

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Melánie Fišerová

ULTRASTRUKTURA EUSTIGMATOFYTNÍCH ŘAS

ULTRASTRUCTURE OF EUSTIGMATOPHYCEAN ALGAE

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Yvonne Němcová, Ph. D.

Konzultant: Mgr. Marek Eliáš, Ph. D.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 9. 5. 2012

.....
Melánie Fišerová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Yvonne Němcové za veškerý čas, pomoc a rady, které mi za dobu mého studia laskavě věnovala. Neméně ráda bych poděkovala neúnavným "prarodičům" Melanii Fišerové, Miluši Jaklové a Jiřímu Fišerovi za nezbytnou psychickou podporu a velkou praktickou pomoc s hlídáním. Především ale děkuji Renému Jaklovi, bez kterého bych tuto práci určitě úspěšně nedokončila.

ABSTRAKT

Třídu Eustigmatophyceae vytvořil roku 1971 Hibberd s Leedalem. Vyčlenili ji z třídy Xanthophyceae na základě nápadných ultrastrukturních znaků vegetativních buněk a hlavně zoospor jako např. velké extraplastidiální stigma. Třída byla rozdělena do čtyř čeledí se šesti rody a 12 druhy.

Dnes se zdá, že uvnitř třídy je hluboká dichotomie. Eliáš et al. (unpublished) navrhuje, na základě molekulárních dat z 18S rDNA a *rbcL*, vytvořit dva řády: Eustigmatales (Eustigmatophyceae popsané Hibberdem) a Goniochloridales (řád obsahující *Goniochloris*, *Pseudostaurastrum* a mnoho dalších nepopsaných druhů). Řád Eustigmatales je rozdělen na tři čeledě. Eustigmataceae (A1), Monodopsidaceae (A2) a nově vzniklá čeleď Pseudellipsoidionaceae (A3).

Ve své diplomové práci jsem studovala 10 eustigmatofytních kmenů ze všech tří různých linií v rámci řádu Eustigmatales. Ve všech studovaných kmenech jsem našla typické eustigmatofytní znaky jako je absence chloroplastové věncové lamely, „reddish globule“ a lamelární váčky. Podoba lamelárních váček se proměňuje během životního cyklu řasy.

Má práce ukazuje, že ostatní ultrastrukturní znaky, které byly dříve připisovány všem zástupcům této třídy, jsou specifické pro jednotlivé čeledě.

Polygonální pyrenoid na stopce, který ční ven z chloroplastu do cytoplasmy, jsem pozorovala jen u kmenů *Eustigmatos magnus* CCMP 387, BogD 9/21 T-2d a E4f z čeledi Eustigmataceae (A1). Pyrenoid se také vyvíjí během životního cyklu. Kontinuum jaderné a chloroplastové obalné membrány jsem nepozorovala.

Na druhé straně, v čeledi Monodopsidaceae (A2) jsem našla pyrenoid, který je uložen uvnitř chloroplastu mezi tylakoidy a není jimi vůbec přerušován. U kmene *Monodus unipapilla* SAG 8.83 a *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056 jsem pozorovala kontinuum jaderné a chloroplastové obalné membrány. U kmene „*Monodus*“ *guttula* CCALA 826 zatím nebyla přítomnost nebo absence takového kontinua prokázána.

Za třetí jsem zjistila, že kmeny z nové čeledi Pseudellipsoidionaceae (A3) „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q301, „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q302, *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q401 a Mary 8/18 T-3d nemají vůbec žádný typ pyrenoidu. Kontinuum jaderné a chloroplastové obálky jsem zde také nepozorovala.

Absence nebo přítomnost pyrenoidu a jeho typ spolu s absencí nebo přítomností zoospor v životním cyklu a počtem bičíků zoospor jsou hlavními odlišujícími znaky jednotlivých čeledí třídy Eustigmatophyceae.

Klíčová slova: Eustigmatophyceae, ultrastruktura, fylogenetika, taxonomie, Stramenopiles

ABSTRACT

In 1971, the algal class Eustigmatophyceae, Stramenopiles, was detached by Hibberd and Leedale from the class Xanthophyceae, Stramenopiles, on the basis of prominent ultrastructural differences in vegetative cells and more importantly in zoospores, such as the presence of big extraplastidial stigma. The class was divided into four families, six genera and twelve species.

It seems so far, that there is a deep dichotomy within the class. Eliáš et al. (unpublished) recommend to establish two orders based on molecular sequencing of 18S rDNA and *rbcl*: Eustigmatales (sensu Eustigmatophyceae described by Hibberd) and Goniochloridales (order containing *Goniochloris*, *Pseudostaurastrum* and undescribed relatives). The order Eustigmatales is divided into three separate lineages, most likely families: Eustigmataceae (A1), Monodopsidaceae (A2) and a new family Pseudellipsoidionaceae (A3).

In this study the ultrastructure of 10 eustigmatophycean strains from three separate lineages was investigated. The typical characteristics of this class as chloroplast without a girdle lamella, a „reddish globule“ and lamellate vesicles were found in all strains studied. The appearance of the lamellate vesicles was found to change during the life cycle.

My research indicates that other characteristics, formerly assigned to the whole class, are unique within the separate lineages (families).

Polyhedral pyrenoid projecting out of the plastid was observed only in *Eustigmatos magnus* CCMP 387, BogD 9/21 T-2d and E4f, family Eustigmataceae (A1). The pyrenoid evolves during the life cycle. A continuum of the nuclear and plastid envelopes was not found.

On the other hand, only a pyrenoid situated inside the chloroplast was observed in family Monodopsidaceae (A2). It appears as a bright area in the plastid not transversed by thylakoids. In *Monodus unipapilla* SAG 8.83 and *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056 a continuum of nuclear and plastid envelopes was found. In „*Monodus*“ *guttula* CCALA 826 the presence or absence of the continuum still needs to be examined.

Thirdly, the strains from the new lineage Pseudellipsoidionaceae (A3), „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q301, „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q302, *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q401 and Mary 8/18 T-3d show no pyrenoid at all. A continuum of the nuclear and plastid envelopes was not seen in any of the investigated strains.

The absence or presence of pyrenoid plus its type together with the absence or presence of zoospores and its number of flagella are the main characteristics to distinguish the families within the class Eustigmatophyceae.

Key words: Eustigmatophyceae, ultrastructure, phylogeny, taxonomy, Stramenopiles

PŘEDMLUVA A CÍLE PRÁCE

Podle nejnovějších studií 18S rDNA a *rbcL* genů se třída Eustigmatophyceae rozpadá na dvě hluboce oddělené linie: řády Goniochloridales a Eustigmatales (Eliáš et al., unpublished). Ve své práci jsem se zaměřila na řád Eustigmatales, který obsahuje řasy původně popsané Hibberdem a Leedalem (1970, 1971, 1972). Tento řád se dělí na tři čeledě: Pseudellipsoidionaceae, Monodopsidaceae a Eustigmataceae. Z každé čeledi jsem si vybrala několik zástupců a srovnávala jejich ultrastrukturní znaky v rámci čeledi a mezi čeleděmi. Výsledky této práce byly prezentovány na VI European Congress of Protistology (ECOP) Berlin v červenci 2011 ve formě posteru.

Hlavní cíle a otázky mé práce

- 1) Popsat ultrastrukturu deseti druhů třídy Eustigmatophyceae.
- 2) Do jaké míry korelují ultrastrukturní znaky s molekulární fylogenetikou?
- 3) Může ultrastruktura přispět k rozlišení jednotlivých linií (čeledí), případně rodů?
- 4) Podpořit přesun několika dosud nepopsaných izolátů a jednoho xanthofytního rodu do třídy Eustigmatophyceae na základě unikátních ultrastrukturních znaků.

Diplomová práce obsahuje dosud největší soubor kmenů Eustigmatofyt studovaných ultrastrukturně. Ultrastruktura je nahlížena v kontextu molekulárních studií (18S rDNA a *rbcL* genů), což umožňuje hledání společných strukturních znaků pro jednotlivé linie. Vzhledem k tomu, že molekulární data nejsou dosud publikována, představuje tato práce vůbec první zhodnocení ultrastruktury v širším kontextu. Práce zároveň přináší mnoho nových poznatků (např. kontinuita jaderné a chloroplastové membrány u *Pseudo-tetraëdriella kamillae*, struktura plastidu a pyrenoidu u jednotlivých linií) a reviduje některá publikovaná data.

Obsah

I. Úvod.....	10
I.1. Historie a systém.....	10
I.2. Charakteristika vegetativních buněk.....	11
I.3. Ultrastruktura vegetativních buněk.....	11
I.4. Charakteristika zoospor.....	12
I.5. Ultrastruktura zoospor.....	12
I.6. Bičíky a stigma.....	13
I.7. Pigmentové složení.....	13
I.8. Životní cykly a jednotlivé rody.....	14
I.8.1. Eustigmatos D. J. Hibberd 1981.....	14
I.8.2. Vischeria Pascher 1938.....	14
I.8.3. Nannochloropsis D. J. Hibberd 1981.....	15
I.8.4. Monodopsis D. J. Hibberd 1981.....	15
I.8.5. Pseudotetraëdriella E. Hegewald 2007.....	15
I.8.6. Pseudellipsoidion Neustupa & Němcová 2001.....	15
I.8.7. Pseudocharaciopsis K. W. Lee & H. C. Bold, 1974.....	15
I.8.8. Pseudostaurastrum Chodat 1921.....	16
I.8.9. Goniochloris Geitler 1928.....	16
I.8.10. Chlorobotrys Bohlin 1901.....	16
I.8.11. Botryochloropsis H. R. Preisig & C. Wilhelm 1989.....	16
I.9. Habitat a ekologie.....	16
I.10. Biochemické složení a zásobní látky.....	18
I.11. Současný pohled na molekulární fylogenetiku eustigmatofyt.....	19
II. Materiály a metody.....	22
II.1. Přehled kmenů.....	22
II.2. Fixace.....	23
II.2.1. Fosfátový pufr.....	24
II.2.2. Odvodnění.....	24
II.3. Zalévání.....	24
II.4. Příprava ultratenkých řezů.....	25
II.5. Kontrastování.....	25
II.6. Postup E4f.....	25
II.7. Postup pro ostatní kmeny.....	26
III. Výsledky.....	28
III.1. Pseudellipsoidionaceae.....	28
III.1.1. Charakteristika druhů.....	28
III.1.2. „Pseudocharaciopsis“ ovalis CAUP Q 301	28

III.1.3. Pseudellipsoidion edaphicum CAUP Q401.....	34
III.1.4. „Pseudocharaciopsis“ ovalis CAUP Q 302.....	39
III.1.5. Mary 8/ 18 T- 3d.....	45
III.2. Monodopsidaceae.....	50
III.2.1. Charakteristika druhů.....	50
III.2.2. Pseudotetraëdriella kamillae SAG 2056.....	50
III.2.3. „Monodus“ guttula CICALA 826.....	57
III.2.4. Monodopsis unipapilla SAG 8. 83.....	64
III.3. Eustigmataceae.....	70
III.3.1. Charakteristika druhů.....	70
III.3.2. BogD 9/21 T- 2d.....	70
III.3.3. E4f.....	77
III.3.4. Eustigmatos magnus CCMP (NCMA) 387.....	82
III.4. Souhrn ultrastrukturních znaků.....	90
IV. Diskuze.....	91
IV.1. Monodopsidaceae.....	91
IV.2. Pseudellipsoidionaceae.....	93
IV.3. Eustigmataceae.....	93
V. Závěr.....	96
VI. Literatura.....	97

I. ÚVOD

Třída Eustigmatophyceae (Hibberd & Leedale, 1971) náleží mezi heterokontní (ochrofytní) řasy, v rámci kterých má nejasné fylogenetické postavení (Riiseberg et al., 2009), ale zcela jistě tvoří monofyletickou skupinu (Bhattacharya et al., 1992, Andersen et al., 1998). Eustigmatofyta tvoří jednobuněčné zelené kokální buňky, které mohou při určování ve světelném mikroskopu připomínat xanthofytní nebo chlorofytní řasy (Santos, 1996) Vegetativní buňky a zoospory některých druhů Eustigmatofyt vykazují ale unikátní ultrastrukturní znaky jako např. polygonální pyrenoid na stopce nebo velké extraplastidiální stigma (odtud název Eu- stigma = pravé stigma). Na základě těchto znaků, které je odlišují od všech ostatních Ochrofyt, byla třída Eustigmatophyceae vytvořena (Hibberd & Leedale, 1970, 1971, 1972).

I.1. HISTORIE A SYSTÉM

Vznik třídy Eustigmatophyceae se datuje na začátek 70. let minulého století. Hibberd a Leedale (1971) si povšimli, že několik zástupců třídy Xanthophyceae tvoří odlišné zoospory od ostatních zástupců Xanthofyt, resp. i dalších ochrofytních řas (Hibberd & Leedale, 1970, 1972).

Nejvýznačnějším odlišovacím znakem je velké extraplastidiální stigma, které se nejvíce podobá stigmatu zástupců třídy Euglenophyceae (Santos et al., 1996). I vegetativní buňky se liší od většiny ochrofyt absencí věncové lamely a kontinua jaderné membrány se svrchní membránou plastidu (u většiny rodů).

Dobře pozorovatelným znakem je přítomnost struktury zvané „reddish globule“, což je útvar tvořený lipidickými látkami a je zcela unikátní pro třídu Eustigmatophyceae. Rovněž jedinečné je pigmentové složení Eustigmatofyt. Zástupci této třídy mají chlorofyl a jako jediný fotosyntetický pigment a obsahují violaxanthin jako hlavní xanthofylní pigment (Whittle & Casselton, 1975).

Původně vytvořil Hibberd pouze jediný řád Eustigmatales, ve kterém shromáždil všechny tehdy známé zástupce, což bylo dvanáct druhů v šesti rodech (Hibberd, 1981). Od té doby jsou neustále přerazováni do Eustigmatofyt další zástupci z třídy Xanthophyceae (Schnepf et al, 1996) a zároveň jsou nacházeny v přírodě nové druhy i rody (Neustupa & Němcová, 2001). Diverzita skupiny je patrně stále silně podhodnocena (Bailey et al., 2008) a mnoho dalších Eustigmatofyt bude ještě popsáno (Dashiel & Bailey, 2009).

Původně měla tedy třída jeden řád a čtyři čeledi, které Hibberd (1981) definoval kombinací znaků takto: Chlorobotryaceae (Pascher) a Monodopsidaceae (Hibberd) se rozmnožují dělením autospor zatímco Pseudocharaciopsidaceae (Lee & Bold) tvoří zoospory se dvěma bičíky a Eustigmataceae (Hibberd) zoospory s jedním bičíkem. Čeleď Chlorobotryaceae je unikátní tvorbou slizovitých kolonií. V roce 2007 přidal Hegewald et al. (2007) čeleď Loboceae (Hegewald), do níž zařadil nově popsáný druh *Pseudotetraëdriella kamillae* (Hegewald). Vznik této čeledi se ale nezdá opodstatněný, protože

P.kamillae je podle nejnovějších studií molekulární fylogenetiky úzce příbuzná rodu *Monodopsis* (Hibberd), byť si tyto organismy nejsou morfologicky podobné (Eliáš et al., unpublished).

I.2. CHARAKTERISTIKA VEGETATIVNÍCH BUNĚK

Eustigmatofyta tvoří jednobuněčné kulaté, oválné, diskoidní, polygonální nebo větvenovité buňky. Velikost buněk se pohybuje mezi 2 μm až 25 μm . Buňky obsahují jedno až několik jader, obvykle jeden parietální chloroplast, často také „reddish globule“ a některé rody mají nápadný polygonální pyrenoid (Hibberd, 1980, Santos, 1996). Většinou žijí volně, jen rod *Pseudocharaciopsis spp.* se přichycuje na substrát pomocí stopky.

I.3. ULTRASTRUKTURA VEGETATIVNÍCH BUNĚK

Buněčná stěna u většiny rodů je celistvá, ale obzvláště u starších buněk v ní lze rozeznat několik vrstev. Unikátní buněčnou stěnu tvoří *Chlorobotrys regularis*. Stěna je totiž velmi pružná a je obalena vrstevnatým slizem (Hibberd, 1974).

Vegetativní buňky obsahují obvykle jeden parietální laločnatý chloroplast. Tylakoidy jsou umístěny v lamelách po třech a chloroplast nemá nikdy věncovou lamelu charakteristickou pro heterokontní řasy. Lamely jsou v chloroplastu pravidelně uloženy aniž by byly propojeny tylakoidy. Dlouhé, podélné lamely končí u plastidové membrány. Sekundární chloroplast má čtyři obalné membrány. Nejsvrchnější membrána, tedy endoplasmatické retikulum plastidu, pochází z fagocytického váčku původní hostitelské buňky. Druhá membrána pochází z cytoplasmatické membrány endosymbiotické řasy (Cavalier-Smith, 2003). Obě vnitřní membrány jsou homologní s původní dvojitou membránou plastidu fagocytované řasy (Hashimoto, 1997). Spojení chloroplastového endoplasmatického retikula se svrchní jadernou membránou jádra, jež je typické pro Ochrofyta, bylo nalezeno jen u zástupců čeledi Monodopsidace, rodu *Monodopsis* a *Nannochloropsis* (Antia et. al., 1975, Santos & Leedale, 1995, Krienitz et. al., 2000).

U rodu *Vischeria*, *Eustigmatos* a *Chlorobotrys* najdeme typický polygonální pyrenoid vyčnívající ven z plastidu. Pyrenoid je přichycen k chloroplastu krátkou stopkou. *Chlorobotrys* obsahuje jeden až tři pyrenoidy čnící z jediného plastidu (Hibberd, 1974). U *Pseudocharaciopsis minuta* má pyrenoid spíše kulatý tvar, ale také je přichycen na stopce vně plastidu (Lee & Bold, 1973).

Rod *Monodopsis* se vyznačuje terminálním pyrenoidem uvnitř chloroplastu. Pyrenoidem neprochází tylakoidy. U rodu *Nannochloropsis* byl pyrenoid popsán v jediné studii (Antia et. al., 1975), ale od té doby nebyl nikdy pozorován (Santos, 1996) a jeho výskyt byl zpochybněn.

Naproti pyrenoidu nebo nahodile v cytoplasmě nalezneme lamelární váčky, které jsou unikátní pro třídu Eustigmatophyceae. Po fixaci se jeví tyto váčky jako velice jemně strukturované útvary obalené membránou. Lamely jsou uloženy podél delší osy váčku a rozestupy mezi nimi jsou asi 10 nm. Některé váčky mohou obsahovat lamely jen z části a z části jsou tvořeny kompaktně vypadajícím obsahem. V prů-

běhu zoosporogeneze ztrácí váčky úplně lamelární charakter. Přesné složení těchto váček není objasněno, ale pravděpodobně jde o zásobní látky ve formě neutrálních polysacharidů jako je β 1-3 glukan (Schnepf et. al., 1996).

Jádro je obvykle jedno víceméně kulovitěho tvaru. Ve světelném mikroskopu je nejlépe pozorovatelné u mladých buněk. Mitóza je uzavřená (Murakami & Hashimoto, 2009). Mitochondrie mají tubulární kristy stejně jako bylo pozorováno u většiny Ochrofyty (Cavalier-Smith, 2002, Hashimoto, 2004). Golgiho aparát je u vegetativních buněk většinou malý jen se třemi až čtyřmi cisternami kvůli čemuž je špatně pozorovatelný (Santos & Leedale, 1992).

Nápadnou strukturou je vakuola s granulemi, která ve světelném mikroskopu vykazuje Brownův pohyb. Tato vakuola se s věkem autospory mění v „reddish globule“, která mění barvu od oranžové až po tmavě červenou. Během stárnutí buňky se stává větší a tmavší (Santos, 1996).

„Reddish globule“ je buď složena z několika různě velkých kapének nebo je homogenní jako u *Chlorobotrys regularis* (Hibberd, 1974).

I.4. CHARAKTERISTIKA ZOOSPOR

Většina Eustigmatofyt tvoří nahé jednobíčíkaté nebo dvoubíčíkaté, 5- 15 μ m velké, zoospory (kromě čeledi Monodopsidaceae, která se rozmnožuje jen tvorbou autospor). Zoospory jsou oválného nebo lahvovitěho tvaru s nápadným stigmatem v anteriorní části buňky (vyjma zástupců rodů *Pseudostaurostrum* a *Pseudotetraëdriella*, kteří stigma nemají). U dvoubíčíkatých zoospor je ve světelném mikroskopu dobře viditelný jen delší heterokontní bičík s mastigonematy (Hibberd, 1972, Santos, 1996). Zoospory jsou pohyblivé poměrně krátkou dobu a na světle velice rychle přisedají (Schnepf et. al., 1996).

I.5. ULTRASTRUKTURA ZOOSPOR

Jádro zoospor má hruškovitý tvar a je umístěno naproti bazálnímu tělísku bičíku v anteriorní části buňky. Membrána jádra není nikdy spojena se svrchní membránou jediného chloroplastu. Chloroplast je podlouhlý a zabírá asi dvě třetiny posterioerní části buňky. Podobně jako ve vegetativních buňkách nemá chloroplast věncovou lamelu, ale oproti nim také nikdy nemá žádný typ pyrenoidu (Hibberd, 1972).

Zoospory obsahují jednu nebo více tubulárních mitochondrií. Golgiho aparát byl poprvé nalezen u zoospor *Vischeria helvetica* (Santos & Leedale, 1992). Nalezneme ho vždy blízko anteriorní části jádra a obvykle je tvořen třemi až čtyřmi cisternami. Dříve se myslelo, že se u zoospor vůbec nevyskytuje, protože je příliš malý a bylo obtížné ho najít (Hibberd & Leedale, 1970, 1971, 1972, Santos & Leedale, 1992).

I v zoosporách najdeme typické eustigmatofytní lamelární váčky a také spirální váčky. Spirální váčky nalezneme jen v zoosporách (Santos, 1990). v průměru měří asi 200 až 500 nm a jsou umístěny v periferních částech buňky. Obsahují stočená vlákna a pravděpodobně hrají úlohu při přisedání zoospor

(Hibberd, 1980). Santos (1990) spekuluje, že z materiálu uloženého v těchto váčcích, se stává po přisednutí zoospory pyrenoid. Pyrenoid totiž mizí v určité fázi tvorby zoospor a znovu vzniká na vnitřní membráně plastidu brzy po přisednutí. Spirální váčky splývají s chloroplastem právě v místě vzniku nového pyrenoidu (Santos, 1990). Preisig & Wilhelm (1989) se naopak domnívají, že spirální váčky obsahují materiál, který pomáhá zoosporám přisednout k substrátu.

I.6. BIČÍKY A STIGMA

Unikátní organizace stigmatu a bičíků u eustigmatofytních zoospor byla hlavním důvodem vyčlenění a vzniku této třídy (Hibberd & Leedale, 1970). Všechny zoospory mají typický heterokontní bičík s mastigonematy. Bičík je dlouhý a ve spodní části má ztlustlinu. Je umístěn subapikálně a anteriorně (Hibberd & Leedale, 1972). Dvoubičíkaté zoospory mají druhý bičík krátký a nahý. Umístěn je posteriorně a nikdy nemá na své bázi ztlustlinu. I u dvoubičíkatých zoospor je ztlustlina vždy na bázi dlouhého bičíku (Hibberd, 1980).

Stigma je velmi velké, oranžové až červené a není spojeno s chloroplastem. Je však umístěno v anteriorní části buňky a přiléhá ke ztlustlině dlouhého bičíku. Extraplastidiální stigma najdeme jen u zoospor eustigmatofytních řas a u třídy Euglenophyceae (Santos et al., 1996, Dodge, 1973). Skládá se z několika různě velkých kulatých nebo oválných kapének, které obsahují karotenoidní lipidy. Průměr kapének kolísá mezi 0,26 - 0,7 μm . Kapénky nejsou obaleny membránou a ani stigma jako celek není obaleno membránou (Santos et al., 1996). Stigma zabírá celou anteriorní část buňky a vytlačuje všechny orgány a lamelární a spirální váčky. Ve světelném mikroskopu je velmi nápadné a dobře pozorovatelné.

I.7. PIGMENTOVÉ SLOŽENÍ

Neobvyklé pigmentové složení Eustigmatofyt bylo jedním z důležitých znaků při vyčlenění této třídy z Xanthofyt. Před masivním rozvojem molekulárních technik patřil obsah pigmentů spolu s ultrastrukturními znaky mezi hlavní kritéria, zda řasa patří či nepatří mezi Eustigmatofyta (Antia et al., 1975, Preisig & Wilhelm, 1989). Od Xanthofyt a ostatních Ochrofyt se třída Eustigmatophyceae totiž liší absencí chlorofylu c v jakékoli formě a absencí diadinoxanthinu/ diatoxanthinu (Schnepf et al., 1996, Krienitz et al., 2000, Suda et al., 2002). Neobsahuje ani fucoxathin, který způsobuje hnědé zbarvení např. u třídy Bacillariophyceae nebo Phaeophyceae, a tak se Eustigmatofyta jeví pod světelným mikroskopem zelená (Whittle & Casselton, 1975, Santos, 1996). Jediným chlorofylem je chlorofyl a. Hlavním xanthofylním pigmentem je violaxanthin, který může tvořit až 60% všech xanthofylů. Violaxanthin a ostatní karotenoidy jako vaucherixanthin, vaucherixanthin (- ester) a zeaxanthin jsou zapojeny do violaxanthinového cyklu, který chrání buňku před přílišným ozářením (Lubian & Montero, 1998). Dále nalezneme v buňkách běžně i β -karoten.

Zástupci třídy Eustigmatophyceae mají obvykle v kultuře zelenou barvu, ale se stářím kultury dochází ke změně barvy na hnědou a nakonec až oranžovou (Santos, 1996). Antia & Cheng (1982) zjistili, že s růstem kultury se mění relativní poměry pigmentů v buňce. Při stárnutí buněk se zvyšuje množství karotenoidů na úkor chlorofylu, a proto se kultury zbarvují do oranžova. Také keto- karotenoidy jako je canthaxanthin zvyšují svůj poměr vůči celkovému množství karotenoidů. Přesto si violaxanthin a vaucherianaxanthin (- ester) neustále drží nejvyšší relativní zastoupení mezi karotenoidy (Antia & Cheng, 1982).

I.8. ŽIVOTNÍ CYKLY A JEDNOTLIVÉ RODY

Eustigmatofyta se rozmnožují nepohlavně tvorbou 2- 4 atuspor. Některé rody mohou tvořit také jednobíčíkaté nebo dvoubíčíkaté zoospory (Hibberd & Leedale, 1971, Lee & Bold, 1973). Větší kulaté druhy (např. *Eustigmatos magnus*) tvoří buď dvě autospory ve tvaru písmene D nebo čtyři čtyřboké autospory. V oválných buňkách (např. *Pseudocharaciopsis minuta*) jsou autospory uspořádány podélně uvnitř mateřské buněčné stěny. Zoospory jsou tvořené většinou Eustigmatofyt, nebyly pozorovány u rodů *Nannochloropsis*, *Monodopsis* a *Chlorobotrys* (Santos, 1996). Pohlavní rozmnožování nebylo ještě pozorováno (Santos, 1996).

U několika druhů (*Pseudotetraëdriella kamillae*, *Pseudocharaciopsis ovalis*, *Vischeria* sp. a *Nannochloropsis limnetica*) je známo odpočívající stádium (Hegewald et al. 2007, Neustupa & Němcová, 2001, Fietz et al., 2005). Jedná se o menší buňky s málo propustnou, tlustou buněčnou stěnou. U *Nannochloropsis limnetica* Fietz et al. (2005) prokázali, že z takovéto tlustostěnné buňky vyklíčí jen jediná buňka místo několika autospor.

Pro odlišnosti mezi jednotlivými rody bych je ráda stručně charakterizovala:

I.8.1. *Eustigmatos* D. J. Hibberd 1981

Kulaté buňky s hladkým povrchem bez výrůstků. Polygonální pyrenoid na stopce. Zoospory s jedním bičíkem a stigmatem. Fylogeneticky velice blízce příbuzný nebo dokonce identický rodu *Vischeria* spp. (Procházková & Eliáš, pers. comm.) Rod *Eustigmatos* bude patrně brzy sloučen a včleněn do rodu *Vischeria*. Zatím tři druhy: typový druh *E. vischeri*, *E. magnus*, *E. polyphem*.

I.8.2. *Vischeria* Pascher 1938

Kulaté nebo nepravidelně polyedrické buňky. Buněčná stěna obvykle tvoří projekce a výrůstky. Polygonální pyrenoid na stopce. Zoospory jednobíčíkaté se stigmatem. Tři jisté druhy: typový druh *V. stellata*, *V. punctata*, *V. helevetica* a 9 dalších druhů popsanych Pascherem roku 1939, u kterých ale není potvrzena příslušnost k Eustigmatofytům.

I.8.3. *Nannochloropsis* D. J. Hibberd 1981

Buňky kulaté, oválné nebo cylindrické. Maximální velikost 5 µm. Bez pyrenoidu. Netvoří zoospory. Šest druhů: typový druh *N. oculata*, *N. salina*, *N. gadinata*, *N. granulata*, *N. oceanica*, *N. limnetica*.

Fawley & Fawley (2007) popsali na základě rozdílných sekvencí v 18S rDNA a *rbcL* další 4 variety sladkovodního druhu *N. limnetica* a to *N. limnetica* var. *globosa*, *N. limnetica* var. *irregularis*, *N. limnetica* var. *dystrophica* a *N. limnetica* var. *gutta*.

I.8.4. *Monodopsis* D. J. Hibberd 1981

Buňky kulaté, oválné nebo cylindrické. Velikost v průměru mezi 5 µm až 10 µm. Terminální pyrenoid uvnitř chloroplastu. Netvoří zoospory. Validně popsán jen typový druh *M. subterranea*. Blíže molekulárně příbuzný druh *Monodopsis unipapilla* byl opakovaně zmínován v literatuře jako eustigmatofytní druh (Santos & Leedale, 1995). Byl přeražen a přejmenován z xanthofytního druhu *Monodus unipapilla*. Tento popis ale nebyl nikdy taxonomicky správně proveden.

U dalších zástupců rodu *Monodus* se sice předpokládá příslušnost a přeražení do třídy Eustigmatophyceae, ale je potřeba podrobnější revize rodu (Eliáš et al., unpublished). Proto uvádím druh „*Monodus*“ *guttula* v závorkách, které vyjadřují jeho předpokládanou příslušnost do třídy Eustigmatophyceae.

I.8.5. *Pseudotetraëdriella* E. Hegewald 2007

Buňky se čtyřmi laloky. Tvoří zoospory s jedním bičíkem, ale bez stigmatu. Typový druh: *P. kamillae*.

I.8.6. *Pseudellipsoidion* Neustupa & Němcová 2001

Oválné nebo kulaté buňky. Zoospory s jedním bičíkem a stigmatem. Typový druh: *P. edaphicum*.

I.8.7. *Pseudocharaciopsis* K. W. Lee & H. C. Bold, 1974

Oválné buňky schopné tvořit stopku a přichytit se k substrátu. Pyrenoid na stopce u *P. minuta*. Zoospory se dvěma bičíky a stigmatem. Rod *Pseudocharaciopsis* byl vytvořen na základě morfologické podobnosti xanthofytnímu rodu *Characiopsis*. Rody se lišily hlavně pigmentovým složením a stavbou zoospor. Původním typovým druhem byl *P. texensis* (Lee & Bold), který byl později Hibberdem synonymizován s *P. minuta* (Braun).

Dalším popsáním druhem je *P. ovalis*, který se ovšem molekulárně velmi liší od *P. minuta*. Rod je tedy polyfyletický a jednotlivé druhy spadají do rozdílných čeledí (Eliáš et al., unpublished).

Amaral et al. (2011) provedli velkou molekulární a ultrastrukturní revizi xanthofytního rodu *Characiopsis* spp. (všechny kmeny ze sbírky v Coimbře) a zjistili, že na základě 18S rDNA všechny studované kmeny patří mezi Eustigmatofyta. V rámci Eustigmatofyt se rozpadají do dvou čeledí a kmeny příbuzné *P. minuta* vykazují i stejnou unikátní eustigmatofytní ultrastrukturu. Amaral et al. (2011) tedy

navrhují, že patrně celý rod *Characiopsis* by měl být přeřazen do třídy Eustigmatophyceae. Zdá se také, že typový druh *P. minuta* je blízce příbuzný nebo identický s druhem *Characiopsis borziana*. To by znamenalo, že *Pseudocharaciopsis* je vlastně mladším synonymem *Characiopsis* a mohl by jím být úplně nahrazen, pokud by se rod *Characiopsis* přesunul zcela mezi Eustigmatofyta (Amaral et al., 2011).

I.8.8. *Pseudostaurastrum* Chodat 1921

Buňky se čtyřmi laloky, které se na špičce opakovaně dichotomicky větví. Bez pyrenoidu. Zoospory s jedním bičíkem a bez stigmatu. Dva druhy: typový druh *P. limneticum*, *P. enorme*.

I.8.9. *Goniochloris* Geitler 1928

Buňky dorzoventrálně zploštělé a z předního pohledu nepravidelně trojúhelníkovité. Povrch buněk je tvarovaný. Bailey et al. (2006) zjistili na základě molekulárních dat, že xanthofytní typový druh *G. sculpta* je členem třídy Eustigmatophyceae. U dalších 20 druhů rodu *Goniochloris* nebyly provedeny studie, které by určily příslušnost ke Xanthofytům nebo Eustigmatofytům.

I.8.10. *Chlorobotrys* Bohlin 1901

Buňky kulaté, po dvojicích nebo ve větších koloniích obalené vrstevnatým slizem. Polygonální pyrenoid na stopce. Netvoří zoospory. Typový druh: *Ch. regularis*. a 8 dalších druhů, u kterých není jasné, zda opravdu patří mezi Eustigmatophyceae (Ettl, 1978).

I.8.11. *Botryochloropsis* H. R. Preisig & C. Wilhelm 1989

Kulaté buňky ve slizu tvoří nepravidelné kolonie. Zoospory se dvěma bičíky. Typový druh: *B. similis*.

I.9. HABITAT A EKOLOGIE

Zástupce třídy Eustigmatophyceae můžeme najít ve sladkovodním i mořském prostředí. Žijí v planktonu i terestricky. Preferují dystrofní a mesotrofní vody v kombinaci s nízkými teplotami od 0°C do 15°C (Wehr & Sheath, 2003). Najdeme je v euplanktonu a metafytonu jezer, tůní, potoků, bazénů i nádrží.

Rod *Vischeria* a *Eustigmatos* jsou primárně půdní organismy (Petersen, 1932, Vischer, 1945, Neustupa & Němcová, 2001). Nalezneme je ale i v subaerických habitatech jako nárosty na borce stromů či na skálách (Nakano et al., 1991). *Eustigmatos vischeri* byl nalezen ve velkých abundancích ve Phoenixu, Arizoně jako nárost v bazénech. Byl rozšířen až v 67% všech zkoumaných bazénů a dostal dokonce přezdívku „hořčicová“ řasa kvůli svému nažloutlému zbarvení. Velké rozšíření bylo možná způsobeno častými vichřicemi a přenosem substrátu z pouště (Adamson & Sommerfeld, 1978).

Rod *Vischeria* bývá nejvíce abundantní na jaře a na podzim. Preferuje teploty od 5°C do 12°C. V Severní Americe ho nalezneme nejvíce v euplanktonu sladkovodních tůňek, ale i jako metafyton v dystrofních až mesotrofních potocích a litorálech jezer. Často bývá v asociaci s cévnatými rostlinami rodu *Typha*, *Nuphar* nebo *Nymphaea* (Wehr & Sheath, 2003).

Rod *Monodopsis* se nachází primárně v půdě, ale byl izolován i z potoka (Hibberd, 1982b). *Monodopsis* má ubikvitní rozšíření. Lze ho nalézt jak roste metafyticky nebo epifyticky v dystrofních tůňkách ve spojení s rodem *Sphagnum* a *Typha* (Wehr & Sheath, 2003).

Rod *Nannochloropsis* tvoří pikoplankton světových oceánů. Jediný druh *N. limnetica* a jeho zatím čtyři popsané variety se vyskytují ve sladkovodním prostředí. Tvoří součást pikoplanktonu jezer s nejvyšší abundancí během studených měsíců (Krienitz et al., 2000, Fawley & Fawley, 2007). Také *Pseudotetraëdriella kamillae* je součástí sladkovodního fytoplanktonu v zimním období (Hegewald et al., 2007). Vyskytuje se v oligotrofních vodách s nejvyšší abundancí v dubnu. Tato řasa má velmi sezónní výskyt a prakticky vůbec se nevyskytuje během letní stratifikace. První jedinci se začínou objevovat po podzimním míchání v září či říjnu. Po úplném promíchání začne populace významně růst zhruba od prosince a největší biomasy dosahuje v dubnu (Hegewald et al., 2007). *P. kamillae* patrně po vzniku termokliny spolu s ostatními pikořasami (*Stephanodiscus chantaicus*, *Cyanobium* nebo *Neocystis polycocca*) klesá do nižších vrstev a jako nepohyblivá buňka čeká na hluboké podzimní míchání, které ji uvolní do vodního sloupce. Tam může využít dočasného období zvýšeného množství živin (leden až duben). Zdá se také, že pro fotosyntézu jí stačí malá intenzita světla (Hegewald et al., 2007).

