

Jihočeská univerzita
Biologická fakulta
obor fyziologie rostlin

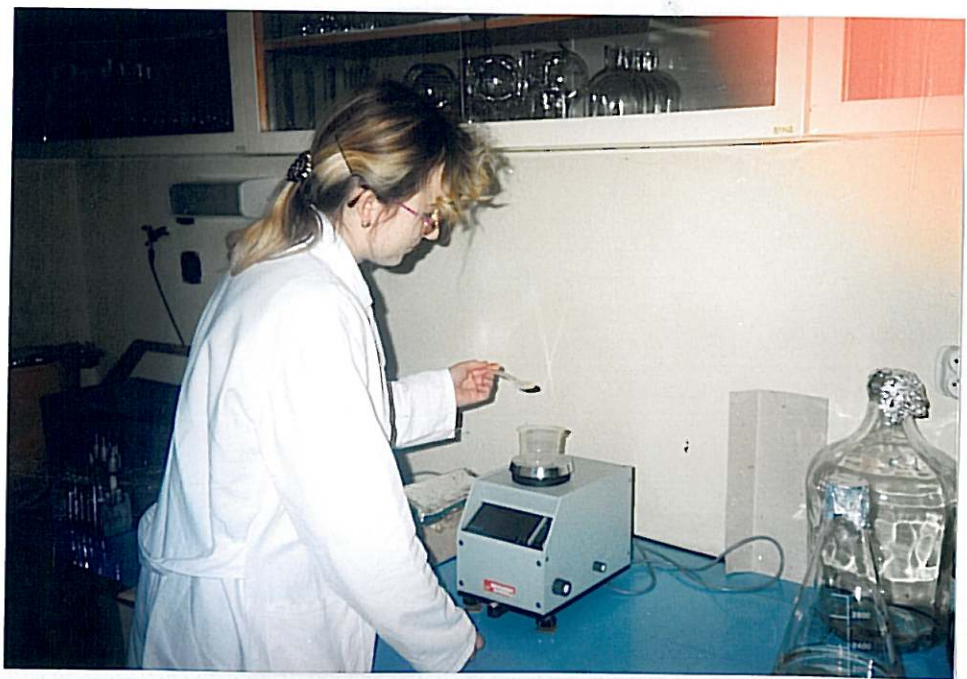
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE:

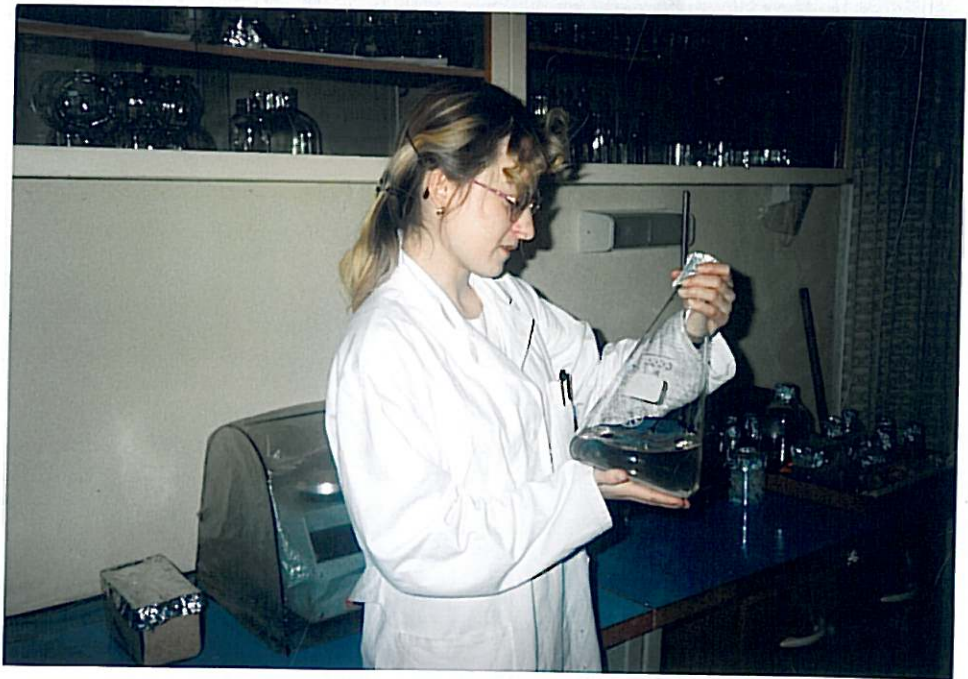
**SEXUÁLNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ
ŘASY
*CHLAMYDOMONAS EUGAMETOS***

Jana Barborková

Barborkova

České Budějovice 1996







OBSAH

I. ÚVOD	1
II. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
III. MATERIÁL A METODY	16
IV. VÝSLEDKY	20
Strategie experimentu.....	29
V. ZÁVĚR	31
VI. LITERATURA	32

I. ÚVOD

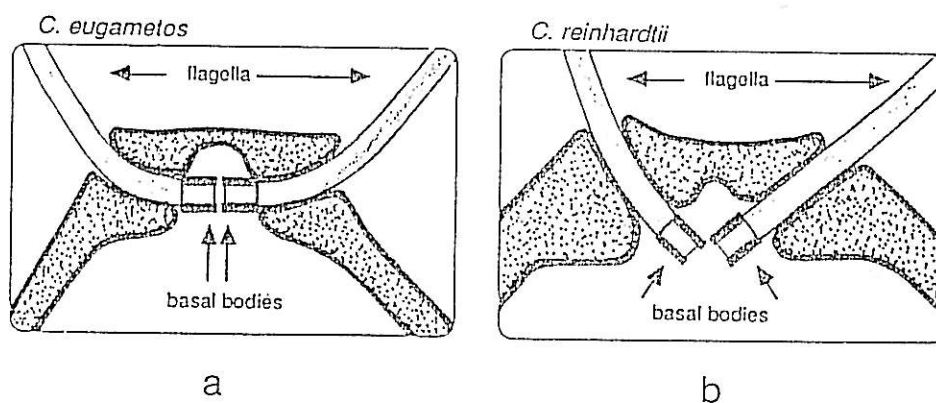
Všechny experimenty popisované v této práci jsem prováděla v laboratoři Mikrobiologického ústavu v Třeboni. Námět mé práce souvisel s výzkumným projektem Dr. Viléma Zachledera tj. pohlavním rozmnožováním řasy *Chlamydomonas eugametos*. Mým úkolem bylo zjistit podmínky, za nichž se tento druh řasy rozmnožuje a zejména podmínky procesu kopulace gamet.

V nedávné době byly publikovány dvě práce, jejichž námětem byl vztah gametogeneze k buněčnému cyklu řasy *Chlamydomonas eugametos*. První z těchto prací poukazuje na skutečnost, že pohlavní cyklus je součástí cyklu vegetativního. Nově oddělené dceřiné buňky byly schopné se chovat po velkou část G1 fáze tzv. "precommitment period" jako gamety (Zachleder a kol., 1991). V pozdější studii nebylo pohlavní chování vzniklých dceřiných buněk potvrzeno (Molendijk a kol., 1992). Rozdílné výsledky byly zjištěny při pěstování synchronní kultury *Chlamydomonas eugametos* za lišících se růstových podmínek. Z těchto důvodů bylo třeba přistoupit k ověření podmínek, které mohou hrát důležitou roli v pohlavním chování dceřiných buněk. Ve své práci jsem proto sledovala vliv složení živné půdy na schopnost vstupování nově oddělených dceřiných buněk ve fázi G1 do pohlavního cyklu. Použila jsem dvou nejpoužívanějších kultivačních půd dle Kates a Jones (1964) a (Björkman a kol., 1955).

II. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Řasa *Chlamydomonas eugametos*, česky pláštěnka, je jednobuněčná zelená řasa s dvěma bičíky. Povrch zoospor a gamet pokrývá buněčná stěna zvaná chlamys. Její důležitou složkou je glykoprotein s vysokým obsahem aminokyseliny hydroxyprolinu. Na rozdíl od jiných zelených řas chlamys neobsahuje polysacharidovou mikrofibrilární složku. V životním cyklu těchto bičíkovců se vyskytují palmelová stadia. Vznikají v době, kdy se bičíkovci přestávají pohybovat a pak žijí a rozmnožují se ve slizovém ložisku. Buňky mají výraznou polární stavbu s přesným rozmístěním organel. Pohyb zajišťují dva stejně dlouhé bičíky vyrůstající na předním konci buňky. Na povrchu bičíků je jemné vlášení. Bazální tělíska zaujímají protilehlou polohu a svírají tupý úhel (Obr. 1). Mikrotubulární kořeny mají křížové uspořádání.

Obr. 1. Orientace bazálních tělísek *Chlamydomonas eugametos* a *Chlamydomonas reinhardtii* dle Kaliny (1994).



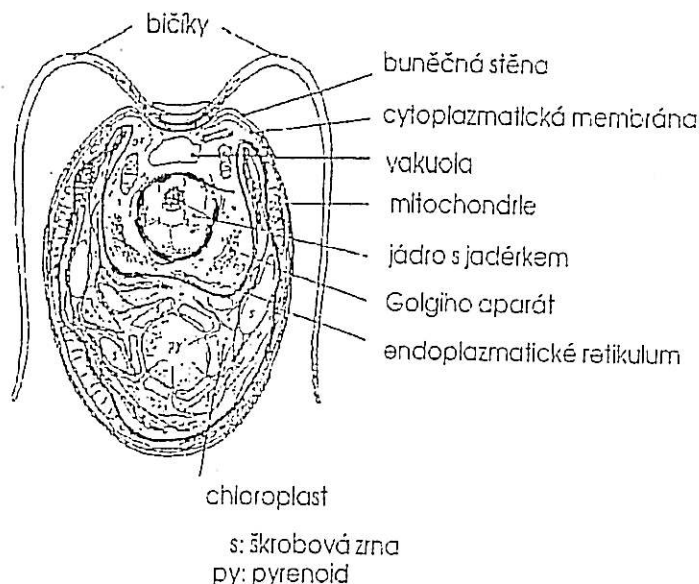
Jediný, zpravidla hrncovitý chloroplast obsahuje pyrenoid a stigma. Při pohlavním rozmnožování se vytvářejí gametospor a pohlavní proces je izogamický. K indukci tvorby gamet

dochází po vyčerpání dostupných zdrojů dusíku ze živného roztok (Kalina, 1994). Při izogamické kopulaci rozlišujeme homothalické a heterothalické druhy. Druh volvokální řasy *Chlamydomonas eugametos* patří mezi heterothalické druhy. Výsledkem kopulace gamet je pohyblivá planozygota. Ke karyogamii dochází až v zygospoře (Kalina, 1994).

