

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze**

Katedra botaniky

Bakalářská práce

# Ultrastruktura eustigmatofytních řas

**Melánie Fišerová**

Praha 2009

Školitel:

RNDr., Yvonne Němcová, PhD.

## Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce shrnuje současné znalosti morfologie a ultrastrukturních znaků zástupců třídy Eustigmatophyceae, Stramenopila. Roku 1971 byla třída Eustigmatophyceae Hibberdem a Leedalem vyčleněna z třídy Xantophyceae na základě významných rozdílů v ultrastruktuře vegetativních buněk a hlavně zoospor. Vyčlenění bylo později potvrzeno molekulárními analýzami. Práce uvádí přehled znaků vybraných rodů: *Nannochloropsis*, *Pseudotetraëdriella*, *Monodopsis*, *Eustigmatos*, *Vischeria*, „*Pseudocharaciopsis*“, *Pseudocharaciopsis*, *Pseudostaurastrum* a *Chlorobotrys*. V teoretické části je dále věnován oddíl nejnovějším poznatkům o průběhu mitózy u *Nannochloropsis oculata* a unikátnímu chemickému složení zástupců třídy Eustigmatophyceae se zaměřením na EPA (eikosapentenová kyselina). V praktické části práce je provedeno srovnání ultrastrukturních znaků vegetativních buněk *Ophiocytium maius* (CCAP 855/1) a eustigmatofytního kmene E4f. Na základě ultrastruktury je diskutována příslušnost kmene *Ophiocytium maius* k třídám Xanthophyceae a Eustigmatophyceae.

Klíčová slova: Eustigmatophyceae, ultrastruktura, EPA, Xantophyceae

## Abstract

Proposed Bc. Thesis summarizes current knowledge on morphology and ultrastructural attributes of members of the class Eustigmatophyceae, Stramenopila, in light of known molecular phylogenies within the class. In 1971, the class Eustigmatophyceae was detached by Hibberd and Leedale from the class Xantophyceae on the basis of prominent differences in ultrastructure of vegetative cells and more importantly in ultrastructure of zoospores. The separate status of the class was later confirmed by molecular analyses. The thesis reviews morphological features of selected genera: *Nannochloropsis*, *Pseudotetraëdriella*, *Monodopsis*, *Eustigmatos*, *Vischeria*, „*Pseudocharaciopsis*“, *Pseudocharaciopsis*, *Pseudostaurastrum* and *Chlorobotrys*. Moreover the unique mitosis of *Nannochloropsis oculata* is described and chemical composition of eustigmatophytes, especially EPA (eicosapentaenoic acid) content is discussed. The aim of the practical part is to demonstrate the differences in the ultrastructure of the *Ophiocytium maius* (CCAP 855/1) and the eustigmatophyte E4f vegetative cells. On the basis of ultrastructure the classification of the *Ophiocytium maius* strain to the class Xanthophyceae and/or Eustigmatophyceae is discussed.

Key words: Eustigmatophyceae, ultrastructure, EPA, Xantophyceae

# Obsah

I.Úvod.....	4
II.Teoretická část.....	4
1.Základní charakteristika.....	4
2.Morfologické znaky eustigmatofyt.....	5
3.Taxonomické členění.....	6
a.Nannochloropsis (Hibberd).....	7
b.Pseudotetraëdriella (Hegewald).....	11
c.Monodopsis (Hibberd).....	12
d.Eustigmatos (Hibberd).....	12
e.Vischeria (Pascher).....	13
f.Chlorobotrys (Pascher).....	14
g.„Pseudocharaciopsis “.....	14
h.Pseudocharaciopsis (Lee a Bold).....	15
i.Pseudostaurastrum (Chodat).....	16
4.Diskuze.....	17
5.Mastné kyseliny.....	18
a.EPA v Nannochloropsis.....	18
b.Produkce EPA v Monodopsis subterraneus.....	19
III.Praktická část .....	21
1.Úvod .....	21
2.Materiál a metody.....	21
3.Výsledky.....	21
4.Diskuze.....	22
IV.Závěr.....	29
V.Použitá literatura.....	30

# I. ÚVOD

Třída Eustigmatophyceae (Hibberd & Leedale, 1971) patří do velmi diverzifikované a málo prozkoumané skupiny Stramenopil (Hackett et al., 2007) spolu s třídou Bacillariophyceae (rozsivky), Chrysophyceae (zlativky), Synurophyceae, Xantophyceae (různobrvky) a Phaeophyceae (chaluhy). Skupina byla vyčleněna ze skupiny Xantophyceae roku 1971 a popsána jako nová třída kvůli rozdílům v submikroskopické struktuře zoospor i vegetativních buněk (Hibberd & Leedale, 1971). Následné analýzy DNA potvrdily, že se jedná o samostatnou vývojovou linii a nové druhy jsou do této skupiny neustále průběžně přerazovány (Andersen et al., 1998).

Eustigmatophyceae je malá třída představovaná v současnosti dvanácti rody, které se v přírodě obvykle vyskytují v nízkých abundancích (Wehr & Sheath, 2003). Diverzita nepopsaných druhů je však obrovská. Ví se o existenci mnoha nových linií a druhů (Bailey et al., 2008). Skupina je stále poměrně málo prozkoumaná a cílem mé práce je sestavit přehled současných znalostí o ultrastruktuře několika vybraných rodů patřících do třídy Eustigmatophyceae. V praktické části se budu snažit srovnat ultrastrukturní znaky vegetativních buněk zástupců třídy Xantophyceae a Eustigmatophyceae a prakticky zvládnout metodiku zhotovení ultratenkých řezů. V diplomové práci se chci poté hlouběji věnovat ultrastruktuře více rodů Eustigmatofyt a zároveň jejich taxonomii.

## II. TEORETICKÁ ČÁST

### 1. Základní charakteristika

Eustigmatophyceae (Hibberd & Leedale, 1971) sdílejí společné znaky se skupinou Chromophyta, do které jsou zařazovány, ale v mnoha znacích se odlišují. Jejich přesné postavení v rámci skupiny je stále nejasné, ale je potvrzeno, že skupina je monofyletická (Andersen et al., 1998).

Buňky ve vegetativním stádiu mají jednoduchou morfologii. Jsou buď sférické, oválné, eliptické nebo nepravidelně kokální. Vyskytují se samostatně, ve slizovitých koloniích po dvou nebo po více buňkách. Obsahují obvykle jeden parietální žlutozeleně zbarvený chloroplast s nápadným pyrenoidem. V plastidech se vůbec neobjevuje chlorofyl *c* ani fukoxantin. Z tohoto důvodu se buňky jeví žlutozelené až zelené a mohou se často plést se zelenými řasami. Hlavním pigmentem je chlorofyl *a* a jako hlavní přídatný pigment se v plastidech vyskytuje violaxantin. Dalším přídatným pigmentem je  $\beta$ -karoten, zeaxantin a

vaucherixantin. Vaucherixantin byl zatím nalezen pouze u třídy Raphidiphyceae, Xantophyceae a Eustigmatophyceae.

Sexuální rozmnožování nebylo u této skupiny doposud pozorováno. Buňky se dělí nepohlavně pomocí nepohyblivých autospor nebo pohyblivých zoospor (Hibberd & Leedale, 1971). Zoospory mají obvykle jeden bičík a dvě bazální tělíska (rod *Pseudocharaciopsis* má dva bičíky u zoospor) a většinou i velké stigma uložené mimo chloroplast (z toho pochází označení celé skupiny „Eustigmatophyceae“ - pravé stigma, Hibberd & Leedale, 1971.)

U této skupiny se vyskytuje také struktura zvaná „reddish globule“ neznámé funkce a neznámého složení. Zásobní látka také zatím není známa (Santos, 1996). Zástupci třídy Eustigmatophyceae se vyznačují velkým obsahem nenasycených mastných kyselin, obzvláště eikosapentenové kyseliny (EPA), a jsou proto intenzivně zkoumáni pro průmyslové využití (Apt & Brehmens, 1999).

## **2. Morfologické znaky Eustigmatofyt**

Soubor výrazných znaků, které můžeme u třídy Eustigmatophyceae pozorovat ve světelném a elektronovém mikroskopu, jsem sestavila pro větší přehlednost dalšího textu. Čerpala jsem hlavně od autorů Wehr a Sheath (2003), Van den Hoek et al. (1995), Kalina a Váňa (2005) a z článků citovaných přímo v textu.

**Bičíky:** pouze jeden bičík je umístěn subapikálně. Dvě bazální tělíska jsou ale vždy přítomna. Bičík, který je opatřen mastigonematy (tripartitní tubulární glykoproteiny), směřuje dopředu buňky. U rodu *Pseudocharaciopsis* (Lee & Bold) mají zoospory dva bičíky. Bičík s mastigonematy směřuje stále dopředu a druhý bičík je nahý a při plavání směřuje do strany nebo dozadu. Přechodná zóna pleuronematického bičíku obsahuje helikoidální strukturu a na bázi je vždy zduřelý.

**Plastidy:** v buňce je většinou jen jeden žlutozelený chloroplast. Chloroplasty mají čtyři obalné membrány. Tylakoidy jsou v nich uspořádány v lamelách po třech jako u všech Chromofyt, ale na rozdíl od většiny tříd této skupiny nemají věncovou lamelu (soubor tylakoidů jdoucí pod povrchem celého chloroplastu). Svrchní membrána plastidu obvykle tvoří kontinuum s jadernou membránou u vegetativních buněk, ale ne u zoospor.

**Pyrenoid:** vegetativní buňky mají velký polygonální pyrenoid (pokud se u nich vyskytuje) mimo chloroplast, se kterým je pouze spojený stopkou. Matrix pyrenoidu není penetrována membránami plastidu nebo tylakoidy. Pyrenoid je obalen váčky s jemně vrstevnatým obsahem. Zoospory pyrenoid neobsahují.

**Stigma:** Eustigmatophyceae mají velké extraplastidiální (umístěné mimo chloroplast) stigma. Leží v přední části buňky a má oranžovočervené zbarvení. Skládá se z nepravidelných globulí bez obalných membrán a celý komplex stigmatu také není obalen žádnou membránou (Hibberd & Leedale, 1971). Strukturně je stejné jako stigma krásnooček, ale fotoreceptivní mechanismus se od nich pravděpodobně liší.

**Zoospory:** většinou protáhlé ale i kulovité pohyblivé buňky, které slouží k nepohlavnímu rozmnožování. Nemají buněčnou stěnu a pyrenoid. U většiny druhů se nevyskytuje v zoosporách ani Golgiho komplex. Chloroplast je obvykle jeden a zabírá dvě třetiny posterioerní části buňky. Zoospory obsahují stigma a většinou jeden bičík. K rozmnožování zoosporami dochází méně často než pomocí autospor.

