

Zdeněk Š e s t á k :

Použití papírové chromatografie chlorofylů a karotenoidů v algologii

Ústav experimentální botaniky ČSAV, odd. fyziologie a genetiky rostlin, Praha 6

Současná systematická botanika se v mnohých směrech musí opírat o moderní metody biochemické. Zejména u nižších rostlin je obsah specifických sloučenin mnohdy znakem stejnocenným se znaky morfologickými.

Nejvyšší taxonomické jednotky řas se navzájem odlišují obsahem lipofilních pigmentů, tj. chlorofylů a karotenoidů. Výrazná je zejména přítomnost chlorofylů. Všechny autotrofní rostliny, a tedy i řasy, obsahují chlorofyl *a*, který je u fotosyntetisujících bakterií nahrazen bakteriochlorofylem. Jen dva kmeny řas — *Chlorophyta* a *Euglenophyta* — obsahují shodně s vyššími rostlinami také chlorofyl *b*, což je podkladem četných fylogenetických úvah. Pouze u řas byly nalezeny další typy chlorofylů: chlorofyl *c* u hnědých řas, rozsivek a řas z oddělení *Dinophyceae* kmene *Pyrrophyta*, a chlorofyl *d* u ruduch. Pochybná je existence chlorofylu *e*, jehož absorpční maxima udává STRAIN (1951) podle svých starších pokusů s *Tribonema bombycinum* DEBB. et SOL., a jehož přítomnost žádný další autor nepotvrdil. Chlorofylů *c* a *d* (respektive *e*) jsou v uvedených řasách množství velmi malá vzhledem k obsahu chlorofylu *a* a proto se tato labilní barviva obtížněji isolují a stanovují než chlorofyl *b*, který tvoří obvykle 1/4 až 1/3 z celkového množství chlorofylů.

Poměrně málo a nepřilíhli potvrzených údajů máme také o karotenoidech řas, jak svědčí např. tabulky STRAINOVA (1951, tab. 6), GOODWINOVA (1955, tab. 3) a DOUGHERTYOVÉ a ALLENOVÉ (1960). Řasy obsahují některé stejné karotenoidy jako vyšší rostliny. Jsou to především karoteny α , β a γ , z nichž obsahují všechny typy řas pouze β -karoten. Všechny tři karoteny jsou podle dosavadních údajů (GOODWIN 1955) přítomny jen u zelených řas. Karoteny neobsahují v molekule žádný atom kyslíku; oxydované karotenoidy se nazývají xanthofyly. Jednotlivé xanthofyly se liší zejména počtem kyslíkových atomů v molekule, typem funkční skupiny ($-\text{OH}$, $-\text{O}-$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{OCH}_3$), strukturní konfigurací molekuly a počtem konjugovaných a izolovaných dvojných vazeb. Z karotenoidů se 2 atomy kyslíku v molekule obsahují řasy nejčastěji lutein, případně zeaxanthin, které jsou běžné u vyšších rostlin. Z xanthofylů se 4 kyslíkovými atomy je významný violaxanthin, který s neoxanthinem je přítomen i u vyšších rostlin. K tomuto typu xanthofylů patří u některých zelených řas a euglen astaxanthin, vlastně živočišný karotenoid. K nejoxydovanějším xanthofylům patří fukoxanthin, specifický pro rozsivky, hnědé i žluté řasy. Další specifické xanthofyly není třeba v tomto přehledu uvádět; literatura o nich je rozsáhlá a nepřilíhli jednotná, už proto, že snadno přecházejí v různé formy.

Složení pigmentů řas nebylo dosud studováno u širšího druhového materiálu ani ho nebylo využíváno častěji jako znaku svědčícího pro systematické zařazení druhů řas; důvodem byly hlavně metodické obtíže. Klasickým postupem pro rozdělení rostlinných pigmentů je chromatografie na sloupci adsorpční látky (např. cukru, škrobu, inulinu, kysličníku hlinitého), některou z modifikací metody ČVETOVY (TSWETT 1936). Tato metoda je významná zejména při stanovení karotenoidů, je však pracná a vyžaduje extrakt z velkého množství materiálu. Výsledky jednotlivých analys jsou pak navzájem obtížně srovnatelné. Široce použitelnou metodou, zvláště pro orientační určení nebo podepření systematického zařazení, může být jenom rychlá standardní

metoda, vyžadující malé množství materiálu. Tou je papírová chromatografie.

Sám zakladatel chromatografie ČVET ve výše citované stati (1906) uvádí dělení pigmentů pomocí kapilární analýsy na papíře: pruh filtračního papíru se spodním okrajem ponoří do misky s vodným roztokem rostlinných pigmentů. Roztok postupuje kapilárami v papíře a vzhledem k adsorpci a dělení mezi fázemi částečně se odpařujícího rozpouštědla se diferencují zony obsahující jednotlivá barviva. Této metody použil KYLIN (1927) při stanovení karotenoidů u sinic, ruduch, zelených řas, hnědých řas, rozsivek a u *Dinophyceae*. Pro kapilární analýsu, kterou nedocílíme dokonalého oddělení jednotlivých pigmentů, však potřebujeme téměř stejné objemný vzorek jako pro sloupcovou chromatografii.

Podstatné zmenšení vzorku, potřebného k analýse, přináší teprve metody papírové chromatografie. BROWNOVA (1939) kruhová metoda k dělení listových barviv zůstala izolovaným pokusem a tak papírovou chromatografií chlorofylů a karotenoidů můžeme datovat až rokem 1951 (všeobecný přehled viz ŠESTÁK 1958a). Od té doby bylo této metody několikrát použito ke studiu pigmentů řas (ANGAPINDU aj. 1958, ANDERSON 1960, DOUIN 1954, BLASS, ANDERSON a CALVIN 1959, BRZESKI a RÜCKER 1960, BLAAUW-JANSEN 1954 a, b, HUZSIGE aj. 1957, EPSTEIN a WEISS 1960), ale pouze v jednom případě (HARDER a KOCH 1954) bylo této metody použito jako pomůcky k systematickému zařazení řas. Ve snaze zpřístupnit algologům analýsu pigmentů řas, pokusil jsem se sestavit vhodný pracovní postup srovnávacího chromatografického rozdělení pigmentů na papíře, a vyzkoušel jej na čistých kulturách řas různých typů.

