Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Botanika

Bc. Karolína Vávrová

Životní cyklus řas z druhového komplexu *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)

Life cycle of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) species complex

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

Praha, 2017

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, 27. 4. 2017

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce Yvonne Němcové za pomoc s vypracováním celé této práce i za trpělivost, laskavost a podporu, které mi poskytovala během celého magisterského studia. Dále bych chtěla poděkovat Martině Pichrtové za pomoc s desikačními experimenty, Míše Klimešové a Pavlovi Škaloudovi za pomoc s fylogenetickými analýzami, Josefovi Jandovi za pomoc s průtokovou cytometrií a Janě Kulichové a Jiřímu Neustupovi za přírodní vzorky. V neposlední řadě děkuji všem z algologického oddělení za příjemnou a přátelskou pracovní atmosféru a své rodině a přátelům za podporu během celého mého studia.

Abstrakt

Sladkovodní jednobuněčné zelené řasy z druhového komplexu *Haematococcus pluvialis* jsou nejlepšími přírodními producenty sekundárního karotenoidu astaxanthinu s velmi silnými antioxidačními vlastnostmi. Navzdory celosvětovému rozšíření, velkému biotechnologickému potenciálu a značné pozornosti, která je věnována možnostem kultivace *H. pluvialis*, však zůstávají až překvapivé mezery v poznání komplexního životního cyklu a chování tohoto organismu. První z nejasností se týká omezeného počtu dělení zoospor na pět buněčných cyklů (Lee & Ding 1994) po uvolnění z akinety. Přítomnost tohoto genetického omezení nebyla během této práce potvrzena, počet dělení zoospor ovlivňují především zvolené kultivační podmínky. Značně komplikovaná je i problematika pohlavního rozmnožování *H. pluvialis*. Důvodem nejasností je především nízký počet pozorování celého procesu gametogeneze a splývání gamet. Jednotlivé publikované studie se navíc v určitých bodech liší. Navzdory široké škále vyzkoušených podmínek, jimž byly vystaveny dva druhy z komplexu *H. pluvialis*, konkrétně *H. pluvialis* a *H. rubicundus*, se však ani v jednom případě v rámci této práce nepodařilo pohlavní rozmnožování indukovat. Důvodem neúspěchu může být heterothalismus studovaných kmenů. Vzhledem k výskytu *H. pluvialis* v efemerních biotopech je pro tento druh klíčová schopnost přežít vysušení. Zjištěná desikační tolerance akinet kmene CCALA 357 byla velmi vysoká. Akinety jsou schopné přežít dokonce rychlé vysušení při 10% relativní vzdušné vlhkosti a tříměsíční uchovávání ve vysušeném stavu. Vysušení u nich navíc může sloužit jako mechanismus pro přežití extrémních teplot, konkrétně -80 °C a 55 °C. Tato velmi vysoká odolnost akinet, jež je pravděpodobně umožněna přítomností silné buněčné stěny obsahující algenan, může mít zásadní vliv na životní cyklus i na celosvětové rozšíření tohoto organismu.

Klíčová slova: akineta, algenan, astaxanthin, desikační tolerance, komplex *Haematococcus pluvialis*, mikrořasové biotechnologie, pohlavní rozmnožování, stresová tolerance, životní cyklus

Abstract

Freshwater green algae within species complex *Haematococcus pluvialis* are best natural producers of secondary carotenoid astaxanthin famous for its strong antioxidant activity. Despite worldwide distribution, great biotechnological potential and extensive literature dealing with different approaches to the cultivation of these organisms, there still remains surprising gaps in knowledge of their complex life cycle and behaviour. First uncertainty concerns asexual cell division of zoospores, hypothetically limited to five cell doublings (Lee & Ding 1994). No such genetic limitation was observed in this thesis, number of cell divisions is thus influenced mainly by cultivation conditions. There is still considerable uncertainty regarding to the asexual reproduction, as well. Ambiguity might be caused by scarce observation of the whole process of gametogenesis and conjugation of gametes. Published studies differed in some particular points. Unfortunately, we did not succeed in induction of gametogenesis despite broad scale of tested cultivation conditions applied to two different species within the *H. pluvialis* complex, namely *H. pluvialis* and *H. rubicundus*. This failure might be caused by heterothalism of the studied strains. *Haematococcus pluvialis* inhabits mainly ephemeral pools. Its ability to survive unfavourable conditions in desiccated stage is crucial. Observed desiccation tolerance of akinetes of strain CCALA 357 was extreme. Akinetes survive even fast desiccation in 10% relative air humidity and three-month persistence in desiccated state. Furthermore, desiccation might serve as mechanism for survival of extreme temperatures such as -80 °C and 55 °C. This high resistance, caused probably by thick algaenan containing cell wall, may have crucial influence on life cycle and worldwide distribution of this organism.

Keywords: akinete, algaenan, astaxanthin, desiccation tolerance, life cycle, microalgal biotechnology, sexual reproduction, species complex *Haematococcus pluvialis,* stress tolerance

Obsah

1 Úvod 1
1.1 Fylogenetické postavení rodu *Haematococcus* 2
1.2 Životní cyklus druhu *Haematococcus pluvialis* 3
1.2.1 Zoospory 4
1.2.2 Palmely 5
1.2.3 Akinety 6
1.2.4 Gamety a pohlavní rozmnožování 7
1.3 Desikace jako důležitý faktor v životním cyklu *Haematococcus pluvialis* 10
1.3.1 Desikační tolerance 10
1.3.2 Vliv složení buněčných obalů na míru desikační tolerance 11
1.3.3 Vliv látek obsažených v buňkách na míru desikační tolerance 12
1.3.4 Příklady dalších řas odolných vůči desikaci 13
1.3.5 Fluorimetrie a její využití pro sledování vlivu stresových faktorů 14
1.4 Cíle práce 16
2 Materiál a metody 17
2.1 Původ kmenů a kultivace 17
2.2 Zjištění fylogenetického postavení jednotlivých kmenů 18
2.2.1 Izolace DNA, PCR a sekvenování 18
2.2.2 Fylogenetické analýzy 19
2.3 Zjišťování počtu dělení zoospor 20
2.4 Synchronizace kultury střídáním světla a tmy 20
2.5 Indukce gametogeneze 21
2.6 Transmisní elektronová mikroskopie 22
2.7 Desikační pokusy 23
2.7.1 Vystavení kultur různým rychlostem vysychání 23
2.7.2 Pokusy s červenými akinetami kombinující vysychání s dalšími faktory 24
3 Výsledky 26
3.1 Fylogenetické postavení jednotlivých kmenů 26
3.2 Dělení zoospor 27
3.2.1 Počet dělení zoospor 27
3.2.2 Synchronizace dělení zoospor střídáním světla a tmy 28
3.3 Indukce gametogeneze, dělení akinet, uvolňování zoospor a palmel 30
3.4 Desikační odolnost 33
3.4.1 Míra odolnosti červených a zelených akinet při různých rychlostech vysychání 33

3.4.2 Vzájemný vliv působení rozdílných teplot a doby vyschnutí 35
3.4.3 Odolnost vysušených akinet vůči působení extrémních teplot 36
3.4.4 Srovnání vysušených a nevysušených akinet 37
3.4.5 Vliv velmi dlouhé doby vyschnutí 37
4 Diskuze 39
4.1 Nepohlavní rozmnožování 39
4.1.1 Nepohlavní dělení zoospor 39
4.1.2 Nepohlavní dělení akinet 40
4.2 Pohlavní rozmnožování 41
4.3 Desikační tolerance a její vliv na životní cyklus *H. pluvialis* 42
5 Závěr 44
6 Literatura 45

1 Úvod

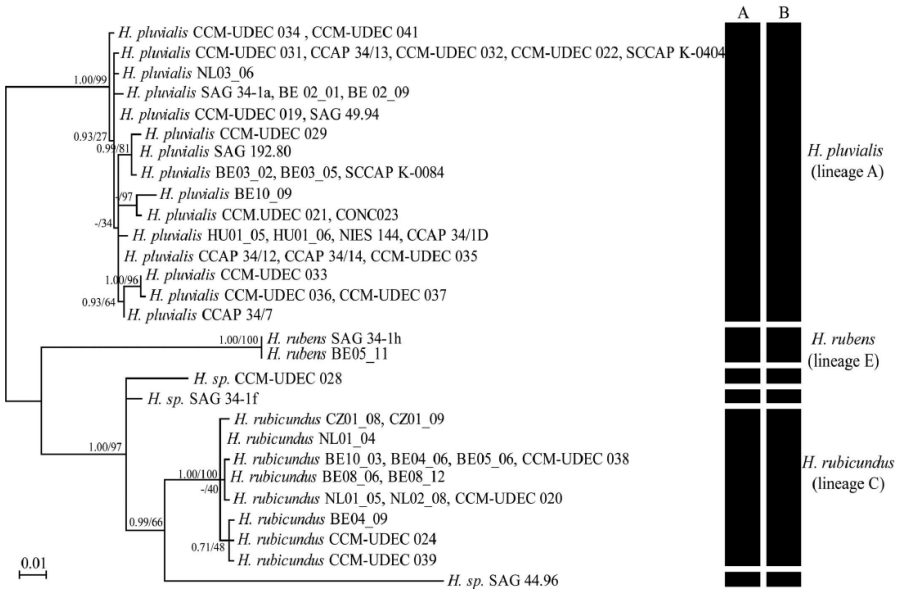
Sladkovodní jednobuněčné zelené řasy z druhového komplexu *Haematococcus pluvialis* řazené do třídy Chlorophyceae (Guiry & Guiry 2017) patří mezi nejvýznamnější biotechnologicky využívané mikrořasy. Při vystavení stresovým podmínkám jsou totiž tyto organismy schopny ve svých buňkách akumulovat vysoké množství sekundárního karotenoidu astaxanthinu, který funguje jako přírodní zdroj červeného pigmentu v kulturách lososů a krevet i v akvaristice pro výrazné zbarvení okrasných ryb (Lorenz & Cysewski 2000). Astaxanthin je i velmi účinným antioxidantem, působí dokonce silněji než β-karoten nebo α-tokoferol (Naguib 2000), má tudíž i značný farmaceutický potenciál. Mimo jiné snižuje oxidativní poškození mitochondrií spojené se stárnutím (Park et al. 2013), působí preventivně proti vzniku Parkinsonovy choroby a dalších neurodegenerativních onemocnění (Chan et al. 2009), má imunomodulační (Okai & Higashi-Okai 1996) a protinádorovou aktivitu (Jyonouchi et al. 2000).

Z těchto důvodů jsou velmi důkladně zkoumány možnosti kultivace *H. pluvialis* od různých typů kultivačních postupů, fotobioreaktorů a kultivačních médií po konkrétní nastavení jednotlivých kultivačních parametrů jako je osvětlení, teplota nebo pH (např. Park et al. 2014, Domínguez-Bocanegra et al. 2004, Saha et al. 2013, Hata et al. 2001, Sarada et al. 2002). Oproti tomu ale zůstávají překvapivé mezery a nejasnosti týkající se komplexního životního cyklu této řasy, jejichž objasnění by mohlo mít vliv i na optimalizaci biotechnologické produkce.

1.1 Fylogenetické postavení rodu *Haematococcus*

Rod *Haematococcus* je řazen do třídy Chlorophyceae, do řádu Chlamydomonadales v rámci CS cladu. Původně byly do tohoto rodu řazeny i druhy *H. buetschlii, H. capensis, H. droebakensis* a *H. zimbabwiensis*. Na základě morfologických i molekulárních odlišností byly tyto druhy přeřazeny do nového rodu *Balticola* (Droop 1956, Buchheim et al. 2013). Typový druh *Haematococcus pluvialis* se od nich odlišuje například stejnoměrně tenkými cytoplasmatickými provazci, přítomností tří a více pyrenoidů a schopností syntetizovat sekundární karotenoid astaxanthin (Buchheim et al. 2013).

Podrobnější molekulární analýzy druhu *H. pluvialis* už delší dobu ukazovaly na značnou vnitrodruhovou diverzitu mezi různými kmeny (Mostafa et al. 2011, Buchheim et al. 2013). Z těchto důvodů byly z tohoto druhu vyčleněny dva nové, konkrétně *H. rubens* a *H. rubicundus* (Allewaert et al. 2015; viz obr. č. 1). Kromě ITS a *rbc*L sekvencí se tyto tři druhy nejspíše odlišují i teplotními preferencemi a částečně i některými morfologickými znaky (tvar protoplastu a cytoplasmatických provazců). Nicméně vzhledem ke značné morfologické variabilitě mezi kmeny i uvnitř jednotlivých kmenů není možné tyto druhy jednoznačně odlišit pouze na základě morfologie.

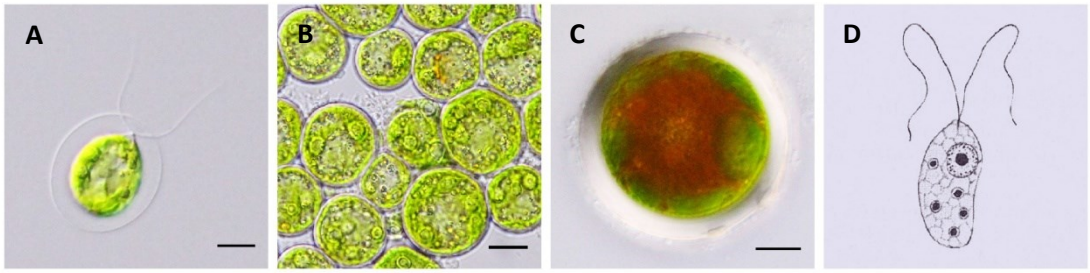


Obr. č. 1: Fylogenetický strom zobrazující vztahy v rámci komplexu *Haematococcus pluvialis* sestavený na základě analýzy dat z ITS rDNA sekvencí. (Allewaert et al. 2015)

V teoretické části této diplomové práce bude s těmito druhy zacházeno jako s druhovým komplexem *H. pluvialis*, protože z údajů dostupných v literatuře většinou není možné odlišit, se kterým z druhů je pracováno. Na druhou stranu je možné, že jsou rozdílné výsledky některých studií, ať už se týkají životního cyklu tohoto organismu nebo optimalizace kultivačních podmínek, zapříčiněny právě příslušností použitých kmenů k jiným druhům rodu *Haematococcus*.

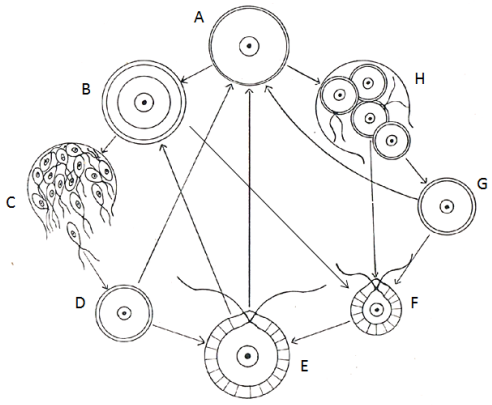
1.2 Životní cyklus druhu *Haematococcus pluvialis*

V životním cyklu *H. pluvialis* jsou přítomna čtyři různá stádia. Jedná se o velké dvoubičíkaté zoospory (= megazoidy), malé oválné dvoubičíkaté buňky, které pravděpodobně představují gamety (= mikrozoidy), kulaté nepohyblivé zelené palmely a poslední stádium představují silnostěnné odolné cysty (= akinety, aplanospory) (Hazen 1899, Peebles 1909, Elliott 1934, Droop 1956, Pocock 1959; viz obr. č. 2).



Obr. č. 2: Buněčné typy přítomné v životním cyklu *Haematococcus pluvialis*. A: zoospora; B: palmely s dobře patrnými pyrenoidy; C: tlustostěnná akineta, v níž se postupně hromadí sekundární karotenoid astaxanthin; D: schematické vyobrazení gamety. Měřítka odpovídají 10 µm. (A-C: vlastní fotografie, kmen CCALA 357; D: Elliott 1934)

Životní cyklus začíná přenesením akinet do čerstvého média, v němž dochází k jejich dělení a následnému uvolnění 2-32 dceřiných zoospor (Wayama et al. 2013; viz obr. č. 3). Tyto zoospory dále rostou a dělí se. Po nějaké době dojde k jejich přeměně na kulaté palmely, které mohou pokračovat v dělení. Pokud jsou buňky vystaveny stresovým podmínkám, dochází k jejich přeměně na cysty, která nejčastěji postupuje přes stádium palmely. Pokud je ale změna podmínek náhlá, mohou být na cysty transformovány přímo zoospory (Elliott 1934). V některých případech může být z akinet místo zoospor uvolněno až 64 gamet (Triki et al. 1997). Uvolněné gamety rychle plavou, po určité době zpomalují, zakulatí se a poté mohou dál pokračovat v asexuálním životním cyklu (Hazen 1899, Elliott 1934, Triki et al. 1997). Samotné splývání gamet připomínající izogamii bylo pozorováno pouze výjimečně (Peebles 1909, Droop 1956, Pocock 1959, Chekanov et al. 2014). Po syngamii byly v kulturách pozorovány čtyřbičíkaté buňky, nejspíše planozygoty. (Peebles 1909, Pocock 1959).



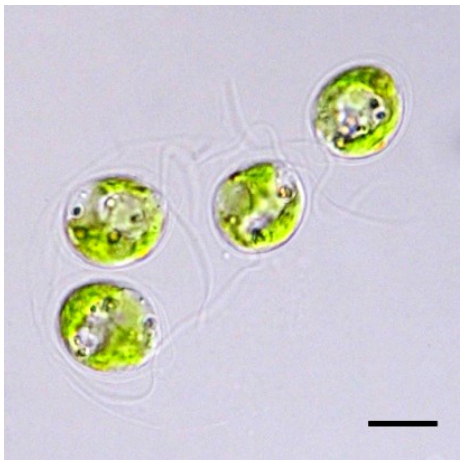
Obr. č. 3: Schematické znázornění nepohlavní části životního cyklu *Haematococcus pluvialis*. A: dospělá palmela; B: akineta; C: uvolňování gamet; D+G: mladé palmely; H: dělení palmely na palmely nebo zoospory; F: mladá zoospora; E: dospělá zoospora. (podle Elliott 1934)

1.2.1 Zoospory

Zoospory jsou dvoubičíkaté buňky dosahující velikosti až 50 μm (Elliott 1934). Jsou obklopené silnou glykoproteinovou matrix (Hagen et al. 2002), jež je propojena s protoplastem pomocí tenkých cytoplazmatických provazců (Santos & Mesquita 1984). Z velké části jsou tyto buňky vyplněné parietálním fragmentovaným chloroplastem, jehož součástí jsou minimálně tři pyrenoidy (Buchheim et al. 2002) a intraplastidiální stigma (Santos & Mesquita 1984), díky němuž zoospory vykazují značnou fototaxi (Hazen 1899).

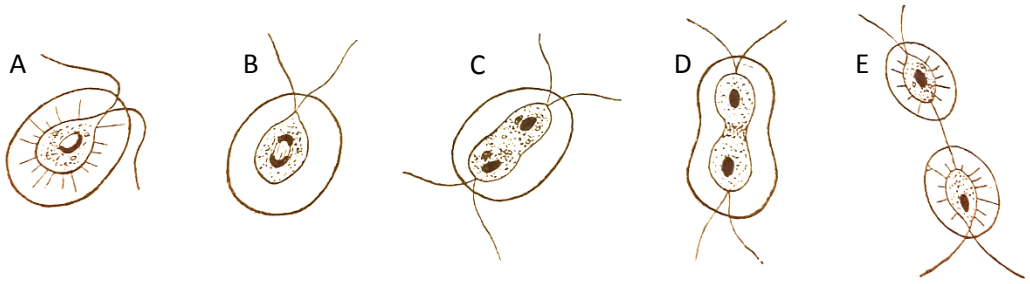
Vegetativní dělení zoospor je hlavním mechanismem nárůstu počtu buněk v kultuře, proto je optimalizaci tohoto procesu věnována velká pozornost. Zdá se, že pro udržení kultury v růstové fázi je vhodné užití spíše nižšího ozáření (Chekanov et al. 2014, Hata et al. 2001, Park et al. 2014), neutrálního pH (Sarada et al. 2002) a teploty okolo 25 °C (Hata et al. 2001). Z těchto důvodů bývá kultivace pro biotechnologické účely často rozdělována na dvě fáze (Aflalo et al. 2007, Park et al. 2014, Zhang et al. 2014), protože v podmínkách optimálních pro zoospory není možné dosáhnout velkého množství astaxanthinu v buňkách. Nicméně i v těchto buňkách může k akumulaci astaxanthinu docházet (Barlow et al. 2014).