**Autospory:** nepohyblivé buňky bez schopnosti tvorby bičíku, které mají buněčnou stěnu. Nejčastější způsob rozmnožování u třídy Eustigmatophyceae je právě pomocí autospor.

### 3. Taxonomické členění

V této kapitole uvádím současné poznatky o taxonomii a vývoji uvnitř třídy Eustigmatophyceae. U devíti vybraných rodů popíši základní charakteristiku s důrazem na ultrastrukturní znaky a ekologii.

Říše: Chromalveolata

Oddělení: Stramenopila (Hackett)

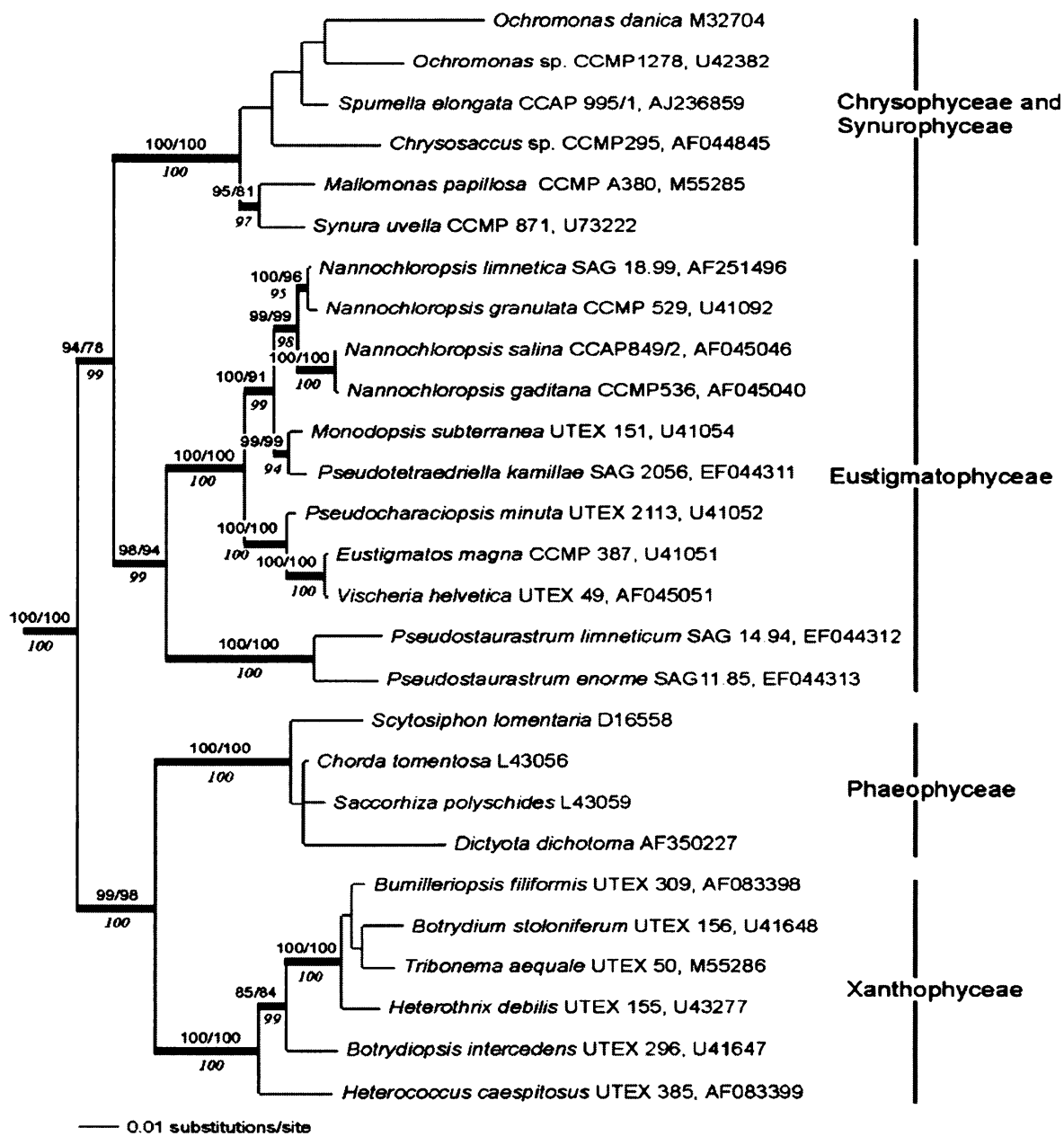
Třída: Eustigmatophyceae (Hibberd & Leedale)

Řád: Eustigmatales (Hibberd)

Hibberd (1981) rozdělil Eustigmatales původně do čtyř čeledí hlavně na základě ultrastrukturních znaků. Nejdůležitější znak byla tvorba či absence zoospor a počet bičíků. Později byla přidána ještě pátá čeleď Hegewaldem et al. (2007).

- Eustigmataceae (Hibberd): Do této čeledi patří rody *Eustigmatos* (Hibberd), *Vischeria* (Pascher) a *Pseudostaurastrum* (Chodat), které se vyznačují tvorbou zoospor s jedním bičíkem.
- Pseudocharaciopsidaceae (Lee & Bold): Rod *Pseudocharaciopsis* (Lee & Bold) tvoří zoospory se dvěma bičíky.
- Chlorobotryaceae (Pascher): Čeleď tvoří rod *Chlorobotrys* (Bohlin). Zoospory netvoří.
- Monodopsidaceae (Hibberd): Rod *Monodopsis* (Hibberd) a *Nannochloropsis* (Hibberd) se také vyznačuje absencí zoospor v životním cyklu.
- Loboceae (Hegewald): Jediným rodem této čeledi je *Pseudotetraëdriella* (Hegewald), která tvoří zoospory s jedním bičíkem a bez stigmatu.

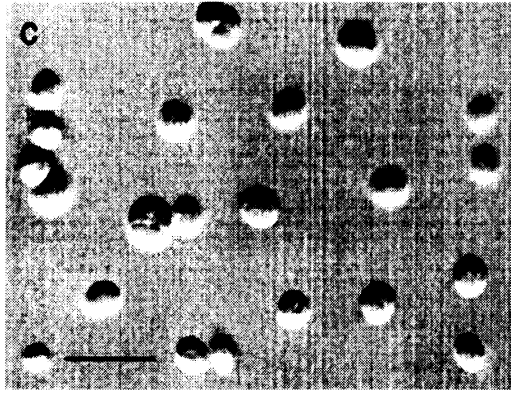
Toto členění však v současné době neodpovídá molekulárně fylogenetickým poznatkům a nedá se podle něj rekonstruovat vývoj uvnitř skupiny. Pro základní přehled současných poznatků uvádím fylogenetický strom od Hegewald et al. (2007), obr. 1.



**Obr. 1:** Na zástupcích třídy Eustigmatophyceae, příbuzných heterokontních řasách, dvou druhích rodu *Pseudostaurastrum* a druhu *Pseudotetraëdriella kamillae* byla provedena parsimonická analýza 18S oblasti ribosomální DNA. Jako sesterská skupina byly vzaty zástupci třídy Bacillariophyceae. Zvýrazněné větve fylogenetického stromu jsou podpořeny bootstrapem > 0,8 (Hegewald et al., 2007)

### a. *Nannochloropsis* (Hibberd)

Rod *Nannochloropsis* tvoří sesterskou skupinu cladu *Monodopsis/Pseudotetraëdriella*. Vyznačuje se jednoduchou morfologií. Buňky jsou převážně kulovité (obr. 2). Určení druhu ve světelném mikroskopu se z tohoto důvodu stává často nemožným a proto je navrhován molekulárně druhový koncept (Krienitz et al., 2000).



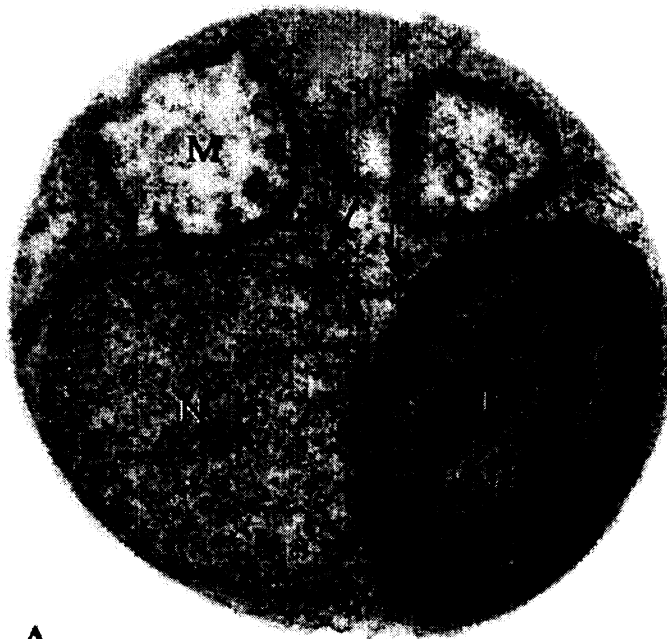
**Obr. 2:** fotografie *Nannochloropsis limnetica* ze světelného mikroskopu, měřítko=10  $\mu\text{m}$  (Fietz et al., 2005)

Buňky *Nannochloropsis* jsou kokální a velké okolo 5  $\mu\text{m}$ . Známe jsou primárně z mořského prostředí, ale v nedávné době byl popsán i sladkovodní druh *N. limnetica* (Krienitz et al., 2000) z rybníku a mělkého jezera v Německu a posléze byl nalezen i v Bajkalském jezeře (Fietz et al., 2005) a v několika jezírkách v Severní Dakotě a Minnesotě (Fawley et al., 2007). U *N. limnetica* izolovaného z Bajkalského jezera bylo jako u prvního zástupce třídy Eustigmatophyceae popsáno klidové stádium (Fietz et al., 2005).

Vzhledem k tomu, že většina zástupců třídy Eustigmatophyceae je primárně sladkovodních, zdá se, že mořské druhy *Nannochloropsis* se původně vyvinuly ze sladkovodního předka (Fawley et al., 2007). Podle molekulárních analýz 18S rDNA a rbcL sekvencí, dnešní sladkovodní linie naopak tvoří monofyletickou skupinu vzniklou z mořského rodu (Fawley et al., 2007). *Nannochloropsis* tedy možná sekundárně osídlil sladké vody a ponechal si některé vlastnosti, které ho zvýhodňují ve studeném prostředí. Jeho nálezy ze sladkovodních biotopů (z Německa, Severní Ameriky i Bajkalského jezera) jsou vždy spojeny se zimní až raně jarní sezónou (Fawley et al., 2007).