Pracovní postup

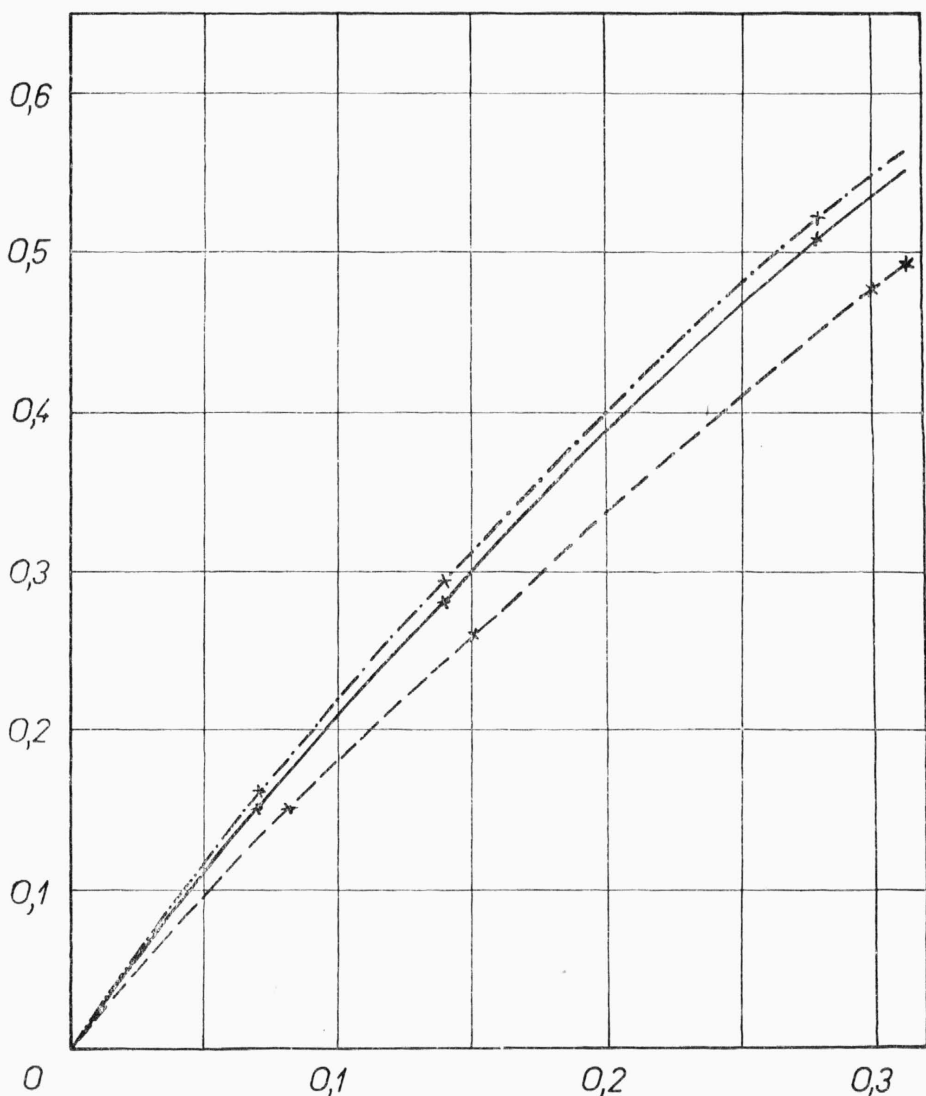
Každá specialisovaná metoda má řadu jemností a úskalí: popisují zde proto metodu co nejpodrobněji, aby se jí dalo použít bez dlouhého přezkušování.

Vzorek: V těch případech, kdy lze vypěstovat druhově čistou kulturu řasy (bezbarvé bakterie a plísň nevdají), připravíme si alespoň 2 zkumavky s dobře rozrostlou kulturou na agaru nebo v tekutém prostředí. Také v přírodě lze nalézt druhově čisté nárosty rozsivek, sinic apod. Znečištění jiným typem řas do 2 až 5 % z celkového objemu buněk obvykle nevdají. Je samozřejmé, že se nepodaří analyzovat pigmenty z pouhých několika desítek buněk řas, i když minimální potřebné množství materiálu pro papírovou chromatografii je nejméně $10 \times$ menší než pro dělení na sloupce.

Extrakce pigmentů: Jsou-li řasy ve vodném prostředí, musíme je před extrakcí zahustit. Výhodné je předběžně zahustění centrifugací a pak filtrace přes 1–2 cm tlustou vrstvu křemenného písku (např. jemný bílý sklářský písek nebo preparát Lachema „Mořský písek čistý“), předběžně zjemněného rozetřením v třecí misce. Písek se umístí na filtračním papíře v Büchnerově nálevce nebo na sintru hustoty S 2 až S 4 a filtruje se za odsávání vodní vývěvou.

K vrstvě písku se zahustěným vzorkem řas nebo ke vzorku odebranému drátěným očkem s povrchu agarové plotny (po dodání malého množství písku) pak v malé třecí misce (průměr 5 cm a menší) přidáme špetku $MgCO_3$ k neutralisaci kyselin v buňkách (u většiny druhů řas však tento přídatek není nutný) a zvlhčíme bezvodým acetonem (užíváme acetonu čistoty pro analýsi nebo purum, který jednou předestilujeme). Pak roztíráme tak dlouho, až je písková kaše stejnoměrně zbarvena, bez šmouh (tj. asi 2 až 3 min.). Pak přidáváme po 2 až 3 ml dávky aceton (zprvu bezvodý — pak 85 % — a nakonec bezvodý) a extrakt přes hustý sintr S 4 (G 4) filtrujeme za sníženého tlaku do 10 ml kalibrované zkumavky, umístěné ve 250 ml odsávací baňce. (Další podrobnosti o extrakci pigmentů z řas a sinic viz ŠESTÁK 1958b).

Změření koncentrace chlorofylů v extraktu: Protože dokonalost rozdělení závisí na množství chlorofylů, naneseném na délkové jednotce skvrny na startu chromatografického papíru, je výhodné změřit předem celkovou koncentraci chlorofylů v základním extraktu. Způsobů kolorimetrického stanovení je celá řada; uvedu jako příklad měření na Pulfrichově fotometru. Extrakt se měří ve srovnání s vodou, v kyvetě tloušťky 1 cm, s použitím filtru S 64. Dbáme toho, aby hodnoty extinkce nepřesahovaly cca 0,50; je-li extinkce vyšší, odebereme malou část extraktu, příslušně ji zředíme a teprve potom kolorimetrujeme. Hodnoty extinkce převedeme na váhové množství chlorofylů podle grafu na obr. 1. Graf je sestaven podle měření chromatograficky čistých preparátů chlorofylů *a* a *b*, které laskavě poskytl dr. E. Wiedemann ze Švýcarska. K vyhodnocení použijeme křivky pro chlorofyl *a*; předpokládáme-li, že jde o extrakty ze zelených řas, je přesnější použít křivky pro směs chlorofylů (*a* + *b*) v poměru 3 : 1. Přítomnost chlorofylů *c* a *d* chybu přepočtu zvětší jen nepatrně. Na ose *x* odečteme množství chlorofylů pro 10 ml objem roztoku, které přepočítáme pro objem studovaného extraktu.



Obr. 1. — Kalibrační křivky pro stanovení množství chlorofylu *a* (---), chlorofylu *b* (-.-.) a jejich směsi v poměru $a/b = 3/1$ (—), sestavené podle preparátů od E. Wiedemanna. Lze použít pro měření acetonových roztoků na Pulfrichově fotometru v kyvetách tloušťky 1 cm a s filtrem S 64. Osa *x* — množství chlorofylů v 10 ml objemu roztoku; osa *y* — extinkční hodnoty.