Chlamydomonády se dobře pěstují na umělých živných půdách. Využívají se jako modelové organismy, např. v genetických studiích chloroplastu. Jsou zajímavým objektem pro biotechnologii, protože sušina obsahuje až 50 % bílkovin.

Buňky chlamydomonád mají nejčastěji kapkovitý tvar. Chlamys tvoří na apikálním konci ztlustlinu, papilu, kterou prostupují bičíky (Obr. 2). Na příčném průřezu sestává Chlamys z šesti submikroskopických vrstev. Vnější povrch tvoří periodická struktura, která se na příčném řezu jeví jako jediná řada drobných korálků. Periodickou strukturu tvoří glykoprotein s vysokým obsahem aminokyseliny hydroxyprolinu. Tato látka se vyskytuje i na povrchu bičíků, kde se zúčastňuje rozpoznávací reakce mezi mt^+ a mt^- gamety. Protoplast je v chlamydě uložen poměrně volně a může se v ní pohybovat.

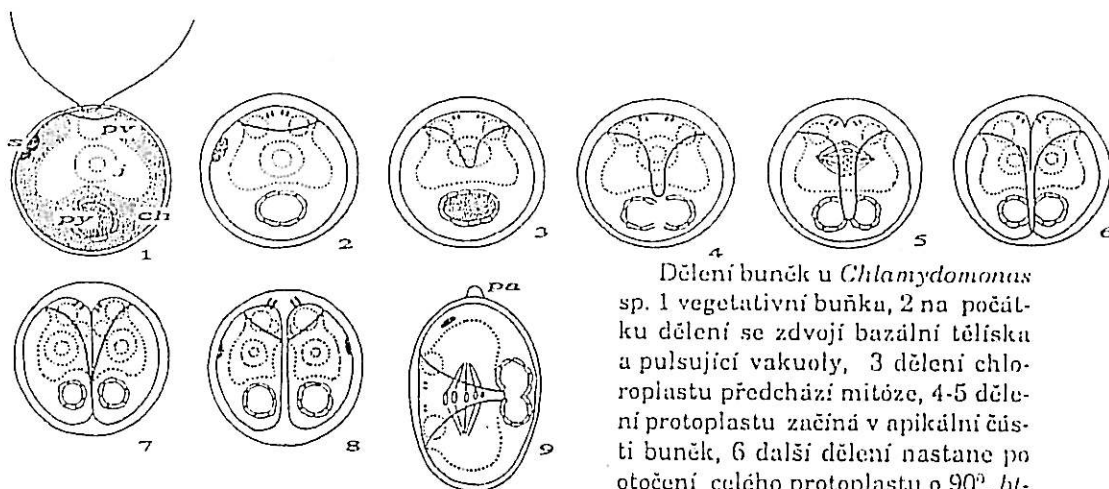
Obr. 2. Schématické zobrazení buněčné struktury řasy *Chlamydomonas*



Bičíky jsou morfologicky i funkčně rovnocenné. Jejich povrch je vybaven dvěma protilehlými řadami jemných glykoproteinových vlásků. Při plavání je pohyb bičků synchronní, probíhá v jedné rovině a odpovídá pohybu paží při vzpažení a upažení (Kalina, 1994).

Buňky jsou jednojaderné, obsahují chloroplast a jedinou, silně rozvětvenou mitochondrii a v blízkosti bičíkových kořenů dvojici pulsujících vakuol. Dělení buňky začíná replikací bazálních tělísek bičků, pak následuje dělení chloroplastu. Teprve potom proběhne první mitóza. Dělicí rýha probíhá ve směru podélné osy buňky (Obr. 3). Před začátkem druhého a případně i dalšího dělení se dceřiné protoplasty otočí vždy o 90° . Druhé dělení vypadá jako příčné, ale podle polohy organel je zřejmé, že se opět jedná o podélné dělení. Vyrejdění zoospor napomáhají autolyziny. Německý fykolog Schlösser zjistil, že autolyziny, které rozpouštějí buněčnou stěnu, produkované určitými druhy chlamydomonád působí pouze na chlamydu stejných nebo blízce příbuzných druhů (Schlösser, 1985).

Obr. 3. Dělení buněk *Chlamydomonas* dle Kaliny (1994)

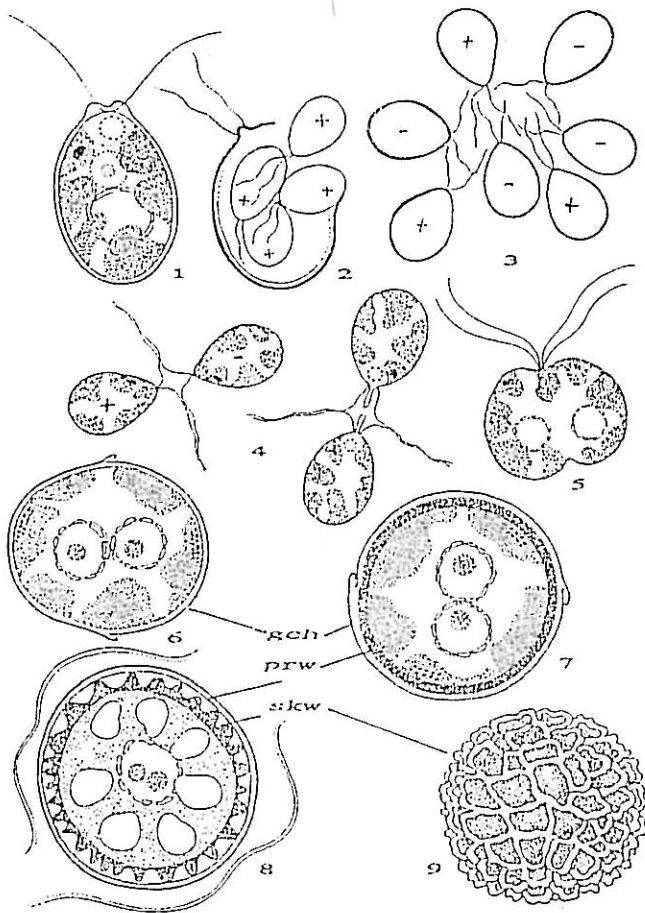


Dělení buněk u *Chlamydomonas* sp. 1 vegetativní buňka, 2 na počátku dělení se zdvojí bazální tělíska a pulsující vakuoly, 3 dělení chloroplastu předchází mitóze, 4-5 dělení protoplastu začíná v apikální části buněk, 6 další dělení nastane po otočení celého protoplastu o 90° . *bt* - bazální tělíska, *ch* - chloroplast, *j* - jádro, *pa* - papila, *pv* - pulsující vakuola, *py* - pyrenoid, *s* - stigma

Obecné poznatky o pohlavním rozmnožování řasy rodu *Chlamydomonas*

Celý proces můžeme sledovat v kultuře, kterou pěstujeme na tekuté živné půdě. Během čtyř až pěti dnů intenzivního růstu se vyčerpají zásoby dusíkatých živin z roztoku, a tím dojde k indukci dělení buněk, jejichž výsledkem jsou izogamety. Vegetativní buňky pohlavního typu mt^+ a mt^- se přeměňovaly v gametické buňky v živném roztoku, který neobsahoval dusík (Sager a Granik, 1954). Gamety se příliš neliší od vegetativních buněk, jsou pouze poněkud menší a jejich bičíky fungují jako pohlavní orgány (Obr. 4).

Obr. 4. Pohlavní rozmnožování homothalického druhu *Chlamydomonas geitleri*.



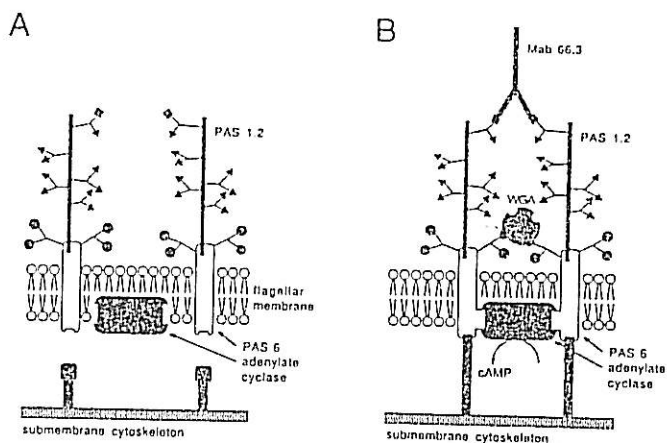
Pohlavní rozmnožování homothalického druhu *Chlamydomonas geitleri*. 1 vegetativní buňka, 2 izogamety opouštějí mateřskou chlamydu, 3 shlukování gametů, 4 párování gametů, 5 přilnutí gametů, 6 v elektronovém mikroskopu pozorujeme překrývání gametových buněčných stěn, 7 pod chlamydami se objevuje primární buněčná stěna zygoty, jádra a jiné orgány zůstávají oddělené, 8 třetí buněčnou stěnou je hustě strukturovaná stěna zygospory, v níž již proběhla karyogamie, 9 povrchová struktura zralé zygospory. *gch* - gametová chlamyda, *prw* - primární stěna zygoty, *skw* - sekundární stěna zygoty.

- **shlukování gamet.** Gamety těkají v těsném shluku, narážejí do sebe a dotýkají se konečky bičíků.

