

Život ve skleníku aneb Rozsivky v akci

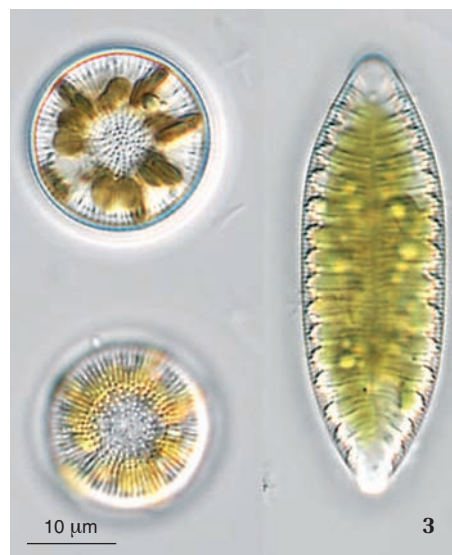
Rozsivky (Bacillariophyceae, Diatomeae), mikroskopické jednobuněčné řasy s pevnou křemičitou schránkou, se vyskytují ve všech sladkovodních i mořských ekosystémech (viz také Živa 2008, 1: 10–11). Představují dobré indikátory kvality vody a slouží k biomonitoringu povrchových vod a k paleolimnologickým rekonstrukcím globálních změn, včetně klimatických. Kromě toho jsou rozsivky pozoruhodné diploidní organismy s unikátním životním cyklem, v němž se střídá vegetativní dělení a pohlavní rozmnožování. Jak si v článku podrobně popíšeme, fylogeneticky starší centrické rozsivky se rozmnožují oogamií za účasti pohyblivých spermatických buněk. Rozmnožování penátních rozsivek je naproti tomu izogamické a vykazuje velkou rozmanitost v mnoha detailech procesu. Většina rodů rozsivek ale dosud nebyla při rozmnožování pozorována, takže lze v budoucnu očekávat další překvapivá odhalení.

Základní charakteristiky rozsivek a postavení mezi mikroorganismy

Rozsivky jsou jednou z nejvýznamnějších skupin hnědé vývojové linie řas, kterou nazýváme Stramenopila (o moderním pojetí systému sinic a řas v Živě 2016, 6: 299–301 a CXXXIII–CXXXVI). Spolu s nimi patří do této vývojové linie zlativky (Chrysophyceae a Synurophyceae), dále Eustigmatoephyceae, chloromonády (Raphidophyceae), chaluhy (Phaeophyceae) a různobrvky neboli žlutozelené řasy (Tribophyceae, dříve Xanthophyceae). Odhaduje se, že rozsivky produkují asi 20 % kyslíku na Zemi a zahrnují ca 100 tisíc druhů, z nichž bylo dosud platně popsáno 12 tisíc. Jsou všudypřítomné, žijí v tekoucích i stojatých sladkovodních biotopech, rostou v mimovodním prostředí (aerofyticky) a dokonce mohou být fykobiontem v lišejníku. V mořském fytoplanktonu dominují spolu s obrněnkami a vápenatými bičíkovci. Rámcová směrnice o vodě Evropské unie Water Framework Directive využívá rozsivky k monitorování čistoty povrchových vod. Schránky těchto řas uložené v sedimentech jezer slouží

k rekonstrukci historických změn lokálních i globálních (obor paleolimnologie), jako jsou eutrofizace (zvyšování obsahu živin), acidifikace (okyselování jezer vlivem znečištěného ovzduší), kolísání výšky vodní hladiny a změny teploty (globální oteplování).

Od ostatních mikroskopických řas, které jsou v americké literatuře označovány soft algae (měkké řasy), se liší pevnou schránkou z amorfni formy oxidu křemíku podobné opálu (obr. 1). Protoplast rozsivek tak žije v těsném „skleněném obydlí“, což vyžaduje řadu unikátních adaptací. Badatelé minulých století byli fascinováni schránkou a jejími strukturami a založili na její morfologii celou taxonomii. První rozsivku (pravděpodobně šlo o zástupce rodu *Tabellaria*) popsal neznámý autor v dopise adresovaném Královské společnosti v Londýně v r. 1703 a další rozvoj závisel na vývoji zobrazovacích technik světelné a později elektronové mikroskopie (obr. 2). Zatímco u některých mikroskopických řas byl morfologický koncept druhu již překonán a pro popisy nových druhů jsou