Abb. 1. — Kalibrationskurve zur Bestimmung der Menge von Chlorophyll *a* (---), Chlorophyll *b* (-.-.-) und deren Gemisch im Verhältnis $a/b = 3/1$ (—), zusammengestellt nach Präparaten von E. Wiedemann. Kann zum Messen von Azetonlösungen auf Pulfrich-Photometer in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke mit dem Filter S 64 benützt werden. Abszisse: Chlorophyllmenge in 10 ml Volumen der Lösung; Ordinate: Extinktionswerte.

Zahuštění extraktu: Acetonový extrakt můžeme přímo nanášet na chromatografický papír. Můžeme také převést pigmenty do etheru: etherový roztok se rychleji nanáší vzhledem k nižšímu bodu varu etheru i k menšímu obsahu vody v extraktu. Acetonový extrakt se tedy nalije do dělicí baňky malého objemu, např. 50 ml, nebo lépe do speciálně zhotovené válečkové dělicí baňky objemu cca 20 ml. K acetonovému extraktu se přidá více než poloviční množství etheru. Protřepe se a podlijte se nasyceným nebo méně koncentrovaným roztokem NaCl. Tím se oddělí dvě vrstvy — svrchní etherová vrstva obsahuje všechny lipofilní pigmenty, do spodní vodné vrstvy přechází aceton a případně fykobiliny a jiné pigmenty rozpustné ve vodě. Přítomnost NaCl zabraňuje vzniku emulsi. Spodní vrstva se vypustí, etherová vrstva v baňce se 3× až 5× promyje destilovanou vodou (bez třepání!), kterou je nejlépe pozvolna prokapávat etherovou vrstvou z pipety nebo z druhé dělicí baňky. Tím se odstraní aceton i zbytky soli a etherový roztok pigmentů se částečně zkoncentruje. Etherový roztok se pak přelije do kalibrované zkumavky; další zahuštění můžeme provést odpařováním za sníženého tlaku nebo foukáním proudů dusíku z tlakové nádoby na hladinu roztoku. Čím koncentrovanější je roztok pigmentů, tím rychleji se nanáší na chromatografický papír.

Nanášení extraktu na chromatografický papír: Vzhledem k nestálosti rostlinných barviv není možné extrakt uchovávat např. do druhého dne. Proto se roztok pigmentů ihned nanese na papír. Použije se kapilární skleněné pipetky, vytažené ze skleněné trubičky. Objem pipetky je třeba změřit pomocí kalibrované mikropipety a vyznačit — vhodné jsou pipetky objemů 20 až 20 0 μ l. Ústí pipetky musí být úzké, roztok musí vytékat až při dotyku s papírem.

K dělení je výhodné užít papíru Whatman č. 1 (tenký) nebo č. 3 (tlustý), podle toho, jak velká množství barviv budeme dělit. Na papíře č. 3 jsou vzhledem k větší tloušťce papíru skvrny oddělených barviv zřetelnější. Papír vystříháme ve tvaru obdélníku, čtverku nebo kruhu — viz jednotlivé metody. Na čáru startu nanášíme extrakt ve formě úsečky dlouhé obvykle 2 cm, a to tak, aby na 1 cm délky startu byl nanesen extrakt se 2 až 5 μ g chlorofylů (papír Whatman 1 nebo s 5 až 10 μ g chlorofylů (Whatman 3). Pomocí jednoduché rovnice můžeme vypočítat, kolik mikrolitrů připraveného etherového roztoku obsahuje 1 μ g chlorofylů:

$$x = \frac{10 \cdot a_v}{a_p \cdot c}$$

x = hledaný počet μ l výsledného etherového roztoku, který obsahuje 1 μ g chlorofylů;

a_v = celkový objem výsledného etherového roztoku v ml;

a_p = původní objem tohoto množství acetonového extraktu, které bylo převedeno do etheru, v ml;

c = množství chlorofylů v mg, odečtené podle změřené extinkce acetonového extraktu na ose x na obr. 1.

Vypočtené množství etherového extraktu — x — pak znásobíme délkou úsečky na startu, na kterou nanášíme, a dále dvěma až pěti pro papír Whatman 1 a pěti až deseti pro papír Whatman 3. Protože dělení chloroplastových pigmentů na papíře se řídí převážně principy adsorpce chromatografie, postupují skvrny chlorofylů rychleji, je-li na jednotce startu naneseno větší množství chlorofylů. Chceme-li tedy srovnat pigmentové složení různých řas, musíme ze studovaných vzorků nanášet taková množství extraktů, aby na délkové jednotce startu bylo vždy stejné množství chlorofylů. Nejlepším způsobem je nanést dvě skvrny porovnávaných vzorků a dprostřed mezi ně jejich směs: při tom koncentrace chlorofylů ve směsné skvrně musí být stejná jako v obou jednotlivých skvrnách.

Odpařování rozpouštědla během nanášení urychlujeme proudem chladného vzduchu (např. z osušovače vlasů) nebo lépe proudem dusíku z tlakové nádoby. Při nanášení dbáme toho, aby skvrna na startu měla co nejúžší tvar.

Způsoby vyvíjení chromatogramu: Pro náš účel jsou vhodné postupy, při nichž se barviva rozdělí rychle a na malé ploše papíru. Lze doporučit tři způsoby:

- a) vzestupné vyvíjení na obdélníkovém papíře,
- b) vzestupné vyvíjení na kuželové ploše papíru (podle OSAWY 1957),
- c) kruhové vyvíjení.

Vyvíjí se ve tmě (stačí zakrýt vyvíjecí komoru černou látkou).

a) **Vzestupné vyvíjení na obdélníkovém papíře.** Vyvíjíme ve skleněné kyvetě rozměru např. 190×80×260 mm se zabroušeným víkem. Pod víkem upevníme vodorovně po délce kyvety dvě skleněné tyčinky, jejichž oba konce jsou zapuštěny v provrtá-

ných gumových zátkách. Zabroušený horní okraj kyvety a víka se namažou hustou vazelínou, aby byl prostor uvnitř kyvety těsně uzavřen. Na dno kyvety nalijeme asi 30 ml vyvíjecí rozpouštědlové soustavy (viz níže).

Na papíře rozměru 140×270 mm označíme (obyčejnou tužkou!) rovnoběžně 2 cm od okraje kratší strany čáru startu, kterou rozdělíme na 5 úseček délky 2 cm, s 0,5 cm mezerami mezi úsečkami a 1 cm mezerou od okrajů papíru. Na úsečky nanese analysované vzorky. Po vysušení nanesených skvrn papír spodním okrajem (blízko čáry startu) ponoříme opatrně do vyvíjecí soustavy (asi 30 ml) na dně kyvety, horní okraj přehneme přes skleněnou tyčinku upevněnou v horní části kyvety. Uzavřenou kyvetu překryjeme černou látkou a vyvíjíme tak dlouho, dokud se čelo vyvíjecí soustavy nepřiblíží na vzdálenost asi 1 cm od ohybu papíru (cca 1 hod.). Pak chromatogram vyjmeme a ihned zakreslíme obrysy oddělených skvrn a jejich barvu.