- **párování.** Ze shluku se oddělují kopulační páry, tvořené mt^+ a mt^- gametou. Jejich bičíky se postupně slepují po celé délce (aglutinační reakce), tím se buňky přibližují a papily obou gamet se orientují do přesně protilehlé polohy.

Aglutininy se počítají mezi periferní membránové proteiny a jsou spojeny s integrálními komponenty bičíkové membrány. Takové proteiny jsou nezbytné pro pohlavní aglutininy, protože přenášejí signál přes plazmatickou membránu. O tomto ukotvujícím proteinu, nebo aglutinin vázajícím proteinu publikoval Homan a kol. (1982). Komplex aglutininů (Obr. 5) pracuje podobným způsobem jako hormonální receptor zvířat, jehož proteinové komplexy jsou vystaveny působení látek z vnější i vnitřní strany plasmatické membrány (Kalshoven, 1993).

Obr. 5. Model pohlavního receptorového komplexu v bičíkové membráně *Chlamydomonas eugametos* v neaktivním (A) a v aktivním stavu (B). Aglutinin (PAS 1.2) je navázán na extracelulární doménu (PAS 6). (PAS 1.2) i (PAS 6) mají odlišné glykosilační pozice (Kalshoven, 1993).

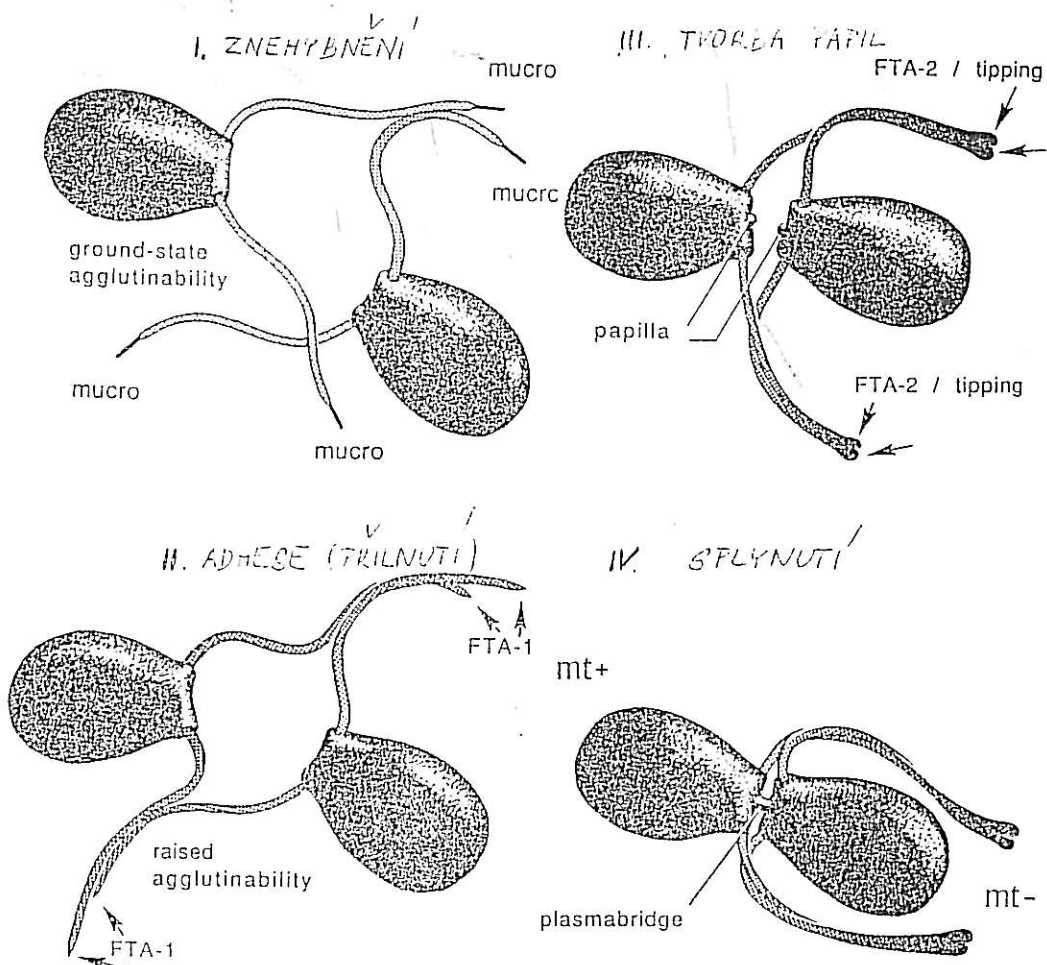


Gamety řasy *Chlamydomonas eugametos* produkují membránové váčky zvané izoaglutininy. Bylo zjištěno, že pocházejí z membrány bičíku, které jsou schopné se vázat na povrch bičíku opačného pohlavního typu. Jestliže se aglutinační faktor nalézá na povrchu mt^- izoaglutininu, spojí se s jinými membránovými glykoproteiny. Membránové proteiny se poté inaktivují. Aktivace membránových proteinů se docílila inkubací v extrahovaných glykoproteinech (Homan, 1982). Tubulinové jedy zamezují nárůst schopnosti bičíků vázat se na bičíky opačného pohlavního typu. Soudí se, že tubulin hraje významnou roli v aktivaci aglutininu. Kinetika aglutinační reakce ukazuje, že gamety mají lepší schopnost sdružovat se s gametami, které byly již aglutinovány, než s jinými volnými buňkami. Tím bylo prokázáno, že aglutinin může být aktivován též z vnější strany membrány (Tomson, 1989).

- **kopulace.** (Obr. 6) Působením sexuálních autolyzinů se chlomyda v oblasti papily otevře. V těchto místech se na obou gametách vytvoří plazmatické výběžky, které se spojí. Toto jemné spojení mezi gametami se postupně rozšiřuje. Vytvoří se plazmatický můstek a později dojde ke splynutí gamet v celé apikální oblasti. Gamety opačného pohlavního typu se rozeznají na základě intracelulárních signálů. Tyto signály posléze působí i na tvorbu papily a plazmatického můstku, pomocí nichž gamety splývají (Schuring, 1993). Iont Ca^{2+} funguje jako intracelulární signál v pohlavním procesu *Chlamydomonas eugametos*. Vápenatý iont se akumuluje v gametách a je vylučován v průběhu procesu pohlavní aglutinace.

Hladina Ca^{2+} se mění v průběhu pohlavního procesu.
 Aglutinační děj je doprovázen poklesem hladiny Ca^{2+}
 (Schuring, 1993).

Obr. 6. Schématické znázornění průběhu kopulace u druhu
Chlamydomonas eugametos (Tomson, 1989).



Gametogeneze

Po vyčerpání živných látek z roztoku se buňky začínají pohlavně rozmnožovat. Diferenciace buněk z vegetativního stavu do stavu gamet je závislá na světle (Ishiura, 1976). V poslední době se zjistilo, že gamety se formují i přítomnosti dusíkatého zdroje. Přítomnost iontů NH_4^+ má podstatný vliv na počátek gametogeneze tím, že působí na gen, který zabezpečuje syntézu specifických gametických komponent. Proces gametogeneze začíná, jestliže množství iontů NH_4^+ klesne pod určitou hladinu.

Na agarových plotnách dochází k procesu gametogeneze po pěti dnech kultivace (Martin a Goodenough, 1975). Palmelové stádium nemůže být klasifikováno jako pohlavní stádium, neboť buňky nemají bičíky, které jsou důležité při pohlavním procesu. Začátek gametického cyklu lze sledovat, jestliže kulturu zalijeme čerstvým živným roztokem.

Za 1 - 2 hodiny se buňkám vytvoří bičíky a jsou pohlavně aktivní. V roztoku však musí být přítomen nitrát ve vhodné formě.

Gamety dediferencují ve vegetativní buňky, které se začínají opět dělit. Palmelová stádia se změnila na buňky s pohlavní aktivitou pouze tehdy, když kulturu buněk zalijeme roztokem obsahujícím inhibitor proteinové syntézy. Naproti tomu kultury buněk zalité roztokem NH_4Cl (100 mM) nejsou schopné vstoupit do pohlavního cyklu. Bičíky se jim sice vyvinou, ale buňky zůstávají pohlavně inaktivní. Existuje domněnka, že ionty NH_4^+ selektivně blokují expresi gametických proteinů. Bičíky gamet, oproti vegetativním buňkám, jsou schopny se spojit

s bičíky opačného pohlavního typu, protože v bičíkové membráně jsou přítomny adhezivní molekuly (Bergman, 1975).

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. Kromě toho, gamety mají nízkou metabolickou aktivitu a mohou přežívat za nepříznivých podmínek řadu měsíců (Tomson, 1989).

- **planozygota.** Pohyblivá zygota je prvním výsledkem kopulace. V tomto stadiu se slepené bičíky opět uvolní a planozygota se čtyřmi bičíky, dvěma dosud oddělenými chloroplasty a dvěma jádry je pokryta překrývajícími se chlamydami obou původních gamet.

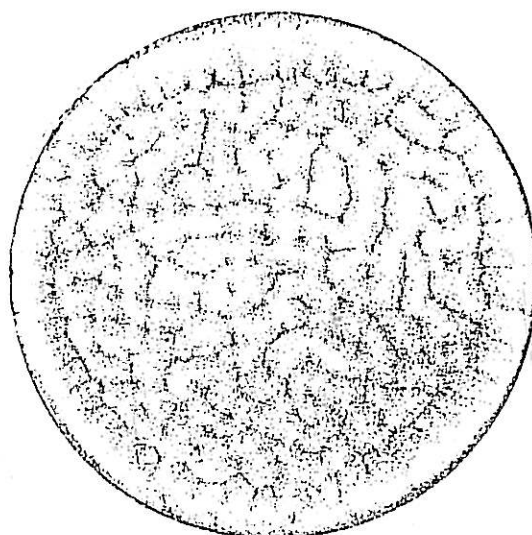
- **primární stěna mladé zygoty.** Primární stěna je pružná vrstva homogenního materiálu, který se objeví pod překrývajícími se chlamydami na povrchu mladé zygoty. Splývání protoplastů je již ukončeno, ale všechny orgány, včetně jádra zůstávají oddělené.

