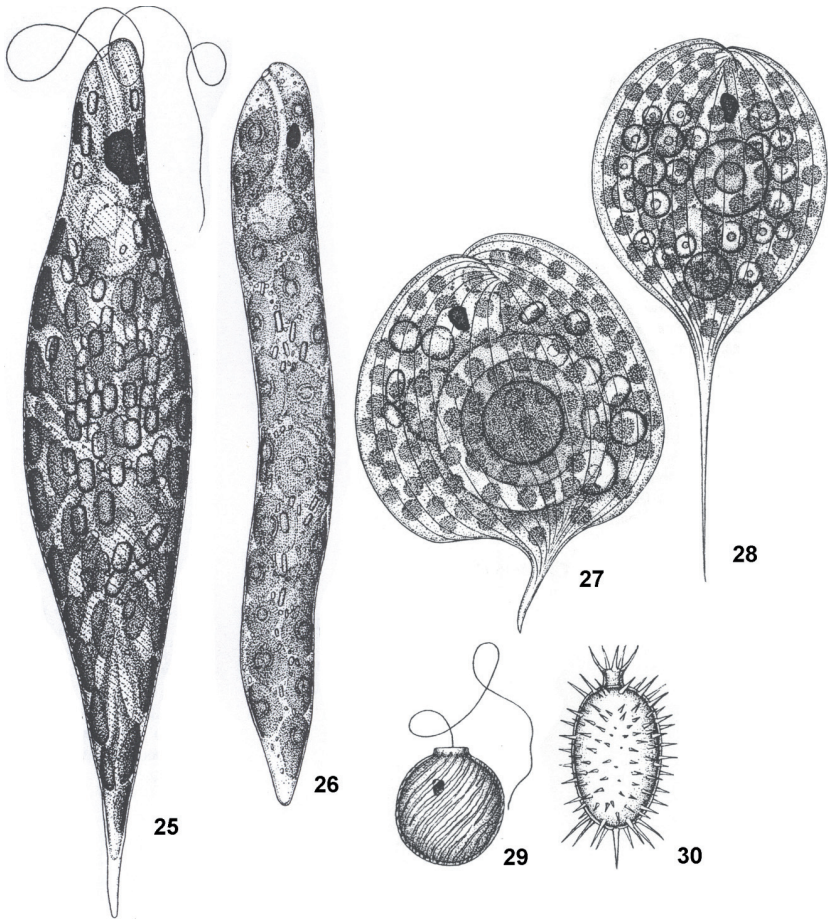
Z hlediska života a životní strategie jsou krásnoočka poměrně unikátní skupinou. Kromě autotrofního způsobu výživy se ochotně vyživují **heterotrofně**. Přijímají jednak rozpuštěné organické látky, nebo jsou dokonce schopny aktivního lovu bakterií nebo jiných drobných řas. Krásnoočka se také proto často vyskytují ve znečištěných vodách. Běžně je nacházíme v chovných rybnících nebo v lokalitách, kam směrují splaškové vody z domácností a zemědělství. Často se ve vodách vyskytují v blízkosti sedimentů, kde jsou zvýšené koncentrace organických látek a dostupné drobné potravy pro dravé druhy. Druh *Euglena sanguinea* tvoří za teplých letních dní na vodní hladině červenou neustonickou blanku.

Mezi základní rody patří:
Euglena – protáhlé, oválné nebo vřetenovité buňky, mnohdy elastické, mohou měnit svůj tvar. Vyskytuje se ve stojatých i tekoucích vodách (Obr. 25–26).
Phacus – obvykle ploše listovité buňky s často naznačenými bílkovinnými provazci v pelikule. Hojný rod ve stojatých a mírně tekoucích vodách (Obr. 27–28).
Trachelomonas – kulovité až oválné buňky s výrazně hnědě zabarvenými lorikami. Některé loriky mají na svém povrchu zřetelné trny, výstupky apod. (Obr. 29–30).

Zelené řasy (Chlorophyta a Streptophyta)

Skupina zelených řas (Obr. 31–41) je v současné době rozdělena na dvě hlavní vývojové větve. První zahrnuje jednodušší kokální až vláknité typy (Cholorophyta), jejichž způsob průběhu mitózy a molekulární charakteristiky je oddělují od druhé skupiny (Streptophyta), která se buněčnou strukturou, mechanizmem buněčného dělení a molekulárně více podobá vyšším zeleným rostlinám. Můžeme tedy říci, že skupina Streptophyta představuje důležitou linii v evoluci vyšších rostlin.

Stélky zelených řas (Chlorophyta a Streptophyta) jsou velmi variabilní a v této skupině se objevují prakticky všechny typy. Velmi časté jsou kokální, bičíkaté a vláknité. Buněčné stěny jsou velmi často pevné, výrazné, někdy s výraznými strukturami v podobě výstupků a hrbolků. Chloroplasty jsou



Obr. 25–30 Zástupci našich krásnooček: 25–26 *Euglena*, 27–28 *Phacus*, 29–30 *Trachelomonas*

jasně zelené, obsahují chlorofyl a, b. Ve struktuře chloroplastu lze pozorovat drobná bílkovinná tělíska (pyrenoidy), na jejichž povrchu bývá uložena zásobní látka (škrob) ve formě zrnek. Rozmnožování těchto řas je variabilní s ohledem na celkovou šíři této skupiny. Řasy se běžně rozmnožují fragmentací stélky nebo pomocí výtrusů (spor), které mohou být bičíkaté (**planospory**), nebo nebičíkaté (**aplanospory**). Pohlavní rozmnožování zahrnuje izo-, anizo- a oogamii. Dalším příkladem pohlavního rozmnožování je somato-

gamie, kdy jako gameta vystupuje přímo vegetativní buňka. Tento proces je typický pro skupinu, kterou označujeme spájivky a nazýváme ho **spájení** (konjugace). Zelené řasy velmi často žijí v haploidním stavu a gamety se netvoří redukčním dělením, které se objevuje až při dělení zygoty a tvorbě nových jedinců. Méně často se vyskytuje rodozměna, kdy se střídá gametofytní a sporofytní fáze v podobě dvou nezávisle rostoucích rostlin. Ještě méně často se vyskytuje stav, kdy řasy žijí v diploidní fázi jako vyšší zelené rostliny.

Zelené řasy obývají prakticky všechny biotopy od rovníku po polární kruh. Najdeme je ve vodách v planktonu nebo porůstající ponořené substráty, stejně tak na souši na kamenech, v půdě, na vegetaci nebo lidských stavbách a obydlích. Mnohé z nich mají technologický, potravinářský a farmakologický význam. Již od prehistorických dob se mořská řasa rodu *Ulva* pojídá. Chlorella se pěstuje za účelem výroby doplňků výživy. Bičíkovec *Haematococcus* se pěstuje za účelem extrakce důležitých karotenů, které jsou účinné v prevenci nádorových bujení. Podobně se karoteny extrahují z bičíkovce *Dunaliella*. Olejové inkluze řasy *Botryococcus* jsou předmětem výzkumu v biotechnologii a výrobě biopaliv. Mnohé zelené řasy jsou velmi úspěšné v kolonizaci nových stanovišť a rychle se šíří. Mořská teplomilná řasa rodu *Caulerpa* se masivně rozšiřuje ve Středozemním moři, kam pravděpodobně unikla v roce 1984 z Oceánografického muzea v Monaku. Produkuje silné toxiny a ohrožuje faunu a flóru ve Středozemním moři. Jelikož zde nemá přirozeného predátora, snadno se šíří. Jediný známý predátor žije ve vodách v oblasti Floridy (mořský měkkýš *Elysia subornata*), nicméně vody Středozemního moře jsou pro něj chladné. Naše tekoucí vody často kolonizuje žabí vlas (*Cladophora*) mající vláknitý vzhled. Na kůře stromů roste zelená zrněnka (*Apatococcus*) nebo červeně se barvící *Trentepohlia*.