Samotné dělení zoospor může probíhat dvěma způsoby. Ve většině případů se zoospora nejprve zakulatí a ztratí bičíky. Poté dojde k jednomu nebo dvěma buněčným dělením, vzniklé dceřiné buňky si vytvoří bičíky a aktivně se uvolní ze společné extracelulární matrix (Hazen 1899, Peebles 1909, Elliott 1934; viz obr. č. 4).



Obr. č. 4: Uvolňování zoospor *Haematococcus pluvialis* ze společné extracelulární matrix. Měřítko odpovídá 10 μm. (vlastní fotografie, kmen CCALA 357)

Výjimečně může u zoospor docházet i k příčnému dělení, v tomto případě u buněk nedochází k zakulacení protoplastu ani ke ztrátě bičíků (Peebles 1909, Elliott 1934; viz obr. č. 5). V přírodních podmínkách se zoospory dělí především brzy ráno (Hazen 1899, Elliott 1934). Hazenova pozorování (1899) naznačují, že světlo může proces dělení zoospor inhibovat nebo alespoň zpomalovat.



Obr. č. 5: Schematické znázornění příčného dělení zoospor *Haematococcus pluvialis*. A: zoospora před dělením; B: dělení jádra; C: počátek cytokineze, vytvoření druhého páru bičíků; D: oddělování protoplastů; E: zoospory propojené tenkým provazcem těsně před konečným oddělením. (podle Peebles 1909)

Ze studie Lee & Ding (1994) vyplývá, že se zoospory rozdělí pouze pětkrát a poté dochází k jejich přeměně na palmely a následně akinety. Není ale jisté, jestli se jedná o genetické omezení (v tomto případě by během kultivace nemělo smysl usilovat o vyšší nárůst kultury, než odpovídá pěti buněčným dělením) nebo pouze o vliv zvoleného typu kultivace. Tato studie zároveň na základě výsledků průtokové cytometrie naznačuje, že zoospory obsahují oproti nepohyblivým stádiím poloviční množství DNA. V tom případě by zoospory představovaly pohlavní stádium. Nicméně je možné, že bylo dvojnásobné množství DNA u palmel způsobeno tím, že se buňky právě připravovaly na buněčné dělení. Tato domněnka je podpořena přítomností stádia mikrozoidů v buněčném cyklu, neboť tyto buňky odpovídají pohlavnímu stádiu mnohem lépe.

1.2.2 Palmely

Palmely nejčastěji vznikají transformací zoospor po jejich vystavení stresovým podmínkám a většinou fungují jako předstupeň akinet (Elliott 1934, Wayama et al. 2013). Zoospory se nejprve zakulatí a ztratí bičíky a poté se pod glykoproteinovou matrix vytvoří primární celulózová buněčná stěna (Hagen et al. 2002). Od akinet se palmely kromě složení buněčné stěny liší i přítomností neporušeného parietálního chloroplastu, který může představovat až 41,7 % buněčného objemu (Wayama et al. 2013), a nižším obsahem astaxanthinu, jenž se nejprve akumuluje v tukových kapénkách na povrchu jádra (Collins et al. 2011, Santos & Mesquita 1984, Wayama et al 2013). Dalším rozdílem je, že palmely ještě nejsou odpočívajícími buňkami, ve vhodných podmínkách se dále dělí, dceřinými buňkami pak mohou být opět palmely, ale i zoospory (Elliott 1934).

Palmely ale mohou vznikat i dělením akinet přenesených do podmínek, které brání vzniku zoospor. Může se jednat o nižší teplotu (Hazen 1899), nedostatek vody, kultivaci na agaru nebo v médiu s nízkým obsahem rozpuštěného kyslíku a oxidu uhličitého (Peebles 1909).

1.2.3 Akinety

Akinety vznikají z palmel, výjimečně dokonce přímo ze zoospor (Elliott 1934), ve stresových podmínkách, jako je vysoké ozáření (Saha et al. 2013, Domínguez-Bocanegra et al. 2004, Chekanov et al 2014), teplota nad 30 °C (Tjahjono et al. 1994), vyšší koncentrace solí (Sarada et al. 2002) nebo nedostatek živin (Boussiba et al. 1999, Saha et al. 2013).

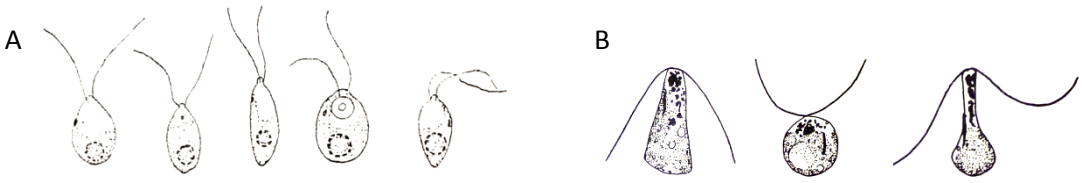
Pro akinety je typická silná sekundární buněčná stěna, která je navíc na povrchu krytá trojvrstevným obalem obsahujícím algenan (Hagen et al 2002). Tato vrstva se nejspíše podílí i na odolnosti vůči vyschnutí a účinkům UV záření (Blokker 2000). Kromě syntézy buněčné stěny dochází u akinet i k další akumulaci astaxanthinu a lipidů (Gu et al. 2013), vzniklá červená lipidová tělíska mohou tvořit až 52,2 % buněčného objemu. Zároveň dochází k úbytku objemu chloroplastu (až na 9,7 % buněčného objemu) i pyrenoidů, obě struktury ale zůstávají zachovány, což umožňuje jejich rychlé obnovení (Wayama et al. 2013). Chloroplast získává síťovitou morfologii (Nogami et al. 2014) a může v něm docházet k rozvolňování thylakoidních membrán (Wayama et al. 2013, Gu et al. 2013). Přesto je chloroplast stále alespoň částečně fotosynteticky aktivní, energie je nejspíše využita především pro syntézu astaxanthinu (Gu et al. 2013). Fotosyntéza je nicméně omezena značným úbytkem cytochromu f, jenž limituje elektronový transport mezi fotosystémy (Han et al. 2012).

Akinety na rozdíl od palmel představují klidové stádium, dochází u nich pouze ke zvětšování objemu vlivem akumulace lipidů a astaxanthinu (Hazen 1899). Díky své buněčné stavbě jsou dobře přizpůsobené k přečkání nepříznivých podmínek, jako je nedostatek vody nebo zmrznutí. Nahrazují tak pohlavně vzniklé zygospory jiných druhů. Nepohlavní způsob vzniku akinet je velmi výhodný, protože v mělkých nádržkách, ve kterých se *Haematococcus pluvialis* vyskytuje nejčastěji, dochází ke změně podmínek velmi rychle (Pocock 1959).

Opět aktivní začínají být akinety až po opětovném zlepšení podmínek. Zvětšují svůj objem a dělí se, z jedné akinety může být uvolněno až 32 zoospor (Wayama et al. 2013), případně 64 gamet (Triki et al. 1997). Počet uvolněných zoospor souvisí s původní velikostí akinety. V průběhu dělení dochází vlivem zvětšování objemu k prasknutí mateřské buněčné stěny, v tomto místě poté dochází k uvolňování dceřiných buněk do okolí (Wayama et al. 2013). V přírodě dochází k dělení akinet většinou brzy ráno (Hazen 1899, Elliott 1934), celý proces trvá 10-15 hodin (Peebles 1909).

1.2.4 Gamety a pohlavní rozmnožování

Gamety jsou dvoubičíkaté buňky, které se od zoospor liší menší velikostí, jež nepřesahuje 20 μm (Elliott 1934), většinou se ale pohybuje okolo 10 μm a méně (Pocock 1959, Triki et al. 1997). Zároveň nejsou obklopené extracelulární matrix (Elliott 1934, Pocock 1959), jiné ultrastrukturální odlišnosti od zoospor pozorovány nebyly (Triki et al. 1997). Gamety mohou mít různý tvar (viz obr. č. 6), mohou být oválné (Hazen 1899, Elliott 1934), hruškovité (Peebles 1909), vejčité, kulovité, komolé nebo dokonce i činkovité (Droop 1956).



Obr. č. 6: Různé tvary gamet *Haematococcus pluvialis*. (A: Pocock 1959; B: Droop 1956)

Díky své menší velikosti může být z jedné akinety uvolněno až 64 gamet. Ty před uvolněním aktivně plavou uvnitř mateřské buněčné stěny (Peebles 1909, Elliott 1934, Triki et al. 1997). Na rozdíl od jiných příbuzných organismů, např. *Chlamydomonas*, kde jsou gamety vytvořeny přeměnou haploidních zoospor za vhodných podmínek (Pan et al. 1997), se u druhu *H. pluvialis* gamety tvoří pouze po dělení nepohyblivých akinet (Peebles 1909, Droop 1956, Pocock 1959).

Indukce gametogeneze je poměrně obtížná a řadu úspěšných postupů se nepodařilo v jiných studiích zopakovat (Elliott 1934, Triki et al. 1997). Hazen (1899) nejčastěji pozoroval uvolňování gamet z červených cyst, které byly před vysušením vystaveny nepříznivým podmínkám, například nedostatku živin nebo zmrznutí, případně byly vysušeny velmi rychle, nebo pokud byla do vhodných podmínek přenesena akineta, která vznikla přímo ze zoospory. Peebles (1909) gametogenezi pozorovala nejčastěji u akinet, které se nahromadily na okraji vysychající nádoby, ale nebyly vyschlé příliš dlouho. Lepších výsledků bylo dosaženo, pokud byl po opětovném zalití biofilmu na stěně nádoby novým médiem celý pokus vysychání zopakován. Tuto metodu doporučuje i Droop (1956), v modifikované podobě i Pocock (1959), který doporučuje pomalé vysychání v uzavřené nádobě, v níž je udržována vysoká vzdušná vlhkost. Elliott (1934) získal gamety po seškrabání akinet ze starých agarových ploten, které na noc umístil do převařené kohoutkové vody. Týmu Triki et al. (1997) se podařilo indukovat gametogenezi pouze po přidání čerstvého média ke starým hladovějícím kulturám. Nedostatek živin, především dusíku, spouští gametogenezi i u příbuzného druhu *Chlamydomonas reinhardtii* (Sager and Granick 1954). Zdá se, že je pro vznik gamet velmi podstatné i světlo (Peebles 1909), jistý vliv by mohlo mít i UV záření (Sun et al. 2008). Na rozdíl od zoospor gamety nemohou vznikat ve tmě (Hazen 1899). Podobná pozorování existují i pro *Ch. reinhardtii* (Pan et al. 1997, Saito et al. 1998).

Uvolněné gamety velmi rychle neuspořádaně plavou (Elliott 1934, Pocock 1959) a vykazují značnou fototaxi (Peebles 1909). Jejich velká rychlost může být způsobena tím, že mají bičíky stejně dlouhé jako zoospory, ale jejich buňky jsou mnohem menší (Hazen 1899). Takto aktivně plavat ale vydrží pouze několik hodin (Hazen 1899, Elliott 1934). Velká část gamet brzy zemře (Hazen 1899, Peebles 1909), ostatní buď konjugují nebo pokračují v životním cyklu nepohlavně, zakulatí se, ztratí bičíky a přemění se na cysty, ze kterých mohou být později uvolňovány zoospory (Hazen 1899, Elliott 1934, Triki et al. 1997). Elliott (1934) jako jediný pozoroval i nepohlavní podélné dělení gamet (viz obr. č. 7).

Obr. č. 7: Podélné dělení gamet *Haematococcus pluvialis*. (Elliott 1943)

Pohlavní proces nejspíše představuje izogamii (Chekanov et al. 2014) a trvá velice krátce, dvě gamety mohou splynout během 5-10 minut (Peebles 1909). Gamety se nejprve potkají svými předními konci, zatímco obě rychle plavou, poté začínají splývat směrem od papily s bičíky k opačnému konci buněk (viz obr. č. 8). Po dokončení konjugace je vytvořena čtyřbičíkatá planozygota obsahující dvě stigmata (Peebles 1909, Droop 1956, Pocock 1959). Zygota se brzy přestane pohybovat, po 4-5 hodinách ztratí bičíky a vytvoří si buněčnou stěnu. Postupně nabývá na objemu, původní buněčná stěna jí začne být malá, takže ji opustí a vytvoří si novou. V této fázi vypadá jako klasická akineta, ze které jsou po několika dnech uvolňovány zoospory (Peebles 1909). Stále není jasné, jaká je ploidie jednotlivých stádií a kdy dochází k redukčnímu dělení.

Obr. č. 8: Schematické znázornění pohlavního rozmnožování *Haematococcus pluvialis*. A: gamety před uvolněním z mateřské buněčné stěny; B: uvolněná gameta; C: dvě gamety se nejprve setkají svými předními konci; D: počátek konjugace; E: čtyřbičíkatá planozygota; F: zygota po ztrátě bičíků; G: opuštění původní buněčné stěny; H: klidové stádium připomínající akinetu. (podle Peebles 1909)

Nízký počet pozorování pohlavního procesu by mohl být vysvětlen tím, že je *H. pluvialis* heterothalický a tudíž potřebuje k rozmnožování dva různé pohlavní typy, které nemusí být v laboratorních kmenech přítomny (Droop 1956, Triki et al. 1997). Tomuto závěru však odporuje fakt, že ve studii Chekanov et al. (2014) byla syngamie pozorována u kmene izolovaného z jedné buňky. Samotný proces vzniku gamet pravděpodobně na přítomnosti

různých pohlavních typů v kultuře závislý není, protože byl opakovaně indukován i u kmenů vzniklých z jedné buňky (Droop 1956, Triki et al. 1997).

Celá situace ohledně pohlavního rozmnožování a gametogeneze je ještě zkomplikována pozorováním Pococka (1959), který popisuje dva různé typy mikrozoidů. Jedná se o větší buňky dosahující velikosti 9 μm, u kterých nikdy nepozoroval pohlavní proces, a o menší gamety, jež nedosahovaly ani 5 μm a které musely před dalším vývojem projít konjugací. Proto vyslovil hypotézu, že jsou v životním cyklu *H. pluvialis* produkovány dva různé typy malých neobalených bičíkovců, což by vysvětlovalo rozpory v pozorováních předchozích autorů. Odlišné výsledky různých studií ale mohou být způsobeny i značnou vnitrodruhovou diverzitou.

1.3 Desikace jako důležitý faktor v životním cyklu *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis je možné nalézt po celém světě ve všech biogeografických regionech v mělkých efemérních tůňkách (Genitsaris et al. 2016), které mohou pravidelně na delší dobu vysychat. Společně s dalšími fotosyntetizujícími mikroorganismy, které obývají tyto biotopy, je tudíž poměrně často vystavován desikačnímu stresu, jehož vlivem dochází k přizpůsobování obsahu vody v buňkách relativní vlhkosti okolní atmosféry (Evans 1958). Aby mohla být pozorovaná životní strategie *H. pluvialis* úspěšná, musí se u tohoto organismu vyskytovat mechanismy, jak se s tímto intenzivním stresovým faktorem, který často způsobuje vysokou mortalitu buněk, vyrovnat.

Z těchto důvodů je pochopení mechanismů desikační tolerance jedním z klíčových bodů ve studiu životního cyklu *H. pluvialis*.

1.3.1 Desikační tolerance

Schopnost přežívat po nějakou dobu ve vysušeném stavu se nazývá desikační tolerance (Holzinger & Karsten 2013), může být definována jako schopnost přežít vysušení až na 10 % původního obsahu vody v buňkách, což zhruba odpovídá stavu za 50% vzdušné vlhkosti (Alpert 2006). Desikační tolerance umožnila řasám kolonizovat souš, zároveň se díky ní mohou organismy dostávat na nové habitaty pomocí větru (Genitsaris et al. 2011) nebo například na nohách či peří vodních ptáků (Figuerola et al. 2002).

Řasy mohou tolerovat vysychání buď ve vegetativním stavu (Lüttge & Büdel 2010) nebo prostřednictvím tvorby odolných stádií, například akinet, cyst a zygospor (Holzinger & Karsten 2013), přičemž obnova fyziologických funkci je v tomto případě limitována časem potřebným pro germinaci spor. Některé organismy omezují vliv desikačního stresu tvorbou hustých porostů (Karsten et al. 2014), nebo půdních krust (Gray et al. 2007).

Nedostatek vody působí na buňky podobně jako nízké teploty (Smirnoff 1993), alespoň pro některé organismy je ale vystavení mrazu méně stresující (Souffreau et al. 2010). Při mírných mrazech ani nemusí docházet ke zmrznutí buněčného obsahu (Elster et al. 2008). Oproti tomu může desikační tolerance zvyšovat odolnost vůči extrémním teplotám (Demura et al. 2014), přičemž postupné zvyšování teploty představuje méně intenzivní stres než její náhlá změna (Souffreau et al. 2010). Míra odolnosti organismů závisí i na tom, v jakém prostředí žijí, pokud se setkávají se suchem častěji, bývají odolnější (Herburger et al. 2016). Velký vliv na odolnost řas má i rychlost vysychání, jež je ovlivněná relativní vzdušnou vlhkostí (Pichrtová et al. 2014), a doba, po kterou desikační stres působí. Pokud jsou organismy suchu vystavené pouze krátce, není jeho negativní vliv tak velký (Lüttge & Büdel 2010, Pichrtová et al 2014).

Během působení desikačního stresu se u fotosyntetizujících organismů snižuje odolnost vůči negativním vlivům ozáření, i při relativně nižších světelných intenzitách již v buňkách dochází

k poškození fotosyntetického aparátu (Smirnoff 1993, Zhang et al. 2016). Pokud jsou řasy vysoušeny na světle, znamená to pro ně vyšší míru stresu než vysychání ve tmě (Gray et al. 2007). Vlivem sucha totiž může zvláště při desikaci na světle docházet k přerušení elektronového transportu a tím ke vzniku reaktivních forem kyslíku (= ROS), které mohou způsobovat oxidativní poškození buněčných struktur (Vicré et al. 2004). Oxidativní stres nejvíce postihuje fotosyntézu a dýchání (Farrant 2000), především fotosystém II, fixaci uhlíku enzymem RuBisCO a ATP syntázu (Allakhverdiev et al. 2008). Některé organismy tento problém řeší degradací chlorofylu a thylakoidních membrán, čímž omezí vznik kyslíkových radikálů, které vznikají v důsledku přenosu energie z excitovaných molekul chlorofylu na kyslík (Farrant 2000). Jinou možností je zvýšení produkce antioxidantů (Sherwin & Farrant 1998).

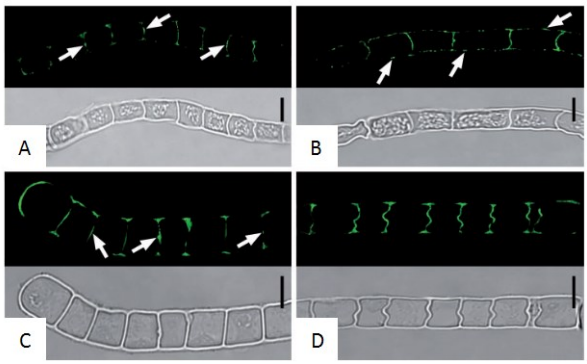
Vhodnou metodou pro měření míry desikační tolerance jednotlivých druhů řas je fluorimetrie, neboli měření fluorescence chlorofylu *a* (Karsten et al. 2014, Herburger et al. 2016, Pichrtová et al. 2014). Základní charakteristika této metody bude uvedena později.