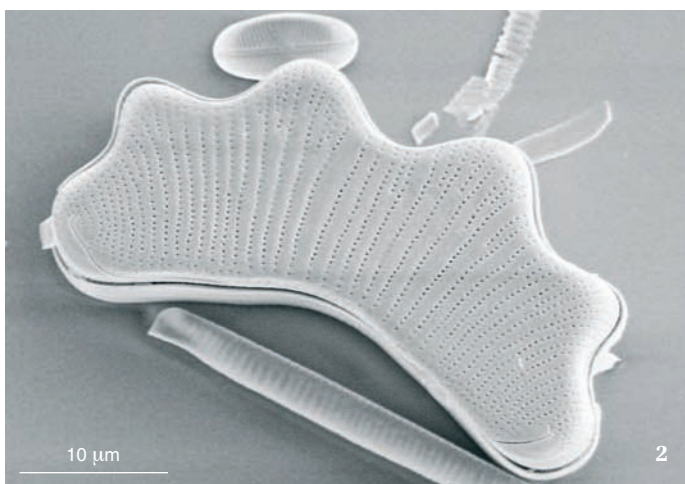
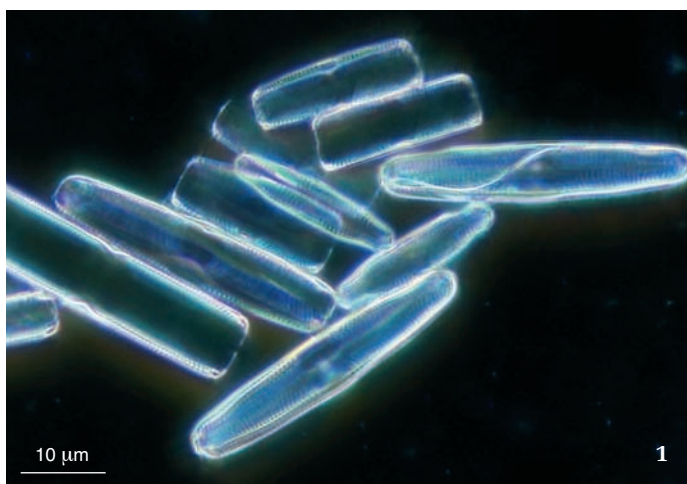
vyžadována molekulární data, u rozsivek dosud převažují popisy druhů výhradně na základě morfologie schránky. Je to dáno silnou „frankfurtskou“ školou prof. Horsta Lange-Bertalota, autora a editora většiny rozsivkových určovacích klíčů publikovaných v posledních 40 letech, ale také obtížemi, které přináší aplikace biologického konceptu druhu na organismus s tak nedobytnou schránkou. Moderní polyfázický přístup ke zkoumání diverzity mikroorganismů apeluje na kombinování všech známých charakteristik – morfologie, ultrastruktury, rozmnožování, ekologie, genetiky a fylogenetiky.

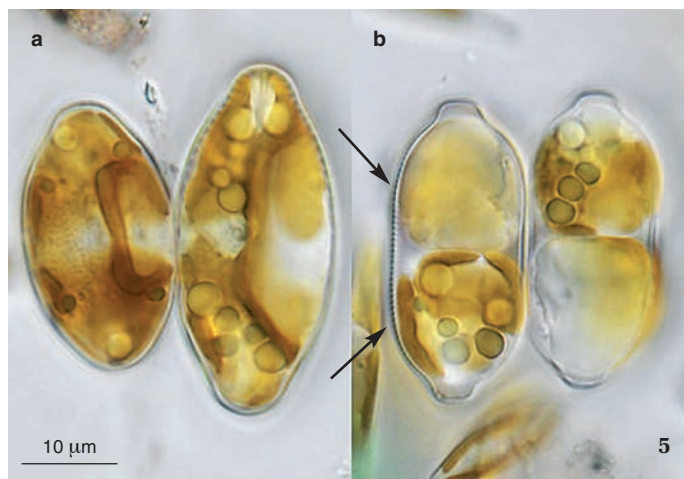
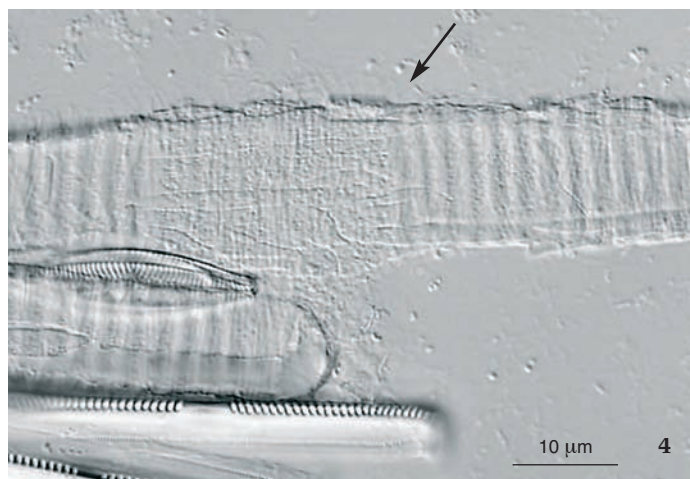
Tvar a souměrnost schránky vedly k hrubému rozlišení rozsivek na dvě skupiny – centrické většinou s paprscitou souměrností (mimo mořské zástupce) a penátní s dvostrannou (bilaterální) souměrností (obr. 3). Většina centrických rozsivek je přizpůsobena planktonnímu způsobu života, zatímco penátní žijí většinou na dně a na substrátech ponořených ve vodě (kameny, rostliny nebo bahno). Nejnovější výzkumy s použitím molekulárních metod