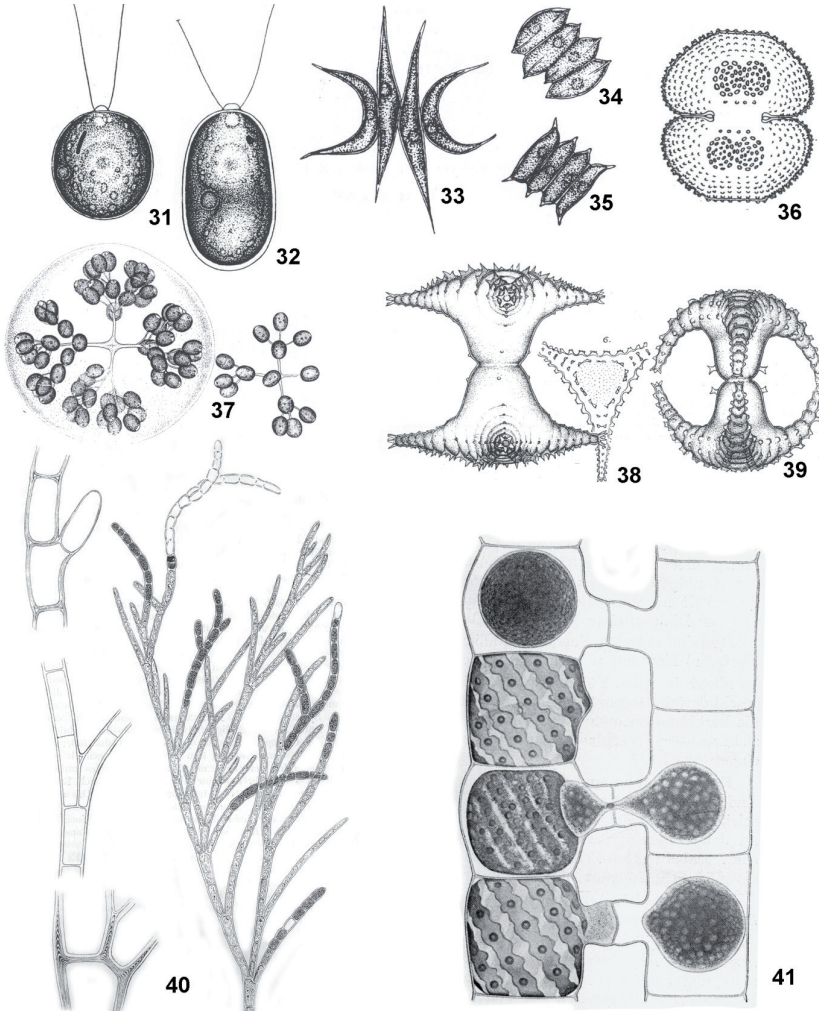
Globální význam mají zástupci skupiny Streptofyta (zejména parožnatky Charophyceae), ze kterých se s největší pravděpodobností vyvinuly vyšší rostliny.

Mezi základní rody patří:

Chlamydomonas (pláštěnka) – zelení kapkovití bičíkovci se dvěma bičíky. Jsou velmi hojní ve stojatých i tekoucích vodách (Obr. 31–32).

Chlorella (zelenivka) – kulovitá řasa, která se rozmnožuje pomocí nebičíkatých výtrusů. Roste jak ve vodách, tak i na souši. Velmi hojná řasa, snadno lze kultivovat.

Scenedesmus (řetízovka) – vytváří specifické kolonie (coenobia), kde buňky vznikají v jeden okamžik. Obvykle se jedná o kratší řady několika buněk



Obr. 31–41 Zástupci našich zelených řas: 31–32 *Chlamydomonas*, 33–35 *Scenedesmus*, 36 *Cosmarium*, 37 *Dictyosphaerium*, 38–39 *Staurastrum*, 40 *Cladophora*, 41 *Spirogyra* – probíhající konjugace

(2, 4, 8, 16), které mohou mít na svém povrchu různé výstupky. Jedná se o velmi hojnou řasu našich stojatých i tekoucích vod (Obr. 33–35).
Apatococcus (zrněnka) – drobná koloniální řasa na kůře stromů. Buňky mají proměnlivý tvar.

Cladophora (žabí vlas) – vláknitě vyhlížející větvená řasa s podlouhlými buněčnými segmenty a velkým množstvím drobných chloroplastů. K větvení dochází vždy u příčné přehrádky (Obr. 40).
Spirogyra (šroubatka) – vláknitá řasa se šroubovitým chloroplastem. Patří do skupiny spájivek. Velmi hojná v litorálech našich vod (Obr. 41).
Chara (parožnatka) – přesličkovitě vyhlížející řasa až několik decimetrů dlouhá. Žije v tůních, jezerech a pomalu tekoucích vodách. Při výskytu může vytvářet masivní porosty.

Použitá literatura a internetové zdroje

Kalina T., Váňa J. (2005): Sinice, řasy, houby a mechorosty v systému šesti říší. – Praha, Karolinum, str. 608.

Molekulární markery využívané při studiu variability rostlin

Miloslav Kitner

Laboratoř molekulárních markerů, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Přednáška proběhla dne 26. ledna 2012.

1 Úvod

V současné době lze bez jakýchkoliv pochybností tvrdit, že metody molekulární biologie umožňující amplifikaci (tj. kopírování, množení) kratších, či delších oblastí nukleových kyselin (především deoxyribonukleových kyselin, DNA) a jejich analýz se staly běžnou součástí života a rutinními nástroji v řadě odvětví jako je například lékařství, farmacie, kriminalistika, potravinářství, populační genetika atd. V této práci se budeme snažit o popis základních postupů při analýze nukleových kyselin se zaměřením na metody využívané při analýze deoxyribonukleových kyselin (DNA) při studiu variability rostlin – tedy na způsoby extrakce DNA, ověřování její kvality a koncentrace, její uchovávání, princip polymerázové řetězcové reakce (PCR) a v současnosti nejčastěji užívané metody studia variability rostlin (RAPD, RFLP, AFLP, mikrosatelity, sekvenování). Existují stovky odborných publikací, kde jsou tyto metody využívány pro řešení různých otázek. Je nad rámec tohoto studijního materiálu uvádět konkrétní případy. Uvádíme pouze stručný přehled hlavních směrů využití daných markerů s odkazem na odbornou literaturu. Je nutno podotknout, že výše uvedené metody jsou díky současným pokrokům genomiky postupně nahrazovány technologiemi celogenomového sekvenování (NGS, Next Generation Sequencing – např. Illumina, SOLiD a 454 sekvenování) a z nich odvozených metod (např. RADseq). Jejich širší uplatnění je prozatím limitováno současnými možnostmi analýzy a interpretace vygenerovaných dat a dále i značnou finanční náročností těchto metod.

2 Genetické markery

Při studiu variability organizmů potřebujeme pomůcky (metodické nástroje), kterými jsme schopni identifikovat rozdíly mezi jedinci. Můžeme hledat rozdíly v rámci jedinců určité populace, ale zároveň vzájemně srovnávat odlišnosti mezi jedinci z různých populací. Základními pomůckami, které nám tyto rozdíly pomáhají nalézt, popsat a analyzovat, jsou genetické markery.

Genetický marker (signální gen) je polymorfní znak (vyskytuje se ve více variantách), který vykazuje Mendelistickou dědičnost, je snadno a jednoznačně detekovatelný. Genetické markery mají buď přímý vztah k určitému znaku či vlastnosti (kvalitativní nebo kvantitativní), nebo jsou v genové vazbě s významným znakem či vlastností (Vejl et al., 2002). Markery nám umožňují určovat, které alely jsou přítomné v populaci. Obecně je můžeme podle využití rozdělit do několika skupin:

- Studium genetické variability populací a popis genetické struktury populací, měření toku genů (gene-flow, kvantifikace migrace mezi populacemi) – výstupy pro konzervační genetiku, evoluční genetiku nebo pro šlechtění.
- Studium rozmnožovacích systémů (určit stupeň inbreedingu v populaci).
- Určování paternity.
- Studium genů odpovídajících za kvantitativní vlastnosti organizmu (např. určení počtu genů podmiňující velikost nebo tvar listů).

Markery lze rozdělit do několika skupin podle způsobu jakým jsou detekovány. V minulosti se jako selekční markery používaly morfologické znaky, barva apod. Tyto **viditelné polymorfizmy** jsou poměrně málo variabilní, hodnocené znaky mají omezený počet variant a jsou kódovány jedním nebo dvěma lokusy. Odhalují tedy jen malou část genetické variability studovaného jedince (souboru jedinců). S těmito markery pracoval např. Gregor Mendel při studiu hrachů (žlutá a zelená semena, bílé a purpurové květy), a jsou stále základním vodítkem při základní identifikaci organizmů.