b) **Vzestupné vyvíjení na kuželové ploše papíru.** Z listu chromatografického papíru vystříháme kruh o poloměru 23 cm, který rozstříháme na 4 čtvrtkruhy. Čáru startu tvoří soustředná kružnice o poloměru o 2 cm menším. Extrakty pigmentů nanášíme na úsečky 2 až 3 cm dlouhé, s mezerami 0,5 až 1 cm. Od konců čáry startu vynecháme po 3 cm. Papír pak stočíme do kužele tak, aby se okraje překrývaly dole šířkou cca 1 cm, spojíme propíchnutím špendlíkem a postavíme do Petriho misky průměru 12 cm, v níž je vyvíjecí soustava. Petriho miska stojí na skleněné desce; miska s kuželem se překryje obráceným skleněným válecm se zabroušeným a vazelínou potřeným okrajem. Vyvíjení se ukončí po cca 1 hod., když čelo vyvíjecí soustavy dosáhlo vzdálenosti asi 2,5 až 3 cm od vrcholu kužele.

c) **Kruhové vyvíjení.** Z chromatografického papíru se vystříhne kruh o průměru 21 cm. Soustředná kružnice o průměru 3 cm tvoří čáru startu, na které lze nanášet extrakty na krátké úsečky (1 až 2 cm) nebo ve tvaru teček. Ve středu papírového kruhu se udělá asi 3 mm otvor, jímž se prostrčí zespodu smotek filtračního papíru. Papír se pak vloží vodorovně mezi zabroušené okraje dvou stejně velkých polovin Petriho misek. Na dně spodní misky stojí miska malého průměru (5–10 cm), v níž je nalita vyvíjecí soustava. Do ní musí dosahovat smotek papíru. Vyvíjecí soustava jím stoupá ke středu papíru a radiálně (v mírném ovalu vzhledem ke směru vláken papíru) postupuje k okraji papíru. Vyvíjení se ukončí po cca 30 minutách, když je čelo rozpouštědlové soustavy asi 0,5 cm od stěny misky.

Způsob a) je spolehlivým způsobem standardním. Při způsobu vyvíjení b) se skvrny pigmentů zužují a zahušťují, což zvýrazňuje oddělení zejména karotenoidů. Při způsobu c) se plocha naopak rozšiřuje a tak málo koncentrované pigmenty se úplně ztrácejí (např. karotenoidy). Postup c) je však velmi rychlý, skvrny jsou poměrně ostře odlišené, kompaktní a bez „ocasů“; proto se hodí tam, kde je třeba určit pouze přítomnost chlorofylů.

Vyvíjecí soustavy: Vyvíjecích soustav byla v literatuře popsána celá řada (viz např. SESTRÁK 1958a); jsou to vesměs kombinace nepolárního rozpouštědla s malým podílem polárního rozpouštědla.

Pro běžnou práci stačí tři soustavy, které poskytují odlišné rozdělení: je výhodné dělit stejné vzorky paralelně ve všech třech soustavách rozpouštědel a výsledky porovnat.

1. Toluen p. a. Chlorofyly zůstanou špatně rozlišené jako dvě zony blízko startu, zato oddělené karotenoidy jsou dobře patrné;
2. toluen-methanol (400 : 1) (modifikovaná soustava podle CHIBY a NOGUCHIHO 1954). Methanol lze nahradit *n*-i isopropanolem. Množství alkoholu v soustavě nesmí být vyšší, než je udáno. Chlorofyly jsou dobře odděleny, ovšem většinou není bezbarvá zóna mezi chlorofylem *a* a *b*. Karotenoidy jsou dobře odděleny;
3. směs podle HAGERA (1955): benzin—benzen—chloroform—aceton—isopropanol (50 : 35 : 10 : : 0,5 : 0,17). Dobře se od sebe oddělí skvrny chlorofylů *a* a *b*, které však většinou překrývají skvrny xanthofylů.

Detekce skvrn: Jednotlivá barviva určujeme vizuálně, podle barvy a polohy (od čela rozpouštědla): směsná skvrna karotenů (oranžově žlutá); feofytiny (šedoolivová, málo výrazná skvrna, vznikající z chlorofylů destrukcí kyselinami); 3 až 4 skvrny xanthofylů — postupně oxydovanější typy (barvy žluté, oranžově žluté i červené a purpurově červené); chlorofyl *a* (modrozelený); chlorofyl *b* (žlutozelený); na startu chlorofylidy a další deriváty chlorofylů rozpustné ve vodě i přídatná hydrofilní barviva (fykobiliny a anthokyany), pokud zbyly v etherovém roztoku po promývání vodou. Polohu karotenoidů je třeba ihned zakreslit, protože některé se na vzduchu rychle destrukují a už 1/2 hod. po skončení vyvíjení nejsou zřetelné. Chlorofyly a jejich deriváty lze určit podle červenofialové fluorescence pod ultrafialovým zářením (lampa Phylora s Woodovým sklem) — jsou takto zřetelné i po vyblednutí barvy.

Přesné určení a kvantitativní analýsa pigmentů: Podle polohy skvrn lze jen hrubě určit, k jakému typu xanthofylů pigmenty ve skvrnách patří. Chceme-li

určit karotenoidy přesně, podle absorpčních spekter, musí se na tlustém papíře (Whatman č. 3) rozdělit velké množství extraktu (mnoho skvrn), z vystřižených částí papíru se skvrnami vylouvat pigmenty hexanem a stanovit jejich spektrální křivku spektrofotometricky. Toto stanovení se musí dělat opatrně, v atmosféře dusíku. Chceme-li se ovšem podrobněji věnovat spektrofotometrickému stanovení karotenoidů, je výhodnější použít chromatografie na sloupci adsorbentu.

Chlorofyly pro kvantitativní kolorimetrické stanovení eluujeme z vystřižených skvrn etherem nebo acetone.

Pokusný materiál

Jako materiál sloužily kultury na agaru i ve vodném prostředí ze Sbírkky kultur autotrofních organismů ČSAV, vedené akad. S. Prátem (vide PRÁT 1948). Kultury laskavě připravovaly prom. biol. J. Dvořáková a M. Baslerová. Kultury byly analysovány v několika pokusných sériích v letech 1958 až 1961. Byly to kultury (vpravo uvedeno sbírkové číslo — viz BASLEROVÁ a DVOŘÁKOVÁ 1962):