Ve sladkovodním planktonu roste i rod *Pseudostaurastrum* a *Goniochloris*, které můžeme často najít v různých sladkovodních habitatech jako jsou dystrofní tůňky nebo mesotrofní rybníky a jezera. Většinou je ale nalezneme jen v malých abundancích. Eustigmatofyta téměř nikdy netvoří dominantu řasových společenstev. Kromě rodu *Nannochloropsis*, který dokáže tvořit vodní květ ve znečištěných vodách (Ryther, 1954, Bourelly, 1958) a brakických vodách (Andreoli et al., 1999). Nebo také Ghosh & Love (2011) studovali pomocí *rbcL* markeru řasové složení odpadních vod ve vybraných čističkách vod v Severní Americe a zjistili, že v některých odpadních vodách tvořila Eustigmatofyta dokonce až 90% všech nalezených řas a řasovému společenstvu tak dominovala (Ghosh & Love, 2011).

Oproti tomu rod *Chlorobotrys* žije pouze v habitatech s nízkým pH jako jsou rašelinné tůňky (Hibberd, 1974). *Pseudocharaciopsis minuta* byl izolován z tekoucí vody (Lee & Bold, 1973) a „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* najdeme také ve sladkovodních habitatech, ale i v půdních nárostech. Stejně tak *Pseudellipsoidion edaphicum*, který byl zatím nalezen v půdě jen v rámci střední Evropy (Neustupa & Němcová, 2001).

Roku 1997 našli Frost et al. (1997) neurčeného zástupce třídy Eustigmatophyceae v symbiotickém vztahu se sladkovodní houbou *Corvomeyenia everetti*. Symbiont uvnitř houby vykazoval charakteristické znaky Eustigmatofyt jako jsou plastidy bez věncové lamely nebo přítomnost lamelátních váčků. Na základě ultrastrukturních znaků a pigmentového složení se ho ale nepodařilo určit dále do rodu (Frost et al., 1997).

I.10. BIOCHEMICKÉ SLOŽENÍ A ZÁSObNÍ LÁTKY

Přestože chemická povaha zásobních látek patří mezi určovací znaky řas, u Eustigmatofyt se jí ještě nepodařilo objasnit (Santos, 1996). Sloučenina, která je uvnitř lamelárních váčků, je krystalická a špatně rozpustná. Jedná se patrně o neutrální polysacharid složený z β 1, 3 glukanu (nebo jiného polyglukanu) s helikátními molekulami uloženými rovnoběžně s delší osou váčku (Schnepf et al., 1996). Polysacharid se podobá paramylonu a naopak vůbec není podobný škrobu (α 1,4 glukán).

Eustigmatophyta jsou zajímavá vysokou schopností akumulovat lipidy (Hibberd, 1969). Hlavně zástupci rodu *Nannochloropsis* jsou studováni kvůli potenciálnímu využití při výrobě biopaliv (Sukeník, 1999, Gouveia & Oliveira, 2009). Obsah lipidů v jejich buňkách dosahuje až 27, 8 % a při dusíkovém hladovění se množství lipidů zvýší až o 50%.

V dnešní době se navíc vyrábí biopaliva z cévnatých rostlin jako je sója, slunečnice nebo ze semen řepky olejky. Pokud by se ale dělala biopaliva z řas, přinášelo by to velké výhody. Oproti cévnatým rostlinám, se dají řasy pěstovat celoročně ve vnitřních kultivacích.. Jejich produkce není sezónní a mohou se „sklízet“ každý den. Na jejich kultivaci se nespotřebuje tolik vody jako na pěstování vyšších rostlin a v neposlední řadě nezabírají zemědělskou půdu rostlinám určeným k potravinářské spotřebě (Gouveia & Oliveira, 2009).

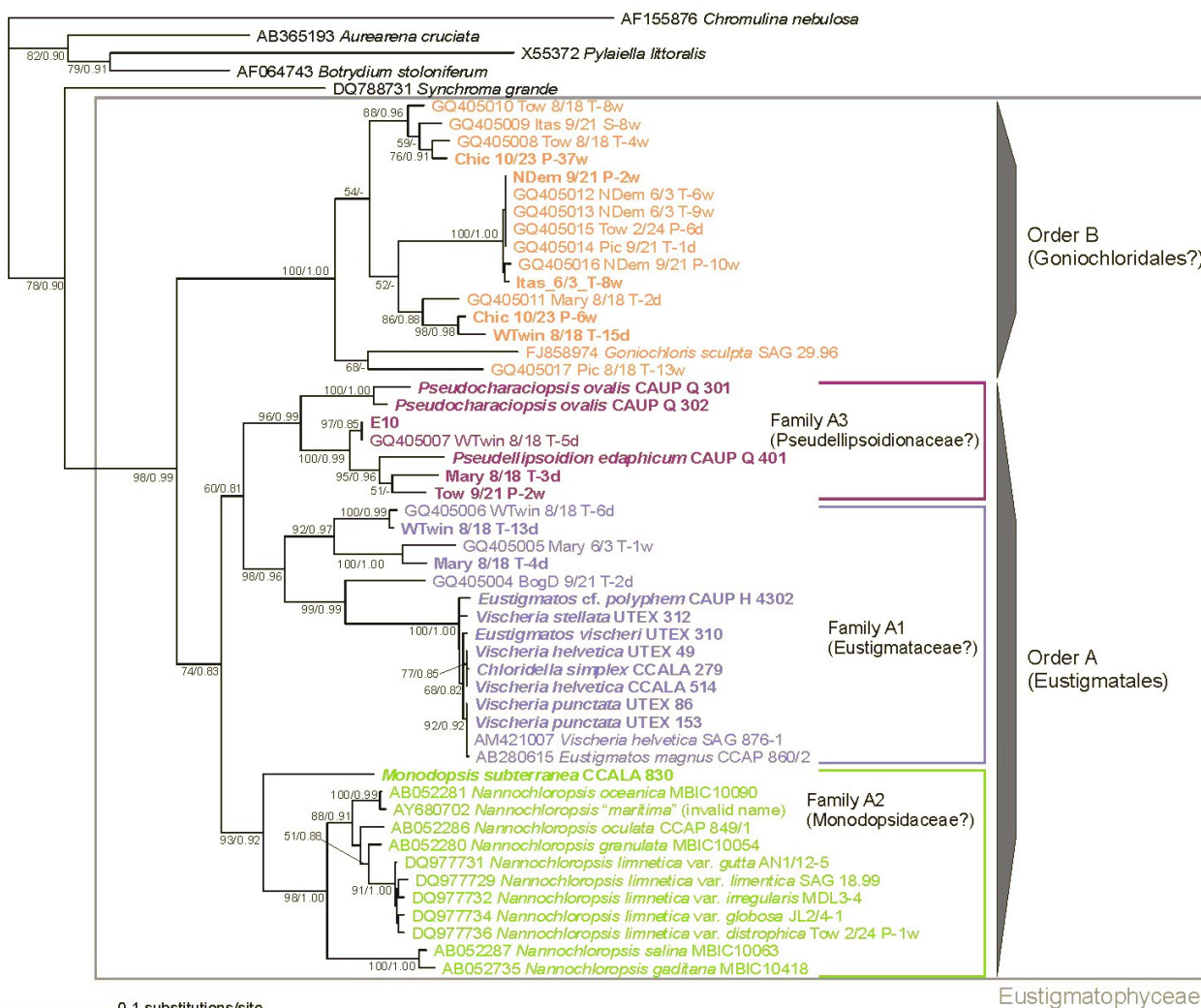
Eustigmatofyta produkují také vysoké procento ω - 3 nenasycených mastných kyselin včetně eikosapentenové kyseliny EPA 20:5 (n- 3) = karboxylová kyselina s 20 uhlíkatým řetězcem a 5 dvojnými vazbami, první dvojná vazba je lokalizována na třetím uhlíku od ω - konce (Volkman et al., 1993, Kriemitz & Wirth, 2006).

EPA může při pravidelném požívání snižovat rizika koronárních srdečních chorob (Simopoulos, 1991) a hraje esenciální úlohu ve vývoji mozku a nervového systému (Innis, 1992). EPA byla také nalezena u rodů *Vischeria* a *Eustigmatos* či *Monodopsis* (Volkman et al. 1999). v současné době probíhá intenzivní výzkum lipidického složení a biochemických metabolických cest, jejichž znalost by pomohla při průmyslové produkci EPA přímo z řas (Cohen, 1999). Pokud by se EPA používala jako potravinový doplněk, mohla by například omezit depresivní onemocnění u lidí. Huan et al. (2004) totiž zjistili, že lidé trpící depresemi se sklony k sebevraždě měli silně sníženou hladinu EPA v červených krvinkách.

Hlavním zdrojem EPA je v současnosti rybí tuk. Ryby získávají EPA z potravy, tj. mořských řas a hlavně planktonního rodu *Nannochloropsis*. Proto se v Japonsku a v dalších zemích rod *Nannochloropsis* využívá v akvakultuře jako potrava pro ryby v chovech. z rybího tuku se dostává EPA do lidských organismů buď přímou spotřebou nebo se z tuku extrahuje (Duerr et al., 1998, Pfeiffer & Ludwig, 2007). Tento proces je ale relativně drahý (nejdražší je extrakce jednotlivých nenasycených mastných kyselin z rybího tuku) a bylo by tedy výhodnější získávat EPA přímo z řas (Cohen, 1999).

I.11. SOUČASNÝ POHLED NA MOLEKULÁRNÍ FYLOGENETIKU EUSTIGMATOFYT

Roku 2007 Hegewald et al. provedli analýzu 18S rDNA u *Pseudotetraëdriella kamillae*, *Pseudostaurastrum enorme*, *P. limneticum* a dalších eustigmatofytních druhů. Podle analýzy je *P. kamillae* nejvíce příbuzná rodu *Monodopsis*. Zároveň ukázali, že rod *Pseudostaurastrum* patří mezi Eustigmatofyta,

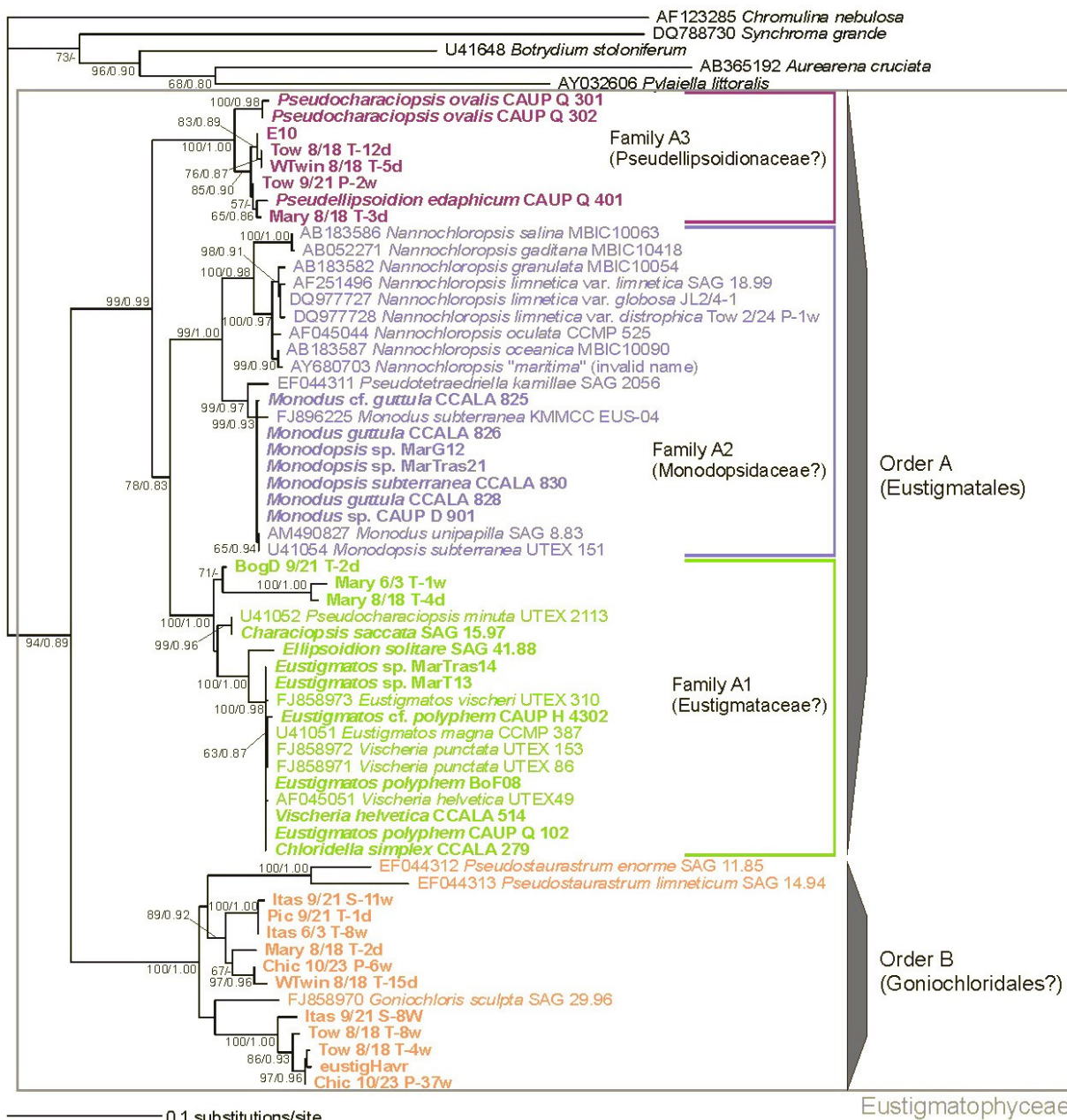


Obr. 1: Molekulárně-fylogenetická analýza Eustigmatofyt na základě *rbcL*, Eliáš et al. (unpublished).

ale tvoří samostatnou linii na jejich bázi.

Eliáš et al. (unpublished) prováděli fylogenetické analýzy *rbcL*, 18S rDNA a kombinace *rbcL*+18S rDNA pomocí PhyML 3.0 vykonaného na ATGC serveru <http://atgc.lirmm.fr/phyml/> a pomocí GTR + Γ +I substitučního modelu. Výsledky ukazují Obr. 1-3. Za kořen stromu náhodně vybrali chrysofytní řasu *Chromulina nebulosa*. Bootstrapové podpůrné hodnoty vyšší než 50 (na základě 100 opakování) a aLRT podpůrné hodnoty vyšší než 0, 80 jsou zobrazeny na bázích větví. Nové nepublikované sekvence jsou tučně zvýrazněny. Otazníky u názvů řádů a čeledí ukazují, že jsou to jména zatím provizorní. *rbcL* + 18S rDNA analýza byla dělána pouze pro kmeny, u kterých se jim podařilo získat obě tyto sekvence.

Při zkoumání 18S rDNA a *rbcL* genů se ukázalo, že třída Eustigmatophyceae je členěna na dvě hluboce oddělené linie (Eliáš et al., unpublished). Autoři navrhují, aby tyto dvě linie byly označeny jako řády Eustigmatales a Goniochloridales.



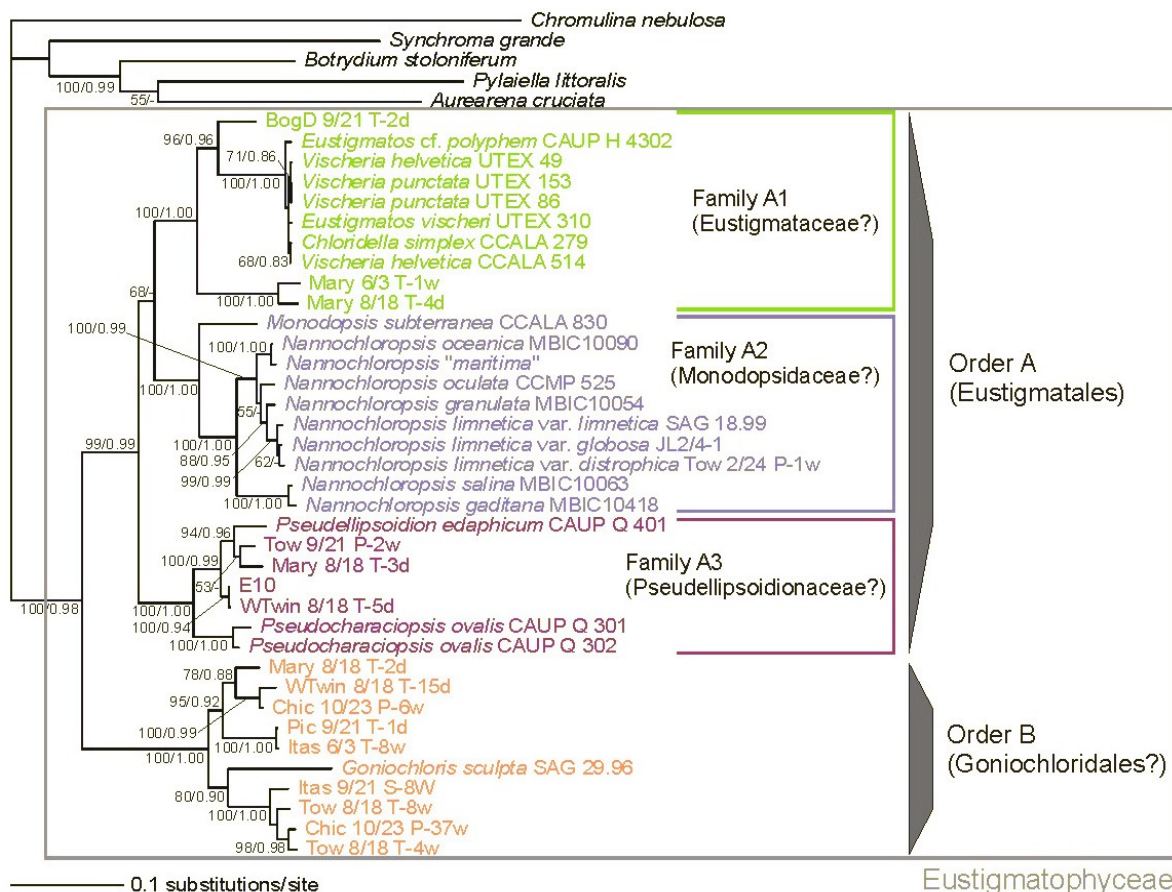
Obr. 2: Molekulárně-fylogenetická analýza Eustigmatofyt na základě 18S rDNA, Eliáš et al. (unpublished).

V potenciálním řádu Goniochloridales se nachází převážně planktonní řasy. Tato linie se nachází na bázi třídy Eustigmatophyceae. Spadají sem bývalé xanthofytní druhy *Pseudostaurastrum limneticum*, *P. enorme*, *Goniochloris sculpta* a *Trachydiscus minutus*.

Eustigmatales obsahuje řasy v užším Hibberdovském pojetí. v rámci tohoto řádu můžeme rozlišit tři linie (potenciální čeledě): Monodopsidaceae, Eustigmataceae a Pseudellipsoidionaceae (Eliáš et al., unpublished).

Do čeledi Monodopsidaceae spadají rody *Nannochloropsis*, *Monodopsis* a *Pseudo-tetraëdriella*. Podle sekvencí DNA zde nalezneme také mnoho zástupců rodu *Monodus*, které nebyly ještě formálně přerazeny.

V čeledi Eustigmataceae se spojují dva rody: *Eustigmatos* a *Vischeria*. Zdá se, že tyto dva rody jsou vlastně identické a měly by tvořit jediný rod pod názvem *Vischeria* (Procházková,



Obr. 3: Molekulárně-fylogenetická analýza Eustigmatofyt na základě *rbcL*+*18S rDNA*, Eliáš et al. (unpublished).

unpublished). Do této čeledi patří i *Pseudocharaciopsis minuta* (Eliáš et al., unpublished, Amaral et al., 2011).

V čeledi Pseudellipsoidionaceae nalezneme *Pseudellipsoidion edaphicum* a další druh polyfyletického rodu *Pseudocharaciopsis*, tedy *P. ovalis* (Eliáš et al., unpublished, Amaral et al., 2011). Podle studie Amaral et al. (2011) na 18S rDNA sbírkových kmenů rodu *Characiopsis* také soudíme, že mnoho, ne-li všichni zástupci rodu *Characiopsis* spadají pod Eustigmatofyta, konkrétně do čeledi Eustigmataceae a Pseudellipsoidionaceae.

II. MATERIÁLY A METODY

Ve své diplomové práci jsem zpracovala 10 eustigmatofytních kmenů, které jsem pozorovala a hodnotila pomocí transmisní elektronové mikroskope (TEM). Sedm kmenů jsem získala z řasových sbírek CAUP, SAG, CCALA a NCMA. Čtyři z těchto kmenů byly získány z půdy („*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q302, „*Monodus*“ *guttula*, *Monodopsis unipapilla* a *Eustigmatos magnus*), jeden z planktonu (*Pseudotetraëdriella kamillae*) a dva z rašeliniště („*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q301 a *Pseudellipsoidion edaphicum*).

Další dva kmeny (Mary 8/18 T- 3d a BogD 9/21 T- 2d) jsou planktonní izoláty od Karen a Marvina Fawleyových, Department of Biological Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND 58105. Poslední izolát (E4f) byl izolován Jiřím Neustupou z nárostu řas na kůře stromu v Malajsi.

II.1. PŘEHLED KMENŮ

EUSTIGMATOFYTNÍ ŘASA	ČÍSLO KMENE	PŮVOD
„ <i>Pseudocharaciopsis</i> “ <i>ovalis</i>	CAUP Q 301	Rašelina, blízko vesnice Třtice, Česká republika, 1998
„ <i>Pseudocharaciopsis</i> “ <i>ovalis</i>	CAUP Q 302	Půda, acidofilní dubový les u Netolic, Česká republika, 1987
<i>Pseudellipsoidion edaphicum</i>	CAUP Q 401	Rašelina, blízko vesnice Třtice, Česká republika, 1998
Mary 8/ 18 T- 3d		Plankton, Karen a Marvin Fawley, USA
„ <i>Monodus</i> “ <i>guttula</i>	CCALA 826	Půda, Swaldberg, Ny- Ålesund, Norsko, 1998
<i>Monodopsis unipapilla</i>	SAG 8. 83	Půda, Ötztalerské Alpy, Rakousko, 1964
<i>Pseudotetraëdriella kamillae</i>	SAG 2056	Plankton, Liblaler See, Německo, 1995
BogD 9/ 21 T- 2d		Plankton, Karen a Marvin Fawley, USA
E4f		kůra, Jiří Neustupa Malajsie
<i>Eustigmatos magnus</i>	CCMP (NCMA) 387	Půda, Bealy, Nový Zéland

ZKRATKY: CAUP = Culture Collection of Algae of Charles University in Prague, SAG = Sammlung von Algenkulturen Göttingen, CCALA = Culture Collection of Autotrophic Organisms, CCMP = dnes NCMA = National Center for Marine Algae and Microbiota.

Devět kmenů jsem pěstovala na pevném Bold Basal Médiu obohaceném půdním dekoktem, BBM (Bischoff & Bold, 1963). Šikmé agarové zkumavky jsem měla uložené v lednici o teplotě 16°C a osvit 7 μmol . Před fixací jsem je přeočkovala na čerstvé BBM médium a asi na dva týdny přemístila na denní světlo do pokojové teploty (cca 20 °C).

Pouze kmen Mary 8/18 T- 3d jsem pěstovala v tekutém médiu BBM v Erlenmeyerově baňce (50 ml) na denním světle při pokojové teplotě (cca 20 °C). Před fixací jsem zkontrolovala fyziologický stav řas ve světelném mikroskopu. Řasová kultura vykazovala exponenciální růst a řasy byly v dobrém fyziologickém stavu.

Jednotlivé kmeny řas jsem také pozorovala ve světelném mikroskopu Olympus BX 51 a fotografovala pomocí fotoaparátu Olympus E30 Zoom za použití Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu.

II.2. FIXACE

Pro pozorování v transmisním elektronovém mikroskopu je nutné řasy fixovat, neboli rychle usmrtit jejich buňky pro co možná nejlepší zachování jejich tvaru, struktury a obsahu (Kalina et al., 1978). Chemická fixace spočívá v působení chemických sloučenin na buňky a buněčné organely, tak aby zůstala jejich struktura neporušená.

Pro nejlepší zachování buněčné ultrastruktury se používá aditivní fixace glutaraldehydem CHO $(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$. Tento typ fixace mění cytoplasmu v gel transparentní pro elektrony a to díky vytvoření sítě vazeb mezi různými buněčnými komponenty. Aldehydy se váží s bílkovinami, které si udržují svou terciární strukturu a schopnost reagovat. Glutaraledhyd (GA) má dvě vazebná místa a může proto tvořit můstky mezi různými molekulami. GA také zachovává částečnou semipermeabilitu membrán, umožňuje pozorování mikrotubulů a zachovává ribosomy (Nebesářová, 2001, Kalina et al., 1978).

GA je v koncentrovaném stavu čirá olejovitá kapalina s výraznou vůní. Rychlost pronikání GA do tkání je relativně pomalá, asi 0, 2 až 0, 34 mm/hod (Nebesářová, 2001).

Aldehydy ovšem nejsou schopny vytvořit dostatečný kontrast, který by umožňoval pozorování v elektronovém mikroskopu. Pro vytvoření kontrastu se používají většinou sloučeniny těžkých kovů jako je octan uranylu $\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ a oxid osmičelý OsO_4 . Ten tvoří při pokojové teplotě nažloutlé krystalky a je silně toxický a těkavý. Na práci s ním je nezbytná kvalitní digestoř a ochranné rukavice. Působí jako oxidační činidlo a reaguje s nenasycenými mastnými kyselinami, kde oxiduje dvojná a trojná vazby (Kalina et al., 1978).

Díky těmto reakcím dochází k výborné fixaci membrán a jejich zdůraznění v buněčné ultrastruktuře. Navázané atomy osmia totiž působí jako kontrastující činidlo a dobře rozptylují procházející elektrony. K fixaci se obvykle používá 2 % vodný roztok OsO_4 , který je dost stabilní.

Octan uranylu (UAC) tvoří jasně žluté krystalky a používá se ke zvýraznění nukleových kyselin, bílkovin a fosfolipidů. Nejsilněji reaguje s nukleovými kyselinami při pH 3,5. Fixace octanem uranylu se provádí po fixaci GA a OsO₄ před začátkem odvodňování vzorků.

II.2.1. Fosfátový pufr

Pufry používané pro elektronovou mikroskopii musí splňovat vysoké nároky. Musí mít vysokou schopnost tlumící kapacity a být chemicky stabilní, ale zároveň nesmí být cytotoxické, disociovat a uvolňovat ionty vápníku, draslíku, sodíku apod. Fosfátový pufr tedy není toxický a cytoplasma a jádro získává po fixaci aldehydy a oxidem osmičelým elektrondenzní vzhled (v TEM se jeví jako tmavé místo). Buněčné organely a membrány zůstávají dobře zachovány. Pufruje do pH 7, 4 (Nebesářová, 2001).

Fosfátový pufr může ovšem reagovat s roztoky octanu uranylu a citrátu olovnatého, které se používají později při kontrastování. V přítomnosti vápenatých iontů tvoří sraženiny. Jeho výroba je ale levná a snadná. Skladujeme ho v lednici, kde do několika týdnů probíhá kontaminace bakteriemi, takže jeho trvanlivost je krátká (Nebesářová, 2001, Kalina et al., 1978).

II.2.2. Odvodnění

Po fixaci vzorků a jejich promytí v pufru je nutné vzorky odvodnit ve vzestupné alkoholové řadě. Tento postup je nezbytný, protože většina zalévacích médií používaných pro přípravu vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii není mísitelná s vodou. Voda uvnitř buněk se musí nahradit organickými rozpouštědly jako je etanol, butanol, aceton nebo propylenoxid. Takto upravené vzorky lze převést do pryskyřice, která ztverdne a umožní následné krájení vzorku na ultramikrotomu (Nebesářová, 2001, Kalina et al., 1978).

II.3. ZALÉVÁNÍ

Vzorky se zalévají do pryskyřice, která jim po polymerizaci poskytne mechanickou pevnost v tenké vrstvě a zároveň je stabilní ve vakuu. Také se do obrazu nesmí nijak promítat vlastní struktura pryskyřice. Neměla by měnit ultrastrukturu buněk a vzniklé bločky musí být přiměřeně tvrdé, aby se daly krájet. Často používané jsou epoxidové pryskyřice, které jsou tvořeny více složkami a vhodným poměrem těchto složek se dá měnit jejich tvrdost. Epoxidové pryskyřice polymerizují rovnoměrně při 60 °C a nemění strukturu buněk.

Nejznámější je Spurrůva pryskyřice (Spurr, 1919) jejíž hlavní složkou je vinylcyclohexendioxid. Má nízkou viskozitu, která je vhodná pro zalévání rostlinného materiálu. Nevýhodou je trochu nižší kontrast při pozorování v transmisním elektronovém mikroskopu (Nebesářová, 2001).

Preparáty se postupně prosytí roztoky pryskyřice v dehydratačním médiu (např. butanolu nebo propylenoxidu). Koncentrace pryskyřice se postupně zvyšuje. Samotné zalévání suspenze se provádí do kapslí buď z polypropylénu nebo želatiny. Při zalévání se musí dbát na to, aby se do kapslí nedostalo při-

liš mnoho vzduchu a nedošlo k napěnění pryskyřice. U epoxidových pryskyřic je vhodné provádět zalévání v přítomnosti vysoušecích látek, protože jinak příliš přitahují vodu. Polymerizace epoxidů se iniciuje v termostatu zvýšenou teplotou do 60 °C (Kalina et al., 1978).

II.4. PŘÍPRAVA ULTRATENKÝCH ŘEZŮ

Vzorky zalité do pryskyřice je potřeba nakrájet na ultratenké řezy 60 až 70 nm široké. Po vyndání z kapslí se ořeže přebytečná pryskyřice a na vrcholu kapsle se vytvoří lichoběžník, ze kterého se odkrajují ultratenké řezy. Na řezání se používají skleněné nebo diamantové nože. Pomocí diamantového nože vytvoříme kvalitnější řezy, ale je mnohonásobně dražší než skleněný nůž a velmi křehký. Při řezání musí být pod vzorky vanička s vodou, na jejíž hladinu se řezy pouští. Jelikož je diamant hydrofobní, může být problém dostat vodu ve vaničce až k řezné hraně (Nebesářová, 2001). Řezání probíhá na přístroji zvaném ultramikrotom. Ultramikrotomy lze rozdělit na dva typy: ultramikrotom s mechanickým posunem nebo ultramikrotom, který využívá tepelné dilatace měděné tyče k posunu bločku k hraně nože.

Hotové řezy se přenáší na síťku z mědi, niklu nebo např. zlata. Síťka slouží ke snadné manipulaci s řezy. Její průměr je 3 mm a čím větší jsou její otvory, tím větší plochu řezu je vidět. Aby se řezy neprohýbaly při osvitě elektrony, můžeme síťku potáhnout formvarovou nebo uhlíkovou blánou, která řezy podepře. Ta ovšem ztlušťuje celý preparát a tak by řezy na síťku s blankou měly být krájeny tenčí (Nebesářová, 2001, Kalina et al., 1978).

II.5. KONTRASTOVÁNÍ

Ultratenké řezy by měly bez kontrastování malý kontrast v TEM, protože hustota pryskyřice a řas či jiného biologického materiálu je téměř shodná. Proto se na buněčné struktury navazují těžké kovy, které více rozptylují primární elektrony a zvyšují tak kontrast struktur, na které se adsorbovaly. Ke kontrastování přispívá už oxid osmičelý a dále pak octan uranylu a citrát olovnatý. Octan uranylu se používá ve formě vodného nebo alkoholického roztoku a reaguje hlavně s nukleovými kyselinami. Vhodná koncentrace je asi 1- 3 % vodný roztok. Poté se použije citrát olovnatý, který zvýrazňuje membrány, proteiny, nukleové kyseliny a glykogen. Ten se nesmí používat v přítomnosti vzdušného oxidu uhličitého, se kterým také reaguje. Při kontrastování může vzniknout velké množství artefaktů kvůli snadné tvorbě sraženin uranu i olova.

II.6. POSTUP E4F

Řasy jsem zcentrifugovala v plastových zkumavkách do husté suspenze, ve které byly fixovány:

FIXACE	
2 % GA v 0,05 M Sörensenově fosfátovém pufru	2 hodiny

II.6. POSTUP E4F

3x promytí v 0,05 M fosfátovém pufru	během 2 hodin
1 % OsO ₄ v 0,05 M fosfátovém pufru	2 hodiny v lednici
2x promytí ve fosfátovém pufru	během 40 minut
2x promytí v destilované vodě	během 20 minut
1 % UAC v 50 % metanolu	přes noc v lednici

Po fixaci byly vzorky odvodněny ve vzestupné alkoholové řadě:

ODVODNĚNÍ	
70 % ethanol	20 minut
96 % ethanol	20 minut
100 % ethanol	40 minut
100 % ethanol	40 minut

Po odvodnění jsem řasy převedla do butanolu:

PŘEVEDENÍ DO BUTANOLU	
ethanol 3: 1 butanol	20 minut
ethanol 1: 1 butanol	20 minut
ethanol 1: 3 butanol	20 minut
čistý butanol	15 minut
čistý butanol	přes noc v lednici

Preparáty byly zalaty do Spurrový pryskyřice s nízkou viskozitou:

ZALÉVÁNÍ DO SPURROVY PRYSKYŘICE	
5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 95 % Spurr	vždy 15 minut
100 % Spurr	15 minut
100 % Spurr	19 hodin (přes noc za neustálého míchání)
Spurr a DMAE (dimethylaminoetanol)	6 hodin za neustálého míchání

Poté byly preparáty převedeny do kapsulí a centrifugovány na 11 tisíc otáček po dobu 6 minut. Byly polymerizovány v píce při 70°C po 3 dny. Výsledné bločky byly vyjmuty z kapslí a nařezány diamantovým nožem Diatome 45° na ultramikrotomu Ultracut E (Reichert – Jung). Řezy byly převedeny na síťky s formvarovou blankou a bez blanky v poměru 50:50. Poté byly kontrastovány citrátem olovnatým 20 min v atmosféře bez oxidu uhličitého.

II.7. POSTUP PRO OSTATNÍ KMENY

Zbylé kmeny jsem fixovala 2 % glutaraldehydem v 0,05 M fosfátovém pufru. Po propláchnutí pufrům jsem je zalévala do 1,7 % agarozy. Plastové zkumavky jsem zcentrifugovala a odebrala supernatant. Zbylou řasovou suspenzi jsem smíchala s rozehrátou agarozou a přenesla na vymražené podložní sklíčko. Poté jsem vzorky umístila do lednice a po ztuhnutí nařezala agarozové bločky, které jsem uložila do Eppendorfk naplněných 2 % glutaraldehydem v 0,05 M fosfátovém pufru.

Takto upravené vzorky jsem postoupila k další fixaci a zpracování Laboratoři elektronové mikroskopie na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a Biologického centra AV ČR. Postup dalšího zpracování se lišil v drobných detailech: řasy byly fixovány pouze oxidem osmičelým a ne i octanem uranylu, dále nebyly před zalitím do pryskyřice převedeny do butanolu, ale do propylenoxidu.

Hotové bločky byly nařezány a kontrastovány podle postupu uvedeného výše. Všechny vzorky jsem pozorovala v transmisním elektronovém mikroskopu JEOL 1010. Mikroskop je vybavený CCD kamerou Veleta s akvizičním softwarem (Olympus Soft Imaging Solution GmbH), pomocí které jsem zaznamenávala mikrofotografie řezů.

III. VÝSLEDKY

III.1. PSEUDELLIPSOIDIONACEAE

III.1.1. Charakteristika druhů

„*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301, „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302, *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q 401 a Mary 8/ 18 T- 3d. Tyto kmeny patří do řádu Eustigmatales, čeledi Pseudellipsoidionaceae.

Vyznačují se kulatým nebo oválným tvarem buněk. Průměr buněk se pohybuje v rozmezí od 4 μm až do 15 μm . Mohou tvořit stopky, které jsou tvořeny z buněčné stěny, a přichytit se k substrátu. Při kultivaci na agaru ve zkumavkách však tvoří spíše buňky bez stopek.