3 Molekulární markery

Metody molekulární biologie nám dovolují pracovat s markery (ukazatele, klasifikátory), které postihují rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými jedinci, populacemi, druhy. Nejčastěji pracujeme s markery ve formě proužků (bandů), tedy krátkých úseků DNA na agarózovém nebo polyakry-

lamidovém gelu, kdy zpravidla hodnotíme přítomnost nebo nepřítomnost daného bandu (binární data). Druhým typem jsou elektronické záznamy nukleotidových sekvencí DNA, kdy pozorujeme přímo rozdíly (polymorfizmy) v nukleotidových sekvencích analyzovaných jedinců (vícestavová data). V současnosti jsou využívány např. při studiu evoluce na molekulární úrovni (fylogenetické analýzy, řešení taxonomických otázek), pro testování otcovství a identifikaci jedinců (kriminalistika), testování jedinců na dědičně podmíněné nemoci (humánní i veterinární medicína), při zjišťování genetické čistoty osiva, při genetickém mapování, v populační a konzervační genetice apod.

3.1 Isozymy

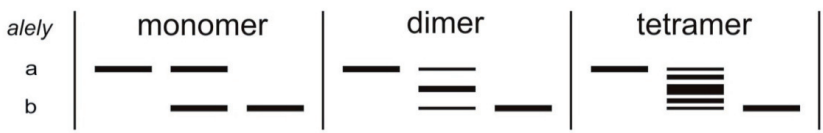
Prvním typem molekulárních markerů užívaných při studiu variability rostlin byly ***isozymy*** (allozymy, isoenzymy). Analýza isoenzymů je metoda používaná od 60. let 20. století v oblasti studia taxonomie, proměnlivosti, populační genetiky, vývojové biologie, ale i ve šlechtění rostlin. Jako isoenzymy označujeme enzymy, které katalyzují stejnou biochemickou reakci, ale liší se svým aminokyselinovým složením, mají tedy odlišnou primární strukturu (délka řetězce, záměna AMK). Při analýze je využíváno rozdílů v rychlosti pohybu makromolekul ve stejnosměrném elektrickém poli (elektroforetická pohyblivost). Tato metoda se nazývá ***elektroforéza*** a používá se k separaci směsí makromolekul látek nesoucích elektrický náboj (bílkovina, fragment DNA). Jednotlivé enzymy se detekují díky jejich specifické aktivitě k určitému substrátu, protože katalyzují přeměnu určitého substrátu – detekce se provádí specifickým histochemickým barvením k dané reakci. Tímto barvením na gelu vizualizujeme spektrum isoenzymů daného jedince (Vallejos et al., 1983; Soltis a Soltis, 1989) v podobě různě zbarvených pruhů (bandů).

Výhodou isozymů je jejich kodominantní charakter (lze detekovat heterozygotní genotyp), rychlost a nízké finanční náklady analýz. Isozymy jsou ale v současnosti postupně nahrazovány pokročilejšími typy markerů. Hlavním důvodem je jejich nízká variabilita, která může být ovlivněna několika faktory:

- Isozymy jsou proteiny plnící v organizmu určitou funkci. Jakákoliv větší změna v nukleotidové sekvenci kódující enzym je buď opravena reparačními mechanizmy buňky, nebo vede k nefunkčnosti enzymu,

nefunkčnosti dané metabolické dráhy (vedoucí například k nedostatku určitých látek v organizmu), popřípadě i k eliminaci jedince přírodním výběrem.
- Proteiny vznikají přepisem genetické informace pouze z kódující oblasti DNA, tím pádem variabilita v proteinech neodhaluje variabilitu obsaženou v nekódujících sekvencích genomu.
- Každá aminokyselina je kódována trojicí nukleotidů. Případná jednobodová mutace nemusí ve výsledku znamenat záměnu aminokyseliny, tedy změnu molekulové hmotnosti proteinu a z toho vyplývající detekovatelný rozdíl v mobilitě proteinu (rychlosti pohybu) a tím změnu polohy proteinu na gelu. Můžeme tedy konstatovat, že změnu nelze detekovat.

Mezi další nevýhody isozymů patří potřeba čerstvého materiálu (nelze pracovat s herbarizovanými vzorky) a práce s toxickými chemikáliemi. Velkým problémem je i vyhodnocování záznamů u enzymů se složitější kvarterní strukturou (tj. enzymů s větším počtem podjednotek, Obr. 1), dále vyhodnocování proteinů z několika navzájem se překrývajících lokusů, a to vše se dále komplikuje u polyploidních druhů. Na výsledný záznam může mít vliv i vývojová etapa rostliny, prostředí a rovněž rostlinný orgán, z něhož je isozym izolován (Desborough a Peloquin, 1968).



Obr. 1 Vyhodnocení alelické konstituce diploidního organizmu pro enzymy s různým počtem podjednotek (monomer – enzym tvořen jednou bílkovinou, tetramer – funkční enzym složen ze čtyř podjednotek)

Využití – v současnosti jsou isozymy nahrazovány variabilnějšími DNA markery. Nicméně je lze použít při identifikaci mezidruhových hybridů (Lebeda et al., 2012), posuzování genetické struktury populací, při řešení fylogenetických vztahů nebo pro identifikaci klonů (Soltis & Soltis, 1989; Jaaska, 2005).

3.2 DNA markery

Přímá analýza molekul DNA má oproti isozymům řadu výhod. Detekovaná variabilita je daleko vyšší a je nezávislá na podmínkách prostředí, ve kterém organizmus žije (selektivní neutrálnost). Různé části DNA podléhají selekčním tlakům nestejnoměrně. Oblasti DNA kódujících životně důležité proteiny podléhají silnému selekčnímu tlaku, jsou nevariabilní a ve velké většině případů se pro hodnocení variability nedají použít. Naopak v nekódující oblasti genomu (např. introny, nekódující repetitivní DNA) se snadno hromadí mutace (nemají vliv na fitness jedince = selekčně neutrální), a proto jsou tyto oblasti genomu velice variabilní.

Molekula DNA je velice stabilní a DNA lze extrahovat tedy nejenom ze živých, ale i z mrtvých tkání (v případě rostlin z herbářových položek). Molekula DNA je natolik stabilní, že může být zachována i po dobu několika miliónů let (Cano et al., 1993). Množství vzorku pro extrakci DNA nemusí být velké (část listu, vzorek krve) a DNA markery tedy lze mj. použít i u velmi raných ontogenetických stadií, což znamená např. urychlení selekce jedinců s důležitými znaky ve šlechtění.

3.2.1 Extrakce DNA

Prvním krokem drtivé většiny studií je izolace DNA, tedy její uvolnění z buněk mechanickým rozdrcením, a poté oddělení DNA od ostatních sloučenin, zejména polysacharidů, proteinů, fenolických látek, barviv. Existují ovšem případy, kdy izolace DNA není nutná, nebo ji nelze provést (např. nemožnost kultivace studovaného organizmu – např. některé druhy sinic vyskytujících se na ponořených substrátech). Matricí pro probíhající reakce pak není roztok přečištěné DNA, ale přímo buňka, spory patogena nebo část rostlinného pletiva. To jsou ovšem výjimky, drtivá většina analýz vyžaduje purifikovanou DNA.

Při izolaci nukleové kyseliny je třeba volit metodu v závislosti na požadované čistotě a množství finální nukleové kyseliny a na typu buněk, z nichž má být nukleová kyselina izolována. Dostupných metod pro extrakci DNA je celá řada a jejich výběr závisí především na povaze vzorku, ze kterého má být DNA izolována (Weising et al., 2005).

Pro extrakci DNA z rostlinných pletiv nejčastěji používáme tyto přístupy – a) extrakci metodou CTAB, b) mikroextrační metody použitím komerčně dostupných kitů (kolonky se silikátovými membránami nebo kity na bázi magnetických kuliček).