- **sekundární stěna mladé zygoty.** (Obr. 7). Sekundární stěna je v pořadí již třetím obalem na povrchu zygospory. Zakládá se pod primární stěnou v době, kdy probíhá karyogamie. Zbytky chlamyd a primární stěna jsou v té době již z větší části odvrženy. Zralá stěna zygospory je tlustá, na povrchu výrazně strukturovaná, s vnější sporopoleninovou vrstvou. Její vnitřní obsah je nepřehledný. Spora má červenohnědou barvu.

Zrání zygoty

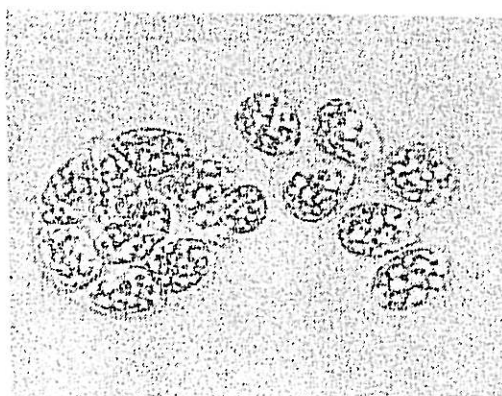
Zygota zraje za 24 až 48 hodin na světle. Po 3 až 10 dnech může být iniciována germinace světlem. Podmínky, při nichž by došlo k dokonalému vyklíčení zygospor zatím nebyly nalezeny (Ende, 1992).

Obr. 7. Mikrofotografie zralé stěny zygoty (Tomson, 1989)



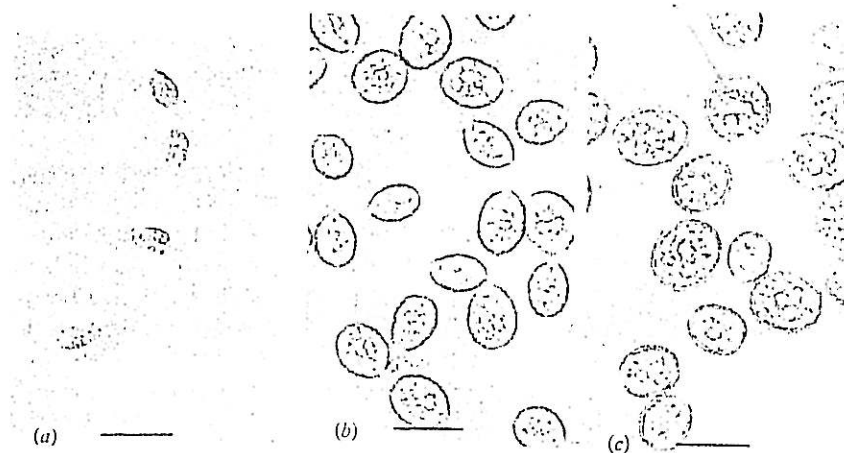
- **klíčení zygospory.** Klíčení je možné až po období klidu, které trvá nejméně tři týdny. Pak zprvu proběhne meiotické dělení a z prasklé zygospory vyrejdí čtyři haploidní zoospory (Obr. 8).

Obr. 8. Uvolnění dceřiných buněk po prasknutí mateřské buněčné stěny zygospory (Tomson, 1989).



Experimenty prováděné na synchronních kulturách *Chlamydomonas eugametos* v tekutých živných půdách prokázaly, že pohlavní cyklus je normální součástí buněčného cyklu (Zachleder a kol., 1991). Na počátku periody světla měly buňky elipsoidní tvar. V průběhu periody světla nabývaly kulatého tvaru. (Obr. 9). Po deseti hodinách se buňky začínaly shlukovat. Toto shlukování je typické pro rod *Chlamydomonas*. Mnoho buněk ztratilo svůj bičík před mitotickým dělením. Dále se zjistilo, že dělení buněk probíhalo během periody tmy a to na 8 - 32 dceřiných buněk. Čerstvě oddělené dceřiné buňky projevují pohlavní schopnost. Vytváří páry s dceřinými buňkami opačného pohlavního typu.

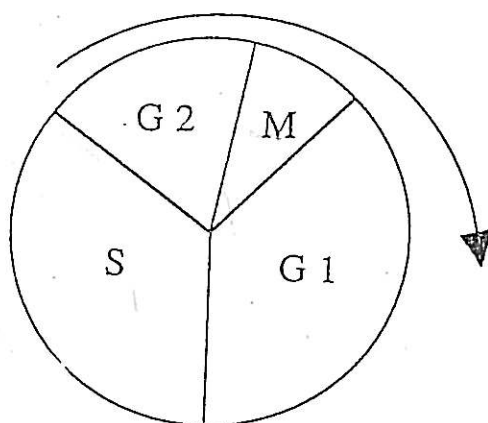
Obr. 9. Buňky *Chlamydomonas eugametos* různého stáří v synchronní kultuře. Osvětlení 50 W/m^2 , teplota 30°C , koncentrace CO_2 2% (v/v), počet buněk $10^6/\text{ml}$. a) 0 hod, b) 4 h, c) 8 h.



Toto chování dceřiných buněk lze ztotožnit s chováním pohlavně schopných buněk, které získáme po zalití tří týdnů staré plotny s řasami. Kromě toho byla kontrolována sexuální schopnost buněk po celý buněčný cyklus. Proto se průběžně odebíraly vzorky a zkoušela se schopnost aglutinovat

s gametami opačného pohlavního typu. Průměrně 70 - 80 % buněk bylo pohlavně schopných po celou fázi 'precommitment' (část G1 fáze) (Obr. 10), avšak jednu až dvě hodiny před první indukcí buněčného dělení (commitment point) přešly zpět do vegetativní fáze. Další pohlavní fáze nastala až po uvolnění dceřiných buněk ze sporangií.

Obr. 10. Čtyři fáze buněčného cyklu eukaryotické buňky. S = syntéza DNA, M = mitóza (jaderné dělení) a cytokineze (cytoplazmatické dělení), velká část G1 fáze = fáze před indukcí buněčného dělení.



Zjistilo se, že délka periody před indukcí buněčného dělení závisí na růstovém poměru. Změníme-li tedy vnější podmínky, změníme i růstový poměr a následně i dobu, po kterou jsou buňky schopné pohlavního rozmnožování. Tyto závěry byly potvrzeny experimenty, kde doba rozmnožování byla ovlivněna ozářením, teplotou (Zachleder a Ende, 1992).

Dále byl odvozen inverzní vztah mezi délkou periody pohlavního rozmnožování a růstovým poměrem. Koncentrace dusíku v živné půdě hraje zřejmě jen nepřímou roli jako regulační faktor růstu. Zajímavé je, že buňky, které byly vystaveny tmě v období před indukcí buněčného dělení si zachovaly po celou tuto dobu schopnost být gametami, avšak

buňky těsně před bodem indukce buněčného dělení již tuto schopnost ztrácely. Z toho plyne, že před bodem indukce buněčného dělení existuje již fáze vegetativní.

Po indukci buněčného dělení buňky vykazovaly opět schopnost pohlavního rozmnožování. Jestliže byly buňky kultivovány za stálého světla procento pohlavně schopných buněk po 30 hodinách bylo nižší 60ti procent (Zachleder a kol., 1991).

Charakteristika buněčného cyklu v synchronních kulturách *Chlamydomonas eugametos* ve vztahu ke gametogenezi byla zkoumána za pomoci synchronizace. Bylo zjištěno, že buňky produkují lepivý materiál, který znemožňuje buňkám přilnutí k substrátu během buněčného dělení. Sekreci tohoto materiálu regulují buňky *Chlamydomonas eugametos* buněčným cyklem. Nedávno bylo zjištěno, že dceřiné buňky v exponenciální fázi růstu se chovaly jako gamety, ačkoliv za našich podmínek tento výskyt gamet nebyl pozorován. Dceřiné buňky neaglutinují s normálními gametami opačného pohlavního typu. Závěrem bylo zjištěno, že gametogeneze v kulturách *Chlamydomonas eugametos* nemusí být součástí buněčného cyklu (Molendijk, 1992).

Gametogeneze v synchronních kulturách v exponenciální fázi se může vyskytnout jako následek podmínek kultivace použitých v práci Zachleder a kol. (1991). Hlavním rozdílem v růstových podmínkách je kultivační půda (Kates a Jones, 1964) a dále se liší v koncentraci buněk, které se nashromáždily na konci periody světla a zalitím kultury s novým čerstvým živným roztokem na počátku každé periody světla. Schopnost aglutinace zoospor na kultivační živné půdě dle Kates a Jones

(1964) se nepodařilo prokázat. V růstovém režimu podle Zachledera (1991) se nahromadila masa buněk na konci periody světla. Tento jev může být následkem nedostatku živin na konci periody světla způsobeným dělením buněk. Na konci každé periody byly buňky naředěny na koncentraci 10^6 buněk/ml čerstvým živným roztokem. Po zalití se buňky diferencovaly ve vegetativní buňky a znovu podstoupily gametogenezi na konci buněčného cyklu. Dediferenciaci gamet *Chlamydomonas eugametos* za určitého množství zdroje dusíku dokumentovali Kates a Jones (1964). Lze proto předpokládat, že cyklický výskyt gametické fáze pozorovaný v práci Zachleder a Ende (1992) není normální součástí buněčného cyklu, ale snad je ovlivněn pouze specifickými růstovými podmínkami (Molendijk a kol. 1992).

Cílem mé práce bylo ověřit, zda nedostatek dusíku má vliv na gametogenezi řasy *Chlamydomonas eugametos* a zda je proces gametogeneze ovlivněn použitím různých zdrojů dusíku v živných roztocích.