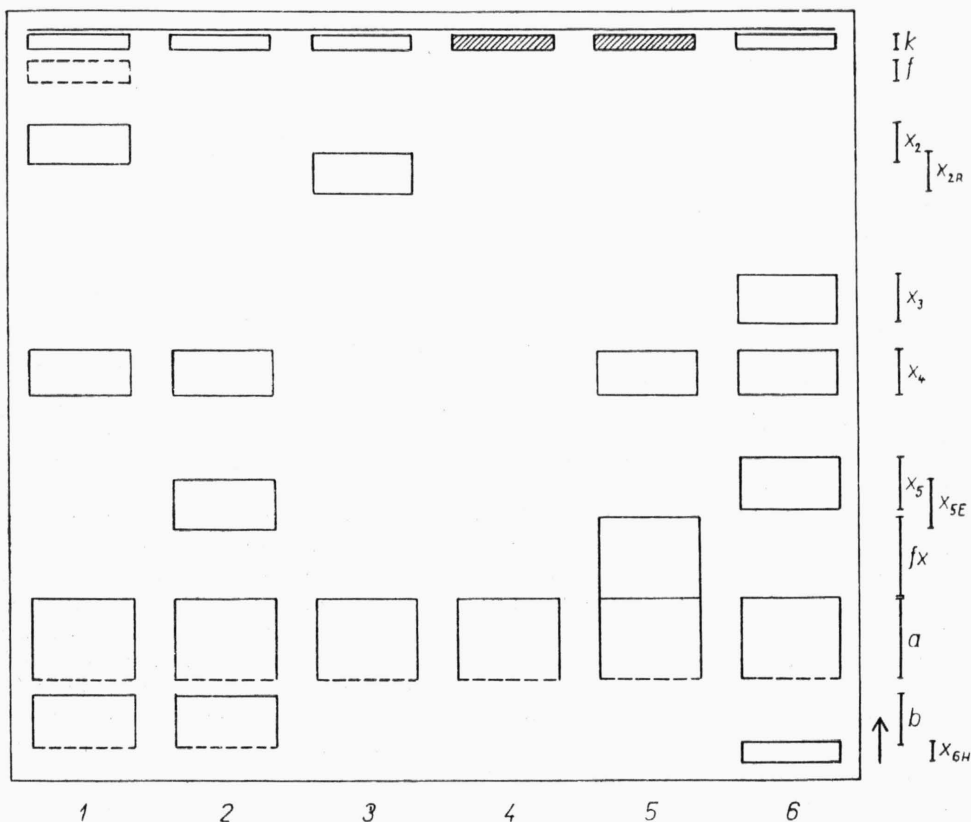
<i>Anabaena cylindrica</i> LEMM.	C 373
<i>Botrydiopsis alpina</i> VISCHER	A 294
<i>Botrydiopsis intercedens</i> VISCHER et PASCHER	A 12
<i>Calothrix</i> sp.	C 377
<i>Chlamydomonas agloeiformis</i> PASCHER	A 34
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> CHICK	A 82
<i>Chlorella vulgaris</i> var. <i>viridis</i> CHODAT	A 87
<i>Chlorocloster engadinensis</i> VISCHER	A 296
<i>Chlorococcum humicolum</i> (NAEG.) RAB.	A 90
<i>Cryptomonas ovata</i> EHRENB.	A 291
<i>Dunaliella salina</i> TEODORESCO	A 281a
<i>Euglena gracilis</i> KLEBS	A 259a
<i>Haematococcus pluvialis</i> FLOTOW et WILLE	A 63
<i>Heterococcus caespitosus</i> VISCHER	A 6
<i>Heterococcus crassulus</i> VISCHER	A 306
<i>Heterothrix solida</i> VISCHER	A 214
<i>Mesotaenium caldarium</i> HANSG.	A 225
<i>Muriella decolor</i> VISCHER	A 118
<i>Nephrodiella brevis</i> VISCHER	A 297
<i>Oocystis pusilla</i> HANSG.	A 213
<i>Pleurochloris magna</i> BOYE-PETERSEN	A 316
<i>Pleurochloris meiringensis</i> VISCHER	A 386
<i>Porphyridium aeruginosum</i> (kmen od O. Starra, Indiana University, Bloomington, USA)	
<i>Porphyridium cruentum</i> (AG.) NAEG.	A 126
<i>Vaucheria</i> sp.	A 374

Nárost rozsivek, prakticky bez znečištění řasami z jiných taxonomických skupin, vyrostly na betonovém podkladě v Pražské kanalisaci a čistírně odpadních vod v Praze 6, Papírenská 6, mi poskytl prom. biol. J. Popovský.

Výsledky pokusů a diskuse

Výsledky získané na 107 chromatogramech, jsou schematicky shrnuty na obr. 2, který ukazuje nalezené rozdíly mezi řasami z různých taxonomických skupin.

U všech studovaných druhů řas z kmene *Chlorophyta* byly nalezeny pigmenty stejného typu jako jsou u vyšších rostlin. Velmi podobné složení pigmentů má *Euglena gracilis*, která se od zelených řas lišila nepřítomností xanthofylu typu luteinu (x_2), zato obsahovala vysoce oxydovaný xanthofyl.



Obr. 2. — Schematické znázornění chromatogramu, ukazujícího nalezené složení pigmentů u různých taxonomických skupin řas: 1 — Chlorophyta (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Mesotaenium*, *Muriella*, *Oocystis*); 2 — Euglenophyta (*Euglena*); 3 — Rhodophyta (*Porphyridium*); 4 — Cyanophyta (*Anabaena*, *Calothrix*); 5 — Diatomeae; 6 — Heterokontae (*Botrydiopsis*, *Heterococcus*, *Heterothrix*, *Pleurochloris*, *Vaucheria*). Stupnice vpravo ukazuje jednotlivé typy pigmentů: k — karoteny (u 4 — Cyanophyta a 5 — Diatomeae oranžově červeně zbarvené — zřejmě výhradní přítomností β -karotenu); f — feofytiny (zakresleny jen u 1. skupiny řas); x₂ — xanthofyly typu luteinu (se 2 atomy kyslíku v molekule); x_{2R} — specifický xanthofyl u *Porphyridium*; x₃ — oranžově žlutý xanthofyl *Heterokontae* (nenalezen u *Heterothrix* a *Pleurochloris*); x₄ — xanthofyly typu violaxanthinu; x₅ — specifické xanthofyly *Heterokontae*; x_{5E} — specifické xanthofyly u *Euglena*; fx — fukoxanthin; a — chlorofyl a; b — chlorofyl b; x_{6H} — specifický xanthofyl *Heterokontae*.

Abb. 2. — Schematische Darstellung des Chromatogramms, welches die ermittelte Pigmentzusammensetzung bei verschiedenen Algenarten darstellt: 1 — Chlorophyta (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Mesotaenium*, *Muriella*, *Oocystis*); 2 — Euglenophyta (*Euglena*); 3 — Rhodophyta (*Porphyridium*); 4 — Cyanophyta (*Anabaena*, *Calothrix*); 5 — Diatomeae; 6 — Heterokontae (*Botrydiopsis*, *Heterococcus*, *Heterothrix*, *Pleurochloris*, *Vaucheria*). Die Skala rechts zeigt die einzelnen Pigmenttypen: k — Carotine (bei 4 — Cyanophyta und 5 — Diatomeae orangetot gefärbt — wahrscheinlich durch die ausschliessliche Gegenwart von β -Carotin); f — Phaephytine (nur bei der ersten Algengruppe eingezeichnet); x₂ — Xanthophylle des Typs Lutein (mit 2 Sauerstoffatomen im Molekül); x_{2R} — spezifisches Xanthophyll bei *Porphyridium*; x₃ — orangegelbes Xanthophyll der *Heterokontae* (ist bei *Heterothrix* und *Pleurochloris* nicht gefunden worden); x₄ — Xanthophylle des Typs Violaxanthin; x₅ — spezifische Xanthophylle der *Heterokontae*; x_{5E} — spezifische Xanthophylle bei *Euglena*; fx — Fucoxanthin; a — Chlorophyll a; b — Chlorophyll b; x_{6H} — spezifisches Xanthophyll der *Heterokontae*.