Zobecnění principu všech metod může být následující:

- První krok (homogenizace vzorku) spočívá v mechanickém rozbití vzorků ve třecí misce (přídavek tekutého dusíku) nebo ve speciálním mlecím mlýnku.
- Rozrušení buněčných membrán přídavkem detergentů (např. CTAB, SDS).
- Inaktivace buněčných enzymů rozkládajících DNA přídavkem EDTA nebo detergentů – chelatují dvojmocné soli (Ca^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}) enzymů.
- Inaktivace a degradace proteinů přídavkem proteinasy K.
- Odstranění hydrofobních buněčných (lipidy, polyfenoly) zbytků od DNA extrakcí organickým rozpouštědlem (chloroform).
- Oddělení přečištěné DNA centrifugací, její následné zakoncentrování přesrážením alkoholem (isopropanol), přečištění vodným roztokem ethanolu, vysušením a rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle.

Metoda CTAB byla popsána v práci Murray a Thompson (1980) a byla mnohokrát modifikována (Weising et al., 2005). CTAB (cetyl trimethylammonium bromid) je detergent rozpouštějící buněčné membrány a v přítomnosti NaCl vytvářející komplex CTAB-DNA, který je následně extrahován roztokem chloroformu a isoamylakoholu. Chloroform je organické rozpouštědlo a je tedy nemísitelný s vodou. Proto po jeho přídavku dochází ve zkumavce k vytvoření dvou fází – horní vodné (obsahující DNA) a dolní organické, přičemž na rozhraní obou fází se utváří bílý prstenec vysrážených proteinů. Vodná fáze je po centrifugaci odpipetována, komplex CTAB-DNA je vysrážen alkoholem (isopropanol). Po další centrifugaci je na dně zkumavky viditelná bílá sraženina DNA, která je dále přečišťována 70% ethanolem (odstranění solí a detergentu), vysušena a rozpuštěna ve vhodném pufru s nízkým nebo žádným obsahem solí (např. voda).

Podstatou mikroextračních metod je využití vlastnosti DNA vázat se v přítomnosti tzv. chaotropní soli (např. guanidinium thiokyanát) na povrch silikátových částic. Kontaminující složky se odstraňují opakovaným promýváním pufrem s guanidinium thiokyanátem, DNA přitom zůstává navázána na silikát až do použití elučního pufru, který DNA ze silikátu uvolní. Původně byly při purifikaci používány silikátové částice ve formě skleněného prášku (glass milk) a v posledním kroku byla po centrifugaci přečištěná DNA odpipetována od sedimentu skleněných částic do jiné zkumavky. V poslední době jsou silikátové částice součástí tenkých membrán

umístěných na centrifugačních kolonkách dodávaných v purifikačních kitech. Použití takových kitů je velice rychlé a jednoduché, zároveň je kvalita takto purifikované DNA velmi vysoká. Nevýhodou je vyšší finanční náročnost a nižší výtěžek získané DNA. Průběh purifikace DNA přes kolonky je následující. Homogenizovaný materiál je po inkubaci přenesen na tzv. prefiltr ve formě kolonky umístěné na mikrozkumavku (objem 1,5–2 ml), na které po centrifugaci zůstávají zbytky rostlinných pletiv. K takto přefiltrovanému roztoku se přidá pufr obsahující chaotropní sůl a po promíchání je pipetou roztok nanesen na novou kolonku se silikátovou membránou. Při centrifugaci přechází roztok membránou kolonky a DNA se váže na silikátové částice. V dalším kroku se na kolonku nanese promývací roztok a ta se znovu centrifuguje. Posledním krokem je nanesení elučního (vymývacího) pufru, kterým se DNA při centrifugaci uvolňuje z membrány do roztoku.

Kity využívající magnetické kuličky pracují na podobném principu. Jádro magnetických částic tvoří magnetické oxidy železa (např. maghemit, magnetit). Magnetické částice mají značný rozsah velikostí, jejich povrch může být různě modifikován a bude tedy sloužit pro izolace různých typů sloučenin (proteiny, hormony). Pro izolaci nukleových kyselin se používají částice o velikosti 20–450 nm (Huska et al., 2009) s modifikovaným povrchem pro vazbu vláken nukleových kyselin. Samotná izolace DNA pak probíhá tak, že ke vzorku nukleových kyselin přidáme magnetické částice ve vhodném pufru, zkumavku promícháme a inkubujeme. Během inkubace dojde k navázání molekul DNA na povrch magnetických částic. V dalším kroku se kuličky s DNA shromáždí na stěnu zkumavky po přiložení magnetu, zbytky homogenizovaného vzorku odpipetujeme. Následuje promývání a uvolnění nukleových kyselin z povrchu kuliček. Přečištěná DNA se od kuliček odstraní opět přiložením magnetu na stěnu zkumavky a odpipetování roztoku DNA.

3.2.2 Ověření kvality a kvantity DNA

Kontrola kvality DNA (a rovněž detekce DNA fragmentů) probíhá pomocí elektroforetické separace na agarózovém gelu, který funguje jako trojrozměrné síto. DNA nebo její fragmenty se separují elektroforeticky na základě svého náboje a molekulární hmotnosti. Nejmenší molekuly putují nejrychleji a největší se nejvíce zpožďují. Gel je umístěn v elektroforetické komůrce s příslušným pufrem, který udržuje stálé pH, teplotu a vede elektrický proud. Molekuly DNA jsou díky fosfátovým zbytkům záporně

nabité a putují v elektrickém poli směrem od katody k anodě. Vzorky se do jamek v gelu nanášejí společně s nanášecím pufrem a barvivem (např. bromfenolová, xylenová modř). Díky vyšší hustotě pufru zůstanou vzorky v jamkách a barvivo nám umožní sledovat, jak rychle vzorky putují v gelu. Pro možnost stanovení velikosti fragmentů DNA se do gelu přidává tzv. marker molekulové hmotnosti, což je směs fragmentů DNA s definovanou velikostí. Pro vizualizaci molekul DNA a PCR fragmentů se do gelu přidává ethidium bromid, který se naváže na DNA a při excitaci UV zářením vyzařuje oranžové fluorescenční záření. Srovnáním pozice pruhu DNA s délkovým standardem se určí jeho délka (popřípadě i odhadne koncentrace PCR produktu nebo stupeň degradace DNA). Ethidium bromid je mutagen a kancerogen, proto je nahrazován tzv. netoxickými barvičkami, které pracující na podobném principu.

Koncentrace a čistota extrahované DNA se stanovuje pomocí UV spektrofotometru. DNA v roztoku absorbuje UV světlo v rozmezí od 210 do 500 nm, s absorpčním maximem 260 nm. Protože DNA, RNA a nukleotidy mají stejné absorpční maximum, tj. 260 nm, nemůže být v roztoku DNA určena koncentrace RNA a nukleotidových kontaminantů. Proto se stanovuje poměr absorbancí A260/A280 (280 nm – absorpční maximum bílkovin). Pokud se výsledná hodnota pohybuje v rozmezí 1,7–1,9, není vzorek znečištěn bílkovinami. Kontaminace nízkomolekulárními látkami je kontrolována poměrem absorbancí při vlnových délkách 260 a 230 (A260/A230), při kterých mají absorpční maximum nízkomolekulární látky, např. fenol, polysacharidy a EDTA. Optimální hodnota tohoto poměru je vyšší než 2,0 (Ovesná a Hodek, 2010).

3.2.3 Molekulární markery – rozdělení, princip, využití

Při studiu variability organizmů si nevystačíme se srovnáním DNA z různých jedinců. Molekula DNA je příliš velká makromolekula na to, abychom byli schopni efektivně prokázat rozdíly mezi srovnávanými jedinci. V praxi existují dva přístupy – buď použijeme metodu analyzující jeden (nebo omezený počet) jasně definovaný úsek DNA (sekvenace, mikrosatelity), nebo naopak používáme metody pracující s velkým počtem anonymních úseků DNA (RAPD, AFLP). Podle principu použité molekulárně biologické metody můžeme molekulární markery rozdělit na metody založené na:

- Restrikčním štěpení analyzovaného úseku DNA a následné hybridizaci se značenou sondou.

- Množení určitých úseků DNA v *in vitro* podmínkách pomocí PCR reakce.
- Kombinací obou přístupů.

