

Jihočeská univerzita  
Biologická fakulta  
katedra fyziologie rostlin

MAGISTERSKÁ PRÁCE

PROBLEMATIKA GAMETOGENEZE ZELENÉ  
CHLOROKOKÁLNÍ ŘASY

*SCENEDESMUS OBLIQUUS*

JANA BARBORKOVÁ

ČESKÉ BUDĚJOVICE 1997

PROBLEMATIKA GAMETOGENEZE ZELENÉ  
CHLOROKOKÁLNÍ ŘASY  
SCENEDESMUS OBLIQUUS

Magisterská práce Biologické fakulty Jihočeské univerzity

Vedoucí práce: RNDr. Jaromír Lukavský

Prohlašuji, že jsem vypracovala předloženou práci samostatně,  
pouze s použitím literatury uvedené v seznamu.

V Českých Budějovicích 22.4. 1997

*Barbora*

# OBSAH

I. Úvod .....	1
1.1 Obecná charakteristika druhu <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	2
1.2 Obecné poznatky o pohyblivých buňkách zelených řas ...	4
1.3 Morfologická variabilita .....	4
1.4 Gametogeneze u zelených řas .....	4
1.5 Buněčný cyklus .....	6
1.6 Proces synchronizace buněčné kultury .....	13
1.7 Cíl práce .....	14
II. Materiál a metody .....	15
2.1 Kultivační aparatura .....	15
2.2 Použité kmeny řasy <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	15
2.3 Podstata indukce buněčného dělení .....	17
2.4 Užité živné roztoky .....	17
2.5 Použité postupy .....	18
2.6 Strategie experimentu .....	19
III. Výsledky .....	22
3.1 Výsledky pokusu č. 1 .....	23
3.2 Výsledky pokusu č. 2 .....	24
3.2.1 Vyhodnocení vzorků z pokusu č. 2 pomocí elektronové mikroskopie .....	31
3.3 Výsledky pokusu č. 3 .....	41
IV. Diskuze .....	49
V. Závěr .....	51
VI. Literatura .....	54

# I. ÚVOD

Více než jedno století bylo bičíkaté stádium u rodu *Scenedesmus* zcela neznámé, až dosud se totiž věřilo, že existuje jen jeden způsob rozmnožování a to nepohlavním způsobem tvorby autospor. Před třiceti lety pozoroval jako první TRAINOR (1963) pohyblivé buňky této řasy *Scenedesmus obliquus*, které označil jako zoospory. Později však u tohoto druhu izolovali TRAINOR; BURG (1965 a) plus a minus ( $mt^+$  a  $mt^-$ ) typ buněk, které se chovaly jako gamety. LUKAVSKÝ (1991) první pozoroval bičíkaté buňky *Scenedesmus obliquus* v malé venkovní kultivační jednotce. Nedávno potvrdili opět HINDÁK; TRAINOR (1995), že existuje bičíkaté stadium u dvou kmenů *Scenedesmus obliquus*. Počet buněk produkující zoospory řasy *Scenedesmus obliquus* značně vzrůstá se vzrůstající světelnou intenzitou a klesající teplotou (TRAINOR, 1965). Zjistilo se, že nepřítomnost dusíku je předpokladem pro produkci zoospor u řasy *Scenedesmus obliquus*. To se též prokázalo i pro jiné chlorokokální řasy jako *Scenedesmus dimorphus* nebo *Coelastrum microsporum* (TRAINOR; BURG, 1965 b). Dnes již tedy není pochybnost o existenci bičíkatých stádií u rodu *Scenedesmus*.

Rod *Scenedesmus* je největší a nejkomplicovanější rod z řádu *Chlorococcales*. Je to jedna z nejběžnějších řas, která se vyskytuje v širokém spektru přírodních podmínek. Představuje velmi rozšířený laboratorní a produkční organismus užívaný ve venkovní masové kultivaci. Na základě ultrastruktury buněčné stěny a obzvláště přítomnosti či nepřítomnosti vnější sporopoleninové vrstvy (KOMÁREK; LUDVÍK, 1972), byl druh *Scenedesmus obliquus* zařazen do skupiny *obliquus* a poté i do samostatného rodu *Acutodesmus* (HEGEWALD, 1978).

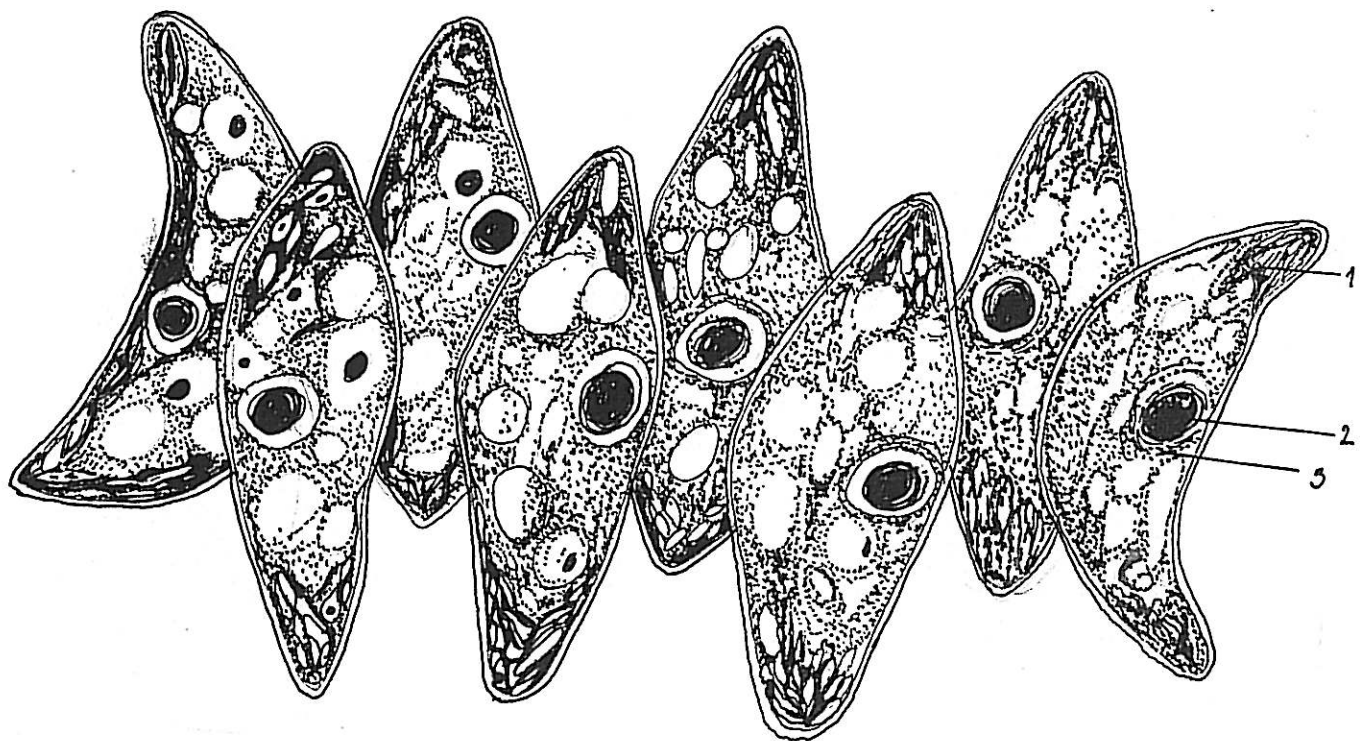
Objev pohyblivých buněk rodu *Scenedesmus* byl tak překvapující, že většina fykologů vážně pochybovala o tomto jevu. Výskyt pohyblivých buněk u rodu *Scenedesmus* byl tak nazván algologickou Lochnesskou nebo Yettim (LUKAVSKÝ, 1991).

## 1.1 Obecná charakteristika druhu *Scenedesmus obliquus*

Řasa *Scenedesmus obliquus* je druh, který se rozmnožuje vegetativně opakovaným dělením na 2, 4, 8 nebo 16 buněk a vytváří rozpadavá dceřiná cenobia při široké variabilitě růstových podmínek. Buňky této řasy mají vřetenovitý tvar a jsou na obou koncích špičaté (obr. 1). Cenobium je sestaveno z ploché dvojité série buněk, které jsou rovnoběžné podle svých dlouhých os (FOTT, 1967). Chloroplasty řasy *Scenedesmus obliquus* obsahují pro fotosyntézu potřebná barviva chlorofyl a + b,  $\alpha$ - a  $\beta$ - karoteny, xanthofyly a pyrenoid. Bílkovinné tělísko pyrenoid obsahuje aktivní enzym 1,5 - ribulózobisfosfát karboxylázu / oxidázu. Povrch pyrenoidu bývá pokryt škrobovými zrny. Povrch chloroplastů pokrývá dvojice obalných membrán. Thylakoidy srůstají po dvou až šesti v lamely. V chloroplastové matrix jsou rozptýleny ostrůvky DNA (nukleoidy). Hlavní zásobní látkou je škrob ( $\alpha$  - 1,4 - glukán) uložený v chloroplastech nebo na povrchu pyrenoidu. Další zásobní látkou jsou polyfosfátová zrnka (volutin) (KALINA, 1994).

Buňky jsou obvykle jednojaderné, mohou však obsahovat i několik jader (LUKAVSKÝ, 1991).

Buněčná stěna řasy je polysacharidová. Její stavby se účastní pevná mikrofibrilární složka a složka amorfni. V malém množství jsou přítomny bílkoviny (extensin) (CONWAY; TRAINOR, 1972). K dalším specifickým látkám patří sporopolenin. Pevná část buněčné stěny se sestává ze svazků submikroskopických mikrofibril, které jsou nejčastěji celulosní ( $\alpha$  - 1,4 - glukán), ale mohou mít i jiné složení, např. mannan, xylan aj. Amorfní složky jsou hemicelulozové nebo pektinové (KALINA, 1994).



Obr. 1. Morfologie zelené chlorokokální řasy *Scenedesmus obliquus*. 1 - chloroplasty, 2 - jádro, 3 - endoplasmatické retikulum. Převzato z PICKET - HEAPS (1975).

## 1.2 Obecné poznatky o pohyblivých buňkách zelených řas

Zelené řasy se vyznačují strukturální a chemickou rozmanitostí buněčných stěn. V nejjednodušším případě jsou buňky bičíkovců, zoospor a gamet nahé, tj. jejich povrch pokrývá pouze plazmatická membrána. U zoospor bývá takový stav přechodný, neboť se po krátké době zoospory oblaní několika vrstvami buněčné stěny (HEGEWALD, 1982). Někteří bičíkovci třídy *Prasinophyceae*, gamety a zoospory třídy *Charophyceae* mají na povrchu submikroskopické šupiny z organického materiálu. Ojedinele se vyskytují šupiny i ve třídě *Ulvophyceae*. Povrch bičíkovců a zoospor ve třídě *Chlamydoephyceae* pokrývá glykoproteinový plášť, obal (chlamys) (KALINA, 1994).

## 1.3 Morfologická variabilita

Rod *Scenedesmus* je známý svými ekomorfami, které byly často popisovány jako samostatné rody. Tento jev je způsoben měnicími se podmínkami na téže lokalitě (KALINA, 1994). Morfologická variabilita rodu *Scenedesmus* byla studována v laboratorních pokusech. Produkce různých druhů coenobií a jednobuněčných stadií byla výsledkem koncentrace buněk, různého pH a složení živného roztoku (EGAN, P. F.; TRAINOR, F. R. (1989); SWALE, 1967). Přesto však nevnesl laboratorní výzkum jednotný princip do problematiky zohledňující stimulaci vývoje morfologické formy jednobuněčného stadia. TRAINOR (1979) předpokládá, že produkce jednobuněčných formací může být jen laboratorním artefaktem.

## 1.4 Gametogeneze u zelených řas

Po vyčerpání živných látek z roztoku se buňky začínají pohlavně rozmnožovat (ZACHLEDER, 1972). Diferenciace buněk z vegetativního stavu do stavu gamet je závislá na světle (ISHIURA, 1976). V poslední době se prokázalo, že se gamety

u některých druhů řas (*Chlamydomonas*) tvoří i v přítomnosti dusíkatého zdroje. V tomto případě má přítomnost amonného iontu podstatný vliv na počátek gametogeneze tím, že působí na gen, který zabezpečuje syntézu specifických gametických komponent (TRAINOR a kol., 1988). Proces gametogeneze začíná, jestliže množství amonného iontu klesne pod určitou hladinu (TOMSON; DEMETS, 1989). Při kultivaci na agarových plotnách dochází k procesu gametogeneze po 5 až 6 dnech od počátku kultivace (MARTIN; GOODENOUGH, 1975). Palmelové stádium nemůže být klasifikováno jako pohlavní stádium, neboť buňky nemají bičíky, které jsou důležité při pohlavním procesu nejen u zelených řas (MITCHINSON, 1971). Začátek gametického cyklu lze sledovat, jestliže se kultura zalije čerstvým živným roztokem za jednu až dvě hodiny se buňkám vytvoří bičíky a jsou pohlavně aktivní (*Prasinophyceae, Chlamydoephyceae*). V roztoku však musí být přítomen nitrát ve vhodné formě (GAVIS a kol., 1979). Gamety se diferencují ve vegetativní buňky, které se začínají opět dělit. Pouze když kulturu buněk zalijeme roztokem obsahující inhibitor proteinové syntézy, palmelová stádia se změní na buňky s pohlavní aktivitou (ISHIURA, 1976). Naproti tomu kultury buněk zalité roztokem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 mM) nejsou schopné vstoupit do pohlavního cyklu. Bičíky se jim sice vyvinou, ale buňky zůstávají pohlavně inaktivní. Existuje domněnka, že amonné ionty selektivně blokují expresi gametických proteinů zelených řas (GERLOFF; FISHBECK, 1979). Bičíky gamet, oproti vegetativním buňkám, jsou schopny se spojit s bičíky opačného pohlavního typu, protože v bičíkové membráně jsou přítomny adhezivní molekuly (BERGMAN a kol., 1976). Bylo zjištěno, že pohlavní přilnavost gamet není konstantní, ale je ovlivněna několika vnitřními a vnějšími faktory jako jsou diurnální rytmy v pohlavní aktivitě. S ohledem na organizaci uvnitř buněk, je možné konstatovat, že toto uspořádání může odrážet schopnost přizpůsobit se metabolickým stresům způsobených nedostatkem živných látek. Mimo to, gamety mají nízkou metabolickou aktivitu a mohou přežívat za nepříznivých podmínek řadu měsíců (TOMSON; DEMETS, 1989).



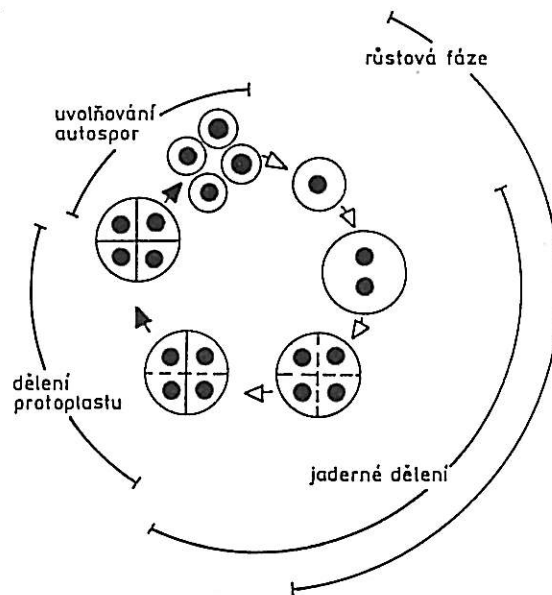
### 1.5 Buněčný cyklus

Zelené řasy mají celou řadu zvláštností, což je nejnápadnější u chlorokokálních řas, kde zcela běžně je i za fyziologických podmínek oddělena karyokineze a cytokineze (a dokonce i replikace DNA). V mateřské buňce dochází k namnožení jader a teprve později se buňka rozdělí na odpovídající počet buněk (simultánní dělení). Tyto buněčné cykly byly označeny jako cykly typu  $C_n$ . Podle toho, na kolik buněk se rozdělí mateřská buňka, tj. zda na  $2^1, 2^2, 2^3, \dots, 2^n$  jsou tyto buněčné cykly rozdělovány na cykly prvního, druhého a třetího, resp.  $n$  - řádu (označují se jako  $C_1, C_2, C_3, \dots, C_n$  cykly). Buněčné cykly typu  $C_n$  jsou jedinečným modelem pro analýzu kauzálního propojení dílčích procesů vedoucích k reprodukci buňky (NEČAS a kol., 1981).

Dosud byly popsány dva základní typy buněčných cyklů řas. První z těchto dvou cyklů se nazývá  $C_1$  a jeho podstatou je rozdělení mateřských buněk řas na dvě dceřiné buňky. Druhý buněčný cyklus se nazývá  $C_n$  a zahrnuje mnoho druhů řas, u nichž buněčný cyklus končí rozdělením mateřské buňky na  $2^n$  dceřiných buněk. I když se takové cykly vyskytují i u jiných organismů (např. u plísňí), jejich výlučné použití pro vegetativní reprodukci buněk v mnoha taxonomických skupinách je zvláštností řas a pro studium cyklů  $C_n$ , nalézáme u řas nejvhodnější modely. Cyklus má řadu modifikací, které se liší regulačními mechanismy buněčného cyklu a vzájemným časovým spřažením jednotlivých následných stupňů replikace na různých genomových, jaderných, organelových a buněčných úrovních (NEČAS a kol., 1981).

U řas, jejichž buněčný cyklus se označuje  $C_n$ , končí buněčný cyklus rozdělením mateřské buňky na  $2^n$  dceřiných buněk, přičemž  $n$  je obvykle větší než 1 buňka. Počet dceřiných buněk je tedy 4, 8, 16, až  $n_{\max}$ . Maximálního počtu dceřiných buněk se dosáhne za optimálních podmínek růstu, kdy buňka roste maximální specifickou růstovou rychlostí. S klesající růstovou rychlostí se zmenšuje počet dceřiných buněk a může eventuálně klesnout na dvě buňky, čímž se cyklus přiblíží cyklu typu  $C_1$ . V praxi je třeba vždy uvažovat průměrný počet dceřiných buněk, neboť se část populace dělí na  $2^n$  buněk, ale část na  $2^{n+1}$  buněk a často bývá zastoupen ještě jeden nebo dva další stupně (NEČAS a kol., 1981).