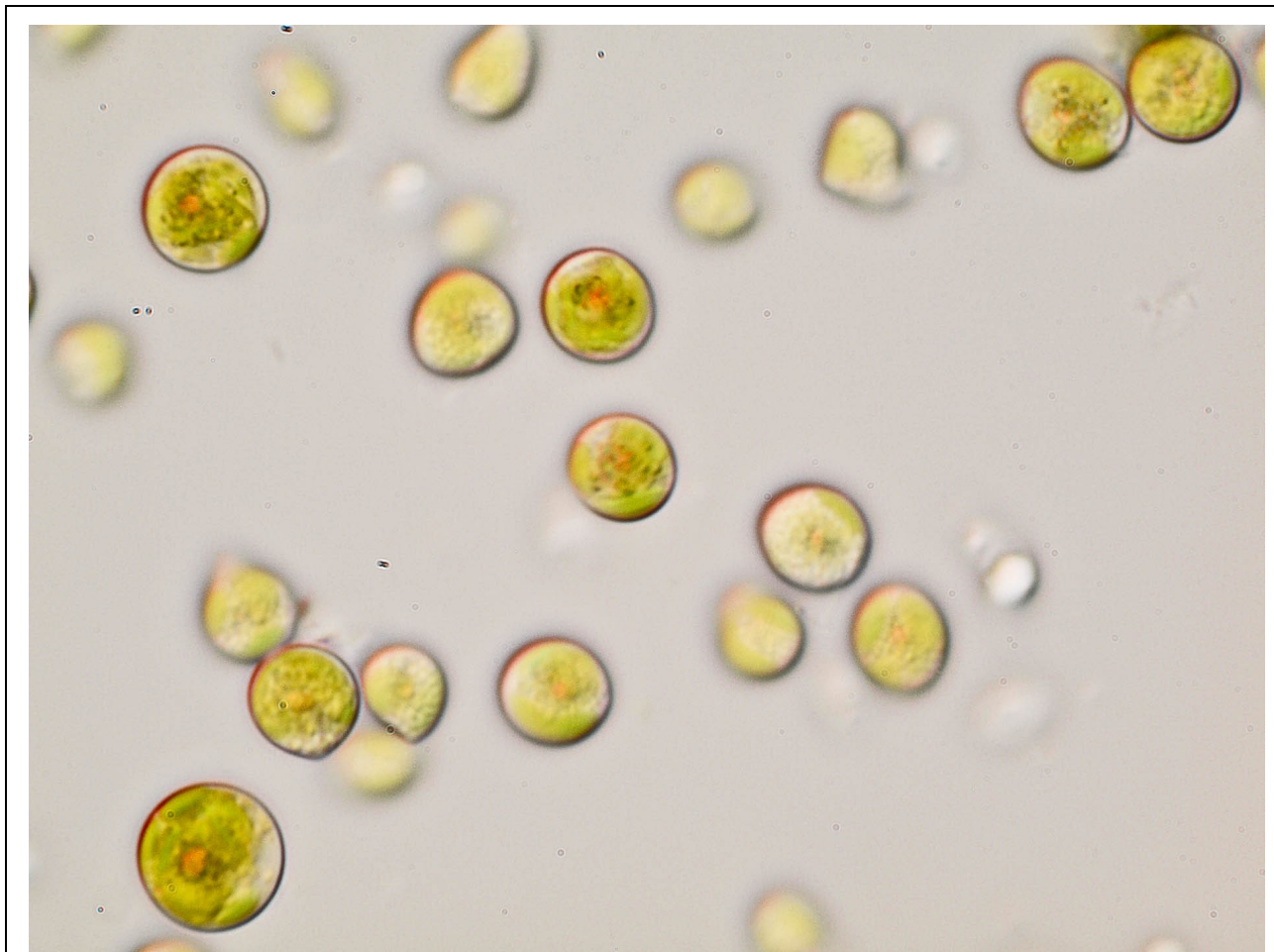
Obsahují jeden až čtyři parietální chloroplasty bez věncové lamely. V chloroplastech můžeme vidět plastoglobuly uložené mezi tylakoidy, ale žádný pyrenoid. Víceméně kulovité jádro se vyskytuje zhruba uprostřed buňky a v průměru měří 1,5 až 1,75 μm . V cca 50% případů je v jádru patrné jadérko s průměrem až 0,5 μm .

Buňky obsahují více různě velkých mitochondrií s tubulárními kristami. Ve všech zástupcích nalezneme lamelární váčky, které jsou 0,1 až 1,2 μm dlouhé. „Reddish globule“ pozorujeme u starších buněk. „Reddish globule“ vypadá ve světelném mikroskopu celistvá. Kontinuum jaderné a plastidové membrány nebylo u žádného ze zkoumaných kmenů nalezeno. Buněčná stěna je celistvá a široká od 0,05 μm do 0,1 μm .

III.1.2. „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301

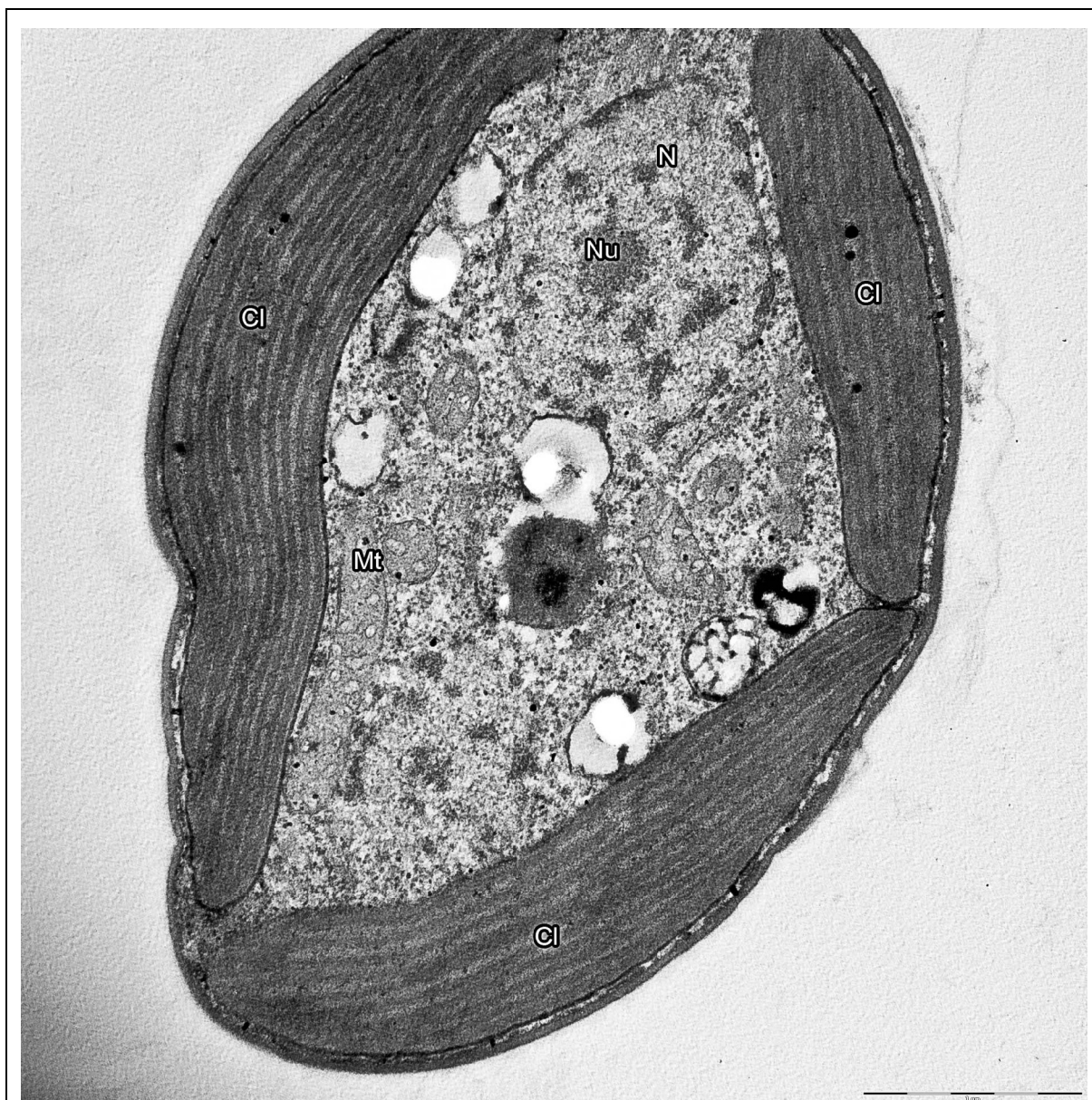
„*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301 tvoří kulaté a oválné buňky. Buňky obsahují několik parietálních chloroplastů. Ve starších a větších buňkách lze snadno pozorovat oranžovou až načervenalou „reddish globule“. Kulaté buňky měří v průměru 5 až 7,5 μm . Oválné buňky dosahují na délku až 10 μm a na šířku 5 μm (Obr. 4).

Jádro je víceméně kulovité o průměru asi 1,5 μm . Uvnitř jádra je často nápadné jadérko (Obr. 5). Chloroplast je parietální a laločnatý bez věncové lamely a pyrenoidu (Obr. 5). Chloroplast má tylakoidy uložené v lamelách po třech (Obr. 6) a čtyři obalné membrány (Obr. 7). Mitochondrie s tubulárními kristami jsou nepravidelně uložené v cytoplasmě a nabývají v závislosti na ose řezu rozmanitého tvaru: kulaté, oválné nebo nápadně dlouhé (Obr. 5). Mitochondrie mohou být až 0,65 μm dlouhé a mají dvě obalné membrány (Obr. 7).

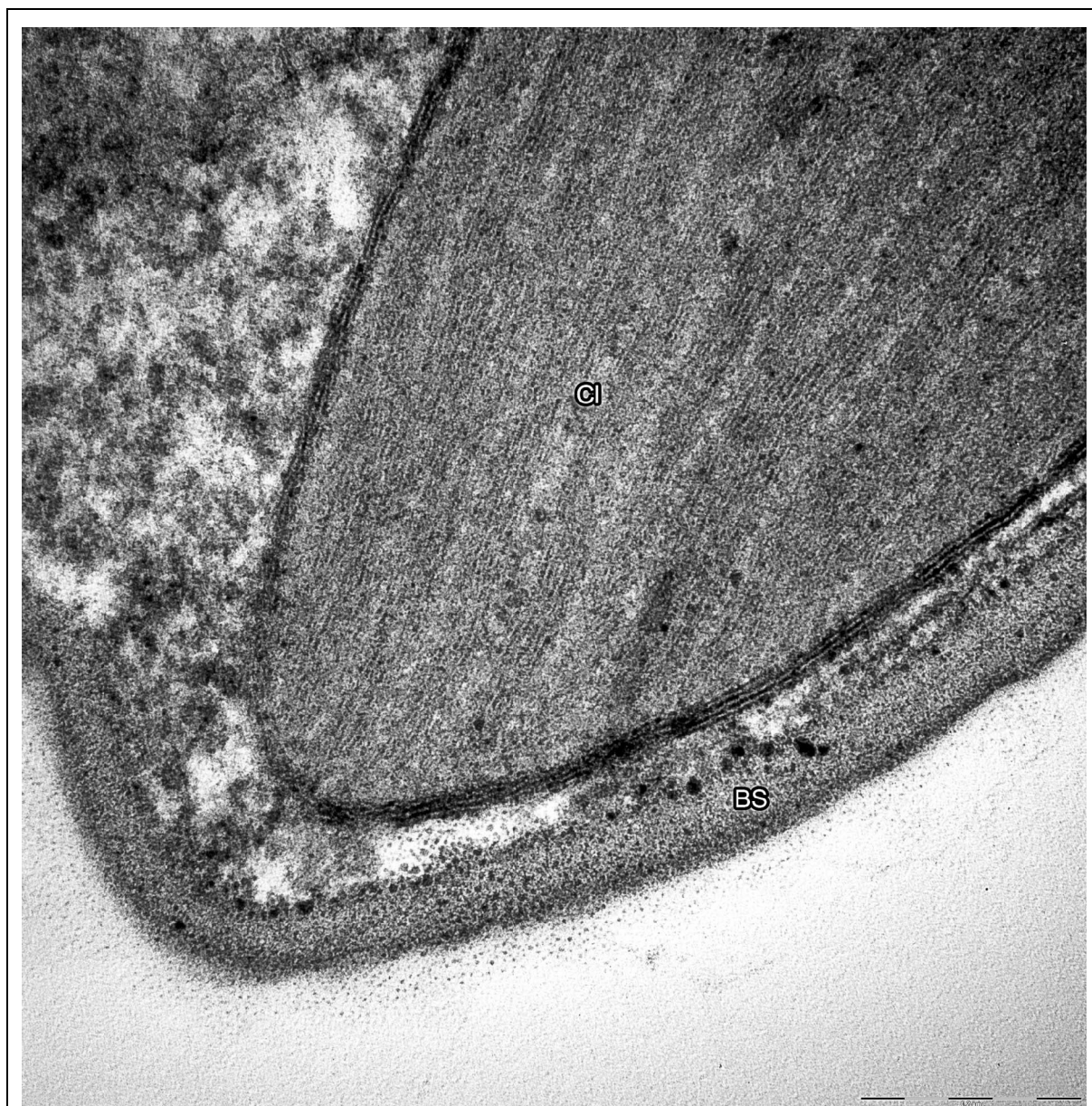


Obr. 4: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301

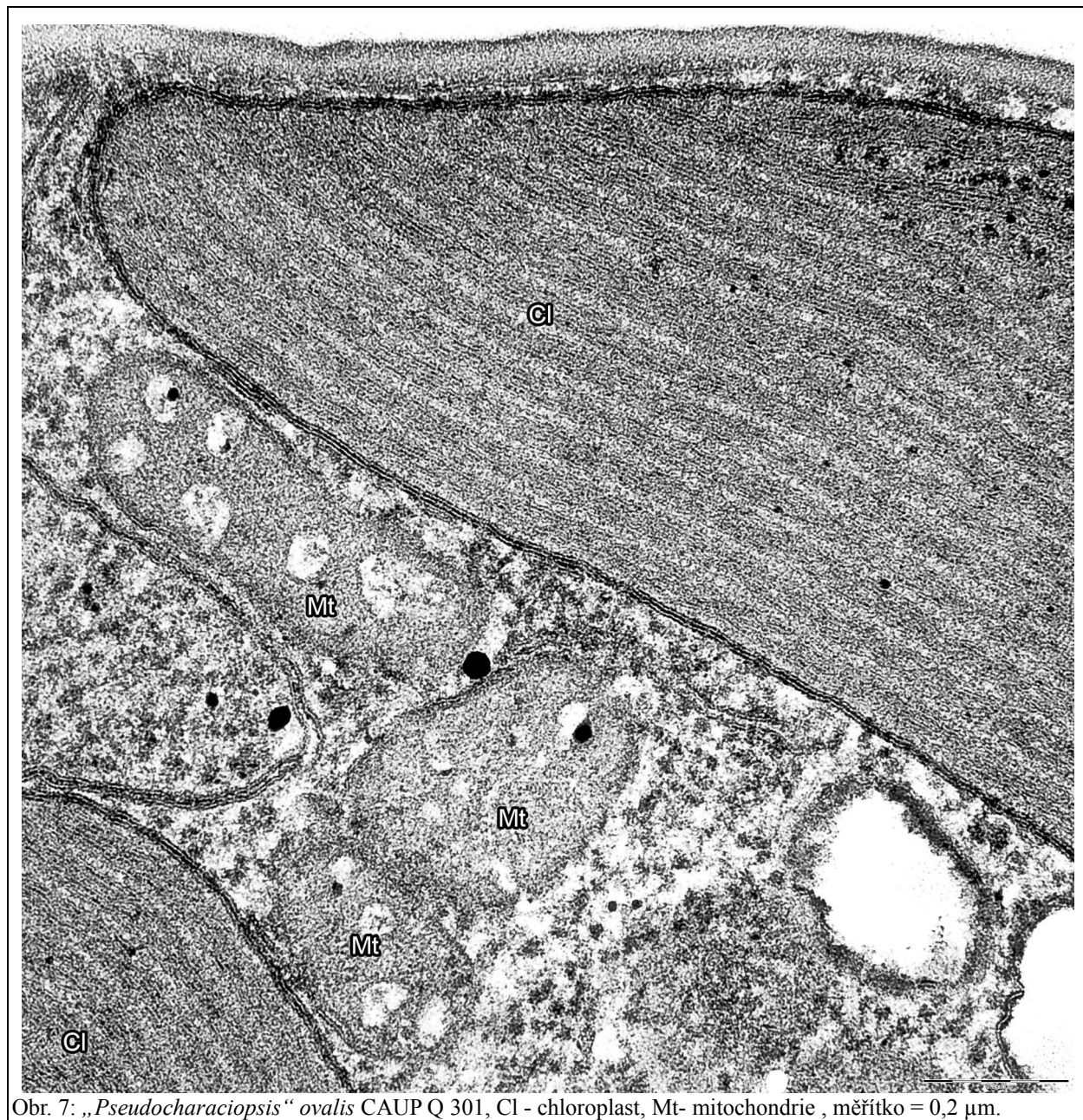
„*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301 obsahuje lamelární váčky, které měří od 0,4 μm do 0,65 μm na délku a od 0,1 μm do 0,2 μm na šířku (Obr. 8). Váčky jsou uložené v cytoplasmě a lamely jsou uložené podélně s delší osou váčku. Buněčná stěna je celistvá a v průměru asi 0,06 μm široká (Obr. 6).



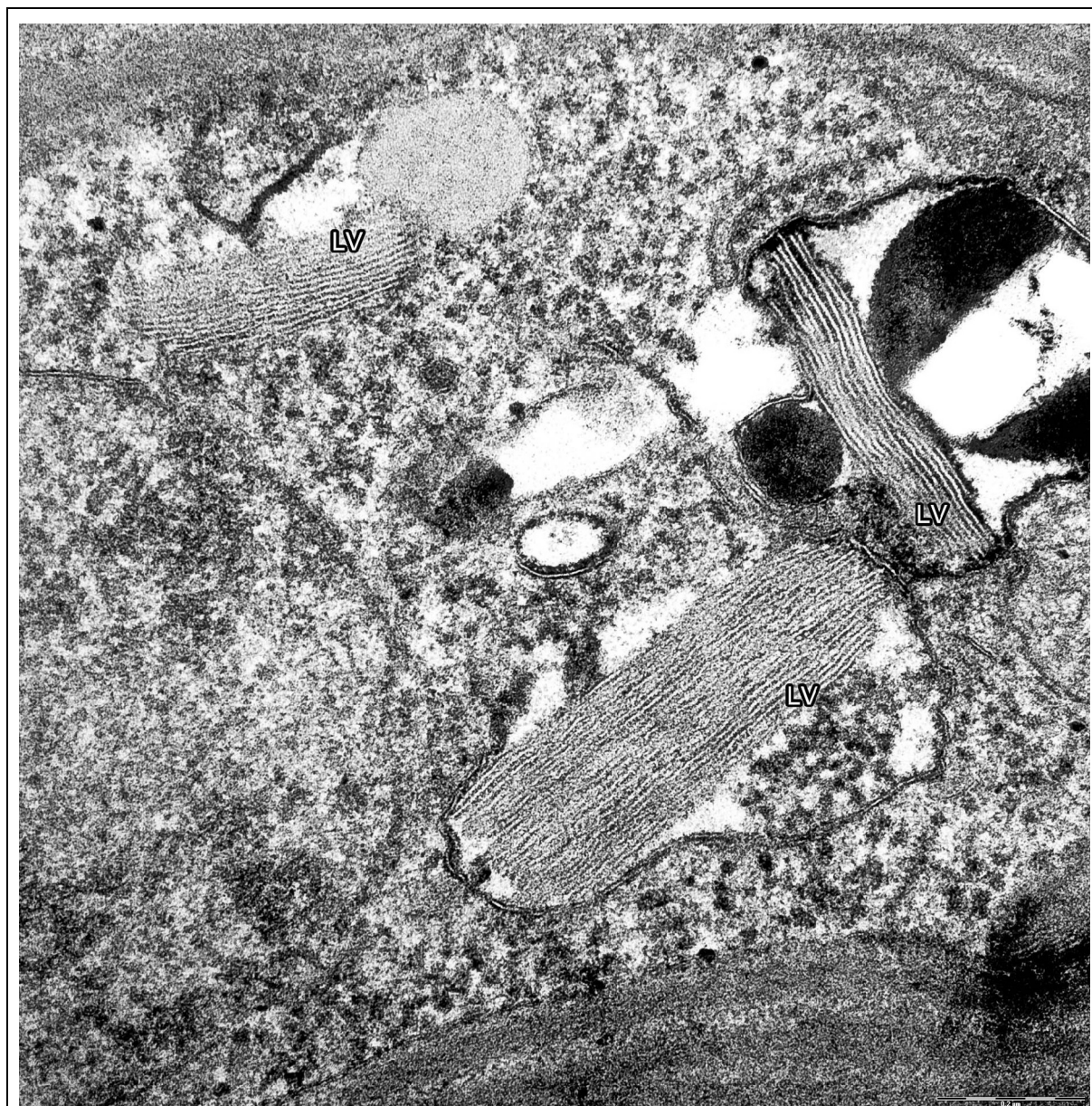
Obr. 5: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301, Cl - chloroplast, Mt - mitochondrie, N - jádro, Nu - jadérko, měřítko = 1 μ m.



Obr. 6: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, měřítko = 0,2 μm .



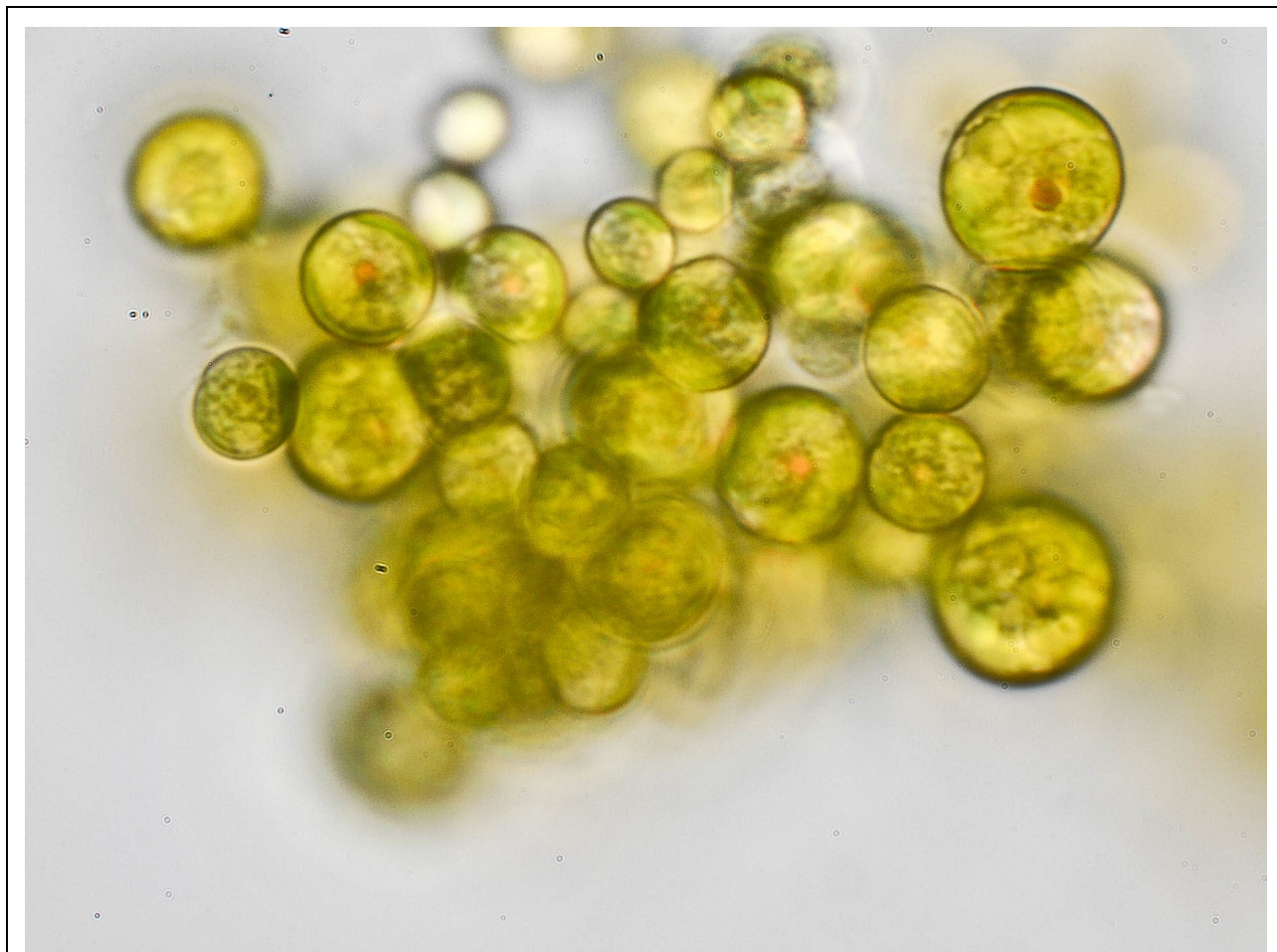
Obr. 7: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301, Cl - chloroplast, Mt- mitochondrie , měřítko = 0,2 μ m.



Obr. 8: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301, LV - lamelární váčky, měřítko = 0,2 μm .

III.1.3. *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q401

Buňky *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q401 mají kulovitý tvar. Uvnitř buněk se nachází jeden až čtyři parietální chloroplasty. Počet chloroplastů nezávisí na velikosti buněk. Většina buněk měří v průměru cca 5 μm , ale největší buňky měří až 12 μm v průměru. Většina dospělých buněk obsahuje „reddish globule“ a v největších buňkách dosahuje až 2,5 μm v průměru (Obr. 9).



Obr. 9: *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q 401

Jádro je kulovité s průměrem až 1,5 μm . Uvnitř jádra lze v polovině případů spatřit jadérko, které měří až 0,5 μm (Obr. 10). Chloroplast je nástěnný bez věncové lamely a pyrenoidu (Obr. 11). Mezi tylakoidy, které jsou uspořádané v lamelách po třech, jsou uloženy plastoglobuly (Obr. 12).

V buňkách *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q401 jsou v cytoplasmě uloženy lamelární váčky, které dosahují délky až 1 μm (Obr. 11). Buněčná stěna je celistvá s průměrnou šířkou asi 0,05 μm . Bazální tělíska bičíků zůstávají zachována i ve vegetativních buňkách. Bazální tělísko měří v průměru 0,26 μm . Jednotlivé páry mikrotubulů jsou asi 0,06 μm široké (Obr. 13).



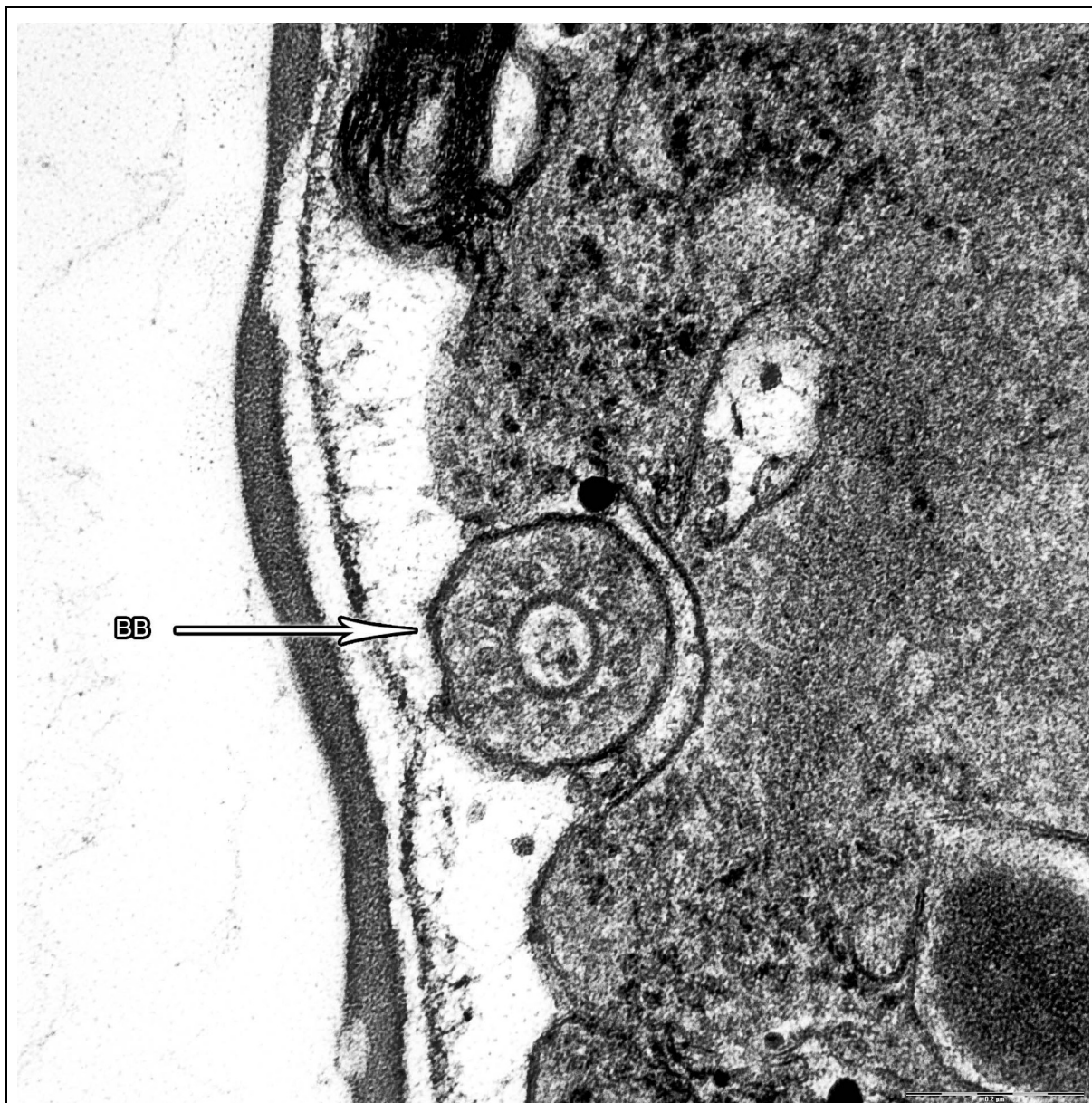
Obr. 10: *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q401, Cl - chloroplast, Mt - mitochondrie, N - jádro, Nu - jadérko, měřítko = 0,5 μm .



Obr. 11: *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q401, Cl - chloroplast, LV - lamelární váčky, Pl - plastoglobuly, měřítko = 0,5 μm .



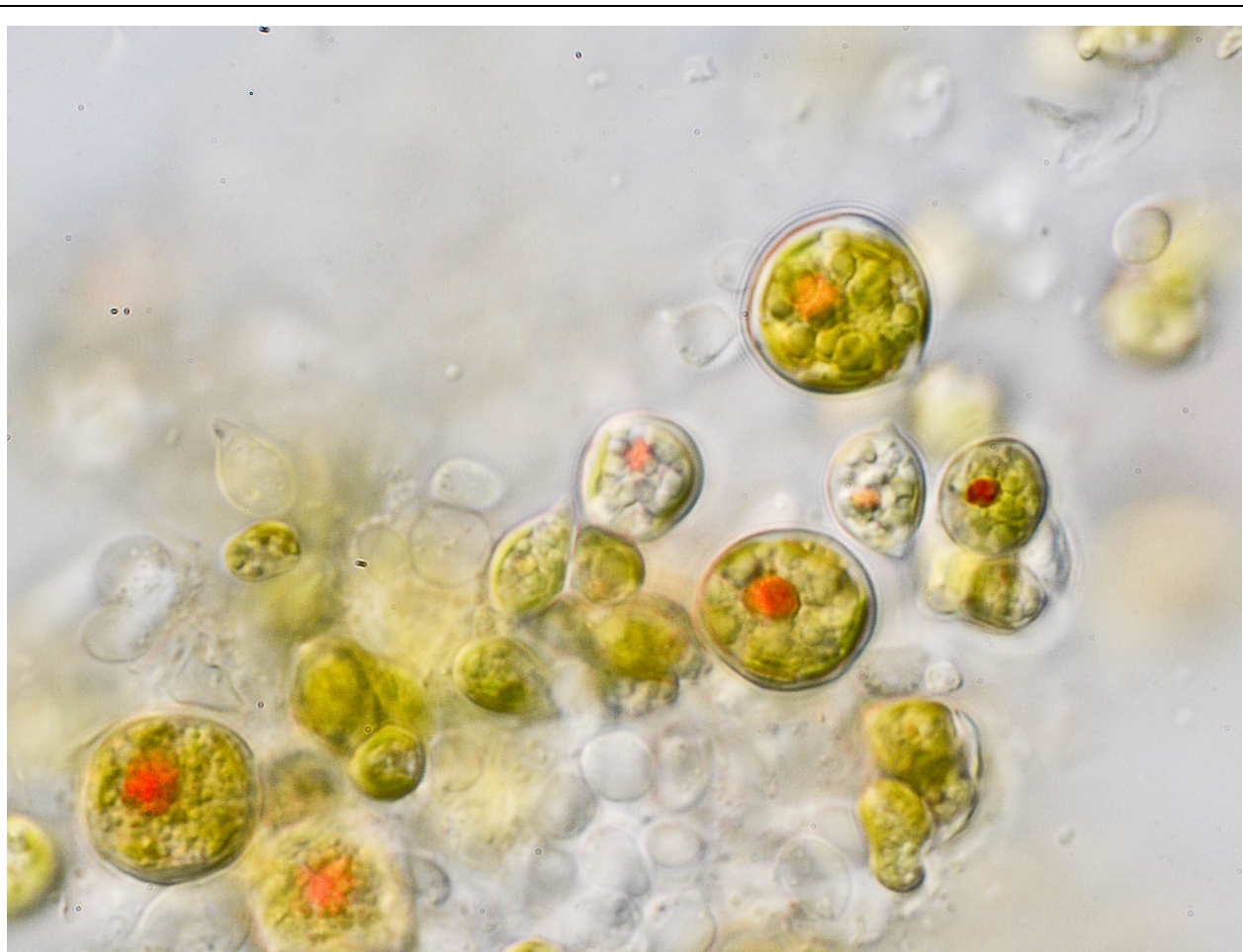
Obr. 12: *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q401, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, Pl - plastoglobuly, měřítko = 0,5 μm .



Obr. 13: *Pseudellipsoidion edaphicum* CAUP Q401, BB - bazální tělisko, měřítko = 0,2 μm.

III.1.4. „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302

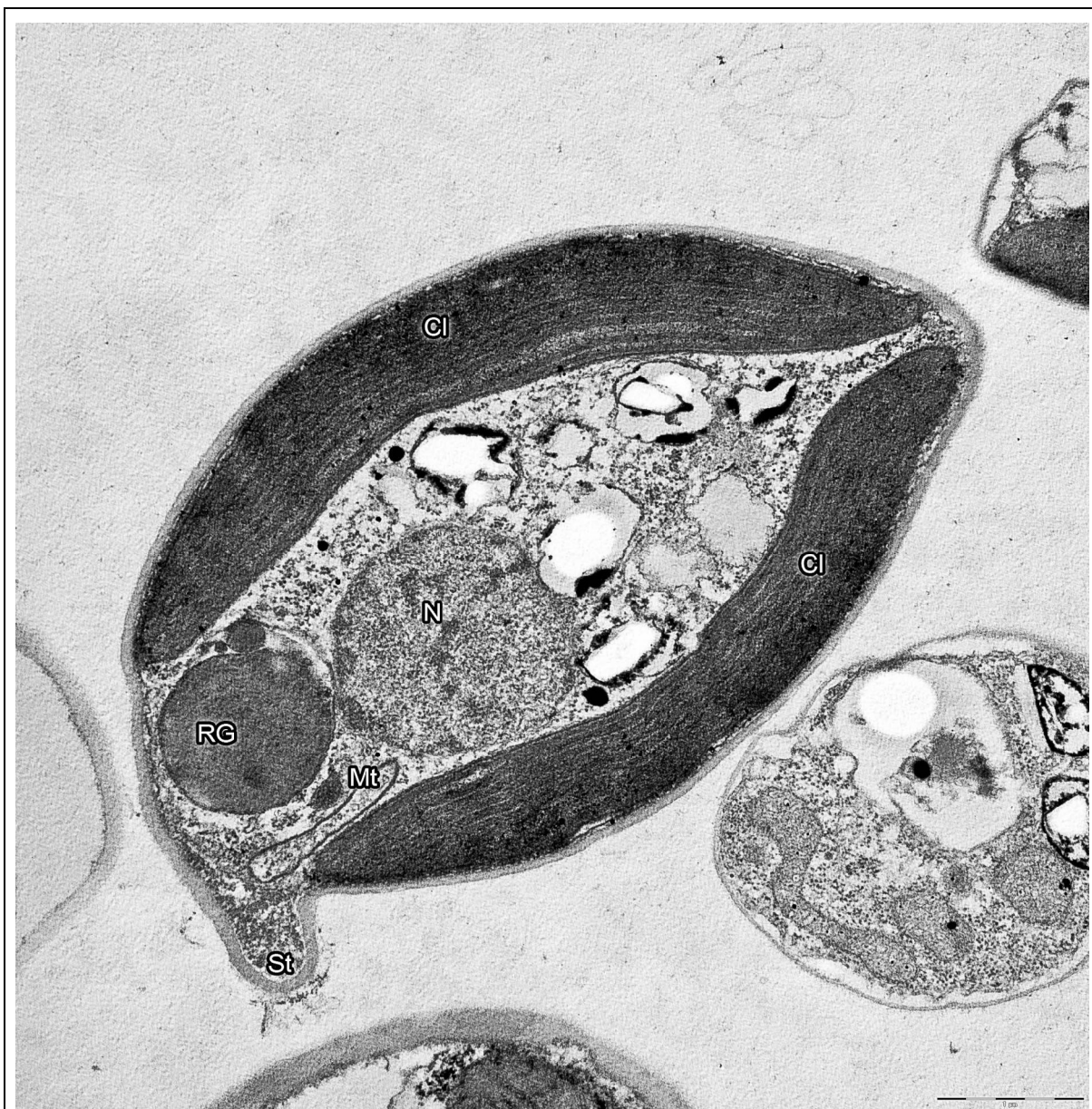
„*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302 tvoří ze studovaných kmenů největší buňky. Velké kulaté buňky dosahují v průměru 12,5 až 15 μm . „Reddish globule“ uvnitř těchto buněk má v průměru až 3,5 μm . Většinu buněk v kultuře ale tvoří kulaté buňky o průměru asi 7,5 μm a oválné buňky se stopkou cca 10 μm dlouhé a 7- 8 μm široké. Ve všech typech buněk se vyskytuje „reddish globule“. Buňky obsahují jeden až dva nástěnné chloroplasty (Obr. 14).