3.2.3.1 Metody založené na restrikčním štěpení a hybridizaci

3.2.3.1.1 RFLP

Restriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism – polymorfizmus délky restrikčních fragmentů

Jedná se o jednu z historicky nejstarších metod DNA markerů. Je založena na detekci změn v sekvencích, které jsou rozpoznávány restrikčními endonukleasami (tj. enzymy štěpící esterové vazby v úseku DNA s konkrétním pořadím nukleotidů). Jejich činností je DNA nastříhána na velké množství fragmentů, které jsou rozděleny pomocí elektroforézy, přeneseny (blotovány) na speciální membránu (tzv. Southernův přenos) (Southern, 1975), kde je vizualizována pouze část fragmentů použitím specifické sondy. Jako sondy se používají např. uměle nasyntetizované oligonukleotidové sekvence značené radioaktivní značkou. Byla však již vypracována řada neradioaktivních metod značení sondy (Řepková a Relichová, 2001). Detekovaná variabilita odráží jednobodové mutace v původních restrikčních místech (dochází ke ztrátě, nebo naopak ke vzniku nového restrikčního místa) a/nebo inzercemi nebo delecemi v analyzovaném úseku DNA.

Výhodou metody je její kodominantní charakter umožňující po elektroforéze rozlišit homozygoty (1 fragment) od heterozygotů (2 fragmenty). RFLP markery byly u rostlin poprvé využity pro tvorbu genetických map, pro určování otcovství. Nevýhodou této metody je její celková pracnost, časová a finanční náročnost a vysoká výchozí koncentrace DNA pro restrikční štěpení. Vzhledem k relativní pracnosti metody se dnes dává přednost její modifikaci vzniklé spojením s PCR (PCR-RFLP). Naproti tomu se RFLP díky snadnější dostupnosti sond a interpretaci dat používá při fylogenetických studiích založených na analýze chloroplastové DNA.

Využití – studium genetické diverzity a fylogenetických vztahů (Avise, 2004; Sun et al., 2001, Weising et al. 2005), historie domestikace, původ a evoluce druhů (Dubreuil & Charcosset, 1999), mapování genů a tvorba restrikčních map (Ahn & Tanksley, 1993), fylogeografické studie.

3.2.3.2 Techniky molekulárních markerů založené na metodě PCR

3.2.3.2.1 PCR

Polymerase **C**hain **R**eaction – polymerázová řetězová reakce (Mullis, 1987)

Polymerázová řetězcová reakce je základní metoda molekulární biologie sloužící k namnožení relativně krátkých úseků DNA, které buď slouží jako přímý diagnostický znak (např. RAPD, mikrosatelity, AFLP), nebo mohou být dále analyzovány (např. sekvenací). Metoda PCR nám umožňuje vytvářet miliardy kopií vybrané části DNA v *in vitro* podmínkách v cyklické reakci o třech teplotních fázích. Pro provedení reakce potřebujeme DNA, několik základních chemikálií (tzv. PCR mix) a termocyklér – přístroj schopný periodicky a relativně rychle měnit teploty podle nastaveného programu.

Složení PCR mixu

- Templátová DNA – vyextrahovaná DNA (nebo její část), kterou chceme analyzovat.
- Primery – synteticky připravené oligonukleotidy, zpravidla o délce 10–30 bazí.
  - Jejich úloha při PCR je klíčová, protože vymezují oblast na DNA, která se bude kopírovat (amplifikovat).
  - Používá se zpravidla dvojice primerů (forward + reverse), výjimečně pouze jeden primer – např. při sekvenaci nebo metodě RAPD.
  - Syntéza primerů je komerční záležitost, na trhu existuje řada firem, které relativně rychle a levně (cca 250–300 Kč) primer nasyntetizuje, přečistí a dodá ve formě odparku.
  - Sekvence primerů můžeme odvodit ze znalosti sekvence cílové DNA, nebo je převzít z literárních zdrojů (vědecké publikace). Existují univerzální, např. specifické primery pro analýzu chloroplastových genů, nebo naopak sady RAPD primerů amplifikující anonymní části DNA.
- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs) – stavební kameny, ze kterých jsou syntetizovány kopie DNA. Jedná se o směs cytosinu, adeninu, guaninu a thyminu ve formě deoxyribonukleosidtrifosfátů – tj. dATP, dCTP, dGTP, dTTP.
- Polymeráza – enzym, který zajišťuje „kopírování" DNA – zabudovává nukleotidy do nově vznikajícího řetězce na základě komplementarity bazí.
- Reakční pufr dodávaný s polymerázou – zajišťuje optimální podmínky pro činnost polymerázy.

- Mg^{2+} ionty – ve formě $MgCl_2$, nezbytný iont pro činnost polymerázy.
- Existuje řada modifikací, jak je polymeráza (s pufrem a Mg^{2+}) dodávána – někdy je každá ze složek dodávána samostatně, jindy jsou v pufru obsaženy i Mg^{2+} ionty, příp. může být polymeráza dodána společně s pufrem, Mg^{2+} a nukleotidy v jedné zkumavce.
- Voda vhodná pro PCR – sterilní, redestilovaná (destilovaná a následně deionizovaná) voda s vodivostí do 0,2 μS.

Teplotní profil PCR reakce

V průběhu PCR reakce dochází k cyklickému opakování třech dílčích fází:

- Denaturace – zpravidla při teplotě 94 °C (92–95 °C) dochází k porušení dvoušroubovice DNA a ke vzniku jednořetězcových molekul.
- Annealing – nasedání primerů při teplotě v rozmezí 40–66 °C. Teplota annealingu se liší podle typu reakce a podle konkrétních primerů. Při nižších teplotách dochází k nespecifickému (nepřesnému) nasedání primerů ke komplementárnímu úseku na templátové DNA – vznikají přídavné bandy, rozmazané bandy, záznam je nehodnotitelný. Zvyšováním teploty se přesnost nasedání primerů zvyšuje, ale po překročení určité teploty k nasednutí nedojde a reakce neproběhne. Optimální annealingová teplota se zjišťuje pomocí tzv. gradientové PCR, kdy se na termocykléru nastaví určitý rozsah teplot a po elektroforéze se vybere teplota, při které byl detekován optimální záznam.
- Elongace – při teplotě 72 °C dochází k syntéze dceřiných molekul DNA, které se automaticky stávají matricí následujícího cyklu – dochází k exponenciálnímu nárůstu kopií amplifikované části DNA.

Tyto tři dílčí fáze se cyklicky opakují, počet opakování je zpravidla v rozsahu 25–40 cyklů.

V současnosti se metoda PCR používá v drtivé většině aplikací, při nichž pracujeme s relativně krátkými úseky DNA. Pokud ovšem analyzujeme např. geny existující v organizmu v několika variantách (např. u polyploidů) nebo pokud kopírujeme dlouhý úsek DNA (až 3MB), je třeba použít tzv. klonování. Izolovaná DNA je rozštěpena restrikčními endonukleázami a požadovaný úsek DNA je vložen do vektoru [plazmidy, viry (bakteriofágy)], a umělé chromozomy (např. YAC, *yeast artificial chromosome*, nebo BAC, *bacterial artificial chromosome*). Vektor obsahuje gen zajišťující rezistenci proti antibiotikům. Získáme rekombinantní molekulu DNA, kterou vloží-

me do hostitelské buňky, nejčastěji bakteriální, která je vložena na živné médium obsahující antibiotikum. Díky tomu dochází k pomnožení pouze bakterií nesoucích gen rezistence proti antibiotikům a zároveň tedy i požadovaný úsek DNA.

3.2.3.2.2 RAPD

Randomly **A**mplified **P**olymorphic **D**NA – polymorfizmus náhodně amplifikované DNA

RAPD metodu použil jako jeden z prvních Williams et al. (1990). Princip je založen na amplifikaci fragmentů DNA za použití pouze jednoho oligonukleotidového primeru. RAPD primery mají obvykle délku 10 bazí. Krátká délka motivu a výrazně nižší teplota annealingu (35–38 °C) zvyšuje pravděpodobnost nasednutí primeru na mnoha místech molekuly DNA (primery jsou tzv. nespecifické).

Pro výběr primeru nepotřebujeme žádnou znalost konkrétních sekvencí studovaného organizmu, můžeme použít jakýkoliv primer a zajímá nás jen to, který z nich vykazuje u studovaných vzorků polymorfní pattern. V současnosti je na trhu k dostání více než 400 různých primerů (Firma Operon Technologies).