Mořské druhy jsou vždy jednobuněčné a rozmnožují se dělením. „Reddish globule“ a zrnité inkluze se vyskytují vždy aspoň v nějakých pozorovaných buňkách a se stářím kultury jich přibývá (Suda et al., 2002). Buňky mají kulovitý, hruškovitý až válcovitý tvar. Obsahují většinou jednu mitochondrii a jeden Golgiho aparát. Všechny mají cytoplasmatické membránové váčky, pyrenoidu podobný útvar a výraznou papilu vyčnívající ven z buněčné stěny. Tato papila je unikátní znak rodu *Nannochloropsis* v rámci zástupců třídy Eustigmatophyceae, ale její funkce je neznámá. Tylakoidy jsou v chloroplastech uspořádány v lamelách po třech. Přítomnost membránových váčků a elektrondenčních částic se velmi liší i mezi buňkami jedné kultury a tak jednotlivé druhy nemohou být s jistotou rozlišeny ani na základě ultrastrukturních snímků (Suda et al., 2002). Obr. 3 zobrazuje ultrastrukturu interfázni buňky u *N. oculata*.



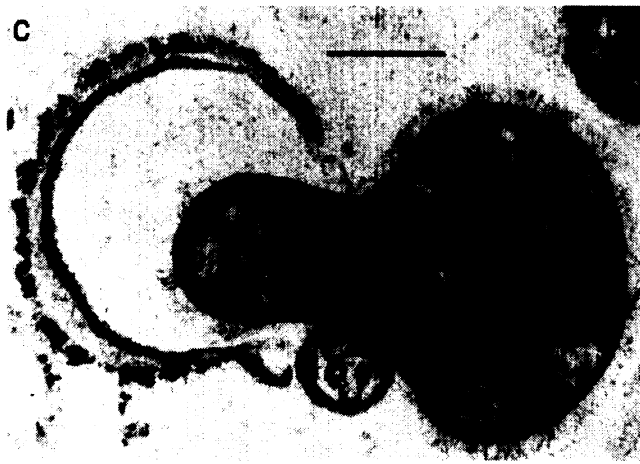


**A**  
**Obr. 3:** ultrastruktura *Nannochloropsis oculata*, zřetelně viditelný jediný plastid a mitochondrie, P-plastid, N-jádro, M-mitochondrie, vnější membrána jádra (dlouhá šipka) a povrchová membrána plastidu (krátká šipka) jsou spojené a tvoří kontinuum, měřítko= 200 nm (Murakami et al., 2009)

Sladkovodní druhy obsahují jeden až dva parietální žlutozelené plastidy, ale bez pyrenoidu. Buňky jsou tvarově rozmanité od kulovitých, oválných, kapkovitých až po srdčité. „Reddish globule“ je přítomna a je výraznější u větších buněk. Buňky obsahují oválné až tyčovitě buněčné váčky. Papila buněčné stěny je různě nápadná u odlišných izolovaných kmenů (Fawley et al., 2007). Buněčná stěna je hladká, silná 10- 25  $\mu\text{m}$ . Tylakoidy jsou uspořádané v lamelách po třech až čtyřech. Dělení probíhá pomocí dvou až čtyř autospor, které se uvolňují z mateřské buňky (Krienitz et al., 2000).

U kmenů izolovaných z Bajkalského jezera bylo pozorováno až osm chloroplastů v buňce a osm jader, jejichž množství koresponduje s velikostí buňky. Eustigmatofyta mají obvykle jen jedno jádro. Malá lámavá, tyčovitá tělíska jsou často pozorovatelná v buňkách. Povrchová membrána plastidu tvoří kontinuum s jadernou membránou.

Některé menší buňky s tlustou, méně prostupnou buněčnou stěnou jsou považovány za klidová stádia, protože z nich klíčí jediná buňka místo několika autospor (obr. 4). Tento proces je srovnatelný s pučením zelené řasy *Marvania geminata* (Hindák, 1976).



Obr. 4: pučící klidové stádium *Nannochloropsis limnetica*, B-bakterie; měřítko=1  $\mu\text{m}$  (Fietz et al., 2005)

Zjistilo se, že Eustigmatophyceae a hlavně *Nannochloropsis* v planktonu Bajkalského jezera jsou dobře odlišitelní pigmentovým složením od ostatního planktonu, hlavně třídy Xanthophyceae a Chlorophyceae. Vyznačují se vysokým podílem chlorofylu *a* vůči violaxantinu a zároveň nepřítomností diadinoxantinu. Diverzita a rozšíření sladkovodních druhů *Nannochloropsis* je možná stále podceněná kvůli jejich jednoduché morfologii, ale pokud by bylo zkoumáno i pigmentové složení planktonu, tak by se mohlo ukázat, že jsou mnohem hojnější (Fietz et al., 2005). To by se mohlo ukázat i pomocí enviromentálního sekvenování, při kterém se molekulárně analyzují směsné vzorky planktonu.

#### Mitóza u *Nannochloropsis*

*Nannochloropsis oculata* je první řasou z třídy Eustigmatophyceae, u které bylo pomocí elektronového mikroskopu pozorováno a poté popsáno buněčné dělení (Murakami & Hashimoto, 2009). Výsledky pomáhají ozřejmit průběh mitózy u jednobuněčných řas s plastidem vzniklým sekundární endosymbiózou. Eustigmatophyceae mají stejně jako ostatní Stramenopila čtyři plastidové membrány chloroplastu. U svrchní membrány hrubého endoplasmatického retikula se předpokládá vznik z vakuolární membrány fagocytující hostitelské buňky. U druhé membrány pod ní se předpokládá vznik z plasmatické membrány symbiotické buňky (Cavalier - Smith, 2003). Obě vnitřní membrány plastidu jsou homologní s dvojitou membránou primárních plastidů (Hashimoto, 1997). U mnoha stramenopilních druhů s jedním nebo dvěma plastidy je nejsvrchnější membrána plastidu spojena s membránou jádra a tvoří kontinuum uzavírající jádro spolu s plastidem či plastidy (Van den Hoek et al., 1995).

V interfázi u *N. oculata* je jádro a jeden plastid také spojené kontinuem svrchních membrán jádra a plastidu, a tím pádem se vnitřní membrána jádra a druhá svrchní membrána plastidu na určité ploše dotýkají. V profázi Murakami a Hashimoto (2009) pozorovali sudovité pólové tělíčko, ze kterého směřuje mnoho mikrotubulů směrem k jaderné membráně

a na opačnou stranu do cytoplasmy. Považují proto tento útvar za druh MTOC (microtubule organizing center). Dělicí vřeténko je uzavřeno jadernou membránou, takže se jedná o uzavřenou mitózu. V metafázi už ale sudovité tělísko popsané v profázi nepozorovali. Vyskytoval se zde útvar ve tvaru písmene L, který označují jako bumerangovité tělísko, a z kterého vystupuje množství mikrotubulů. Usuzují proto, že tento útvar je také typem MTOC. Od sudovitého tělíška se ale liší tvarem a lokalizací. Je možné, že původní tělíško prodělává změny při přechodu z profáze do metafáze. Není ale zatím možné říci, jestli se jedná o ten samý útvar, který pouze prochází změnou, nebo o zcela jinou strukturu (Murakami & Hashimoto, 2009).

V poslední fázi mitózy nejdříve dokončuje dělení vnitřní membrána jádra a až poté vnější membrána jádra. Obě membrány se začínají dělit najednou, ale vnější membrána záhy zaostává. Uvažuje se o tom, že se membrány dělí pomocí jiných mechanismů. Vnitřní membrána je možná ovládána faktory uvnitř jádra a vnější membrána možná faktory z cytoplasmy (Murakami & Hashimoto, 2009). Pořadí dělení jádra a plastidu není přesně určeno. Nejdříve se může rozdělit jádro anebo naopak plastid.

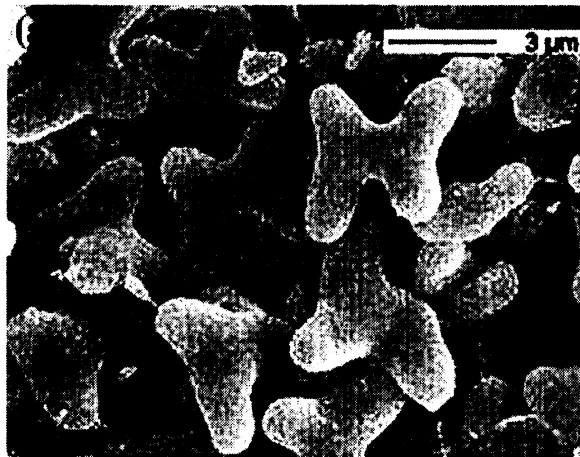
Takto neobvyklý způsob mitózy nebyl ještě popsán u žádné stramenopilní skupiny. Je potřeba dalšího zkoumání, které by pomohlo vysvětlit evoluční proces sekundární endosymbiózy (Murakami & Hashimoto, 2009).

## **b. *Pseudotetraëdriella* (Hegewald)**

Hegewald (2007) popsal jako nový druh řasu *Pseudotetraëdriella kamillae* (Hegewald & Padišák). Hegewald (2007) sice vytvořil i novou čeleď Loboceae, kam patřila jen *P. kamillae*, ale na základě fylogenetických dat se takové rozdělení nezdá opodstatněné. *Pseudotetraëdriella* byla často v ekologických studiích zaměňována za zástupce třídy Xanthophyceae nebo zelené řasy z třídy Chlorophyceae. Morfologicky se svými čtyřmi laloky podobá rodu *Pseudostarastrum*, ale na základě 18S rDNA je nejvíce příbuzná druhu *Monodopsis subterraneus* (Petersen). Tyto druhy se od sebe ale ekologicky i morfologicky významně liší. *M. subterraneus* je druh aerofytický a *P. kamillae* je druh planktonní, typický pro studená roční období (vysoce sezónní). Největších abundancí dosahuje v mírném pásu od ledna do dubna. Pravděpodobně dokáže využít živiny nejlépe v době jarního míchání než se vytvoří letní stratifikace (Hegewald et al., 2007).

Buňky jsou jednotlivé s pravidelnými laloky, jejichž tvar je ale podmíněn stavem a podmínkami v pěstované kultuře (Hegewald et al., 2007). Přítomen je jeden chloroplast v mladých buňkách a ve starších buňkách jeden nebo dva chloroplasty bez pyrenoidu. Velikost buněk se pohybuje mezi 3-7  $\mu\text{m}$ . Rozmnožují se nepohlavně zoosporami s jedním bičíkem a bez stigmatu. Autospory nebyly zatím pozorovány. Buněčná stěna se jeví hladká. V životním

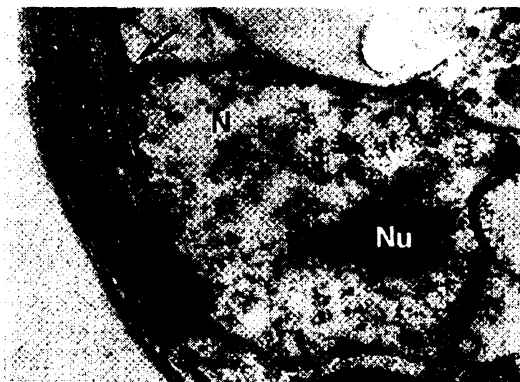
cyklu je přítomno kulovité klidové stádium (Hegewald et al., 2007).