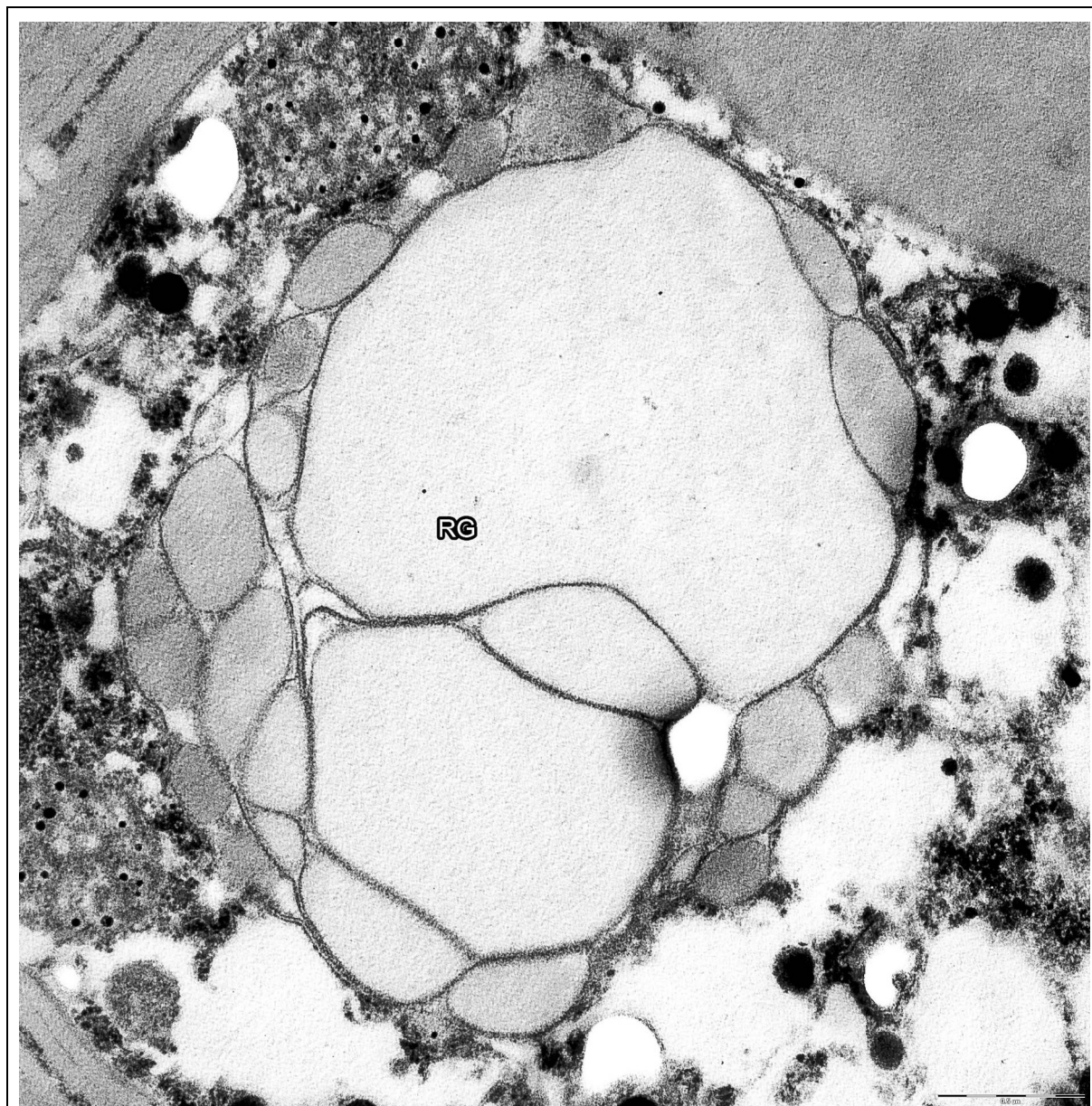
Obr. 14: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302

Buňky jsou i oválné se stopkou, která je derivátem buněčné stěny (Obr. 15). Buněčná stěna je celistvá a asi 0,1 μm široká (Obr. 17). Jádro je kulovité s průměrem až 1,75 μm . „Reddish globule“ je zpočátku celistvá, ale v průběhu ontogeneze se rozpadá na několik různě velkých kapének, které jsou všechny dohromady obaleny membránou. Měří asi 2,8 μm x 2,5 μm (Obr. 16).

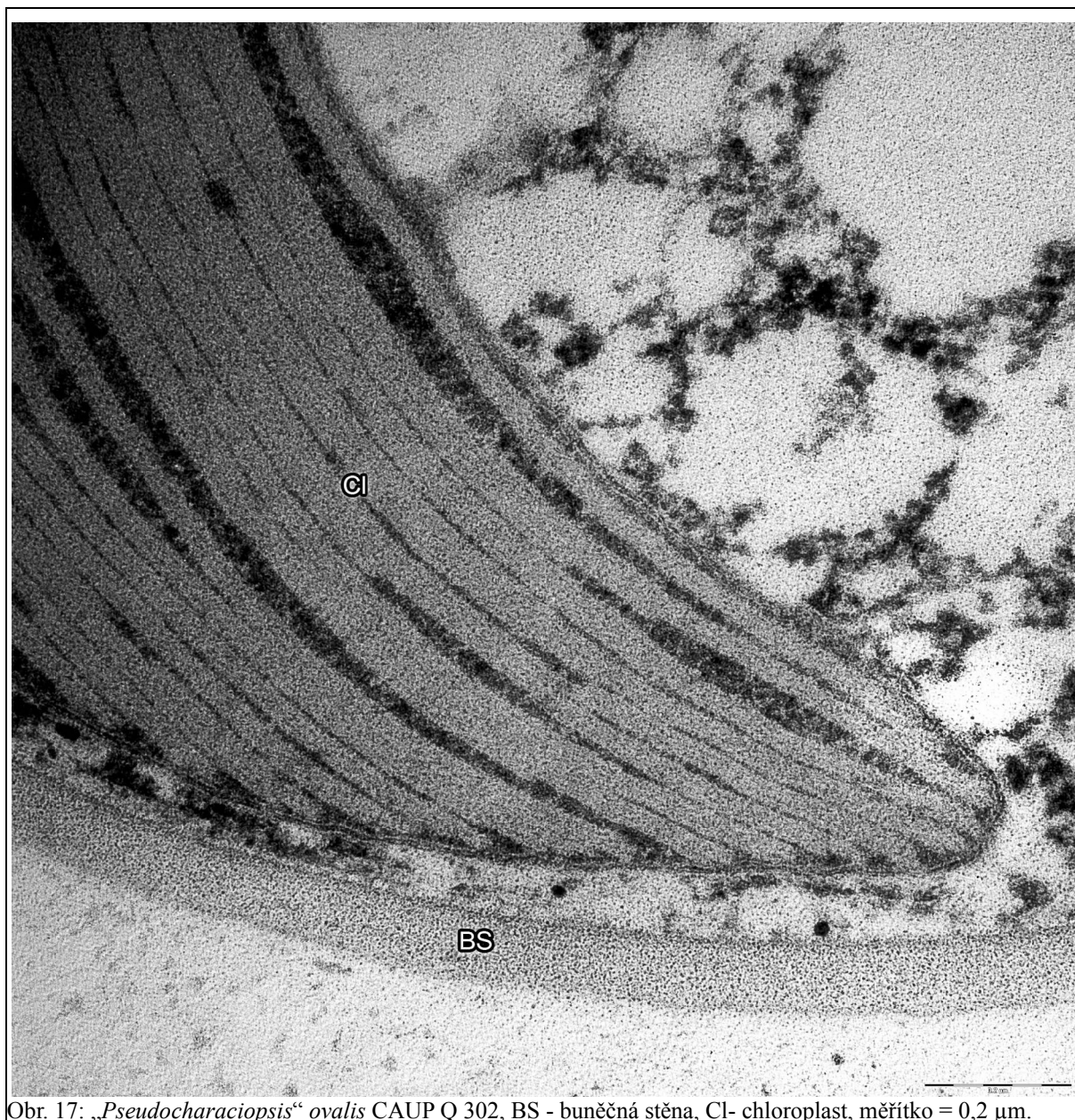
Chloroplast je parietální bez věncové lamely a pyrenoidu. Mezi tylakoidy jsou často umístěné plastoglobuly (Obr. 18). Lamelární váčky u „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302 mají velice jemné vrstvení. Dosahují délky od 1 do 1,2 μm (Obr. 19).



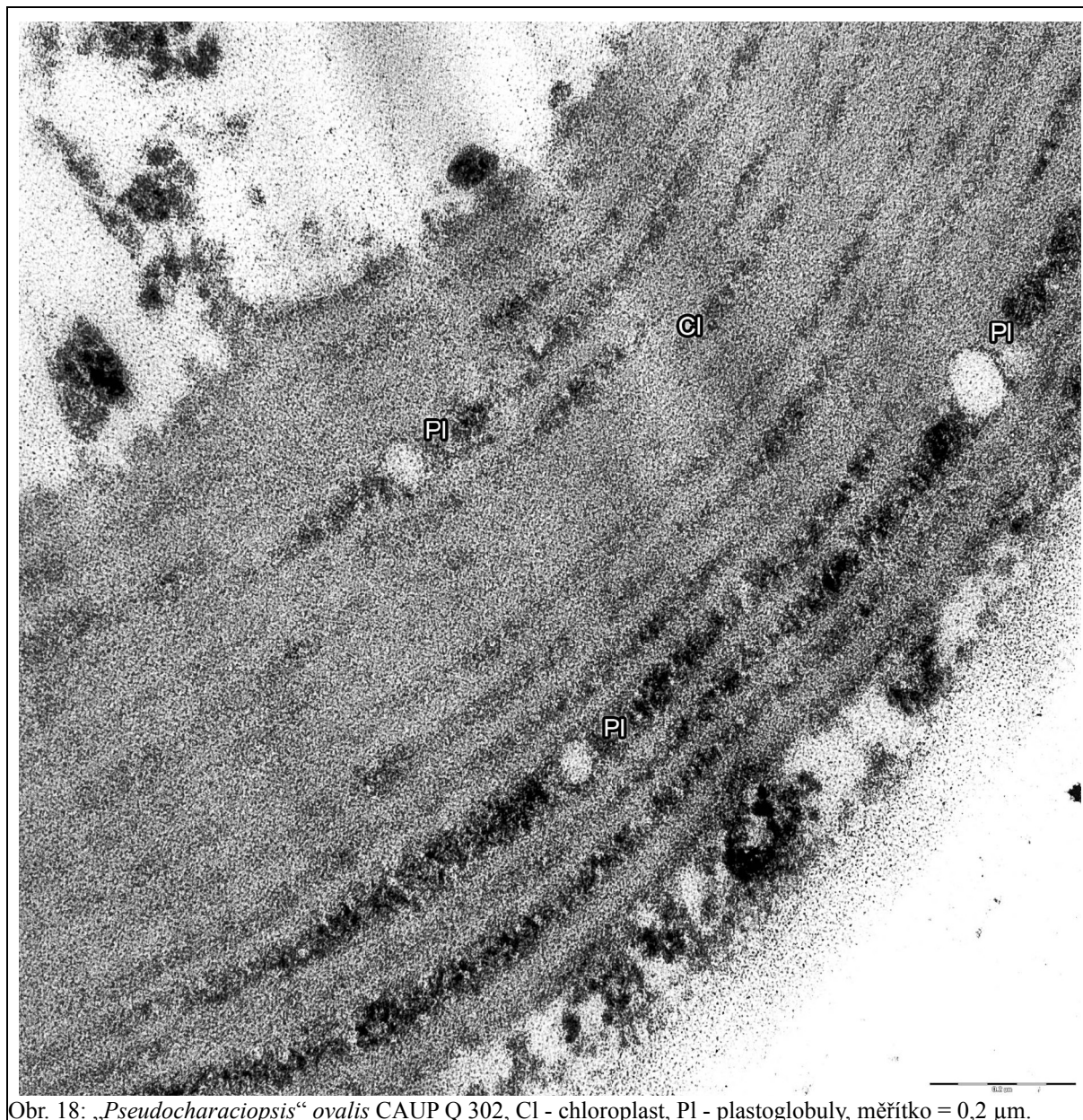
Obr. 15: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302, Cl - chloroplast, Mt - mitochondrie, N - jádro, RG - „reddish globule“, St - stopka, měřítko = 1 μ m.



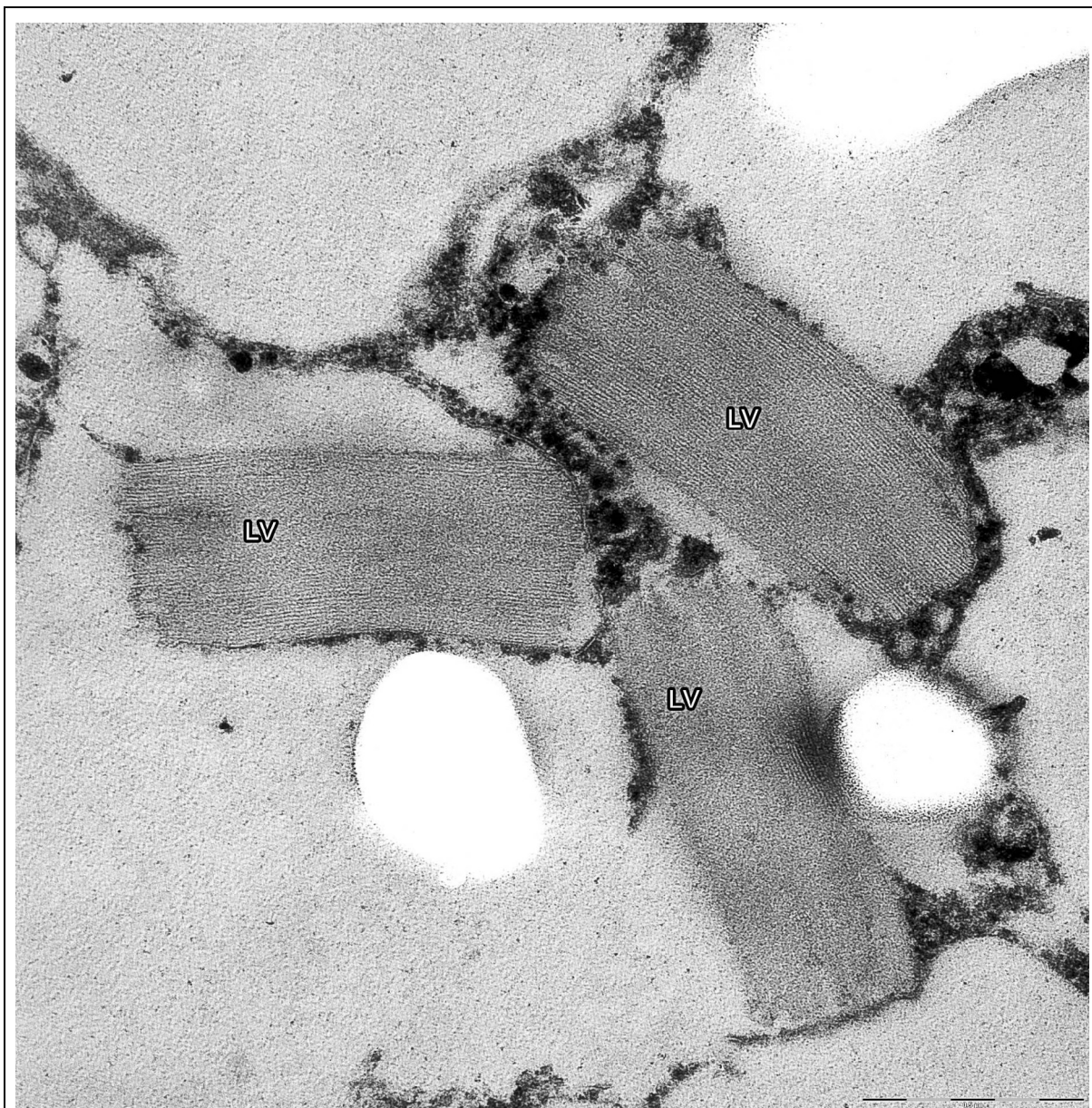
Obr. 16: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302, RG - „reddish globule“, měřítko = 0,5 μm .



Obr. 17: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302, BS - buněčná stěna, Cl- chloroplast, měřítko = 0,2 μ m.



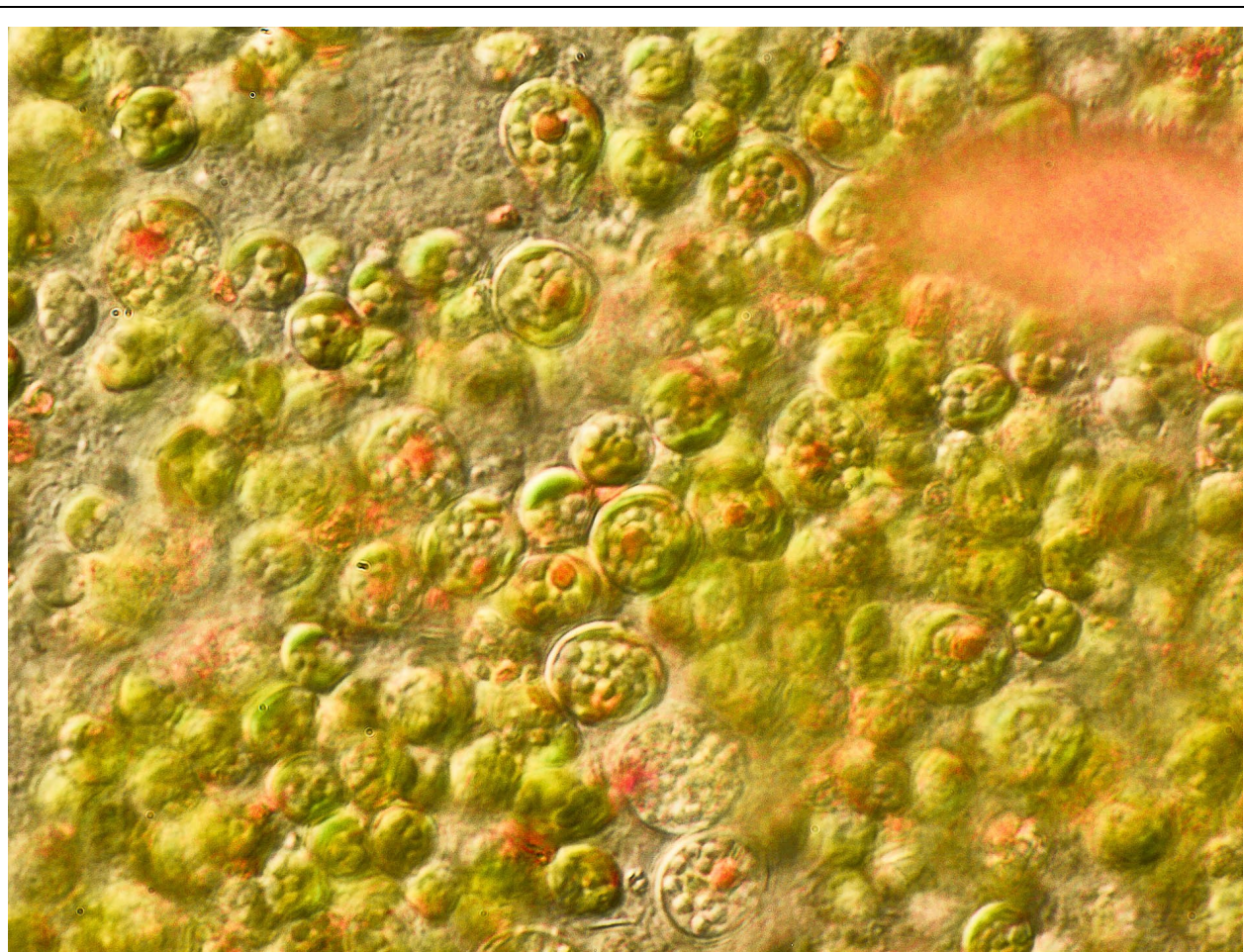
Obr. 18: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302, Cl - chloroplast, Pl - plastoglobuly, měřítko = 0,2 μ m.



Obr. 19: „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302, LV - lamelární váčky, měřítko = 0,5 μm .

III.1.5. Mary 8/ 18 T- 3d

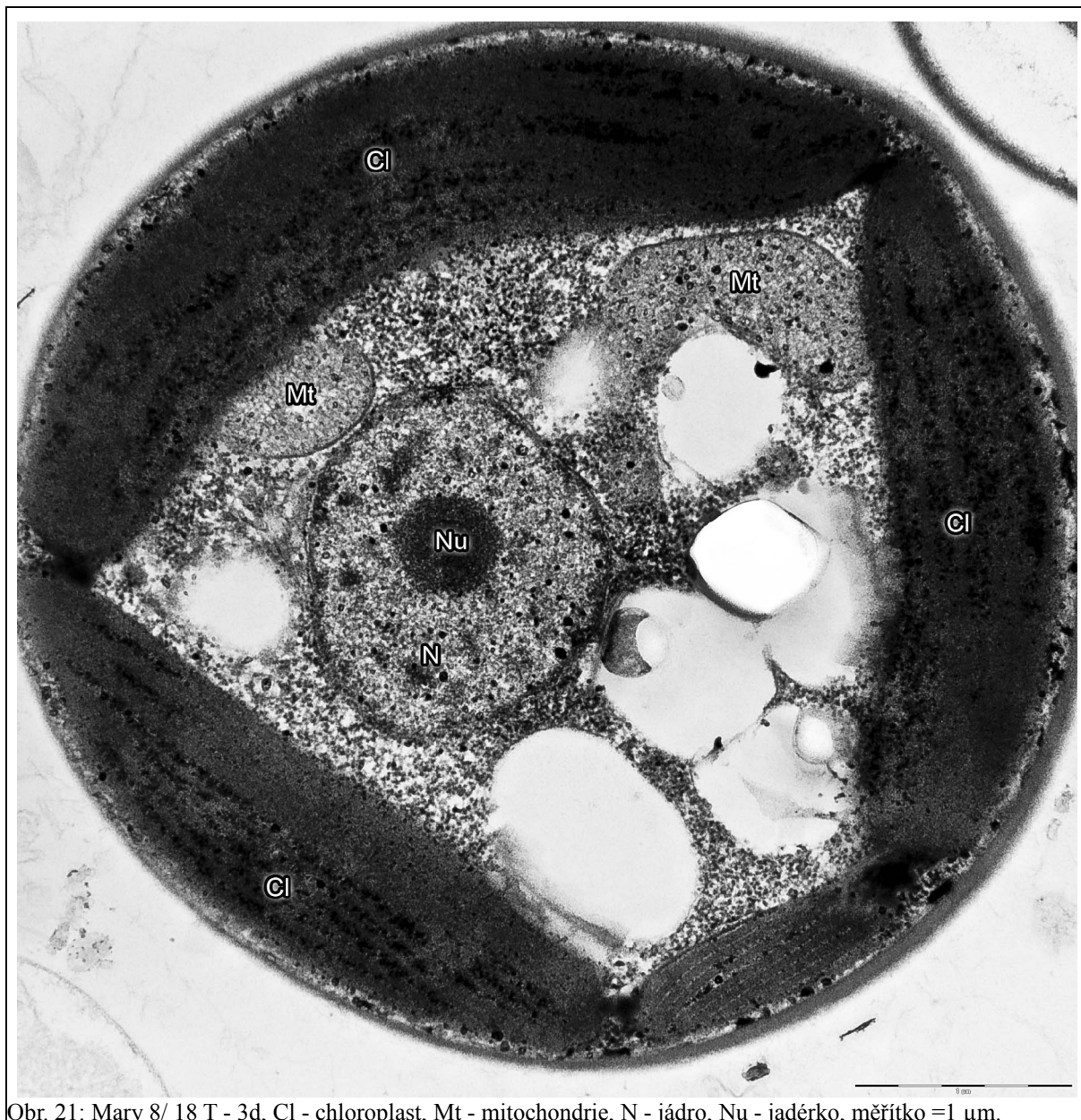
Kmen Mary 8/ 18 T- 3d tvoří kulaté buňky s jedním až dvěma chloroplasty. Buňky mohou tvořit stopku, pomocí které se přichycují k substrátu. Většina buněk má průměr 4 až 5 μm . V kultuře ale lze snadno pozorovat i větší buňky s průměrem až 10 μm . V těchto i ostatních buňkách se téměř vždy nachází „reddish globule“, která působí na pohled celistvě (Obr. 20).



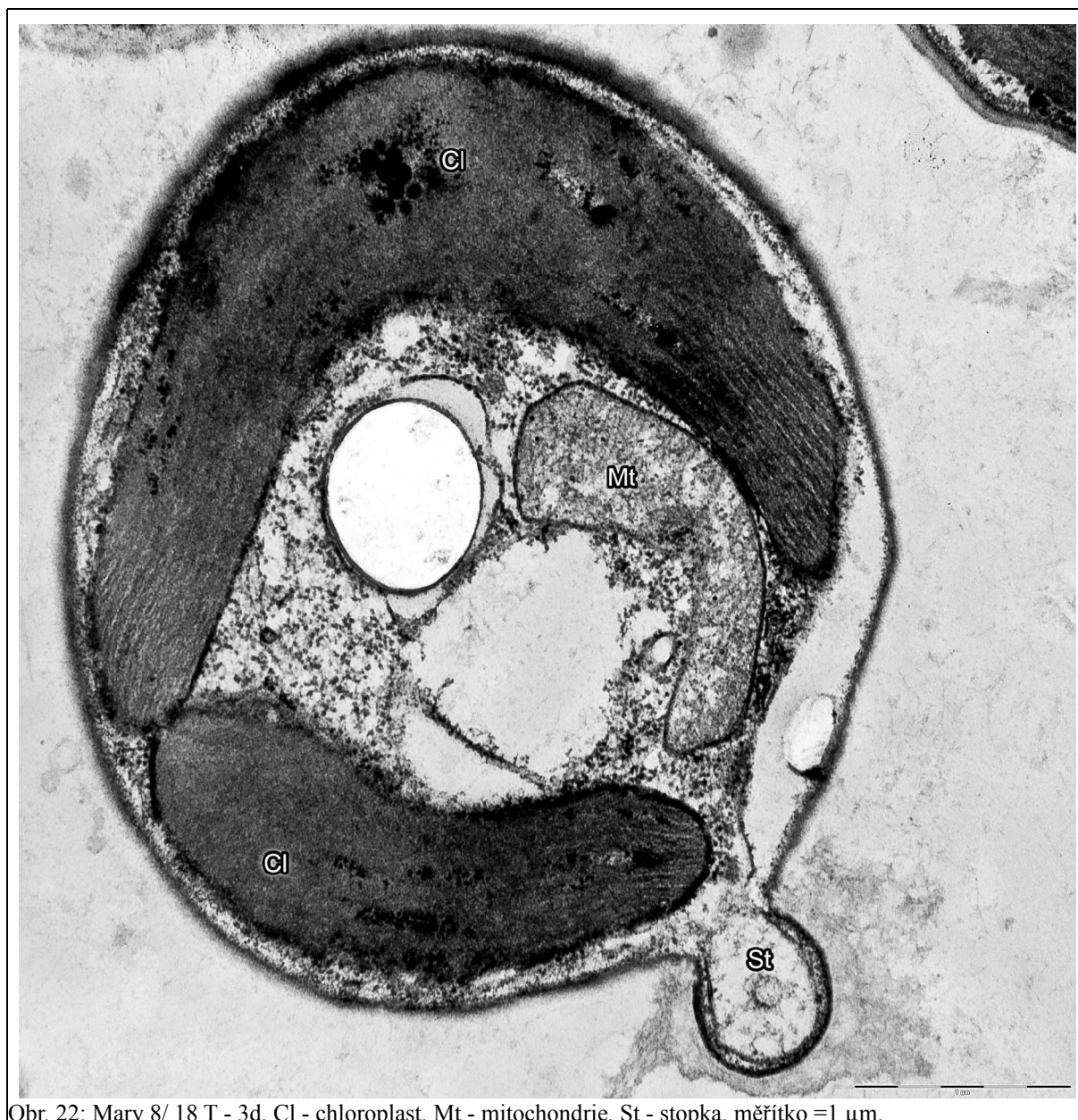
Obr. 20: Mary 8/ 18 T- 3d

Stopka jako derivát buněčné stěny se tvoří u téměř kulatých buněk. Stopka může být až 0,7 μm široká. Buněčná stěna je celistvá a v nejširších částech až 0,07 μm široká (Obr. 22).

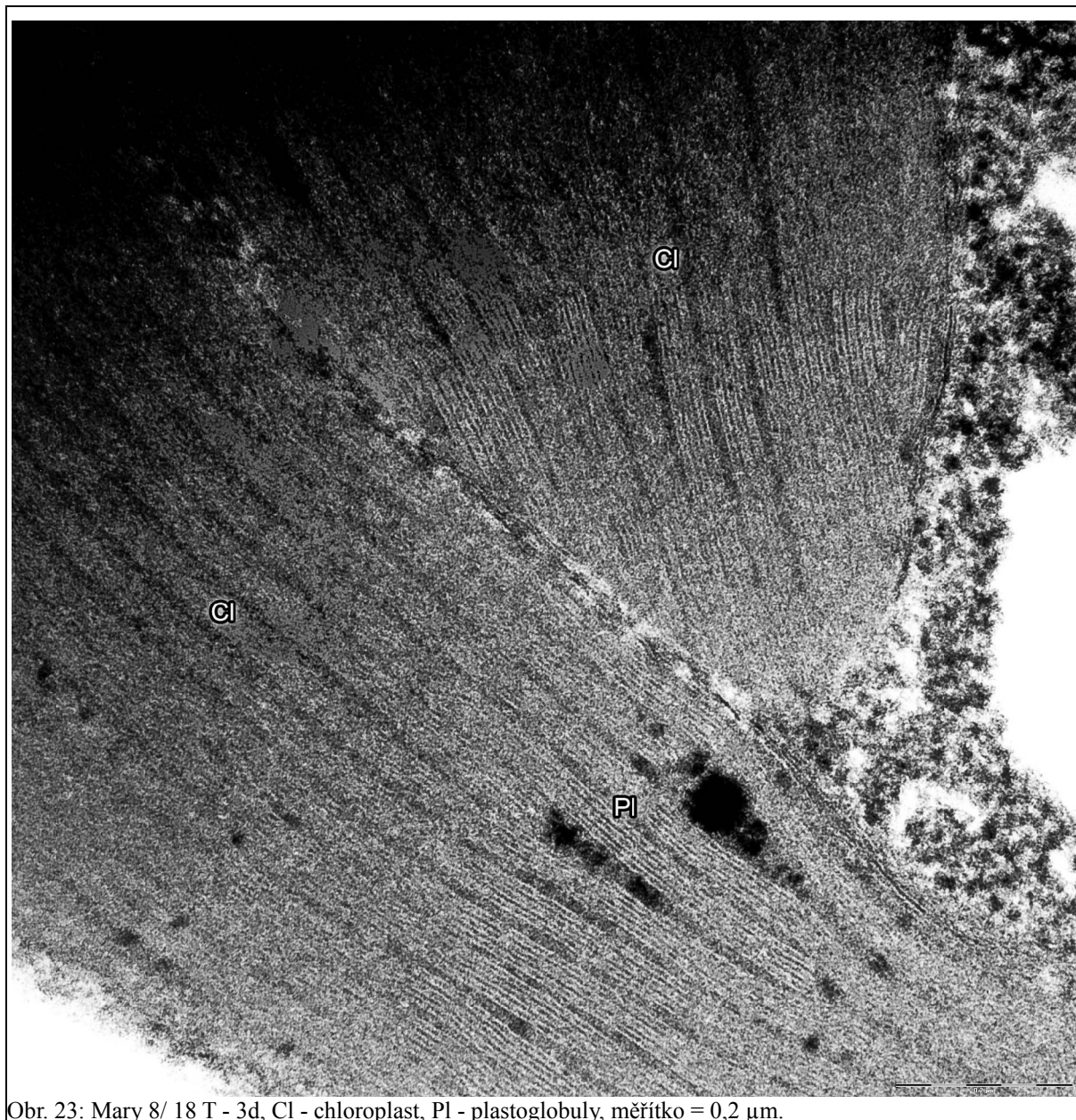
Kulaté jádro s průměrem až 1,5 μm leží uprostřed buňky. Uvnitř se často nachází jadérko s průměrem až 0,5 μm (Obr. 21). Chloroplast je nástěnný bez věncové lamely a pyrenoidu. Mezi tylakoidy jsou umístěné plastoglobuly (Obr. 23). Mitochondrie s tubulárními kristami mají na řezu různé tvary a mohou být až 2,25 μm dlouhé (Obr. 22).



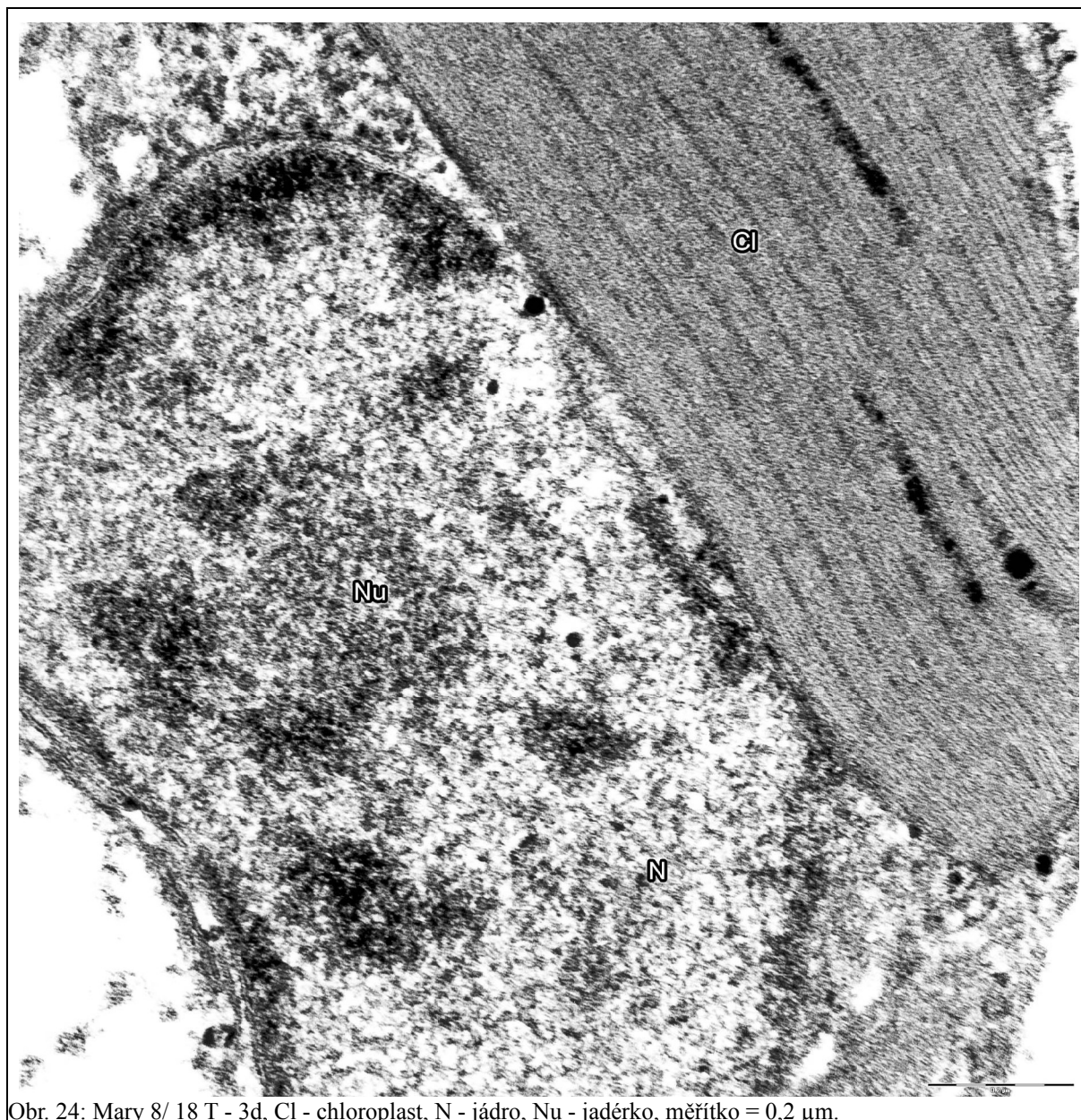
Obr. 21: Mary 8/ 18 T - 3d, Cl - chloroplast, Mt - mitochondrie, N - jádro, Nu - jadérko, měřítko =1 μm .



Obr. 22: Mory 8/ 18 T - 3d, Cl - chloroplast, Mt - mitochondrie, St - stopka, měřítko =1 μm.



Obr. 23: Mary 8/ 18 T - 3d, Cl - chloroplast, Pl - plastoglobuly, měřítko = 0,2 μ m.



Obr. 24: Mary 8/ 18 T - 3d, Cl - chloroplast, N - jádro, Nu - jadérko, měřítko = 0,2 μ m.

III.2. MONODOPSIDACEAE

III.2.1. Charakteristika druhů

Pseudotetraëdriella kamillae SAG 2056, „*Monodus*“ *guttula* CCALA 826 a *Monodopsis unipapilla* SAG 8. 83. Tyto druhy patří do řádu Eustigmatales, čeledi Monodopsidaceae.

„*Monodus*“ *guttula* CCALA 826 a *Monodopsis unipapilla* SAG 8. 83 tvoří převážně oválné buňky. Občas se v kultuře tvoří i buňky kulovité. *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056 tvoří buňky v kultuře nepravidelné. V přírodě se vyskytuje ve formě se čtyřmi pravidelnými laloky. Velikost buněk všech kmenů kolísá mezi 4 až 7 μm u kulatých buněk. Oválné buňky měří od 2, 5 μm do 5 μm na šířku a od 5 μm do 10 μm na délku. Uvnitř buněk nalezneme jeden až dva chloroplasty. U starších buněk snadno pozorujeme „reddish globule“ s průměrem až 1 μm .