Naamplifikované produkty jsou většinou elektroforeticky separovány na agarózovém gelu. Vizualizace se většinou provádí pomocí ethidium bromidu. Pruhy na gelu jsou hodnoceny na základě jejich přítomnosti/nepřítomnosti (1/0) jako tzv. dominantní data bez možnosti odlišení heterozygotní konstituce alel.

Problémem této metody je její nízká reproducibilita. Jde o to, že výsledky RAPD analýz provedených v různých laboratořích jsou ve srovnání s mikrosatelity, AFLP markery nebo sekvenačními daty špatně srovnatelné. To dosvědčují i výsledky společného projektu několika evropských laboratoří, které měly pro RAPD analýzu k dispozici vzorky z identických jedinců a stejnou metodiku PCR reakcí, avšak výsledná RAPD spektra se na gelech lišila (Jones et al., 1997). Tyto nedostatky se eliminují prováděním opakování za stále stejných podmínek a na stejném laboratorním vybavení, i když ani to nezaručí zisk identických RAPD profilů na gelech.

Komplikaci také představuje omezená použitelnost RAPD pro řešení otázek na úrovni vyšší než druhové, například stanovení příbuznosti v rámci rodu. Fakt, že dva fragmenty putují na gelu stejnou rychlostí (komigrují), nelze automaticky brát jako důkaz jejich homologie. Může se jednat o stej-

ně velké fragmenty pocházející z naprosto odlišných oblastí genomu. Tyto nevýhody však nijak neomezují použití RAPD markerů pro studie genetické variability populací (Weising et al., 2005), avšak RAPD jsou vesměs nahrazovány mikrosatelitními a AFLP markery.

Využití – studium genetické variability populací (Fisher et al., 2000), fylogenetických vztahů (Nkongolo et al., 2002; Syring et al., 2005), při identifikaci klonů (např. Toral Ibañez et al., 2009), identifikace hybridů.

3.2.3.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity (**STRs** – **S**hort **T**andem **R**epeats nebo **SSRs** – **S**imple **S**equence **R**epeats) jsou úseky DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů. Délka motivu je 1–6 nukleotidů [např. motivy $(CA)_n$, $(CAA)_n$, $(GA)_n$, $(GATA)_n$]. Podle složení lze mikrosatelity rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalý mikrosatelit je tvořen pouze jedním, stále se opakujícím motivem, např. $(AG)_{24}$, u nedokonalých je hlavní motiv přerušen [např. $(AG)_{14}C(AG)_{35}$] a v sekvenci složených mikrosatelitů se objevuje více motivů [např. $(AT)_n(CT)_n$)] (Weising et al., 2005).

Mikrosatelitové lokusy patří mezi nejvariabilnější oblasti genomu. Polymorfismus je dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu (n). Tyto změny pravděpodobně nejčastěji vznikají „klouzáním" DNA polymerázy během replikace (tzv. replication slippage), dále bodovými mutacemi sekvencí v okolí mikrosatelitového lokusu (na které nasedají primery), nebo inzercí/delecí delších částí uvnitř mikrosatelitového lokusu.

Mikrosatelity jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu všech eukaryot a v některých genomech prokaryot (Weising et al., 2005). Obvykle se však tato polymorfní místa vyskytují v nekódujících oblastech, bez vlivu na změnu čtecího rámce odpovídajícího bílkovinnému produktu.

Mikrosatelitové markery získáme PCR reakcí s primery, které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. Tyto specifické primery lze obecně získat třemi hlavními způsoby. Při klasickém postupu vývoje jsou mikrosatelity **izolovány *de novo*** z DNA daného druhu (z genomických knihoven), který chceme testovat. Její základní kroky spočívají v izolaci genomické DNA, jejího rozštípání pomocí restrikčních endonukleáz, vložení do plazmidového vektoru, kterým se transformují kompetentní bakteriální buňky, selektují se klony obsahující mikrosatelitové repetice. Takto vyselektované klony se namnoží a osekvenují. Provede se

konstrukce primerů, které jsou specifické pro daný mikrosatelitový lokus (Zane et al., 2002). Je zřejmé, že tento proces je finančně i časově velmi náročný. Proto se častěji používají mikrosatelitové lokusy, které byly navrženy pro blízce příbuzný druh organizmu, který chceme studovat. Tato metoda se nazývá ***cross-species*** **PCR amplifikace** (Primmer et al., 1999). U mikrosatelitů, které jsou polymorfní, pak dochází k optimalizaci PCR podmínek a doby elektroforetické separace pro zisk optimálního záznamu.

Dalším z možných řešení je **vývoj EST-SSR markerů** využitím veřejně dostupných databází obsahující tzv. EST (Expressed Sequence Tags) sekvence, získaných sekvenací produktů reverzní transkripce z mRNA (cDNA). EST databáze spravovaná NCBI (National Center for Biotechnology Information – Národní centrum pro biotechnologické informace) obsahuje stále více cDNA sekvencí, ze kterých lze pomocí speciálního softwaru navrhovat nové EST-SSR markery (Simko, 2009; Riar et al., 2011).

Využití – populačně genetické studie (Majeský et al., 2012), studium genových toků (Edh et al., 2007; Uwimana et al., 2012), hybridizace (Snow et al., 2010), fylogenetika (Provan et al., 1999.; Weising et al., 2005), identifikace jedinců, klonů, genotypizace (Motilal et al., 2009; Riar et al., 2011; Uwimana et al., 2012).

3.2.3.2.4 AFLP

Amplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů

Princip metody AFLP je založen na selektivní amplifikaci restrikčních fragmentů celého genomu. Postup se ve zkratce skládá ze čtyř základních kroků: 1. rozštěpení genomické DNA na fragmenty, 2. ligace adaptorů, 3. preselektivní a 4. selektivní amplifikace fragmentů pomocí speciálních primerů. Následuje elektroforéza produktů a statistické zpracování dat (Vos et al., 1995). Detailní popis metody AFLP je následující:

Prvním krokem je tzv. restrikce, během které dochází k naštípání genomické DNA pomocí dvou různých restrikčních enzymů – enzym *Eco*RI rozpoznává šestibázovou sekvenci GAATTC a enzym *Mse*I čtyřbázovou sekvenci TTAA. Vznikají tři typy DNA fragmentů se zbytky restrikčních míst (*Eco-Eco, Eco-Mse, Mse-Mse*) s tzv. lepivými konci (Meudt a Clarke, 2007). Na konce takto vzniklých fragmentů DNA se ve druhém kroku (ligaci) navážou (naligují) krátké, synteticky připravené fragmenty DNA – tzv.

adaptory. Díky tomu se změní původní anonymní povaha restrikčních fragmentů a nově vzniklé fragmenty s naligovanými adaptory je možno použít pro PCR reakci v dalším kroku.

Ve třetím kroku tedy dochází k amplifikaci fragmentů DNA s navázanými adaptory pomocí klasické PCR reakce s dvojicí primerů, které jsou komplementární k sekvenci adaptorů. Každý z těchto primerů navíc obsahuje na 3´ konci nukleotid zasahující dovnitř amplifikovaných fragmentů DNA. Díky tomu dojde jednak k selekci fragmentů, které vznikly současným štěpením enzymů *Eco*RI a *Mse*I, a také k výrazné redukci fragmentů přítomných v ligační směsi (Savelkoul et al., 1999). Počet fragmentů získaných preselektivní amplifikací je příliš velký pro spolehlivou separaci a detekci těchto fragmentů. Proto je nutné počet fragmentů ve směsi dále redukovat.

V posledním čtvrtém kroku jsou proto použity PCR primery, které obsahují další (1–3) selektivní nukleotidy (např. *Eco*+ATA a *Mse*+CAC) redukující počet amplifikovaných fragmentů. Počet a typ selektivních nukleotidů se zvolí na základě testování různých primerových kombinací tak, aby byl po separaci získán informativní a spolehlivě detekovatelný profil. Změnami kombinací primerů v posledním kroku AFLP dochází opakovaně k vygenerování a detekci 20–100 vysoce polymorfních markerů z celého genomu jedince. Provádí se několik PCR reakcí s použitím různých primerových kombinací vedoucích k zisku 200–400 bandů.

Pro detekci amplifikovaných fragmentů se v současnosti používá separace fluorescenčně značených AFLP fragmentů na sekvenátoru nebo finančně a přístrojově nenáročná radiografická detekce či detekce barvením stříbrem (Vos et al., 1995).