Xanthofyly se 2 atomy kyslíku v molekule, které pro *Euglenophyta* uvádí GOODWIN (1955), nebyly nalezeny. STRAIN (1958) zjistil u *Euglena* chromatografií na sloupci dva xanthofyly, z nichž i méně adsorbovaný byl více adsorbován než zeaxanthin nebo jiné xanthofyly se 2 kyslíkovými atomy v molekule. To souhlasí s výsledky mých pokusů.

U řas z dalších studovaných kmenů nebyl nalezen jiný chlorofyl, než chlorofyl *a*. Chlorofyl *c*, uváděný u rozsivek řadou autorů (viz např. STRAIN 1951), se nepodařilo zjistit.

U ruduch z rodu *Porphyridium* byl zjištěn oranžově žlutý xanthofyl, podle adsorpčních vlastností xanthofyl se 2 atomy kyslíku v molekule. Podle STRAINA (1958) jde o zeaxanthin; to souhlasí s údaji JENSENA a JENSENA (1959) o větší adsorbovatelnosti zeaxanthinu než luteinu. V souhlase se STRAINEM (1958) jsem u rodu *Porphyridium* nenalezl chlorofyl *d*.

Skvrna karotenů u analysovaného vzorku rozsivek byla charakteristicky oranžové barvy, což svědčí o přítomnosti převážně β -karotenu. Kromě skvrny fukoxanthinu se oddělila ještě skvrna xanthofylu typu violaxanthinu.

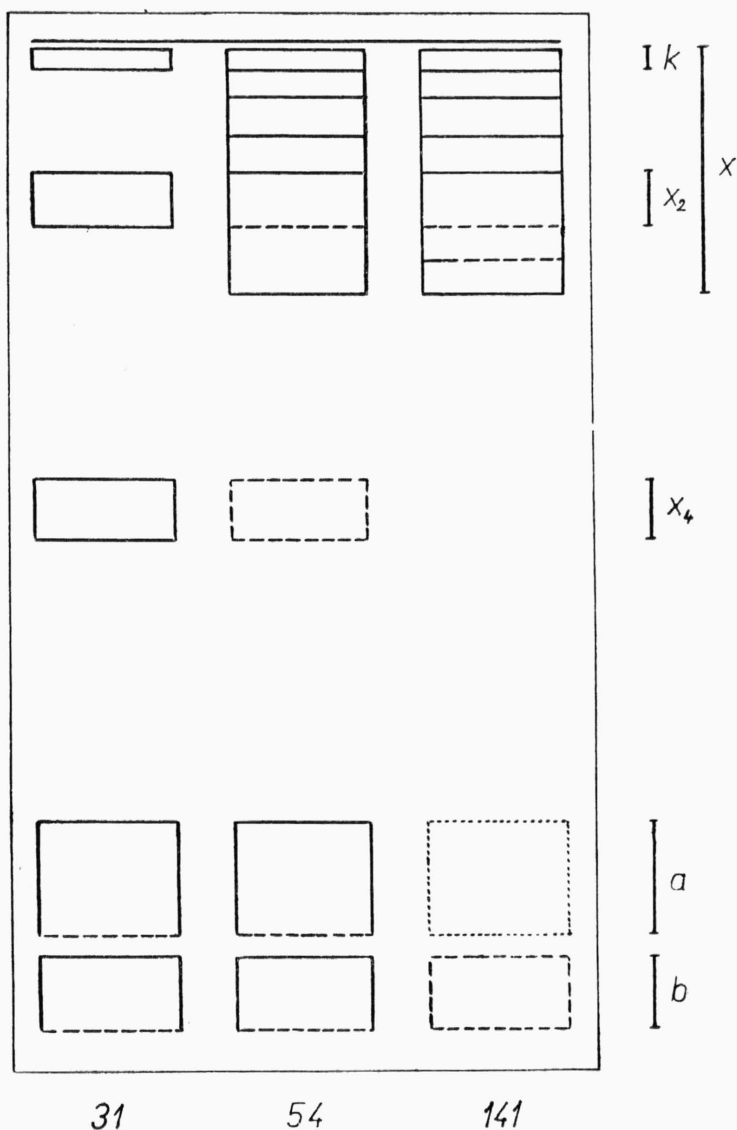
U obou studovaných sinic (*Anabaena*, *Calothrix*) nebyly kromě oranžové skvrny karotenu (podle STRAINA 1958 i GOODWINA 1955 výhradně β -karoten) nalezeny další karotenoidy; na některých chromatogramech byla těsně pod skvrnou karotenu slabá skvrna snad některého málo oxydovaného xanthofylu.

U studovaných heterokontních řas byly zjištěny 4 skvrny xanthofylů. Nejméně adsorbovaný xanthofyl byl oranžově žlutý a nebyl přítomen ve všech analysovaných druzích (chyběl u *Heterothrix solida* VISCHER a u *Pleurochloris magna* BOYE-PETERSEN). Prostřední xanthofyl připomíná svými vlastnostmi violaxanthin. Třetí xanthofyl netvořil směsnou skvrnu při současném vyvíjení s extrakty z jiných typů řas. Poslední žlutohnědý pigment tvořil úzkou zonu blízko startu. Sledování v ultrafialovém zařízení svědčí pro xanthofyl: pigment fluoreskoval matně žlutě, slabě růžové zbarvení bylo zřejmě způsobeno znečištěním malými množstvími chlorofylu *a*. Při eluci této skvrny a opakované chromatografii se pigment rozkládal. Je velmi pravděpodobné, že jde o 4 dosud nepojmenované xanthofyly, specifické pro heterokontní řasy, jak ostatně dokazuje STRAIN (1958), který změřil i jejich spektra. Analýsy pigmentů z *Vaucheria* sp. potvrdily její příslušnost k heterokontním řasám, kterou v posledních letech prokazovali podle přítomnosti pouze chlorofylu *a* (byť ve dvou vazebně odlišných formách) SAGROMSKY (1957) a RIETH a SAGROMSKY (1959) na základě studia druhů *Vaucheria dichotoma* (LINNÉ) AGARDH. a *V. synandra* WORONIN ze dvou ekologicky i zeměpisně odlišných stanovišť. Stejně xanthofyly jako u zelených řas jsem pozoroval u heterokontní řasy *Chlorocloster engadinensis* VISCHER, která si vyžaduje ještě dalšího studia.

Použitelnost metody papírové chromatografie k taxonomickému studiu se ukázala u řasy *Nephrodiella brevis* VISCHER, která se v literatuře řadí mezi *Heterokontae*. Papírovou chromatografií byla u ní jasně prokázána přítomnost chlorofylu *b* i přítomnost xanthofylů typických pro zelené řasy.

Nejméně informací je v literatuře o pigmentech řas z kmene *Pyrrophyta* (viz GOODWIN 1952). U analysované kultury *Cryptomonas ovata* EHRENB. jsem našel chlorofyl *a*, neidentifikovaný oranžově žlutý xanthofyl a karoten.