**Obr. 5:** morfologie druhu *Pseudotetraëdriella kamillae* (SAG 2056, EF 044311), fotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu (Hegewald et al., 2007)

### **c. *Monodopsis* (Hibberd)**

Rod *Monodopsis* tvoří společný clade s rodem *Pseudotetraëdriella*. *Monodopsis* tvoří samostatné, asymetrické, 5-10 μm dlouhé buňky. Netvoří zoospory a množí se autosporami. Na obr. 6 můžeme pozorovat spojení chloroplastové a jaderné membrány u *M. subterraneus*. *M. subterraneus* je půdní řasa vyskytující se aerofyticky (Hegewald et al., 2007), ale i epifyticky a v metafytonu dystrofních nádrží (Wehr & Sheath, 2003).

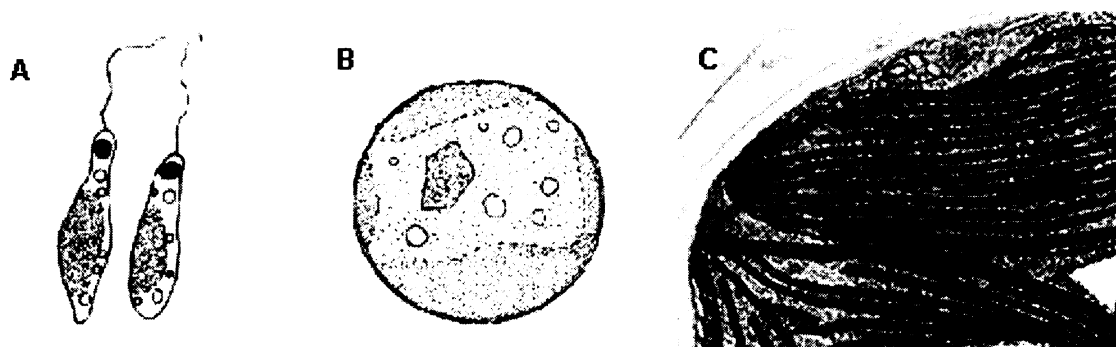


**Obr. 6:** spojení chloroplastové a jaderné membrány u *Monodopsis subterraneus* (šipka), N-jádro, Nu-jadérko (Santos, 1996)

### **d. *Eustigmatos* (Hibberd)**

*Eustigmatos* (Hibberd) tvoří kulovité buňky s hladkou buněčnou stěnou. Obvykle má jeden parietální chloroplast a extraplastidiální polygonální pyrenoid. Obr. 7C ukazuje chloroplasty bez věncové lamely u *E. vischerii*. Rozmnožuje se zoosporami s jedním bičíkem

a stigmatem. V přírodě se většinou vyskytuje v půdě nebo na povrchu půdy (Wehr & Sheath, 2003). Obr. 7A a 7B znázorňují zoospory a vegetativní buňku (Neustupa & Němcová, 2001).

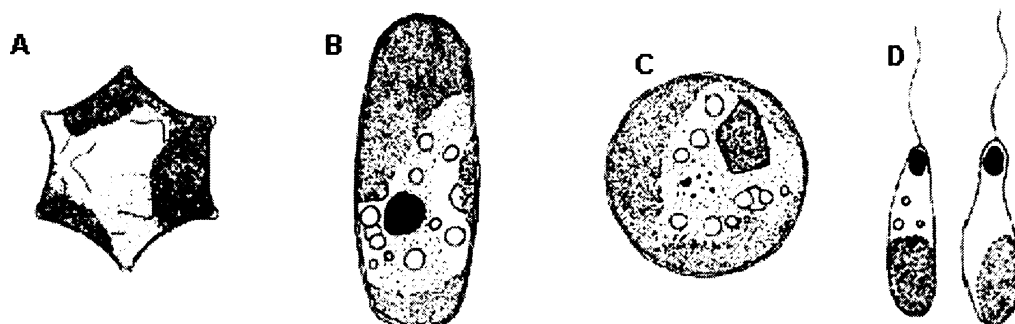


Obr. 7: *Eustigmatos vischeri*: 7A- zoospory s jedním bičíkem (Neustupa & Němcová, 2001), 7B- vegetativní kulovitá buňka (Neustupa & Němcová, 2001), 7C- chloroplasty bez věncové lamely (Santos, 1996)

### e. *Vischeria* (Pascher)

Morfologicky velmi podobná řasa rodu *Eustigmatos* je rod *Vischeria*. *Vischeria* je charakterizována převážně svými zoosporami s jedním bičíkem a schopností tvořit polyedrické buňky (Hibberd, 1990), které ale mohou být poměrně vzácné (Neustupa & Němcová, 2001). *Eustigmatos* a *Vischeria* tvoří společný clade.

*Vischeria* má buď kulovité (7-14  $\mu\text{m}$ ), nepravidelně polyedrické (7-9  $\mu\text{m}$  v průměru) až oválné buňky (šířka 5,5-8  $\mu\text{m}$ , délka 8-20  $\mu\text{m}$ ). Morfologické tvary druhu *Vischeria* sp. vyobrazují obr. 8A-8C (Neustupa & Němcová, 2001). Z autospor a zoospor (obr. 8D) vznikají v naprosté většině případů mladé kulovité buňky. Polyedrické buňky se vyskytují zřídka a obecně jsou menší než buňky kulovité. Dospělé buňky se prodlužují a ve starých kulturách najdeme většinu oválných buněk. Kulovité buňky mají prakticky stejné rozměry a strukturu jako vegetativní buňky *E. vischeri* a jsou od sebe nerozeznatelné (Neustupa & Němcová, 2001).



Obr. 8: *Vischeria* sp.: 8A-polyedrická buňka, 8B-oválná buňka, 8C-kulovitá buňka, 8D-zoospory s jedním bičíkem (Neustupa & Němcová, 2001)



Obr. 9: vnitřní stavba *Vischeria punctata*,  
Py-pyrenoid, C-plastid, N-jádro (Santos, 1996)

*Vischeria* obsahuje polygonální pyrenoid spojený stopkou s jediným parietálním chloroplastem (obr. 9). Plastid má složitou strukturu tvořenou mnoha laloky. V dospělých buňkách je patrná nápadná „reddish globule“. Při dělení získá „reddish globule“ vždy jedna z autospor.

Řasa se dělí pomocí zoospor nebo dvou až osmi autospor. Oválné buňky tvoří většinou jen dvě autospory. Nahé zoospory mají jeden parietální chloroplast a v apikální části velké nápadné stigma (Neustupa & Němcová, 2001).

Zástupce rodu *Vischeria* nalezneme v planktonu a metafytonu dystrofních a mesotrofních rybníků, potoků nebo chráněného litorálu jezer (Wehr & Sheath, 2003).

#### **f. *Chlorobotrys* (Pascher)**

*Chlorobotrys* tvoří kulovité buňky o průměru 12,5  $\mu\text{m}$ . Jedna nebo dvě buňky jsou obaleny ve slizovité pochvě a tvoří kolonie dvou až 32 buněk. Slizovitá pochva je vrstevnatá a shluky kolonií mohou tvořit slizovité útvary o velikosti několik mm. Buňky tvoří zoospory a nebyla pozorována ani klidová stádia.

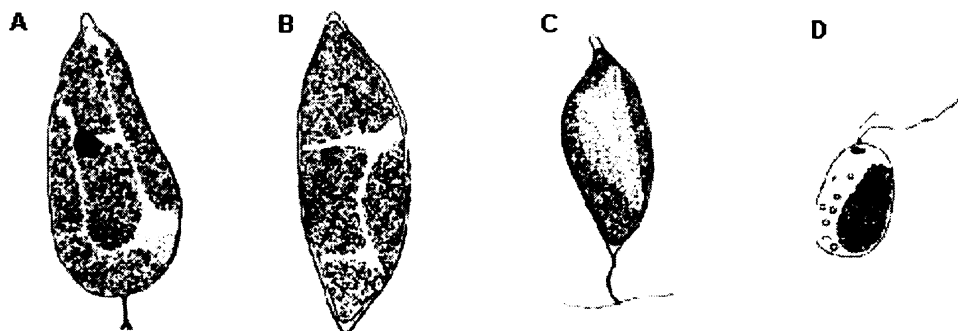
V buňce je přítomen jeden parietální chloroplast a typický eustigmatofytní pyrenoid. Membrány plastidu a jádra nejsou spojené (Hibberd, 1972).

*Chlorobotrys* žije v planktonu kyselých rašelinišť a slatinišť nebo může být přichycený na kamenech (Wehr & Sheath, 2003).

#### **g. „*Pseudocharaciopsis*“**

Rod „*Pseudocharaciopsis*“ byl původně považován za rod *Pseudocharaciopsis*, protože je morfologicky téměř totožný. Na základě molekulárních dat se ale zjistilo, že je

součástí nové hluboké linie v rámci Eustigmatofyt a bude nutné pro něj vytvořit nový rod (Eliáš, osobní sdělení). Je charakterizován tvorbou přisedlých vegetativních buněk a zoospor se dvěma bičíky. „*Pseudocharaciopsis*“ se vyskytuje ve dvou základních morfortypech: kapkovité volné buňky na pevném médiu a na stopce upevněné buňky v tekutém médiu. Morfortypy jsou znázorněny obr. 10A až 10C u druhu „*Pseudocharaciopsis ovalis*“ (Neustupa & Němcová, 2001). Kapkovité buňky mohou být někdy zakulacené se ztlustělou buněčnou stěnou.



**Obr. 10:** „*Pseudocharaciopsis ovalis*“: 10A-přisedlá buňka, 10B-volná buňka, 10C-přisedlá buňka, 10D- zoospóra se dvěma bičíky (Neustupa & Němcová, 2001)

Stopka, kterou se drží přisedlé buňky na substrátu, je odvozena od buněčné stěny. U mladých buněk vzniklých ze zoospor je stopka krátká a tlustá, zatímco u starších buněk se prodlužuje a zeštíhluje. Buňky obsahují několik parietálních chloroplastů. „Reddish globule“ se vyskytuje u většiny vegetativních buněk (Neustupa & Němcová, 2001).

Rozmnožují se zoosporami (obr. 10D), které jsou nahé s jedním nebo dvěma parietálními plastidy v posteriorní části buňky. Zoospory mají dva bičíky, ale jeden z nich je pouze rudimentární. V anteriorní části zoospory je snadno viditelné extraplastidiální stigma. Buňky se dělí pomocí dvou až 16 autospor. Osm autospor je nejčastější počet. Autospory mají nepravidelný nebo kapkovitý tvar a pravděpodobně je dokáží tvořit jen volně žijící kapkovité buňky (Neustupa & Němcová, 2001).