III. MATERIÁL A METODY

Základní živné roztoky

Živný roztok dle Björkman a kol. (1955)

$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	1.50 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.15 g/l)1.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.536 g/l
KH_2PO_4	1.70 g/l
CaCl_2 bezvodý	0.04 g/l
Chelatonát železito - sodný	0.023 g/l
Mikroelementy:	
H_3BO_3	0.285 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.125 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03 g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04 g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.012 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.050 g/l

pH 6,4 se upravuje pomocí NaOH - ze zásobního roztoku

4 g/100 ml

Živný roztok dle Kates a Jones (1964)

KNO_3	1.0 g/l)
KH_2PO_4	0.74 g/l
K_2HPO_4	0.136 g/l
MgSO_4	0.5 g/l
CaCl_2	0.05 g/l

1 ml mikroelementů podle kultivační živné půdy Šetlík a Zachleder (1982)

Živný roztok dle Šetlík a Zachleder (1982)

KNO_3	2.02 g /l
KH_2PO_4	0.34 g /l
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.011 g /l
Chelatonát železito-sodný	0.018 g /l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.988 g/l
Mikroelementy:	
H_3BO_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
$(\text{NH}_4)_6 \cdot \text{MoO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,013 g /l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,018 g /l

Základní metody

Použité procedury

- **Sterilizace.** Sterilizace roztoků probíhala v autoklávu při tlaku 150 kPa a teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Laboratorní sklo jsem sterilizovala vždy dvě hodiny v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 160 °C.

- **Kultivace** řas na Petriho miskách. Kultivace probíhala za stálého osvětlení 40 W dvěma zářivkami umístěnými rovnoběžně 35 cm nad kovovým temperovaným panelem vyhřívaným na teplotu 27 °C. Na kovovém temperovaném panelu jsem

uspořádala kultivační misky s pevnou živnou půdou a kultivovanými řasami tak, aby byl splněn princip rovnoměrného rozmístění Petriho misek a potažmo i princip stejných podmínek pro kultivování řas. Doba kultivace byla 14 až 21 dní.

- **Příprava živné půdy.** Do 3 litrových baněk jsem namíchala požadovanou živnou půdu a přidala agar (LACHEMA a. s. Brno o. z. Neratovice). Na jeden litr jsem dala 7.5 g agaru. Tuto směs jsem nechala sterilizovat v autoklávu. Po vyjmutí z autoklávu jsem nechala směs v baňce mírně vychladnout a poté za stálého míchání nalila do rovněž vysterilizovaných misek. Objem roztoku v miskách byl konstantní (25 ml).

- **Postup** při očkování řas na povrch agarových ploten. Nejvýše tři týdny staré kultury řas na Petriho miskách jsem zalila destilovanou vodou. Po třech hodinách jsem zvlášť slíla mt^+ i mt^- kmen rodu *Chlamydomonas eugametos*. Provedla jsem nezbytnou zkoušku kopulace kmenů. Na předem vysterilizovaných miskách s připravenou živnou půdou jsem rozetřela skleněnou kličkou kulturu řas. Pracovala jsem ve sterilním boxu za podmínek, které minimalizovaly možnou kontaminaci pokusných živných půd. Misku s naočkovaným agarem jsem zaklopila krycí miskou, popsala a uložila do kultivačního zařízení.

- **Fixace glutaraldehydem.** Při fixaci řas jsem používala 40 μ l/ml tak, aby výsledná koncentrace glutaraldehydu dosáhla hodnoty 2%.

- **Test kopulace.** Testovaný vzorek řas jsem si rozdělila do dvou odměrných válečků. Do roztoku řas v prvním válečku jsem

dala 25 % glutaraldehyd tak, aby výsledná koncentrace glutaraldehydu byla dvě procenta. Tím jsem řasy v testovaném vzorku zfixovala a mohla jsem později provést výpočet obsahu buněk na 1 ml roztoku. Z druhého válečku jsem vzala 1 ml roztoku mt^- řas a smíchala s 1 ml řas pohlavního typu mt^+ . Vzorek kmene mt^+ byl získán zalitím agarových ploten starých tři týdny pěstovaných v kultivačním zařízení na temperovaných panelech. Schopnost pohlavního rozmnožování těchto buněk se pohybovala kolem 70%. Smíchala jsem suspenzi buněk mt^+ a mt^- kmene a nalila do malých Petriho misek s průměrem 4 cm. Petriho misky jsem umístila na kultivační panely ozářené dvěma zářivkami (15 W / m^2) po dobu dvou hodin při pokojové teplotě. Za dvě hodiny jsem provedla fixaci glutaraldehydem. Spočítala jsem množství párů buněk a vypočetla procento kopulujících gamet z počtu buněk mt^- kmene.

IV. VÝSLEDKY

Z mých výsledků vyplývá, že živná půda podle Björkmana a kol. (1955) je nejvýhodnější pro kultivaci druhu řasy *Chlamydomonas eugametos* (Tab 2.). Toto mé tvrzení je patrné nejen z nárůstu buněk, ale i z větší ochoty vstupovat z vegetativního cyklu do pohlavního (Obr. 11, 12, 13). U sloučeniny NH_4Cl se tento vliv neprojevil. Byl dosažen velmi nízký nárůst buněk patrně vlivem vnějších podmínek, které se mi nepodařilo determinovat (Obr. 12, 14, 15). Malý nárůst byl však zaznamenán u obou typů živných půd, což vylučuje vliv jejich složení na zmíněný jev.

Kupodivu byl však zaznamenán velmi nízký výskyt gamet. Z toho usuzuji, že sloučenina NH_4Cl jako samostatný zdroj dusíku nestačí. Existuje domněnka, že ionty NH_4^+ selektivně blokují expresi gametických proteinů. Kultury zalité roztokem sloučeniny NH_4Cl nebyly schopny vstoupit do pohlavního cyklu (Bergman, 1975).

Močovina velmi dobře ovlivnila jak nárůst buněk tak i kopulaci gamet (Obr. 13, 14, 15). S klesajícím obsahem močoviny v živné půdě docházelo k poklesu nárůstu buněk, ale naproti tomu k vyššímu výskytu kopulujících párů. Dusičnan draselný se projevil jako nejvhodnější zdroj dusíku pro kultivaci rodu *Chlamydomonas* na pevných agarových plotnách. Při klesajícím procentuálním zastoupení sloučeniny KNO_3 došlo k výraznému vzestupu kopulace gamet, následkem vyčerpání živin z kultivační půdy (Obr. 11). Vyčerpáním zdrojů dusíku bez ohledu na typ sloučeniny vede k výraznému zvýšení procenta uvolněných gamet (Obr. 16). Nárůsty buněk na agarových

plotnách se zdrojem sloučeniny dusíku KNO_3 byly také nejvyšší a to zejména v živné půdě podle Björkmana a kol. (1955) (Obr. 14).

Tab. 1. Přírůstky počtu buněk, počet kopulujících gamet v pokusných variantách s různými sloučeninami a koncentracemi dusíku v živných roztocích dle Kates a Jones (1964) a Björkman a kol. (1955).

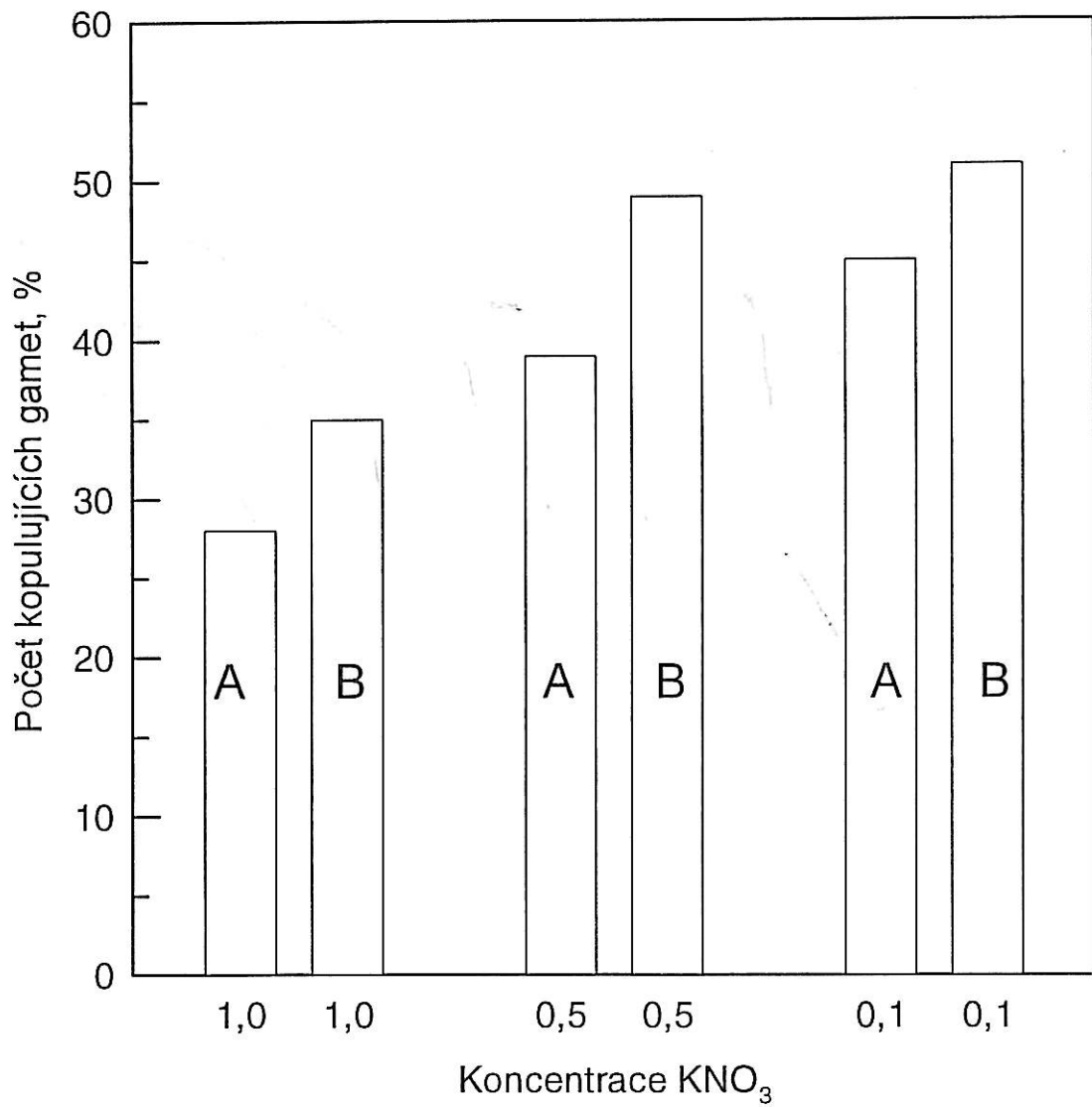
Živný roztok dle Kates a Jones (1964)