Podrobnějšího studia by si zaslouhovaly změny složení pigmentů během ontogenetického vývoje řas, při stárnutí kultury. Snad by se tak vysvětlila občasná přítomnost silně adsorbovaného xanthofylu, pravděpodobně se 6 atomy



Obr. 3. — Vliv stárnutí kultury na složení pigmentů u *Haematococcus pluvialis* FLOTOW et WILLE. Stáří kultury ve dnech označeno pod schematickým nákresem. První dvě kultury pěstovány v tekutém médiu, poslední na agaru. Označení typů pigmentů (vpravo) jako na obr. 2, x — značí směs karotenoidů — žlutého, oranžového až červenofialového zbarvení.

Abb. 3. — Einfluss des Alterns der Kultur auf die Pigmentzusammensetzung bei *Haematococcus pluvialis* FLOTOW et WILLE. Das Alter der Kultur in Tagen ist unter der schematischen Zeichnung angegeben. Die ersten 2 Kulturen wurden auf flüssigem Medium, die letzte auf Agar kultiviert. Die Bezeichnung des Pigmenttyps (rechts) wie in Abb. 2, x — bedeutet ein Gemisch von Carotinoiden gelber, orange bis rotvioletter Färbung.

kyslíku v molekule, kterou jsem zjistil u několika zelených řas (*Chlorococcum*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Mesotaenium*, *Oocystis*). Jde zřejmě o neoxanthin nebo jemu podobný xanthofyl.

Zajímavé změny byly pozorovány během stárnutí kultury *Haematococcus pluvialis* FLOTOW et WILLE (viz obr. 3). V kultuře staré 31 dní byly všechny buňky zelené, složení pigmentů bylo stejné jako u jiných druhů zelených řas. Po 54 dnech lze už pod mikroskopem zjistit postupné červenání chloroplastu, xanthofyl x_4 se ztrácí, xanthofyl x_2 a karoten začíná překrývat několik žlutých až červenofialových karotenoidů, které konečně u staré kultury převládnou. U staré kultury zmizely i chlorofyly, zejména i chlorofyl *a*. Chloroplasty této kultury jsou již zcela červené.

Na příkladu řasy *Haematococcus pluvialis* FLOTOW et WILLE lze ukázat, že rozpor mezi různými údaji v literatuře o karotenoidech řas (viz GOODWIN 1952) mohou být způsobeny stavem analysované kultury. Podobně chlorofyl *d* byl STRAINEM (1958) nalezen jen u některých druhů ruduch, i v týchž třídách.

Nejasnou otázkou zůstávají také změny pigmentů, zejména karotenoidů, při úšehově extraktů (i za skladování ve tmě při teplotě okolo 0° C). Tak např. u extraktů z řasy *Porphyridium cruentum* (AG.) NAEG. byla hned po připravení extraktu pozorována jen jedna skvrna xanthofylů, pravděpodobně zeaxanthin (viz STRAIN 1958), kdežto 2. a 3. dne byla pozorována ještě další skvrna, svědčící pro xanthofyly typu violaxanthinu. Kromě možnosti přeměn karotenoidů in vitro je ovšem velmi pravděpodobná úplná destrukce některého pigmentu během skladování vzorku a případně i během přípravy extraktu, takže určitý málo koncentrovaný pigment nemusí být při chromatografickém dělení vůbec zjištěn.

Pigmenty řas a dynamika jejich výskytu jsou oblastí dosud poměrně málo prozkoumanou a zasloužily by si větší pozornosti. Není pochyby, že podrobné studium pigmentového složení řas vyjasní i mnoho taxonomických otázek v algologii.

Souhrn

Metoda papírové chromatografie plastidových pigmentů umožňuje rychlé orientační stanovení přítomnosti chlorofylů a karotenoidů, které lze použít jako významný znak v algologii. Proto jsou podrobně popsány způsoby přípravy extraktu pigmentů řas, techniky vyvíjení chromatogramů (vzestupné vyvíjení na obdélníkové a kuželové ploše, horizontální kruhové vyvíjení), vhodné rozpouštědlové soustavy (toluen; toluen-methanol v poměru 400 : 1 a HAGEROVA směs) a způsoby detekce oddělených pigmentů. Pigmentové složení dvou druhů řas lze srovnat na jednom chromatogramu nanesením oddělených skvrn extraktů z jednotlivých druhů a jejich směsné skvrny. Uvádí se výsledky analýs 25 druhů řas, patřících mezi *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Cyanophyta*, *Diatomeae* a *Heterokontae*. Byla potvrzena příslušnost rodu *Vaucheria* mezi *Heterokontae*. U druhu *Nephrodiaella brevis* VISCHER, řazeného dosud mezi heterokontní řasy, byl nalezen chlorofyl *b* a xanthofyly shodné s xanthofyly zelených řas. U druhu *Haematococcus pluvialis* FLOTOW et WILLE byly sledovány změny pigmentového složení při stárnutí kultur a červénání chloroplastů.

Poděkování: Za cenné rady v otázkách algologických co nejsrdečněji děkuji prof. dr. B. Fottovi.

Literatura

- ANDERSON, J. M. (1960): Centrifugally accelerated paper chromatography of chloroplast pigments. — *J. Chromatog.* 4: 93–98.
- ANGAPINDU, A., SILBERMAN, H., TANTIVATANA, P. et KAPLAN, I. R. (1958): The separation of chlorophylls by paper and cellulose column chromatography. — *Arch. Biochem. Biophys.* 75: 56–68.
- BASLEROVÁ, M. et DVOŘÁKOVÁ, J. (1962): *Algarum, Hepaticarum, Muscorumque in culturis collectio*. — ČSAV, Praha. 59 p.