„*Pseudocharaciopsis*“ byl nalezen ve sladkovodních nebo aerofytických habitatech. Do sladkovodních habitatů se může možná dostat inokulací např. pomocí větru z aerofytických habitatů jako u druhu „*Pseudocharaciopsis ovalis*“ (Neustupa & Němcová, 2001).

### ***h. Pseudocharaciopsis (Lee & Bold)***

Původní rod *Pseudocharaciopsis* má velmi podobnou morfologii rodu „*Pseudocharaciopsis*“, ale je sesterský cladu *Eustigmatos/Vischeria*. Zoospory mají dva bičíky a na obr. 12 můžeme vidět dvě bazální tělíska u *P. minuta*. Jeden bičík je dlouhý, pleuronematický. Druhý bičík je krátký, hladký, asi třikrát užší než pleuronematický a nemá

žádnou ztlustlinu (Lee & Bold, 1973). Přisedlá buňka je jasně zobrazena na obr. 11.



**Obr. 11:** vnitřní stavba přisedlé buňky *Pseudocharaciopsis minuta*, C-chloroplast, Py-pyrenoid, N-jádro, W-buněčná stěna (Santos, 1996)



**Obr. 12:** průřez bazálními tělisky a helikoidální struktura (šipka) u *Pseudocharaciopsis minuta* (Santos, 1996)

### **i. Pseudostaurastrum (Chodat)**

Podle molekulárních analýz 18S rDNA provedené Hegewaldem et al. (2007) se zdá, že *Pseudostaurastrum enorme* a *P.limneticum* tvoří svůj vlastní clade, sesterský ke všem ostatním skupinám. Do tohoto cladu také patří velké množství planktonních druhů Eustigmatofyt, které zatím nejsou popsány (Bailey et al., 2008). Mimo jiné mezi ně patří *Goniochloris sculpta* dříve řazený mezi Xantophyta. Na základě těchto poznatků se třída Eustigmatophyceae dělí na dvě velké skupiny.

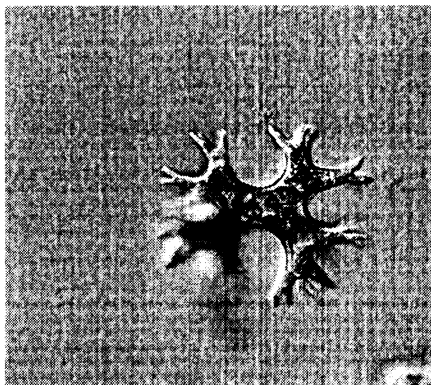
*Pseudostaurastrum* tvoří buňky se čtyřmi nepravidelně rozvětvenými, silně zařízlými laloky (obr. 13). Buňky *P.limneticum* měří v průměru 20-25  $\mu\text{m}$  a mohou mít i více než čtyři laloky, někdy dokonce jen tři. Laloky se jednou až třikrát dichotomicky dělí a mohou dosahovat délky 12  $\mu\text{m}$ . V mladých vegetativních buňkách jsou vyplněny cytoplasmou a plastidy. Chloroplasty mají čokovitý tvar a je jich velké množství. Jsou uloženy převážně parietálně. Plastidy neobsahují pyrenoid a vnější membrána není nikdy spojena s jadernou



vnější membránou (Schnepf et al., 1995-1996).

Rozmnožují se vytvořením čtyř nahých zoospor s jedním bičíkem z jedné mateřské buňky, která se zakulacuje a později její buněčná stěna praská pod tlakem rostoucích zoospor. Ty jsou pohyblivé jen tři až pět minut a neobsahují typické extraplastidiální stigma. Poté začnou tvořit laloky a na závěr se obalí buněčnou stěnou. Tento proces trvá 3-12 minut. Zoospory obsahují mnoho chloroplastů stejně jako vegetativní buňky. Absence stigmatu je pro zástupce třídy Eustigmatophyceae neobvyklá, ale uvažuje se, že buňky možná přestaly stigma potřebovat. Zoospory jsou totiž mobilní jen po velice krátkou dobu. Schnepf et al. (1995-1996) našli útvary na bázi bičíku, o kterých se domnívají, že by mohly být pozůstatky stigmatu. *Pseudostaurastrum* tak možná stigma druhotně ztratilo (Schnepf et al., 1995-1996).

*Pseudostaurastrum* se vyskytuje v planktonu dystrofních jezírek a nádrží nebo v planktonu mesotrofních rybníků a jezer. Může se vyskytovat i metafyticky společně s rašeliníkem *Sphagnum* (Wehr & Sheath, 2003).



**Obr. 13:** *Pseudostaurastrum* sp., plankton, lokalita Cep u Třeboně

#### **4. Diskuze**

Zástupci cladů *Nannochloropsis* a *Pseudotetraëdriella/ Monodopsis* se vyznačují přítomností jednoho až dvou plastidů ve vegetativních buňkách. Pouze u jednoho kmene *Nannochloropsis limnetica* izolovaného z Bajkalského jezera bylo pozorováno až 8 plastidů v buňce. U zástupců těchto cladů plastidová membrána tvoří obvykle kontinuum s jadernou membránou. Polygonální, typicky eustigmatofytí pyrenoid nebyl v buňkách nalezen, ale u rodu *Nannochloropsis* se vyskytují často pyrenoidu podobná tělíska, u kterých ale nemůžeme s jistotou potvrdit, že je to opravdu pyrenoid.

Druh *Pseudotetraëdriella kamillae* a *Nannochloropsis limnetica* (kmen z Bajkalského jezera) se jako jediné dva dosud známé druhy vrámci Eustigmatofyt vyznačují tvorbou klidových stádií. Rod *Nannochloropsis* a *Monodopsis* se rozmnožují pomocí autospor, zatímco rod *Pseudotetraëdriella* se dělí pomocí zoospor a autospory u něj nebyly zatím

pozorovány. Zoospory mají jeden bičík a neobsahují extraplastidiální stigma. Stavba zoospor se nejvíce podobá stavbě zoospor zástupců cladu *Pseudostaurastrum*. Tyto dva rody ale nejsou fylogeneticky blízké.

*Pseudostaurastrum* tvoří sesterskou skupinu ke zbytku Eustigmatofyt a vykazuje velké rozdíly v ultrastrukturních znacích. Buňky obsahují mnoho čočkovitých plastidů bez pyrenoidu. Plastidy a jádro nejsou spojeny membránami. Rozmnožuje se pomocí zoospor s jedním bičíkem a bez stigmatu. Zoospory obsahují mnoho chloroplastů jako vegetativní buňky.

Zástupci cladu *Eustigmatos/ Vischeria* si jsou ultrastrukturně velmi podobní. Oba rody mají obvykle jeden plastid s nápadným extraplastidiálním pyrenoidem. Tvoří také zoospory s jedním bičíkem a stigmatem.

Všichni zástupci třídy Eustigmatophyceae jsou kokální řasy s jednoduchou morfologií, která znemožňuje snadné určení a zařazení. I ultrastrukturně si jsou některé rody a druhy velice podobné. V současnosti je k popsání vztahů v rámci třídy nutný tzv. polyfázický přístup, který kombinuje znalosti molekulárních dat, ultrastruktury, životních cyklů i morfologie a ekologie.

## 5. Mastné kyseliny

Třída Eustigmatophyceae je významná vysokým obsahem esenciálních  $\omega$ -3 mastných kyselin, zejména EPA (eikosapentenová kyselina, 20:5(n-3), tj. dvacetihlíkatý řetězec s pěti *cis* dvojnými vazbami, první dvojná vazba je na třetím uhlíku od omega konce). Tyto mastné kyseliny s dlouhým řetězcem mohou snížit smrtelná rizika koronárních srdečních onemocnění (Simopoulos, 1991) a jsou nezbytné pro vývoj mozku, retiny a nervového systému (Innis, 1992).

Člověk přijímá eikosapentenovou kyselinu konzumací mořských ryb (losos, makrela, sardinka), které ji získávají požíráním řas. EPA je poté složkou rybího tuku, což je zdroj dostatečně kvalitní pro lidskou výživu, ale nedostačující pro farmaceutické účely. Rybí tuk je směsí mnoha mastných kyselin a extrakce EPA je velice finančně nákladná. Proto jsou způsoby kultivace řas s vysokým obsahem EPA předmětem intenzivního zkoumání ve snaze získávat kyselinu přímo z jejích primárních producentů, tj. řas (Cohen, 1999).

### a. EPA v *Nannochloropsis*

Rod *Nannochloropsis* se používá jako složka uměle vytvořeného potravního řetězce používaného pro chov ryb. *Nannochloropsis* se kultivuje jako potrava pro vířníky a krevety, kterými je krměn rybí potěr. Je to také potencionální důležitý přímý zdroj  $\omega$ -3 mastných kyselin pro lidskou výživu. EPA je u rodu *Nannochloropsis* podstatnou součástí galaktolipidů

(monogalaktosyldiacylglycerol), ale také fosfolipidů (fosfatidylglycerol, trimethylhomoserin).

Změnou růstových podmínek lze u jednobuněčných řas docílit zvýšené syntézy mastných kyselin (Shifrin, 1981). V optimálních růstových podmínkách totiž řasy produkují hlavně proteiny potřebné pro růst. V suboptimálních podmínkách akumulují lipidy a uhlovodíky. Toho se využívá v průmyslové produkci.

V Japonsku se tato řasa kvůli rybímu potěru kultivuje velkoplošně v důsledku stále větší celosvětové poptávky po mořských rybách. Proto je mimo jiné kladen velký tlak na zefektivnění produkce řas obsahujících EPA a jejich průmyslové a komerční využití. Kultivační podmínky jsou měněny různými způsoby, např. přidáním trávicích enzymů do kultury *Nannochloropsis*, které odstraní většinu obalů buňky, vede k zefektivnění této řasy jako zdroje potravy pro bezobratlé v potravních řetězcích (Seto, 1992).

## **b. Produkce EPA v *Monodopsis subterraneus***

EPA tvoří 20-37 % všech mastných kyselin této řasy (Cohen, 1994). Nejvíce je zastoupena v galaktolipidech. Dále tvoří vcelku velkou část fosfolipidů a v menší míře je i součástí triacylglycerolů. Množství EPA i ostatních mastných kyselin stoupá při pěstování kmenů za nízkých světelných intenzit. Obsah EPA tedy roste se stoupající hustotou buněk v kultuře. Nejvyšší obsah EPA byl zaznamenán na konci fáze exponenciálního růstu populace, kde se růst zpomaluje.

EPA je hlavní součástí galaktolipidů, které tvoří součást fotosyntetických membrán. Adaptace na stín při vysoké hustotě populace se projevuje zvýšenou syntézou fotosyntetických komplexů. Zvýšení obsahu EPA při vyšším zastínění by mohla být fotoadaptivní reakce na nedostatek světla.