Cyklus typu  $C_n$  je typický především pro chlorokokální a volvokální druhy řas, u nichž byl také nejpodrobněji studován (obr. 2). Vyskytuje se však také u jiných řádů řas. Lze jej rozlišit na dva další typy: U prvního typu je počet dceřiných buněk poměrně nízký, hodnota  $n$  se pohybuje nejčastěji mezi 2 až 5 a výjimečně nabývá  $n$  vyšších hodnot. Charakteristické pro tento typ cyklu je, že se  $n$  při pomalém růstu snižuje na dvě a v mnoha případech se při velmi pomalém růstu dělí mateřské buňky pouze na dvě dceřiné ( $n = 1$ ). Je zde tedy patrný plynulý přechod k cyklu typu  $C_1$ , což je zvláště významné pro studium povahy cyklů  $C_n$  (NEČAS a kol., 1981).



Obr. 2 Schéma závislosti pochodů buněčného cyklu chlorokokálních a volvokálních řas na osvětlení. Bílé šipky = pochody závislé na světle, černé šipky = pochody nezávislé na světle (NEČAS a kol., 1981).

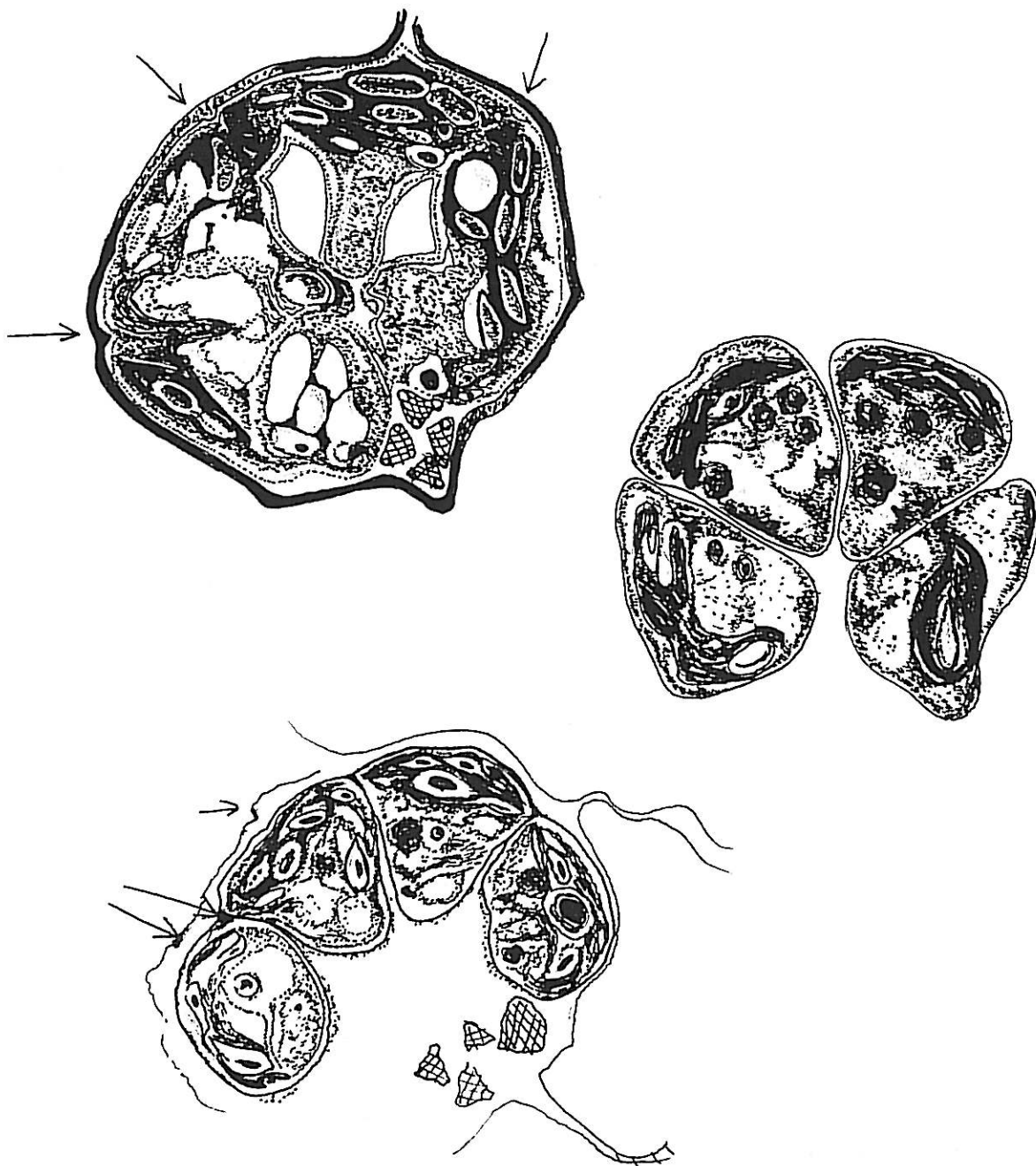
Charakteristickými zástupci druhého typu jsou např. některé koloniální řasy pocházející z čeledi *Volvocaceae* a některé cenobiální řasy z čeledi *Hydrodictyceae* a též rod *Scenedesmus* (obr. 3). Také u těchto řas se hodnota počtu buněk  $n$  mění s podmínkami růstu, ale nesnižuje se pod jistou dolní mez (NEČAS a kol., 1981).

U všech řas, jejichž buněčný cyklus patří k typu  $C_n$ , dojde v průběhu cyklu k  $n$  postupným jaderným dělením a ke stejnému počtu dělení protoplastů buněk. V některých případech následují jednotlivé stupně dělení protoplastu vždy těsně po příslušném stupni jaderného dělení, tj. ještě před následujícím stupněm dělení jader. Jindy se dělení protoplastu začne teprve po skončení všech jaderných dělení, k nimž v daném cyklu dojde. Existují tudíž rozdíly v regulačních vazbách, jimiž jsou spjata jaderná a buněčná dělení (NEČAS a kol., 1981).

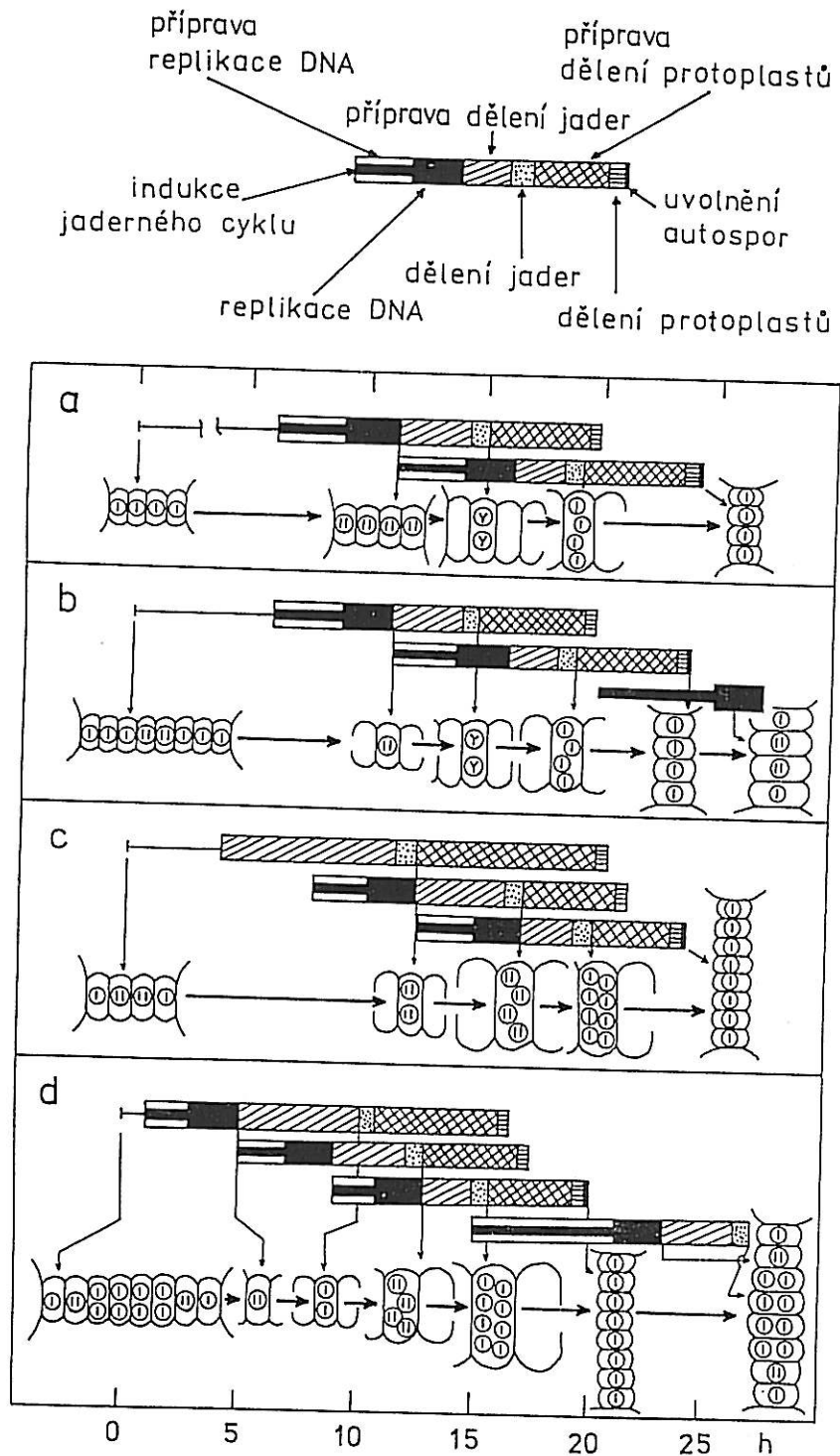
Buněčný cyklus typu  $C_n$  u rodu *Scenedesmus*. Schéma se vztahuje na nejpodrobněji prostudovaný druh *Scenedesmus quadricauda* (obr. 4). Dceřiné buňky z jedné mateřské buňky zůstávají stmeleny a tvoří dvoj-, čtyř- a osmibuněčná cenobia. Dvojibuněčná cenobia se tvoří jen za extrémních podmínek, při vysokých růstových rychlostech však vznikají dvojjaderné dceřiné buňky. Krátkým osvětlením lze indukovat rozdělení jader na dvě bez buněčného dělení; extrémními podmínkami lze indukovat čtyřjaderné buňky. Jádra mohou obsahovat jeden nebo dva genomy, je tedy  $n = 2$  nebo  $3$  pro buněčné dělení,  $1$  až  $4$  pro jaderné dělení a  $1$  až  $5$  pro replikaci genomu. Syntéza DNA začíná záhy v cyklu a má zřetelně několikastupňový charakter; dělení protoplastů začíná po skončení jaderných dělení (cyklus typu  $C_{np}$ ). Variabilita startovních časů jednotlivých dějů se projevuje i v rámci jednoho cenobia, kde vnitřní buňky jsou vždy pokročilejší (u některých klonů jsou to vnější buňky) (NEČAS a kol., 1981).

Pro analýzu cyklů  $C_n$  je závažnou okolností závislost počtu dceřiných buněk na specifické růstové rychlosti buněk. V synchronních populacích závisí počet dceřiných buněk také na době, po níž je populace osvětlena a kdy roste s pozitivní syntetickou bilancí. To se nejnázorněji ukáže, sledujeme-li tzv. indukci buněčného dělení, resp. potenciální počet dceřiných buněk. Jestliže ze synchronní populace rostoucí na světle odebíráme postupně vzorky, které umístíme ve tmě (zbavíme

přísunu energie), zjistíme, že od jistého bodu v cyklu se mohou buňky po uplynutí dostatečně dlouhého času ve tmě rozdělit. V okamžiku, kdy jsme vzorky z populace odebrali, byly v nich již předpoklady pro rozdělení jádra a buňky - bylo v nich indukováno buněčné (jaderné) dělení. V synchronní populaci se po určité době růstu objeví buňky schopné dělení na dvě dceřiné buňky a s postupujícím časem jejich podíl v populaci roste. Na rozdíl od cyklů  $C_1$  dojde v cyklech  $C_n$  s pokračujícím růstem po indukci dělení na dvě dceřiné buňky ( $i_1$ ) k indukci dělení na čtyři dceřiné buňky ( $i_2$ ), dále k  $i_3$ ,  $i_4$  atd. až k  $i_n$ , kde  $n$  je dáno nejvyšším počtem dceřiných buněk, jehož je za daných podmínek růstu schopna. Průběhy indukcí dávají křivky esovitého charakteru, které charakterizují variabilitu generačních dob v populaci. Indukce jednotlivých následných stupňů se ve skutečnosti nezřídka částečně překrývají. (NEČAS a kol., 1981). Schematicky je průběh indukcí v modelovém cyklu znázorněn na grafu 1.

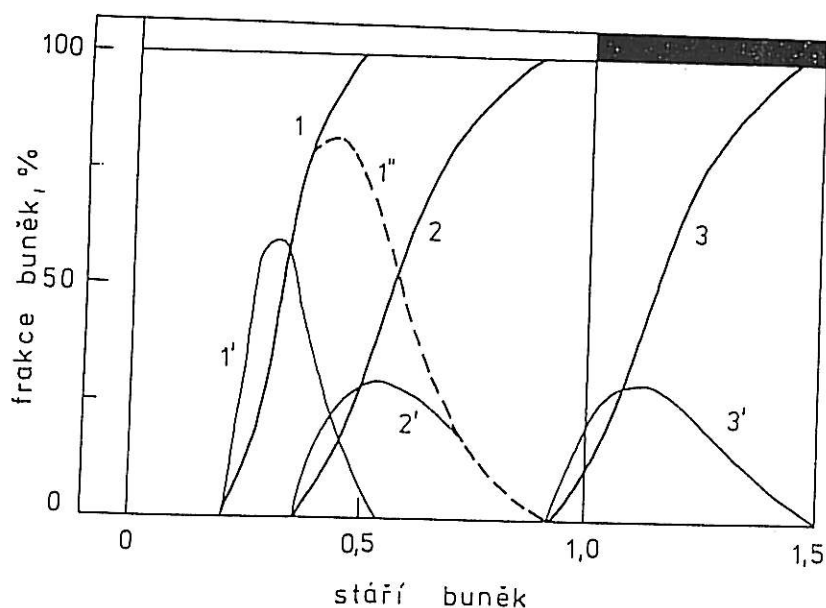


Obr. 3 Postup dělení mateřské buňky řasy *Scenedesmus obliquus* na čtyři dceřiné buňky, které zůstávají po rozdělení spojeny rozích a tak vytvářejí čtyřbuněčné coenobium. Delší šipky ukazují místa, kde dochází k dělení buněk a tvoří se dceřiná buněčná stěna, převzato od PICKET - HEAPS (1975).



Obr. 4 Na obrázku 4 jsou schemata průběhu dějů v buněčných cyklech za různých specifických rychlostí růstu: a)  $u = 0.06 \text{ h}^{-1}$ , z buněk čtyřbuněčných cenobií vznikají opět čtyřbuněčná cenobia. b) a c)  $u = 0.08 \text{ h}^{-1}$ , v populaci existují vedle sebe čtyřbuněčná a osmibuněčná cenobia s jedno - a dvojgenomovými jádry v buňkách na počátku cyklu; znázorněny jsou dva nejčastější vzory, podle nichž probíhají buněčné děje. d)  $u = 0.12 \text{ h}^{-1}$  z osmibuněčných cenobií

vznikají opět osmibuněčná; značné procento dceřiných buněk je dvoujaderné, při cyklu začínajícím dvoujadernou buňkou vzniká dceřiné cenobium se všemi buňkami dvoujadernými. Pásy nad schematickými kresbami buněk znázorňují sled dějů v jednotlivých následných jaderných cyklech; vysvětlení je nad obrázkem. Schematické kresby ukazují pouze vývoj jedné buňky v cenobiu označené šipkou. Kroužky v buňkách jsou jádra, úsečky v jádrech jsou genomy, Y znamená replikující se genom. (NEČAS a kol., 1981).



Graf. 1 Schematické znázornění průběhu indukčních křivek a buněčného dělení v cyklech typů  $C_n$  pro  $n = 2$ . Křivky 1 a 2 sledují průběh indukce dělení na dvě a na čtyři dceřiné buňky. Křivka 1'' ukazuje skutečný podíl buněk v populaci, které se dělí na dvě dceřiné buňky. Dříve, než jejich podíl v populaci dosáhne 100 %, začíná u nejmaturejších buněk indukce dělení na čtyři, která počet pozorovaných dvojic snižuje. Křivky 1' a 2' jsou derivace křivek 1 a 2, které ukazují charakter variability startovních časů indukce v populaci. Křivka 3 sleduje dělení buněk, 3' je její derivace. Bílý a černý pruh nad obrázkem označuje, kdy byla kultura na světle a kdy ve tmě (NEČAS a kol., 1981).

## 1.6 Proces synchronizace buněčné kultury

Synchronní kultura je v ideálním případě soubor buněk, u kterých jednotlivé události buněčného cyklu nastávají vždy současně v celém souboru. Synchronizace lze dosáhnout pomocí synchronizačních metod, které se dělí na dvě základní skupiny:

a) Selektivními metodami se vyčlení z nesynchronní kultury frakce stadií buněk, v určitém stadiu buněčného cyklu;

b) Indukčními metodami se zásahem do průběhu buněčného cyklu převede nesynchronní kultura do stejného stadia. Indukuje se synchronní průběh následujících cyklů. Analýza odchylek od normálního cyklu přináší cenné údaje o příčinných vztazích mezi jednotlivými událostmi cyklu. Při analýze výsledků je však třeba mít na zřeteli, že v reálné synchronizované kultuře neprobíhají události v jednotlivých buňkách simultánně. Příčinou je přirozená variabilita a nedokonalosti synchronizačního postupu (NEČAS a kol., 1981). Je třeba zvláště poznamenat, že u rodu *Scenedesmus* jsou buněčné cykly při průběhu vlastního pokusu nesynchronní. Na základě poměrně vysoké růstové rychlosti se totiž buněčné cykly poněkud překrývají (BERGMAN a kol., 1976).