1.3.2 Vliv složení buněčných obalů na míru desikační tolerance

Stavba a složení buněčných obalů má pro odolnost vůči působení desikačního stresu velký význam. Buněčná stěna může ovlivňovat zadržování vody v buňce nebo stabilitu či proměnlivost tvaru buněk.

U řas, které jsou častěji vystavovány vysychání, se často vyskytují buňky se silnou a rigidní buněčnou stěnou. Jedná se například o akinety rodu *Haematococcus* (Hagen et al. 2002), pre-akinety rodu *Zygnema* (Herburger et al. 2015) nebo starší buňky druhu *Zygogonium ericetorum* (Holzinger et al. 2010, Hoppert et al. 2004).

S odlišnou strategií se můžeme setkat u druhů *Klebsormidium crenulatum* a *K. nitens*, v jejichž vláknech dochází k regulovanému zprohýbání příčných stěn, což je umožněno specifickým zabudováváním polysacharidu kalózy do těchto míst (Herburger & Holzinger 2015; viz obr. č. 9). Tato flexibilita buněčné stěny je velmi důležitá i pro úspěšnou rehydrataci (Holzinger et al. 2011, Herburger & Holzinger 2015).



Obr. č. 9: Specifické zabudování kalózy do buněčných stěn *Klebsormidium nitens* (A, B) a *K. crenulatum* (C, D). A+C: vlákna před vysušením; C+D: vysušená vlákna. Měřítko odpovídá 5µm. (podle Herburger & Holzinger 2015)

Další významnou skupinou látek jsou algenany. Jedná se o několik blízce příbuzných rezistentních biomakromolekul podobných sporopoleninu, které jsou tvořené sítí převážně lineárních uhlíkových řetězců (Versteegh & Blokker 2004). Algenany se nachází například v buněčných stěnách klidových stádií rodů *Spirogyra, Dunaliella* a *Haematococcus* (Blokker 2000, Hagen et al. 2002), pravděpodobně zde mají důležitou protektivní úlohu proti působení desikačního stresu, zvýšené salinity i jako bariéra vůči mikrobiálnímu napadení.

1.3.3 Vliv látek obsažených v buňkách na míru desikační tolerance

Kromě buněčných stěn se na odolnosti vůči vysychání podílí řada dalších látek obsažených v buňkách nebo vylučovaných do extracelulárního prostoru.

Často se jedná o sekundární karotenoidy, které kromě zbarvení poskytují buňkám i ochranu před oxidačním stresem, jenž je s desikací úzce spojený. U zelených řas je podstatné jejich zapojení do xantofylového cyklu. Ten umožňuje disipaci nadměrné energie ve formě tepla (Smirnoff 1993, Fernández-Marín et al. 2011, Zhang et al. 2016). Sekundární karotenoidy ale mohou fungovat i jako antioxidanty, příkladem může být β-karoten nebo astaxanthin, jenž je akumulován v buňkách rodu *Haematococcus* (Naguib 2000). Syntéza astaxanthinu je úzce spojená s výskytem ROS (Kobayashi et al. 1993), nicméně i přes své velmi silné antioxidační účinky může v buňkách působit spíše jako barevný štít, který chrání jádro před účinky UV záření (Collins et al. 2011).

Podobnou funkci jako karotenoidy mohou mít především v buňkách vyšších rostlin antokyany, které mohou sloužit pro stínění chlorofylu před nadměrným ozářením nebo se díky svým antioxidačním vlastnostem mohou přímo uplatňovat jako ochrana před kyslíkovými radikály (Sherwin & Farrant 1998).

Jako ochranu proti stresu z vysychání využívá mnoho organismů osmolyty, látky rozpuštěné v cytoplasmě, které slouží k zachování buněčného objemu, stabilizují makromolekuly a brání poškození buněčných struktur (Yancey 2005). Mezi osmolyty patří polyoly jako sorbitol a ribitol často využívané například aeroterestrickými zástupci třídy Trebouxiophyceae, například rody *Prasiola, Elliptochloris* a *Watanabea* (Gustavs et al. 2011) nebo planktonním zástupcem *Botryococcus braunii* (Demura et al. 2014).

Další skupinu protektivních látek představují fenoly, které přispívají především k odolnosti buněk vůči působení UV, jehož negativní účinky mohou být během desikace výraznější (Aigner et al. 2013, Pichrtová et al. 2013).

Odolnost vůči desikaci může být posílena i zvýšeným obsahem lipidů v buňkách (Pocock 1959, Gu et al. 2013). Dále se na odolnosti řas mohou podílet extracelulární polysacharidy nebo cukry obsažené v cytoplasmě, například arabinóza, galaktóza nebo manóza (Demura et al. 2014).

1.3.4 Příklady dalších řas odolných vůči desikaci

Aeroterestrické řasy žijí z hlediska dostupnosti vody v extrémním prostředí, jejich buňky jsou desikaci vystavovány pravidelně (Holzinger & Karsten 2013), proto jsou u nich vyvinuty různé mechanismy, jak se s tímto stresem vypořádat. Zástupci třídy Trebouxiophyceae často obsahují organické osmolyty polyoly (Gustavs et al. 2011). Další běžnou strategií je rychlá redukce fotosyntézy, například reverzibilní snížení aktivity reakčních center fotosystému II u řasy *Trentepohlia jolithus* (Zhang et al. 2016). Zajímavé bylo srovnání odolnosti běžných zelených (většinou ze třídy Trebouxiophyceae) a oranžových (rod *Trentepohlia*) řas rostoucích na kůře stromů, přičemž zeleně zbarvené řasy byly obecně odolnější (Lüttge & Büdel 2010). Další možnou strategií je vytváření půdních krust typické například pro pouštní fotosyntetizující organismy (Gray et al. 2007). Buňky ve spodních částech těchto útvarů jsou chráněny před nadměrným ozářením a částečně i před výparem.

Zajímavým příkladem primárně vodních organismů může být *Botryococcus braunii*, který dokáže ve vyschlém stavu přežít až osm měsíců. Na jeho odolnosti se nejspíše podílejí polyoly, extracelulární polysacharidy a další uhlovodíky i cukry obsažené v buňkách (Demura et al. 2014).

Z hlediska desikační tolerance je velká pozornost věnována především streptofytním řasám, protože jejich schopnost odolávat desikačnímu stresu jim umožnila kolonizovat souš, staly se tak předchůdci cévnatých rostlin (Becker & Marin 2009).

U rodu *Klebsormidium* se můžeme setkat s několika strategiemi. Některé druhy, například *K. crenulatum*, mají silná vlákna s tlustou buněčnou stěnou (Karsten & Holzinger 2012). Zároveň může být výhodná i flexibilita buněčné stěny, která umožňuje reverzibilní změnu objemu buněk (Herburger & Holzinger 2015). Úplně jinou strategii využívá *K. dissectum*, pro přežití delších období sucha se jeho vlákna rozpadají na menší jednotky (Karsten and Holzinger 2012). Další možností je vytváření hustých porostů, těsná asociace s ostatními buňkami zde poskytuje lepší ochranu proti ztrátě vody i dalším environmentálním stresům. Tuto strategii často využívají i jiné organismy, například příbuzný rod *Interfilum* (Karsten et al. 2014).

Obr. č. 10: Hustý porost rodu *Zygnema* v Pyramiden na Svalbardu. (vlastní fotografie)

Zástupci rodu *Zygnema* vytváří kromě hustých porostů (viz obr. č. 10) i odolná stádia, tzv. pre-akinety. Jedná se o starší vlákna se silnou buněčnou stěnou, často obsahují velké množství zásobních látek, velká lipidová tělíska (Herburger et al. 2015) i fenolické látky fungující jako ochrana před UV zářením (Pichrtová et al. 2013). Tvorba těchto odolných vláken je nejspíše spuštěna nedostatkem živin (Pichrtová et al. 2014), s věkem vláken roste i jejich odolnost vůči desikaci (Herburger et al. 2015). Fenolické látky a silnou buněčnou stěnu využívá i příbuzné *Zygogonium ericetorum* (Holzinger et al. 2010, Hoppert et al. 2004, Aigner et al. 2013).

1.3.5 Fluorimetrie a její využití pro sledování vlivu stresových faktorů

Měření fluorescence chlorofylu *a* neboli fluorimetrie poskytuje rychlou, neinvazivní a velmi senzitivní metodu, díky níž je možné získat kvalitativní i kvantitativní informaci o stavu fotosyntetického aparátu, konkrétně fotosystému II, například v reakci na působení stresových faktorů (Govindjee 1995). Fluorimetrie může být použita pro sledování procesu zachycení energie fotonů světlosběrnými komplexy, dále pro pozorování toku elektronů přes soubor přenašečů v membráně thylakoidu, ale i pro výzkum fyziologických procesů na úrovni jedné rostliny nebo celého společenstva (Roháček & Barták 1999). Poměrně hojně bývá tato metoda využívána i v algologickém výzkumu pro sledování reakcí jednotlivých druhů na působení různých stresů, například stresu z vysychání (např. Karsten et al. 2014, Herburger et al. 2016, Pichrtová et al. 2014).

Dopadající světlo je nejprve absorbováno anténovými pigmenty světlosběrných komplexů, z nichž je excitační energie přenášena do reakčních center fotosystémů I a II, jež obsahují molekuly chlorofylu *a*. Více než 90 % této zachycené energie je využito na primární fotochemické reakce světelné fáze fotosyntézy (Krause & Weis 1991). Zbytek excitační energie může být spotřebován buď pomocí tepelné disipace přes epoxidaci a de-epoxidaci pigmentů xantofylového cyklu (Fernández-Marín et al. 2011), nebo může být emitován ve formě fluorescence chlorofylu. Toto rozdělení excitační energie mezi tři systémy umožňuje sledovat změny na úrovni efektivity fotochemických procesů nepřímo přes změny intenzity fluorescence – čím větší část excitační energie je vyzářena, tím méně jí je logicky využito ostatními procesy. Sledování právě změn intenzity fluorescence chlorofylu je vzhledem k jejich poměrně snadnému měření praktické, i když se tento systém za normálních podmínek na využití absorbované světelné energie podílí pouze ze 3 % (Krause & Weis 1991).

Za pokojové teploty pochází 90 % fluorescence z reakčních center fotosystému II (Govindjee 1995), což se odráží i v používané terminologii. Pro měření stavu fotosyntetického aparátu (a tím i míry působícího stresu) je možné použít maximální kvantový výtěžek, který může být získán po temnostní adaptaci vzorku s využitím vzorce $(F_m-F_0)/F_m$, přičemž F_0 zde představuje

minimální fluorescenci se všemi reakčními centry fotosystému II otevřenými, F_m naopak maximální fluorescenci se všemi reakčními centry uzavřenými (van Kooten & Snel 1990). Pro mnoho experimentů by však tento parametr vzhledem k nutnosti poměrně dlouhé temnostní adaptace vzorků nebyl příliš vhodný, v těchto případech bývá využíván efektivní kvantový výtěžek.

Efektivní kvantový výtěžek (Φ_{PSII}) je relativní parametr používaný pro sledování efektivity fotochemických procesů fotosystému II ve stavu, kdy jsou buňky adaptované na světlo (Roháček and Barták 1999). Je možné jej stanovit na základě vzorce $(F_M´-F)/F_M´$, přičemž F představuje stabilní fluorescenci v ustáleném stavu na světle a $F_M´$ maximální fluorescenci naměřenou po aplikaci saturačního pulsu na vzorek adaptovaný na světlo (Karsten et al. 2014, Pichrtová et al. 2014). Jinými slovy, efektivní kvantový výtěžek je tím větší, čím větší je rozdíl mezi klidovou a maximální fluorescencí. Z toho vyplývá, že čím je hodnota kvantového výtěžku vyšší, tím efektivnější jsou fotochemické procesy fotosyntézy, protože je excitační energie v klidovém stavu využívána na fluorescenci pouze v malé míře. V praxi se proto hodnota efektivního kvantového výtěžku může používat pro sledování změn rychlosti fotosyntézy. Vlivem působení stresových faktorů hodnota efektivního kvantového výtěžku obecně klesá, při následné aplikaci příznivých podmínek se naopak opět zvyšuje (Karsten et al. 2014, Pichrtová et al. 2014).

1.4 Cíle práce

Navzdory značné pozornosti, která je druhu *Haematococcus pluvialis* věnována díky jeho využívání v biotechnologické produkci, stále nejsou vyřešeny některé otázky týkající se životního cyklu této řasy. Například není jasné, jestli je počet dělení zoospor geneticky omezen, což by mohlo mít zásadní vliv na snahy o optimalizaci kultivace. Největší nejasnosti se ale týkají pohlavního roznožování, informací o jeho průběhu není mnoho, v některých bodech se pozorování liší a například ploidie jednotlivých životních stádií není známa vůbec. Další poměrně neprobádanou oblast představuje odolnost akinet vůči desikačnímu stresu, jež by mohla být zásadní pro přežití *H. pluvialis* v mělkých efemérních tůňkách i pro celosvětové rozšíření tohoto organismu.

Konkrétně se práce zabývá těmito otázkami:

1. Je vegetativní dělení zoospor geneticky omezeno na pět buněčných cyklů (jak bylo publikováno v práci Lee & Ding 1994), nebo byl pozorovaný jev způsoben pouze konkrétními kultivačními podmínkami?
2. Jaké podmínky indukují pohlavní rozmnožování *H. pluvialis* a jaký je jeho průběh?
3. Jaká je míra desikační tolerance akinet *H. pluvialis*?
    a. Je desikační tolerance zajištěna pouze přítomností silné buněčné stěny obsahující algenan, nebo se na ní podílí i zvýšený obsah astaxanthinu v buňkách?
    b. Jak je desikační tolerance ovlivněna rychlostí vysychání, délkou doby vyschnutí a působením extrémních teplot?
    c. Může vysušení akinet fungovat jako mechanismus pro přežití extrémních teplot?

2 Materiál a metody

2.1 Původ kmenů a kultivace

Pro experimenty byly použity následující kmeny *Haematococcus pluvialis*:

- kmen CCALA 357: Culture Collection of Autotrophic Organisms CCALA, Třeboň (izolován v Březové nad Svitavou, 1958)
- Knovíz: 50.2122022N, 14.1380489E (izolován 27. 4. 2016 ze střechy domu)
- Machov: 50.4960350N, 16.2507533E (izolován 18. 7. 2016 z napajedla pro daňky)

Většina experimentů byla prováděna s kmenem CCALA 357, nově izolované kmeny z Knovíze a Machova byly použity pouze pro pokusy o indukci gametogeneze.

Ve všech případech bylo použito kultivační médium BG11, jehož složení je uvedeno v tab. č. 1.

Kmen CCALA 357 byl mezi experimenty kultivován při kontinuálním ozáření 25 µmol m^{-2} s^{-1} v teplotě 22 °C v Erlenmayerově baňce o objemu 500 ml, kultura byla zároveň probublávána vzduchem, což zajišťovalo její promíchání i větší obsah rozpuštěného CO_2 v médiu.

Z přírodních vzorků z Knovíze a Machova byla vždy sterilní skleněnou kapilárou odchycena jedna akineta, jež byla postupně přenášena mezi třemi kapkami sterilního média, aby došlo k jejímu očištění. Následně byla tato akineta přenesena do média BG11 na kultivační destičku (48 jamek, Greiner Bio-One). Po několika dnech byla výsledná kultura přeočkována do Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml. Vzorky byly kultivovány při kontinuálním ozáření 40 µmol m^{-2} s^{-1} v teplotě 22 °C.

Staré kultury byly uchovávány v teplotě 15 °C při kontinuálním ozáření, pro zisk červených akinet bylo použito ozáření 95 µmol m^{-2} s^{-1}, pro uchování zelených akinet s nízkým obsahem astaxanthinu bylo použito ozáření pouze 2 µmol m^{-2} s^{-1}.

Složení BG11	koncentrace [g/l]
$CaCl_2$	0,027
Citrát železito-amonný	0,006
K_2HPO_4	0,03
Kyselina citronová	0,006
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,075
Na_2-EDTA	0,001
$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$	0,054
$NaNO_3$	1,5
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$2,5 \cdot 10^{-6}$
H_3BO_3	$6,1 \cdot 10^{-5}$
$MnSO_4 \cdot H_2O$	$1,69 \cdot 10^{-4}$
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} . 4H_2O$	$1,25 \cdot 10^{-5}$
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$2,87 \cdot 10^{-4}$
B_{12}	$3,69 \cdot 10^{-10}$
Biotin	$2,05 \cdot 10^{-9}$
Thiamin	$5,93 \cdot 10^{-7}$

Tab. č. 1: Složení média BG11. (podle Kuhl & Lorenzen 1964, Rippka & Herdman 1992, upraveno)

2.2 Zjištění fylogenetického postavení jednotlivých kmenů

2.2.1 Izolace DNA, PCR a sekvenování

Pro izolaci DNA byly vzorky kultur odebrány do 2ml mikrozkumavek (Eppendorf). Vzorky byly zcentrifugovány a supernatant tvořený médiem byl posléze odebrán pipetou. Do každé zkumavky bylo k buňkám přidáno 100 µl kitu InstaGene matrix (BioRad) a několik malých skleněných kuliček. Takto upravené vzorky byly poté na 5 minut umístěny do oscilačního mlýnku Retsch MM400 s frekvencí 30 Hz. Po rozdrcení buněk byly zkumavky umístěny do termobloku (Eppendorf Thermomixer® Comfort), kde byly vzorky inkubovány 30 minut při 56 °C a s frekvencí míchání 700 rpm. Následně byly zkumavky vortexovány přibližně 10 sekund a poté opět inkubovány v termobloku, tentokrát 8 minut v teplotě 99 °C. Vzorky byly poté opět vortexovány. Po půlminutovém vychlazení na ledu byly vzorky centrifugovány (Centrifuge 5415D, Eppendorf) 2 minuty při 12000 rpm. Nakonec byly vzorky pro kontrolu koncentrace vyizolované DNA změřeny na nanodropu (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Před dalším zpracováním byly vzorky uchovávány v lednici.

Pro odlišení jednotlivých druhů spadajících do komplexu *Haematococcus pluvialis* byl zvolen molekulární marker ITS (Allewaert et al. 2015). Pro amplifikaci tohoto úseku byly vybrány univerzální primery ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) a ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al. 1990) a polymeráza AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied biosystems). Reakční směs (Master Mix), jejíž složení je uvedeno v tabulce č. 2, byla nejprve smíchána ve větším objemu vztaženém na počet vzorků a poté rozpipetována do mikrozkumavek. Jako poslední byl k 19 µl reakční směsi přidán 1 µl vyizolované DNA (celkový objem každého vzorku byl tudíž 20 µl). Vzorky byly následně krátce vortexovány a umístěny do cycleru (Mastercycler® pro, Eppendorf), ve kterém probíhala PCR podle protokolu uvedeném v tabulce č. 3.

Gold Master Mix	
složka	**objem**
ddH_2O	13 µl
pufr Gold	2 µl
dNTP	0,4 µl
$MgCl_2$	2,2 µl
Gold enhancer	0,6 µl
primer ITS1	0,3 µl
primer ITS4	0,3 µl
Gold polymeráza	0,2 µl
vzorek DNA	1 µl

Tab. č.2: Složení reakční směsi pro PCR.

PCR protokol		
teplota	**čas**	**opakování**
95 °C	5 min	1x
95 °C	1 min	35x
54 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1x

Tab. č. 3: PCR protokol pro amplifikaci úseku ITS s využitím primerů ITS1 + ITS4 (Bačkor et al. 2010)

Správná délka, množství a čistota PCR produktů byly poté zkontrolovány pomocí elektroforézy (Scie-plas: HU6, SHU6, HU13, V20-CDC se zdrojem napětí Consort E132) na 1% agarózovém gelu nabarveném ethidium bromidem. Výsledky elektroforézy byly vizualizovány v Gel Logic 100 (UV filter, SYBR Green filter a UVlight transilluminator; Heterolab UVT-20M), délka PCR produktů byla porovnána se standardem O'Gene 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific).