	Koncentrace dusíku		
	1,0	0,5	0,1
NH₄Cl			
Přírůstek počtu buněk (mil/ml)	2,1	2,0	2,4
Počet gamet (%)	8,5	8,5	10,0
KNO₃			
Přírůstek počtu buněk (mil/ml)	9,1	6,1	3,6
Počet gamet (%)	28,0	39,0	45,0
(NH₂)₂CO			
Přírůstek počtu buněk (mil/ml)	2,7	5,1	4,3
Počet gamet (%)	21,0	25,0	29,0

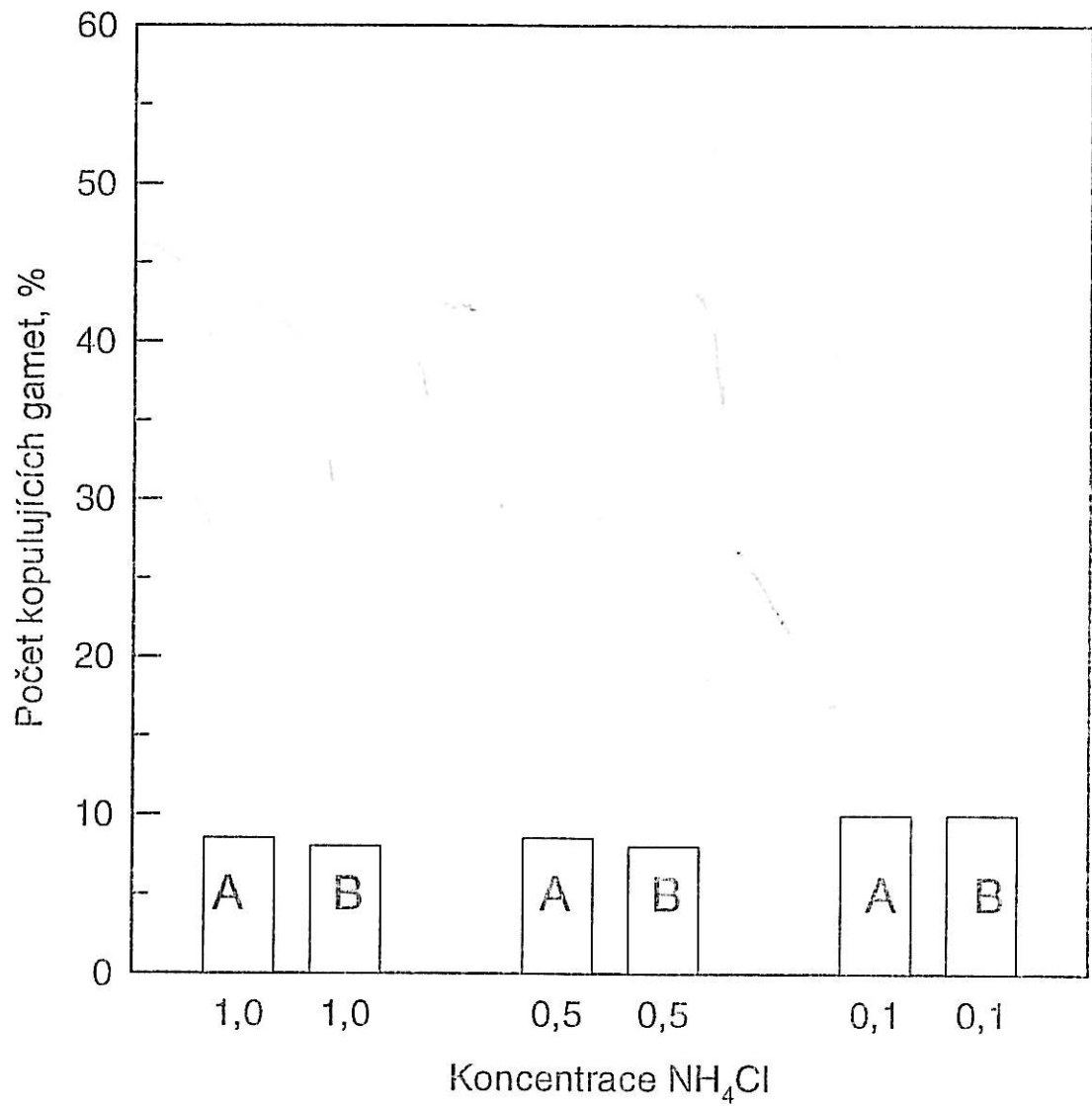
Živný roztok dle Björkman a kol. (1955)

	Koncentrace dusíku		
	1,0	0,5	0,1
NH₄Cl			
Přírůstek počtu buněk (mil/ml)	1,9	1,7	2,1
Počet gamet (%)	8,0	8,0	10,0
KNO₃			
Přírůstek počtu buněk (mil/ml)	8,4	7,8	4,9
Počet gamet (%)	35,0	49,0	51,0
(NH₂)₂CO			
Přírůstek počtu buněk (mil/ml)	6,5	9,1	8,3
Počet gamet (%)	29,0	41,0	45,0

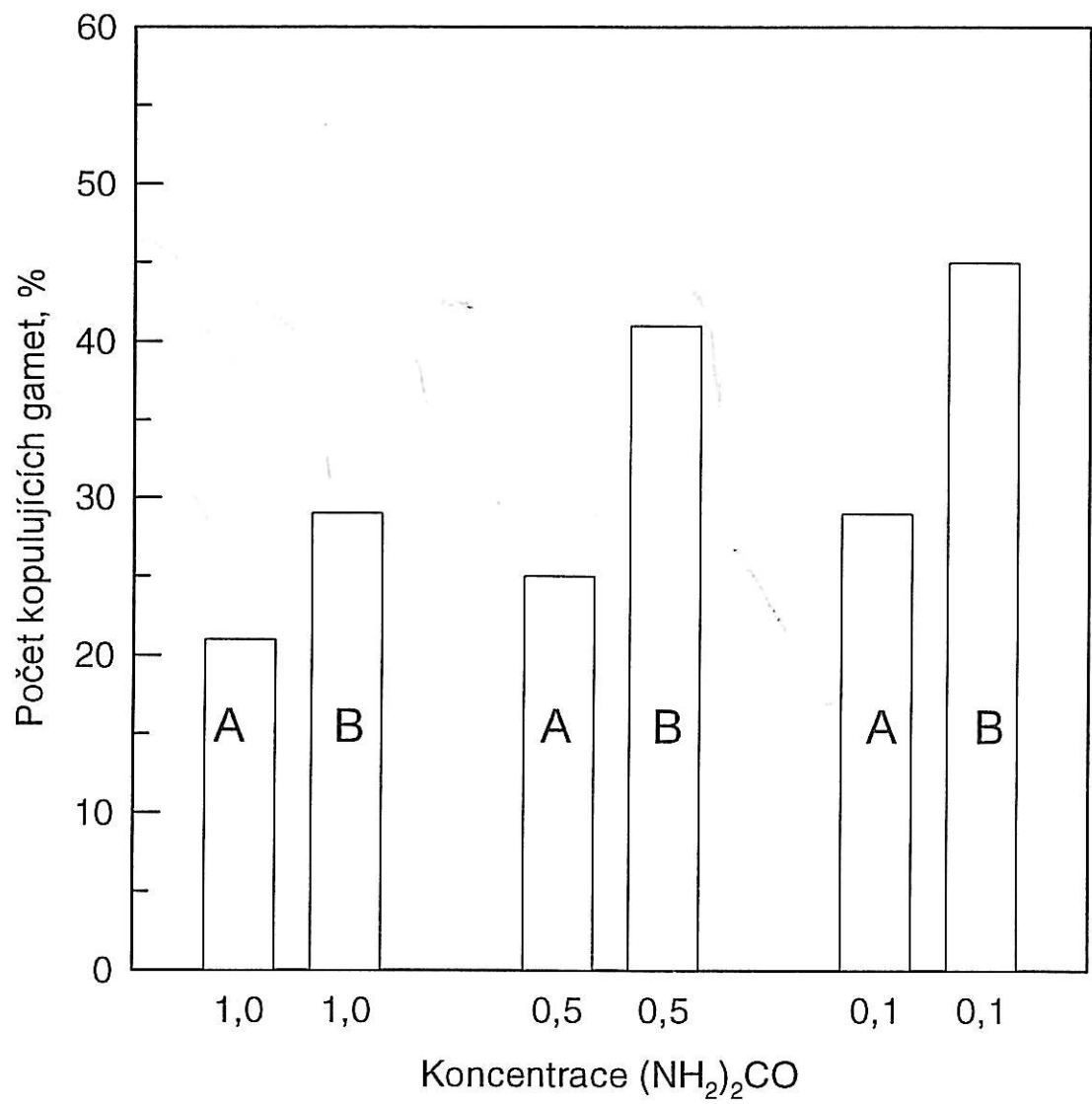
Obr. 11. Závislost počtu kopulujících buněk na koncentraci KNO_3 v živném roztoku dle Kates a Jones (1964) (A) a dle Björkman a kol. (1955) (B)