V současné době se většinou používá následující uspořádání. Nesynchronní kultura se pěstuje při intenzivním osvětlení několik hodin. V následujícím intervalu zatemnění proběhnou pochody nezávislé na světle (to se týká zvláště dělení na dvě nebo více buněk) podle toho, v jakém stadiu cyklu byla mateřská buňka v době prvního osvětlení. Potom následuje druhé osvětlení, během kterého se většina buněk připraví k dalšímu dělení. Doba zatemnění v druhém cyklu je taková, aby se rozdělily i buňky, které nebyly zcela připravené k dělení během předchozího osvětlení. Několik prvních cyklů se vyznačuje nestejnou délkou světelné periody. K ustálení režimu dojde po dvou až čtyřech cyklech (TAMIYA, 1966). Délka světelné periody je dána kultivačními podmínkami (KOMÁREK, 1964). Vhodná perioda cyklu světlo - tma bývá většinou 24 hodin, což naznačuje souvislost s přirozeným denním rytmem. Získaný synchronní materiál má schopnost tvorby autospor. Vhodná perioda cyklu světlo - tma bývá většinou 24 hodin, což naznačuje souvislost s přirozeným denním rytmem (NEČAS a kol., 1981).



Synchronizace buněčných cyklů v našich experimentech proběhla za podmínek střídání světla a tmy v denní periodě 16 : 8. Tento postup se obvykle užívá u všech jednobuněčných nebo jednoduchých cenobiálních typů řas a dále některých rozsivek a sinic (TAMIYA, 1966; MITCHINSON, 1991; DOUCHA a kol., 1976).

Poněkud horší synchronnost vykazuje jaderné dělení. Také počet autospor vzniklých z jedné buňky někdy kolísá (ŠETLÍK a kol., 1972; KOMÁREK; SIMMER, 1965).

### 1.7 Cíl práce

Cílem mé práce je potvrdit existenci zoospor u řasy *Scenedesmus obliquus* a jejich možnou indukci pomocí specifických podmínek.

V případě, že se podaří tento jev doložit, změní se náhled na reprodukci celé skupiny řas *Chlorococcales*. Indukce tvorby gamet by měla též praktický význam v řasové genetice, umožnila by křížení a tím i možnost např. šlechtění nových kmenů, mnohem vhodnějších pro venkovní masovou kultivaci.

## II. MATERIÁL A METODY

### 2.1 Kultivační aparatura

Kultivační aparatura se skládala z těchto základních částí (obr. 5):

- a) kultivační panel s nádrží na vodu
- b) systém rozvodu směsi vzduchu a CO<sub>2</sub>
- c) osvětlovací tělesa a hodinový spínač

ad a) Na dně nádrže s vodou byl umístěn stojan na kultivační nádoby. Vedle vodní nádrže se nacházel ultratermostat s plynule nastavitelnou teplotou, který zabezpečoval udržení stálé teploty vodní lázně. Pro kontrolu teploty vody byl připevněn na stěně nádrže kontaktní rtuťový teploměr.

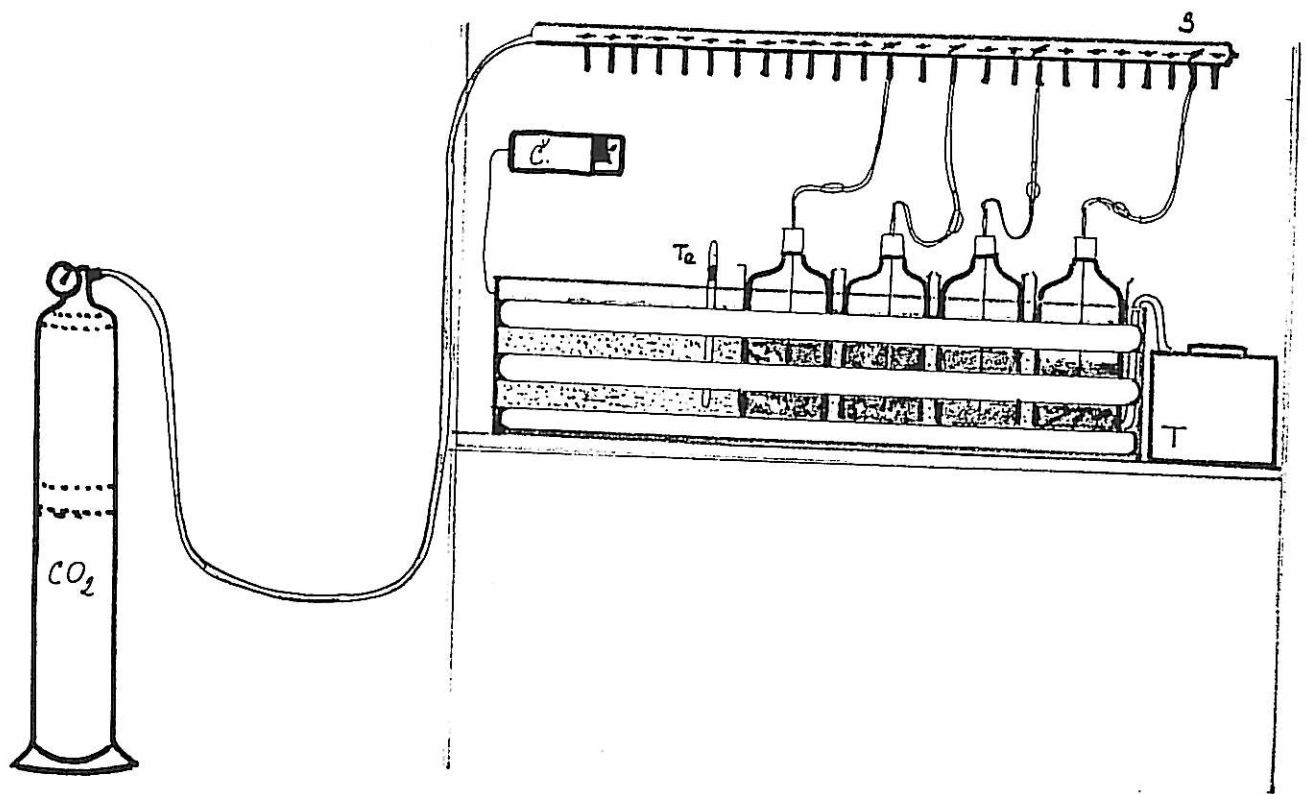
ad b) Pro kultivaci řasové suspenze byl nutný přísun směsi vzduchu a CO<sub>2</sub>. Zdrojem oxidu uhličitého byla tlaková nádoba. Směs vzduchu a CO<sub>2</sub> byla vedena systémem rozvodného zařízení až na regulovatelné výstupy (plynové kohoutky), kam bylo možné připojit hadičky vedoucí přímo do kultivačních nádob.

ad c) Zářivková tělesa (Tungsram F33, cool white) byla umístěna na světelném panelu na přední straně nádrže temperované vodní lázně a připojena na časový spínač, který určoval délku periody světla a tmy.

### 2.2 Použité kmeny řasy *Scenedesmus obliquus*

Zkoumaná kultura řasy *Scenedesmus obliquus*, kmen BARTOŠ a MANSO 1986/206 pochází jako kontaminující řasa z venkovní masové kultivace řasy *Chlorella* na Kubě a byla užívána ve venkovní masové kultivaci v Třeboni.

Druhá testovaná řasa byl *Scenedesmus obliquus*, kmen HINDÁK 94/11. Tento kmen pochází z Třeboňské sbírky řas, BÚ AV ČR. Fyziologickou zvláštností kmene HINDÁK 94/11 je neschopnost tvorby dvoubuněčných dceřiných cenobií oproti kmenu BARTOŠ a MANSO 1986/ 206.



Obr. 5 Kultivační aparatura: Č - časový spínač, T - termostat, V - vodní lázeň, Te - teploměr, S - směs vzduchu a CO<sub>2</sub>.

### 2.3 Postup indukce buněčného dělení

Ke 100  $\mu$ l řasové suspenze jsem přidala živný roztok Z (STAUB, 1961) o objemu 1.4 ml. Tento připravený roztok byl rozetřen sterilní kličkou na Petriho misku s agarovou půdou, jejímž základem byl živný roztok Z. Petriho misky se poté uložily do uzavíratelné nádoby a ta se umístila do lednice, kde byla teplota 7 °C. Kultivační živný roztok Z vytvářel spolu s temným a chladným prostředím takové podmínky, které umožnily indukci dělení buněk. Nespornou výhodou bylo i to, že buněčná cenobia zůstávala v celku a nerozpadala se jako při kultivaci v roztoku, což umožnilo počítání buněk.

### 2.4 Užité živné roztoky

Živný roztok Z (složení pozměněno podle Zehndera), (STAUB, 1961)

NaNO <sub>3</sub>	467 mg / l = 5.50 mM / l
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	59 mg / l = 0.25 mM / l
K <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	31 mg / l = 0.31 mM / l
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	25 mg / l = 0.25 mM / l
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	21 mg / l = 0.21 mM / l
Fe - EDTA komplex	10 ml / l = 0.01 mM / l

Stopové prvky byly připraveny dle Zachledera a Šetlíka (1982)

Živný roztok 1 / 2 S Š (ZACHLEDER; ŠETLÍK, 1982)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.34 g / l
$\text{KNO}_3$	0.20 g / l
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.11 g / l
Chelat. železito sodný	0.18 g / l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.99 g / l
Mikroelementy:	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.046 g / l
$\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.018 g / l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.019 g / l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.022 g / l
$(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24}$	0.013 g / l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.018 g / l

## 2.5 Použité postupy

- **Sterilizace.** Roztoky, nástroje a laboratorní sklo bylo sterilizováno v autoklávu při 150 kPa a 125 °C po dobu 20 minut. Laboratorní sklo bylo sterilizováno v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 160 °C po dobu 2 hodin.

- **Příprava živné půdy.** Do 3 litrových baněk byla nalita živná půda Z, byl přidán agar v prášku (LACHEMA a. s. Brno o. z. Neratovice). Na jeden litr bylo přidáno 7.5 g agaru. Tato směs byla sterilizována v autoklávu. Po vyjmutí z autoklávu se nechala směs v baňce mírně vychladnout a poté za stálého míchání nalila do rovněž vysterilizovaných Petriho misek. Pro přípravu tekutých živných půd se užila živná půda Z. Tato půda se připravovala buď v kompletním složení, sloužila - li ke kultivaci řas nebo bez přidavku dusíkatých sloučenin, sloužila - li k indukci tvorby zoospor.

### - Fixace glutaraldehydem

Při fixaci řas byl použit glutaraldehyd ve výsledné koncentraci 1 %. Pro elektronovou mikroskopii byly řasy konzervovány ve 2 % formaldehydu. Po promytí v 0.2 M kakovylátovém pufru byly tyto vzorky prefixovány OsO<sub>4</sub>.

## 2.6 Strategie experimentu

V provedených experimentech jsme použili řasy *Scenedesmus obliquus* kmen BARTOŠ a MANSO 1986/206 a kmen HINDÁK 94/11. V průběhu našeho pokusu rostly kultury v živném roztoku Z s minerálními mikroprvky 1 / 2 SŠ. Roztok s řasami byl neustále zásobován CO<sub>2</sub> o koncentraci 3 % (objemových procent ve vzduchu). Bylo použito osvětlení 90 W.m<sup>-2</sup> při 30 °C. Prvním předpokladem k možnosti pozorování a zkoumání buněčného cyklu řasy *Scenedesmus obliquus* a k následné indukci zoospor je dokonalá synchronizace buněčných cyklů v pokusné kultuře. Pro úspěšnou synchronizaci buněčných cyklů byla stanovena perioda světla a tmy 16 : 8. Průběžně se sledoval stav buněk ve světelném mikroskopu a měřila se optická hustota narůstajícího množství buněk řas v roztoku. Kultivace řas *Scenedesmus obliquus* probíhala za výše uvedených podmínek v Tamiyových lahvích. Po uplynutí několika buněčných cyklů došlo k dokonalé synchronizaci kultury. Následovalo rozředění roztoku na počáteční hustotu asi 10<sup>5</sup> buněk v 1 ml a tato suspenze řas byla aplikována do několika kultivačních válců, kde poté probíhal připravený pokus zároveň s odběry vzorků. Zoospory, byly indukovány v živném roztoku Z, který neobsahoval žádný zdroj dusíku. Kultura rostla při 15 °C, při osvětlení 10 W.m<sup>-2</sup> a za periody světla a tmy 16 : 8. Vzorky byly odebírány každou hodinu. Pro fixaci odebraných vzorků byl použit 1 % glutaraldehyd.

### POKUS č. 1

Po třídenní synchronizaci řasové kultury *Scenedesmus obliquus* kmene HINDÁK 94/11, se každé dvě hodiny odebíraly vzorky, které byly následně zpracovány a vyhodnoceny. Hlavním záměrem pokusu č. 1 bylo stanovení buněčných indukci.

Vyhodnocení vzorků:

- a) Měření absorbance roztoku řas se provádělo při 750 nm.
- b) Z každého odebraného vzorku se nalilo 0.5 ml suspenze buněk do malé laboratorní kyvety (Ependorf) a fixovalo glutaraldehydem.
- c) Posledním bodem zpracování vzorků byl odběr řasové suspenze pro stanovení indukce buněčného dělení. Pro toto vyhodnocení bylo třeba 100  $\mu$ l řasové suspenze.

### POKUS č. 2

Úspěšnému provedení druhého pokusu předcházela proces synchronizace buněčných cyklů řasy *Scenedesmus obliquus* kmen HINDÁK 94/11. Za tři dny byla kultura buněk zcela synchronní. Proces synchronizace probíhal ve dvou kultivačních válcích o objemu 400 ml, při teplotě 30 °C, za stálého provětrávání směsí vzduchu a 3 % CO<sub>2</sub> (v/v), při ozáření 90 W m<sup>-2</sup> a periodě světla a tmy v poměru 16 : 8. Po dokončení synchronizace byla kultura řas naředěna na iniciační koncentraci 10<sup>5</sup> buněk / ml při absorbanci 0.09. Tento roztok řas byl umístěn do tří Tamiyových lahví a další kultivace probíhala již za stejných podmínek, tj. při teplotě 30 °C, provzdušňování 3 % CO<sub>2</sub>, ozařování 90 W m<sup>-2</sup> a periodě světla a tmy v poměru 16 : 8. Z dané kultury buněk se odebral po hodině vzorek o stanoveném objemu a ten byl použit k jednotlivým dílčím vyhodnocení. Tímto způsobem se odebralo celkem 15 vzorků.

a) Postup odebrání a zpracování vzorků kultury řasy *Scenedesmus obliquus*.

Odběr vzorků započal první Tamiyovou lahví a po provedení několika odběrů pokračoval druhou a třetí Tamiyovou lahví. Podmínky pokusu byly ustanoveny tak, aby byly kultivační podmínky ve všech třech lahvích stejné. První odběr měl objem 140 ml při absorbanci 0.09. K dílčímu vyhodnocení bylo ještě třeba 5 ml suspenze buněk a tudíž činil celkový objem prvního odběru 145 ml.

b) Výpočet objemu vzorku. Výpočet objemu odebíraného vzorku  $V$  se vypočítal z absorbance předchozího vzorku  $A_{750}$  s ohledem na počet buněk v ml :

$$V(\text{ml}) = 15 / A$$

K následujícímu zpracování vzorků bylo nutné, aby byl počet buněk na 1 ml stejný. Objem odebíraného vzorku s dalšími odběry klesal, neboť se zvyšovala koncentrace buněk v roztoku.

c) Kultivace vzorků na indukci tvorby zoospor. Odměřený objem suspenze buněk jsem nalila do kyvety a odstředila při 3200 otáčkách za minutu. Teplota při odstředování byla 22 °C a odstředování trvalo 10 minut. Obsah kyvety jsem opatrně slila a sediment buněk zalila 100 ml sterilního bezdusíkatého živného roztoku Z. Tuto směs jsem opět odstředila v centrifuze za stejných podmínek a postup opakovala třikrát. Účelem tohoto postupu bylo odstranění dusíku z živného roztoku a tak připravit podmínky pro indukci zoospor. Po posledním odstředování jsem roztok opět slila a sediment buněk rozředila 5 ml bezdusíkatého živného roztoku ve sterilním boxu. Tuto suspenzi jsem nalila do menšího kultivačního válce o objemu 40 ml a umístila do lázně o teplotě 15 °C, provzdušňované směsí vzduchu a 3 % CO<sub>2</sub> a ozařované 10 W m<sup>-2</sup>. Kultivace za těchto podmínek probíhala 40 hodin.

d) Pro vyhodnocení dílčích odběrů bylo zapotřebí 5 ml roztoku ke stanovení absorbance a na fixaci řas glutaraldehydem.

e) Vyhodnocení vzorků na indukci buněčného dělení. Pro vyhodnocení bylo třeba 100 µl buněčné suspenze.



f) Pozorování zoospor v elektronovém mikroskopu. Objektem pozorování pro fotografie získané v elektronovém mikroskopu byla řasa *Scenedesmus obliquus* kmen BARTOŠ a MANSO 1986/206. Kultura této řasy byla odebrána z malé kultivační plošiny v Třeboni v r. 1995.

### POKUS č. 3

Záměrem pokusu č. 3 bylo zjištění závislosti růstu buněčné suspenze a tvorby zoospor na intenzitě ozáření.

Po synchronizaci buněčného dělení se roztok s řasami naředil na výchozí koncentraci  $10^5$  buněk na ml do čtyř Tamiyových láhví. Každá Tamiyova láhev byla ozářována jinou světelnou intenzitou. První Tamiyova láhev byla ozářována  $12 \text{ W.m}^2$ , druhá  $25 \text{ W.m}^2$ , třetí  $60 \text{ W.m}^2$  a čtvrtá  $110 \text{ W.m}^2$ . Z každé láhve se po hodině odebíral vzorek o určitém objemu pro vyhodnocení dílčích vzorků. První odběr měl objem 85ml, celkem bylo provedeno 20 odběrů. Oběry ze subkultur byly prováděny po 4 hodinách celkem 40 hodin.