Vzorky byly poté přečištěny s pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) podle pokynů výrobce. Následně byly vzorky pro kontrolu koncentrace amplifikované DNA změřeny na nanodropu (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Sekvenace byla provedena firmou Macrogen Inc.

2.2.2 Fylogenetické analýzy

Alignment ITS sekvencí pro fylogenetické analýzy byl vytvořen v programu SeqAssem (Hepperle 2004) přidáním sekvencí získaných z kmenů CCALA 357, Machov a Knovíz k již vytvořenému alignmentu, který byl použit ve studii Allewaert et al. (2015). Přidání sekvencí do alignmentu bylo provedeno v programu MEGA5 (Tamura et al. 2011). Ze vzniklého alignmentu byly poté před dalším zpracováním odstraněny identické sekvence.

Na základě tohoto alignmentu byl poté vytvořen fylogenetický strom s využitím Bayesiánské interference v programu MrBayes 3.2 (Ronquist et al. 2011). Byly použity dvě nezávislé analýzy Monte Carlo Markovových řetězců (MCMC), každý se třemi horkými a jedním studeným řetězcem. Obě tyto analýzy běžely po 3 000 000 generací, fylogenetické stromy byly zaznamenávány vždy jednou za 100 generací. Pro analýzu byl využit model GTR+G. Po ukončení analýzy byla odstraněna spodní čtvrtina ze vzniklých stromů, jež byla vytvořena ještě před dosažením rovnováhy. Ze zbylých fylogenetických stromů byl nakonec vytvořen konsenzuální fylogenetický strom.

2.3 Zjišťování počtu dělení zoospor

Pro zjištění počtu dělení zoospor byly využity ty zoospory, které se ještě neuvolnily z mateřské buněčné stěny po dělení akinety. Tímto způsobem je zajištěno, že se zoospory nestačí rozdělit ještě před zahájením experimentu. Vhodné dělící se buňky byly získány přenesením starých akinet do čerstvého média. Po 15 hodinách byly poté po jedné přemístěny do jamek v kultivačních destičkách (96 jamek, Greiner Bio-One), zároveň byl zaznamenán počet dceřiných zoospor. Buňky byly následně kultivovány deset dní při kontinuálním ozáření 30 μmol m^{-2} s^{-1} a teplotě 25 °C. Každý den kultivace byla část buněk ráno fixována přidáním malé kapky Lugolova roztoku, čímž bylo získáno sedm různě starých kultur. Pro každý den byla provedena tři opakování. Nafixované buňky byly na závěr přímo v destičkách spočítány na invertovaném mikroskopu (Nikon Diaphot). Průměrný počet dělení každé zoospory byl stanoven s využitím následujícího vzorce:

$$počet\ dělení = \log_2(konečný\ počet\ zoospor / původní\ počet\ zoospor)$$

2.4 Synchronizace kultury střídáním světla a tmy

Pro synchronizaci buněčného dělení byla kultura kultivována při ozáření 25 μmol m^{-2} s^{-1} a teplotě 22 °C v médiu BG11 v Erlenmayerově baňce o objemu 500 ml, kultura byla zároveň probublávána vzduchem, což zajišťovalo její promíchání i větší koncentraci rozpuštěného CO_2 ve vodě. Cyklus střídání světla a tmy byl nastaven na 16:8 hodin. Vzorky k analýze byly z kultury odebírány sterilními injekčními stříkačkami (Injekt® Luer Solo, Braun) po dobu 14 dní vždy hodinu po začátku světelné fáze a hodinu před jejím ukončením. Odebrané vzorky byly zafixovány přidáním paraformaldehydu do konečné koncentrace v médiu 0,5 %. Tento způsob fixace nemění buněčnou morfologii a jen nepatrně pozměňuje autofluorescenční vlastnosti (Hyka et al. 2013).

Každý vzorek byl nejprve prozkoumán pod mikroskopem (Olympus CX22LED). Na základě prohlédnutí 100 buněk bylo spočítáno procentuální zastoupení jednotlivých životních stádií ve vzorcích. Stádia byla rozdělena do pěti kategorií: zoospory s dvěma zřetelnými bičíky(1), dělící se zoospory uzavřené ve společné glykoproteinové matrix (2), palmely - buňky se zakulaceným protoplastem bez pozorovatelných bičíků a proteinového obalu a zároveň bez silné buněčné stěny (3), akinety se silnou buněčnou stěnou, většinou červeně zbarvené (4) a neidentifikovatelné buňky (5) – ty byly buď rozpadlé nebo deformované (což mohlo být způsobeno i manipulací se vzorkem, po fixaci již nebylo možné určit, jestli se jednalo o živé buňky či nikoli), nebo je nebylo na základě morfologie možné přesně zařadit do žádné z předchozích skupin (typicky buňky se vzhledem zoospor, u kterých nebyly patrné bičíky).

Před analýzou průtokovou cytometrií byly vzorky uchovávány ve 2ml mikrozkumavkách (Eppendorf) ve tmě v teplotě 28 °C.

Cytometrická měření byla provedena na průtokovém cytometru Cytoflex S (Beckman Coulter) vybaveném 4 lasery (405nm, 488nm, 561nm a 638nm), 13 fluorescenčními detektory a dvěma detektory pro rozptyl světla (přední FSC odpovídající velikosti buněk a boční SSC odpovídající granularitě buněk). Fluorescence chlorofylu byla detekována při excitaci modrým 488nm laserem s použitím bandpass filtru 690/50.

2.5 Indukce gametogeneze

Pro pokusy o indukci gametogeneze byly využity všechny tři kmeny *Haematococcus*, všechny experimenty byly nejprve provedeny s kmenem CCALA 357, vybraným podmínkám byly posléze vystaveny i nové kmeny z Knovíze a Machova. Pro potřeby většiny pokusů byly kmeny kultivovány v teplotě 22 °C při ozáření 45 μmol m^{-2} s^{-1} s nastaveným cyklem střídání světla a tmy 14:10 hod. Většině indukčních podmínek byly buňky vystaveny večer těsně před koncem světelné fáze. Pro usnadnění mikroskopických pozorování byla část kultury vždy přenesena do jamek v kultivačních destičkách (Greiner Bio-One), všechny experimenty byly provedeny ve třech až šesti opakováních. Mikroskopická pozorování byla zahájena následující den po aplikaci induktivních podmínek ráno těsně po začátku světelné fáze. Vzorky byly poté v destičkách prohlíženy nejméně tři hodiny v invertovaném mikroskopu (Leica DMi1).

V části pokusů se pracovalo s mladými akinetami, které byly získány pomalým vysycháním kultur tvořených zpočátku převážně zoosporami. Na stěně nádoby se postupně vytvořil naoranžovělý povlak tvořený právě nově vzniklými akinetami. Z tohoto povlaku byla část večer přenesena do čerstvého média nebo destilované vody (Droop 1956, Hazen 1899), v jednom případě byly induktivní podmínky aplikovány až ráno, po předchozím omytí povlaku destilovanou vodou (Pocock 1959). Ke zbytku kultury bylo přidáno čerstvé médium, následně byla kultura opět vystavena pomalému vyschnutí a celý pokus byl zopakován (Peebles 1909).

Další série pokusů byla provedena se středně starými červenými akinetami, které byly získány velmi pomalým vysycháním starších kultur – vytvořil se z nich povlak na stěně nádob, ale zatím nedošlo k jejich úplnému vysušení. Tyto akinety byly na noc přeneseny do čerstvého média nebo převařené kohoutkové vody (Elliott 1934).

Pro všechny ostatní pokusy byly použity staré červené nebo zelené akinety, které byly vytvořeny ve starých kulturách vystavených hladovění. U části kultur byl nedostatek živin ještě zvýrazněn výměnou starého média za převařenou kohoutkovou nebo destilovanou vodu. Induktivní podmínky potom představovalo buď přenesení akinet do čerstvého média večer před pozorováním (Triki et al. 1997), nebo přenesení do čerstvého média či destilované vody, do nichž byla přidána glukóza (v koncentraci 5 g/l), která může sloužit jako vhodný zdroj organického uhlíku (Zhang et al. 2011).

Pro některé pokusy byly akinety kromě hladovění vystaveny i velmi rychlému nebo pomalému vysušení. Po několika dnech ve vyschlém stavu byly tyto akinety večer zality čerstvým médiem nebo destilovanou vodou (Hazen 1899, Droop 1956, Pocock 1959). V jednom případě byly akinety po rychlém vysušení vystaveny i mrazu umístěním na jednu hodinu do -18 °C.

Další pokusy spočívaly v opakovaném vystavení chladu za oknem (Hazen 1899), případně v opakovaném mrznutí (v -18 °C) a tání kultur. Induktivní podmínky spočívaly kromě přenesení kultur do tepla i v přidání čerstvého média nebo destilované vody.

Kompletní přehled všech pokusů a kombinací podmínek je společně s výsledky mikroskopických pozorování uveden v tabulce č. 6.

2.6 Transmisní elektronová mikroskopie

Vzorky starých zelených a červených akinet byly pro transmisní elektronovou mikroskopii připraveny modifikovaným postupem podle Wayama et al. (2013). Vzorky byly nejprve fixovány přidáním glutaraldehydu do konečné 2% koncentrace v médiu 8 hodin při teplotě 4 °C. Poté byly třikrát promyty 0,05 M kakodylátovým pufrem a fixovány přes noc roztokem 1% OsO_4 v kakodylátovém pufru. Následně byly vzorky třikrát promyty 0,05 M kakodylátovým pufrem (pH 7,8), jednou promyty 0,025 M kakodylátovým pufrem (pH 7,8) a nakonec třikrát promyty destilovanou vodou. Zcentrifugované buňky byly smíchány s 1,7% roztokem agarózy o teplotě 39 °C a kápnuty na předchlazené podložní sklo. Po ztuhnutí byl bloček agarózy obsahující buňky nakrájen na menší kousky (o straně 1 mm). Vzorky byly poté odvodněny vzestupnou ethanolovou sérií. Nejprve byly několik dní umístěny v 50% ethanolu a poté vždy na 30 minut v 70%, 90%, 95% a 100% ethanolu (100% ethanol byl dvakrát vyměněn). Následně byly vzorky inkubovány vždy 30 minut ve směsích 100% ethanolu a 100% butanolu v poměru 3:1, 100% ethanolu a 100% butanolu v poměru 1:1 a 100% ethanolu a 100% butanolu v poměru 1:3. Nakonec byly vzorky inkubovány 30 minut ve 100% butanolu. Po dehydrataci byly vzorky převáděny do pryskyřice sycením vzestupnými koncentracemi 5%, 10%, 25%, 50% a 90% Spurr média (Spurr 1969) v butanolu a nakonec 100% Spurr médiem, 100% Spurr byl poté dvakrát vyměněn za Spurr obsahující 2% dimethylaminoethanol (DMAE), jenž způsobuje ztvrdnutí pryskyřice. Postupné sycení Spurr médiem probíhalo po dobu tří dnů.

Ultratenké řezy silné 60-70 nm byly získány řezáním diamantovým nožem na mikrotomu Ultracut E. Řezy na měděné síťce pokryté formvarovou blankou byly kontrastovány roztokem citronanu olovnatého.

Vzorky byly pozorovány na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Veleta a s akvizičním softwarem Olympus Soft Imaging Solution GmbH.

2.7 Desikační pokusy

2.7.1 Vystavení kultur různým rychlostem vysychání

Pro stanovení míry odolnosti vůči vysychání u červených a zelených akinet byly použity několik měsíců staré kultury, u kterých byly sledovány změny fyziologického stavu fotosyntetického aparátu během tří různých rychlostí vysychání a během následné rehydratace. Různých rychlostí vysychání bylo dosaženo při různých relativních vlhkostech vzduchu nad nasycenými roztoky solí KCl (86% rh) a K_2CO_3 (43% rh) (Greenspan 1977) a nad částečně vysušeným silikagelem (Silica Gel Orange, Carl Roth) (10% rh, Pichrtová et al. 2014).

Z obou kultur bylo naneseno 25 µl na filtry ze skleněných vláken (Whatman GF/C). Ke vzorkům bylo poté přidáno 25 µl ředěného média BG11:destilovaná voda v poměru 1:9, aby byl minimalizován vliv stresu ze zasolení. Všechny experimenty byly provedeny ve čtyřech opakováních.

Filtry s nanesenými vzorky byly vloženy do polystyrenové krabičky s průhledným víkem na mřížku, která byla umístěna nad roztok soli nebo nad čerstvě vysušený silikagel (Karsten et al. 2014).

Po 24 hodinách od vyschnutí byly filtry se vzorky přeneseny do jamek v kultivační destičce (48 jamek, Greiner Bio-One) a zality 1 ml čerstvého kultivačního média BG11.

Mezi měřeními byly vzorky uchovávány v teplotě 22 °C při kontinuálním ozáření okolo 45 µmol m^{-2} s^{-1}.

Změny fyziologického stavu vzorků v průběhu vysychání byly měřeny pomocí změn efektivního kvantového výtěžku fotosystému II (Φ_{PSII}) s využitím neinvazivní PAM (pulse amplitude modulation) fluorimetrie (FluorCam, Photon System Instruments). Efektivní kvantový výtěžek byl stanoven podle vzorce (F_M´-F)/F_M´, přičemž F představuje stabilní fluorescenci v ustáleném stavu na světle a F_M´ maximální fluorescenci naměřenou po aplikaci saturačního pulsu na vzorek adaptovaný na světlo (Karsten et al. 2014, Pichrtová et al. 2014).

Klidová fluorescence F byla měřena při ozáření vzorků aktinickým světlem royal blue (vlnová délka 447 nm) s intenzitou 39 µmol m^{-2} s^{-1}, pro měření F_M´ byl použit saturační záblesk světlem cool white (teplota 6500 K) s intenzitou 1199 µmol m^{-2} s^{-1}. Měřící sonda byla od vzorku vzdálena 11 cm, měření probíhalo přes průhledné víčko polystyrenové krabičky. První měření proběhlo hned po umístění filtrů do krabičky, následná měření byla prováděna vždy po 30 minutách pro vzorky vysychající při 86% rh, každých 20 minut pro vysychání při 43% rh a každých 10 minut pro 10% rh. Měření bylo ukončeno, jakmile hodnota efektivního kvantového výtěžku klesla pod 0,1.

Pro sledování změn po rehydrataci byl efektivní kvantový výtěžek měřen ihned po zalití vzorků čerstvým médiem a poté vždy po 1, 6, 12, 24, 48 a 72 hodinách. Vzorky byly zároveň pravidelně

prohlíženy pod stereomikroskopem (Olympus SZ61) pro ověření životaschopnosti buněk, jež byla potvrzena uvolněním zoospor z akinet.

2.7.2 Pokusy s červenými akinetami kombinující vysychání s dalšími faktory

Pro zjištění odolnosti starých červených akinet vůči desikaci kombinované s dalšími faktory, jako jsou prodloužená doba vyschnutí a extrémní teploty, byly provedeny dvě série pokusů, ve kterých byly sledovány pouze změny fyziologického stavu (měřené přes změny efektivního kvantového výtěžku fotosystému II) a obnova buněčné aktivity (představovaná uvolněním zoospor z akinet) následující po rehydrataci vzorků. Měření fluorescence i optická pozorování probíhala podobně jako v experimentu s různými rychlostmi vysychání, pouze s tím rozdílem, že sonda pro měření fluorescence byla tentokrát od vzorků vzdálena 16 cm.

Pro minimalizaci stresu ze zasolení bylo staré médium nahrazeno médiem BG11 naředěným destilovanou vodou v poměru 1:9. Z takto upravené kultury bylo vždy odebráno 100 µl do jamky v kultivační destičce (96 jamek, Greiner Bio-One) ve čtyřech opakováních. U takto připravených vzorků byla nejprve pro kontrolu změřena hodnota efektivního kvantového výtěžku, aby bylo zajištěno, že byl počáteční fyziologický stav všech vzorků stejný. Všechny vzorky byly poté vystaveny vysychání v 30-50% rh, v teplotě okolo 25 °C a při kontinuální ozářenosti 30 µmol m^{-2} s^{-1}. Rehydratace vzorků byla následně provedena přidáním 300 µl čerstvého média BG11.

Mezi měřeními byly vzorky uchovávány v teplotě 22 °C při kontinuálním ozáření okolo 45 µmol m^{-2} s^{-1}.

V první sérii pokusů bylo sledováno, jak bude odolnost buněk ovlivněna při aplikaci různých kombinací délky vyschnutí, konkrétně 1, 2 a 4 týdnů, a teplot -1 °C, 25 °C a 40 °C. Teplotám -1 °C a 40 °C byly vzorky vystaveny až po vyschnutí, a to po dobu jedné hodiny. Vzorky po vyschnutí ponechané ve 25 °C sloužily jako kontrola pro zjištění samotného vlivu rozdílné doby, po kterou byly buňky ponechány ve vyschlém stavu. Všechny kombinace podmínek jsou shrnuty v tabulce č. 4.

	1 týden	2 týdny	4 týdny
25 °C	1K	2K	3K
40 °C	1T	2T	3T
-1 °C	1Z	2Z	3Z

Tab. č. 4: Kombinace různých teplot a doby vyschnutí. *K:* kontrola; *T:* vzorky vystavené teplotě 40 °C; *Z:* vzorky vystavené teplotě -1 °C.