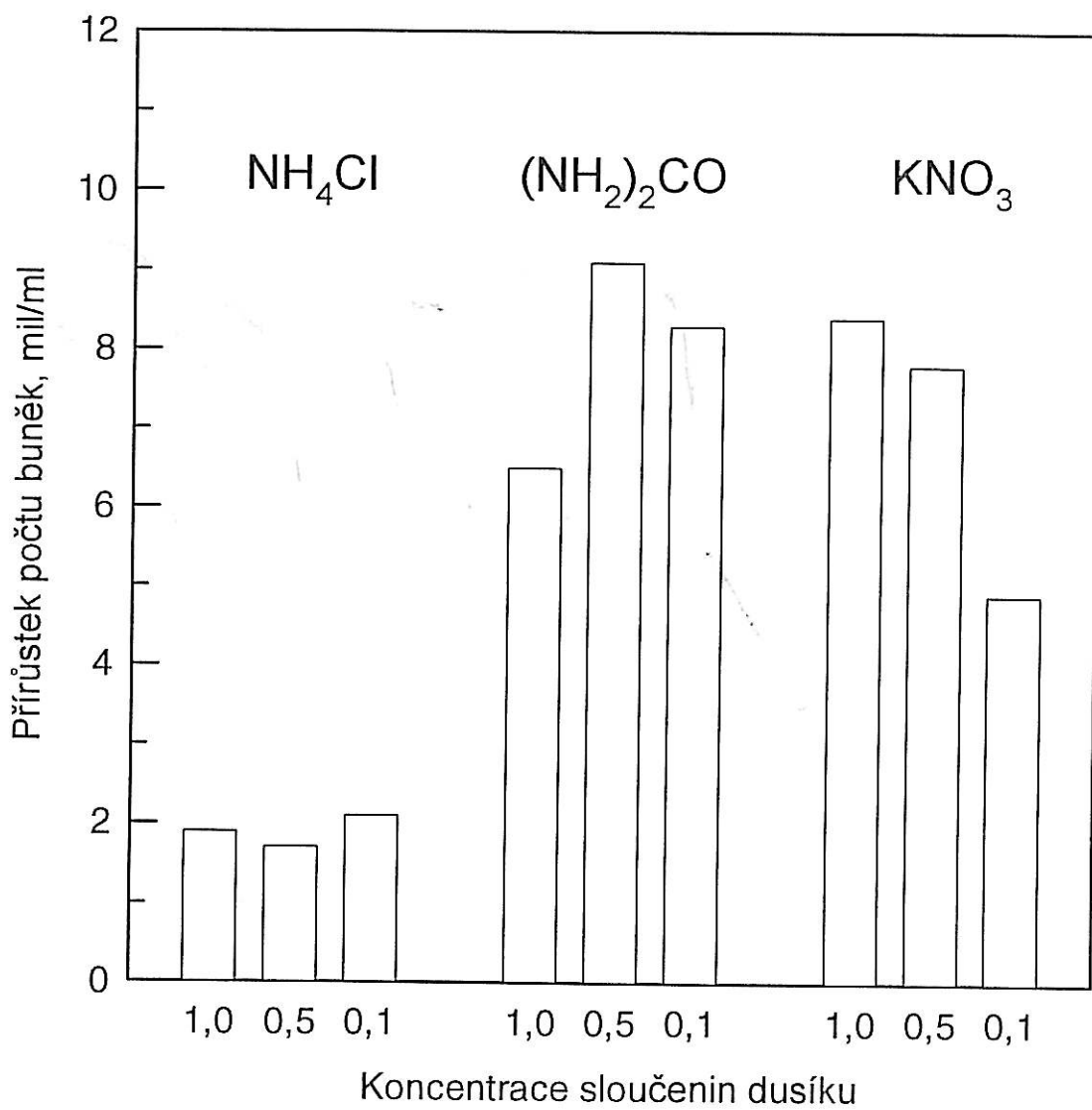
Obr. 12. Závislost počtu kopulujících buněk na koncentraci NH_4Cl v živném roztoku dle Kates a Jones (1964) (A) a dle Björkman a kol. (1955) (B)



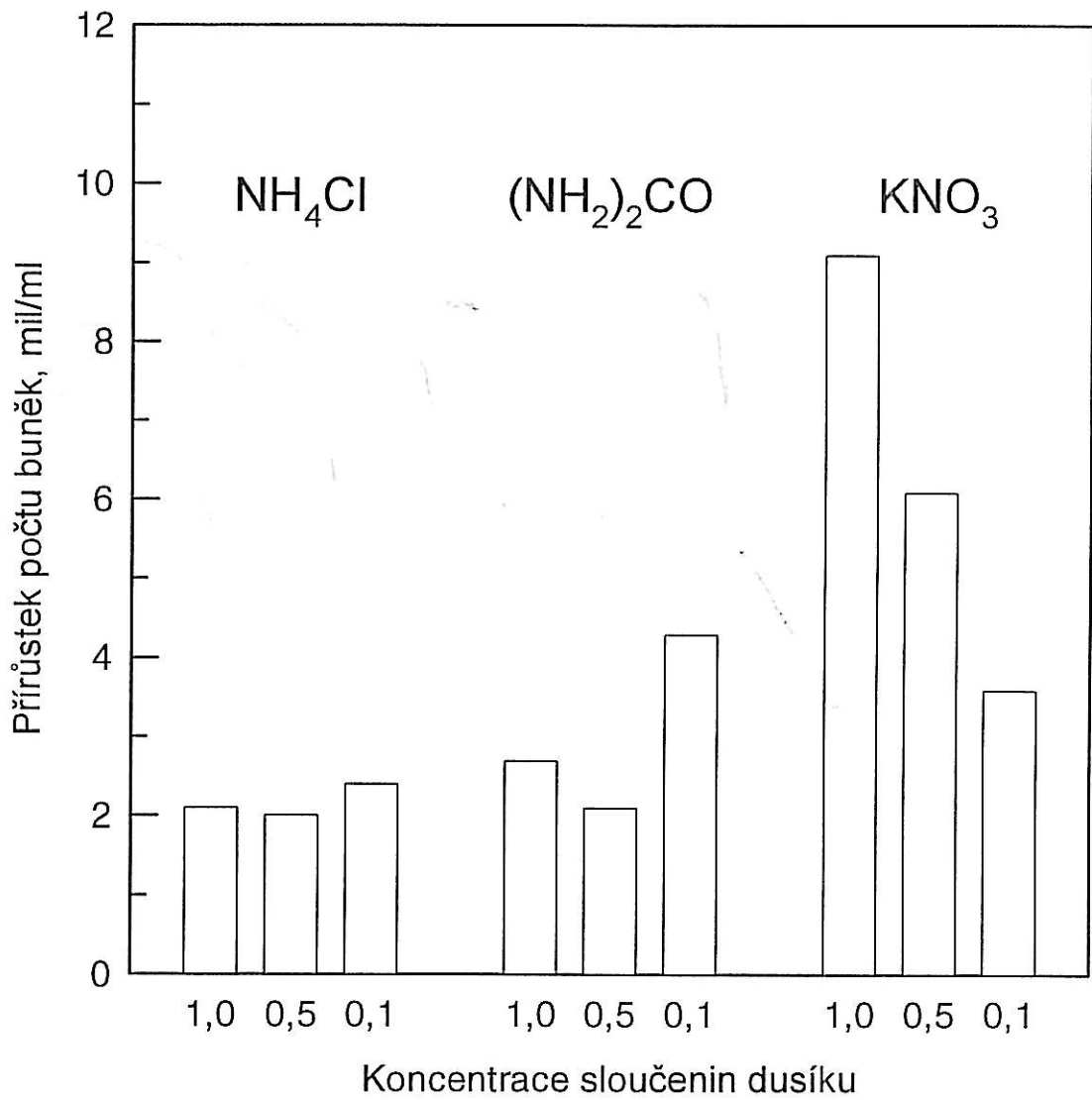
Obr. 13. Závislost počtu kopulujících buněk na koncentraci $(\text{NH}_4)_2\text{CO}$ v živném roztoku dle Kates a Jones (1964) (A) a dle Björkman a kol. (1955) (B)



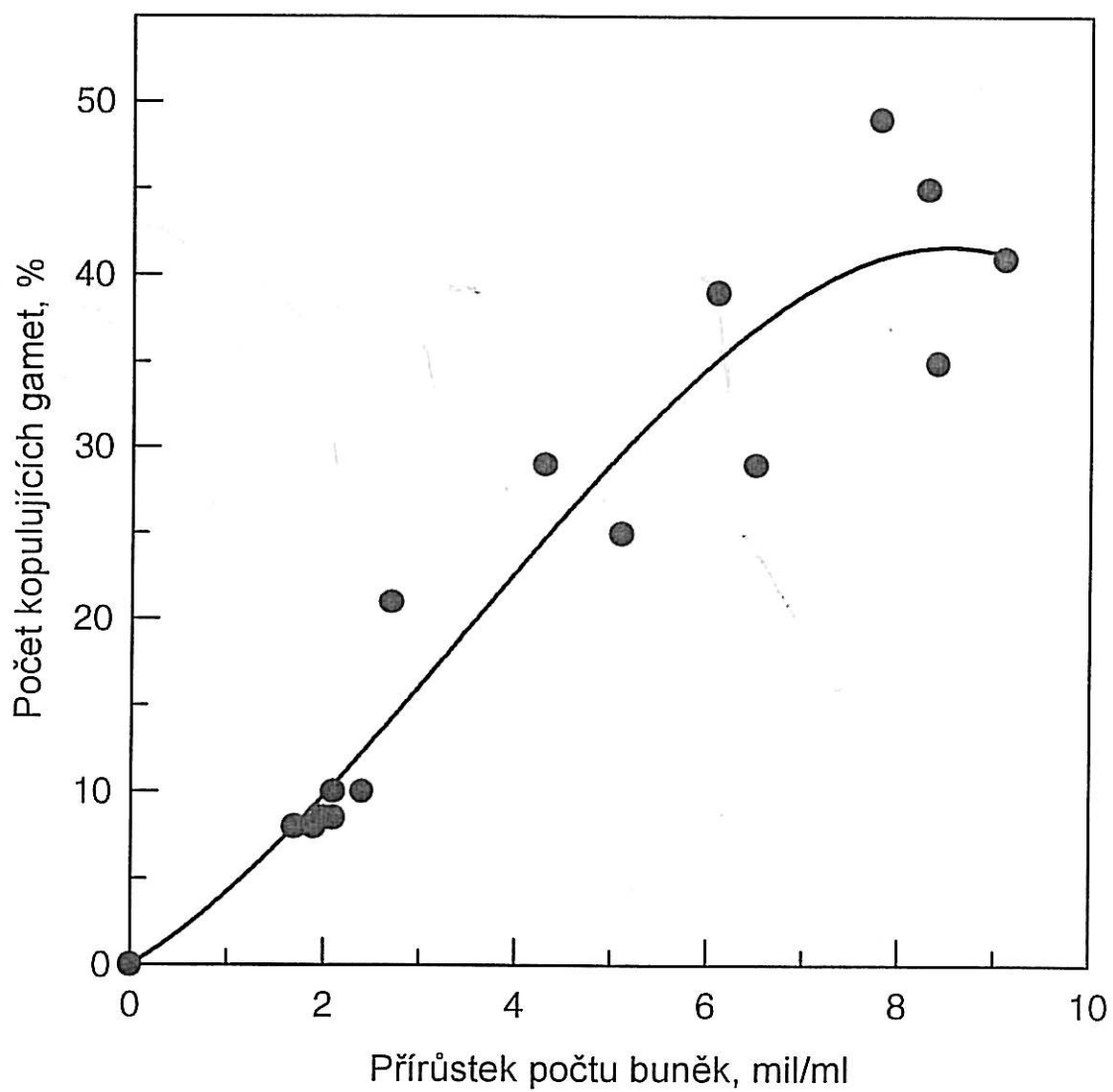
Obr. 14. Závislost přírůstku počtu buněk na koncentraci a typu sloučenin dusíku v živném roztoku dle Björkman a kol. (1955).