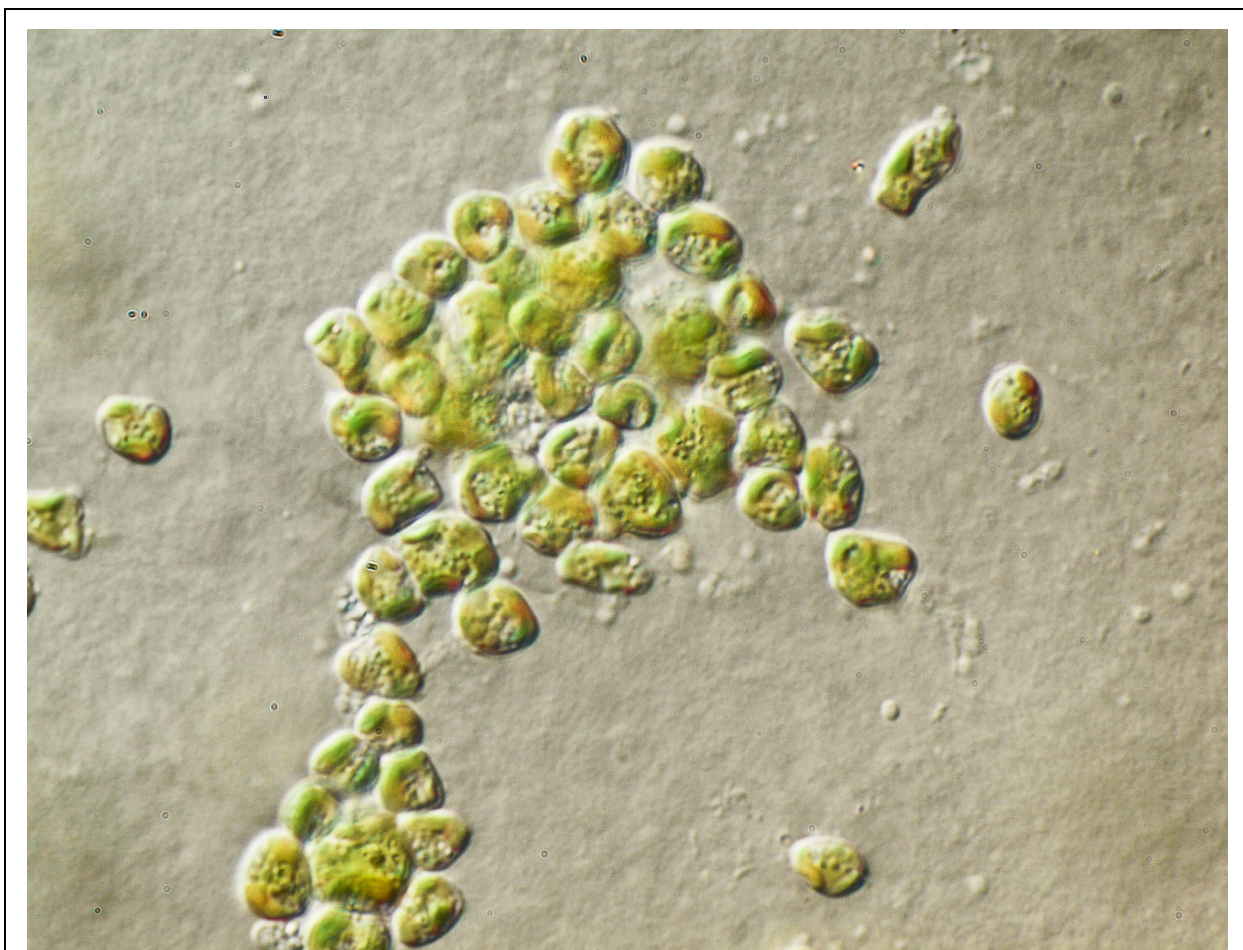
Ve všech třech kmenech jsem pozorovala lamelátní váčky a chloroplasty bez věncové lamely. Lamelátní váčky dosahují délky až 0,75 μm . Uvnitř chloroplastů těchto kmenů jsem našla terminální pyrenoid. Pyrenoid není přerušován žádnými tylakoidy. Jádru má nepravidelný tvar a bývá často uloženo v blízkosti chloroplastu. Dosahuje velikosti 1,5 μm na 1 μm . U *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056 a *Monodopsis unipapilla* SAG 8. 83 je vnější jaderná membrána spojená s vnější jadernou membránou sekundárního plastidu. V buňkách jsem také pozorovala nápadné mitochondrie s tubulárními kristami a u „*Monodus*“ *guttula* CCALA 826 také velký Golgiho aparát. Buněčná stěna je celistvá a široká od 0,05 μm u *Monodopsis unipapilla* SAG 8. 83 a do 0,2 μm u *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056.

III.2.2. *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056

Pseudotetraëdriella kamillae SAG 2056 tvoří v kultuře velice nepravidelné buňky. Buňky mohou být víceméně kulaté, oválné nebo čtyřhranné. Tato řasa je planktonní a v přírodě tvoří pravidelné buňky se čtyřmi laloky. Dosahuje velikosti od 5 μm do 7 μm v průměru. Buňky obsahují obvykle jeden parietální chloroplast. U starších buněk mohou být dva chloroplasty a také u nich lze pozorovat „reddish globule“. Pyrenoid není ve světelném mikroskopu patrný (Obr. 25).

Jádru má víceméně kulovitý tvar s průměrem asi 1 μm (Obr. 26). Bývá uloženo v blízkosti chloroplastu. Vnější membrána jádra a chloroplastu tvoří kontinuum (Obr. 29). Chloroplast nemá věncovou lamelu. Tylakoidy jsou uloženy v lamelách po třech. Mezi tylakoidy jsou umístěné plastoglobuly (Obr. 28). Uvnitř chloroplastu je terminální pyrenoid. Pyrenoid leží mezi tylakoidy a není jimi nijak přerušován (Obr. 27).

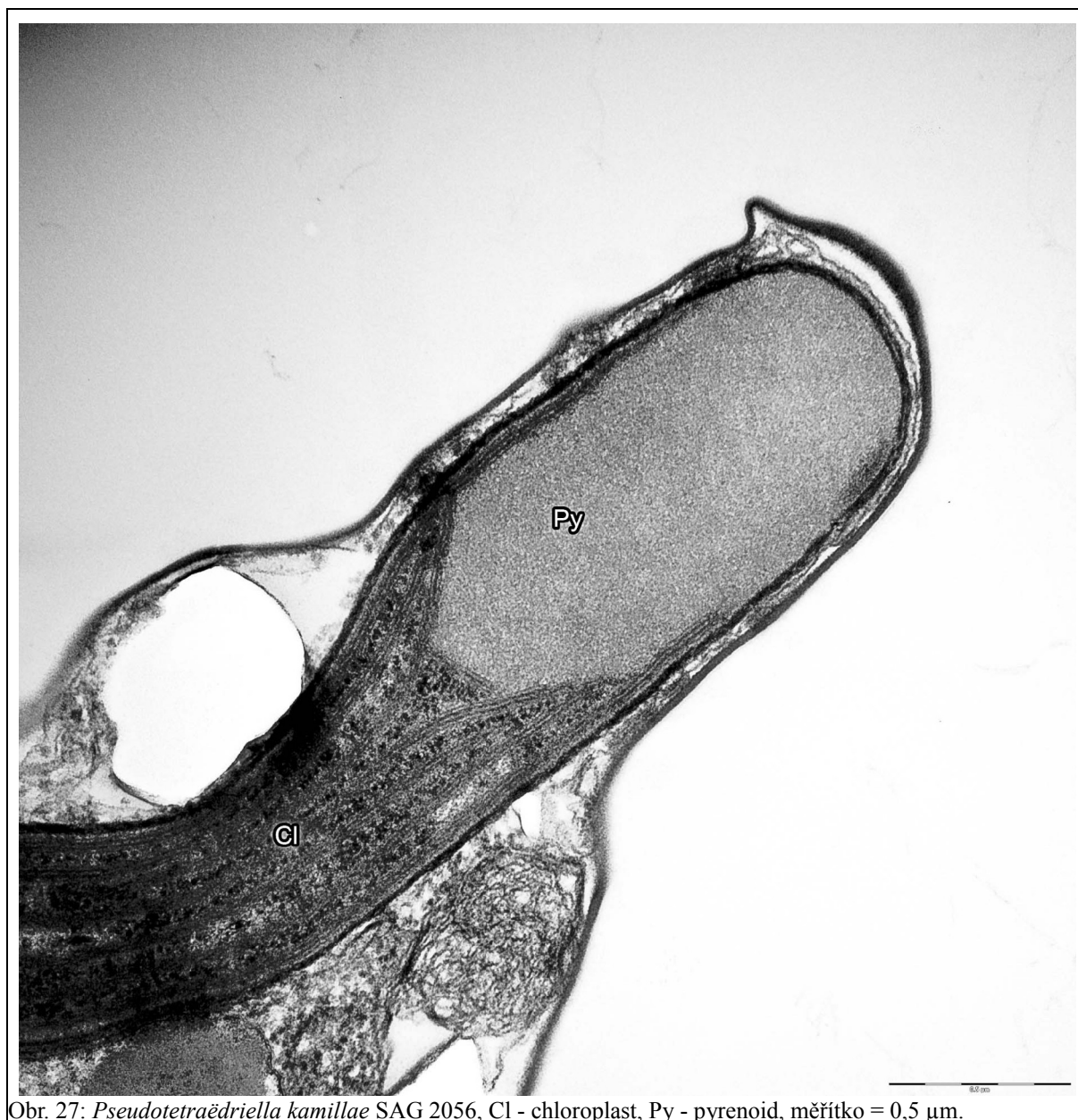
Pseudotetraëdriella kamillae SAG 2056 obsahuje lamelátní váčky až 0,8 μm dlouhé (Obr. 30). Buněčná stěna je celistvá a široká od 0,1 do 0,5 μm (Obr. 28). V buňkách jsou mitochondrie s tubulárními kristami (Obr. 29).



Obr. 25: *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056



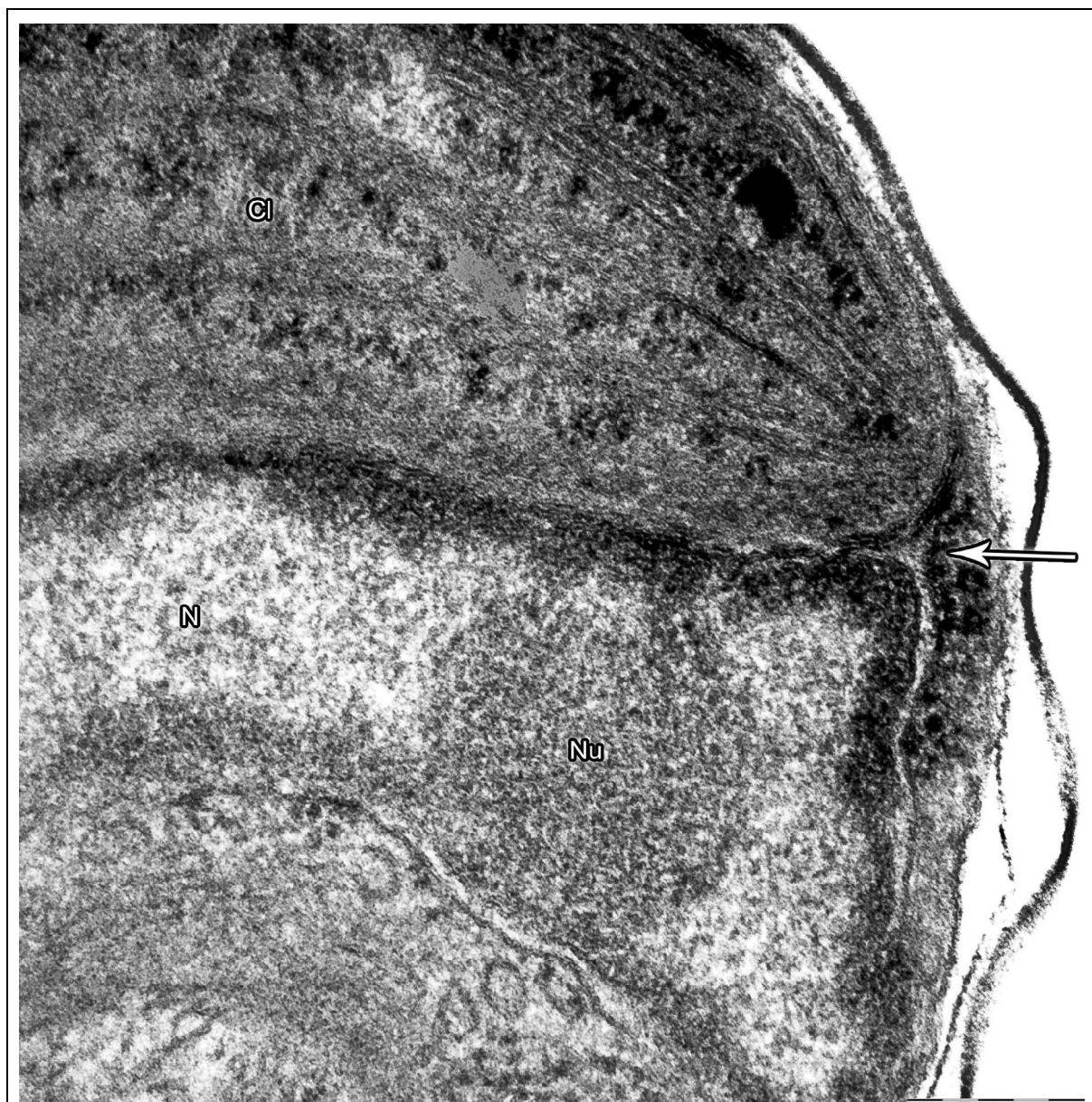
Obr. 26: *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, N – jádro, Py - pyrenoid, měřítko = 0,5 μm .



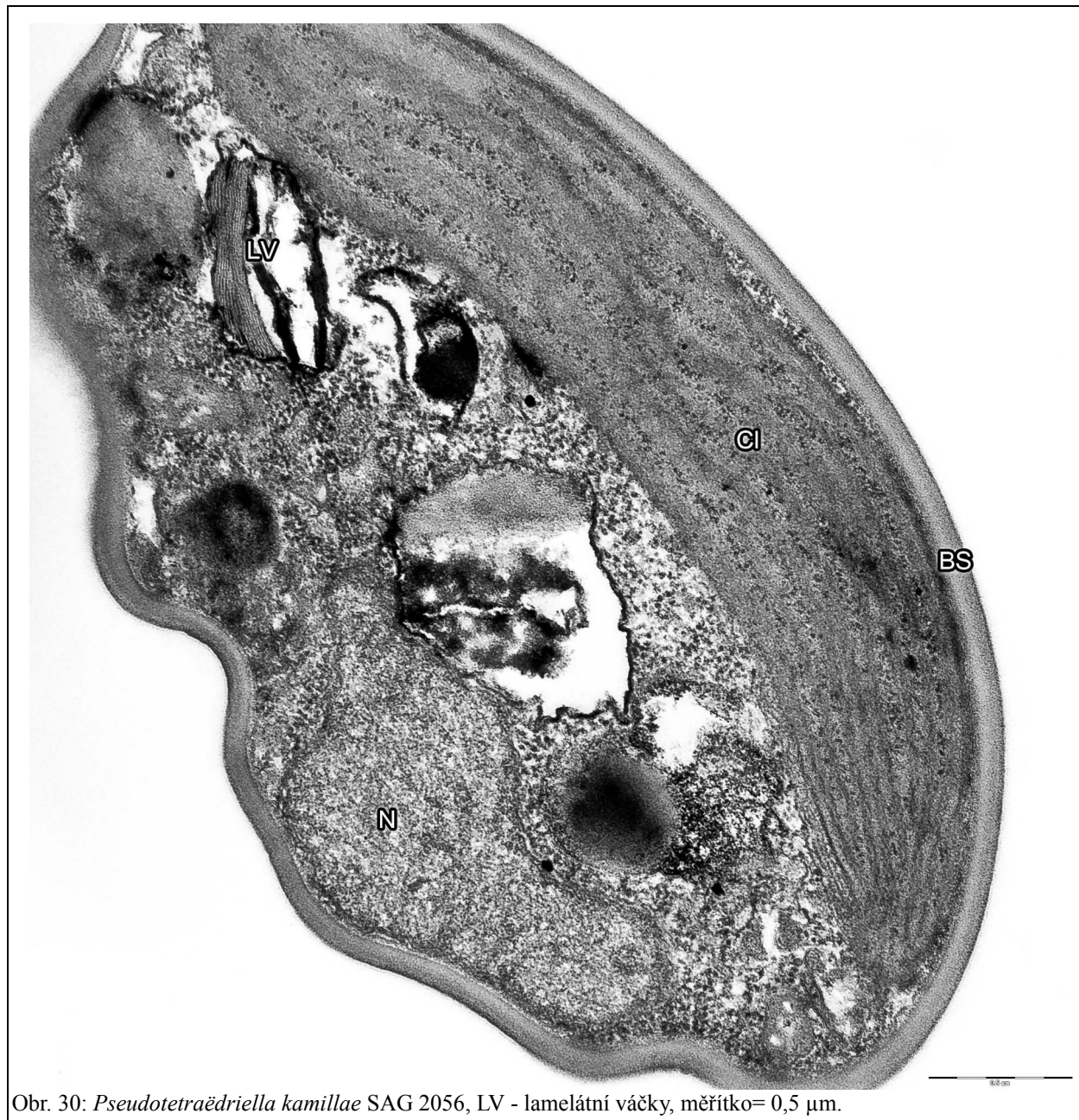
Obr. 27: *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056, Cl - chloroplast, Py - pyrenoid, měřítko = 0,5 μm .



Obr. 28: *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, Pl - plastoglobuly, měřítko = 0,2 μm .



Obr. 29: *Pseudotetraëdriella kamillae* SAG 2056, Cl - chloroplast, N - jádro, Nu - jadérko, šipka - kontinuum jaderné a chloroplastové membrány, měřítko = 0,2 μm .

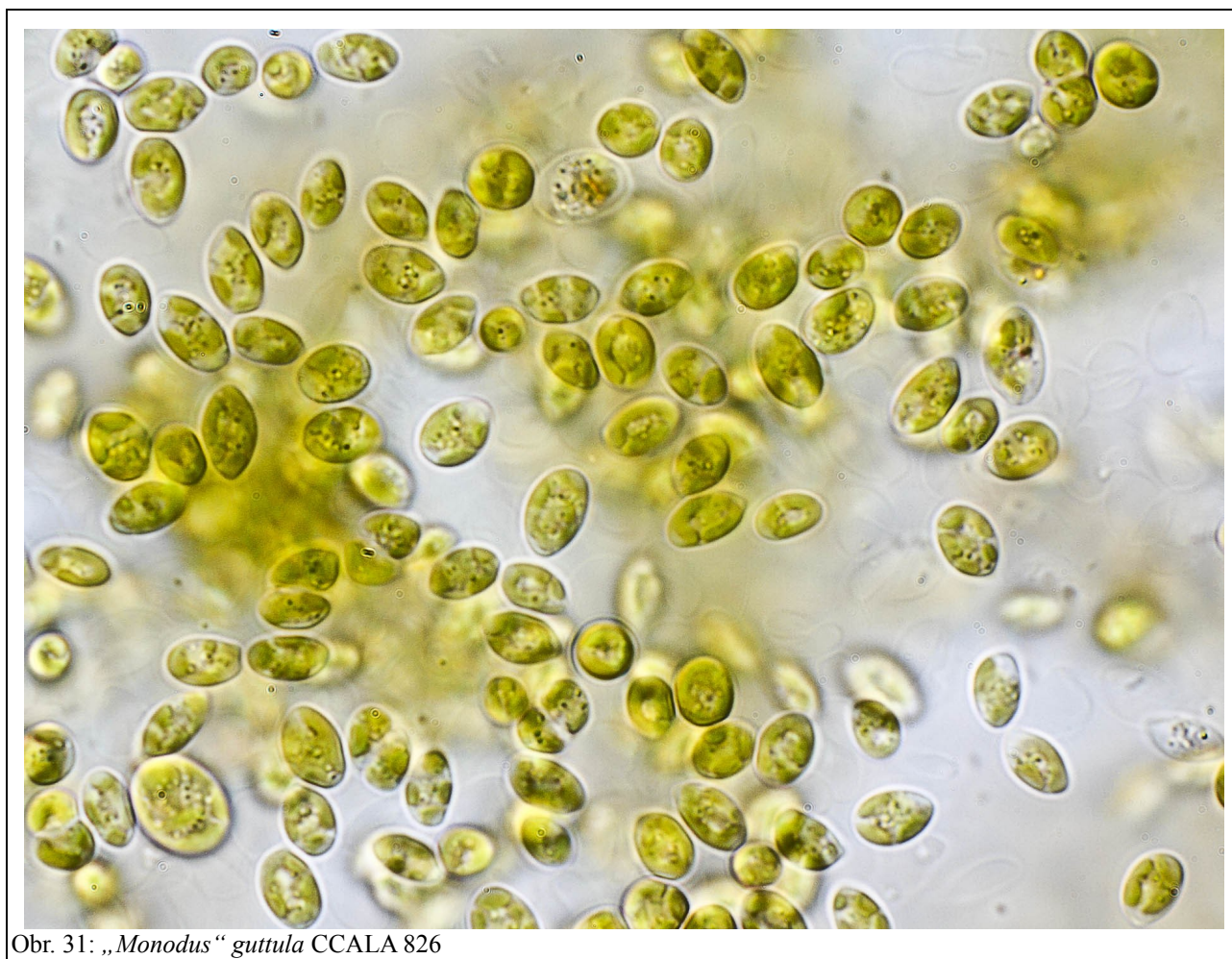


III.2.3. „*Monodus*“ *guttula* CCALA 826

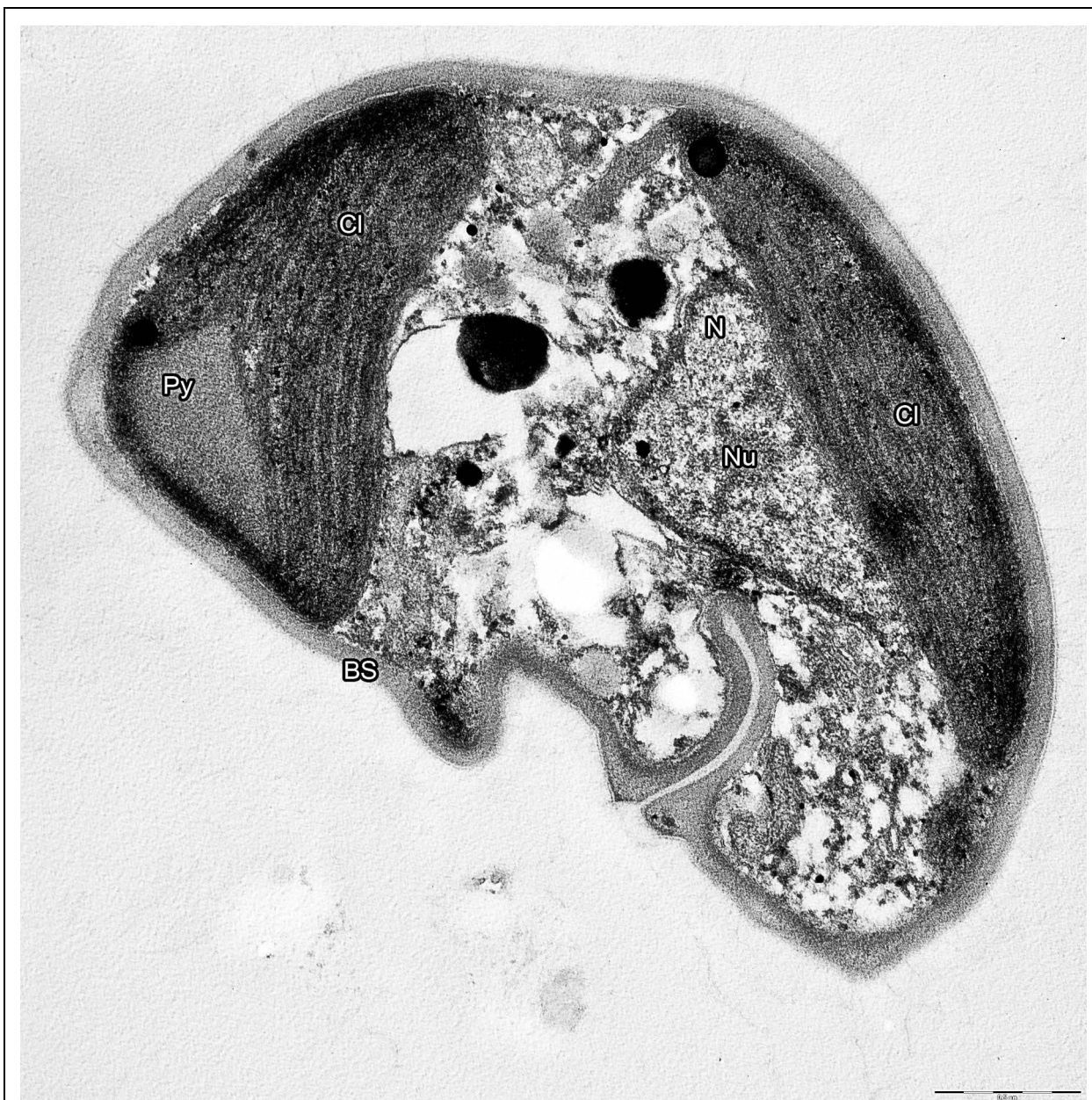
„*Monodus*“ *guttula* CCALA 826 tvoří kulaté až oválné buňky s průměrem 4 až 5 μm . Uvnitř buňky nalezneme jeden až dva chloroplasty. Pyrenoid není ve světelném mikroskopu patrný. „Reddish globule“ je pozorovatelná u starších buněk (Obr. 31). V elektronovém mikroskopu působí celistvá (Obr. 35).

Jádro má nepravidelný tvar. Může být až 1 μm dlouhé a 0,6 μm široké (Obr. 32). V blízkosti jádra se vyskytuje nápadný Golgiho aparát (Obr. 35). Jádro se nachází blízko chloroplastu. Chloroplast nemá věncovou lamelu. Obsahuje terminální pyrenoid uložený mezi tylakoidy. Pyrenoid není tylakoidy nijak přerušován (Obr. 34). Mezi tylakoidy jsou patrné také plastoglobuly (Obr. 33).

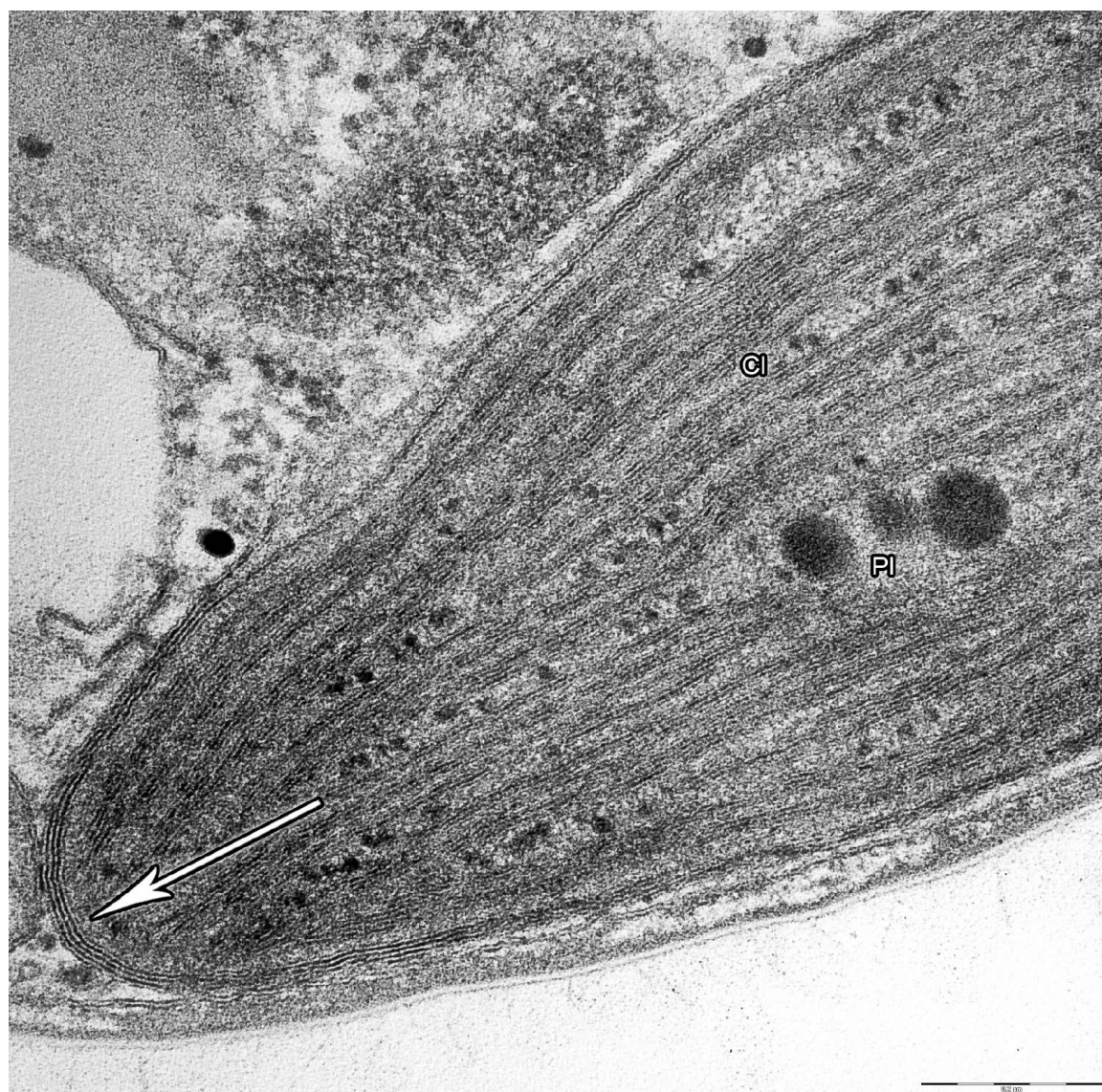
Lamelární váčky umístěné v cytoplasmě dosahují délky až 0,5 μm . Vzdálenost lamel se pohybuje okolo 0,005 μm (Obr. 36). Buněčná stěna je celistvá a až 0,08 μm široká. Na jejím povrchu lze pozorovat mikrofibrily polysacharidů (Obr. 34). Buňky „*Monodus*“ *guttula* CCALA 826 obsahují mitochondrie s tubulárními kristami (Obr. 34).



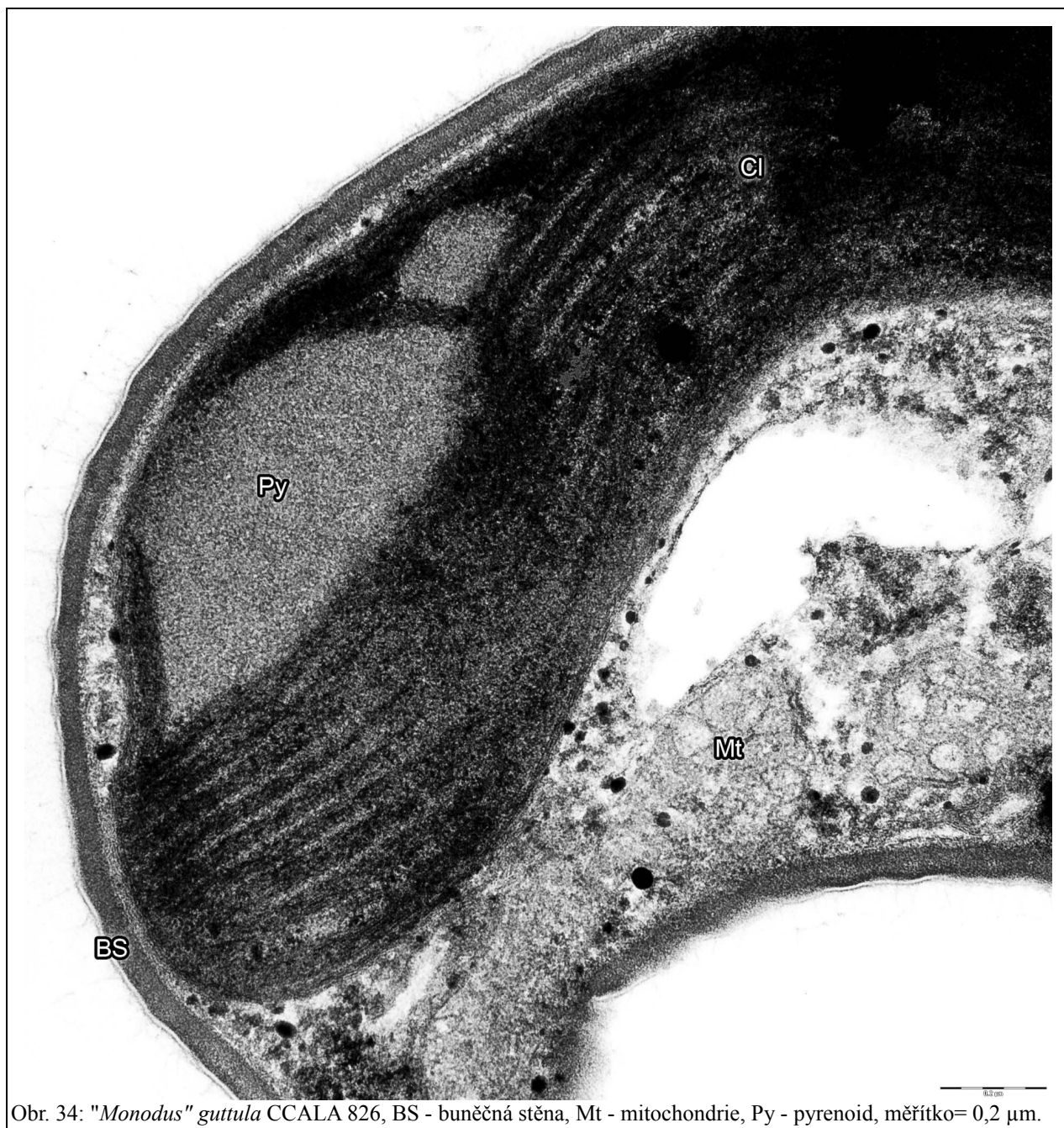
Obr. 31: „*Monodus*“ *guttula* CCALA 826



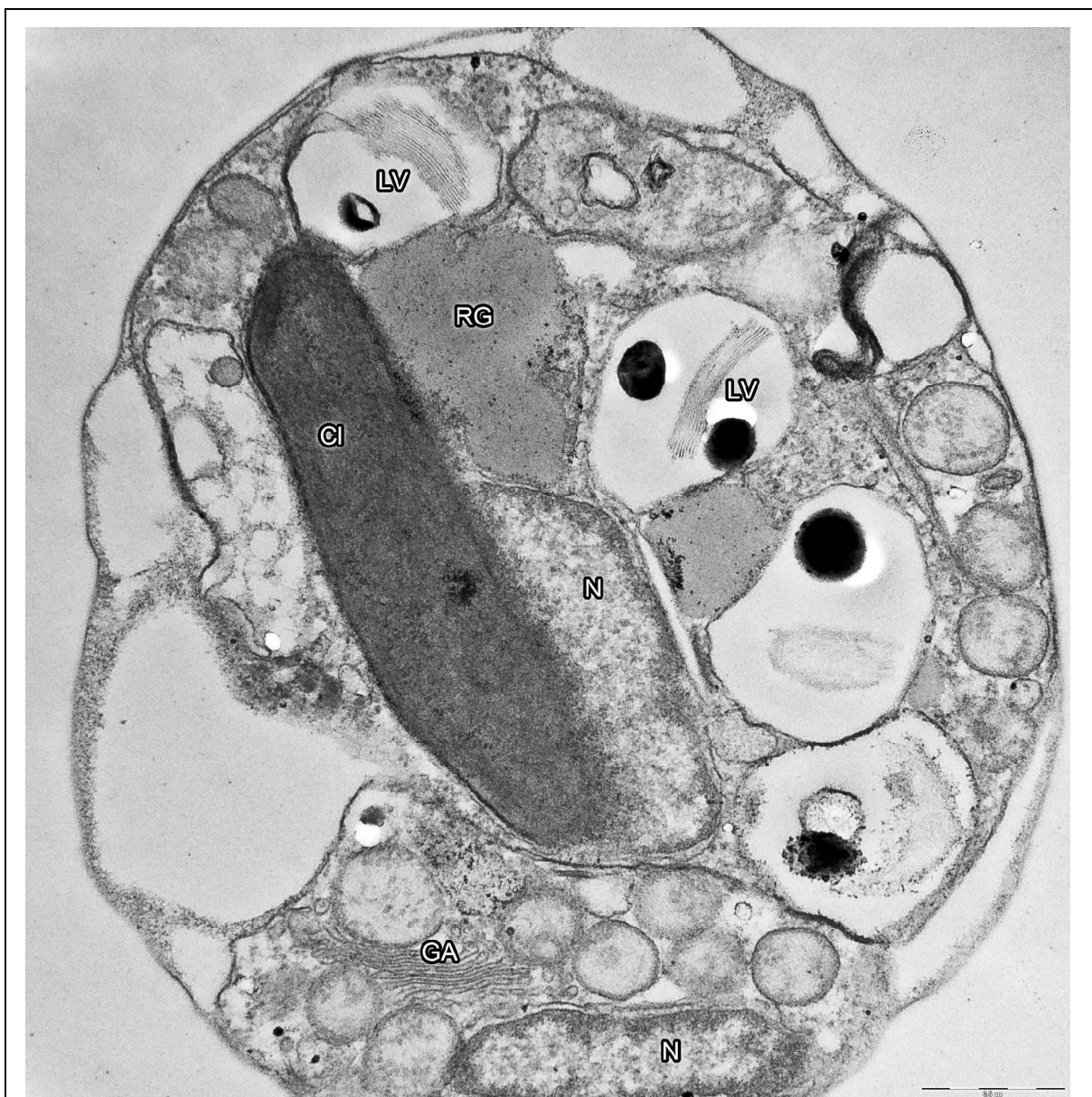
Obr. 32: *Monodus guttula* CCALA 826, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, N - jádro, Nu - jadérko, Py - pyrenoid, měřítko= 0,5 μ m.