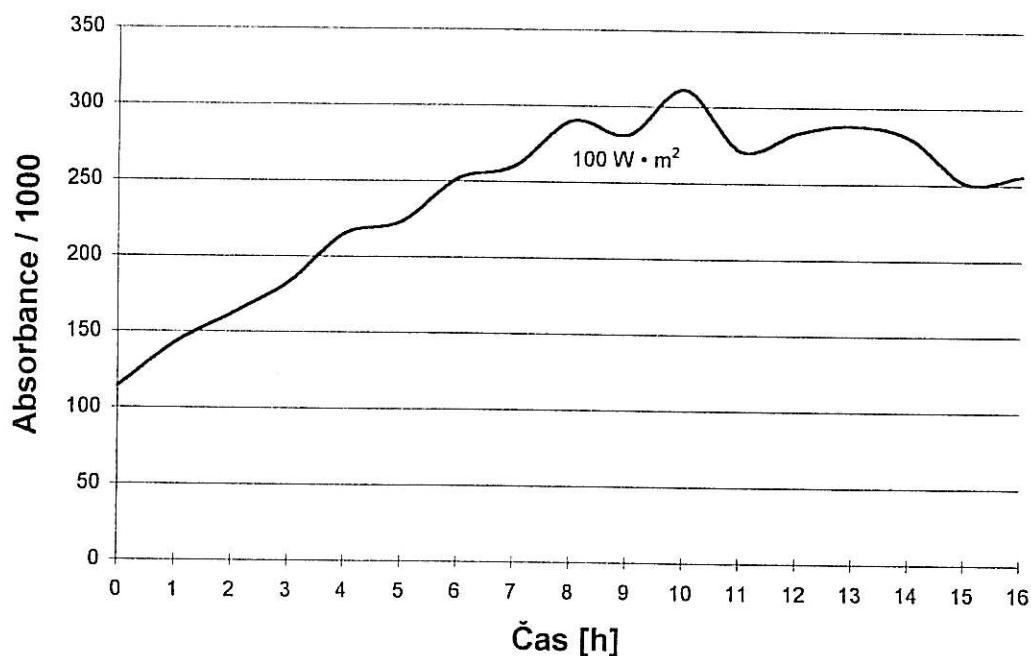
Vyhodnocení vzorků:

- a) Stanovení absorbance při 750 nm.
- b) Stanovení indukce buněčného dělení. K vyhodnocení bylo třeba 100  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze.
- c) Fixace buněk glutaraldehydem. K fixaci bylo třeba 0.5 ml buněčné suspenze.
- d) Výpočet objemu vzorku a kultivace vzorků na indukci tvorby zoospor.

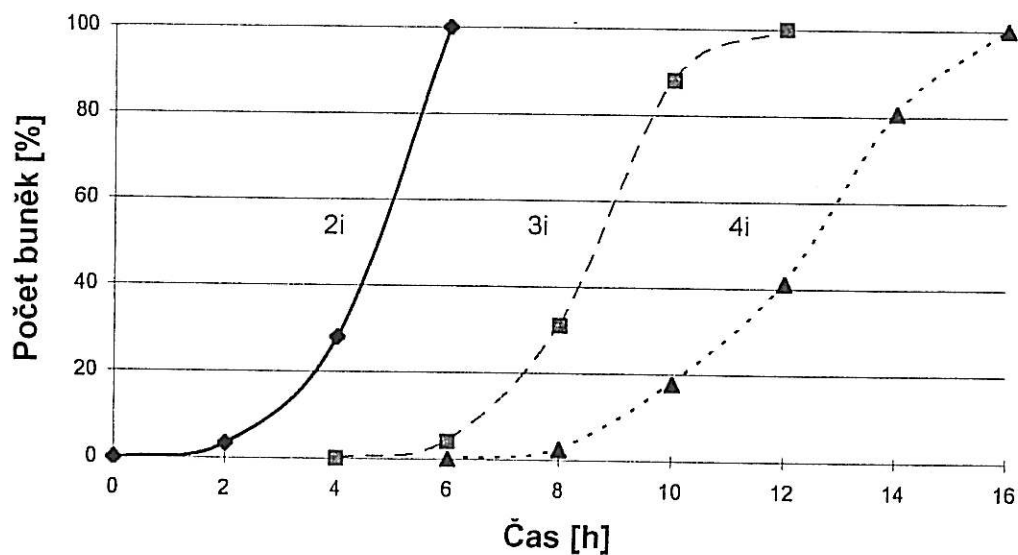
### III. VÝSLEDKY

#### 3.1 Výsledky pokusu č. 1.

V pokusu č. 1 se podařilo stanovit indukce buněčného dělení řasy *Scenedesmus obliquus* kmene HINDÁK 94/11 při kultivaci buněk řasy na agarové plotně v Petriho miskách. Agarové plotny v Petriho miskách se následující den vyhodnotily ve světelném mikroskopu. Charakter rychlosti růstu buněčné suspenze lze dobře vidět z grafu č. 2 (graf č. 2). Domnívám se, že kolem 13. hodiny došlo k hromadění látek metabolismu a též již byla patrná nižší rychlost růstu buněčné populace v základní kultuře (graf č. 2). Charakter indukčních křivek je dobře vidět z grafu č. 3 (graf č. 3). Již od počátku experimentu se objevily indukce buněčného dělení na čtyři dceřiné buňky. Od čtvrté hodiny od počátku kultivace se objevily indukce na osm dceřiných buněk a od šesté hodiny na šestnáct dceřiných buněk.



Graf č. 2 Nárůst množství buněk v roztoku vyjádřené v závislosti na čase při 750 nm.

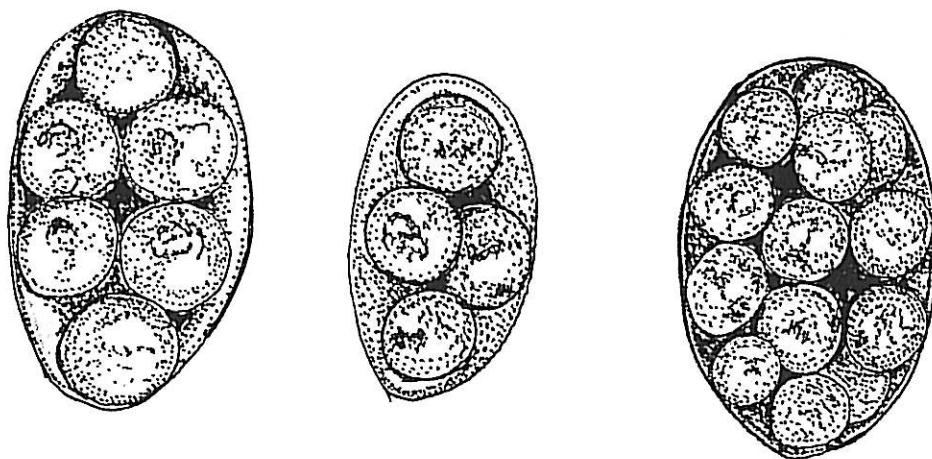


Graf č. 3 Indukční křivky řasy *Scenedesmus obliquus* kmene HINDÁK 94/11 při 90 W.m<sup>-2</sup>.

### 3.2 Výsledky pokusu č. 2.

Zoosporám podobné buňky řasy *Scenedesmus obliquus* kmene BARTOŠ a MANSO 1986/206 v pokusu č. 2 se vyskytly při kultivaci v živném roztoku Z v buněčné subkultuře za nedostatku dusíku. Podařilo se dosáhnout indukce a vzniku zoospor. Tyto buňky se však vyskytly až v době, kdy se většina buněk nacházela ve stavu vysoké zralosti. Z těchto okolností lze usuzovat, že zoospory se při tomto pokusu objevily až po dostatečném vyspění mateřských buněk a tudíž byly

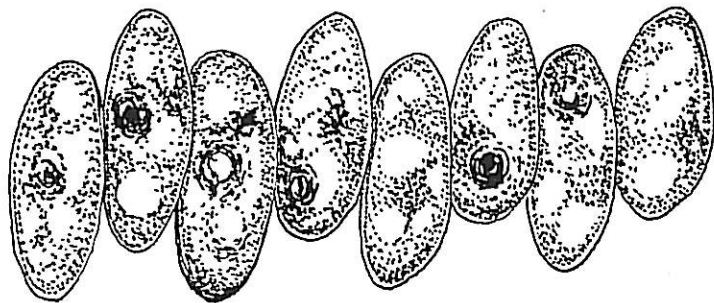
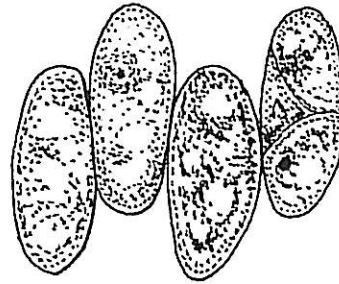
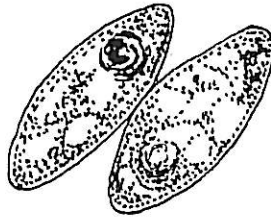
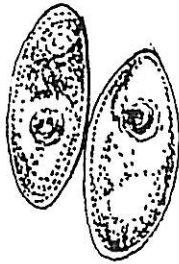
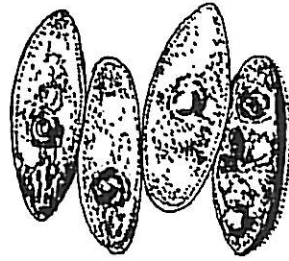
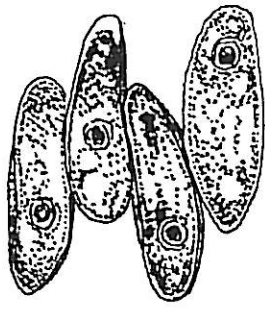
schopné po následném vystavení vlivu nedostatku dusíku tvorby zoosporických komponent. Je zvláštní, že právě syntéza a vývin jednotlivých součástí zoospor je pravděpodobně závislá na velikosti buňky a celkovém dosaženém vývinu v určitém období buněčného cyklu, tedy zejména v jeho druhé polovině a v neposlední řadě i na rychlosti růstu buněčné suspenze. To znamená podstatný rozdíl oproti dobře prostudovanému rodu *Chlamydomonas*, u kterého je principem tvorby zoospor též nedostatek dusíku, avšak tento proces tvorby zoospor nastane jen v tzv. G1 fázi buněčného cyklu, tedy hned po rozdělení a vyřeždění dceřiných buněk. Perioda G1 fáze se nazývá tzv. „precommitment period“. U rodu *Scenedesmus* však dochází k tvorbě zoospor zřejmě až po vyspění mateřských buněk, které jsou teprve po nabytí určité velikosti, obsahu bílkovinných komponent a zmnožení genetického materiálu schopné tvorby zoospor. Jedná se tedy pravděpodobně o reliktní jev, který nenastává za běžných podmínek kultivace. V našem pokusu se zoospory objevily v nejvyšším počtu ve vzorcích, které se odebraly po devíti hodinách od počátku kultivace v hlavní kultuře a poté přenesly do subkultury (obr. 6).



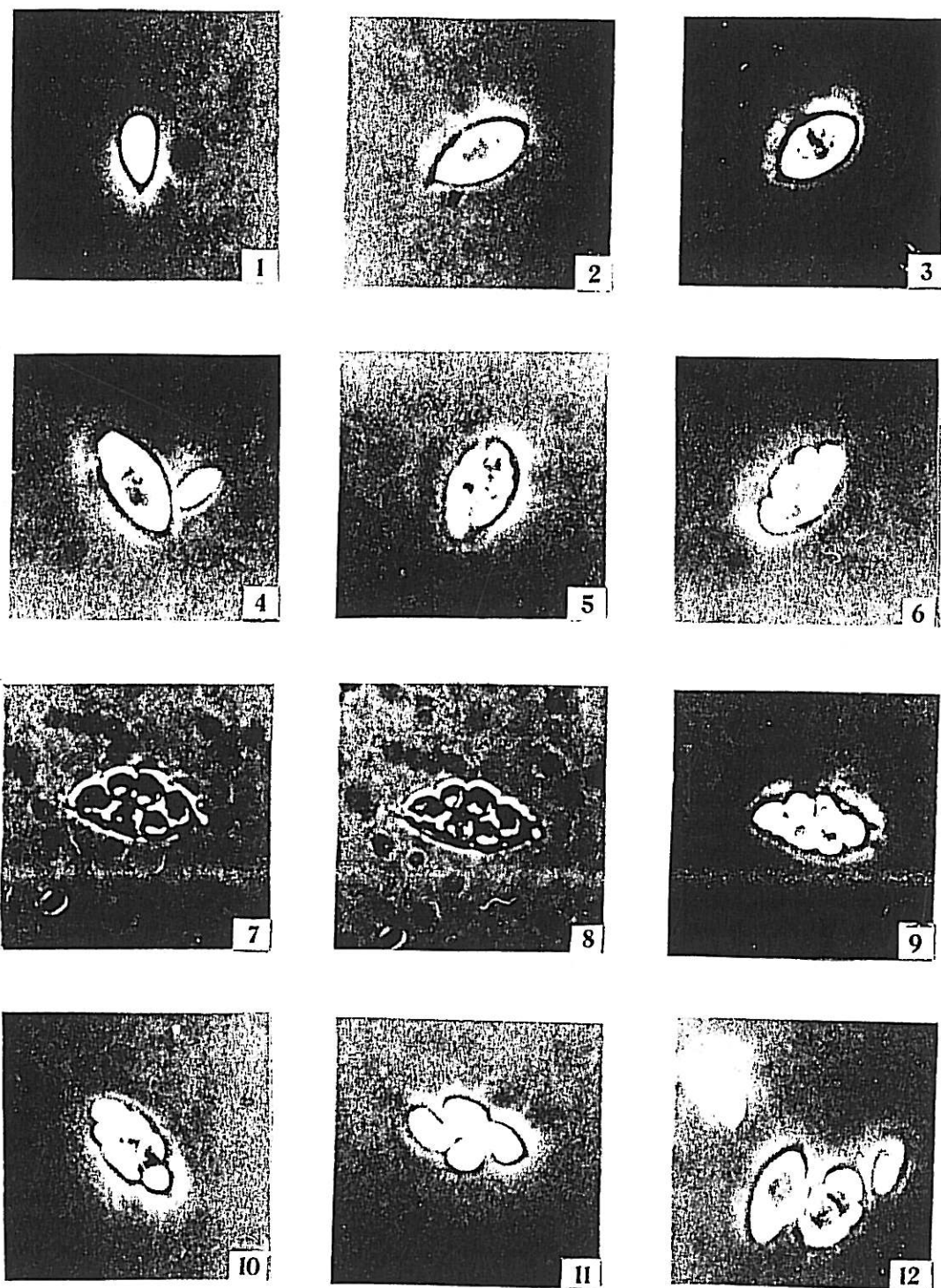
Obr. 6 Zoospory řasy *Scenedesmus obliquus* kmen BARTOŠ a MANSO 1986/206.

V subkultuře se prováděl též odběr vzorků a následná fixace glutaraldehydem po 4 hodinách ve 40 hodinovém úseku, kdy nejvyšší počet zoospor jsme pozorovali ke konci časové periody při 32 hodině. Z indukčních křivek v grafu 6 vyplývá, že zoospory vznikaly především při výskytu osmibuněčných a šestnáctibuněčných indukcí, tedy při nejvyšší růstové rychlosti suspenze buněk. Z počtu napočítaných buněk lze pozorovat, že ač byly podmínky pro tvorbu zoospor téměř ideální, hodnoty procentuálního zastoupení těchto buněk jsou poměrně nízké, jen 20 % v maximálním zastoupení počtu zoospor 53 % (graf č. 6). Při provádění pokusu došlo k vyčerpání zdroje oxidu uhličitého a přibližně v desáté hodině kultivace též k prudkému poklesu rychlosti buněčného růstu, což je velmi dobře patrné z grafu 4 (graf č. 4). Procentuální hodnoty počtu zoospor ve zkoumaném roztoku jsou spočteny kumulativně vzhledem k hodině odběrů z hlavní kultivační suspenze (graf č. 6).

Současně s tímto pokusem byly vyhodnoceny vzorky řas, které byly odebrány po hodině z hlavní kultivační suspenze a umístěny na agarové plotny na Petriho misky do tmy. Vzorky byly vyhodnoceny již druhý den po odběru. Významem tohoto způsobu vyhodnocování vzorků bylo především to, že se podařilo pozorovat celá nerozpadlá cenobia řasy *Scenedesmus obliquus*, která je známa svou snadnou rozpadavostí cenobií ve vodných roztocích a z toho důvodu již lze následovně zjistit, zda dceřiné buňky pocházejí původně z čtyřbuněčného, osmibuněčného nebo šestnáctibuněčného cenobia. Tvar buněk a morfologie cenobií lze pozorovat z nákrešů na obrázcích 7 a 8 (obr. 7, 8).

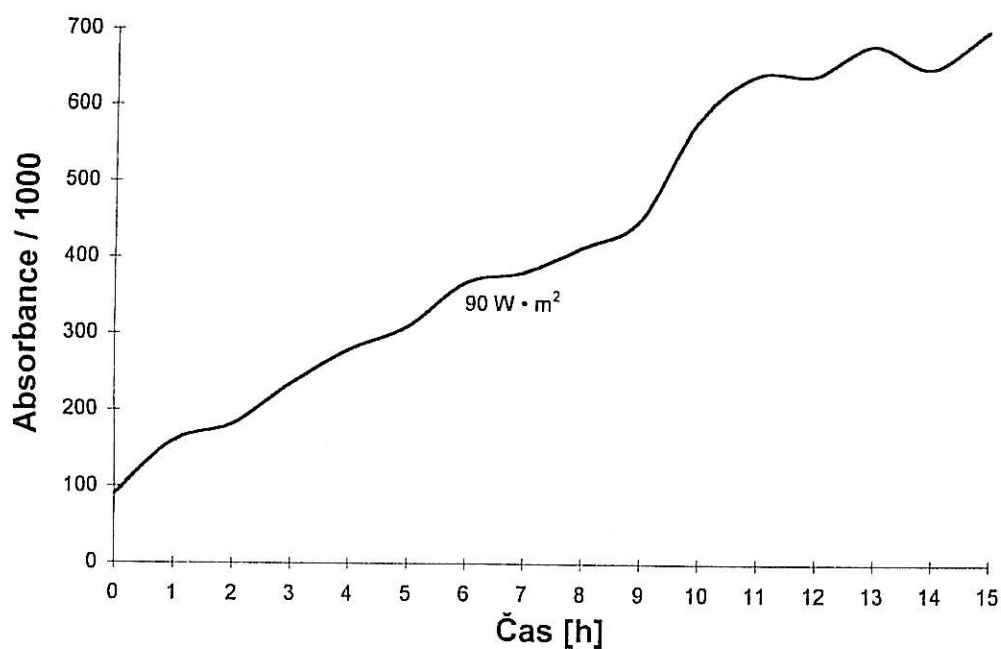


Obr. 7 Tvar buněk a cenobii *Scenedesmus obliquus*.