Druhá série pokusů byla zaměřena na odolnost buněk vůči desikaci, která byla kombinovaná s následujícími extrémními podmínkami (doba vyschnutí byla jeden týden, pokud není stanoveno jinak):

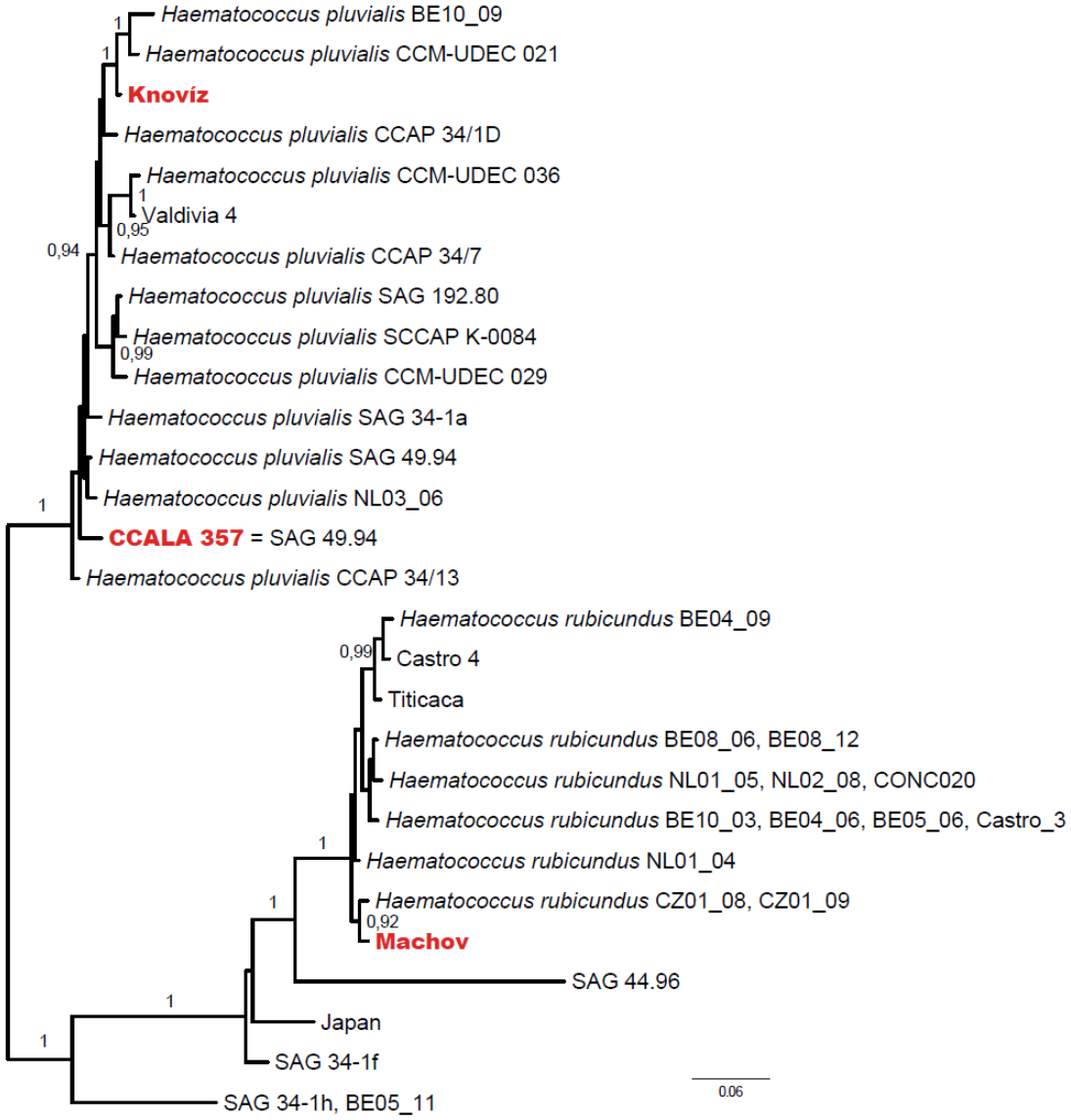
- kontrola: 25 °C
- T1: hodina 45 °C
- T2: hodina 45 °C, hodina 50 °C
- T3: hodina 45 °C, hodina 50 °C, hodina 55 °C
- Z1: 3 hodiny v -1 °C
- Z2: hodina v -1 °C, hodina v -18 °C
- Z3: hodina v -1 °C, hodina v -18 °C, hodina v -80 °C
- 2 měsíce vyschnutí
- 3 měsíce vyschnutí

Společně s těmito vzorky byly změřeny i dva, u kterých byly extrémní podmínky v podobě teplot -18 °C a 50 °C (vždy na jednu hodinu) aplikovány v nevyschlém stavu kultury, aby bylo možné stanovit, jestli je odolnost vůči extrémním teplotám ovlivněna vyschnutím či nikoli. Před fluorimetrickým měřením bylo u těchto vzorků staré médium nahrazeno čerstvým.

3 Výsledky

3.1 Fylogenetické postavení jednotlivých kmenů

Z výsledků fylogenetických analýz (viz obr. č. 11) vyplývá, že kmen CCALA 357 používaný ve všech pokusech skutečně patří do druhu *Haematococcus pluvialis*, společně s nově izolovaným kmenem z Knovíze. Kmen z Machova oproti tomu patří do druhu *Haematococcus rubicundus*.



Obr. č. 11: Fylogenetický strom zobrazující vzájemnou příbuznost sekvencí získaných z kmenů CCALA 357, Knovíz a Machov a sekvencí použitých ve studii Allewaert et al. (2015). Strom byl vytvořen s využitím Bayesiánské interference.

3.2 Dělení zoospor

3.2.1 Počet dělení zoospor

Z výsledků počítání buněk v různě starých kulturách je patrné, že se některé zoospory musely rozdělit minimálně osmkrát. V kulturách starých 8-10 dní již nebylo možné konečný počet zoospor kvůli vysoké hustotě kultury přesně stanovit, nicméně bylo zjevné, že k dělení zoospor docházelo i v dalších dnech kultivace.

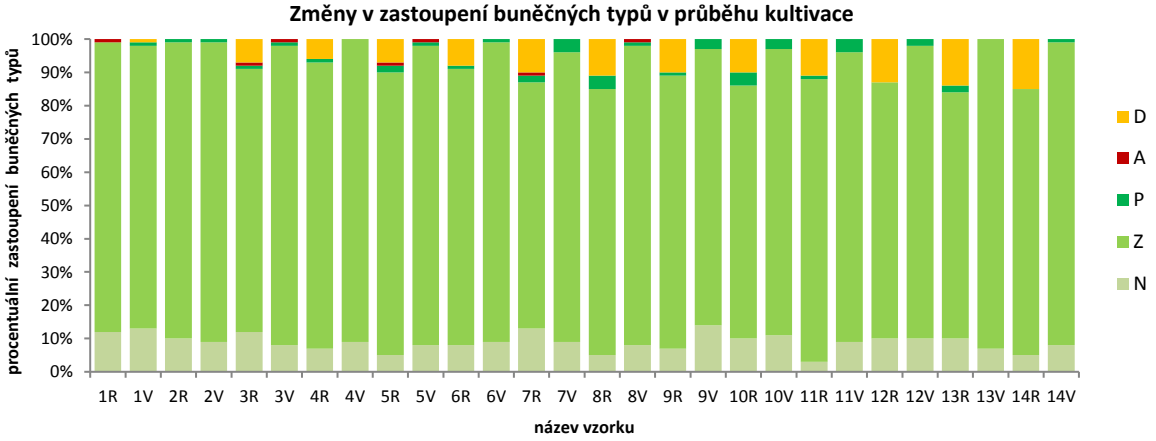
Z mikroskopických pozorování navíc bylo zřejmé, že se v kulturách nacházely pouze zoospory. Počty zoospor ve vzorcích pro 1.-7. den kultivace jsou uvedeny v tabulce č. 5.

den	původní počet zoospor	konečný počet zoospor	počet dělení
1	8	8	0,00
	16	16	0,00
	12	12	0,00
2	16	79	2,30
	8	53	2,73
	4	24	2,58
3	16	103	2,69
	4	33	3,04
	2	16	3,00
4	4	32	3,00
	10	169	4,08
	4	14	1,81
5	4	65	4,02
	4	195	**5,61**
	4	147	**5,20**
6	16	405	4,66
	8	218	4,77
	4	224	**5,81**
7	4	673	**7,39**
	4	523	**7,03**
	8	1139	**7,15**

Tab. č. 5: Výsledky počítání zoospor v kultivačních destičkách. (*původní počet zoospor:* počet zoospor před uvolněním z mateřské buněčné stěny; *konečný počet zoospor:* počet zoospor po fixaci kultury; *počet dělení:* průměrný počet dělení jedné zoospory)

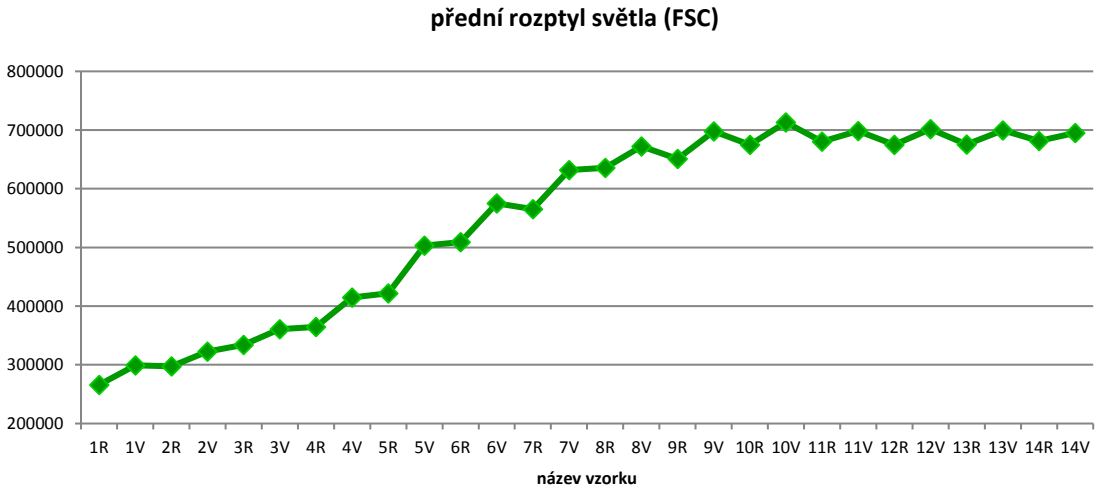
3.2.2 Synchronizace dělení zoospor střídáním světla a tmy

Z výsledků počítání zastoupení buněčných typů v průběhu kultivace je zřejmé, že synchronizace kultury *Haematococcus pluvialis* střídáním světla a tmy (cyklus světlo:tma 16:8) proběhla úspěšně. Již od třetího dne kultivace bylo dělení buněk pozorováno pouze ve vzorcích odebraných z kultury hodinu po zahájení světelné fáze, v dalších dnech kultivace se navíc v ranních vzorcích procentuální zastoupení dělících se buněk postupně zvyšovalo (viz obr. č. 12). Naprostou většinu buněk představovaly ve všech vzorcích zoospory, akinety byly pozorovány pouze ojediněle, pravděpodobně se jednalo o pozůstatky z inokula.



Obr. č. 12: Změny v procentuálním zastoupení buněčných typů v průběhu kultivace. *D:* dělící se buňky; *A:* akinety; *P:* palmely; *Z:* zoospory; *N:* buňky, které nebylo možné spolehlivě určit. Na ose x jsou postupně vyneseny všechny odebrané vzorky, číslo představuje den odběru vzorku, R: ranní vzorky, V: večerní vzorky.

Synchronizovanost buněk v kultuře byla potvrzena i výsledky z průtokové cytometrie, jejíž pomocí byla měřena velikost částic a fluorescence chlorofylu. U buněk z ranních vzorků byly naměřeny nižší hodnoty předního rozptylu světla (forward scatter, FSC)(viz obr. č. 13), což poukazuje na jejich relativně menší velikost oproti buňkám z večerních vzorků. Kromě nižších hodnot světelného rozptylu byla u ranních vzorků především ve druhé fázi kultivace naměřena i nižší fluorescence chlorofylu. Synchronizovanost kultury potvrzují i naměřené změny hustoty kultury (počet buněk/ml) mezi jednotlivými ranními a večerními vzorky.



Obr. č. 13: Mediány z naměřených hodnot předního rozptylu světla (forward scatter, FSC) pro jednotlivé vzorky. Z těchto hodnot je možné vyvodit relativní změny ve velikosti buněk. Na ose x jsou postupně vyneseny všechny odebrané vzorky, číslo představuje den odběru vzorku, R: ranní vzorky, V: večerní vzorky.

3.3 Indukce gametogeneze, dělení akinet, uvolňování zoospor a palmel

Navzdory využití různých kmenů a opakovanému vyzkoušení mnoha různých dříve úspěšných postupů a jejich modifikací se ani v jednom případě nepodařilo gametogenezi indukovat.

Proto jsou zde uvedeny alespoň ostatní výsledky vyzkoušených postupů, které ukazují rozdílné působení jednotlivých podmínek na nepohlavní část životního cyklu *Haematococcus pluvialis*, konkrétně na ochotu akinet k dělení a následnému uvolňování zoospor či palmel. Podrobný popis všech pokusů i s jejich výsledky je vyobrazen v tabulce č. 6 (uvedené výsledky popisují stav po třech hodinách od začátku působení světla).

Z většiny pokusů vyplývá, že je vhodné užití cyklu střídání světla a tmy, přičemž indukčním podmínkám jsou buňky vystaveny v noci, světlo poté zahájí proces dělení. Navíc se zdá, že je k zahájení dělení akinet třeba, aby byly ve vhodných podmínkách delší dobu, pokud jsou do těchto podmínek přeneseny až ráno, samotné světlo k rychlému spuštění buněčného dělení nestačí.

Pokud jde o výsledky pokusů, ve kterých byly akinety dlouhodobě vystaveny nedostatku živin a následně přeneseny do čerstvého média (pokusy 1 a 2), zdá se, že hladovění umocněné kultivací akinet v kohoutkové nebo destilované vodě nemá na jejich dělení žádný podstatný vliv.

Vystavení akinet vysychání a jejich následné zalití čerstvým médiem či destilovanou vodou (pokusy 3-7) indukuje buněčné dělení alespoň u kmene CCALA 357 (*H. pluvialis*) velmi dobře. Pomalé vysychání působí lépe než rychlé, buňky se při něm začínají dělit dříve. Vůbec největší míra buněčného dělení a uvolňování zoospor byla pozorována u mladých akinet vystavených vysychání opakovaně po jejich zalití médiem (pokus 3.III) a u starých červených akinet vystavených pomalému vysušení, které byly následně zality destilovanou vodou (pokus 7).

V případě, kdy byly pomalému vysychání zoospory vystaveny velmi krátce (pokus 3.II), bylo kromě dělení akinet pozorováno i velké množství dělících se zoospor (viz obr. č. 14).

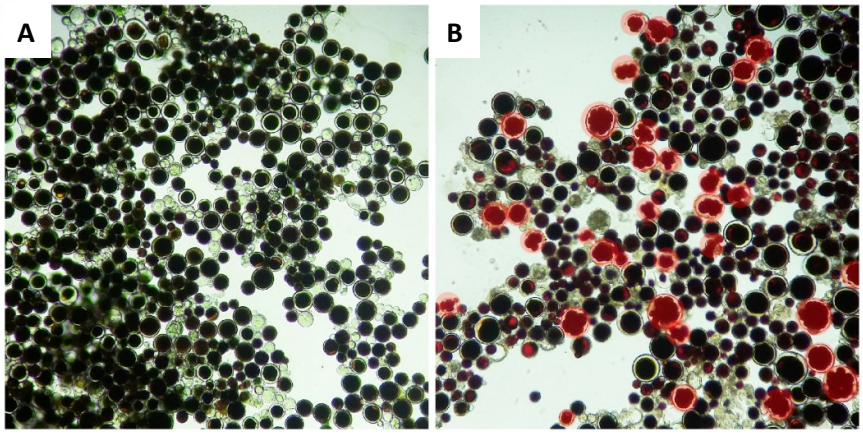
Obr. č. 14: Dělení akinet (označené hvězdou) a zoospor (označené šipkou) kmene CCALA 357 (*H. pluvialis*)(pokus 3.II).

Pokud byly staré akinety několik dní vystaveny chladu za oknem (pokus 9), reagovaly na změnu podmínek mnohem intenzivněji, když bylo přenesení do tepla kombinované i s výměnou starého média za čerstvé nebo za destilovanou vodu.

Buňky vystavené mrazu se za celou dobu pozorování ani v jednom případě (pokusy 8 a 10) dělit nezačaly. Patrně to není způsobené tím, že by vystavení mrazu nepřežily (viz výsledky desikačních pokusů), spíše jim zahájení buněčného cyklu trvá mnohem déle.

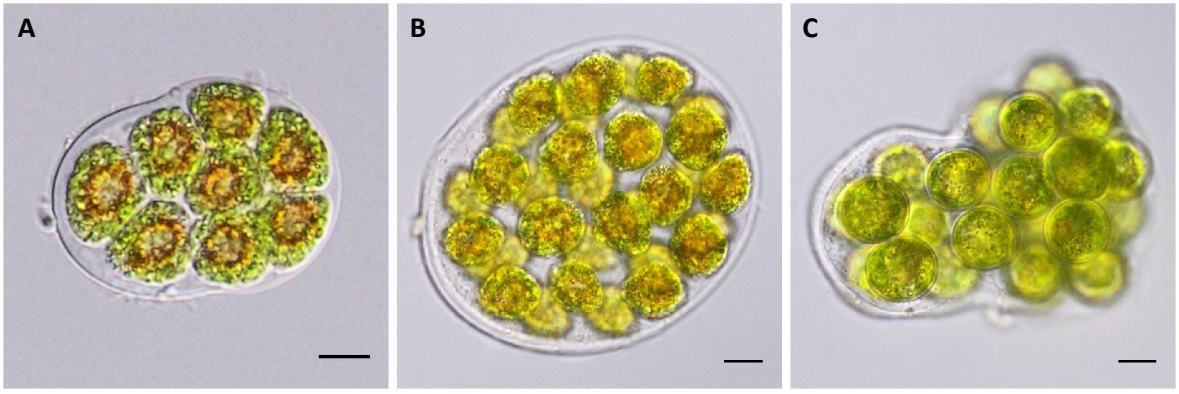
Přenesení buněk do destilované vody většinou působilo podobně jako jejich přenesení do čerstvého média, v některých případech byla intenzita buněčného dělení v destilované vodě dokonce vyšší (pokusy 2, 5, 6 a 7)

Zároveň z výsledků vyplývá, že se u kmene CCALA 357 staré červené akinety obecně dělí mnohem ochotněji než zelené (pokusy 1, 7, 9 a 10; obr. č. 15).



Obr. č. 15: Staré akinety CCALA 357 (*Haematococcus pluvialis)* vystavené pomalému vysušení následně zalité destilovanou vodou (pokus 7). A: zelené akinety; B: červené akinety. Červeně jsou zvýrazněny akinety, jež se dělí.

Mezi kmeny byly pozorovány velké rozdíly, akinety z obou přírodních kmenů se oproti kmenu CCALA 357 (*H. pluvialis)* dělily v mnohem menší míře, přičemž u kmene z Knovíze (*H. pluvialis)* bylo buněčné dělení pozorováno pouze jednou a jen u několika buněk (pokus 2). U kmene z Machova (*H. rubicundus)* bylo navíc jako u jediného po dělení akinet opakovaně pozorováno uvolňování palmel (obr. č. 16).



Obr. č. 16: Dělení akinet. A: počáteční fáze tvorby zoospor, jádra jsou obklopená astaxanthinem (*Haematococcus pluvialis,* kmen CCALA 357); B: rozdělené zoospory před vytvořením bičíků (*H. rubicundus*, kmen Machov); C: palmely před uvolněním z mateřské buněčné stěny (*H. rubicundus*, kmen Machov). Měřítka představují 10 µm.