Browse a Somerville (1994) studovali biosyntézu lipidů u vyšších rostlin. Tento složitý proces se skládá z mnoha reakcí poháněných desaturázami, acylázami, transacylázami a mnoha dalšími enzymy. Navíc mnoho těchto enzymů se vyskytuje ve dvou formách: prokaryotické v chloroplastu a eukaryotické na endoplasmatickém retikulu. Přes tyto cenné informace se toho ví méně o syntéze mastných kyselin s dlouhým řetězcem, jelikož vyšší rostliny neprodukují kyseliny s více než 18 uhlíkovými atomy.

Khozin-Goldberg et al. (2002) se zabývali biosyntézou EPA u *M. subterraneus* a je zřejmé, že biosyntéza mastných kyselin je komplikovanější než u vyšších rostlin. Mastné kyseliny se liší přítomností dalších pěti dvojných vazeb a čtyř atomů uhlíku. Autoři použili různé inhibitory pro objasnění biosyntetické dráhy. Z jejich výsledků vyplývá, že hlavní cesta syntézy EPA u *M. subtearraneus* jde přes  $\omega$ -6 mastné kyseliny. Uvažuje se o tom, že pokud by se podařilo ovlivnit poměr prokaryotické a eukaryotické cesty syntézy, mohlo by se to využít

ke zvýšení obsahu EPA. Přesto je v tomto procesu ještě příliš mnoho neznámých, které zatím znemožňují použití genového inženýrství. Předpokládá se navíc, že syntéza EPA není kódovaná jen jedním genem (Cohen, 1999).

# III. PRAKTICKÁ ČÁST

## 1. Úvod

V praktické části bych ráda srovnala ultrastrukturní znaky vegetativních buněk kmene E4f, který patří mezi Eustigmatofyta, a kmene *Ophiocytium maius* (Nägeli), (CCAP 855/1), u kterého je fylogenetická pozice nejasná. *Ophiocytium maius* je tradičně řazeno do třídy Xantophyceae, ale Ehara et al. (1997) provedli analýzu mitochondriálního *cox 1* genu a řadí *O. maius* (CCAP 855/1) do třídy Eustigmatophyceae. Avšak molekulární analýzy provedené na dvou plastidových genech *rbcL* a *psaA* téhož kmene, Maistrem et al. (2007), řadí *O. maius* do třídy Xantophyceae. Důkladné prozkoumání ultrastrukturálních znaků *O. maius* (CCAP 855/1) a srovnání s typickým eustigmatofytním zástupcem může přispět k objasnění fylogenetické pozice tohoto kmene.

Na základě výrazných odlišností v ultrastruktuře vegetativních buněk i zoospor byla totiž třída Eustigmatophyceae z třídy Xantophyceae vyčleněna (Hibberd & Leedale, 1971).

## 2. Materiál a metody

*Ophiocytium maius* (Nägeli), SAG 855-1, CCAP 855/1, UTEX 48, ATCC 30601, jsem získala ze sbírky CAUP (Culture Collection of Algae of Charles University in Prague). Řasa byla pěstována na pevném Bold Basal Médiu, BBM (Bischoff & Bold, 1963). Pro pozorování v transmisním elektronovém mikroskopu jsem řasy fixovala 2 % glutaraldehydem v 0,05 fosfátovém pufru, poté 1% oxidem osmičelým ve fosfátovém pufru a 1% octanem uranylu v metanolu. Buňky byly odvodněny ve vzrůstající etanolové řadě, potom převedeny do butanolu a zality do Spurrovy pryskyřice s nízkou viskozitou (Spurr, 1969). Zalité bločky byly nařezány diamantovým nožem, kontrastovány a pozorovány v transmisním elektronovém mikroskopu JEOL 1010.

Jako zástupce třídy Eustigmatophyceae jsem použila tropický kmen E4f izolovaný Jiřím Neustupou v Malajsii. Tento kmen je sesterský k *Eustigmatos/Vischeria* cladu. Pěstovaný byl také na pevném BBM. Pro pozorování v elektronovém mikroskopu byly vzorky E4f připraveny stejným způsobem, jaký jsem uvedla výše.

## 3. Výsledky

Vegetativní buňka *Ophiocytium maius* (CCAP 855/ 1) obsahuje větší množství relativně malých chloroplastů (obr. 14). Chloroplasty mají výraznou věncovou lamelu (obr. 15). Tylakoidy jsou v chloroplastech spojeny v lamelách po třech (obr. 15). Mezi

tylakoidy jsou umístěny kulovité útvary, plastoglobuly (obr. 14). V blízkosti jádra se nachází centrioly (obr. 16). Buněčná stěna je široká 300-450 nm. Zbytek buňky je vyplněn vakuolami se zásobní látkou (obr. 14, 15).

Vegetativní buňka kmene E4f obsahuje laločnatý chloroplast (obr. 17). Plastidy neobsahují věncovou lamelu (obr. 19). Z chloroplastu vychází nápadný polygonální pyrenoid na stopce (obr. 20). Pyrenoid je vždy mimo chloroplast (obr. 17). V buňkách E4f se nachází typická eustigmatofytní struktura „reddish globule“, složená z několika kapek (obr. 18).

#### 4. Diskuze

Vyčlenění třídy Eustigmatophyceae bylo původně založeno zejména na rozdílech v ultrastruktuře zoospor a většina starších studií se na ně zaměřuje. Například Hibberd a Leedale (1971) popisují ultrastrukturu několika kokálních xantofytních řas s důrazem na druh *Ophiocytium maius*. Hibberd a Leedale (1971) neudávají přesné číslo zkoumaného kmene a navíc se zaměřují na zoospory, které jsem já nepozorovala.

*Ophiocytium maius* pozorované Hibberdem a Leedalem (1971) tvoří trubkovité buňky se stopkou, která slouží k připevnění k substrátu. Většinou jsou buňky spojeny s dalšími buňkami, ale mohou být i volně žijící. Dochází u nich k synchronní mitóze a buňky běžně obsahují 1, 2, 3, 4 až 16- 32 a více jader. Většina buněk obsahuje čtyři jádra. Jádra jsou uložena centrálně a mají kulovitý až hruškovitý tvar. Blízko jádra jsou lokalizovány dvě centrioly. Chloroplastů je v buňce několik a jsou parietálně uloženy. Nemají věncovou lamelu. Pyrenoid není přítomný.

*Ophiocytium maius* (CCAP 855/1) je morfologicky velmi podobné výše popsanému kmenu. Také tvoří stopky a je přichyceno na substrát. Tvar buněk je tubulární a zatočený. U buněk jsem pozorovala nejvýše dvě až tři jádra, ale většinou pouze jedno jádro. Kolikrát se jádro rozdělí, než dojde k cytokinezi může být způsobeno kultivačními podmínkami, např. teplotou, složením média. Jádro má spíše oválný až nepravidelný tvar.

Chloroplastů je několik a jsou parietálně uloženy. Na rozdíl od Hibberda a Leedalea (1971) kteří popisují jednotlivě probíhající tylakoidy v chloroplastu, jsem pozorovala tylakoidy spojené v lamelách po třech. Původně se předpokládalo, že Xanthofyta pyrenoidy vůbec nemají (Hibberd & Leedale, 1971), ale později byly popsány u některých druhů pyrenoidy ve tvaru výdutě („bulging pyrenoids“), např. u *Bumilleriopsis filiformis* (Němcová, 1999). Podobné pyrenoidy jsem u *O. maius* nepozorovala. Chloroplasty mají zřetelnou věncovou lamelu. Buňky byly vyplněny velkým množstvím zásobní látky uložené ve váčcích mimo chloroplasty.

Uvádím obecné srovnání zástupců třídy Xantophyceae a Eustigmatophyceae, konkrétně s kmenem E4f. Vegetativní buňky zástupců třídy Eustigmatophyceae jsou kokální a obsahují obvykle jeden laločnatý chloroplast (obr. 17). Na snímcích z elektronového

mikroskopu se může zdát, že chloroplastů je více, ale jedná se většinou o různě proříznuté laloky jednoho nebo dvou plastidů (pouze rod *Pseudostaurastrum* má mnoho čočkovitých plastidů). Mezi zástupce třídy Xantophyceae patří kokální i vláknité řasy. Obvykle obsahují několik až velmi mnoho diskovitých plastidů (obr. 14).

Pokud je v buňce přítomen pyrenoid, což je u zástupců třídy Xantophyceae poměrně vzácné, tak se vyskytuje ve vegetativních buňkách i v zoosporách. Pyrenoid je napůl zanořený v chloroplastu a je penetrován tylakoidy, které jsou uloženy v lamelách po třech. Není obalen žádnou zásobní látkou. U třídy Eustigmatophyceae, pokud ho mají, je pyrenoid přítomný vždy jen u vegetativních buněk. Je velký a nápadný, polygonální, na stopce čnící z plastidu (obr. 20). Jeho matrix neprochází žádné tylakoidy.

Zástupci třídy Eustigmatophyceae se vyznačují nepřítomností věncové lamely v chloroplastu oproti třídě Xantophyceae, kde je věncová lamela obvykle, ale ne vždy, přítomná (obr. 15, 19).

Zvláštní strukturou, která odlišuje třídu Eustigmatophyceae od všech ostatních chromofytních skupin, je „reddish globule“ (obr. 18).

Podstatně se obě třídy liší ve struktuře zoospor. Zástupci třídy Xantophyceae tvoří zoospory oválné, bilaterálně symetrické se šikmo seříznutým anteriorním koncem, zatímco zástupci třídy Eustigmatophyceae mají zoospory výrazně protáhlé a užší s ne tak jasnou bilaterální symetrií. Jádro je hruškovité v anteriorní části buňky, protáhlé směrem k bazálním bičíku bez spojení s membránami plastidu. Jádro xantofytních zoospor je větší a protáhlé k bazálním částem obou bičíků. Vždy je spojeno s jedním nebo dvěma plastidy (Hibberd & Leedale, 1972). Xantofytní zoospory obsahují obvykle dva parietální diskovité chloroplasty. Naopak eustigmatofytní zoospory mají obvykle pouze jeden protáhlý chloroplast (Hibberd & Leedale, 1971).

Většina zástupců třídy Eustigmatophyceae, kteří tvoří zoospory, má jeden anteriorně umístěný bičík. Bičík je pleuronematický a na jeho bázi je ztlustlina, která tlačí na buňku v místě uložení stigmatu. Stigma je velké, složené z nepravidelného shluku elektrondenzních kapek různé velikosti, které nejsou obaleny membránou. Je lokalizováno v přední části buňky vedle bazálního tělíska, vždy mimo chloroplast (Hibberd & Leedale, 1971). Eustigmatofytní zoospory mají obvykle sice jen jeden bičík, ale vždy obsahují dvě bazální tělíska. Pokud mají dva bičíky (např. *Pseudocharaciopsis*), tak ztlustlina je vždy na bázi delšího bičíku (Hibberd & Leedale, 1972). Oproti tomu xantofytní zoospory mají dva nestejně dlouhé bičíky. Dlouhý, pleuronematický míří dopředu a krátký, hladký míří do strany. Hladký bičík nese ztlustlinu, která přiléhá na místo uložení stigmatu. Stigma se skládá z jedné vrstvy globulí stejné velikosti. Je umístěno v plastidu, jenž je bližší bázi hladkého bičíku, hned pod seříznutým anteriorním koncem buňky (Hibberd & Leedale, 1972).