Obecně je AFLP považována za metodu vysoce citlivou, lze ji zautomatizovat a výsledky jsou reprodukovatelné a spolehlivé (Bensch a Akesson, 2005). Na rozdíl od jiných metod (např. mikrosatelity) není nutná znalost DNA sekvence studovaného organizmu. Z toho důvodu často AFLP nachází uplatnění v aplikacích, kdy není dostupná informace o sekvenci DNA, tradiční metody jako sekvenace nejsou dostatečně variabilní (Ovesná a Hodek, 2007) nebo je relativně krátká doba na uskutečnění studie. Metoda je používána pro různé účely, od populačně-biologických a fylogenetických studií, dále pro identifikaci odrůd, kultivarů a hybridů, až po studie zabývající se expresí genů (Cooke a Lees, 2004; Meudt a Clarke, 2007).

Nevýhodou této metody je její dominantní charakter a anonymní povaha fragmentů, ale i tzv. homoplazie fragmentů. Tento termín označuje

fragmenty stejné délky, které pochází z různých lokusů genomu, ale při elektroforetické separaci díky shodné délce migrují společně (podobně jako u RAPD). Při následném hodnocení jsou pak považovány za identické (Caballero a Quessada, 2010; Paris et al., 2010). Fragmenty se stejnou elektroforetickou mobilitou mohou být částmi kopií genů, pseudogenů, transpozomů a především repetetivních částí genomu. Negativnímu ovlivnění výsledků detekcí fragmentů, které vykazují homoplazii, lze snadno předejít redukcí počtu fragmentů při jedné selektivní amplifikaci (Caballero a Quessada, 2010).

Využití – fylogenetika (Koopman et al., 2001), populační genetika (Kitner et al., 2008, 2012; Kuang et al., 2008; Lebeda et al., 2009; Tribsch et al., 2002), genotypizace, studium hybridizace a polyploidní evoluce (Guo et al., 2006).

3.2.3.2.5 Sekvenování

Sekvenováním přesně určíme pořadí nukleotidů v námi studovaném úseku DNA (např. PCR produktu). Mezi nesporné výhody této metody patří výsledná detailní informace o nejzákladnější struktuře genetického materiálu, přičemž množství zkoumaných znaků je relativně vysoké oproti předchozím metodám (zpravidla se v jednom kroku analyzuje oblast o délce 700–900 párů bazí – bp). Výsledná sekvenační data se zpravidla dále statisticky zpracovávají a mohou být archivována ve veřejně dostupných internetových databázích, např. GENEBANK, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/. Díky tomu lze poměrně jednoduše srovnávat výsledky prací různých autorů, srovnávat jedince z různých geografických oblastí, provádět fylogenetické analýzy atd.

V současnosti lze sekvenační metody rozdělit do dvou skupin podle délky sekvenovaného úseku:

a) Sekvenace krátkých úseků DNA

Pro sekvenaci krátkých úseků DNA (cca do délky 700–900 bp) se v současnosti používá modifikovaná **Sangerova metoda** sekvenování (Sanger et al., 1977) založená na terminaci syntézy nově vznikajícího řetězce DNA použitím fluorescenčně značených dideoxyribonukleotidů. Tyto „dideoxy varianty" (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) nemají hydroxylovou skupinu na 3´ uhlíku cukerného zbytku a jsou v PCR směsi smíchány v určitém poměru s klasickými deoxyribonukleotidy (dNTP). Zároveň je každý ze čtyř

typů označen fluorescenční značkou charakteristické barvy pro daný nukleotid. Při sekvenační PCR reakci probíhá kopírování matricového úseku DNA až do té doby, kdy je do nově vznikajícího řetězce náhodně zabudován ddNTP. Tím se PCR zastaví, protože chybí -OH skupina na 3´ uhlíku a polymeráza tedy nemůže připojit nový nukleotid. Jelikož v reakční směsi probíhá současně obrovské množství PCR reakcí a k zabudování dideoxyribonukleotidů dochází náhodně, výsledkem sekvenační reakce je směs různě dlouhých fragmentů DNA, které mají na svém konci fluorescenčně značený nukleotid. Ve speciálním přístroji (tzv. sekvenátoru) potom dojde k rozdělení těchto různě dlouhých fragmentů podle jejich délky pomocí kapilární elektroforézy. Na konci kapiláry je fluorescenční detektor, kterým postupně procházejí rozdělené fragmenty od nejkratšího po nejdelší. Systém identifikuje, jakým typem nukleotidu daný fragment končí. Celý proces je automatizován a výsledný chromatogram je uložen v digitální podobě pro další bioinformatické zpracování.

Pro úplnost je třeba uvést, že v roce 1977 byla vedle Sangerovy metody publikována **Maxam-Gilbertova metoda** (Maxam a Gilbert**,** 1977) založená na využití vlastností různých chemikálií štěpit místa DNA s určitými nukleotidy. DNA byla na svých koncích radioaktivně značena, získané fragmenty byly odděleny elektroforézou a díky radioaktivní značce na jejich konci byly autoradiograficky vizualizovány. Z důvodu nemožnosti automatizace a užívání toxických chemikálií se tato metoda přestala používat.

b) Celogenomové sekvenování

V současnosti dochází k velkému rozvoji metod celogenomového sekvenování, tzv. **sekvenování nové generace** (NGS, *next-generation sequencing*). Tyto metody se neustále vyvíjejí, vylepšují, ale zároveň se objevují zcela nové technologie. Nicméně jejich základní rozdíl od klasické Sangerovy metody spočívá v zisku informací o nukleotidovém složení rozsáhlých částí DNA, nebo dokonce o sekvenci celého genomu provedením pouze jedné sekvenační reakce. Na trhu dnes dominuje několik systémů od různých firem, které pracují na různých principech (454 sekvenování fy. Roche, společnost Illumina a systémy Solid a Ion Torrent fy. Life Technologies). Jejich detailní popis je nad možnosti tohoto studijního materiálu a budeme se proto snažit o zobecňující popis jejich společných rysů.

První fází NGS sekvenování je zpravidla příprava tzv. knihovny fragmentů spočívající ve fragmentaci studované DNA na krátké úseky (např. ultrazvukem, probubláváním dusíkem), ke kterým se připojují speciální

adaptory. V takto připravené knihovně jsou obsaženy miliony fragmentů, které jsou dále zpracovávány a analyzovány podle dané NGS metodiky. Během sekvenační reakce NGS sekvenátor shromažďuje současně informace o milionech paralelně probíhajících sekvenačních reakcích. Díky této masivní výkonnosti může dojít k osekvenování genomu (nebo jeho velké části) během jednoho běhu. Oproti klasické Sangerově metodě není výsledkem informace o jednom úseku DNA o délce 700–900 bp, ale informace o milionech krátkých sekvencí o délce 30–300 bp. Tyto krátké sekvence jsou následně analyzovány – počítač provádí jejich překryv – tj. sekvence se stejným nukleotidovým motivem jsou kladeny nad sebe, a tím dochází k postupnému prodlužování délky výsledné sekvence.

Je zřejmé, že finanční náklady související s celogenomovým sekvenováním jsou značné. Navíc bioinformatické zpracování takto vygenerovaných dat je spojené s ještě vyššími náklady a značnými technickými potížemi. Proto se vědecké týmy snaží o cílené obohacování přesně definovaných úseků genomické DNA, které použijí při NGS sekvenování. Délka sekvenované oblasti genomu se zredukuje jen na oblasti, které je zajímají. Aplikování tohoto postupu vede ke snížení nákladů na samotnou sekvenaci a následné bioinformatické zpracování.

Pro další přiblížení technologie NGS metod doporučuji například review Metzker (2009).

Využití – rekonstrukce fylogeneze, rychlost evoluce, vznik a původ druhů, studium mezidruhové hybridizace, fylogeografické studie, studium struktury a funkce genomu, vývoj molekulárních markerů, studium genů rezistence atd. (Avise, 2004; Weising et al., 2005).

4 Literatura

Avise J. C. (2004). Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, USA.

Ahn S., Tanksley S. D. (1993). Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl Acad. Sci.* U.S.A. 90:7980–7984.

Bensch S., Akesson M. (2005). Ten years of AFLP in ecology and evolution: Why so few animals? *Molecular Ecology* 14:2899–2914.