číslo	kmen	typ buněk na začátku		pre-treatment		induktivní podmínky		čas	výsledek	intenzita
1	CCALA 357	staré akinety	Z	hladovění	st. médium	médium		N	dělení akinet → zoospory	x
					H_2O				-	-
					d. H_2O				-	-
			Č		st. médium				dělení akinet → zoospory	xx
					H_2O				dělení akinet → zoospory	xx
					d. H_2O				dělení akinet → zoospory	xx
	Knovíz	staré červené akinety		hladovění	st. médium	médium		N	-	-
						d. H_2O			-	-
	Machov	staré červené akinety		hladovění	st. médium	médium		N	dělení akinet → palmely i zoospory	xx
						d. H_2O			dělení akinet → palmely i zoospory	x
2	CCALA 357	staré červené akinety		hladovění	st. médium	médium + glukóza		N	dělení akinet → zoospory	xx
						d. H_2O + glukóza			dělení akinet → zoospory	xxx
	Knovíz	staré červené akinety		hladovění	st. médium	médium + glukóza		N	dělení akinet → zoospory	x
						d. H_2O + glukóza			dělení akinet → zoospory	x
	Machov	staré červené akinety		hladovění	st. médium	médium + glukóza		N	dělení akinet → palmely	xx
						d. H_2O + glukóza			dělení akinet → palmely	xx
3.I	CCALA 357	mladé akinety		zoospory vystavené vysychání	hodně pomalé vys.	médium		N	dělení akinet → zoospory	xxx
						d. H_2O			dělení akinet → zoospory	xxx
					pomalé vys.	médium			dělení akinet → zoospory	xx
						d. H_2O			dělení akinet → zoospory	xx
	Knovíz	mladé akinety		zoospory vystavené pomalému vysychání		médium		N	-	-
						d. H_2O			-	-
	Machov	mladé akinety		zoospory vystavené pomalému vysychání		médium		N	-	-
						d. H_2O			-	-
3.II	CCALA 357	mladé akinety a palmely		zoospory vystavené pomalému vysychání velmi krátce		médium		N	dělení palmel i zoospor	xxx
						d. H_2O			dělení palmel i zoospor	xxx
3.III	CCALA 357	mladé akinety		kultura vystavená opakovanému vysychání	hodně pomalé vys.	médium		N	dělení akinet → zoospory	xxx
						d. H_2O			dělení akinet → zoospory	xxx
					pomalé vys.	médium			dělení akinet → zoospory	xxx
						d. H_2O			dělení akinet → zoospory	xxx
4	CCALA 357	mladé akinety		zoospory vystavené pomalému vysychání		omytí d. H_2O + médium		R	-	-
						d. H_2O			-	-
5	CCALA 357	středně staré akinety		velmi pomalé vysychání starších kultur		médium		N	dělení akinet → zoospory	xxx
						H_2O			dělení akinet → zoospory	xxx
	Machov					médium			dělení akinet → zoospory	xx
						d. H_2O			dělení akinet → palmely	xxx
6	CCALA 357	staré červené akinety		rychlé vysušení		médium		N	dělení akinet	x
						d. H_2O			dělení akinet	xx
7	CCALA 357	staré akinety	Z	pomalé vysušení		médium		N	dělení akinet → zoospory	x
						d. H_2O			dělení akinet → zoospory	x
			Č			médium			dělení akinet → zoospory	xx
						d. H_2O			dělení akinet → zoospory	xxx
	Knovíz	staré červené akinety		pomalé vysušení		médium		N	-	-
						d. H_2O			-	-
	Machov	staré červené akinety		pomalé vysušení		médium		N	dělení akinet	x
						d. H_2O			dělení akinet	x
8	CCALA 357	staré červené akinety		rychlé vysušení + vystavení mrazu		médium		N	-	-
						d. H_2O			-	-
9	CCALA 357	staré akinety	Z	chlad za oknem, kolísání teplot během dne		přenesení do tepla	st. médium	N	-	-
							médium		dělení akinet → zoospory	x
							d. H_2O		-	-
			Č				st. médium		dělení akinet → zoospory	x
							médium		dělení akinet → zoospory	xxx
							d. H_2O		dělení akinet → zoospory	xxx
10	CCALA 357	staré akinety	Z	opakované mrznutí a tání		médium		N	-	-
						H_2O			-	-
						d. H_2O			-	-
			Č			médium			-	-
						H_2O			-	-
						d. H_2O			-	-

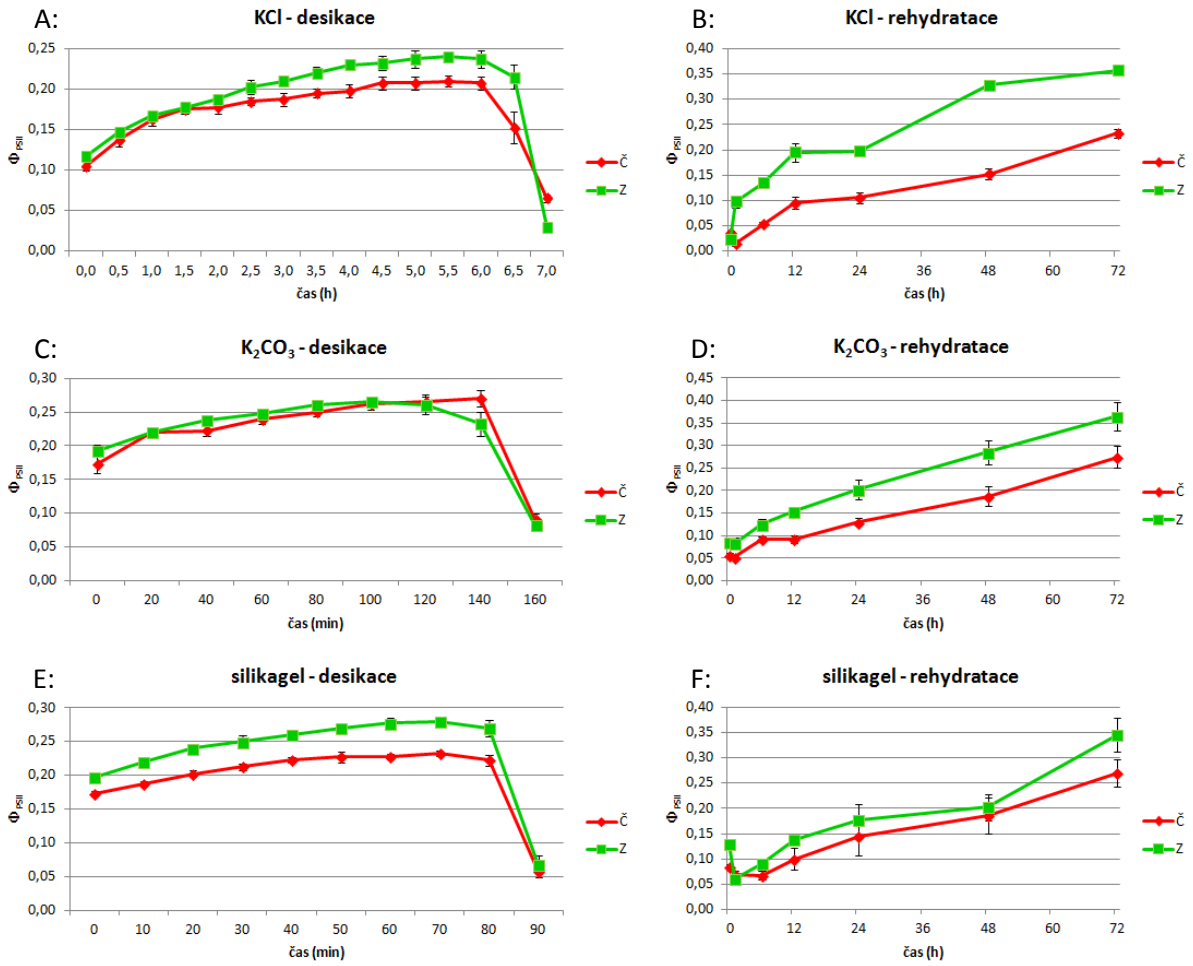
Tab. č. 6: Shrnutí experimentálních podmínek v pokusech o indukci gametogeneze spolu s výsledky působení těchto podmínek na dělení akinet a produkci zoospor či palmel. *Z:* zelené akinety; *Č:* červené akinety; *st. médium:* staré médium; *d. H_2O:* destilovaná voda; *N:* začátek působení induktivních podmínek v noci; *R:* začátek působení induktivních podmínek ráno; *intenzita:* uvedené hodnoty se vztahují k pozorované míře dělení akinet.

3.4 Desikační odolnost

3.4.1 Míra odolnosti červených a zelených akinet při různých rychlostech vysychání

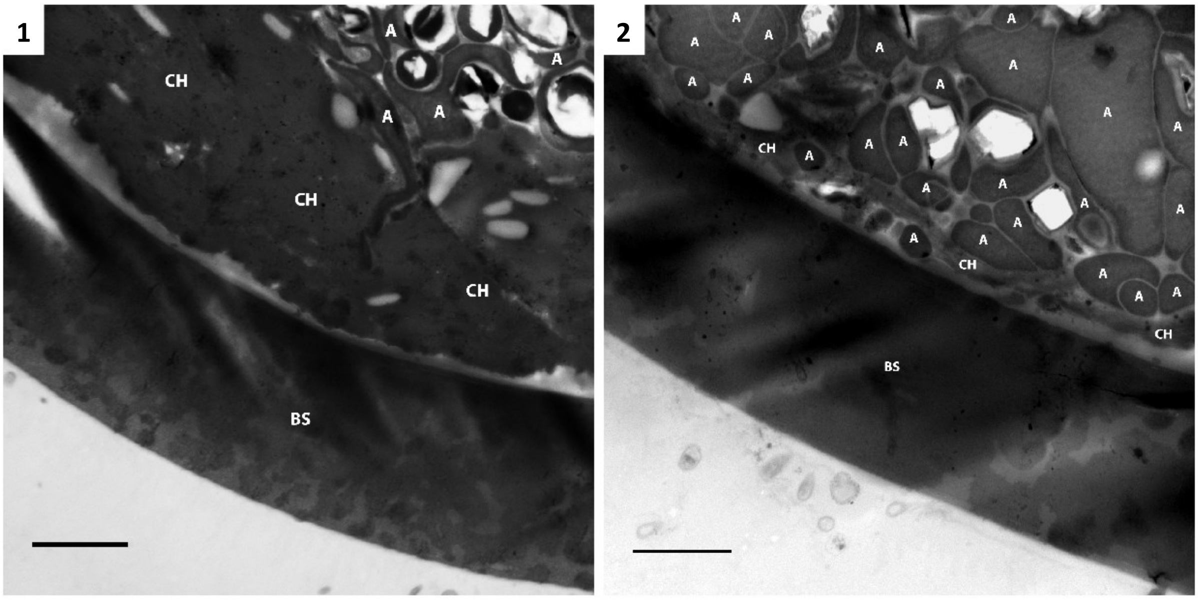
Z výsledků vysychání červených a zelených akinet při různé relativní vzdušné vlhkosti je patrné, že u zelených akinet jsou naměřené efektivní kvantové výtěžky oproti červeným akinetám obecně vyšší (viz obr. č. 17), nejspíše vlivem značné degradace chloroplastu v červených akinetách. Nicméně celkový průběh desikace byl ve všech případech pro obě skupiny buněk stejný a k poklesu efektivního kvantového výtěžku pod hodnotu 0,1 vždy došlo u zelených i červených akinet ve stejnou dobu (obr. č. 17:A,C,E). Výsledky zároveň ukazují, že čím je relativní vzdušná vlhkost nižší, tím rychleji dojde k poklesu efektivního kvantového výtěžku. Při 86% rh došlo k vysušení přibližně po 7 hodinách (obr. č. 17:A), při 43% rh po 160 minutách (obr. č. 17:C) a při 10% rh již po 90 minutách (obr. č. 17:E).

Po rehydrataci byl pro všechny rychlosti vysychání následný nárůst efektivního kvantového výtěžku podobný (viz obr. č. 17:B,D,F). Ve všech případech byly ve vzorcích 24 hodin po rehydrataci pozorovány zoospory, jejichž počet se stále zvyšoval. Právě přechod do vegetativní fáze životního cyklu představený uvolněním zoospor umožnil dosažení vyšších efektivních kvantových výtěžků, než jaké byly naměřeny před vysušením akinet. Množství uvolněných zoospor ze vzorků vysušených nad silikagelem (10% relativní vzdušná vlhkost) bylo oproti ostatním vzorkům mnohem nižší, z čehož je možné usuzovat, že toto velmi rychlé vysychání přežila menší část akinet.



Obr. č. 17: Efektivní kvantové výtěžky (Φ_{PSII}) při různých rychlostech vysychání a po následné rehydrataci vzorků. A, B: KCl - 86% relativní vzdušná vlhkost (rh); C, D: K_2CO_3 - 43% rh; E, F: silikagel - 10% rh. *Č:* červené akinety; *Z:* zelené akinety. Zobrazeny jsou průměry se směrodatnými odchylkami ze čtyř nezávislých pozorování.

Rozdíly v ultrastruktuře zelených a červených akinet byly pozorovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (viz obr. č. 18). Snímky ukazují, že u zelených akinet je mnohem lépe zachován chloroplast, astaxanthin je zde přítomen pouze ve střední části buněk. Červené akinety jsou oproti tomu tukovými kapénkami obsahujícími astaxanthin vyplněny téměř celé a chloroplast je u nich značně degradován. Tento rozdíl ve stavbě a objemu chloroplastu vysvětluje, proč byly u zelených akinet ve všech případech pozorovány vyšší efektivní kvantové výtěžky. Naopak stavba i objem buněčné stěny byly u obou typů akinet v podstatě stejné. Tudíž je pro odolnost akinet vůči desikaci zřejmě zásadní pouze stavba buněčné stěny, množství astaxanthinu v buňkách na ni nemá podstatný vliv.



Obr. č. 18: Porovnání ultrastruktury zelených a červených akinet na snímcích z transmisní elektronové mikroskopie. 1: zelená akineta; 2: červená akineta. *A:* astaxanthin obsažený v tukových kapénkách; *CH:* chloroplast; *BS:* buněčná stěna. Měřítka představují 2 μm.

3.4.2 Vzájemný vliv působení rozdílných teplot a doby vyschnutí

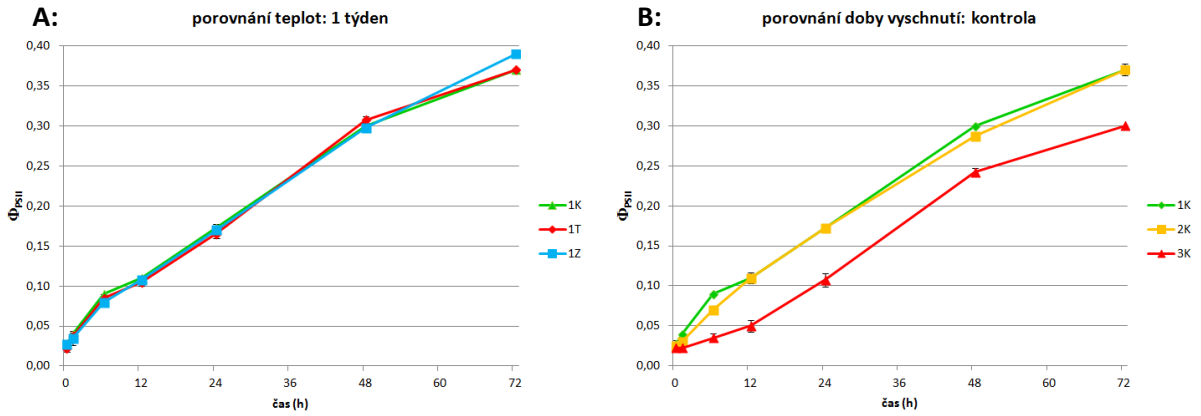
Výsledky pokusů, ve kterých byla zkoumána odolnost starých červených akinet vůči desikaci v různých kombinacích délky vyschnutí a působení rozdílných teplot, neukazují žádnou významnou závislost mezi oběma faktory.

Pro výzkum vzájemného vlivu působení rozdílných teplot a doby vyschnutí byly vždy porovnávány výsledky působení tří různých teplot ve stejný čas a následně výsledky získané po působení jedné teploty ve třech různých časových intervalech.

Pro rozdílné teploty (-1 °C, 25 °C a 40 °C), byl u všech tří zvolených délek doby vyschnutí (1, 2 a 4 týdny) nárůst efektivního kvantového výtěžku po rehydrataci téměř totožný (viz obr. č. 19:A s výsledky po 1 týdnu vyschnutí, grafy pro 2 a 4 týdny byly velmi podobné).

Nejnižší hodnoty efektivního kvantového výtěžku po rehydrataci vzorků byly pro všechny tři zkoumané teploty naměřeny u vzorků, které byly ponechány ve vysušeném stavu nejdéle (4 týdny), nicméně rozdíl vůči ostatním vzorkům není příliš velký (viz obr. č. 19:B s výsledky změřenými u akinet ponechaných ve 25 °C, grafy pro -1 °C a 40 °C byly velmi podobné). V množství uvolněných zoospor se vzorky mezi sebou téměř nelišily.

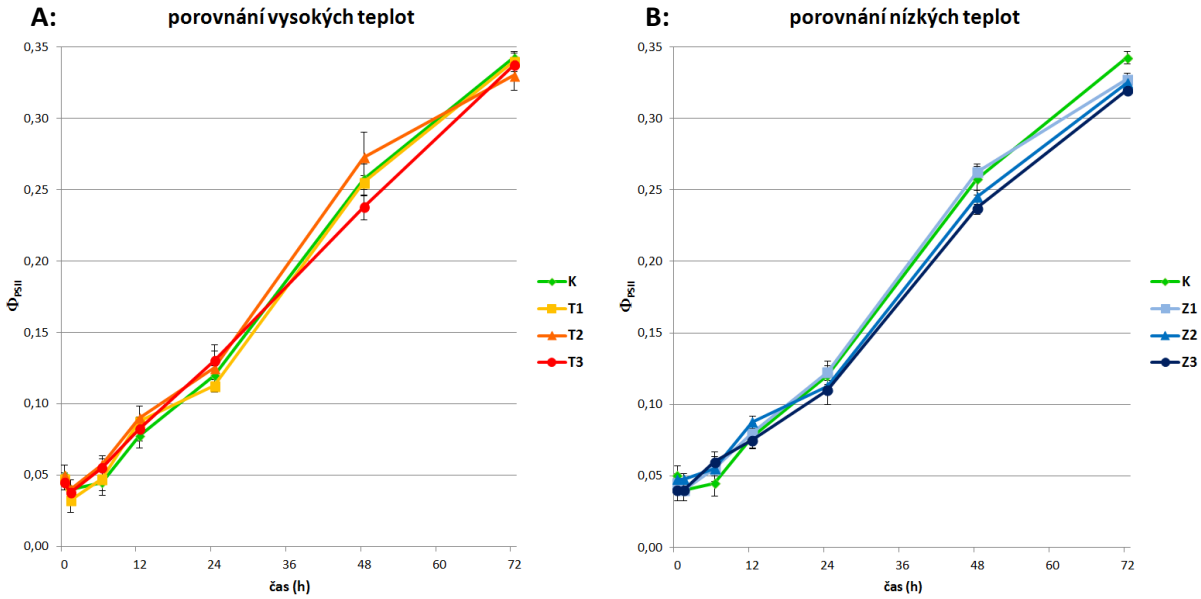
Z výsledků vyplývá, že delší doba vyschnutí představuje silnější stresový faktor, naopak krátkodobým působením teplot -1 °C a 40 °C desikační odolnost akinet ovlivněna není.



Obr. č. 19: Efektivní kvantové výtěžky (Φ_{PSII}) naměřené po rehydrataci vysušených červených akinet. A: porovnání akinet vystavených různým teplotám, doba vysušení 1 týden; B: porovnání různě dlouhé doby vyschnutí u akinet vysoušených v teplotě 25 °C. *1K:* akinety vysušené jeden týden v teplotě 25 °C; *1T:* akinety vystavené teplotě 40 °C vysušené po dobu jednoho týdne; *1Z:* akinety vystavené teplotě -1 °C vysušené po dobu jednoho týdne; *2K:* akinety vysušené dva týdny v teplotě 25 °C; *3K:* akinety vysušené čtyři týdny v teplotě 25 °C. Zobrazeny jsou průměry se směrodatnými odchylkami ze čtyř nezávislých pozorování.

3.4.3 Odolnost vysušených akinet vůči působení extrémních teplot

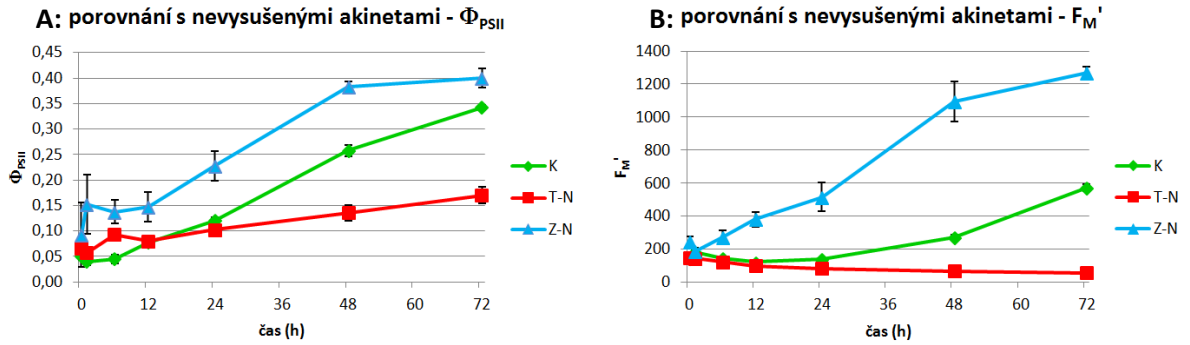
Protože byla u starých červených akinet pozorována značná odolnost vůči desikaci, byly akinety v dalším pokusu po vysušení vystaveny extrémním teplotám, konkrétně 45 °C, 50 °C, 55 °C, -1 °C, -18 °C a -80 °C (viz str. 25). Ve všech těchto případech byl naměřený nárůst efektivního kvantového výtěžku po rehydrataci téměř totožný s kontrolním vzorkem, jenž byl po vysušení uchováván v teplotě 25 °C (viz obr. č. 20:A pro vysoké teploty a obr. č. 20:B pro nízké teploty). Množství uvolněných zoospor bylo ve vzorcích velmi podobné, pouze u vzorků vystavených nejvyšší teplotě (55 °C) bylo zoospor pozorováno relativně nejméně. Tento výsledek naznačuje, že extrémně vysoké teploty pravděpodobně působí na vysušené akinety hůře než teploty nízké.