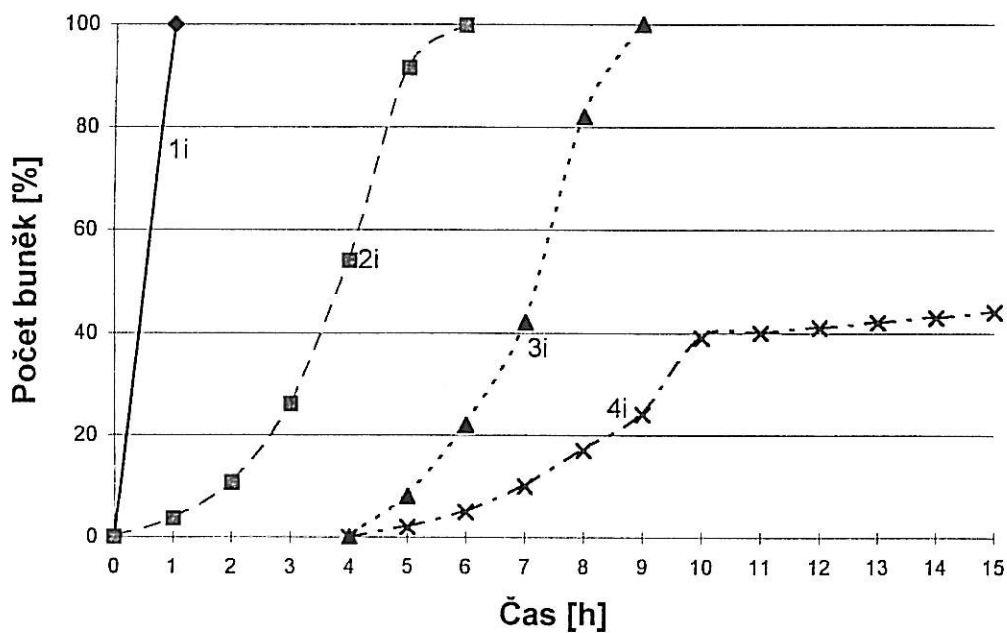
Obr. 8 Snímky ze světelného mikroskopu. 1 - 4 tvar jednobuněčných dceřiných buněk, 5 - autospory v mateřské buňce, 6 - 11 zoospory v mateřské buňce, 12 - autospory.

Z křivky nárůstu buněk, která byla získána z hodnot naměřených absorbancí vzorků v časovém úseku 15 hodin, je možné vyčíst charakter a rychlost růstu populace buněk (graf č. 4). Zde lze pozorovat kolísavý průběh nárůstu absorbance roztoku vlivem odběru vzorků postupně ze tří Tamiyových láhví, které, ač byly kultivovány za stejných podmínek, vykazovaly různý nárůst buněk.

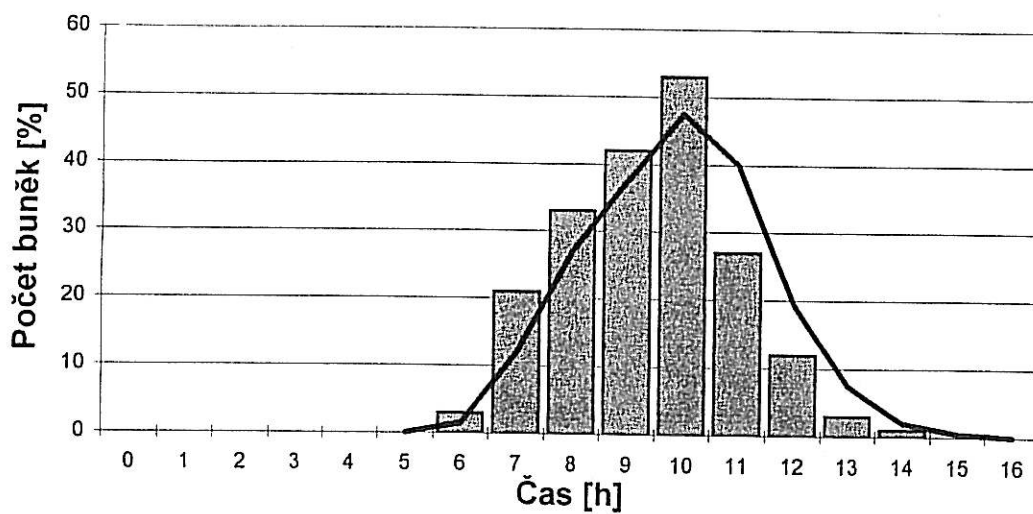


Graf č. 4 Nárůst množství buněk v roztoku vyjádřené v závislosti na čase při 750 nm.





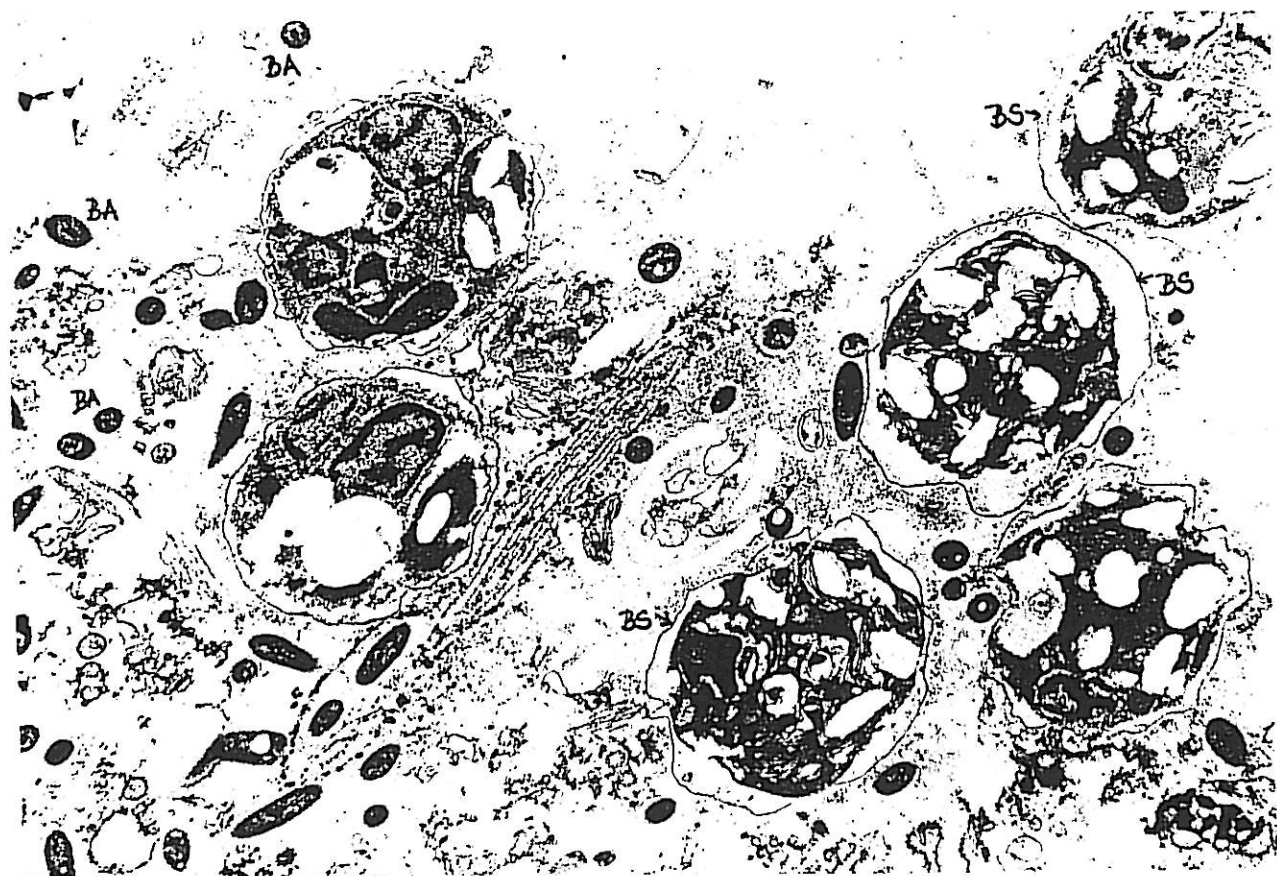
Graf č. 5 Indukční křivky řasy *Scenedesmus obliquus* kmene BARTOŠ a MANSO 1986/206 při 100 W.m<sup>-2</sup>.



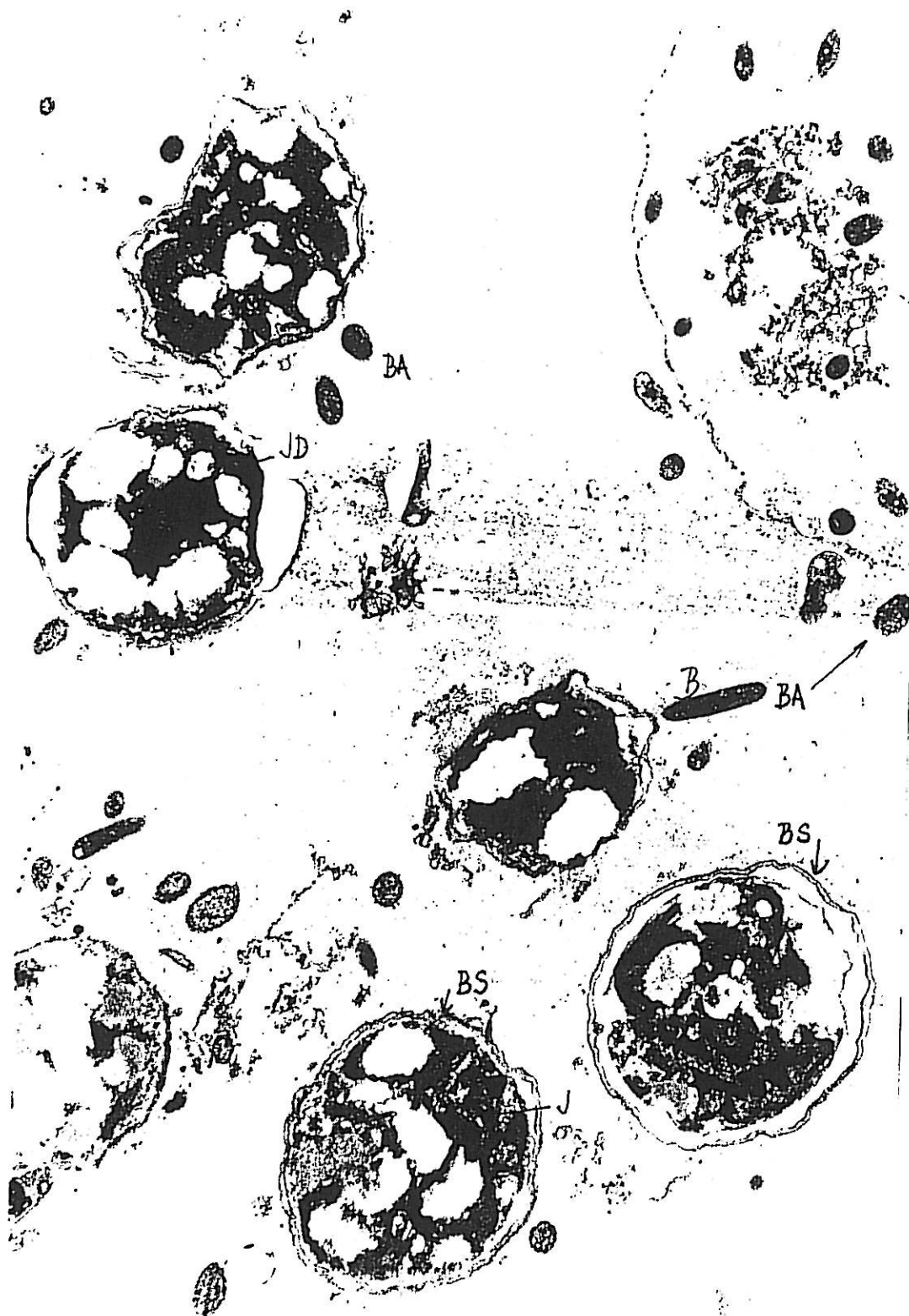
Graf č. 6 Počet zoospor řasy *Scenedesmus obliquus* kme BARTOŠ a MANSO 1986/206 při 100 W.m<sup>-2</sup>.

### 3.2.1 Vyhodnocení vzorků z pokusu č. 2 pomocí elektronové mikroskopie.

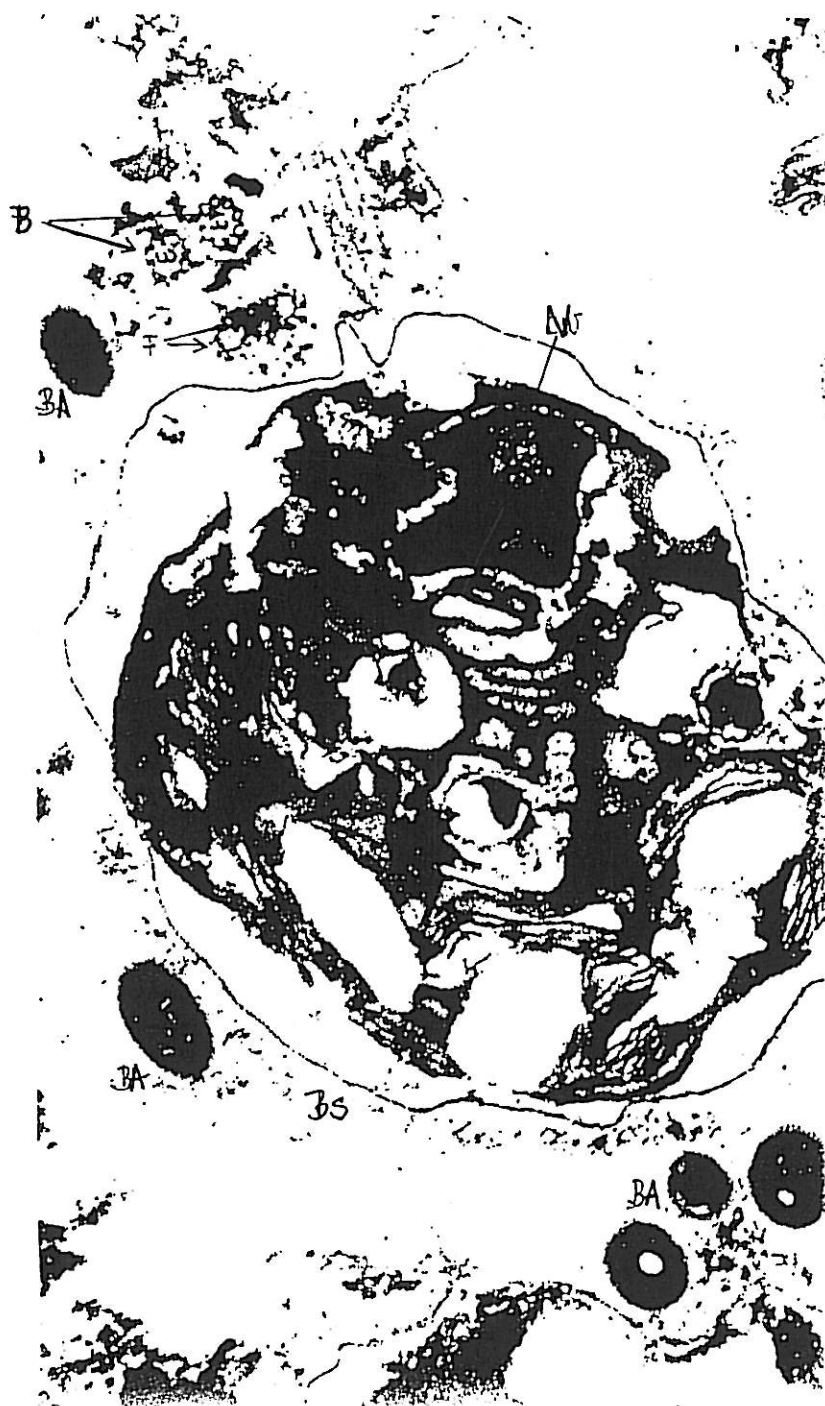
Vzorky řasy *Scenedesmus obliquus* kmen BARTOŠ a MANSO 1986/206, původně odebrané z venkovní masové kultivační jednotky, byly vyhodnoceny za pomoci elektronového mikroskopu. Fotografie získané v elektronovém mikroskopu nejsou tak jednoznačné proto, že zoospor je ve vzorku málo a je velice těžké získat podélný řez v úrovni obou bičíků (obr. 9, 10, 11, 15, 16, 18). Dále je interpretace snímků komplikována množstvím kontaminujících bakterií ve vzorku, který byl odebrán z venkovní plošiny. Přesto jsme našli jasné charakteristické struktury bičíků na řezech (obr. 15, 16, 17) a to i u zoospor uvnitř mateřských buněk (obr. 12, 13, 17, 18). Dále se ukázalo, že buněčná stěna zoospor uvnitř mateřských buněk je jednovrstevná a teprve později, po nebo těsně před uvolněním se zdvojuje (obr. 9, 10). Také buněčná stěna mateřských buněk tvořících zoospory je tenká, kdežto buněčná stěna buněk tvořících autospory je silná a vícevrstevná (Obr. 19). Buňky byly oválného tvaru a doposud obalené mateřskou buněčnou stěnou. Od vegetativních buněk se lišily uspořádáním dceřiných buněk v mateřské buňce. V příčných řezech vegetativními buňkami jsou zřetelné pyrenoidy v obalu škrobových zrn (obr. 20). Autospory, rozdělené vegetativní buňky uvnitř mateřské buňky, jsou uspořádané těsně vedle sebe (obr. 19). Naopak zoosporám podobné buňky jsou uloženy v mateřské buňce poněkud volněji a mají kulovitý tvar. Nejčastější počet zoospor v mateřské buňce činí 4 a 8 buněk.