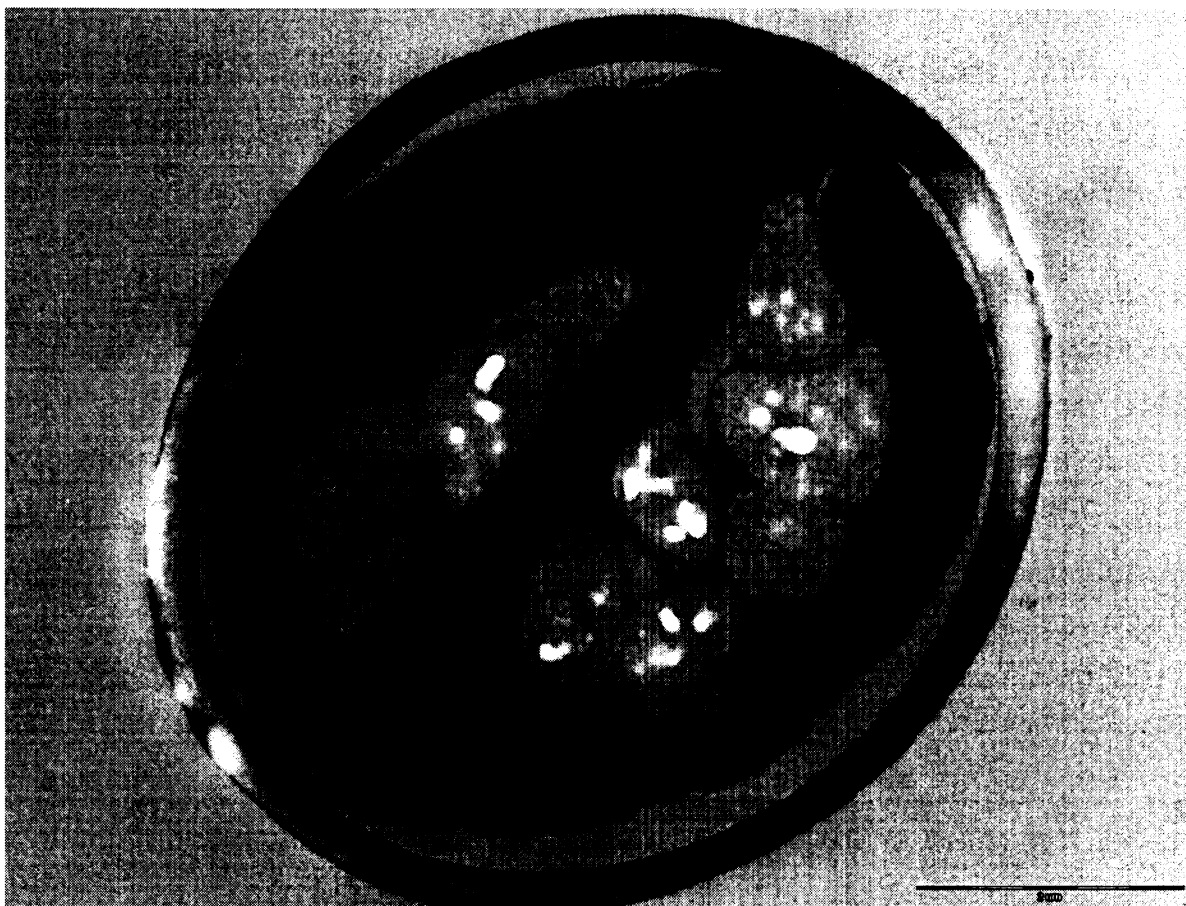
Xantofytní zoospory obsahují vždy Golgiho aparát lokalizovaný blízko jádra u bázi

bičků. Eustigmatofytní řasy tvoří Golgiho aparát jen u vegetativních buněk a ne u zoospor (Hibberd & Leedale, 1971).

Na základě ultrastrukturních znaků *Ophiocytium maius* (CCAP 855/1) odpovídá více obecným znakům třídy Xantophyceae. Mezi hlavní znaky patří přítomnost několika a u některých buněk mnoha chloroplastů, přítomnost výrazné zřetelné věncové lamely a v neposlední řadě pravděpodobně i nepřítomnost pyrenoidu, který je u této třídy vzácný. Oproti třídě Eustigmatophyceae ho vymezuje právě absence nápadného pyrenoidu a přítomnost věncové lamely. Buňky také neobsahují „reddish globule“ typickou pro Eustigmatofyta.

Taxonomickou pozici *Ophiocytium maius* (CCAP 855/1) je potřeba potvrdit pomocí dalších molekulárních markerů a také pozorováním zoospor.





Obr. 14: *Ophiocytium maius* (CCAP 855/1), mnoho chloroplastů



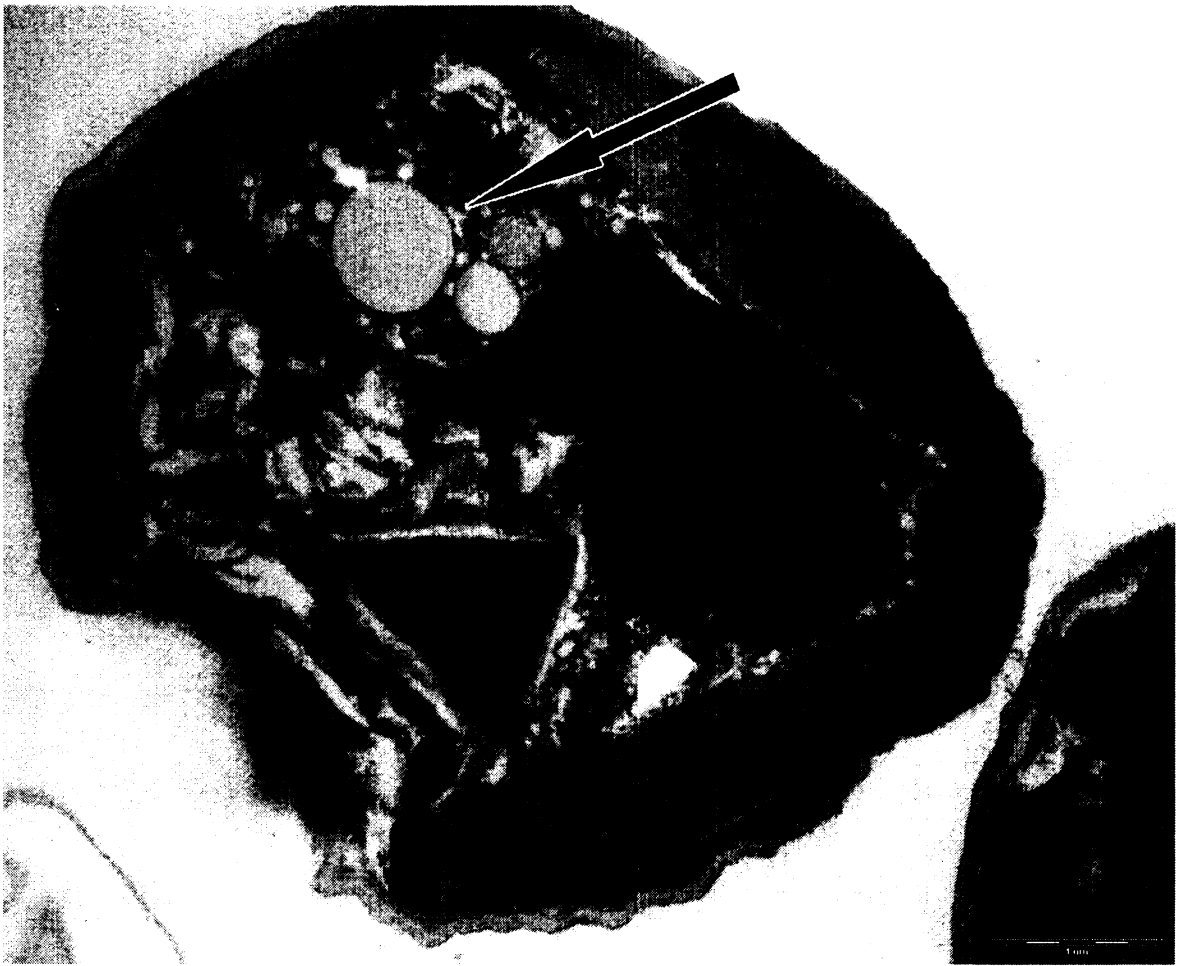
Obr. 15: *Ophiocytium maius* (CCAP 855/1), chloroplasty s věncovou lamelou