Caballero A., Quessada H. (2010). Homoplasy and Distribution of AFLP Fragments: An analysis in silico of the genome of different species. *Molecular Biology and Evolution* 27:1139–1151.

Cano R. J., Poinar H. N., Pieniazek N. J., Acra A., Poinar Jr. G. O. (1993). Amplification and sequencing of DNA from a 120–135-million-year-old weevil. *Nature* 363:536–538.

Cooke D. E. L., Lees A. K. (2004). Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology* 53:692–704.

Dubreuil P., Charcosset A. (1999). Relationships among maize inbred lines and populations from European and North American origins as estimated using RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99:473–480.

Edh K. Widén B., Ceplitis A. (2007): Nuclear and chloroplast microsatellites reveal extreme population differentiation and limited gene flow in the Aegean endemic *Brassica cretica* (Brassicaceae). *Mol. Ecol.* 16:4972–4983.

Fischer M., R Husi R., Prati D., Peintinger M., van Kleunen M., Schmid B. (2000). RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 87:128–1137.

Guo Y.-P., Vogl C., Van Loo M., Ehrendorfer F. (2006). Hybrid origin and differentiation of two tetraploid *Achillea* species in East Asia: molecular, morphological and ecogeographical evidence. *Molecular Ecology* 15:133–144.

Huska, D., Hubalek J., Adam V., Vajtr D., Horna A., Trnkova L., Havel L., Kizek R. (2009): Automated nucleic acids isolation using paramagnetic microparticles coupled with electrochemical detection. *Talanta*, 79:402–411.

Jaaska V. (2005). Isozyme variation and phylogenetic relationships in *Vicia* subgenus *Cracca* (Fabaceae). *Annals of Botany* 96:1085–1096.

Jones C. J., Edwards K. J., Castaglione S., Winfield M. O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevschi A., Marmiroli N. Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding 3:381–390.

Kitner M., Lebeda A., Doležalová I., Maras M., Křístková E., Nevo E., Pavlíček T., Meglic V., Beharav A. (2008). AFLP analysis of *Lactuca saligna* germplasm collections from four European and three Middle Eastern countries, *Israel Journal of Plant Sciences*, 56, 185–193.

Kitner M., Majeský Ľ., Gillová L., Vymyslický T., Nagler M. (2012). Genetic structure of *Artemisia pancicii* populations inferred from AFLP and cpDNA data. *Preslia* 84:97–120.

Koopman W. J. M., Zevenbergen M. J., van den Berg R. G. (2001). Species relationships in *Lactuca* s.l. (Lactuceae, Asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. *American Journal of Botany*, 88, 1881–1887.

Kuang, H., van Eck, H. J., Sicard, D., Michelmore, R., & Nevo, E. (2008). Evolution and genetic population structure of prickly lettuce (*Lactuca serriola*) and its *RGC2* resistance gene cluster. *Genetics* 178:1547–1558.

Lebeda A., Kitner M., Dziechciarková M., Doležalová I., Křístková E., Lindhout P. (2009). An insight into the genetic polymorphism among European populations of *Lactuca serriola* assessed by AFLP. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 597–608.

Lebeda A., Kitner M., Křístková E., Doležalová I., Beharav A. (2012): Genetic polymorphism in *Lactuca aculeata* populations and occurrence of natural putative hybrids between *L. aculeata* and *L. serriola*. *Biochemical Systematics and Ecology* 42:113–123.

Majeský Ľ., Vašut R. J., Kitner M., Trávníček B. (2012). The pattern of genetic variability in apomictic clones of *Taraxacum officinale* indicates the alternation of asexual and sexual histories of apomicts. – PLoS One 7(8):e41868.

Maxam A. M., Gilbert W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:560–564.

Metzker M. L. (2009). Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews* 11:31–46.

Meudth M., Clarke A. C. (2007). Almoust forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12:106–117.

Motilal L. A., Zhang D., Umaharan P., Mischke S., Boccara M., Pinney S. (2009). Increasing accuracy and throughput in large-scale microsatellite fingerprinting of cacao field germplasm collections. *Tropical Plant Biology* 2:23–37.

Mullis B. (1987). U.S. patent 4, 683, 195, July 1987 and U.S. patent 4, 683, 202, July 1987.

Murray M.G., Thompson W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. – *Nucleic Acid Research* 8:4321–4325.

Nkongolo K. K., Michael P., Gratton W. S. (2002). Identification and characterization of RAPD markers inferring genetic relationships among *Pine* species. *Genome* 45:51–58.

Ovesná J., Hodek J. (2007). Využití AFLP pro DNA genotypizaci rostlin. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 20 pp.

Ovesná J., Hodek J. (2010). Metody extrakce DNA z čerstvého plodu papáji a z kandované papáji. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 22 pp.

Paris M., Bonnes B., Ficetola G. F., Poncet B. N., Despres L. (2010). Amplified fragment length homoplasy: in silico analysis for model and non-model species. *BMC Genomics* 11:287.

Primmer C. R., Moler A. P., Ellegren H. (1999). A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5:365–378.

Riar, D. S., Rustgi, S., Burke, I. C., Gill, K. S., & Yenish, J. P. (2011). EST-SSR development from 5 *Lactuca* species and their use in studying genetic diversity among *L. serriola* biotypes. *Journal of Heredity* 102:17–28.

Řepková J., Relichová J. (2001). Genetika rostlin. Masarykova univerzita v Brně, 269 pp.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463–5467.

Savelkoul P. H. M., Aarts H. J. M., Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J. L. W, Schouls L., Lenstzra J. A. (1999). Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3083–3091.

Simko I. (2009). Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Heredity* 100:256–262.

Syring J., Willyard A., Cronn R., Liston A. (2005). Evolutionary relationships among *Pinus* (Pinaceae) subsections inferred from multiple low-copy nuclear loci. *Am. J. Bot.* 92:2086–2100.

Soltis D. E., Soltis P. S. (1989): Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Portland, Oregon.

Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Jornal of Molecular Biology* 98:503–517.

Sun, C. Q., Wang X. K., Li Z. C., Yoshimura A., Iwata N. (2001). Comparison of the genetic diversity of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L.) using RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 102:157–162.

Toral Ibañez M., Caru M., Herrera M. A., Gonzalez L., Martin L. M., Miranda J., Navarro-Cerrillo R. M. (2009). Clones identification of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. in Chile by using PCR-RAPDs technique. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 10:112–119.

Tribsch A., Schönswetter P., Stuessy T. (2002). *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the Ice Age in the European Alps. *American Journal of Botany* 89:2024–2033.

Uwimana B., d'Andrea L. D., Felber F., Hooftman D. A., den Nijs H. C. M., Smulders M. J. M., Visser R. G., van de Wiel C. C. M. (2012). A Bayesian analysis of gene flow from crops to their wild relatives: cultivated *(Lactuca sativa* L.) and prickly lettuce (*L. serriola* L.) and the recent expansion of *L. serriola* in Europe. *Molecular Ecology* 21:2640–2654.

Vallejos C. E. (1983). Enzyme activity staining. In: Tanksley D. S., Orton T. J. (eds.): Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Elsevier, Amsterdam–Oxford–New York, pp. 469–516.

Vejl P., Skupinová S., Sedlák P., Bardová M. (2002). Analýza rostlinného genomu. Praha: ČSU Praha, 238 pp.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407–4414.

Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. (2005). DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications, 2nd edn. Boca Raton: CRC Press. 472 pp.

Williams G. K., Kubelik A. R., Livak K. L., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18:6531–6535.

Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecoogy* 11:1–16.

doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D., a kolektiv

Zajímavé přednášky z chemie a biologie pro SŠ pedagogy

Výkonný redaktor prof. RNDr. Tomáš Opatrný, Dr.
Odpovědná redaktorka Mgr. Hana Pochmanová
Technická redaktorka RNDr. Anna Petříková
Návrh a grafické zpracování obálky Jiří Jurečka

Vydala a vytiskla Univerzita Palackého v Olomouci
Křížkovského 8, 771 47 Olomouc
www.vydavatelstvi.upol.cz
www.e-shop.upol.cz
vup@upol.cz

1. vydání

Olomouc 2013

ISBN 978-80-244-3670-8

Neprodejná publikace

VUP 2013/514