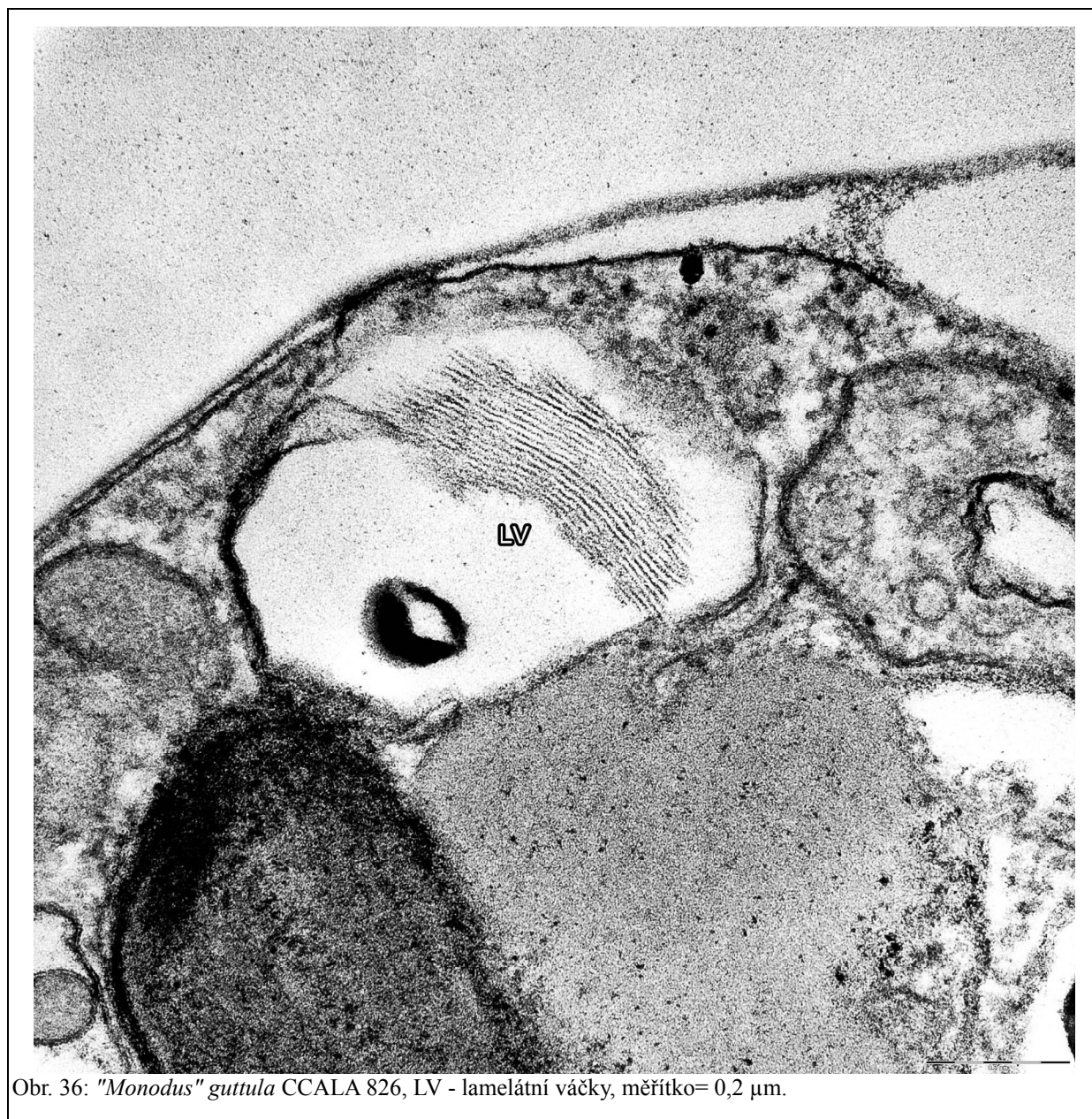
Obr. 33: "*Monodus*" *guttula* CCALA 826, Cl - chloroplast, PI - plastoglobuly, šipka - 4 obalné membrány plastidu, měřítko=0,2 μm .



Obr. 34: "*Monodus*" *guttula* CCALA 826, BS - buněčná stěna, Mt - mitochondrie, Py - pyrenoid, měřítko= 0,2 μ m.



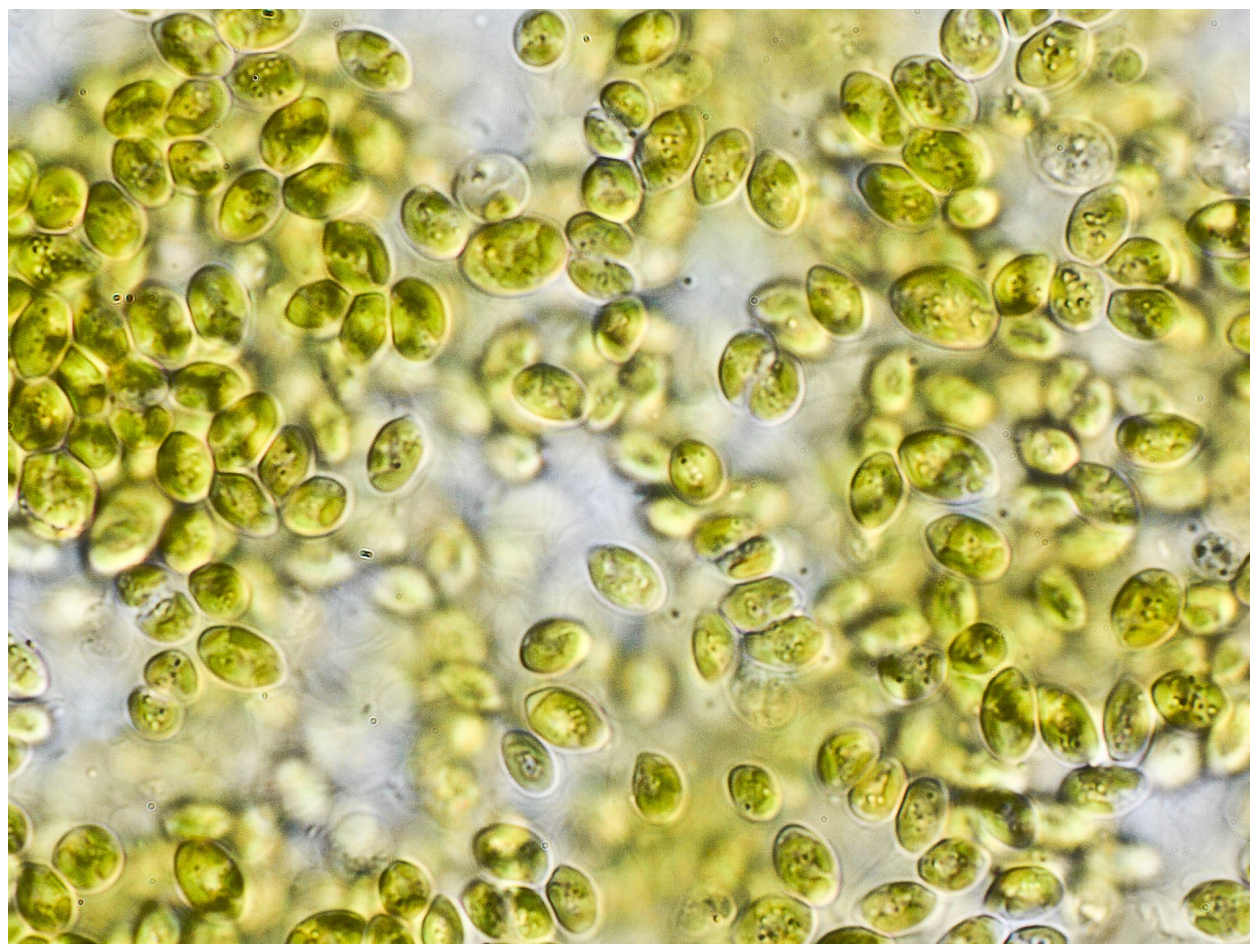
Obr. 35: "*Monodus*" *guttula* CCALA 826, CI - chloroplast, GA - Golgiho aparát, LV - lamelární váčky, N - jádro, RG - „reddish globule“, měřítko= 0,5 μ m.



III.2.4. *Monodopsis unipapilla* SAG 8. 83

Monodopsis unipapilla SAG 8. 83 tvoří většinou oválné buňky 6 μm až 7, 5 μm dlouhé a 2,5 μm až 3, 5 μm široké. V kultuře lze najít i starší a nápadně větší buňky, které měří 10 μm na délku a 5 μm na šířku. Buňky obsahují jeden až dva chloroplasty. Pyrenoid není ve světelném mikroskopu patrný. „Reddish globule“ lze pozorovat jen vzácně u několika málo buněk. Může potom ale dosahovat průměru až 1 μm . Ve světelném mikroskopu se jeví celistvá (Obr. 37). V elektronovém mikroskopu je ovšem vidět, že je složena z několika různě velkých kapének, které jsou všechny obaleny membránou (Obr. 40).

Jádro má nepravidelný tvar. Je až 1,5 μm dlouhé a 1 μm široké. Vnější jaderná a chloroplastová membrána jsou spojené (Obr. 38). Chloroplast je nástěnný bez věncové lamely. Uvnitř chloroplastu je umístěn terminální pyrenoid (Obr. 39). Pyrenoid není přerušován tylakoidy. Buněčná stěna je celistvá a

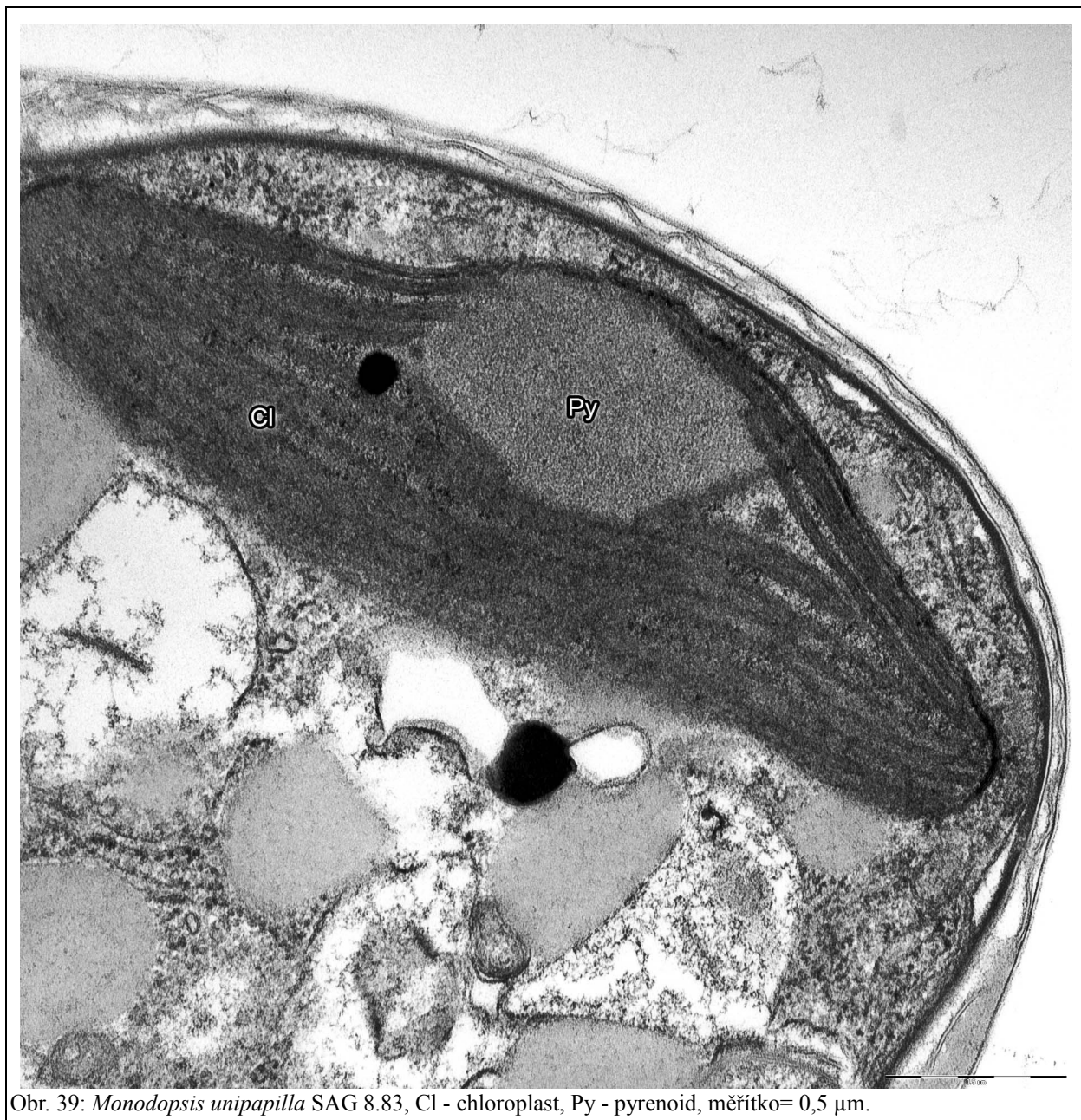


Obr. 37: *Monodopsis unipapilla* SAG 8. 83

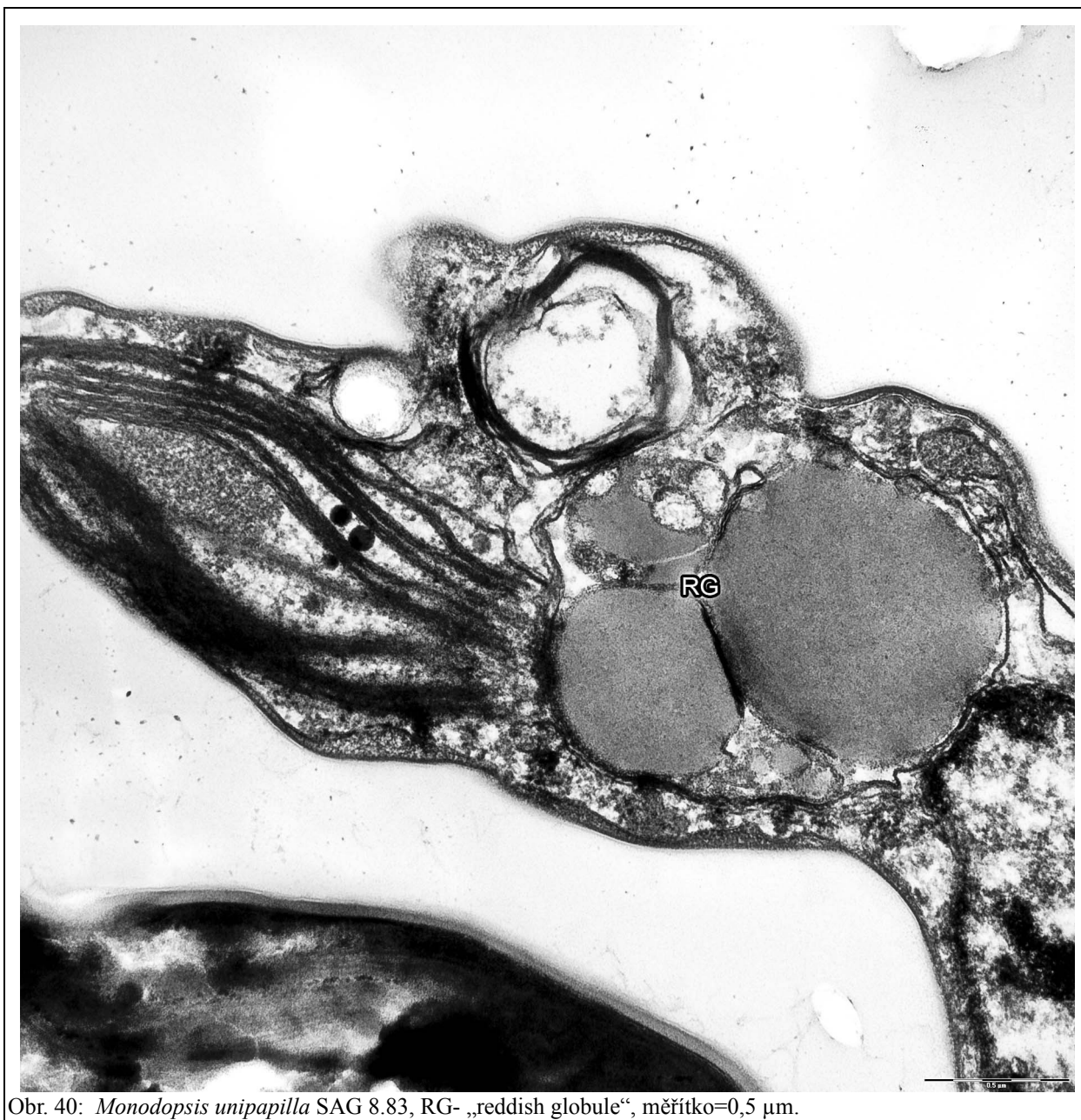
v průměru asi 0,05 μm široká (Obr. 42). Lamelární váčky leží v cytoplasmě a jsou až 0,6 μm dlouhé (Obr. 38). Buňky obsahují mitochondrie s tubulárními kristami (Obr. 38).



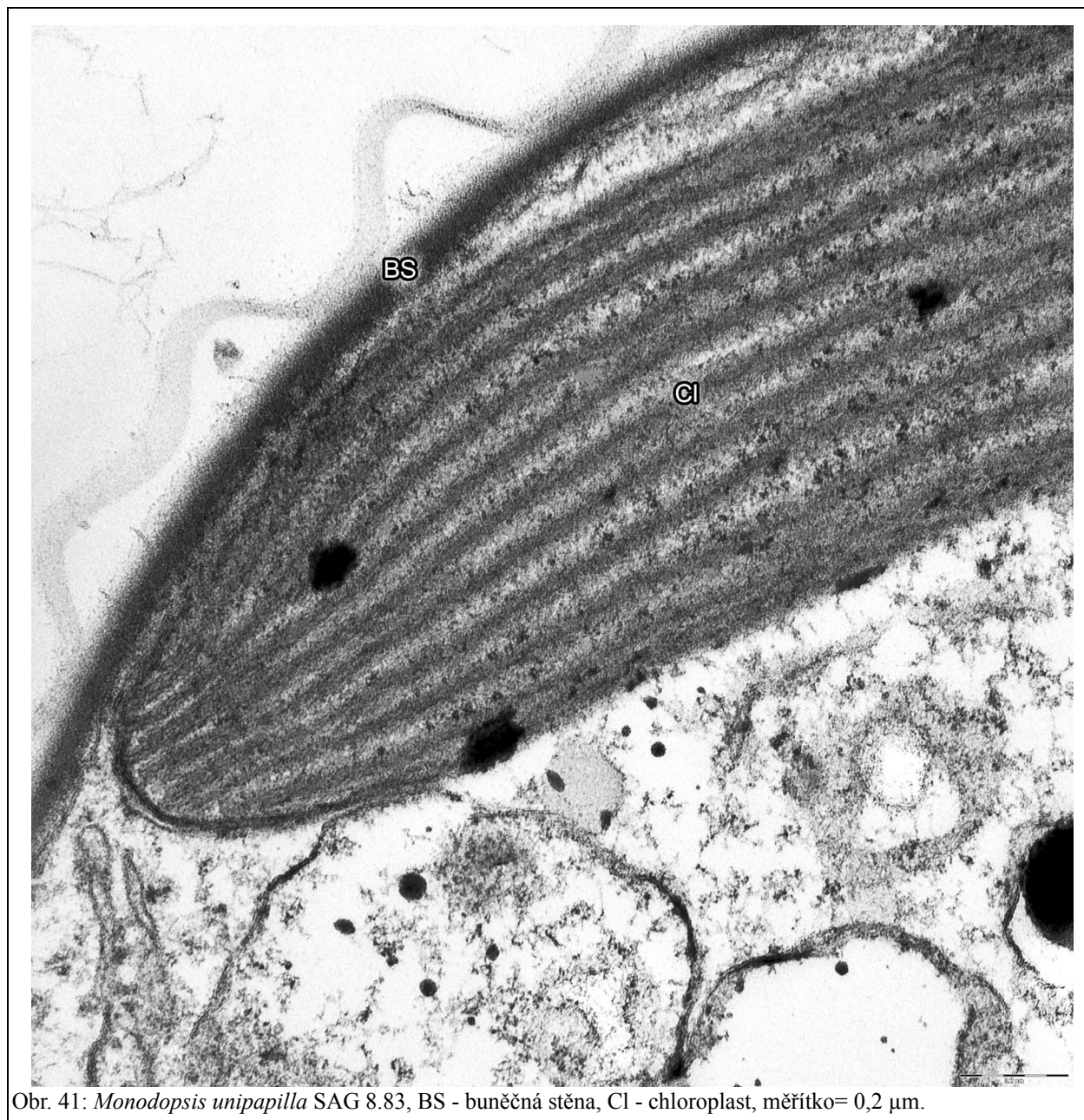
Obr. 38: *Monodopsis unipapilla* SAG 8.83, Cl - chloroplast, LV - lamelární váčky, Mt - mitochondrie, N - jádro, měřítko= 0,5 μ m.



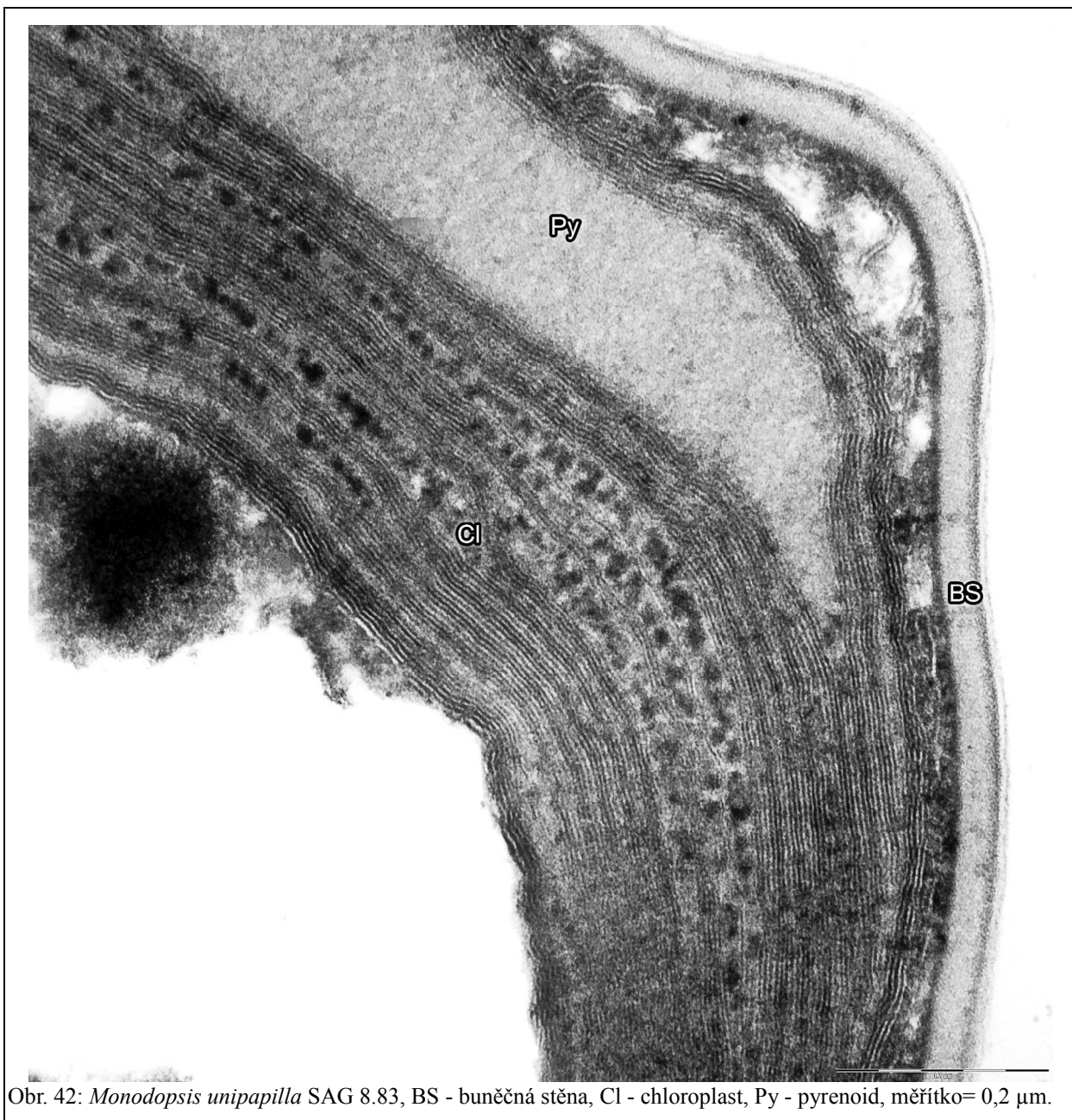
Obr. 39: *Monodopsis unipapilla* SAG 8.83, Cl - chloroplast, Py - pyrenoid, měřítko= 0,5 μ m.



Obr. 40: *Monodopsis unipapilla* SAG 8.83, RG- „reddish globule“, měřítko=0,5 μm.



Obr. 41: *Monodopsis unipapilla* SAG 8.83, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, měřítko= 0,2 μm .



Obr. 42: *Monodopsis unipapilla* SAG 8.83, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, Py - pyrenoid, měřítko= 0,2 μ m.

III.3. EUSTIGMATACEAE

III.3.1. Charakteristika druhů

BogD 9/ 21 T- 2d, E4f a *Eustigmatus magnus* CCMP (NCMA) 387. Tyto kmeny patří do řádu Eustigmatales, čeledi Eustigmataceae.

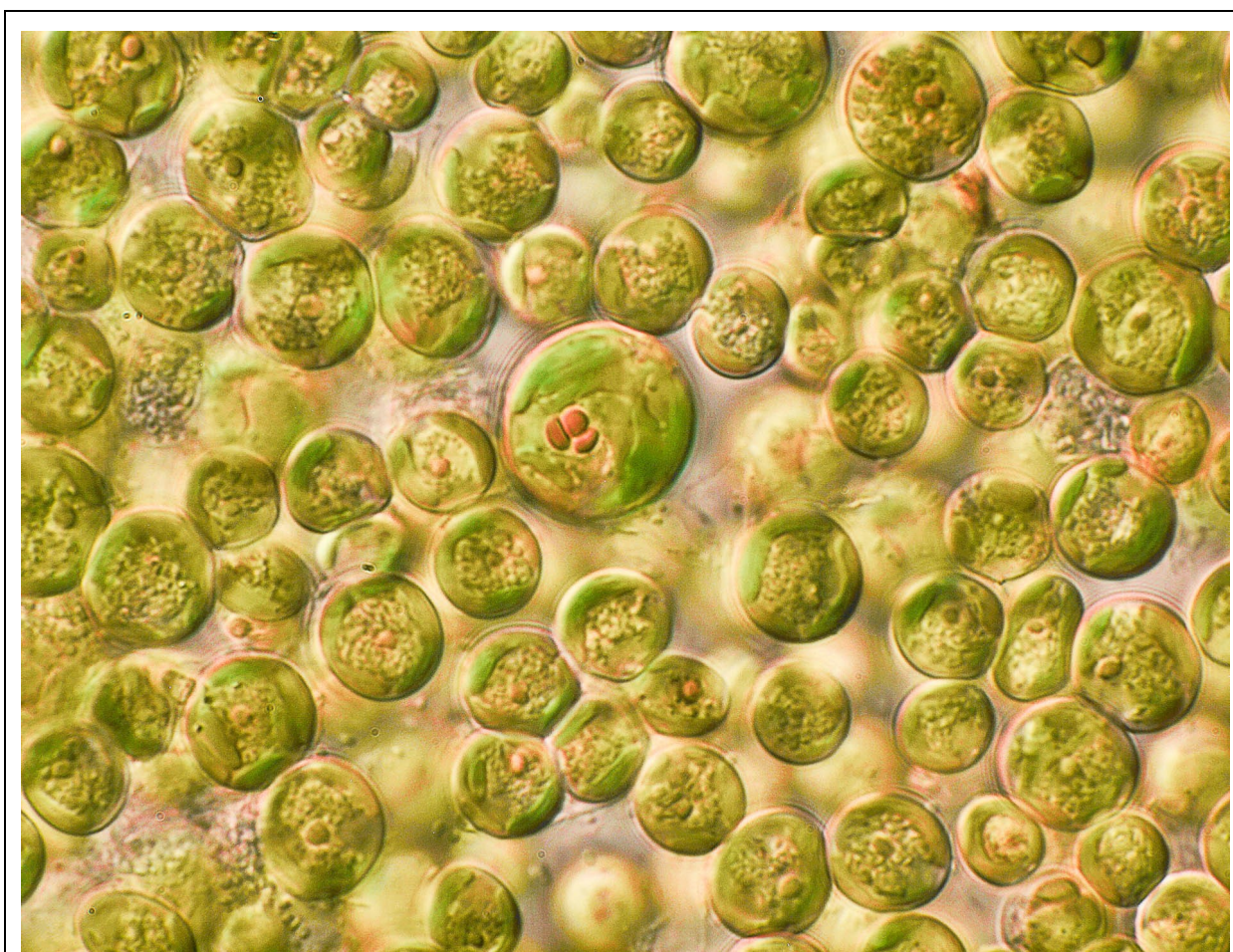
Vyznačují se tvorbou kulovitých, ale občas i oválných buněk. Buňky dosahují v průměru až 10 μm . Obsahují jeden nebo dva parietální chloroplasty. „Reddish globule“ je patrná u většiny dospělých buněk. Většinou působí ve světelném mikroskopu celistvá, ale lze pozorovat i její rozdělení na několik kapének.

Všechny druhy obsahují lamelární váčky o délce 0,4 až 1,2 μm . Jednotlivé lamely jsou uloženy s podélnou osou váčku a vzdáleny od sebe cca 50 až 100 nm. Všechny druhy obsahují také chloroplasty bez věncové lamely. Vyznačují se přítomností nápadného polygonálního pyrenoidu. Ten je uchycen na stopce k chloroplastu a vyčnívá z něj ven. V chloroplastech jsou také nápadné plastoglobuly uložené mezi tylakoidy. Vnější membrána jádra a chloroplastu nejsou spojené. Jádro má víceméně kulovitý tvar a dosahuje v průměru až 2 μm . Buněčná stěna je celistvá a průměrně 0,1 μm široká u E4f a *Eustigmatos magnus*, zatímco u BogD 9/ 21 T- 2d měří v průměru 0,3 μm .

III.3.2. BogD 9/21 T- 2d

BogD 9/ 21 T- 2d tvoří kulovité buňky o průměru až 10 μm . Občas tvoří i oválné buňky, které měří až 10 μm na délku a 8 μm na šířku. Buňky obsahují jeden až dva parietální chloroplasty. Ve většině dospělých buněk je patrná „reddish globule“. Sestává z několika různě velkých kapének (Obr. 43).

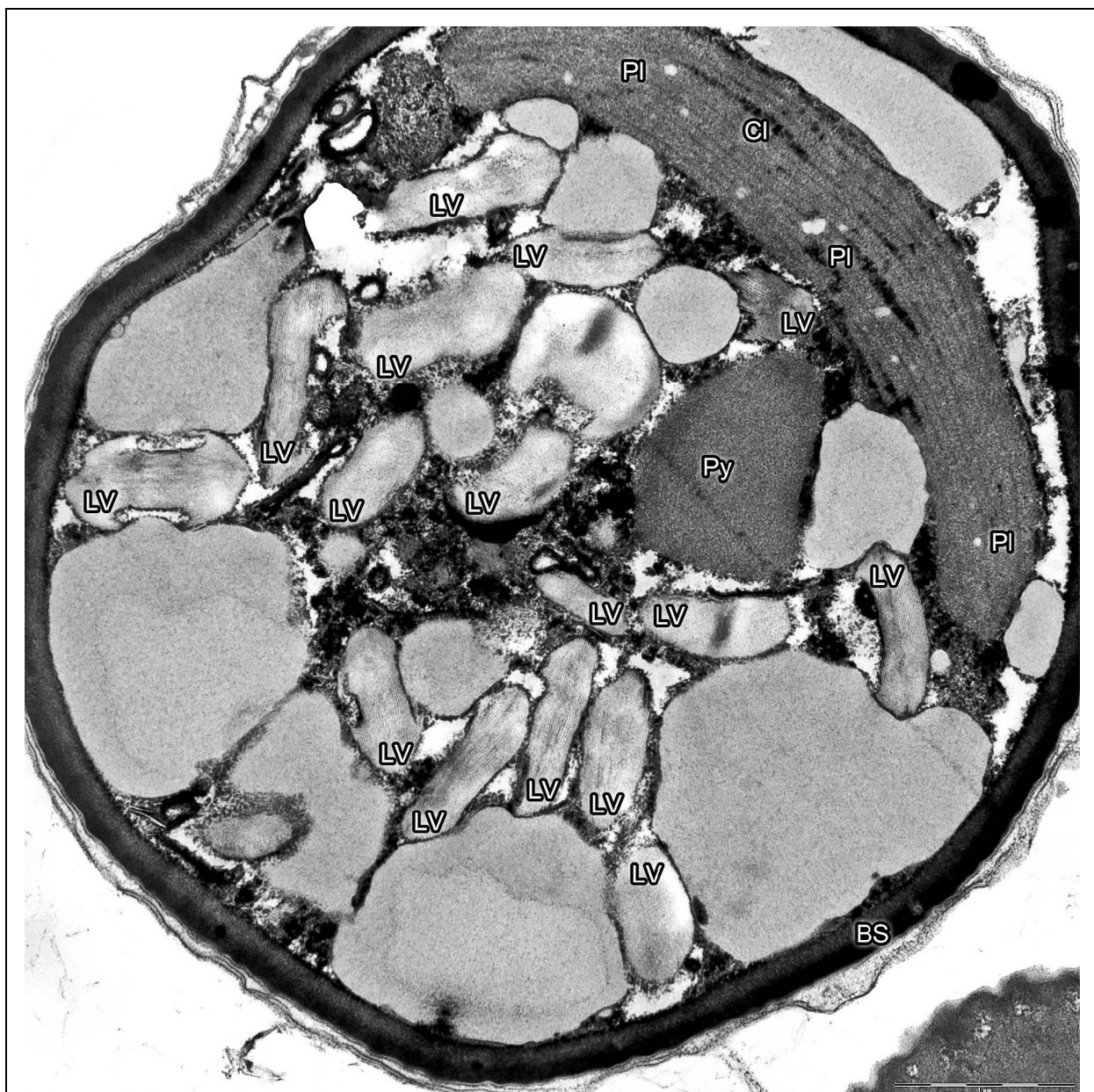
Jádro je víceméně kulovité s patrným jadérkem. Jádro měří v průměru až 1,6 μm a jadérko až 0,5 μm (Obr. 44). Chloroplast nemá věncovou lamelu, ale vyčnívá z něj nápadný polygonální pyrenoid. Ten je uchycen na stopce k chloroplastu a ční ven do cytoplasmy. Dosahuje na délku i 1,2 μm (Obr. 45). Tylakoidy v chloroplastu jsou spojené v lamelách po třech a leží mezi nimi plastoglobuly (Obr. 46). V cytoplasmě a blízkosti pyrenoidu jsou uloženy lamelární váčky, které se liší délkou od 0,4 do 1,2 μm . Jednotlivé lamely jsou od sebe vzdálené 12 nm (Obr. 48). Buněčná stěna je celistvá a průměrně asi 0,3 μm široká (Obr. 44).