Obr. 16: *Ophiocytium maius* (CCAP 855/1), centriola



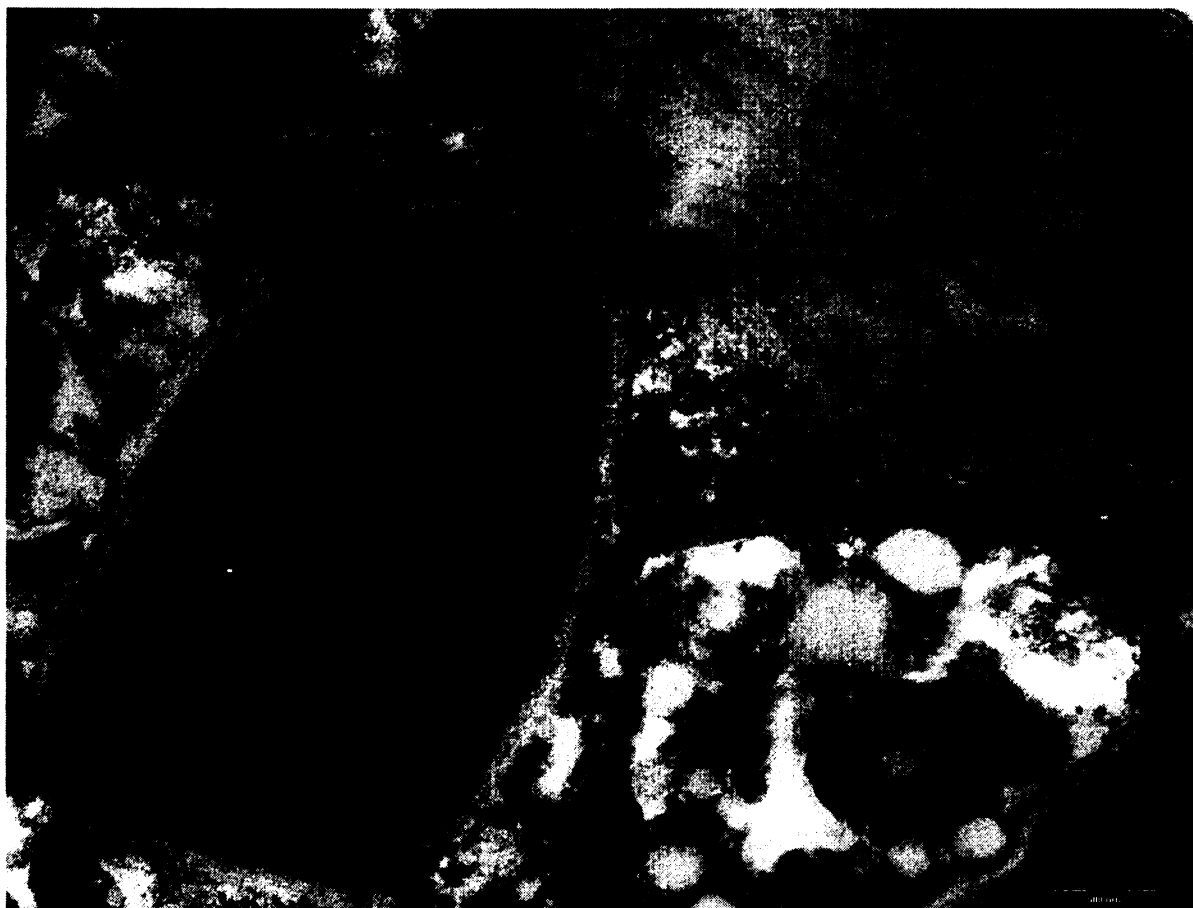
Obr. 17: E4f, laločnatý chloroplast a polygonální pyrenoid uprostřed buňky



Obr. 18: E4f, „reddish globule“ (šipka)



Obr. 19: E4f, chloroplasty bez věncové lamely



**Obr. 20:** E4f, polygonální pyrenoid na stopce vycházející z chloroplastu

## IV. ZÁVĚR

V bakalářské práci jsem se shrnula současné znalosti o morfologii a ultrastruktuře zástupců třídy Eustigmatophyceae. Některé ultrastrukturní znaky jsem ilustrovala v praktické části práce na snímcích z elektronového mikroskopu a zvládla jsem metodiku zhotovení ultratenkých řezů. Cíle práce tak byly splněny.

Třída Eustigmatophyceae je stále z velké části neprobádanou skupinou, u které je potřeba dalšího zkoumání jak už popsanych, tak nových druhů. U mnoha již popsanych druhů nemáme k dispozici molekulární data, která by přispěla k lepšímu pochopení vývojových vztahů uvnitř skupiny. Mnoho druhů je pravděpodobně nepopsanych a nemáme o nich žádné informace.

V diplomové práci bych se ráda zaměřila na zkoumání ultrastruktury, molekulární analýzy a taxonomii eustigmatofytních druhů řas. Budu se snažit izolovat rod *Pseudostaurastrum* z lokality Pískovny Cep a objasnit jeho ultrastrukturu a taxonomickou pozici.

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Yvonne Němcové, PhD. za všechny čas a rady, které mi laskavě věnovala. Za uvedení do řasové problematiky bych ráda poděkovala Mgr. Ladislavu Hodačovi.

## V. POUŽITÁ LITERATURA

- Andersen, R.A., Brett, R.W., Potter, D. & Sexton, J.P.**, 1998, Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*, *Protist*, **149**, 61-74.
- Bailey, C., Fawley, M. & Fawley, K.**, Species diversity among coccooid Eustigmatophyceae (Eustigmatophyta), *1Biology and Marine Biology and Center for Marine Science, UNCWilmington, Wilmington, NC, USA; 2Biological Sciences, North Dakota St. University, Fargo, ND, USA*, abstrakt z konference.
- Bischoff, H.W. & Bold, H.C.**, 1963, Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycological studies IV.*, Univ. Texas Publ., **6318**, 1- 95.
- Browse, J. & Somerville, C.**, 1991, Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**, 467- 506.
- Cavalier-Smith, T.**, 2003, Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein- targeting machinery in eukaryote- eukaryote chimeras ( meta- algae). *Philos Trans R Soc Lond B*, **358**, 109- 134.
- Cohen, Z.**, 1999, Chemicals from microalgae: Genetic improvement of EPA content in microalgae ( Alonso, D.L. a Segura del Castillo, C.), CRC Press, 94- 95.
- Cohen, Z.**, 1994, Production of eicosapentaenoic acid by the alga *Monodus subterraneus* , *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 941- 946.
- Ehara, M., Hayashi-Ishimaru, Y., Inagaki, Y. & Ohama, T.**, 1997, Use of a deviant mitochondrial genetic code in yellow-green algae as a landmark for segregating members within the phylum, *J Mol Evol*, **45**:119-24.
- Fawley, K.P. & Fawley, M.W.**, 2007, Observation on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* ( Eustigmatophyceae), with description of new taxa, *Protist*, **158**, 325- 336.
- Fietz, S., Bleiß, W., Hepperle, D., Koppitz, H. & Nicklisch, A.**, 2005, First record of *Nannochloropsis limnetica* ( Eustigmatophyceae) in the autotrophic picoplankton from lake Baikal, *J: Phycol.*, **41**, 780- 790.
- Hackett, J.D., Yoon, S. Y., Li, S., Reyes-Prieto, A., Rümmele, S. R. & Bhattacharya, D.**, 2007, Phylogenomic Analysis Supports the Monophyly of Cryptophytes and Haptophytes and the Association of Rhizaria with Chromalveolates, *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1702-1713.
- Hashimoto, H.**, 1997, Elektron- opaque annular structure girdling the constricting isthmus of the dividing chloroplasts of *Heterosigma akashiwo* ( Rapshidophyceae, Chromophyta), *Protoplasma*, **197**, 210- 216.
- Hegewald, E., Padisák, J. & Friedl, T.**, 2007, *Pseudotetraëdriela kamillae*: taxonomy and ecology of a new member of the algal class Eustigmatophyceae ( Stramenopiles), *Hydrobiologia*, **586**, 107- 116.

- Hibberd, D.J.**, 1990, Phylum Eustigmatophyta. - In: Margulis, J., Corliss, O., Melkonian, M., Chapman, D.J. & McKhann, H.I. (eds.): Handbook of Protoctista ( 326- 333), Jones and Bartlett, London.
- Hibberd, D.J.**, 1981, Notes on taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xantophyceae), Bot. J. Linn. Soc., **82**, 93-119.
- Hibberd, D.J. & Leedale, G.F.**, 1972, Observations on the cytology and ultrastructure of the new algal class, Eustigmatophyceae, Ann. Bot., **36**, 49- 71.
- Hibberd, D. J. & Leedale, G.F.**, 1971, A new algal class- the Eustigmatophyceae, Taxon, **20(4)**, 523- 525.
- Hindák, F.**, 1976, *Marvania geminata* gen. nov. et sp. nov., a new green alga. Arch. Hydrobiol. Suppl., **49**, 261- 270.
- Innis, S.M.**, 1992: n-3 fatty acid requirements of the newborn, Lipids, **27**, 879-885.
- Kalina, T. & Váňa, J.**, 2005, Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii: Eustigmatophyceae ( 197- 199). Nakladatelství Karolinum. Univerzita Karlova v Praze
- Khozin- Goldberg, S., Didi- Cohen, S., Shayakhmetova, I. & Cohen, Z.**, 2002, Biosynthesis of eicosapentaenoic acid (EPA) in the freshwater Eustigmatophyte *Monodus subterraneus*(Eustigmatophyceae), *J. Phycol.*, **38**, 745–756.
- Krienitz, L., Hepperle, D., Stich, H.B. & Winfried, W.**, 2000, *Nannochloropsis limnetica* ( Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater, Phycologia, **39**, 219-227.
- Lee, K.W. & Bold, H.C.**, 1973, *Pseudocharaciopsis texensis* gen. nov. et sp. nov., a new member of the Eustigmatophyceae, Br. Phycol. J., **8**, 31- 37.
- Maistro, S., Broady, P.A., Andreoli, C. & Negrisolo E.**, 2007, Molecular phylogeny and evolution of the order Tribonematales (Heterokonta, Xanthophyceae) based on analysis of plastidial genes *rbcL* and *psaA*., *Mol Phylogenet Evol*, **43**:407-17.
- Murakami, R. & Hashimoto, H.**, 2009, Unusual nuclear division in *Nannochloropsis oculata* ( Eustigmatophyceae, Heterokonta) which may ensure faithful transmission of secondary plastids, Protist, **160**, 41- 49.
- Neustupa, J. & Němcová, Y.**, 2001, Morphological and taxonomic study for three terrestrial eustigmatophycean species, Nova Hedwigia, **123**, 373- 386.
- Němcová, Y.**, 1999, The fine structure of the xanthophycean alga *Bumilleriopsis filiformis*. *Acta Universitatis Carolinae – Biologica*, **43**, 67-76.
- Santos, L. M. A.**, 1996, The Eustigmatophyceae: Actual knowledge and research perspectives.-In: Prasad, A. K. S. K., Nienow, J. And Rao, V. N. R. (eds.), Nova Hedwigia, 112, Contributions in Phycology (391- 405), J.CRAMER, Berlin- Stuttgart.
- Seto, A., Kumasaka, K., Hosaka, M., Kojima, E., Kashiwakura, M. & Kato, T.**, 1992, Production of eicosapentaenoic acid by marine microalgae and its commercial utilization for

aquaculture, in *Industrial Applications of Single Cell Oils*, 219- 234.

**Simopoulos, A.P.**, 1991, Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development, *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 438- 463.

**Shifrin, N.S. & Chisholm, S.W.**, 1981, Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light- dark cycles, *Journal of Phycology*, **17**, 364- 384.

**Schnepf, E., Niemann, A. & Wilhelm, Ch.**, 1995/ 96, *Pseudostaurastrum limneticum*, a Eustigmatophycean Alga with Astigmatic Zoospores: Morphogenesis, Fine structure, Pigment composition and Taxonomy, *Arch. Protistknd.*, **146**, 237- 249.

**Spurr, A.R.**, 1969, A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.*, **26**, 31- 43.

**Suda, S., Atsumi, M. & Miyashita, H.**, 2002, Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N.oceanica* sp. nov. ( Eustigmatophyceae), *Phycologia*, **41**, 273- 279.

**Van den Hoek**, 1995, *Algae. An introduction to phycology: Heterokontophyta: Class Eustigmatophyceae* ( 130- 133).Cambridge university press. Cambridge, UK

**Wehr, J.D & Sheath, R.G.**, 2003, *Freshwater algae of North America: Eustigmatophyte, Raphidophyte, and Tribophyte algae* ( 423- 427). Academic Press.