Obr. č. 20: Efektivní kvantové výtěžky (Φ_{PSII}) naměřené po rehydrataci vysušených akinet vystavených extrémním teplotám po dobu jedné hodiny. A: porovnání vysokých teplot; B: porovnání nízkých teplot. *K:* kontrola, 25 °C; *T1:* 45 °C; *T2:* 50 °C; *T3:* 55 °C; *Z1:* -1 °C; *Z2:* -18 °C; *Z3:* -80 °C. Zobrazeny jsou průměry se směrodatnými odchylkami ze čtyř nezávislých pozorování.

3.4.4 Srovnání vysušených a nevysušených akinet

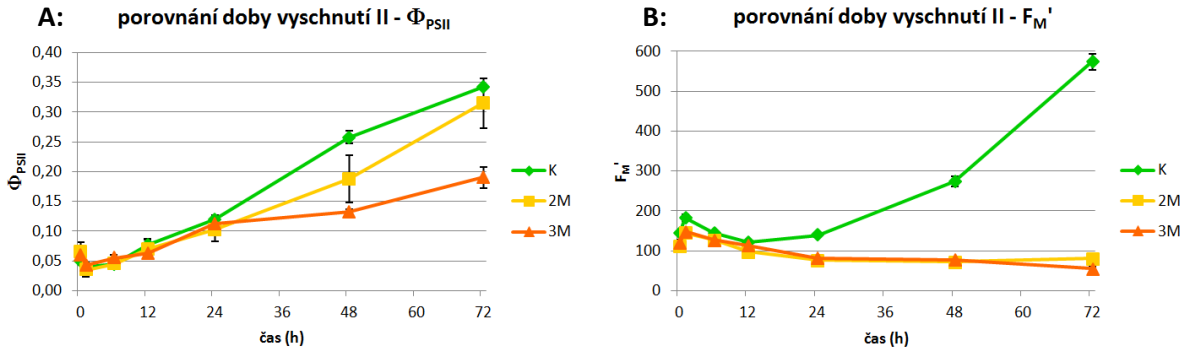
Vyšší míra negativního působení vysokých teplot byla prokázána i porovnáním vysušených akinet se vzorky, na něž byly extrémní teploty -18 °C a 50 °C aplikovány v nevyschlém stavu kultury. Pokud byla kultura krátkodobě vystavena mrazu, byl u ní po rozmrznutí a výměně starého média za čerstvé pozorován dokonce vyšší nárůst efektivního kvantového výtěžku než u kontrolního vysušeného vzorku (obr. č. 21:A). Ještě výrazněji vyniknou rozdíly mezi vzorky při porovnání naměřených hodnot maximální fluorescence (obr. č. 21:B). Z toho vyplývá, že alespoň krátkou dobu zmrznutí přežijí akinety *Haematococcus pluvialis* bez problémů, rychlejší obnova fyziologických funkcí může být mimo jiné způsobena i rychlejším uvolňováním zoospor z nevyschlých akinet. Zcela jinak vypadala situace u nevyschlé kultury, jež byla na hodinu vystavena teplotě 50 °C. Pozorovaný nárůst hodnot efektivního kvantového výtěžku i naměřené hodnoty fluorescence byly velmi nízké (obr. č. 21), navíc nebyly ani po 72 hodinách v žádném ze vzorků pozorovány uvolněné zoospory.



Obr. č. 21: Efektivní kvantové výtěžky (A: Φ_{PSII}) a hodnoty maximální fluorescence (B: F_M') naměřené po přidání čerstvého média ke kulturám vystaveným extrémním teplotám a po rehydrataci kontrolního vysušeného vzorku. *K:* kontrolní vzorek vysušený při teplotě 25 °C; *T-N:* kultura vystavená 50 °C v nevyschlém stavu; *Z-N:* kultura vystavená -18 °C v nevyschlém stavu. Zobrazeny jsou průměry se směrodatnými odchylkami ze čtyř nezávislých pozorování.

3.4.5 Vliv velmi dlouhé doby vyschnutí

Pokus zkoumající odolnost akinet vůči velmi dlouhé době vyschnutí, konkrétně po dobu dvou a tří měsíců, ukázal, že jsou akinety schopné přežít i takto dlouhé vysušení. Z výsledků nicméně vyplývá, že čím je doba vyschnutí delší, tím pomaleji dochází k nárůstu efektivního kvantového výtěžku (obr. č. 22:A). Vzorky se významně lišily i v naměřených hodnotách maximální fluorescence (obr. č. 22:B) a v množství uvolněných zoospor. V kontrolním vzorku byly zoospory pozorovány již 24 hodin po rehydrataci, ve vzorku po dvouměsíčním vyschnutí byly uvolněné zoospory pozorovány až po 48 hodinách a v menší míře, v nejstarším vzorku se zoospory objevily dokonce až po 72 hodinách a jejich počet se pohyboval v řádu jednotek. Z výsledků vyplývá, že dlouhé vyschnutí nejspíše přežije pouze malá část akinet.



Obr. č. 22: Efektivní kvantové výtěžky (A: Φ_{PSII}) a hodnoty maximální fluorescence (B: F_M') naměřené po rehydrataci akinet vystavených dlouhé době vyschnutí. *K:* kontrolní vzorek vysušený 1 týden; *2M:* akinety vysušené 2 měsíce; *3M:* akinety vysušené 3 měsíce. Zobrazeny jsou průměry se směrodatnými odchylkami ze čtyř nezávislých pozorování.

4 Diskuze

4.1 Nepohlavní rozmnožování

4.1.1 Nepohlavní dělení zoospor

Pokud jsou zoospory vystaveny střídání světla a tmy, dochází k jejich dělení brzy ráno, jak dokazuje i úspěšná synchronizace kultury s využitím cyklu střídání světla a tmy 16:8 h. Synchronizace buněčného dělení zoospor v kultuře byla kromě mikroskopických pozorování potvrzena i výsledky z průtokové cytometrie, které mimo jiné ukazují na relativně menší velikost buněk z ranních vzorků. Dělení zoospor brzy ráno dokládají i četná pozorování z přírody (Hazen 1899, Elliott 1934). Střídání světla a tmy může mít vliv i na dělení akinet, jak ukazují výsledky z pokusů o gametogenezi. Z tohoto důvodu by nastavení podobného pravidelného cyklu střídání světla a tmy mohlo být vhodné i při kultivaci pro biotechnologické účely, i když bylo vyšších hustot kultury dosaženo při kontinuálním osvětlení (Domínguez-Bocanegra et al. 2004). Do budoucna by mohlo být zajímavé porovnat vliv různé délky obou fází na růst kultury. Pokud by se například obě fáze zkrátily a jejich střídání by tak nastávalo častěji než jednou za 24 hodin, mohlo by teoreticky být dosaženo i častějšího dělení zoospor.

Výsledky z počítání zoospor v různých dnech kultivace ukazují, že počet dělení zoospor *Haematococcus pluvialis* pravděpodobně není geneticky omezen a k jejich přeměně na nepohyblivé palmely nedochází přesně po pěti buněčných cyklech. Toto pozorování je v rozporu s hypotézou představenou v práci týmu Lee & Ding (1994). Jejich odlišné výsledky mohly být způsobeny konkrétními zvolenými kultivačními podmínkami, které zapříčinily přeměnu na palmely v době odpovídající pěti dělením zoospor. Dalším důvodem by mohla být chybná interpretace dat z průtokového cytometru.

Na druhé straně i metoda využitá v této práci má své limity. Mohlo dojít k tomu, že se po pěti děleních (nebo jiném geneticky určeném počtu) zoospory opravdu přeměnily na palmely, jejichž dceřiné buňky se poté opět transformovaly na bičíkovce. Tato krátkodobá přeměna by byla velmi špatně detekovatelná. Pravděpodobnější ale je, že by se v tomto případě jednalo pouze o zakulacení buňky před dělením (Hazen 1899, Elliott 1934) a ne o pravou přeměnu na palmelu, která je spojená s výraznějšími fyziologickými změnami (Hagen et al. 2002, Collins et al. 2011, Gu et al. 2013). Kdyby přesto ke skutečné krátkodobé přeměně zoospor na palmely docházelo, není z hlediska kultivace tento jev nijak podstatný, protože nebylo pozorováno významné snížení rychlosti dělení a buňky se i v pozdějších fázích kultivace vyskytovaly v bičíkaté formě. Zde prezentované výsledky podporuje i skutečnost, že je možné *H. pluvialis* kultivovat kontinuálně (Del Río 2005).

Navzdory tomu, že počet buněčných dělení *H. pluvialis* pravděpodobně není geneticky omezen, bylo v kulturách po určité době opakovaně pozorováno zastavení růstu (Park et al. 2014, Zhang

et al. 2014). Toto omezení je tudíž nejspíše způsobeno kultivačními podmínkami. Během kultivace jsou spotřebovávány živiny z média, jejich nedostatek potom vede k tvorbě nepohyblivých stádií a k akumulaci astaxanthinu, přičemž výraznější vliv má nedostatek dusíku (Boussiba et al. 1999, Chekanov et al. 2014, Saha et al. 2013). Problém s úbytkem živin v médiu je odstraněn při využití fed-batch kultivace, která spočívá v jejich průběžném dodávání (Hata et al. 2001). Další cestou k dosažení vyšší produktivity může být i optimalizace složení média.

Dalším problémem je, že buňky ve vyšších hustotách kultury produkují inhibiční metabolity, které zastavují růst. Tyto metabolity mohou být z média odstraňovány během perfuzní kultivace, při které je průběžně staré médium nahrazováno novým (Park et al. 2014). Pokud by se podařilo lépe prozkoumat mechanismy působení inhibičních metabolitů, mohl by se další výzkum zaměřit na neutralizaci jejich účinků nebo na zisk kmenů *H. pluvialis*, které by na přítomnost těchto metabolitů nereagovaly. Tím by bylo možné dosáhnout vyšší hustoty kultury. Podstatná je i vhodná volba koncentrace inokula. Při nižší počáteční hustotě kultury by totiž ke zvýšenému hromadění metabolitů docházelo později, tudíž by bylo možné udržovat vysokou růstovou rychlost delší dobu. Na druhou stranu je ale delší kultivace finančně náročnější, proto je nutné najít vhodný kompromis mezi mírou zvyšování biomasy a finančními náklady na kultivaci.

Výsledky této práce ukazují, že má smysl během kultivace cílit na vyšší nárůst biomasy, protože nebylo potvrzeno genetické omezení, které by tomu bránilo.

4.1.2 Nepohlavní dělení akinet

Akinety se překvapivě ochotně dělily po přenesení do destilované vody, v mnoha případech fungovala destilovaná voda dokonce lépe než kultivační médium BG11. Zalití akinet destilovanou vodou může napodobovat podmínky, kterým je *H. pluvialis* vystavován v přírodě, kde k dělení akinet dochází nejčastěji po zalití mělkých nádrží dešťovou vodou (Hazen 1899, Droop 1956, Pocock 1959). I když jsou pro kultivaci *H. pluvialis* používána média bohatá na živiny (např. Boussiba et al. 1999, Domínguez-Bocanegra et al. 2004, Zhang et al. 2014), mohlo by být v některých fázích kultivace, především na jejím začátku, kde ještě není kultura příliš hustá, použito médií zředěných. Tento postup by mimo jiné umožnil snížení kultivačních nákladů.

Ve všech případech, kdy bylo srovnáváno dělení zelených a červených akinet, došlo u červených akinet k zahájení buněčného dělení i k uvolňování nově vzniklých zoospor dříve. Důvodem může být jednodušší stavba červených akinet (Santos & Mesquita 1984, Wayama et al. 2013, Nogami et al. 2014), která by teoreticky mohla umožňovat snadnější rozdělení jednotlivých buněčných komponent mezi vznikající dceřiné buňky. Další možností je funkce astaxanthinu jako zásobní látky (Lemoine & Schoefs 2010, Han et al. 2012), v tomto případě by červené akinety měly na začátku dělení k dispozici více potřebné energie.

Ochota akinet k dělení i podoba uvolňovaných dceřiných buněk se mezi pozorovanými kmeny (CCALA 357, Knovíz a Machov) lišily. Asi nejnápadnějším rozdílem byla častá tvorba palmel místo zoospor pozorovaná u kmene z Machova. Protože podle dat získaných sekvenováním patří tento kmen (na rozdíl od kmenů CCALA 367 a Knovíz) k druhu *Haematococcus rubicundus*, mohl by pozorovaný jev představovat jeden z fyziologických rozdílů odlišujících druhy *H. pluvialis* a *H. rubicundus*.

4.2 Pohlavní rozmnožování

Ani u jednoho z použitých kmenů (*Haematococcus pluvialis:* CCALA 357, Knovíz; *H. rubicundus:* Machov) se navzdory širokému spektru indukčních podmínek nepodařilo indukovat gametogenezi. Příčin tohoto neúspěchu může být několik. První z nich je možnost, že zvolené indukční podmínky nebyly vhodné, což se nicméně vzhledem k již popsaným pozorováním (Hazen 1899, Peebles 1909, Elliott 1934, Droop 1956, Pocock 1959, Triki et al. 1997) nezdá příliš pravděpodobné. Situace ale může být komplikována faktem, že jednotlivé studie mohou ve skutečnosti popisovat různé druhy rodu *Haematococcus*, které se mohou svými reakcemi na indukční podmínky lišit. Dalším důvodem, který by ale mohl vysvětlit pouze chování *H. pluvialis* z kmene CCALA 357, by mohla být ztráta schopnosti pohlavního rozmnožování u kmene, který je velice dlouho udržován pouze v nepohlavní fázi životního cyklu (Pocock 1959). Postupná ztráta fertility u dlouhodobě kultivovaných kmenů byla pozorována i u dalších zástupců třídy Chlorophyceae, například u rodů *Pandorina* či *Gonium* (Coleman 1975, Hamaji et al. 2013). Obecně nízká ochota *H. pluvialis* k pohlavnímu rozmnožování může být vysvětlena i tím, že pro tento organismus vzhledem k nepohlavnímu způsobu tvorby odolných cyst již není pohlavní rozmnožování příliš důležité (Pocock 1959).

Jako nejpravděpodobnější se jeví možnost, že je *Haematococcus pluvialis* heterothalický a tudíž potřebuje k úspěšnému pohlavnímu rozmnožování přítomnost dvou odlišně pohlavně laděných typů gamet, které se v kmenech izolovaných z jediné buňky nemohou vyskytovat. Ale na druhou stranu by samotná indukce gametogeneze neměla být případným heterothalismem znemožněna, protože byly gamety opakovaně pozorovány i u kmenů *H. pluvialis* izolovaných z jedné buňky (Droop 1956, Triki et al. 1997, Chekanov et al. 2014). Existuje ale možnost, že u těchto kmenů došlo k mutaci v genu zodpovědném za pohlavní diferenciaci, jež vedla k sekundárnímu rozlišení původně identických buněk na různé pohlavní typy. Tato možnost je podpořena výsledky experimentů s příbuznými rody *Chlamydomonas* a *Gonium*, u kterých je za diferenciaci gamet zodpovědný jeden gen, konkrétně gen *mid* (Ferris 1997, Hamaji et al. 2013).

4.3 Desikační tolerance a její vliv na životní cyklus *H. pluvialis*

Protože byla ve všech zkoumaných relativních vzdušných vlhkostech rychlost vysychání pro červené i zelené akinety stejná, je možné konstatovat, že pro vysokou míru desikační tolerance akinet rodu *Haematococcus* je zásadní právě přítomnost silné buněčné stěny obsahující algenan, jež byla pozorována u obou typů buněk, zatímco zvýšený obsah astaxanthinu zaznamenaný u červených akinet se na ní zřejmě nepodílí.

Vysoká desikační odolnost pozorovaná u akinet *Haematococcus pluvialis* nejspíše představuje klíčový faktor umožňující celosvětové rozšíření toho organismu v různých typech habitatů (Proctor 1957, Pocock 1959, Mostafa et al. 2011, Genitsaris et al. 2016). Z přírodních habitatů jsou nejčastěji zmiňované dočasně zaplavené mělké prohlubně a štěrbiny ve skalách, tzv. lithotelmy (Hazen 1899, Proctor 1957, Pocock 1959, Chekanov et al. 2014). Velmi často je však *Haematococcus* nalézán i v umělých nádržkách, například na hřbitovech (Hazen 1899, Proctor 1957), ptačích koupalištích (Proctor 1957, Pocock 1959), v odtokových rourách od okapů (Pocock 1959) nebo v příkopech podél cest (Proctor 1957). Z uvedeného výčtu je zřejmé, že se jedná o poměrně izolovaná prostředí s ostrůvkovitým rozšířením, pro jejichž úspěšnou kolonizaci potřebuje mít *Haematococcus* dobře vyvinuté disperzní mechanismy využívající právě desikační odolnost akinet. Jednou z možností šíření je transport na nohách nebo peří ptáků, případně i v jejich trávicím traktu (Figuerola et al. 2002, Cellamare et al. 2010). Tuto možnost podporuje i hojný výskyt rodu *Haematococcus* v ptačích koupalištích. Nicméně velmi častý je nejspíše i transport pomocí větru, akinety byly opakovaně nalezeny ve vzorcích odebraných ze vzduchu (Genitsaris et al. 2014), *Haematococcus* navíc úspěšně kolonizoval i experimentální nádoby zakryté síťkou bránící přenosu pomocí zvířat (Genitsaris et al. 2011). Výsledky této diplomové práce potvrzují možnost, že zdroje pro úspěšnou kolonizaci nových prostředí nemusí být lokální, značná desikační tolerance akinet umožňuje i transport na dlouhé vzdálenosti.

Nicméně dobré předpoklady pro přenos buněk na nové lokality nejsou jediným faktorem, který rozhoduje o přítomnosti druhu v daném habitatu. Zásadní jsou také environmentální podmínky a struktura společenstva (Kristiansen 2008, Siver and Lott 2012). V případě druhu *Haematococcus pluvialis* abiotické faktory nejsou příliš limitující, protože bývá nalézán v širokém rozpětí klimatických podmínek v průběhu celé sezóny (Genitsaris et al. 2011, Genitsaris et al. 2016). Hlavní omezení pro rozšíření této řasy tudíž nejspíše představují nízké kompetiční schopnosti, které způsobují, že bývá *H. pluvialis* pouze výjimečně pozorován ve fytoplanktonu větších vodních ploch (Proctor 1957, Genitsaris et al. 2016). Neschopnost konkurovat ostatním druhům řas může být způsobena mimo jiné vysokou citlivostí vůči inhibičním látkám, které tyto řasy produkují (Proctor 1957), nebo faktem, že je *H. pluvialis* díky produkci astaxanthinu velmi výživnou kořistí upřednostňovanou přítomnými predátory (Genitsaris et al. 2011). I z těchto

důvodů může být značná desikační tolerance klíčová pro rozšíření *H. pluvialis*, protože umožňuje buňkám přežívat i v prostředích, která jsou pro jiné druhy řas limitující. Protože vysušené akinety přežijí i působení extrémních teplot, podle výsledků této práce dokonce až -80 °C a 55 °C, může se *H. pluvialis* vyskytovat i v chladných nebo naopak teplých oblastech, ve kterých je alespoň občasný přísun srážkové vody. Akinety navíc vydrží ve vysušeném stavu poměrně dlouho, podle výsledků této práce minimálně tři měsíce, tudíž nemusí docházet k zaplavení nádržek příliš často. *Haematococcus pluvialis* tak může úspěšně přežívat i v poměrně suchých oblastech.