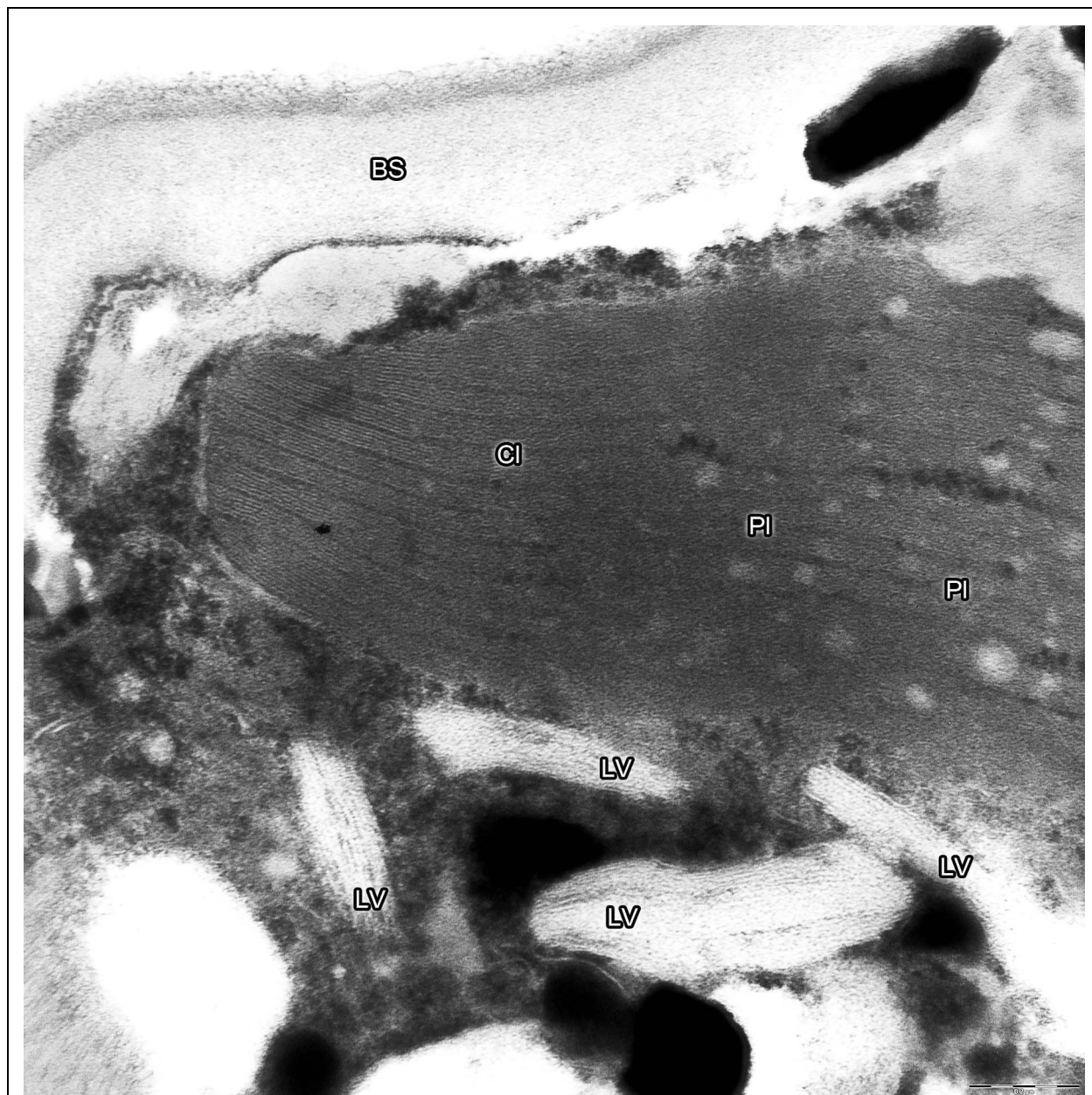
Obr. 43: Bog D 9/ 21 T- 2d



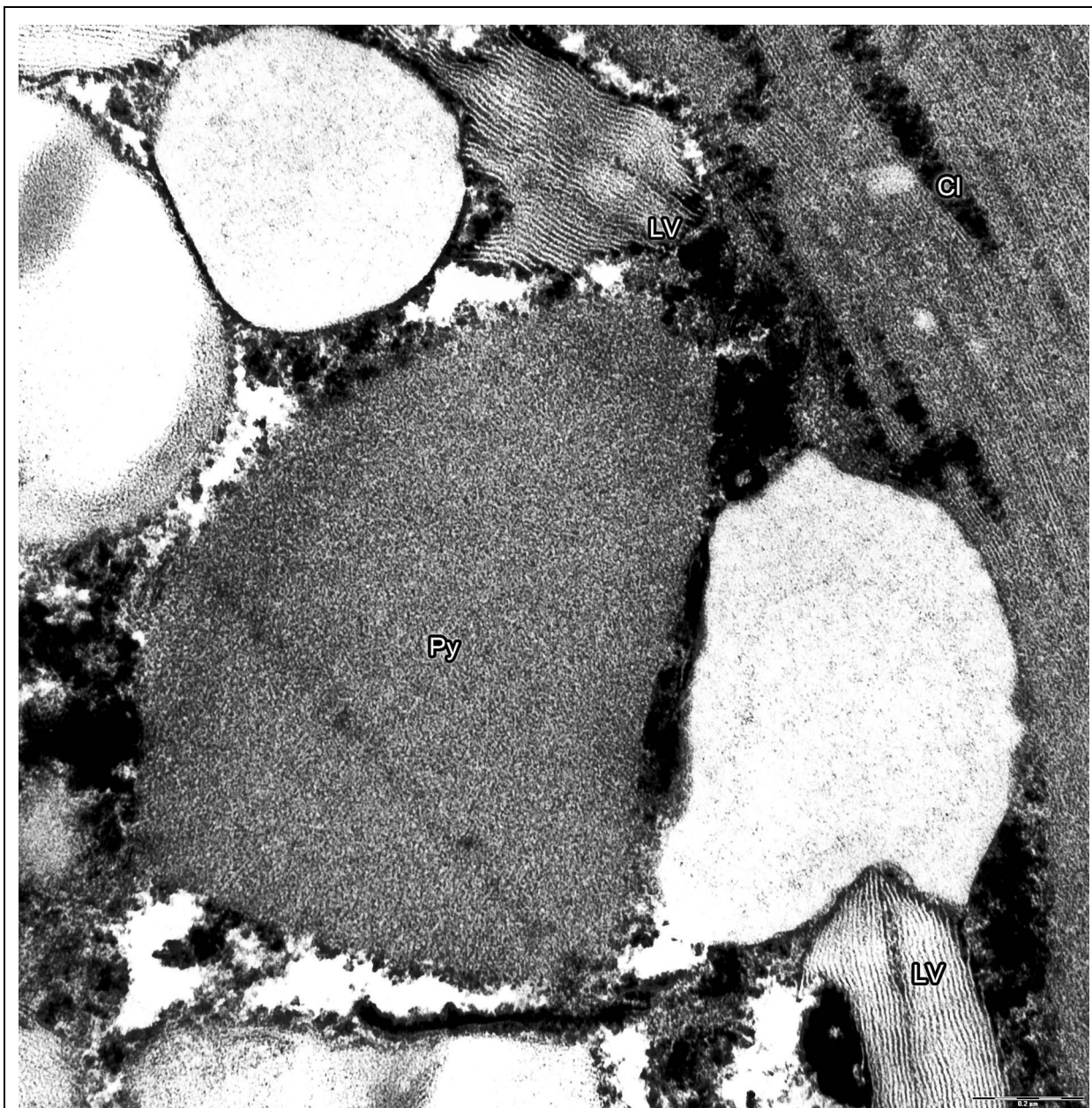
Obr. 44: BogD 9/21 T-2d, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, LV - lamelární vřčky, N - jádro, Nu- jadérko, PI - plastoglobuly, Py - pyrenoid, měřítko= 1 μ m.



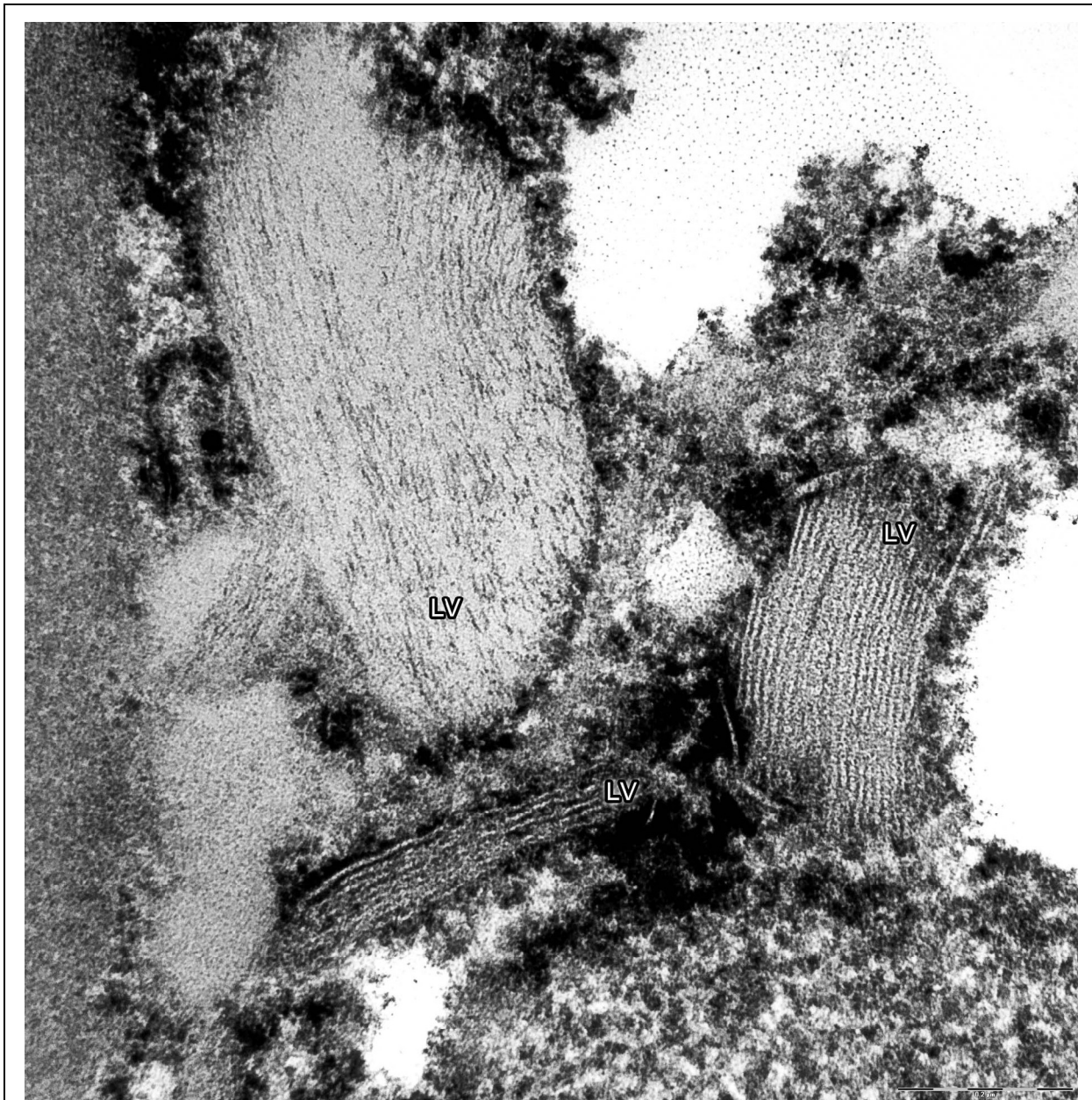
Obr. 45: BogD 9/21 T- 2d, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, LV - lamelární váčky, PI - plastoglobuly, Py - pyrenoid, měřítko= 1 μ m.



Obr. 46: BogD 9/21 T- 2d, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, LV - lamelární váčky, Pl - plastoglobuly, měřítko= 0,2 μm .



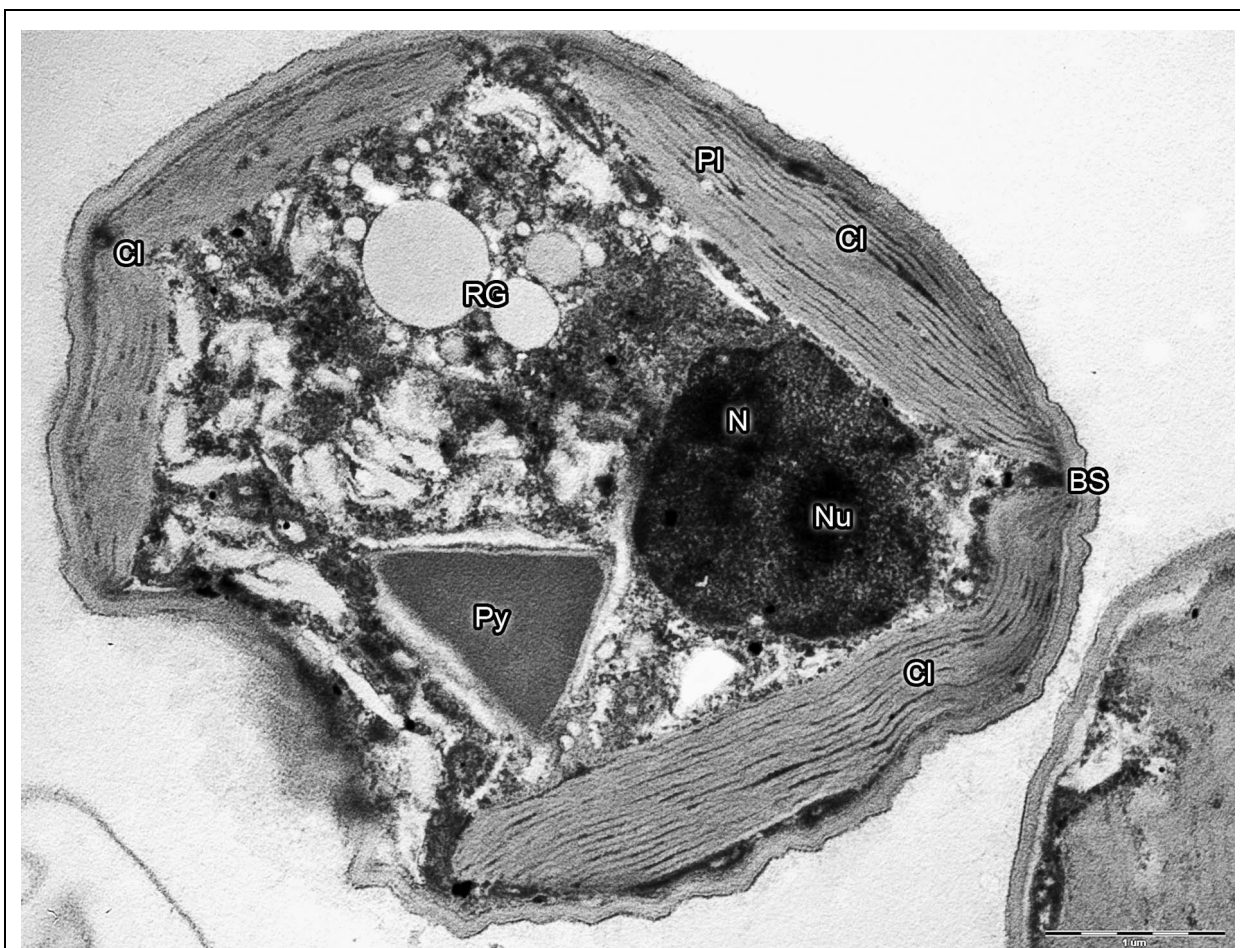
Obr. 47: BogD 9/21 T- 2d, Cl - chloroplast, LV - lamelární váčky, Py - pyrenoid, měřítko= 0,2 μm.



Obr. 48: BogD 9/21 T- 2d, LV - lamelární váčky, měřítko= 0,2 μm .

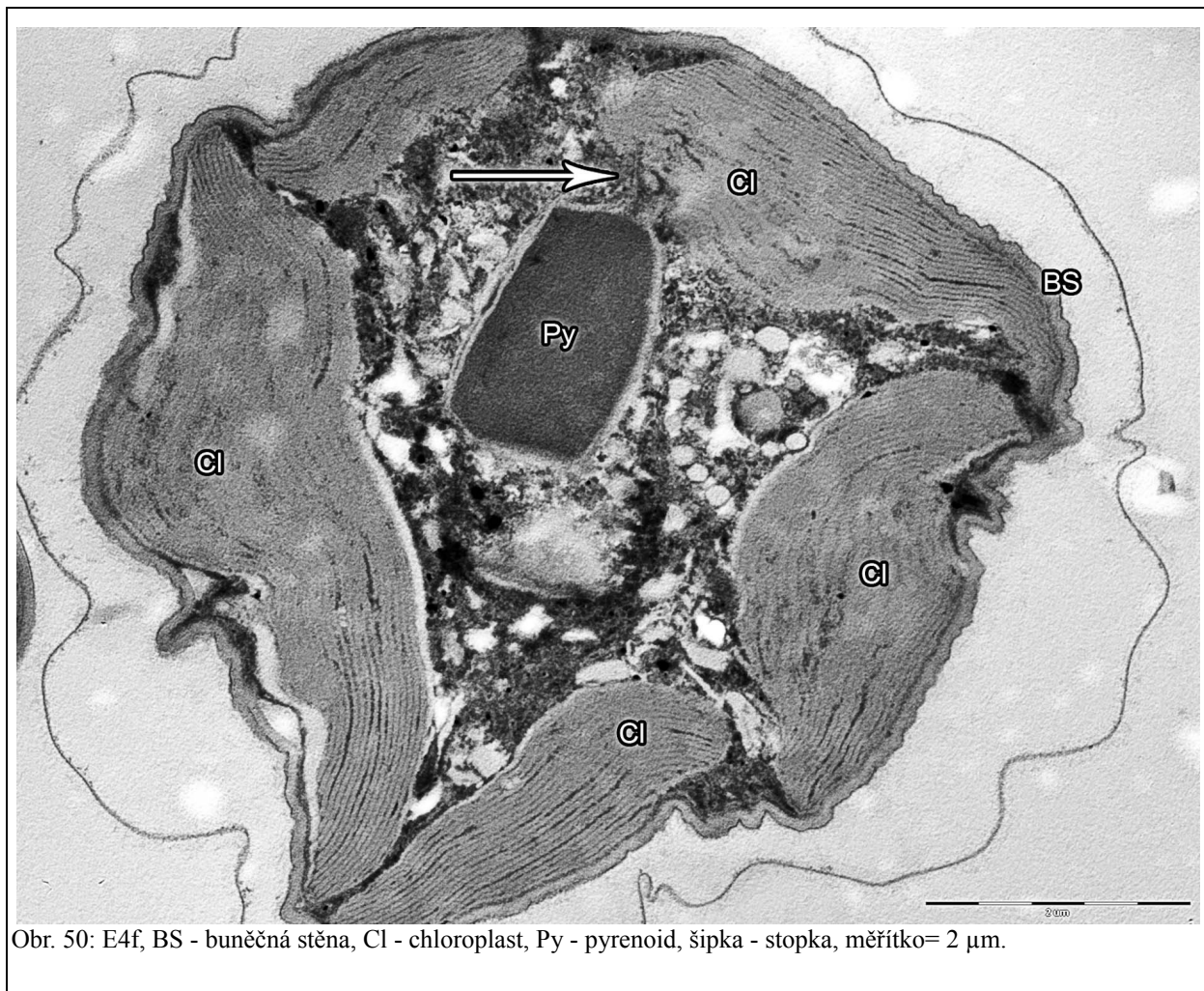
III.3.3. E4f

Kmen E4f má jeden až dva parietální chloroplasty (Obr. 49). Z chloroplastu ční ven velký polygonální pyrenoid, který je ukotven v chloroplastu stopkou (Obr. 50). Pyrenoid měří na délku až 1,8 μm a na šířku 1,2 μm (Obr. 51). Chloroplast nemá věncovou lamelu. Mezi tylakoidy jsou uloženy plastoglobuly (Obr. 53).



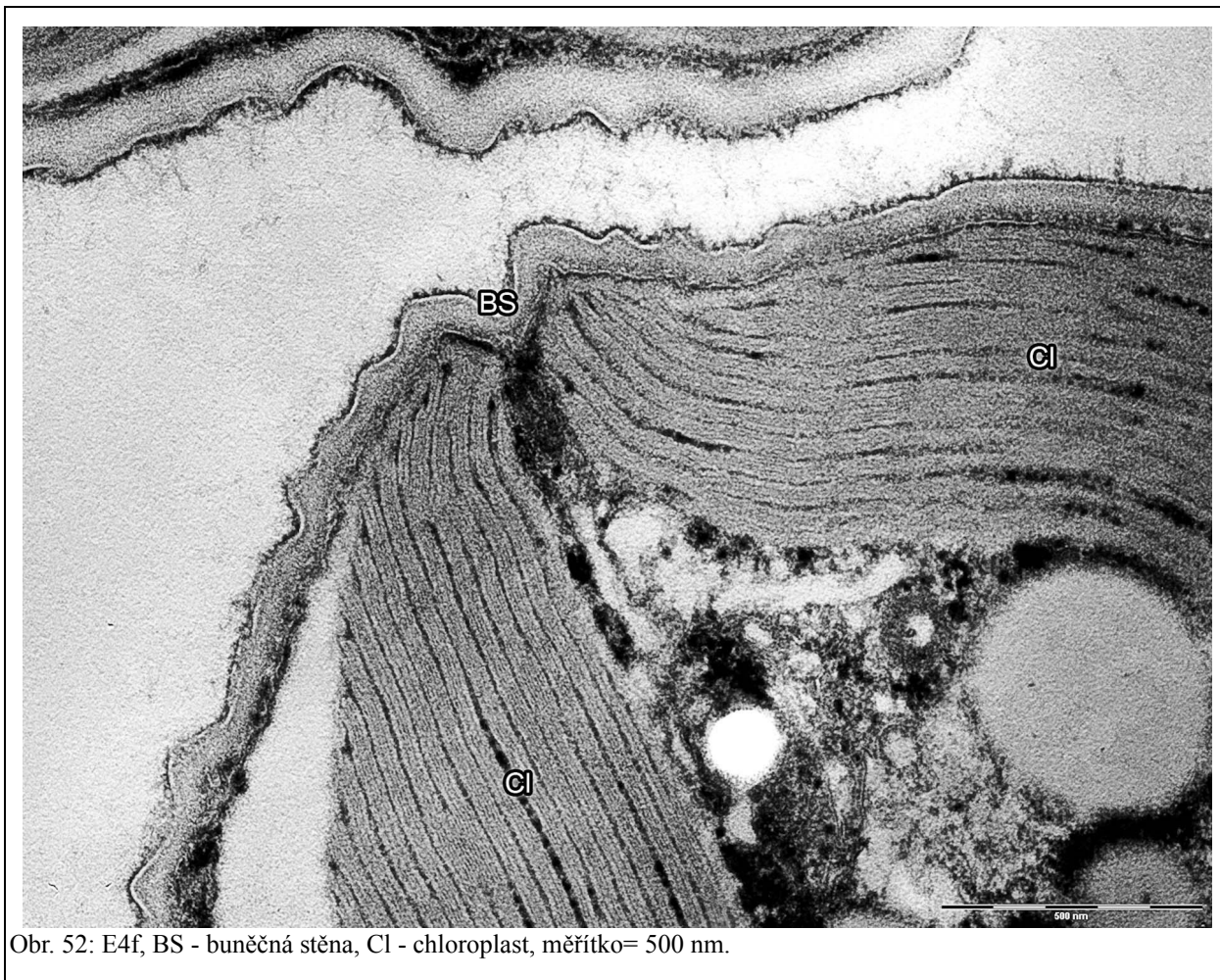
Obr. 49: E4f, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, N - jádro, Nu - jadérko, Pl - plastoglobuly, Py - pyrenoid, RG - „reddish globule“, měřítko= 1 μm

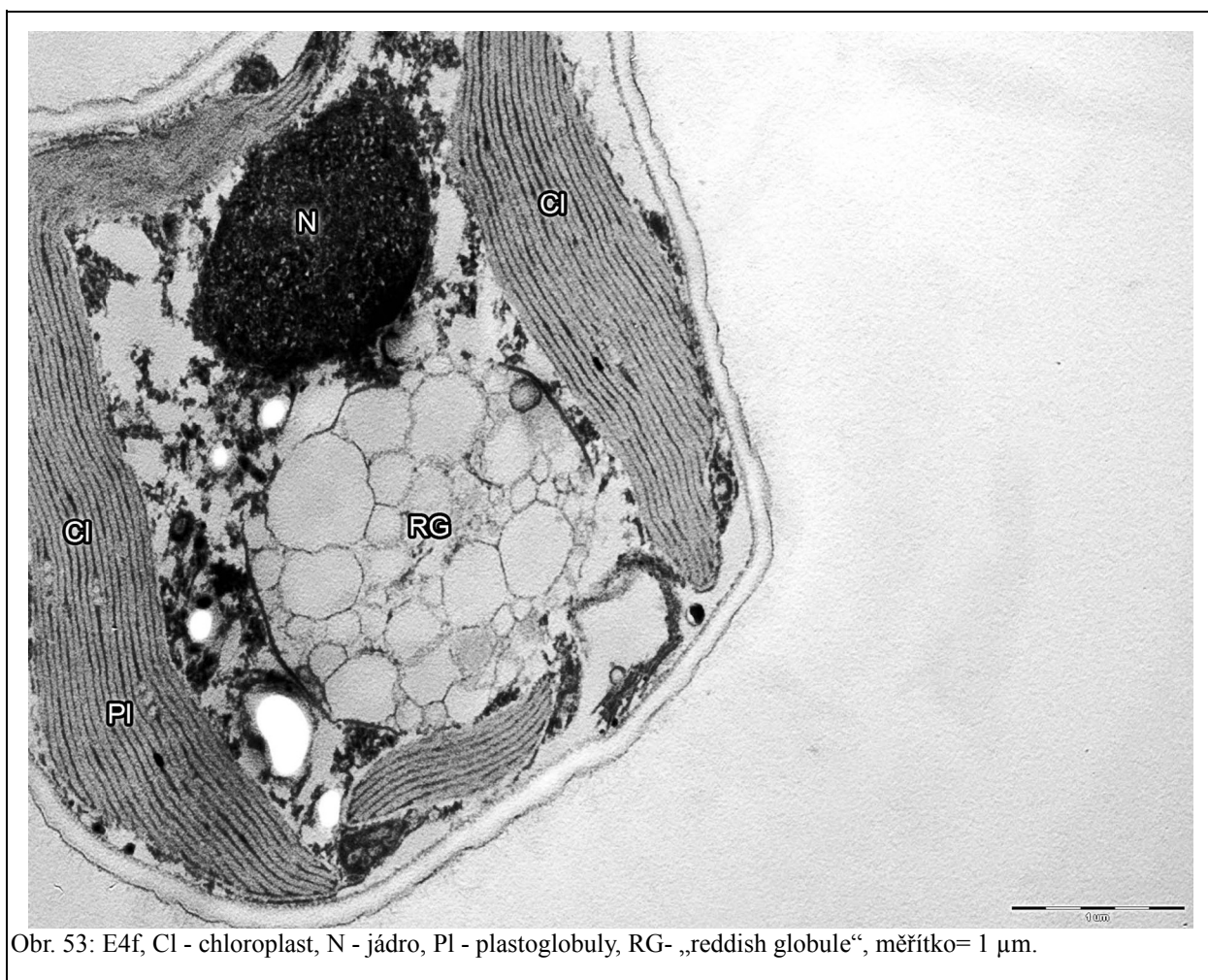
Jádro je víceméně kulovitěho tvaru o průměru až 2 μm s nápadným jadérkem o průměru až 0,5 μm . Jaderná obalná membrána není spojena s obalnou membránou chloroplastu (Obr. 49). Buňky obsahují „reddish globule“, která je tvořena několika různě velkými kapénkami. Celý útvar dosahuje až 2 μm v průměru (Obr. 53). Buněčná stěna je celistvá a asi 0,1 μm široká. Vnější vrstva buněčné stěny obsahuje extracelulární polysacharidy, které vyvolávají „chlupatý“ vzhled (Obr. 49, Obr. 52).





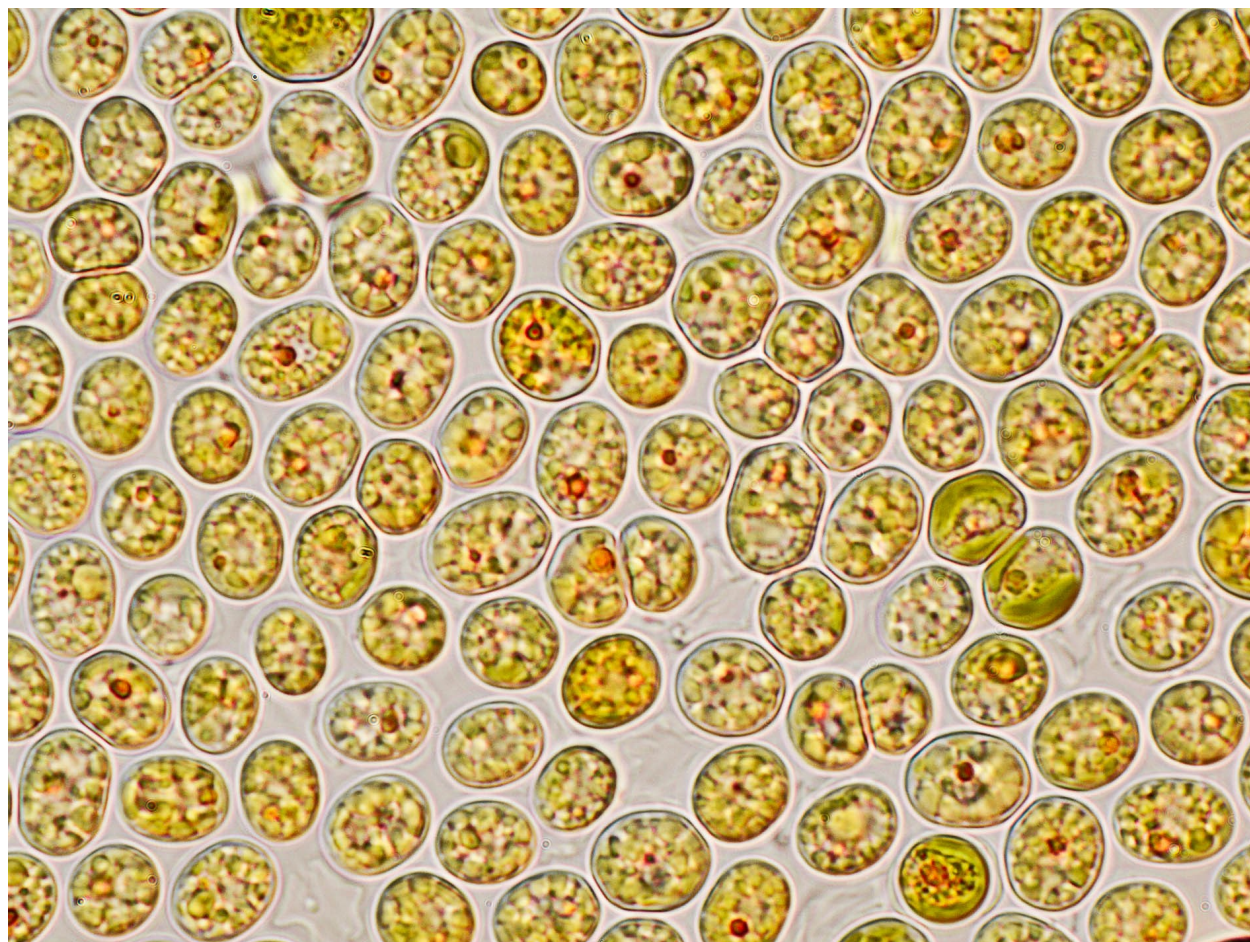
Obr. 51: E4f, Cl - chloroplast, Py - pyrenoid, St - stopka, měřítko= 500 nm.





III.3.4. *Eustigmatus magnus* CCMP (NCMA) 387

Eustigmatus magnus CCMP (NCMA) 387 tvoří kulovité buňky o průměru 7 až 8 μm . Buňky obsahují obvykle jeden parietální chloroplast. Ve většině dospělých buněk je přítomna „reddish globule“ o průměru až 2, 5 μm (Obr. 54).



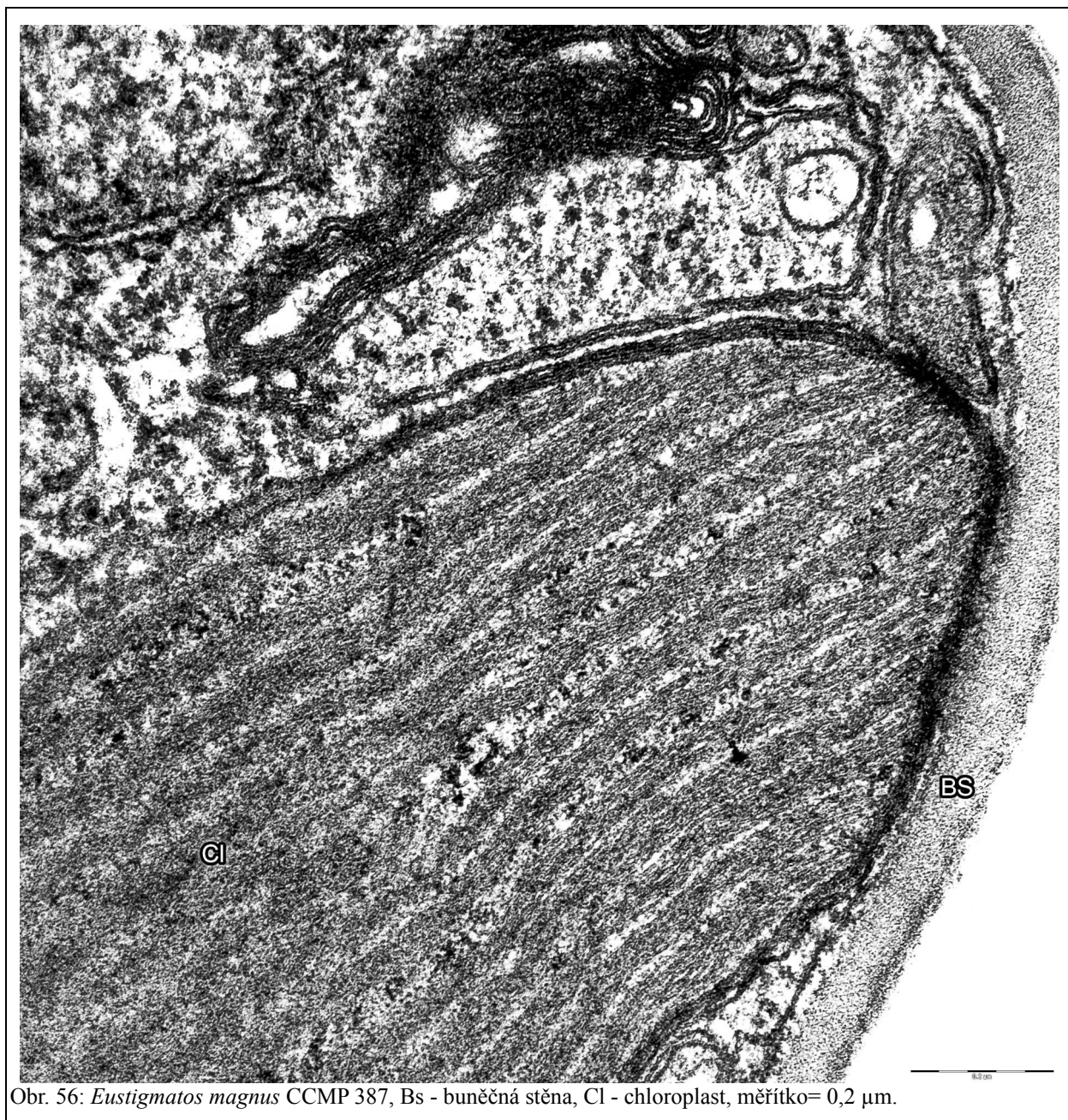
Obr. 54: *Eustigmatus magnus* CCMP (NCMA) 387

Jádro má kulatý až oválný tvar a dosahuje v průměru až 1,4 μm . V jádru je patrné jadérko, které měří v průměru až 0,5 μm . V blízkosti jádra leží Golgiho aparát (Obr. 60). Vnější membrána jádra není spojena s vnější membránou chloroplastu (Obr. 55). Chloroplast nemá věncovou lamelu. Vystupuje z něj nápadný polygonální pyrenoid, který je uchycen k chloroplastu stopkou (Obr. 55). Pyrenoid je až 1,3 μm dlouhý a 1 μm široký (Obr. 57). Pyrenoid v právě rozdělených buňkách má zaoblenější tvar a je spojen s chloroplastem širokou bází oproti plně vyvinutému pyrenoidu, který je polygonální a spojen pouze stopkou (Obr. 61).

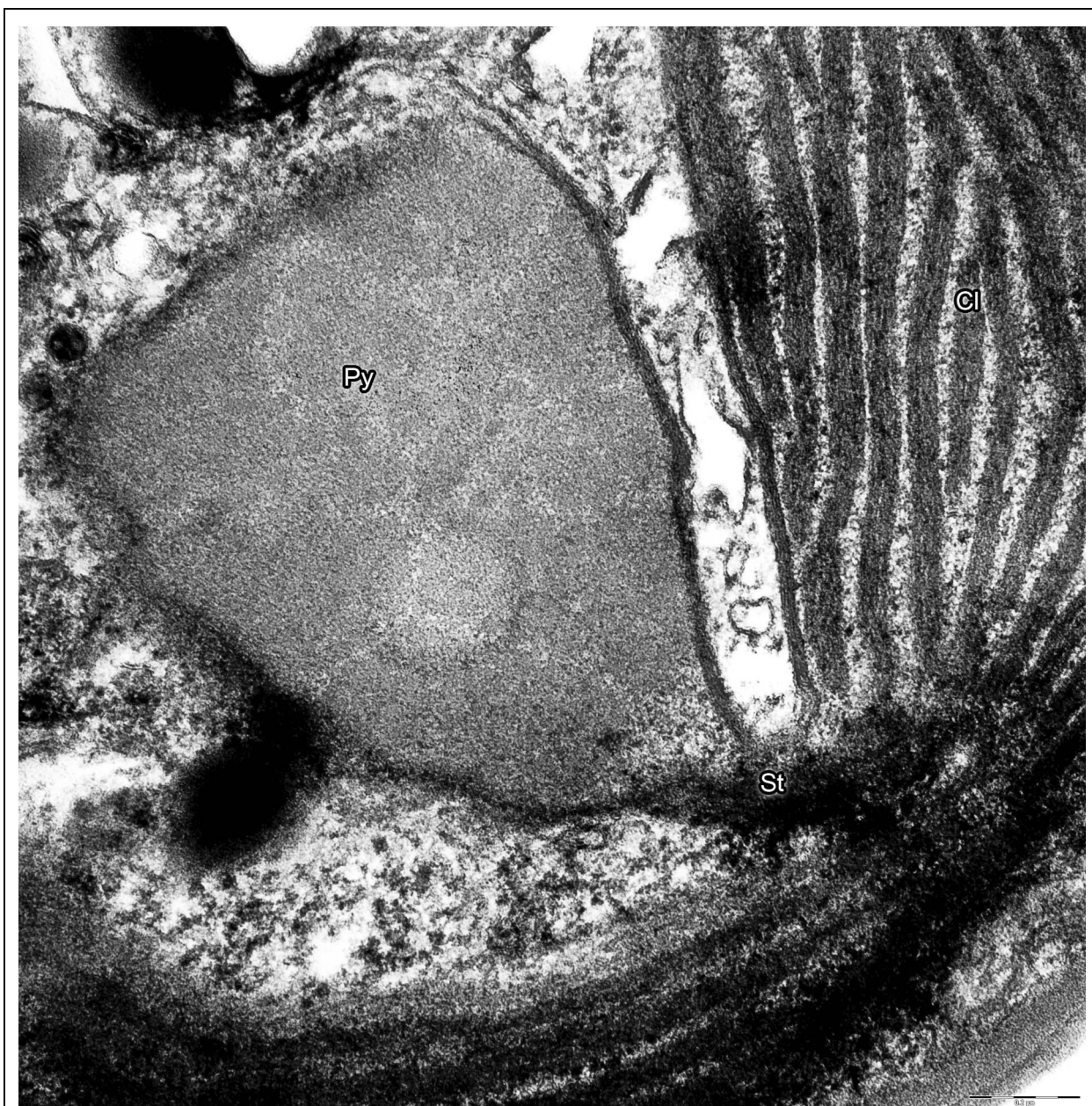
Buňky obsahují lamelární váčky, které dosahují 0,4 až 0,7 μm . Jednotlivé lamely jsou od sebe vzdálené 5 nm (Obr. 58). „Reddish globule“ je přítomna v cytoplasmě a je tvořena několika různě velkými víceméně kulatými kapénkami. Ty měří v průměru 0,3 až 0,7 μm (Obr. 59). Buňky obsahují mitochondrie s tubulárními kristami (Obr. 61). Buněčná stěna je celistvá a asi 0,1 μm široká (Obr. 56).