1 Vypálené schránky rozsivek rodu *Pinnularia* ve světelném mikroskopu (SM). Technika temného pole (blíže také v Živě 2017, 6: CLXII–CLXV)

2 Schránka rodu *Eunotia* ve skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM)

3 Příklad centrické (paprscitě souměrné, vlevo) a penátní rozsivky (dvostranně neboli bilaterálně souměrné, vpravo)





naznačují, že penátní rozsivky se vyvinuly z vývojově starších centrických rozsivek. Podivuhodné struktury schránky jsou lépe viditelné na mrtvých buňkách bez protoplastu, proto badatelé začali před pozorováním rozsivky vypalovat silnými oxidačními činidly (peroxidem vodíku nebo směsí kyseliny dusičné a sírové) a celé generace diatomologů se tak staly ohledávající mrtvých schránek. To bylo také důvodem, proč naše vědomosti o cytologii, biologii a rozmnožování rozsivek začaly zaostávat za poznatky o ostatních řasách. Výjimkou byli badatelé jako L. Geitler, H. A. von Stosch, C. Mereschkowsky, kteří si všímali živého obsahu schránek, variability počtu a tvaru chloroplastů, struktury buněčného jádra a zejména rozmnožování, jež bylo zpočátku chybně vysvětlováno na základě obecných zkušeností z botaniky. Zvláštní způsob rozmnožování rozsivek byl poprvé správně interpretován nezávisle v pracích E. Pfützera a J. D. MacDonalda (1869). Teprve v posledních desetiletích se této problematice dostává zasloužené pozornosti. Neustále jsme překvapováni obrovskou různorodostí pohlavního rozmnožování rozsivek, které je v detailech rodově a mnohdy druhově specifické.

Unikátní způsob rozmnožování

Mezi mikroskopickými řasami ojedinělý gametický životní cyklus rozsivek zahrnuje vegetativní dělení a pohlavní rozmnožování. Vegetativní buňky jsou diploidní, jedinou haploidní fází životního cyklu jsou gamety. Nepohlavní část, prosté dělení na dvě buňky dceřiné, je komplikována křemičitou schránkou. Schránka se skládá ze dvou částí (epitéky a hypotéky), které do sebe zapadají. Při dělení získá každá dceřiná buňka jednu polovinu schránky a dotvoří si vždy menší část – hypotéku. Tímto opakovaným procesem (Pfitzer-MacDonaldovo pravidlo) a také kvůli vyřazování velkých buněk z populace (různými mechanismy) se velikost schránek u části populace většiny rozsivek postupně zmenšuje, až dosáhne prahových hodnot, které představují zhruba třetinu maximální velikosti daného druhu. Rozsivka se v této fázi stává pohlavně zralou a může se rozmnožovat sexuálně, pokud najde vhodného partnera a příhodné ekologické podmínky. Tato schopnost jí zůstává až do další prahové velikosti, kdy je schránka příliš malá, buňky již nejsou schopny se dále dělit a populace vymírá. Pohlavní rozmno-