- BLOSS, U., ANDERSON, J. M. et CALVIN, M. (1959): Biosynthesis and possible functional relationships among the carotenoids; and between chlorophyll a and chlorophyll b. — *Plant Physiol.* 34 : 329—333.
- BLAAUW-JANSEN, G. (1954a): Chlorophyllide, the probable precursor of a growth inhibitor. — *Nature* 174 : 312—313.
- (1954b): On the light-induced transformation of chlorophyllide into a growth inhibiting substance. — *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetenschap. Amsterdam, Ser. C.* 57 : 498—506.
- BROWN, W. G. (1939): Micro separations by chromatographic adsorption on blotting paper. — *Nature* 143 : 377—378.
- BRZESKI, W. et RÜCKER, W. (1960): Biosynthesis of chlorophylls a and b in *Chlorella vulgaris*. — *Nature* 185 : 922—923.
- CHIBA, Y. et NOGUCHI, I. (1954): A new method of paper chromatography of chlorophylls. — *Cytologia* 19 : 41—44.
- DOUGHERTY, E. C., et ALLEN, M. B. (1960): Is pigmentation a clue to protistan phylogeny? — In: *Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems*. (New York). Pp. 129—144.
- DOUIN, R. (1954): Pigments des *Anabaena* endophytes des *Cycas*. — *Compt. Rend. Séanc. Acad. Scie. (Paris)* 239 : 76—78.
- EPSTEIN, S. S. et WEISS, J. B. (1960): The extraction of pigments from *Euglena gracilis*. — *Biochem. J.* 75 : 247—250.
- GOODWIN, T. W. (1952): The comparative biochemistry of the carotenoids. — (London).
- GOODWIN, T. W. (1955): Carotenoids. — In: *Modern methods of plant analysis*. (Berlin—Göttingen—Heidelberg). Vol. III. Pp. 272—311.
- GRANICK, S. (1953): Chlorophyll and photosynthesis. — *Chem. Eng. News* 31 : 748—751.
- HAGER, A. (1955): Chloroplasten-Farbstoffe, ihre papierchromatographische Trennung und ihre Veränderungen durch Aussenfaktoren. — *Z. Naturforsch.* 10b : 310—312.
- HARDER, R. et KOCH, W. (1954): Über die Plastidenfarbstoffe von *Pedinomonas (Protochloroides)*. — *Arch. Mikrobiol.* 21 : 1—3.
- HUZIŠIGE, H., TERADA, T., NISHIMURA, M. et UEMURA, T. (1957): Effect of amino acids and streptomycin on the chlorophyll formation in *Euglena*. — *Biol. J. Okayama Univ.* 3 : 209 to 222.
- JENSEN, A. et JENSEN, S. L. (1959): Quantitative paper chromatography of carotenoids. — *Acta Chem. Scand.* 13 : 1863—1868.
- KYLIN, H. (1927): Über die karotinoiden Farbstoffe der Algen. — *Z. physiol. Chemie* 166 : 39—77.
- OSAWA, Y. (1957): Conical paper chromatography. — *Nature* 180 : 705.
- PRÁT, S. (1948): *Algarum, Hepaticarum, Muscorumque* in culturis collectio. Plantarum physiologiae institutum Universitatis Carolinae. — *Preslia* 22—23 : 1—12.
- RIETH, A. et SAGROMSKY, H. (1959): Untersuchungen an *Vaucherien* halophiler Standorte des Neapeler Gebietes. — *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 31 : 90—97.
- SAGROMSKY, H. (1957): Chlorophyllbestimmungen an zwei *Vaucheria*-Arten. — *Ztschr. Naturforsch.* 12b : 684—687.
- ŠESTÁK, Z. (1958a): Paper chromatography of chloroplast pigments. — *J. Chromatog.* 1 : 293 to 308.
- (1958b): Kvantitativní stanovení chlorofylu v řasách a sinicích. — *Preslia* 30 : 138—145.
- STRAIN, H. H. (1951): The pigments of algae. In: *Manual of phycology*. (Waltham, USA). — Pp. 243—262.
- STRAIN, H. H. (1958): Chloroplast pigments and chromatographic analysis. — (University Park, USA).
- TSWETT, M. (1906): Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. — *Ber. Dtsch. bot. Gesell.* 24 : 384—393.

Zdeněk Š e s t á k :

Die Anwendung der Papierchromatographie der Chlorophyle und Carotinoide in der Algologie

Institut für experimentelle Botanik, Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften, Prag 6

Es ist vorteilhaft, beim Studium der Pigmentzusammensetzung, welche ein wichtiges Bestimmungsmerkmal der Algen ist, die Papierchromatographie

anzuwenden, da diese schneller und weniger mühsam als die Methode des chromatographischen Teilens auf einer Adsorbentsäule ist. Sie ergibt auch besser vergleichbare Ergebnisse bei cca 10mal kleinerer Materialmenge.

Die Pigmente werden aus den Algen nach Zerreiben mit Sand (ŠESTÁK 1958b) mit Azeton extrahiert, dann werden sie in eine Ätherlösung überführt. Diese wird mit Hilfe eines Kapillarpipettchens am Start des chromatographischen Papiers (Whatman Nr. 1 oder 3) aufgetragen. Die Pigmentzusammensetzung von zwei Algenarten kann auf einem Chromatogramm durch Auftragen von getrennten Flecken der Extrakte aus den einzelnen Arten und des Fleckes der Mischung beider verglichen werden. Da die Vollkommenheit der Teilung von der Pigmentmenge, die auf einer Längeneinheit des Fleckes am Start des Papiers aufgetragen wird (beim Papier Whatman Nr. 1 2 bis 5 μg Chlorophyll auf 1 cm der Flecklänge, bei Whatman Nr. 3 5 bis 10 μg), abhängig ist, ist es vorteilhaft, vor dem Auftragen die Pigmentkonzentration im Extrakt festzustellen (siehe Abb. 1). Die Chromatogramme werden aufsteigend auf rechteckigem Papier oder auf einer Kegelfläche (OSAWA 1957) oder mit Hilfe der Horizontal-radial-Technik entwickelt. Es werden Toluol, ein Gemisch von Toluol-Methanol (oder Propanol) im Verhältnis 400 : 1 oder das Gemisch nach HAGER (1955): Benzin — Benzen — Chloroform — Azeton — Isopropanol (im Volumenverhältnis 50 : 30 : 10 : 0,5 : 0,17) angewendet.

In den eigentlichen Versuchen wurden 25 Algenarten untersucht, die zu den *Chlorophyten*, *Euglenophyten*, *Rhodophyten*, *Cyanophyten*, *Diatomeen* und *Heterokonten* gehören und aus der Sammlung von Kulturen autotropher Organismen der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften in Prag (ihr Verzeichnis ist auf S. 128) stammten, und eine Probe eines Diatomeenaufwuchses von einer natürlichen Lokalität. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abb. 2 zu sehen. Bei Grünalgen wurden Pigmente gleichen Typs wie bei höheren Pflanzen gefunden. Bei *Euglena* wurde ausser einem Xanthophyll des Typs Violaxanthin ein hoch oxydiertes Xanthophyll gefunden. Das orangegelbe Xanthophyll der Gattung *Porphyridium* ist wahrscheinlich Zeaxanthin (nach STRAIN 1958). Bei beiden untersuchten Blaualgen wurde significant nur β -Carotin und Chlorophyll *a* festgestellt. Bei den *Diatomeen* wurde Chlorophyll *a*, Fucoxanthin, ein Xanthophyll des Typs Violaxanthin und β -Carotin gefunden. Von den vier Xanthophylltypen der *Heterokontae* ist der am wenigsten oxydierte Typ orangegelb gefärbt; dieser wurde nicht bei *Heterothrix solida* VISCHER und *Pleurochloris magna* BOYE-PETERSEN festgestellt. Zwischen dem Start und dem Chlorophyll *a* — Fleck wurde bei den *Heterokonten* ein am stärksten adsorbiertes gelbes Pigment, eher ein Xanthophyll mit 6 Sauerstoffatomen im Molekül als ein Pigment des Chlorophylltyps gefunden. Bei *Cryptomonas ovata* EHRENB. fand ich Chlorophyll *a*, ein nicht identifiziertes orangegelbes Xanthophyll und Carotin.

Beim Altern von einigen Algenkulturen veränderte sich wesentlich deren Pigmentzusammensetzung. Bei einer 31, 54 und 141 Tage alten Kultur der Grünalge *Haematococcus pluvialis* FLOTOW et WILLE verschwanden nach und nach die Chlorophylle (zuerst Chlorophyll *a*) und das Xanthophyll des Typs Violaxanthin; Carotin und das Xanthophyll des Typs Lutein wurden durch eine bunte Skala von gelben, orangefarbigem bis rotvioletten Carotinoiden überdeckt (siehe Abb. 3).