Obr. 55: *Eustigmatos magnus* CCMP 387, BS - buněčná stěna, Cl - chloroplast, N - jádro, Nu - jadérko, Py - pyrenoid, měřítko=1 μ m.



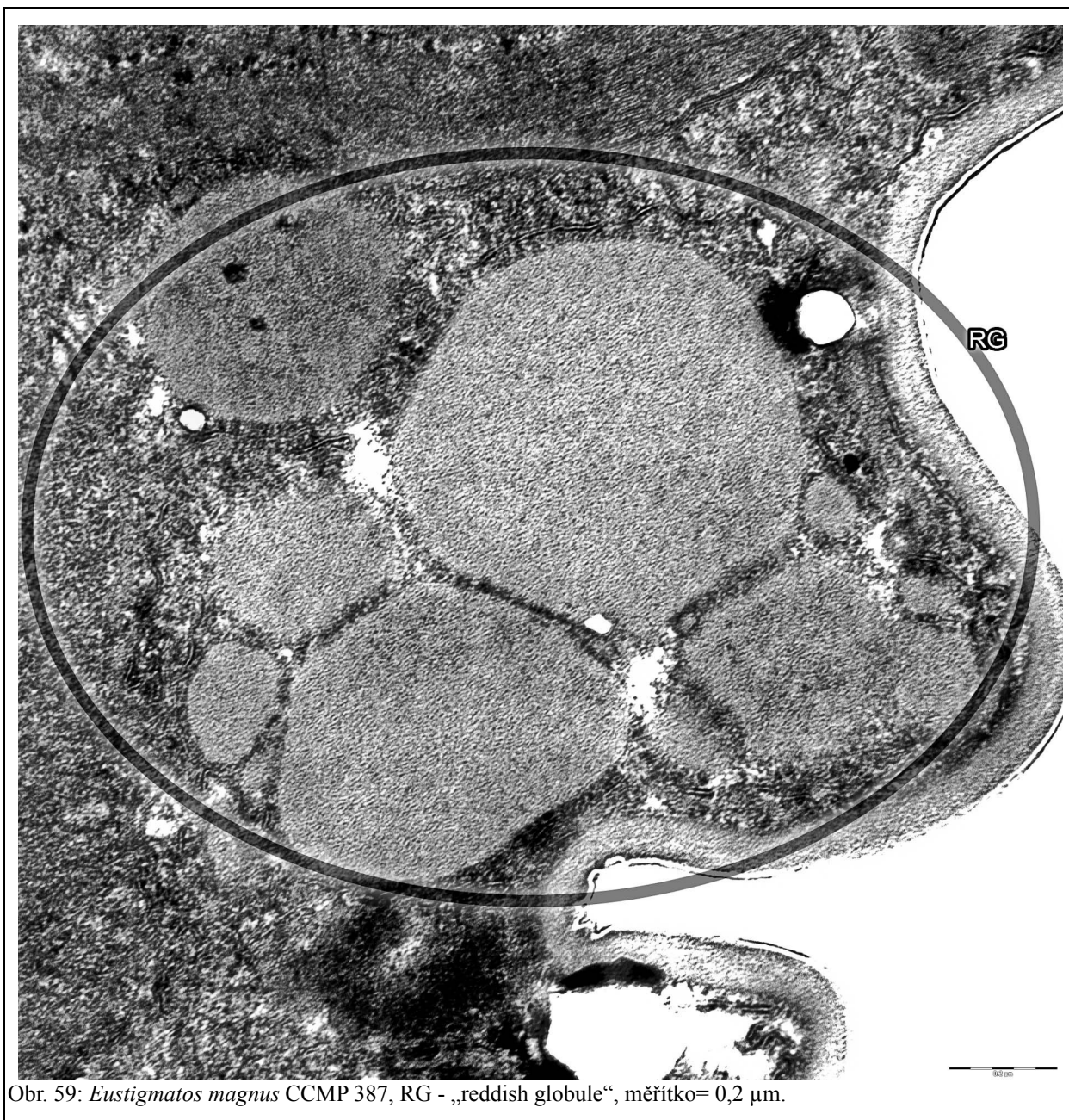
Obr. 56: *Eustigmatos magnus* CCMP 387, Bs - buněčná stěna, Cl - chloroplast, měřítko= 0,2 μm .



Obr. 57: *Eustigmatos magnus* CCMP 387, Cl - chloroplast, Py - pyrenoid, St - stopka, měřítko= 0,2 μm .



Obr. 58: *Eustigmatos magnus* CCMP 387, LV - lamelární váčky, měřítko= 0,2 μm .



Obr. 59: *Eustigmatos magnus* CCMP 387, RG - „reddish globule“, měřítko= 0,2 μm.















































Obr. 60: *Eustigmatos magnus* CCMP 387, Cl - chloroplast, GA - Golgiho aparát, N - jádro, Nu - jádérko, měřítko= 0,5 μm .



Obr. 61: *Eustigmatos magnus* CCMP 387, Cl - chloroplast, Py - pyrenoid, měřítko= 2 μ m.

III.4. SOUHRN ULTRASTRUKTURNÍCH ZNAKŮ

KMEN	ZNAKY					
	chloroplast bez věncové lamely 	„reddish globule“ 	lamelární váčky 	terminální pyrenoid 	polygonální pyrenoid na stopce 	kontinuum jaderné a plastidové obálky 
<i>„Pseudocharaciopsis“ ovalis</i> CAUP Q301				X	X	X
<i>„Pseudocharaciopsis“ ovalis</i> CAUP Q302				X	X	X
<i>Pseudellipsoidion edaphicum</i> CAUP Q401				X	X	X
Mary 8/18 T-3d				X	X	X
<i>Pseudotetraëdriella kamillae</i> SAG 2056					X	
<i>„Monodus“ guttula</i> CCALA 826					X	nepotvrzeno
<i>Monodopsis unipapilla</i> SAG 8.83					X	
E4f				X		X
BogD 9/21 T-2d				X		X
<i>Eustigmatos magnus</i> CCMP 387				X		X

Souhrnná tabulka ultrastrukturních znaků všech studovaných eustigmatofytních kmenů řas.

IV. DISKUZE

V 70. letech minulého století vyčlenili Hibberd a Leedale třídu Eustigmatophyceae na základě unikátních ultrastrukturních znaků a pigmentového složení (Hibberd & Leedale, 1971). Svoje studie, jak dnes víme, prováděli však pouze na zástupcích čeledi Eustigmataceae a tak některé znaky specifické pro tuto skupinu přisuzovali všem Eustigmatofytním řasám.

Mezi tyto znaky patřila přítomnost nápadného polygonálního pyrenoidu, který ční ven z chloroplastu a je k němu přichycen stopkou. Chloroplast nemá věncovou lamelu. V cytoplasmě se nachází lamelární váčky a u zoospor i váčky spirální (Hibberd, 1969, Santos, 1990). Zástupci Eustigmatofyt buď tvoří zoospory (*Nannochloropsis*, *Monodopsis*) anebo je tvoří (*Eustigmatos*, *Vischeria*, *Pseudocharaciopsis* a další) (Hibberd & Leedale, 1972).

Pokud zoospory tvoří, tak mají jen jeden bičík kromě rodů *Pseudocharaciopsis* a *Botryochloropsis*, jejichž zoospory mají bičíky dva (Lee & Bold, 1973, Preisig & Wilhelm, 1989). Předpokládalo se, že v zoosporách zcela chybí Golgiho aparát a ve vegetativních buňkách je zcela zanedbatelný (Hibberd, 1980a). Nápadné bylo velké extraplastidiální stigma u zoospor. Ve vegetativních buňkách nebylo nalezeno spojení svrchních obalných membrán chloroplastu a jádra (Hibberd & Leedale, 1970, 1971). Naopak u všech tehdy popsáných rodů byla popsána nápadná červeno-oranžová struktura pojmenovaná „reddish globule“ nebo „red body“.

IV.1. MONODOPSIDACEAE

Postupem času docházelo ke zveřejnění nových poznatků o původních druzích a zároveň byly další druhy do třídy přerazovány. Santos & Leedale (1995) našli terminální pyrenoid v chloroplastech *Monodopsis unipapilla* a *Monodopsis subterranea*. Pyrenoid nebyl protkán tylakoidy. Popsali kontinuum jaderné a chloroplastové membrány, které bylo nalezeno i u rodu *Nannochloropsis* (Antia et al., 1975, Murakami et al., 2009). U rodu *Nannochloropsis* není ale důvěryhodně popsán žádný druh pyrenoidu, přestože ho údajně pozoroval Antia et al. (1975). Od této studie ale pyrenoid již nikdo jiný nepozoroval (Santos, 1996).

Ve své práci jsem analyzovala tři druhy, které podle molekulárních dat 18S rDNA a *rbcL* (Eliáš et al., unpublished) patří do čeledi Monodopsidaceae společně s rody *Monodopsis* a *Nannochloropsis*. Zjistila jsem, že druhy *Pseudotetraëdriella kamillae*, „*Monodus*“ *guttula* a *Monodopsis unipapilla* obsahují terminální pyrenoid, který je uložen v chloroplastu mezi tylakoidy. Není jimi nijak přerušován. Mezi tylakoidy můžeme nalézt také četné plastoglobuly. Chloroplast nemá věncovou lamelu. Jádro těchto zástupců má nepravidelný tvar a je uloženo v blízkosti chloroplastu.

U *Pseudotetraëdriella kamillae* jsem prokázala spojení jaderné a chloroplastové membrány. Toto spojení nebylo dosud objeveno ani v původní studii od Hegewald et al. (2007). Stejně tak jako nebyl

dosud popsán terminální pyrenoid u *Pseudotetraëdriella kamillae*. Absence pyrenoidu byl dokonce jeden ze znaků, které Hegewald et al. (2007) použili k odlišení *Pseudotetraëdriella kamillae* od jiných velice tvarově podobných druhů řas *Tetraëdron minimum* f. *tetralobulatum* a *Tetraëdron minimum* (Chlorophyceae). Tyto řasy se často vyskytují společně s *Pseudotetraëdriella kamillae* a bývají při určování ve světlém mikroskopu zaměňovány (Hegewald et al., 2007).

Buněčná stěna se jeví u všech zástupců čeledi Monodopsidaceae celistvá a asi 0,05 až 0,08 μm široká u „*Monodus*“ *guttula* a *Monodopsis unipapilla*. *Pseudotetraëdriella kamillae* má buněčnou stěnu tlustší. Tento druh je znám tím, že dokáže tvořit tlustostěnná stádia (Hegewald et al., 2007) a je možné, že proto má při kultivaci na pevném agarovém médiu buněčnou stěnu tlustší než ostatní zástupci této čeledě.

Ve studiích ze 70. a 80. let se ukázalo, že Eustigmatofyta mají ve vegetativních buňkách v blízkosti jádra uložený Golgiho aparát, ale předpokládalo se, že je malý a nenápadný (Santos, 1990). V buňkách „*Monodus*“ *guttula* a *Eustigmatos magnus* jsem však našla velký a nápadný Golgiho aparát. To podle mě může dokazovat, že se velikost Golgiho aparátu pouze mění během životního cyklu buňky a v předchozích studiích byl jen náhodně objeven pouze v malé velikosti. Velikost Golgiho aparátu může souviset s metabolickou aktivitou buňky, která je různá a proměnlivá během životního cyklu.

Santos a Leedale (1992) našli také jediný záznam Golgiho aparátu v jednobíčíkaté zoospoře druhu *Vischeria helevetica*. Golgiho aparát byl malý a uložený v blízkosti jádra. Autoři se domnívali, že se nacházel pouze ve formě několika málo váčků. Autoři tak předpokládali, že Golgiho aparát je u Eustigmatofyt velice malý a proto je pravděpodobnost jeho nalezení v buňkách zoospor také příliš malá (Santos, 1996).

Hegewald et al. (2007) popsali nový druh *Pseudotetraëdriella kamillae*. Určili jeho molekulární podobnost s azosporickým rodem *Monodopsis*, ale zároveň se *Pseudotetraëdriella kamillae* liší tvorbou zoospor s jedním bičíkem a bez stigmatu. Autoři to vyřešili vytvořením nové čeledi Loboceae. Podle následných molekulárních studií se zdá tato nově vytvořená čeleď zbytečná, protože *Pseudotetraëdriella kamillae* je úzce příbuzná rodu *Monodopsis* (Eliáš et al., unpublished).

Podle mých výsledků se *Pseudotetraëdriella kamillae* podobá rodu *Monodopsis* také ultrastrukturně. Oba rody obsahují terminální pyrenoid a bylo u nich nalezeno kontinuum jaderné a chloroplastové membrány. Ultrastrukturní podobnosti těchto dvou rodů jsou zřejmě větší než podobnost mezi rodem *Monodopsis* a *Nannochloropsis*, protože rod *Nannochloropsis* pravděpodobně žádný pyrenoid neobsahuje. Tyto podobnosti odpovídají vysoké molekulární příbuznosti rodu *Pseudotetraëdriella* a *Monodopsis* (Eliáš et al., unpublished).

U všech studovaných kmenů z čeledi Monodopsidaceae jsem pozorovala podle předpokladu lamelární váčky uložené v cytoplazmě. „Reddish globule“ je také přítomná u všech mnou studovaných kmenů. Tyto charakteristiky nachází i Santos (1990) ve všech svých studovaných kmenech. Podobně jako v jejich studiích (Santos, 1990, 1996) jsem zaznamenala horší průběh fixace u čeledi Monodopsidaceae a tím i občasnou zhoršenou schopnost rozlišit některé struktury a interpretovat je.

IV.2. PSEUDELLIPSOIDIONACEAE

Rozpory ve členění třídy rozkryli už dříve Neustupa & Němcová (2001), když popsali nový druh *Pseudellipsoidion edaphicum*, který se morfologicky podobá rodu *Monodopsis*, ale tvoří zoospory se dvěma bičíky a stigmatem. Dále našli rod ve světelném mikroskopu morfologicky identický s rodem *Pseudocharaciopsis*, který ovšem netvoří pyrenoid.

Ve své práci jsem analyzovala výše popsané druhy: *Pseudellipsoidion edaphicum*, „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301, „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302 a Mary 8/18 T- 3d. Všechny druhy se vyznačují absencí jakéhokoli typu pyrenoidu. Chloroplast nemá věncovou lamelu. Jádro je uloženo zhruba uprostřed buňky a má víceméně kulovitý tvar. Nepozorovala jsem kontinuum jaderné a chloroplastové obalné membrány. Všechny kmeny mají lamelární váčky a „reddish globule“.

U kmene *Pseudellipsoidion edaphicum* se mi podařilo vyfotografovat průřez bazálním tělískem, které měří v průměru 0,26 μm . Podobný rozměr (0, 3 μm) zaznamenal Schnepf et al. (1996) na řezu bazálním tělískem u druhu *Pseudostaurastrum limneticum*. Oba druhy se rozmnožují pomocí zoospor a zdá se, že bazální tělíska jsou v buňce přítomna v celém životním cyklu eustigmatofytních zoosporických řas.

Mé výsledky získané podrobným studiem kmenů „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 301 a „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* CAUP Q 302 odpovídají molekulárně- fylogenetickým výsledkům Amaral et al. (2011). Tito autoři studovali pomocí molekulárního markeru 18S rRNA různé kmeny a izoláty xanthofytního rodu *Characiopsis* a dokázali, že všechny studované izoláty patřily mezi Eustigmatofyta podobně jako *Pseudocharaciopsis minuta*. *Pseudocharaciopsis* se ale v rámci Eustigmatofyt rozpadá do dvou různých linií. Morfologie buněk pozorovatelná ve světelném mikroskopu zůstává stejná, ale ultrastruktura se diametrálně liší. Mé výsledky podporují zařazení „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* do čeledi Pseudellipsoidionaceae. Nemá žádný pyrenoid ve svých buňkách, zatímco původní druh *Pseudocharaciopsis minuta*, patřící k Eustigmataceae, tvoří nápadný polygonální pyrenoid na stopce stejně jako ostatní zástupci této čeledi. Tento stav bude potřeba taxonomicky řešit a rod „*Pseudocharaciopsis*“ přejmenovat, aby nesl nové rodové jméno. U čeledi Pseudellipsoidionaceae se předpokládá absence pyrenoidu u všech zástupců, jak naznačují i mé výsledky studia čtyř druhů, a tvorba zoospor se dvěma bičíky (Eliáš et al., unpublished).

IV.3. EUSTIGMATACEAE

Do čeledi Eustigmataceae spadají druhy, které byly původně popsány Hibberdem a Leedalem (1971) a na základě jejichž ultrastruktury a pigmentového složení byla třída Eustigmatophyceae vytvořena. Tyto znaky byly považovány za univerzální pro všechna Eustigmatofyta až do vzniku studií L. A. Santos z 90. let 20. století.

Dnes se dále ukazuje, že morfologické i ultrastrukturní znaky jsou i na tuto čeleď těžko použitelné. Rody *Vischeria* a *Eustigmatos* nelze rozlišit na základě molekulárních dat. Druhy obou rodů jsou vzá-

jemně promíchány na fylogenetických stromech. *Eustigmatos* by měl být spojen s rodem *Vischeria* (Procházková, unpublished). Rod *Vischeria* má typickou eustigmatofytní ultrastrukturu s polygonálním pyrenoidem (Santos, 1996), stejně tak jako mnou studovaný *Eustigmatos magnus* a příbuzné, zatím nepopsané rody a druhy. Oba rody obsahují nápadný polygonální pyrenoid, lamelátní váčky a „reddish globule“.

Ve všech studovaných kmenech (Bog D 9/21 T- 2d, E4f a *Eustigmatos magnus*) byl nalezen velký polygonální pyrenoid. Pyrenoid ční ven z chloroplastu do cytoplazmy a je k chloroplastu připojen stopkou. Pyrenoid se vyvíjí během ontogeneze buňky. Podle Santos (1990) pyrenoid zaniká před rozdělením buňky a poté nově vzniká z chloroplastu. U *Eustigmatos magnus* jsem pozorovala dvě nově vzniklé buňky. Pyrenoid u nových buněk má spíše kulatý tvar a širokou bázi, kterou je spojen s chloroplastem. Při stárnutí buňky se báze zeštíhluje až zůstává pyrenoid zachycen jen na stopce.

Ukázalo se, že původní „Hibberdovské“ eustigmatofytní znaky jako je např. polygonální pyrenoid na stopce, jsou unikátní jen pro čeleď Eustigmataceae. Kmeny uvnitř této čeledě mají velice podobnou ultrastrukturu. Další čeleď Monodopsidaceae se vyznačuje přítomností terminálního pyrenoidu uloženého mezi tylakoidy. Pouze u zástupců této čeledi jsem pozorovala spojení jaderné a chloroplastové obalné membrány. Zástupci uvnitř skupiny si byly také velmi ultrastrukturně podobní. Zástupci čeledi Pseudellipsoidionaceae se vyznačují hlavně absencí pyrenoidu. Jednotlivé druhy uvnitř čeledi nelze jako u ostatních čeledí na základě ultrastruktury od sebe odlišit.

Naopak navzájem od sebe dobře odlišitelné jsou jednotlivé čeledě. Fylogenetické rozčlenění na čeledi Pseudellipsoidionaceae, Monodopsidaceae a Eustigmataceae je dobře podpořeno unikátními ultrastrukturními znaky každé čeledi, stejně tak jako je dobře podpořeno molekulárně na základě 18S rDNA a *rbcL* (Eliáš et al., unpublished). Podle ultrastruktury sice nerozpoznáme druh řasy, ale alespoň její příslušnost k příslušné čeledi.

Hlavním ultrastrukturním rozlišovacím znakem eustigmatofytních druhů mezi čeleděmi je přítomnost nebo absence pyrenoidu (Pseudellipsoidionaceae). Pokud se u nich pyrenoid vyskytuje, tak záleží na jeho typu. Ten je buď polygonální na stopce (Eustigmataceae) nebo terminální uvnitř chloroplastu (Monodopsidaceae). Čeleď Monodopsidaceae je zároveň jediná čeleď, u které bylo pozorováno continuum jaderné a chloroplastové obalné membrány.

Mezi další determinační kritéria patří tvorba či absence zoospor a počet jejich bičíků. Pseudellipsoidionaceae tvoří pravděpodobně zoospory se dvěma bičíky (Eliáš et al., unpublished). Eustigmataceae tvoří zoospory s jedním bičíkem, kromě rodu *Pseudocharaciopsis*, který má dvoubičíkaté zoospory (Hibberd & Leedale, 1971, Lee & Bold, 1973). Monodopsidaceae netvoří zoospory kromě jednobičíkatých zoospor *Pseudotetraëdriella kamillae*- ty však nebyly v práci Hegewald et al. (2007) přesvědčivě demonstrovány. Kombinace těchto znaků spolu s molekulární fylogenetikou pomůže s utříděním rodů v rámci moderního členění Eustigmatofyt.

U všech studovaných kmenů napříč různými čeleděmi jsem pozorovala v cytoplasmě lamelátní váčky. Podle Antia et al. (1975) byly lamelátní váčky nalezeny i uvnitř chloroplastu, ale v žádných dalších

studiích je tam už nikdo nepozoroval (Santos, 1990). Ani já jsem v chloroplastu nikdy lamelární váčky nenalezla a domnívám se, že tyto útvary nalezené autory Antia et al. (1975) byly nejspíš artefakty ne zcela povedené fixace.

Struktura lamelárních váček se patrně mění během životního cyklu řas. Dobře rostoucí buňky mají váčky plné lamel, zatímco buňky ve stacionární fázi růstu mají váčky naplněné kromě lamel i zásobním glukánem. Lamelární váčky zůstávají stále jedinou ultrastrukturní charakteristikou společnou pro všechny druhy Eustigmatofyt, která odlišuje třídu Eustigmatophyceae od všech ostatních organismů (Santos, 1990).

„Reddish globule“ existuje u všech druhů Eustigmatofyt a většinou je tvořena několika různě velkými kapénkami, které jsou obvykle dohromady obaleny membránou. Membrána však není někdy patrná. Vždy je ale každá kapénka zvlášť obalena membránou. „Reddish globule“ je buď celistvá, tvořena jedinou kapénkou, nebo častěji tvořena více kapénkami. Pokud je tvořena větším množstvím kapének, tak jsou to buď cca dvě velké kapénky a mnoho menších nebo několik poměrně stejně velkých kapének. U „*Pseudocharaciopsis*“ *ovalis* Q302 je „reddish globule“ nejdříve celistvá a později se rozpadá na několik kapének. Během ontogeneze buňky prochází tedy změnami a celkově se zvětšuje. U starších buněk dosahuje velikosti několika mikrometrů. Různý vzhled „reddish globule“ není pravděpodobně specifický v rámci rodů nebo čeledí, ale záleží spíš na tom v jaké fázi životního cyklu se buňka nachází.

Chloroplasty zkoumaných kmenů nemají nikdy věncovou lamelu. Výše uvedené tři znaky (lamelární váčky, „reddish globule“, absence věncové lamely) můžeme tedy nadále stejně jako Santos (1990) považovat za znaky společné všem Eustigmatofytům.

V. ZÁVĚR

V předkládané práci jsem popsala a porovnála ultrastrukturní znaky 10 zástupců třídy Eustigmatophyceae. Potvrdila jsem absenci věncové lamely v chloroplastu a zároveň přítomnost lamelárních váčků a „reddish globule“ u všech studovaných kmenů. Na základě znalosti molekulárně fylogenetických vztahů uvnitř třídy jsem našla ultrastrukturní charakteristiky, které jsou buď unikátní pro jednotlivě navrhované clady (čeledě) anebo společné všem druhům napříč celou třídou.

U druhu *Pseudotetraëdriella kamillae* jsem poprvé popsala kontinuum jaderné a chloroplastové membrány a přítomnost terminálního pyrenoidu. Přítomnost terminálního pyrenoidu jsem zaznamenala u všech zástupců čeledi Monodopsidaceae. Mé výsledky přispívají k názoru, že tato čeleď jako jediná z Eustigmatofyt, má spojenou jadernou a chloroplastovou obalnou membránu.

Prokázala jsem přítomnost polygonálního pyrenoidu u BogD 9/21 T- 2d, E4f a *Eustigmatos magnus*. Tento znak je charakteristický pro čeleď Eustigmataceae.

U všech zástupců čeledi Pseudellipsoidionaceae jsem zjistila, že nemají žádný pyrenoid, ale přesto vykazují ostatní eustigmatofytní znaky jako např. přítomnost lamelárních váčků.

Podle mých výsledků usuzuji, že ultrastrukturní znaky a podobnosti Eustigmatofyt korelují pozitivně s molekulární fylogenetikou. Druhy patřící do společného fylogeneticky definovaného cladu (čeledi), vykazují společné morfologické znaky.

Hlavní rozlišovací ultrastrukturní znaky nalezneme na úrovni čeledí. Čeleď Monodopsidaceae obsahuje terminální pyrenoid a kontinuum jaderné a chloroplastové membrány. Čeleď Eustigmataceae obsahuje nápadný polygonální pyrenoid. A čeleď Pseudellipsoidionaceae neobsahuje žádný typ pyrenoidu. Tyto znaky platí pro všechny mnou studované zástupce jednotlivých čeledí. Naopak podobnost druhů uvnitř čeledi je velká a nelze je tedy na základě ultrastruktury odlišit. Ultrastrukturní znaky velmi přesvědčivě korelují s molekulárními daty a přináší další informaci o vnitřní stavbě studovaných kmenů.

U „*Monodus*“ *guttula* jsem pozorovala unikátní eustigmatofytní znaky jako je přítomnost lamelárních váčků a „reddish globule“ a tím jsem potvrdila výsledky molekulárních analýz, podle kterých je „*Monodus*“ *guttula* zástupcem třídy Eustigmatophyceae.

U izolátů Mary 8/ 18 T- 3d, BogD 9/ 21 T- 2d a E4f jsem taktéž našla znaky typické pro Eustigmatofyta, která spolu s molekulárními daty získanými z 18S rDNA a *rbcL* a následnými analýzami, dokazují jejich příslušnost k třídě Eustigmatophyceae.

VI. LITERATURA

- **Adamson, R. P. & Sommerfeld, M. R.**, 1978, Survey of swimming pool of the Phoenix, Arizona, Metropolitan area, *J. Phycol.*, **14**, 519- 521.
- **Amaral, R., Elias, M., Santos, L. M. A. & Santos, F.**, 2011, Molecular and microscopic evidence place microalgal species of *Characiopsis* into Eustigmatophyceae, abstrakt z konference 5th European Phycological Congress, Posters, *European Journal of Phycology*, **46**:sup1, 109-194.
- **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.
- **Andreoli, C., Bresciani, E., Moro, I., Scarabel, L., La Rocca, N., Dalla Valle, L. & Ghion, F.**, 1999, A survey on a persistent greenish bloom in the Comacchio lagoons (Ferrara, Italy), *Botanica Marina*, **42**, 467- 479.
- **Antia, N.J. & Cheng, J. Y.**, 1982, The keto- carotenoids of two members of the Eustigmatophyceae, *Br. Phycol. J.*, **17**, 39- 50.
- **Antia, N.J., Bisalputra, T., Cheng, J. Y. & Kalley, J. P.**, 1975, Pigment and cytological evidence for reclassification of *Nannochloropsis oculata* and *Monallantu salina* in the Eustigmatophyceae, *Journal of Phycology*, **11**, 339- 343.
- **Bailey, C., Fawley, M. & Fawley, K.**, 2008, Species diversity among coccoid 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.
- **Bailey, C., Fawley, M. & Fawley, K.**, 2006, Species diversity among coccoid Eustigmatophyceae (Heterokontophyta), *Journal of Phycology*, **42** (Supplement s1), 27.
- **Bhattacharya, D. Medlin, L., Wainright, P. O., Ariztia, E.V., Bibeau, C., Stickel, S.K. & Sogin, M.L.**, 1992, Algae containing chlorophylls a + c are paraphyletic: molecular evolutionary analysis of the Chromophyta. *Evolution* **46**, 1801- 1817.
- **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.

- **Bourelly, P.**, 1958, Note systematique sur queques algues microscopiques des cuvettes supra- littorales de la région de Dinard, Bulletin du Laboratoire Maritime de Dinard, **43**, 111- 118.
- **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.
- **Cavalier- Smith, T.**, 2002, The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of protozoa. Int. J. System Evol. Microbiol., **52**, 297- 354.
- **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.
- **Dashiel, C. & Bailey, J.**, 2009, New observations on the biology of eustigmatophytes, with a description of *Microtalis* gen. Nov. Journal of Phycology **45**, (Supplement s1), 8.
- **Dodge, J. D.**, 1973, The fine structure of algal cells, Academic press, London and New York, xii + 261 pp.
- **Duerr, E. O., Molnar, A. & Sato, V.**, 1998, Cultured microalgae as aquaculture feeds, Journal of Marine Biotechnology, **6**, 65- 70.
- **Ettl, H.**, 1978, In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa.*, BD. 3. 1. Teil (Ettl, H., Gerloff, H., J., Heynig, H., eds.). Stuttgart: Gustav Fisher.
- **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.
- **Frost, T. M., Graham, L. E., Elias, J. E., Haase, M. J., Kretchmer, D. W. & Kranzfelder**, 1997, A yellow- green algal symbiont in the freshwater sponge, *Corvomeyenia everetti*: convergent evolution of symbiotic associations, Freshwater Biology, **38**, 395- 399.
- **Ghosh, S. & Love, N. G.**, 2011, Application of *rbcL* based molecular diversity analysis to algae in wastewater treatment plants, Bioresource Technology, **102**, 3619- 3622.

- **Gouveia, L. & Oliveira, A. C.**, 2009, Microalgae as a raw material for biofuel production, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**, 269- 274.
- **Hashimoto, H.**, 2004, Mitochondrion- dividing ring in an alga *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae, Heterokonta), *Cytologia*, **69** (3), 323- 326.
- **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. A McKhann, H.I. (eds.): *Handbook of Protoctista* (326- 333), Jones and Bartlett, London.
- **Hibberd, D. J.**, 1982b, Eustigmatophyceae: introduction and bibliography. In: Rosowski, J. R., & Parker, B. C. (eds.), *Selected papers in Phycology II*. Phycological society of America, Lawrence, Kansas, p. 728- 730.
- **Hibberd, D.J.**, 1981, Notes on taxonomy and nomenclature of tha algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xantophyceae), *Bot. J. Linn. Soc.*, **82**, 93-119.
- **Hibberd, D. J.**, 1980, Eustigmatophytes, - In: Cox, E.R., (ed.): *Phytoflagellates*, *Developments in marine biology*, Vol. **2** Elsevier, North Holland, New York, p. 319- 334.
- **Hibberd, D. J.**, 1974, Observation on the cytology and ultrastructure of *Chlorobotrys regularis* (West) Bohlin with special reference to its position in the Eustigmatophyceae, *Br. Phycol. J.*, **9**, 37- 46.
- **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.
- **Hibberd, D.J. & Leedale, G.F.**, 1970, Eustigmatophyceae- a new algal class with unique organization of the motile cell. *Nature* **225**, 758- 760.

- **Huan, M., Hamazaki, K., Sun, Y., Itomura, M., Liu, H., Kang, W., Watanabe, S., Terasawa, K., & Hamazaki, T.**, 2004 Suicide Attempt and n-3 Fatty Acid Levels in Red Blood Cells: A Case Control Study in China, *Biol Psychiatry*, **56**, 490- 496.

- **Innis, S.M.**, 1992: n-3 fatty acid requirements of the newborn, *Lipids*, **27**, 879-885.

- **Kalina, T. & Pokorný, V.**, 1978, Základy elektronové mikroskopie pro biology (14. FIXACE - 17. KONTRASTOVÁNÍ ULTRATENKÝCH ŘEZŮ NA SÍTKÁCH), str. 99- 179, Státní pedagogické nakladatelství Praha.

- **Krienitz, L. & Wirth, M.**, 2006, The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology, *Limnologia* **36**, 204- 210.

- **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.

- **Lubian, L. M. & Montero, O.**, 1998, Excess light– induced violaxanthin cycle activity in *Nannochloropsis gadinata* (Eustigmatophyceae): effects of exposure time and temperature, *Phycologia* **37**, 16- 23.

- **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.

- **Nakano, T., Handa, S. & Takeshita, S.**, 1991, Some corticolous algae from the Taishaku- kyô Gorge, western Japan, *Nova Hedwigia*, **52**, 427- 451.

- **Nebesářová, J.**, 2001, Elektronová mikroskopie pro biology, <http://www.paru.cas.cz/lem/book/>, Příprava preparátů pro TEM chemickou cestou.

- **Neustupa, J. & Němcová, Y.**, 2001, Morphological and taxonomic study for three terrestrial eustigmatophycean species, *Nova Hedwigia*, **123**, 373- 386.

- **Pascher, A.**, 1937- 1939, Heterokonten. In. L. Rabenhorst's *Kryptogamen- Flora von Deutschland, Österreichs und Schweiz*. Aufl. 2. Bd. XI. Leipzig: Akad. Verlagsges.

- **Petersen, J. B.**, 1932, Einige neue Erdalgen, Archiv für Protistenkunde, **76**, 95- 408.
- **Pfeiffer, T. J. & Ludwig, G. M.**, 2007, Small- scale system for the mass production of rotifers using algal paste, North American Journal of Aquaculture, **69**, 239- 243.
- **Preisig., H. R. & Wilhelm, C.**, 1989, Ultrastructure, pigments and taxonomy of *Botryochloropsis similis* gen. Et sp. Nov. (Eustigmatophyceae), Phycologia, **28**, 61- 69.
- **Riisberg, I., Orr, R., Kluge, R., Shalchian-Tabrizi, K., Bowers, H. A., Patilb,V., Edwardsena, B. & Jakobsen, K. S.**, 2009, Seven gene phylogeny of heterokonts, Protist, **160**, 191- 204.
- **Ryther, J. H.**, 1954, The ecology of phytoplankton blooms in Moriches Bay and Great South Bay, Long Island, New York, Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts **106**, 198- 209.
- **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.
- **Santos, L. M. A.**, 1990, Cytology and ultrastructure of Eustigmatophyceae, Ph. D. Thesis, University of Leeds.
- **Santos, L. M. A. & Leedale, G. F.**, 1995, Some notes on the ultrastructure of small azosporic members of the class Eustigmatophyceae, Nova Hedwigia, **60** 219- 225.
- **Santos, L.M.A. & Leedale, G.F.**, 1992, First report of a Golgi body in an uniflagellate eustigmatophycean zoospore, Phycologia, **31**, 119- 124.
- **Santos, L. M. A., Melkonian, M. & Kreimer, G.**, 1996, A combined reflection confocal laser scanning, electron and fluorescence microscopy analysis of the eyespot in zoospores of *Vischeria* spp. (Eustigmatales, Eustigmatophyceae), Phycologia, **35 (4)**, 299- 307.
- **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.
- **Simopoulos, A.P.**, 1991, Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development, Am. J. Clin. Nutr., **54**, 438- 463.

- **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.

- **Sukenik, A.**, 1999, Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*, In: Chemicals from Microalgae (Cohen, Z., ed.), Boca- Raton- London- New York, CRC Press, Taylor & Francis group, pp. 41- 56.

- **Vischer, W.**, 1945, Heterokonten aus Alpenen Boden, Speziell dem Schweizerischen Nationalpark, Ergebnisse der wissenschaftlichen Untersuchung der Schweizerischen Nationalparks 1, 481- 510.

- **Volkman, J. K., Barrett, S. M. & Blackburn, S. I.**, 1999, Fatty acids and hydroxy fatty acids in three species of freshwater eustigmatophytes, Journal of Phycology, **35**, 1005- 1012.

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

- **Whittle, S. J. & Casselton, P.J.**, 1975, The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae, Br. Phycol. J. 10, 179- 191.