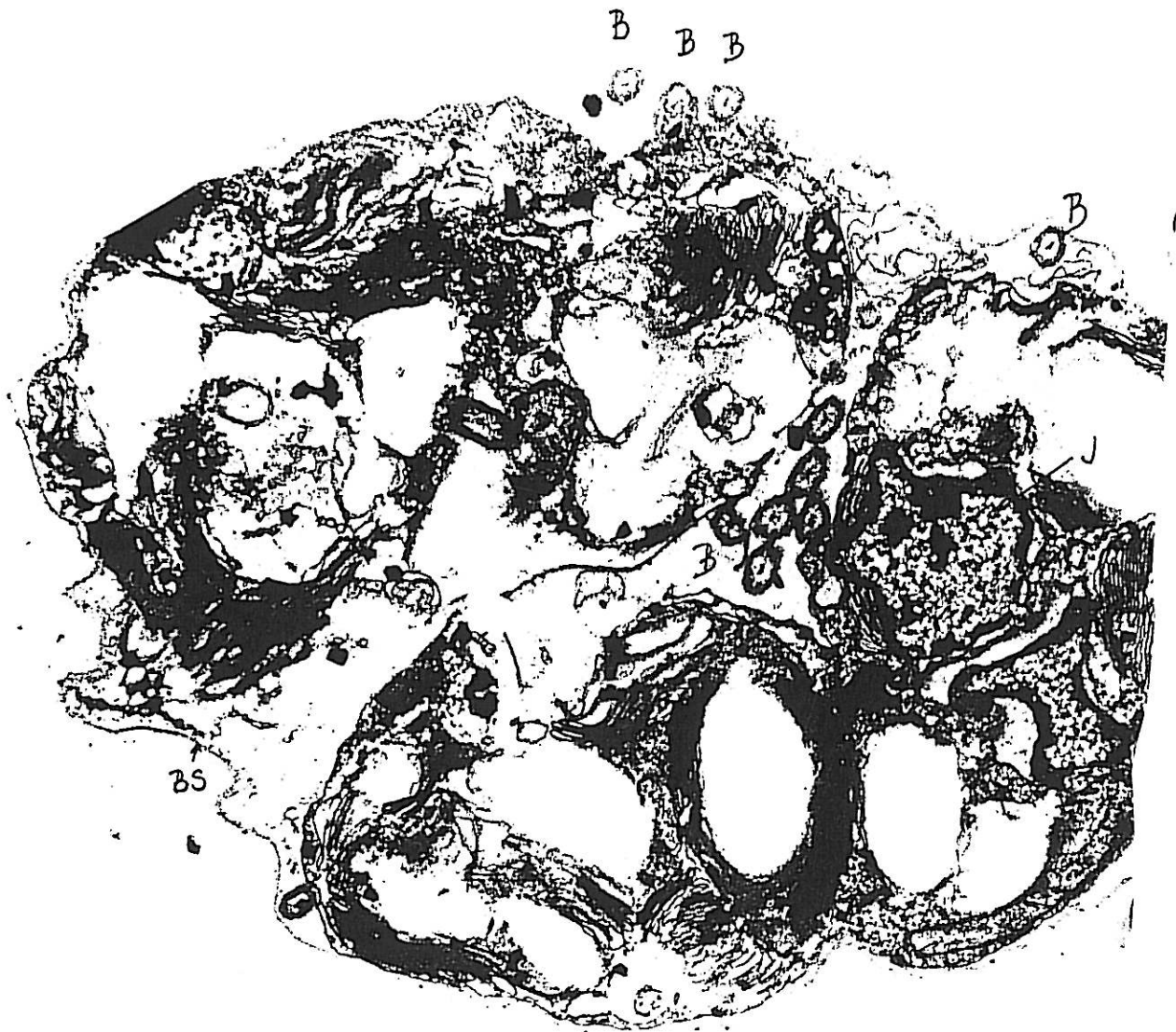
Obr. 9 Řezy v transmisním elektronovém mikroskopu. Zoospory s jednovrstevnou buněčnou stěnou, B - bičíky, J - jádro, BS - buněčná stěna, BA - bakterie kontaminující venkovní kulturu. Snímek řasy *Scenedesmus obliquus* kmen BARTOŠ a MANSO 1986/206.



Obr.10 Řezy v transmisním elektronovém mikroskopu. Zoospory s dvojitou buněčnou stěnou. B - bičíky, J - jádro, BS - buněčná stěna, BA - bakterie.



Obr. 11 Řezy v transmisním elektronovém mikroskopu. Detail zoospor s kolmo prořizými bičičky (B), J - jádro, BS - buněčná stěna, BA - bakterie.



Obr. 12 Řezy v transmisním elektronovém mikroskopu. Detail zoospor uvnitř mateřské buňky s kolmo prořiznými bičíky (B), J - jádro, BS - buněčná stěna, BA - bakterie.



Obr. 13 Řezy v transmisním elektronovém mikroskopu. Papila s kolmo prořizými bičíky  
(B), J - jádro, BS - buněčná stěna, BA - bakterie.



Obr. 14 Řezy v transmisním elektronovém mikroskopu. Papila s kolmo prořízlými bičíky (B), J - jádro, BS - buněčná stěna.

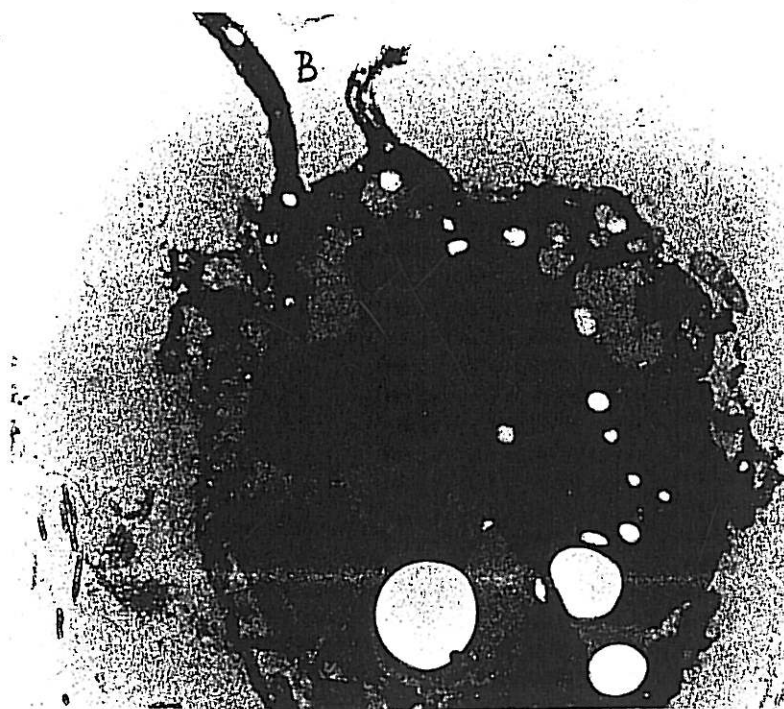


Obr. 15 Řezy v transmisním elektronovém mikroskopu. Podélný a kolmý řez bičíky (B).

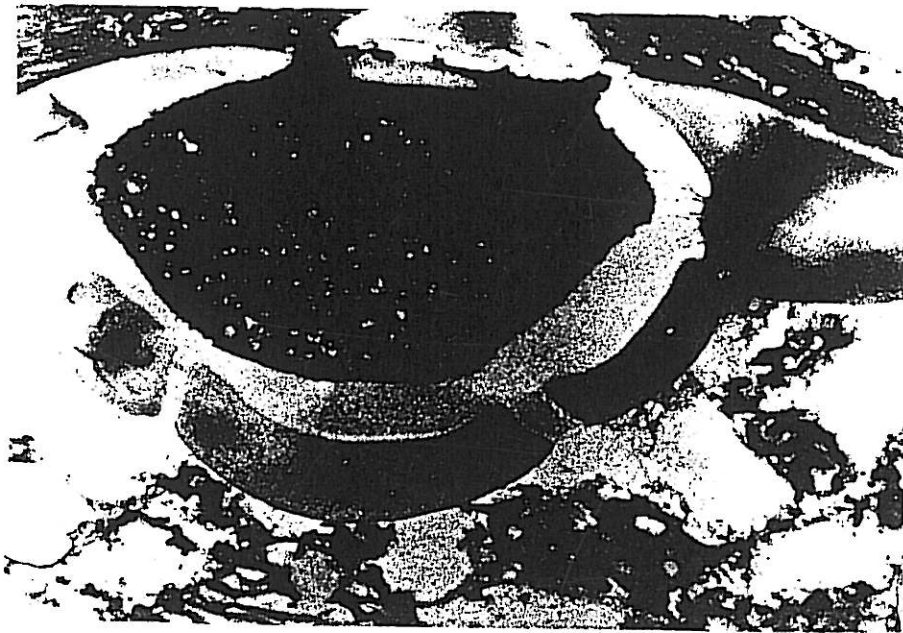




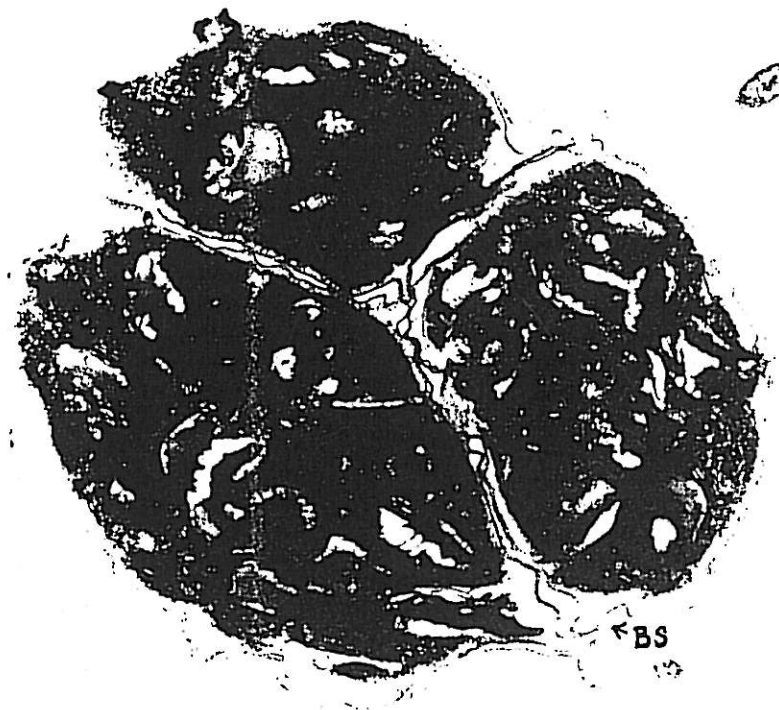
Obr. 16 Řezy v transmisním elektronovém mikroskopu. Papila s podélně prořizlým bičíkem (B).



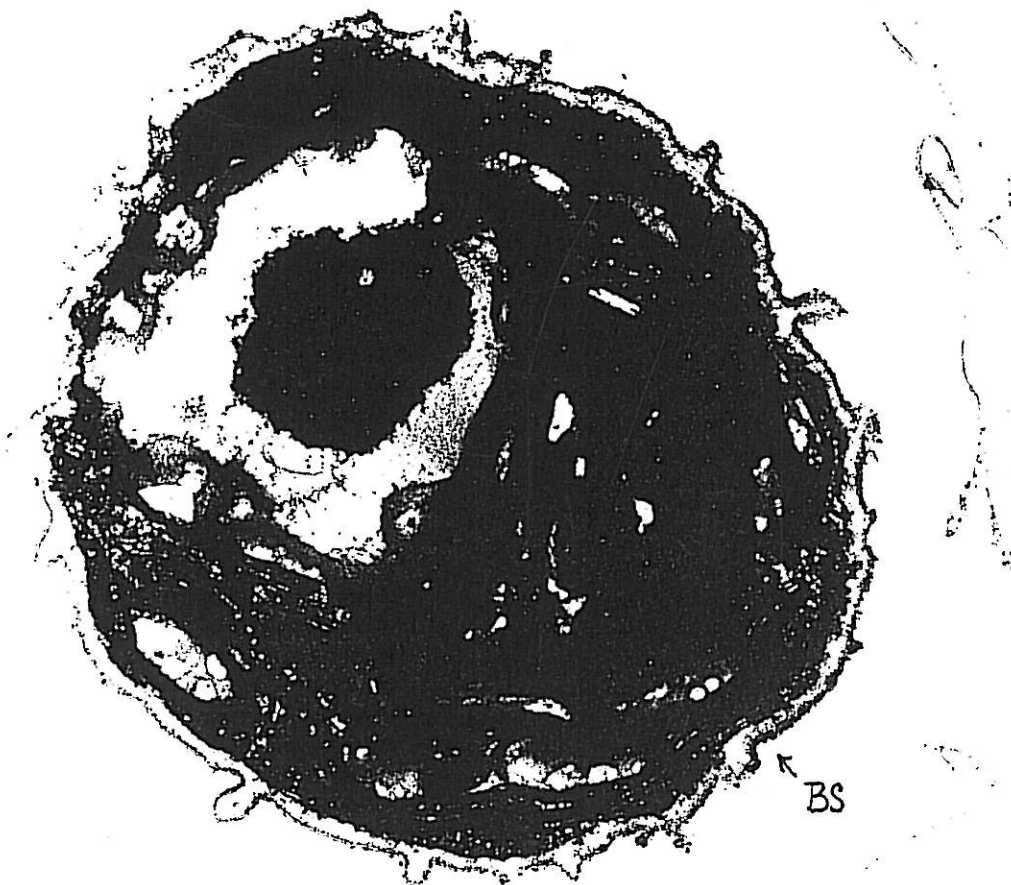
Obr. 17 Řezy v transmisním elektronovém mikroskopu. Podélný řez zoosporou s dvěma bičíky (B).



Obr. 18 Detail pyrenoidu v obalu škrobových zrn.



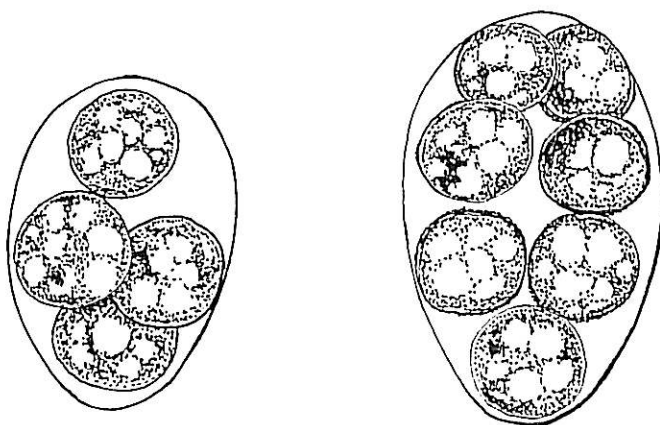
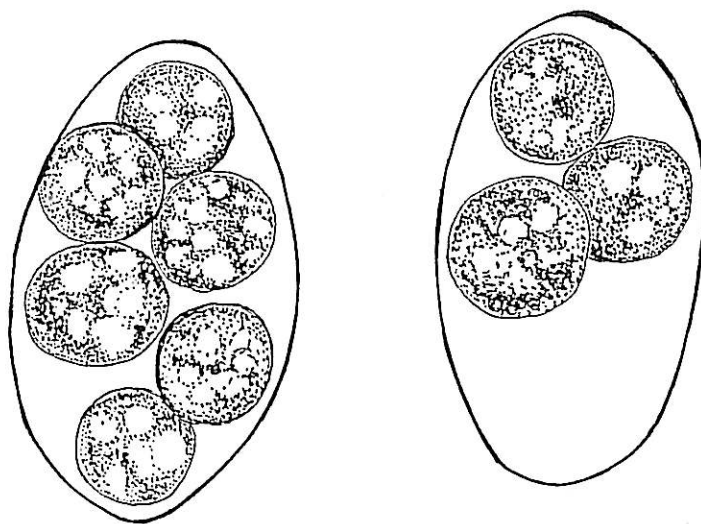
Obr. 19 Příčný řez mateřskou buňkou s autosporami. Charakteristicky stlačené uvnitř mateřské buňky.



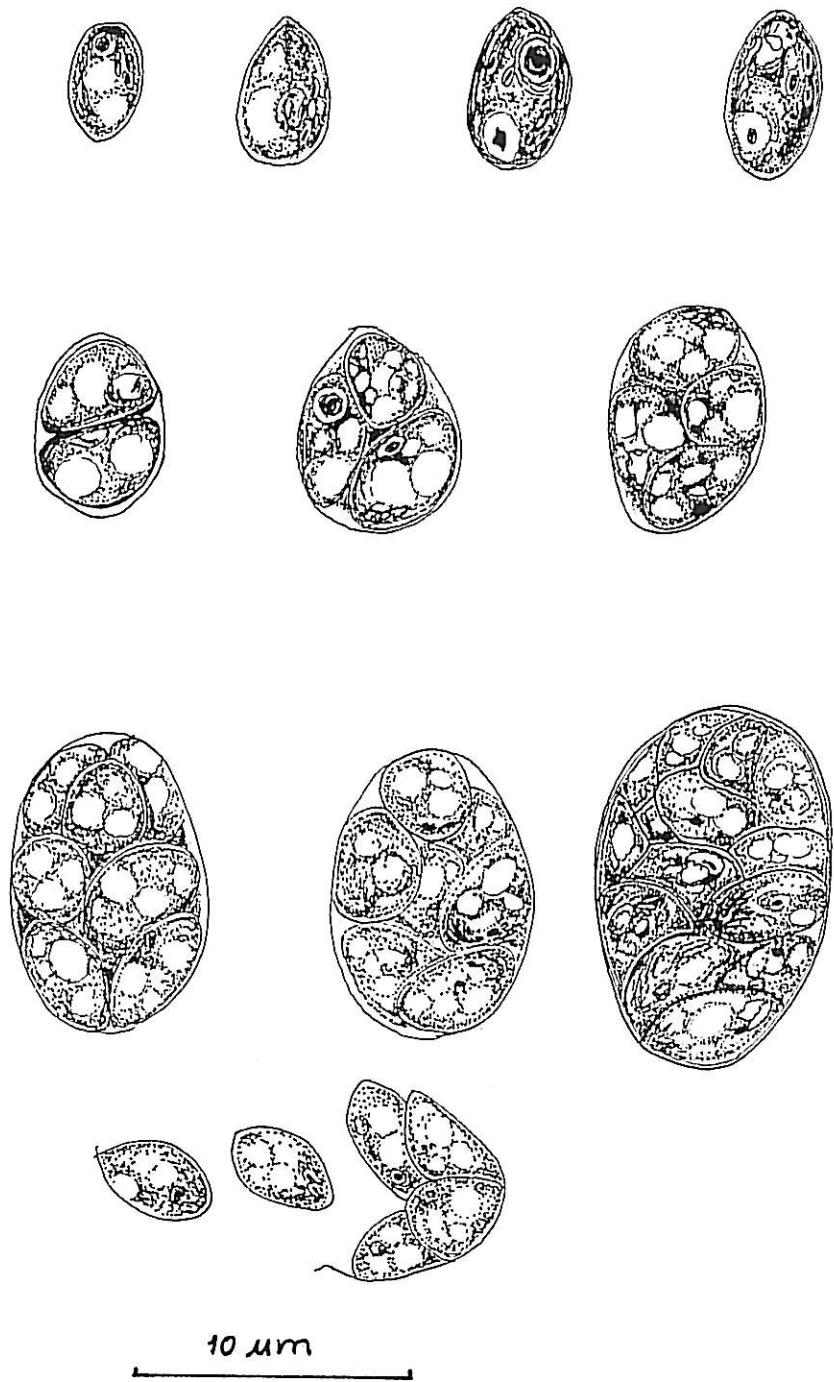
Obr. 20 Příčný řez vegetativní buňkou se zřetelným pyrenoidem v obalu škrobových zm.  
Buněčná stěna (BS) je dvojitá a silná.