Prezentované výsledky mohou pomoci objasnit i jeden zajímavý často pozorovaný jev přítomný v životním cyklu *H. pluvialis*. V průběhu vysychání nádržek se hromadí velká část vytvořených akinet v hustém červeném biofilmu vznikajícím na stěnách (jev pozorovaný v přírodních i laboratorních podmínkách; Hazen 1899, Peebles 1909, Droop 1956, Wan et al. 2014), i když by se mohlo zdát, že by bylo výhodnější, když by akinety klesly na dno nádržky a zůstaly tak co nejdéle ve vodním prostředí. Za teplých slunečných dní se totiž voda v mělkých vysychajících nádržkách může ohřát na vysokou teplotu, kterou nevysušené akinety nepřežijí, zatímco vyschlé akinety jsou k působení vysokých teplot značně odolné. Proto je výhodné, když se akinety vznikající ze zoospor nahromaděných vlivem fototaxe u hladiny přichytí na stěnu nádržek. Akumulace akinet na jednom místě, jež vede ke vzniku hustého biofilmu, navíc může být výhodná díky pomalejšímu vysychání a menší expozici vysoké ozářenosti u buněk ve spodních vrstvách biofilmu.

Vysoká desikační odolnost akinet *H. pluvialis* by potenciálně mohla mít i své laboratorní využití. Pokud by například došlo ke kontaminaci kultury méně odolnými druhy řas, mohlo by rychlé vysušení části kultury v nízké relativní vzdušné vlhkosti nad silikagelem umožnit jejich odstranění. Další výhodou je možnost kultivace akinet na zvlhčované membráně s nižší spotřebou vody oproti jiným typům kultivace, nízká míra desikačního stresu společně s vyšší ozářeností zde vedou k rychlejší akumulaci astaxanthinu v buňkách (Wan et al. 2014, Zhang et al. 2014).

5 Závěr

Výsledky této práce poskytují odpovědi na některé důležité otázky, které se týkají komplexního životního cyklu řasy *Haematococcus pluvialis*.

Co se týče vegetativního dělení zoospor, nebylo potvrzeno genetické omezení na pět buněčných cyklů. Některé ze sledovaných zoospor se musely rozdělit nejméně osmkrát a ani po této době nebyla pozorována přeměna buněk na nepohyblivé palmely. Jev popisovaný v práci Lee & Ding (1994) byl tudíž pravděpodobně způsoben zvolenými kultivačními podmínkami nebo chybnou interpretací dat z průtokové cytometrie.

Pokud jde o míru desikační tolerance akinet *H. pluvialis*, je velmi vysoká a může mít zásadní vliv na životní cyklus i na rozšíření tohoto organismu. Desikační toleranci zajišťuje především silná buněčná stěna obsahující algenan, zvýšené množství astaxanthinu přítomné v červených akinetách se na ní pravděpodobně nepodílí. Z výsledků je patrné, že akinety přežijí i velmi rychlé vysychání v 10% vzdušné vlhkosti. Ve vysušeném stavu mohou akinety přežívat minimálně čtvrt roku. Vysušené akinety navíc bez problémů přežijí i působení extrémních teplot -80 °C a +55 °C. Vyschnutí dokonce může fungovat jako mechanismus pro přežití vysokých teplot.

Navzdory široké škále vyzkoušených podmínek a práci se třemi různými kmeny se pohlavní rozmnožování nepodařilo ani v jednom z případů indukovat. Buď nebyly zvoleny vhodné indukční podmínky, nebo je *H. pluvialis* heterothalický, což by znemožnilo pozorování pohlavního rozmnožování u kmenů izolovaných z jediné vegetativní buňky.

6 Literatura

Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A., Boussiba, S. (2007). On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology and Bioengineering, 98(1), 300-305.

Aigner, S., Remias, D., Karsten, U., Holzinger, A. (2013). Unusual phenolic compounds contribute to ecophysiological performance in the purple-colored green alga *Zygogonium ericetorum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) from a high-alpine habitat. Journal of Phycology, 49(4), 648–660.

Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Klimov, V. V., Los, D. A., Carpentier, R., Mohanty, P. (2008). Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis. Photosynthesis Research, 98, 541–550.

Allewaert, C. C., Vanormelingen, P., Pröschold, T., Gómez, P. I., González, M. A., Bilcke, G., D'Hondt, S., Vyverman, W. (2015). Species diversity in European *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). Phycologia, 54(6), 583–598.

Alpert, P. (2006). Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? Journal of Experimental Biology, 209(9), 1575–1584.

Bačkor, M., Peksa, O., Škaloud, P., Bačkorová, M. (2010). Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on ITS rDNA sequences. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73(4), 603–612.

Barlow, A. M., Slepkov, A. D., Ridsdale, A., McGinn, P. J., Stolow, A. (2014). Label-free hyperspectral nonlinear optical microscopy of the biofuel micro-algae Haematococcus *Pluvialis*. Biomedical Optics Express, 5(10), 3391–3402.

Becker, B., Marin, B. (2009). Streptophyte algae and the origin of embryophytes. Annals of Botany, 103(7), 999–1004.

Blokker, P. (2000). Structural analysis of resistant polymers in extant algae and ancient sediments. In Geologica Ultraiectina (pp. 1–145).

Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J. P., Zarka, A., Chen, F. (1999). Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. Biotechnology Letters, 21(7), 601–604.

Buchheim, M. A., Buchheim, J. A., Carlson, T., Kugrens, P. (2002). Phylogeny of *Lobocharacium* (Chlorophyceae) and allies : a study of 18S and 26S rDNA data. Journal of Phycology, 38, 376–383.

Cellamare, M., Leitão, M., Coste, M., Dutartre, A., Haury, J. (2010). Tropical phytoplankton taxa in Aquitaine lakes (France). Hydrobiologia, 639(1), 129–145.

Coleman, A. W. (1975). Long-term maintenance of fertile algal clones: experience with *Pandorina* (Chlorophyceae). Journal of phycology, 11, 282-286.

Collins, A. M., Jones, H. D. T., Han, D., Hu, Q., Beechem, T. E., Timlin, J. A. (2011). Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae). PLoS ONE, 6(9), e24302.

Del Río, E., Acién, F. G., García-Malea, M. C., Rivas, J., Molina-Grima, E., Guerrero, M. G. (2005). Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. Biotechnology and Bioengineering, 91(7), 808–815.

Demura, M., Ioki, M., Kawachi, M., Nakajima, N., Watanabe, M. M. (2014). Desiccation tolerance of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and extreme temperature tolerance of dehydrated cells. Journal of Applied Phycology, 26(1), 49–53.

Domínguez-Bocanegra, A. R., Legarreta, I. G., Jeronimo, F. M., Campocosio, A. (2004). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology, 92(2), 209–214.

Droop, M. R. (1956). *Haematococcus pluvialis* and its allies. I. The Sphaerellaceae. Revue Algologique, N.S., 2, 53-70.

Elliott, A. M. (1934). Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. Archiv für Protistenkunde, 82, 250-272.

Elster, J., Degma, P., Kováčik, Ľ., Valentová, L., Šramková, K., Batista Pereira, A. (2008). Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia. Biologia, 63(6), 843–851.

Evans, J. H. (1958). The survival of freshwater algae during dry periods: Part I. An investigation of the algae of five small ponds. Journal of Ecology, 46(1), 149–167.

Farrant, J. M. (2000). A comparison of patterns of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. Plant Ecology, 151, 29–39.

Fernández-Marín, B., Míguez, F., Becerril, J. M., García-Plazaola, J. I. (2011). Dehydration-mediated activation of the xanthophyll cycle in darkness: Is it related to desiccation tolerance? Planta, 234(3), 579–588.

Ferris, P. J., Goodenough, U. W. (1997). Mating type in *Chlamydomonas* is specified by *mid*, the minus-dominance gene. Genetics, 146(3), 859–869.

Figuerola, J., Green, A. J. (2002). Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. Freshwater Biology, 47, 483–494.

Genitsaris, S., Kormas, K. A., Christaki, U., Monchy, S., Moustaka-Gouni, M. (2014). Molecular diversity reveals previously undetected air-dispersed protist colonists in a Mediterranean area. Science of the Total Environment, 478, 70–79.

Genitsaris, S., Moustaka-Gouni, M., Kormas, K. A. (2011). Airborne microeukaryote colonists in experimental water containers: Diversity, succession, life histories and established food webs. Aquatic Microbial Ecology, 62(2), 139–152.

Genitsaris, S., Stefanidou, N., Katsiapi, M., Vardaka, E., Kormas, K. A., Sommer, U., Moustaka-Gouni, M. (2016). *Haematococcus*: A successful air-dispersed colonist in ephemeral waters is rarely found in phytoplankton communities. Turkish Journal of Botany, 40(4), 427–438.

Govindjee, R. (1995). Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. Australian Journal of Plant Physiology, 22, 131-160.

Gray, D. W., Lewis, L. A., Cardon, Z. G. (2007). Photosynthetic recovery following desiccation of desert green algae (Chlorophyta) and their aquatic relatives. Plant, Cell and Environment, 30(10), 1240–1255.

Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry, 81A(1), 89–96.

Gu, W., Xie, X., Gao, S., Zhou, W., Pan, G., Wang, G. (2013). Comparison of different cells of *Haematococcus pluvialis* reveals an extensive acclimation mechanism during its aging process: from a perspective of photosynthesis. PLoS ONE, 8(6), e67028.

Guiry, M. D., Guiry, G. M. (2017). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org; searched on 13 April 2017.

Gustavs, L., Görs, M., Karsten, U. (2011). Polyol patterns in biofilm-forming aeroterrestrial green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Journal of Phycology, 47(3), 533–537.

Hagen, C., Siegmund, S., Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. European Journal of Phycology, 37(2), 217–226.

Hamaji, T., Ferris, P. J., Nishii, I., Nishimura, Y., Nozaki, H. (2013). Distribution of the sex-determining gene *MID* and molecular correspondence of mating types within the isogamous genus *Gonium* (Volvocales, Chlorophyta). PLoS ONE, 8(5), e64385.

Han, D., Wang, J., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2012). Susceptibility and protective mechanisms of motile and non motile cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) to photooxidative stress. Journal of Phycology, 48(3), 693–705.

Hata, N., Ogbonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka, H. (2001). Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. Journal of Applied Phycology, 13(5), 395–402.

Hazen, T. E. (1899). The life history of *Sphaerella lacustris*. Memoirs of the Torrey Botanical Club, 6, 211-244.

Hepperle, D. (2004). SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. http://www.sequentix.de.

Herburger, K., Holzinger, A. (2015). Localization and quantification of callose in the Streptophyte green algae *Zygnema* and *Klebsormidium*: correlation with desiccation tolerance. Plant and Cell Physiology, 56(11), 2259–2270.

Herburger, K., Karsten, U., Holzinger, A. (2016). *Entransia* and *Hormidiella*, sister lineages of *Klebsormidium* (Streptophyta), respond differently to light, temperature, and desiccation stress. Protoplasma, 253(5), 1309–1323.

Herburger, K., Lewis, L. A., Holzinger, A. (2015). Photosynthetic efficiency, desiccation tolerance and ultrastructure in two phylogenetically distinct strains of alpine *Zygnema* sp. (Zygnematophyceae, Streptophyta): role of pre-akinete formation. Protoplasma, 252(2), 571–589.

Holzinger, A., Karsten, U. (2013). Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. Frontiers in Plant Science, 4(327), 1–18.

Holzinger, A., Lütz, C., Karsten, U. (2011). Desiccation stress causes structural and ultrastructural alterations in the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust. Journal of Phycology, 47(3), 591–602.

Holzinger, A., Tschaikner, A., Remias, D. (2010). Cytoarchitecture of the desiccation-tolerant green alga *Zygogonium ericetorum*. Protoplasma, 243(1), 15–24.

Hoppert, M., Reimer, R., Kemmling, A., Schröder, A., Günzl, B., Heinken, T. (2004). Structure and reactivity of a biological soil crust from a xeric sandy soil in Central Europe. Geomicrobiology Journal, 21, 183–191.

Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., Kovar, K. (2013). Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. Biotechnology Advances, 31(1), 2–16.

Chan, K. C., Mong, M. C., Yin, M. C. (2009). Antioxidative and anti-inflammatory neuroprotective effects of astaxanthin and canthaxanthin in nerve growth factor differentiated PC12 cells. Journal of Food Science, 74(7), 225–231.

Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., Solovchenko, A. (2014). Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia). Marine Drugs, 12(8), 4504–4520.

Jyonouchi, H., Sun, S., Iijima, K., Gross, M. D. (2000). Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. Nutrition and Cancer, 36(1), 59–65.

Karsten, U., Herburger, K., Holzinger, A. (2014). Dehydration, temperature, and light tolerance in members of the aeroterrestrial green algal genus *Interfilum* (Streptophyta) from biogeographically different temperate soils. Journal of Phycology, 50(5), 804–816.

Karsten, U., Holzinger, A. (2012). Light, temperature, and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a high alpine soil crust. Microbial Ecology, 63(1), 51–63.

Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. Applied and Environmental Microbiology, 59(3), 867–873.

Krause, G. H., Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 42, 313–349.

Kristiansen, J. (2008). Dispersal and biogeography of silica-scaled chrysophytes. Biodiversity and Conservation, 17(2), 419–426.

Kuhl, A., Lorenzen, H. (1964). Handling and culturing of *Chlorella*. In: D.M. Prescott, ed., Methods in cell physiology. Vol.1, pp. 152-187.

Lee, Y.-K., Ding, S.-Y. (1994). Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). Journal of Phycology, 30, 445–449.

Lorenz, R. T., Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends in Biotechnology, 18(4), 160–167.

Lüttge, U., Büdel, B. (2010). Resurrection kinetics of photosynthesis in desiccation-tolerant terrestrial green algae (Chlorophyta) on tree bark. Plant Biology, 12(3), 437–444.

Mostafa, N., Omar, H., Tan, S. G., Napis, S. (2011). Studies on the genetic variation of the green unicellular alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) obtained from different geographical locations using ISSR and RAPD molecular marker. Molecules, 16(3), 2599–2608.

Naguib, Y. M. A. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(4), 1150–1154.

Nogami, S., Ohnuki, S., Ohya, Y. (2014). Hyperspectral imaging techniques for the characterization of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). Journal of Phycology, 50(5), 939–947.

Okai, Y., Higashi-Okai, K. (1996). Possible immunomodulating activities of carotenoids in in vitro cell culture experiments. International Journal of Immunopharmacology, 18(12), 753–758.

Pan, J. M., Haring, M. A., Beck, C. F. (1997). Characterization of blue light signal transduction chains that control development and maintenance of sexual competence in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology, 115(3), 1241–1249.

Park, J. C., Choi, S. P., Hong, M. E., Sim, S. J. (2014). Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. Bioprocess and Biosystems Engineering, 37, 2039–2047.

Park, J. S., Mathison, B. D., Hayek, M. G., Zhang, J., Reinhart, G. A., Chew, B. P. (2013). Astaxanthin modulates age-associated mitochondrial dysfunction in healthy dogs. Journal of Animal Science, 91(1), 268–275.

Peebles, F. (1909). The life history of *Sphaerella lacustris* with special reference to the nature and behavior of the zoospores. Centralblatt für Bacteriologie, Parasitenkunde und Infektions-krankheiten, Abt. 2, 24, 511-521.

Pichrtová, M., Kulichová, J., Holzinger, A. (2014). Nitrogen limitation and slow drying induce desiccation tolerance in conjugating green algae (Zygnematophyceae, Streptophyta) from polar habitats. PLoS ONE, 9(11), e113137.

Pichrtová, M., Remias, D., Lewis, L. A., Holzinger, A. (2013). Changes in phenolic compounds and cellular ultrastructure of arctic and antarctic strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after exposure to experimentally enhanced UV to PAR Ratio. Microbial Ecology, 65(1), 68–83.

Pocock, M. A. (1959). *Haematococcus* in Southern Africa. Transactions of the Royal Society of South Africa, 36, 5-55.

Proctor, V. W. (1957). Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis*. Ecology, 38(3), 457–462.

Rippka, R., Herdman, M. (1992). Pasteur culture collection of cyanobacterial strains in axenic culture. Vol.1, Catalogue of strains. 103pp.

Roháček, K., Barták, M. (1999). Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: Basic concepts, useful parameters, and some applications. Photosynthetica, 37(3), 339–363.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J., Teslenko, M. (2011). MrBayes version 3.2 manual: tutorials and model summaries. Online publication.

Sager, R., Granick, S. (1954). Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas Reinhardtii*. The Journal of General Physiology, 37, 729–742.

Saha, S. K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., Murray, P. (2013). Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology, 128, 118–124.

Saito, T., Inoue, M., Yamada, M. (1998). Control of gametic differentiation and activity by light in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant and Cell Physiology, 39(1), 8–15.

Santos, M. F., Mesquita, J. F. (1984). Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis. Cytologia, 49, 215–228.

Sarada, R., Tripathi, U., Ravishankar, G. (2002). Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. Process Biochemistry, 37, 623–627.

Sherwin, H. W., Farrant, J. M. (1998). Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. Plant Growth Regulation, 24(3), 203–210.

Siver, P. A., Lott, A. M. (2012). Biogeographic patterns in scaled chrysophytes from the east coast of North America. Freshwater Biology, 57(3), 451–466.

Smirnoff, N. (1993). Tansley Review No . 52 The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologist, 125, 27–58.

Souffreau, C., Vanormelingen, P., Verleyen, E., Sabbe, K., Vyverman, W. (2010). Tolerance of benthic diatoms from temperate aquatic and terrestrial habitats to experimental desiccation and temperature stress. Phycologia, 49(July), 309–324.

Spurr, A. S. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research, 26, 31-49.

Sun, Y., Liu, J., Zhang, X., Lin, W. (2008). Strain H2-419-4 of *Haematococcus pluvialis* induced by ethyl methanesulphonate and ultraviolet radiation. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 26(2), 152–156.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28, 2731–2739.

Tjahjono, A. E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N., Nagai, S. (1994). Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. Biotechnology Letters, 16(2), 133–138.

Triki, A., Maillard, P., Gudin, C. (1997). Gametogenesis in *Haematococcus pluvialis* Flotow (Volvocales, Chlorophyta). Phycologia, 36(3), 190–194.

Van Kooten, O., Snel, J. F. H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynthesis Research, 25, 147–150.

Versteegh, G. J. M., Blokker, P. (2004). Resistant macromolecules of extant and fossil microalgae. Phycological Research, 52(4), 325–339.

Vicré, M., Farrant, J. M., Driouich, A. (2004). Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. Plant, Cell and Environment, 27(11), 1329–1340.

Wan, M., Hou, D., Li, Y., Fan, J., Huang, J., Liang, S., Wang, W., Pan, R., Wang, J., Li, S. (2014). The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. Bioresource Technology, 163, 26–32.

Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A., Kawano, S. (2013). Three-Dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. PLoS ONE, 8(1), e53618.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (pp. 315–322).

Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. The Journal of Experimental Biology, 208, 2819–2830.

Zhang, H., Wang, W., Li, Y., Yang, W., Shen, G. (2011). Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii.* Biomass and Bioenergy, 35(5), 1710–1715.

Zhang, L., Li, Y., Liu, J., Leegood, R. (2016). Complete inactivation of photosynthetic activity during desiccation and rapid recovery by rehydration in the aerial microalga *Trentepohlia jolithus*. Plant Biology, 18(6), 1058–1061.

Zhang, W., Wang, J., Wang, J., Liu, T. (2014). Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. Bioresource Technology, 158, 329–335.