Obr. 15. Závislost přírůstku počtu buněk na koncentraci a typu sloučenin dusíku v živném roztoku dle Kates a Jones (1964)



Obr. 16. Závislost počtu kopulujících buněk na přírůstku počtu buněk v pokusných variantách s různými zdroji a koncentracemi sloučenin dusíku v živných roztocích dle Kates a Jones (1964) a dle Björkman a kol. (1955).



Strategie experimentu

Regulace kopulačního mechanismu u řas:

V koncepci pokusu jsem se zaměřila na dvě nejpoužívanější živné půdy při kultivaci řas rodu *Chlamydomonas* na Petriho miskách a to půdy podle Björkmana a kol. (1955) a živné půdy Kates and Jones (1964). Jako další kritérium jsem zvolila různé zdroje dusíku: sloučeniny KNO_3 , $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NH_4Cl . Pro pokus jsem použila media s různým obsahem sloučenin dusíku. Hodnotu navrženou autory medií jsem považovala za 100%. Experimentální media obsahovala 100, 50 a 10% této hodnoty.

Při použití různých zdrojů dusíku (KNO_3 , $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NH_4Cl) jsem množství přidávaných sloučenin volila tak, aby obsah dusíku v jednotlivých mediích byl stejný (Tab. 2).

Tabulka 2. Obsah sloučenin dusíku a obsah dusíku v nich obsaženém v pokusných variantách živných roztoků

%	KNO_3	Obsah N	$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	Obsah N	NH_4Cl	Obsah N
	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)
100	2,02	0,4	0,85	0,4	1,53	0,4
50	1,01	0,2	0,430	0,2	0,76	0,2
10	0,2	0,04	0,085	0,04	0,15	0,04

Živné půdy jsem připravovala bez dusíku. Do menších baněk (18) jsem odměřila množství dusíkatých sloučenin v hodnotách 100%, 50%, 10%, potom jsem přilila vysterilizovaná media o konstantním objemu (60 ml). Tato media jsem znovu

vysterilizovala a posléze nalila do 36 Petriho misek. Dále jsem připravila 10 misek s médiem pro kultivaci kmene mt^+ . Na 36 misek jsem naočkovala 14 dní starou kulturu kmene mt^- . Kmen mt^+ jsem pěstovala v živném roztoku dle Kafes a Jones (1964).

Po 14 dnech jsem pokus vyhodnotila. Misky s mt^- i mt^+ kmenem jsem zalila destilovanou vodou o objemu 15 ml na jednu misku a za pět hodin jsem provedla zkoušku kopulační schopnosti uvolněných buněk. Roztok s řasami jsem přelila do předem připravených válečků. Sadu dalších válečků jsem použila ke smíchání mt^+ i mt^- kmene o objemu 1 ml a 1 ml. Ze zbytku mt^- kmene jsem odměřila vždy 2 ml a okamžitě zfixovala. Za dvě hodiny jsem zfixovala též kopulující gamety a druhý den vyhodnotila počet kopulujících dvojic. Získaný výsledek jsem přepočítala na počet buněk řas mt^- kmene v jednom mililitru. Výsledek jsem vyjádřila v procentech. Pokus jsem opakovala 3x.

V. ZÁVĚR

Cílem experimentu bylo určit nejlepší zdroj dusíku a jeho nejpříznivější obsah pro růst - populace *Chlamydomonas eugametos*. Dále v rámci této práce jsem zjistila, jak podmínky kultivace, tj. obsah dusíku a jeho zdroje, působí na následnou kopulaci. Zjistila jsem, že stupeň kopulace gamet závisí na nedostatku živin, které buňky řas vyčerpaly ze živné půdy. Čím více dusíku bylo v živné půdě, tím byl nárůst buněk v kultuře silnější a rychlejší, avšak po 14 dnech, kdy jsem pokusy vyhodnocovala nedošlo k vyčerpání dusíku ze živné půdy do takové míry, aby následná kopulační schopnost gamet mohla dosahovat maximálních hodnot. Vlivem vyššího obsahu dusíku v živné půdě došlo k opožděnému vývoji gamet, což může být inhibice exprese genu pro translaci gametických komponent (Martin a Goodenough, 1975). Naopak, obsahovala-li živná půda minimální množství dusíku (10 %), došlo k jeho rychlému vyčerpání a buňky se dostaly do stresu způsobeným nedostatkem zdroje dusíku. Stres vyvolal kaskádu reakcí, které vyústily v diferenciaci a v pohlavní aktivitu gamet.

VI. LITERATURA

- BERGMAN, K.; GOODENOUGH, U. W.; GOODENOUGH, A. D.; JAWITZ, J.; MARTIN, H. (1975): Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. II. flagellar membranes and the agglutination reaction. *J. Cell Biol.* 67: 606-672.
- ENDE, H. van den; BRIEL, M. L. van den; LINDEMAN, R.; GULIK, P. van den; MUNNIK, T. (1992): Zygote formation in the homothallic green alga *Chlamydomonas monoica*. *Planta* 188: 551 - 558
- HOMAN, I. W. (1982): An analysis of the flagellar surface of *Chlamydomonas eugametos* with the respect to sexual agglutination. Disertační práce, Univerzita Amsterdam, Str. 53-75.
- CHIANG K.-S.; KATES, J. R.; JONES, R. F.; SUEOKA, N. (1970): On the formation of a homogenous zygotic population in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Dev. Biol.* 22: 655-669.
- ISHIURA, M. (1976): Gametogenesis of *Chlamydomonas* in the dark. *Plant Cell Physiol.* 17: 1141-1150
- KALINA, T. (1994): Systém a vývoj sinic a řas. Vydavatelství Praha Karlova Univerzita. Str. 107 - 114
- KALSHOVEN, H. W. (1993): Aspects of sexual agglutination in *Chlamydomonas eugametos* with special reference to the agglutinin complex in the flagella membrane. Disertační práce, Univerzita Amsterdam. Str. 27-34.
- KATES, J. R.; JONES, R. F. (1964): The control of gametic differentiation in liquid cultures of *Chlamydomonas*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 63: 157-164

- MARTIN, N. C.; GOODENOUGH, U. W. (1975): Gametic differentiation *Chlamydomonas reinhardtii*. Production of gametes and their fine structure. *J. Cell Biol.* 63: 587-605.
- MOLENDIJK, A. J.; EGMOND, P. van ; HARENG, M. A.; KLIS, F. M.; ENDE, van den H. (1992): Characterization of the cell cycle in synchronous cultures of *Chlamydomonas eugametos* in relation to gametogenesis. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1941-1947.
- PIJST, H. L. A. (1985): Sexual agglutination of the green alga *Chlamydomonas eugametos*: Symptoms and signals. Disertační práce, Univerzita Amsterdam. Str. 59-68.
- SÄGER, R.; GRANICK, S. (1954): Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Physiol.*: 37; 56.
- SCHLÖSSER, U. G. (1976): Entwicklungsstadien und sippen-spezifische Zellwand - Autolysine bei der Freisetzung von Fortpflanzungszellen in der Gattung *Chlamydomonas*. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 89: 1-56.
- SCHURING, F. (1993): Sex, signals and responses in *Chlamydomonas eugametos*. Disertační práce, Univerzita Amsterdam. Str. 43-55.
- TOMSON, A. M.; DEMETS, R. (1989): Sexual communication in the green alga *Chlamydomonas eugametos*. Disertační práce, Univerzita Amsterdam. Str. 18-30.
- ZACHLEDER, V.; ENDE van den, H. (1992): Cell cycle events in the green alga *Chlamydomonas eugametos* and their control by environmental factors. *J. Cell Sci.* 102: 469 -474.
- ZACHLEDER, V.; JACOBS, M.; ENDE van den H. (1991): Relationship between gametic differentiation and the cell

cycle in the green alga *Chlamydomonas eugametos*. J.
Gen. Microbiol. 137; 1333 - 1339.

ZACHLEDER, V.; ŠETLÍK, I. (1982): Effect of irradiance on the
Scenedesmus quadricauda. Biol. Plant. 24: 341-353.