### 3.3 Výsledky pokusu č. 3.

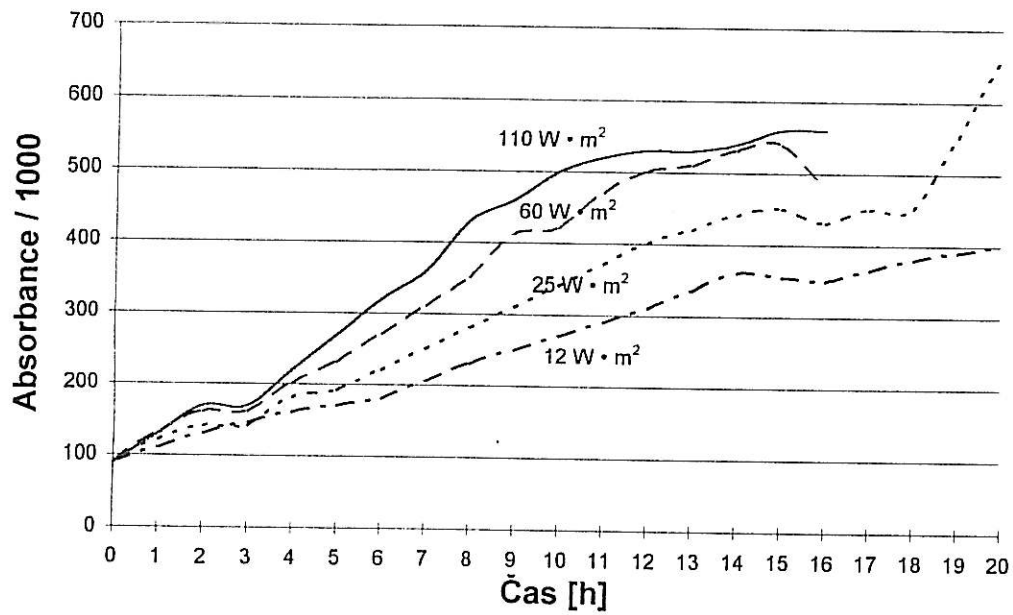
Zoospory buněk *Scenedesmus obliquus* kmene HINDÁK 94/11 v pokusu č. 3 se podařilo získat při všech dílčích pokusech (obr. 21). Nárůst buněčné populace během pokusu je znázorněn na grafu 8 (graf č. 8), kde můžeme sledovat charakter rychlosti růstu vyjádřené hodnotou absorbance v závislosti na čase. Nejvyššího nárůstu počtu buněk dosáhla suspenze buněk, kde ozáření bylo  $110 \text{ W.m}^{-2}$  a nejnižšího nárůstu dosáhla suspenze buněk při ozáření  $12 \text{ W.m}^{-2}$ . Z indukčních křivek je patrný jistý posun indukce dělení buněk, kdy s klesající intenzitou ozáření roste časový úsek, kdy nedochází k indukci dělení buněk (graf č. 8, 9, 10, 11). Tento jev je způsoben nedostatečným osvětlením, a tím i vývinem buněk a nízkou rychlostí dělení buněk. Čím nižší byla rychlost dělení buněk, tím se též zpožďovala tvorba zoospor, neboť pomalu se dělicí buňky nemohly dosáhnout dostatečné zralosti. V případě ozáření  $12 \text{ W.m}^{-2}$  došlo k tvorbě zoospor až po 12. hodině od počátku kultivace a maximum nastalo ve 14. hodině od počátku kultivace, kdy maximální počet zoospor dosáhl hodnoty 5 % (graf č. 12). Ve 14. hodině se počet výskytu zoospor snížil na 1 % a v následujícím časovém úseku se již výskyt nepodařilo doložit. U dílčího pokusu, kde byla suspenze buněk ozářena  $25 \text{ W.m}^{-2}$  se maximum počtu zoospor objevilo kolem 12. hodiny a dosáhlo počtu 20 %. Zoospory se objevovaly až do 17. hodiny od počátku kultivace (graf č. 13). Při ozáření  $60 \text{ W.m}^{-2}$  rostly buňky větší rychlostí a tím se zvýšila i tvorba zoospor až na 45 % s maximem kolem 11. hodiny od počátku kultivace (graf č. 14). Zoospory bylo možné pozorovat již od 7. hodiny až do 15. hodiny od počátku kultivace. Nejvyšší výskyt zoospor byl zaznamenán u pokusu s ozáření  $110 \text{ W.m}^{-2}$ . Maximální počet zoospor byl zjištěn kolem 10. hodiny od počátku kultivace v hodnotě 58 %. Zoospory bylo možné sledovat od 4. hodiny do 16. hodiny od počátku kultivace (graf č. 15). Nárůst počtu zoospor již nebyl tak výrazný, protože ozáření  $110 \text{ W.m}^{-2}$  splňuje požadavky na maximální rychlost růstu buněčné populace a dalším zvyšováním ozáření by došlo jen k nepatrnému vzrůstu rychlosti dělení a růstu buněk. Růst a morfologie buněk i autospor jsou zachyceny na obrázku č. 22 (obr. 22).



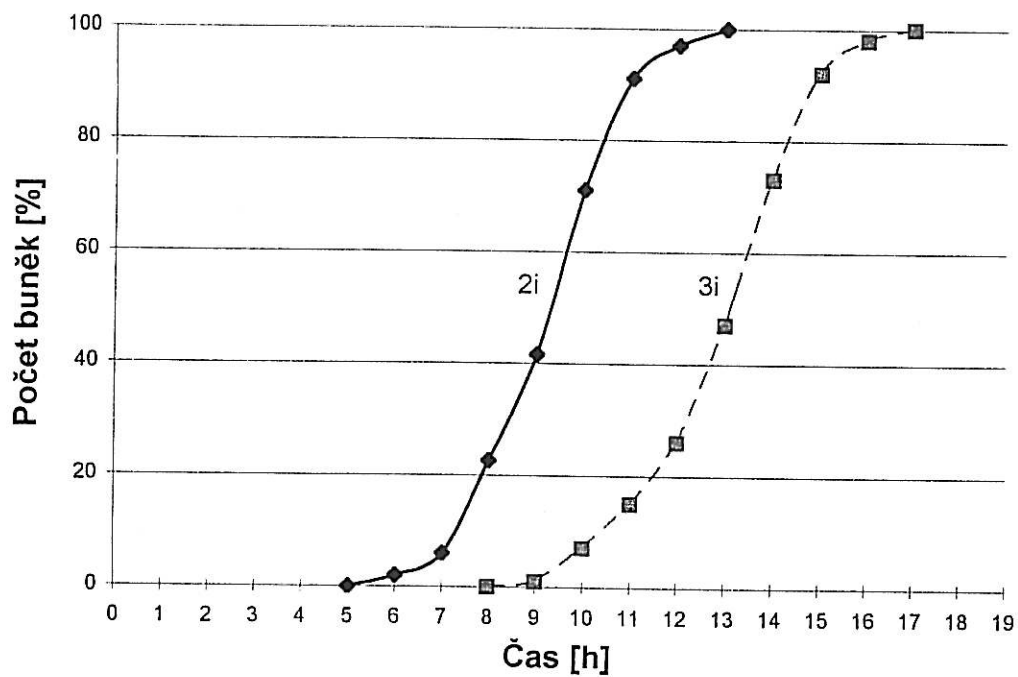
Obr. 21 Tvar a morfologie zoospor řasy *Scenedesmus obliquus* kmen HINDÁK 94/11.



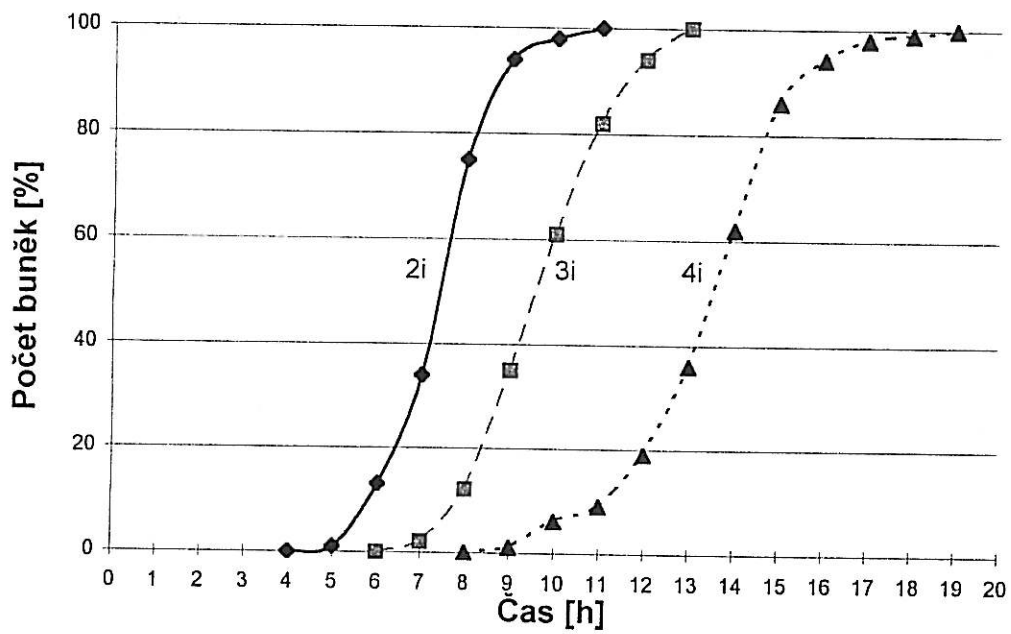
Obr. 22 Růst buněk řasy *Scenedesmus obliquus* kmen HINDÁK 94/11 a tvorba autospor.



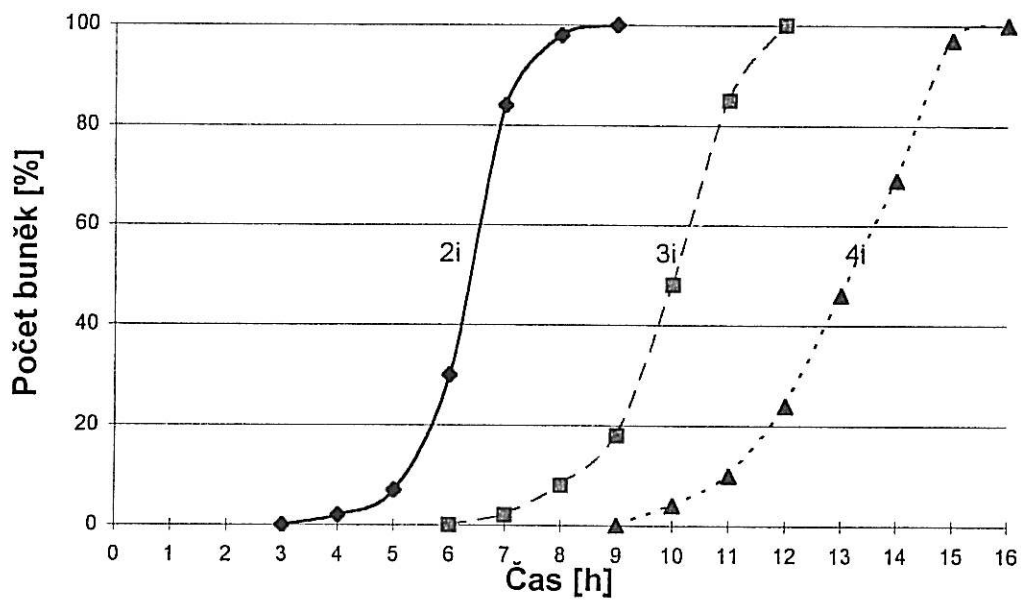
Graf č. 7 Nárůst množství buněk v roztoku vyjádřené v závislosti na čase při 750 nm.



Graf č. 8 Indukční křivky řasy *Scenedesmus obliquus* kmen HINDÁK 94/11 při 12 W·m<sup>2</sup>.

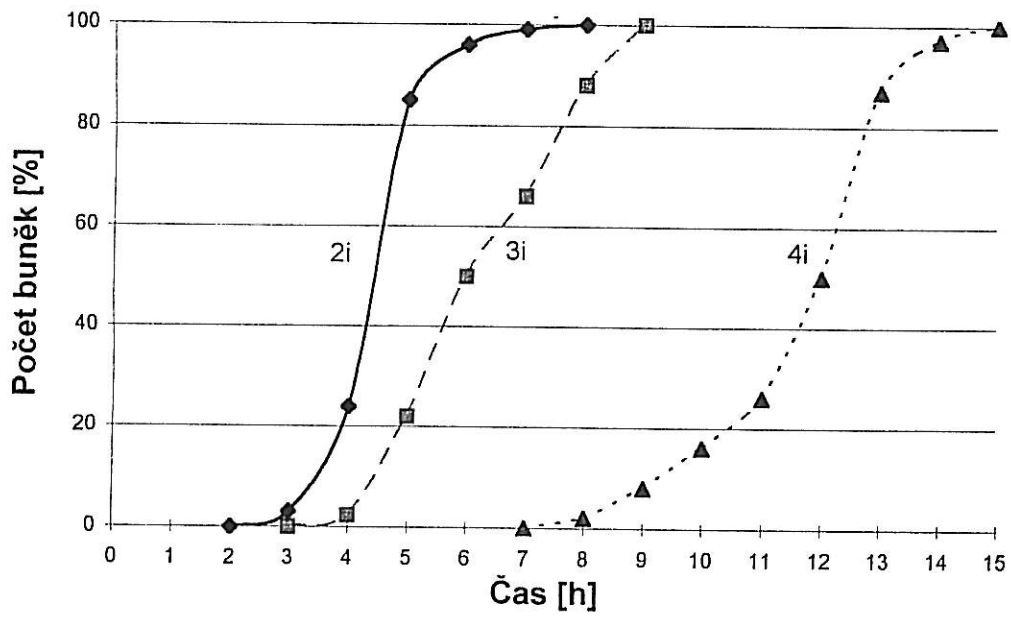


Graf č. 9 Indukční křivky řasy *Scenedesmus obliquus* kmen HINDÁK 94/11 při 25 W.m<sup>-2</sup>

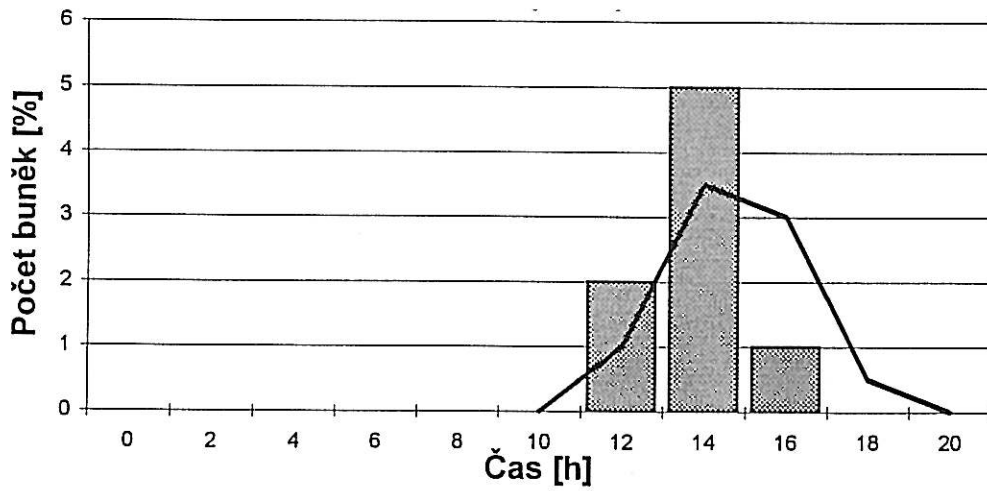


Graf č. 10 Indukční křivky řasy *Scenedesmus obliquus* kmen HINDÁK 94/11 při 60 W.m<sup>-2</sup>.

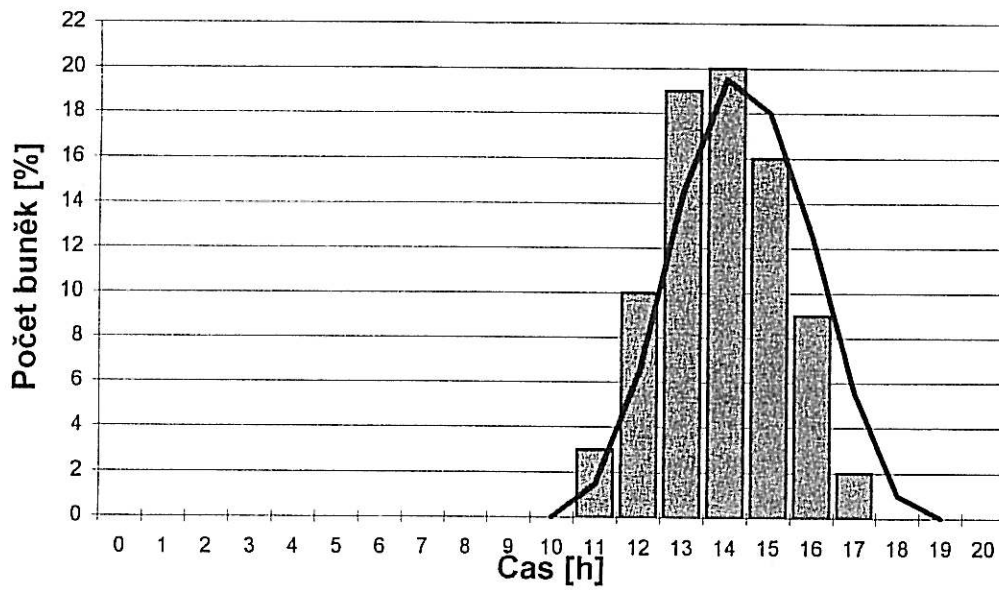




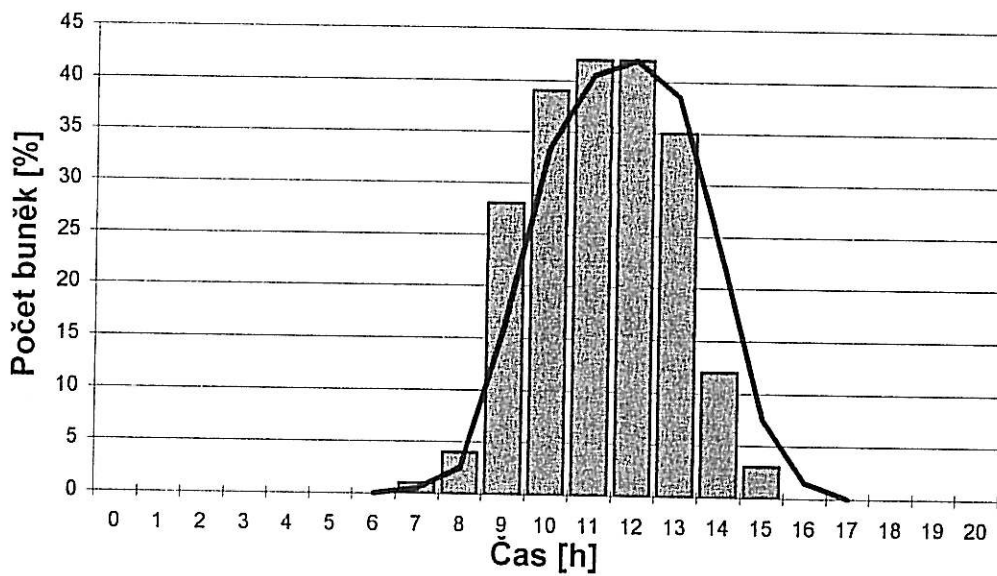
Graf č. 11 Indukční křivky řasy *Scenedesmus obliquus* kmen HINDÁK 94/11 při  $110 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ .



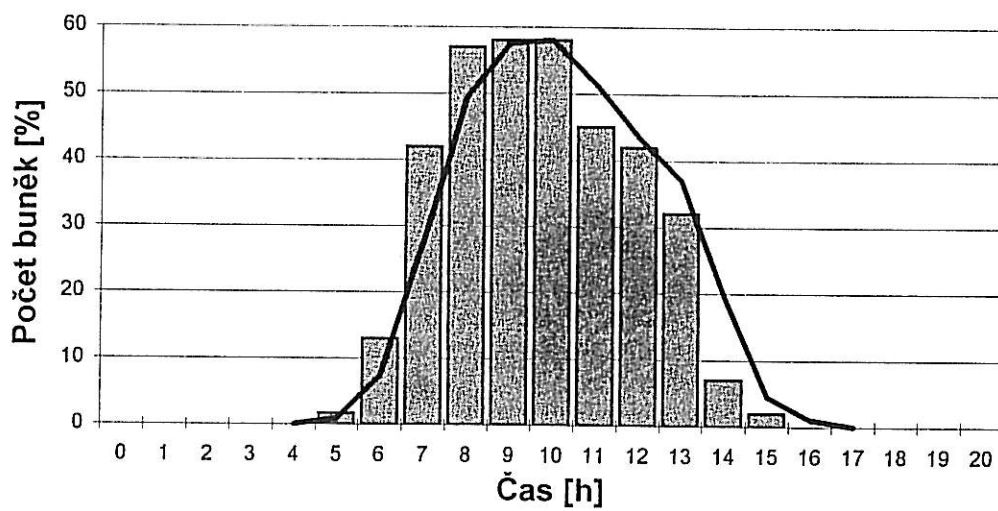
Graf č. 12 Počet zoospor řasy *Scenedesmus obliquus* kmen HINDÁK 94/11 při  $12 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ .



Graf č. 13 Počet zoospor řasy *Scenedesmus obliquus* kmen  
HINDÁK 94/11 při 25 W.m<sup>-2</sup>.



Graf č. 14 Počet zoospor řasy *Scenedesmus obliquus* kmen  
HINDÁK 94/11 při 60 W.m<sup>-2</sup>.



Graf č. 15 Počet zoospor řasy *Scenedesmus obliquus* kmen  
HINDÁK 94/11 při 110 W.m<sup>-2</sup>.

#### IV. DISKUZE

Produkce pohyblivých buněk (zoospor nebo gamet) u chlorokokální řasy *Scenedesmus obliquus*, kmen WH 50, poprvé pozoroval TRAINOR (1963) a naposledy tento jev dokumentovali HINDÁK a TRAINOR v roce 1995. Vlivem nízkých teplotních podmínek společně s nedostatkem dusíku v kultivační půdě se dosáhlo tvorby a uvolnění zoospor z mateřské buňky. Zcela neobvyklým jevem je možnost pozorování těchto pohyblivých buněk rodu *Scenedesmus* ve venkovní masové kultivaci (LUKAVSKÝ, 1991). Produkce zoospor byla výsledkem kultivace za anaerobních podmínek. Podle CEPÁKA a kol. (1991) pozoroval LUKAVSKÝ (1991) pohyblivé buňky ve venkovní masové kultivaci, kde zřejmě došlo k vyčerpání dusíku, a anaerobii. CEPÁK (1993) pozoroval ve vzorcích sebraných ve stejné malé venkovní kultivační jednotce buňky řasy *Scenedesmus obliquus* podobné těm, které popsal LUKAVSKÝ (1991) ve venkovní masové kultuře. Buňky podobné zoosporám se vyskytovaly hojně, asi ve 30 % celkového počtu buněk druhu *Scenedesmus obliquus*. Jejich morfologie pod světelným mikroskopem byla téměř stejná jako u buněk, které popsal LUKAVSKÝ (1991). Jednalo se o buňky sférického tvaru s parietálním chloroplastem bez stigma a bez bičíku. Zoosporám podobné buňky se lišily ve velikosti, což nasvědčovalo tomu, že se nacházejí v různých stadiích buněčného cyklu, ačkoliv žádný vývoj zoospor u druhu *Scenedesmus obliquus* nebyl dosud pozorován (TRAINOR, 1965 a, TRAINOR; BURG, 1965 b, CAIN; TRAINOR, 1965). CEPÁK (1993) ověřoval za pomoci fluorescenčního mikroskopu stadium buněčného cyklu, ve kterém se buňky nacházely, překvapivě však nenašel žádné struktury obsahující DNA. Na druhou stranu největší buňky podobné zoosporám obsahovaly dvě jádra. V laboratoři byly navozeny podmínky, za nichž došlo k indukci tvorby zoospor ve venkovní masové kultivaci. Na základě provedených pokusů a pozorování zpochybnil CEPÁK (1993) možnou existenci zoospor u rodu *Scenedesmus* a tyto buňky označil za buňky rostoucí za nepříznivých podmínek.

Podle našeho názoru se jedná o zatím nedostatečně prozkoumaný proces, který má mnoho otázek nezodpovězených. Lze pozorovat výskyt zoospor, ale nepodařilo

se zatím určit, jestli tyto buňky patří k pohlavním typům  $mt^-$  a  $mt^+$ , jakým způsobem by mohla probíhat kopulace, interakce gamet, splynutí protoplastů či jader. Jedná se zřejmě o proces, který dnes existuje jen jako pozůstatek nějakého úplného procesu rozmnožování. Rovněž však nevíme, proč pravděpodobně došlo u rodu *Scenedesmus* ke ztrátě této evoluční výhody. Z našich výsledků plyne, že v laboratorních podmínkách lze proces tvorby zoospor úspěšně indukovat vnějšími podmínkami v procesu kultivace.

## V. ZÁVĚR

Ve všech našich provedených pokusech jsme měřili absorpenci suspenze buněk řas, stanovovali indukce (charakterizují fázi v buněčném cyklu), výskyt a počet zoospor. Vzhledem k několika stům vzorků získaných během jediného pokusu nebylo možné ihned vzorky mikroskopovat, a bylo nutné je fixovat glutaraldehydem. U takto získaných vzorků je však mnohem těžší detekce bičíků, než je tomu u živých buněk. Pozorování živých buněk by umožnilo lépe detekovat výskyt bičíků a celkové chování zoospor. Charakterizovali jsme hlavní reprodukční procesy v synchronních kulturách *Scenedesmus obliquus* kmen BARTOŠ a MANSO 1986/206 a srovnali s kmenem HINDÁK 1994/11, který v literatuře vykazoval doposud největší množství vzniklých zoospor. Zjistili jsme, že kmen HINDÁK 1994/11 nemá schopnost tvořit při všech testovaných ozářenostech dvoubuněčné autospory, zatímco kmen BARTOŠ a MANSO 1986/206 ano, čímž se podobá nerozpadavým typům *Scenedesmus* jako *Scenedesmus quadricauda*.

Další možností, jak prokázat výskyt zoospor u řasy *Scenedesmus obliquus*, je pozorování těchto buněk elektronovým mikroskopem. Při pozorování zoospor v elektronovém mikroskopu jsme zjistili, že zoospory uložené v mateřské buňce mají bičíky, které ovšem nebylo snadné pozorovat. Z fotodokumentace je dobře vidět vícevrstevná buněčná stěna oddělující autospory charakteristicky stlačené uvnitř mateřské buňky, na příčném řezu vegetativní buňkou lze vidět zřetelný pyrenoid v obalu škrobových zrn a dvojitou buněčnou stěnu, jádro buňky a kolmo prořízlé bičíky. Bylo velmi obtížné pořídit snímky řezů zoospor z elektronového mikroskopu, protože jejich procentuální zastoupení je ve vzorcích obvykle velmi nízké. Vyhodnocení též komplikovaly četné bakterie obsažené ve vzorcích.

Z našich výsledků vyplývá, že řasa *Scenedesmus obliquus* je schopná tvořit pohlavní stadia - zoospory. Tyto pohyblivé buňky se nám podařilo pozorovat světelným mikroskopem pouze v mateřské buňce. Bičíky jsme viděli jen sporadicky. Podařilo se nám navodit vhodné podmínky pro indukci a pro tvorbu zoospor. Podstatou podmínek pro iniciaci tvorby zoospor bylo dodržení podmínek pro vyloučení dusíku ze živného roztoku, dále temné prostředí a nízká kultivační

teplota udržovaná pomocí temperované lázně. Zoospory nevznikaly v prvních fázích po převedení buněk do podmínek vhodných pro indukci tvorby těchto bičíkatých buněk, ale až po několika hodinách. Počet zoospor vzhledem k počtu ostatních buněk narůstal až do určité doby, kdy dosáhl svého maxima a poté začal klesat. Po několika hodinách již nebylo možné zjistit tyto buňky ve zkoumaných vzorcích. Zoospory se tvořily ve velké míře jen tehdy, dosáhly - li mateřské buňky svého růstového a dělicího maxima, což bylo dobře patrné z charakteru indukčních křivek, které popisují stav buněčného cyklu, dělení buněk a rychlost růstu populace. Je tedy zřejmé, že vznik zoospor je vázán na dostatečnou zralost mateřské buňky, což je překvapující zjištění, protože k tvorbě zoospor dochází obvykle již na začátku buněčného cyklu v G1 fázi u mnoha řas. Například u rodu *Chlamydomonas* probíhá indukce vzniku zoospor na počátku G1 fáze, která se nazývá „precommitment period“ též za nepřítomnosti dusíku. V našich experimentech byla dostatečná zralost buněk závislá především na ozáření suspenze buněk světelnými tělesy. Vyšší ozáření umožňovala rychlejší růst buněk a následné dělení v průběhu temné periody. Existuje domněnka, že tvorba zoospor u rodu *Scenedesmus* je pouze pozůstatek dřívějšího pohlavního procesu. Tento názor, vzhledem k současným znalostem o pohlavním rozmnožování rodu *Scenedesmus* však nemůžeme dokázat ani vyvrátit, jistě by to znamenalo daleko více času a úsilí, což zdaleka převyšuje rámeček této práce.

## PODĚKOVÁNÍ

Během své práce jsem používala metodických postupů vyvinutých v Botanickém ústavu v Třeboni. Děkuji svému školiteli RNDr Jaromíru Lukavskému za všestrannou pomoc a vedení během celé mé práce. Děkuji RNDr Vladislavovi Cepákovi za odborné připomínky a cenné rady, které mi poskytl. Mé dík patří i dvěma vynikajícím asistentkám Marii Kašpárkové a Vlastě Titlové, které mi vždy ochotně pomohly. Práce byla podpořena z grantů Biologické fakulty JČU a grantu GAČR 204/96/0130.



## VI. LITERATURA

- BERGMAN, K.; GOODENOUGH, U. W.; GOODENOUGH A. D.; JAWITZ J.
- CAIN, J. R. ; TRAINOR, F. R. (1976): Regulation of gametogenesis in *Scenedesmus obliquus* (*Chlorophyceae*). - J. Phycol. **12**: 383 - 390.
- CEPÁK, V. ; KOVÁČIK, L. a KOMÁREK, J. (1991): DNA - containing structures (nukleoids) in some *Cyanophytes* / *Cyanobacteria* as revealed by DAPI fluorescent staining. - Arch.Hydrobiol., Algal. Stud. **64**: 25 - 39.
- CEPÁK, V. (1993): *Scenedesmus obliquus* zoospores in outdoor mass culture - reality or artefact? - Arch. Hydrobiol., Algal. Stud. **71**: 37 - 42.
- CONWAY, K.; TRAINOR, F. R. (1972): *Scenedesmus* morphology and flotation. - J. Phycol. **8**: 138 - 143.
- DOUCHA, J.; MARVEN, P; PŘIBIL, S.; LHOTSKÝ, O. (1976): Synchronní kultury. - Kolokvium o řasových testech. Dům techniky ČVTS, Č.Budějovice. 85 - 97.
- EGAN, P. F.; TRAINOR, F. R. (1989): The role of unicells in the polymorphic *Scenedesmus armatus* (Chod.) Chod. (*Chlorophyceae*). - J. Phycol. **25**: 65 - 70.
- FOTT, B. (1967): Sinice a řasy. - Akademia, Praha. 272 - 275.
- GAVIS, J.; CHAMBERLIN, C.; LYSTAD, L. (1979): Coenobial cell number in *Scenedesmus quadricauda* (*Chlorophyceae*) as a function of growth rtion in nitrate - limited chemostats. - J. Phycol. **15**: 273 - 275.
- GERLOFF, C.; FISHBECK, K. (1979): Quantitative cation requirements of several green and blue - green algae. - J. Phycol. **5**: 109 - 114.

- HEGEWALD, D. (1978): Morfological control and physiology of *Scenedesmus* strain 170. - Phycol. **20**: 1 - 11.
- HEGEWALD, E. (1982): Taxonomisch - morphologische Untersuchung von *Scenedesmus* - Isolaten aus Stammsammlungen. - Arch. Hydrobiol. **60**: 375 - 406.
- HINDÁK, J.; TRAINOR, F. R. (1995): *Scenedesmus obliquus* sexuality in synchronous cultures. - Arch. Hydrobiol., Algol. Stud. **94**: 121 - 132.
- ISHIURA, M. (1976): Gametogenesis of *Chlamydomonas* in the dark. - P. Cell Physiol. **17**: 1141 - 1150.
- KALINA, T. (1994): Systém a vývoj sinic a řas. - Karlova Universita, Praha. 107 - 114.
- KOMÁREK, J. (1964): Utility of synchronized algal cultures in experimental taxonomy. - P. C. Physiol. **5**: 385 - 391.
- KOMÁREK, J.; SIMMER, J. (1965): Synchronization of the cultures of *Scenedesmus quadricauda*. - Biol. Plant. **7**: 409 - 424.
- KOMÁREK, J.; LUDVÍK, K. (1972): *Scenedesmus obliquus* sp. nov. (*Chlorococcales*). - Phycol. **14**: 177 - 182.
- LUKAVSKÝ, J. (1991): Motile cells in *Scenedesmus obliquus* in outdoor mass culture. - Arch. Protistend. **140**: 345 - 348.
- MARTIN, N. C. ; GOODENOUGH, U. W. (1975): Gametic differentiation *Chlamydomonas*. - J. C. Biolog. **63**: 587 - 605.
- MITCHISON, J. M. (1971): The Biology of the Cell Cycle. - University Press, Cambridge. 155 - 162.
- NEČAS, O.; STREIBLOVÁ, E.; VONDREJS, V. (1981): Buněčný cyklus mikroorganismů. - Academia, Praha. 152 - 173.

- PICKET - HEAPS, J. D. (1975): Structure, reproduction and evolution in selected genera. - Sunderland, Sinauer Assoc. 118 - 122.
- STAUB, R. (1961): Ernährungsphysiologisch - autökologische Untersuchungen an der planktonischem Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. - Schweiz. Z. Hydrol. **23**: 82 - 198.
- ŠETLIK, I.; BERKOVÁ, E.; DOUCHA, J.; KUBÍN, S.; VENDLOVÁ, J.; TAMIYA, H. (1972): Synchronous cultures of algae. - P. Physiol. **17**: 1 - 26.
- SWALE, E. (1967): A clone of *Scenedesmus* with *Chodatella* states. - Br. Phycol. Bull. **3**: 281 - 293.
- TAMIYA, H. (1966): Synchronous cultures of algae. - P. Physiol. **17**: 1 - 26.
- TOMSON, A. M. ; DEMETS, R. (1989): Sexual communication *Chlorophyceae*. - J. Cell Sci. **65**: 102 - 106.
- TRAINOR, F. R. (1963): Zoospores in *Scenedesmus obliquus*. - Science **142**: 1673 - 1674.
- TRAINOR, F. R. (1965): Motility in *Scenedesmus* cultures incubated in nature. - Bull. Torrey Bot. Club **92**: 329 - 332.
- TRAINOR, F. R.; BURG, C. A. (1965 a): *Scenedesmus obliquus* sexuality. - Science **148**: 1094 - 1095.
- TRAINOR, F. R.; BURG, C. A. (1965 b): Motility in *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus obliquus*, and *Coelastrum microporum*. - J. Phycol. **1**: 14 - 17.
- TRAINOR, F. R. (1979): *Scenedesmus* AP1 (*Chlorophyceae*): polymorphic in the laboratory, but not in the field. - Phycol. **18**: 273 - 277.
- TRAINOR, F. R.; CAIN, J.; SCHUBERT, E. (1988): Morphology and nutrition of the colonial green alga *Scenedesmus*. - Bot. Rev. **42**: 5 - 25.

ZACHLEDER, V. (1972): The coupling of synthetic and reproduction processes in *Scenedesmus quadricauda*. - Arch.Hydrobiol., Algol. Stud. 7: 172 - 213.

ZACHLEDER, V.; ŠETLÍK, I. (1982): Effect of irradiance on the course of RNA synthesis in the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda*. - Biologia Plantarum, Praha, 24: 341 - 353.