žování centrických rozsivek je oogamické, splývá při něm nepohyblivá, obvykle větší vaječná buňka s pohyblivou jednobíčíkatou spermatickou buňkou. Penátní rozsivky se rozmnožují izogamicky, tedy splýváním stejně velkých gamet, které vznikají ve dvou těsně spojených párujících se buňkách – gametangích. Gamety penátních rozsivek mají omezenou pohyblivost, většinou vykazují měňavkovitý (améboidní) pohyb a nemají bičík. Zvláštní tenká vlákna, umožňující lepší pohyblivost, byla nedávno objevena u penátní rozsivky rodu *Pseudostaurosira* (Sato a kol. 2011). U některých penátních rozsivek je pohyblivá jen část gamet, ty označujeme jako aktivní (samčí) a proces nazýváme behaviorální anizogamií (např. u rodů *Sellaphora*, *Neidium*). V procesu pohlavního rozmnožování rozsivek byla prokázána i produkce feromonů, jež usnadní vyhledání sexuálního partnera (Bondocová a kol. 2016).

Pohlavní rozmnožování je pro rozsivky zásadní nejen kvůli výměně genetické informace, ale také pro výše zmíněnou obnovu původní velikosti po předchozím zmenšení vlivem vegetativního dělení. Po pohlavním procesu zygota (auxospora) zvětšuje svůj objem a uvnitř se vytvoří iniciální buňka, velikostí výrazně převyšující rodičovské buňky, které vstoupily do pohlavního procesu. Tyto velké buňky byly právě prvními badateli chybně považovány za sporangia, což odpovídalo tehdejšímu zkušenostem z botaniky. Obecné schéma životního cyklu rozsivek má řadu výjimek a pohlavní chování jednotlivých rodů se liší v detailech, jako jsou způsob a poloha při párování (obr. 5 a 11), přítomnost či nepřítomnost slizu (obr. 6), poloha zvětšujících se (expandujících) auxospor, tvar a struktura obalů auxospor (obr. 4 a 7) atd. Zatímco některé druhy jsou schopny pohlavního rozmnožování v rámci klono-

4 Zborcené perizonium (komplexní obal zygoty penátních rozsivek) po vypálení v 30% peroxidu vodíku (blíže v textu). Snímek ze světelného mikroskopu

5 Párující se buňky – párování bokem (miskou k pozorovateli). Počáteční stadium u rodu *Placoneis* (obr. a) a pokročilejší stadium po vytvoření gamet (šipky) u rodu *Neidium* (b)

6 Rozmnožování ve slizu (neobarvená světlá část). Vidíme prázdné schránky rodičovských jedinců, jednu časnou auxosporu (šipka) a dvě odumřelé gamety (hvězdičky), kterým se nepodařilo splýnout. SM, tušový preparát

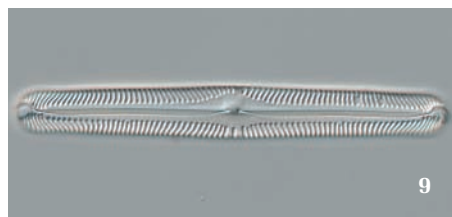
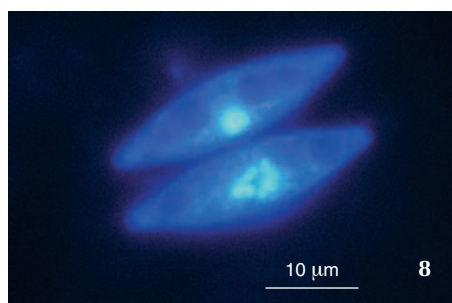
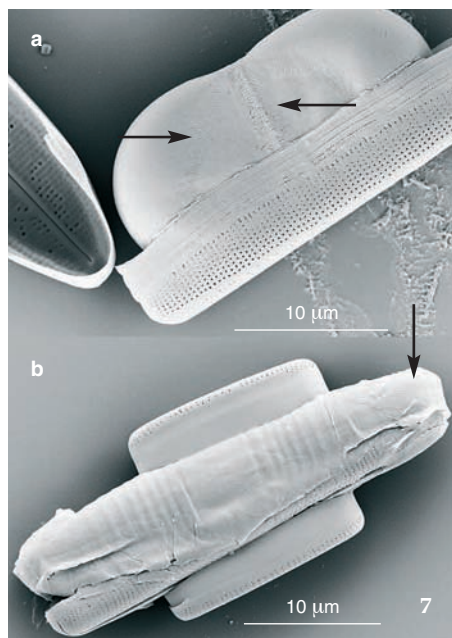
7 Uniparentální auxosporulace (z jedné rodičovské buňky). Velmi mladá zygota rodu *Neidium* (obr. a) uvnitř jedné části schránky, vzniklá pedogamicky (blíže v textu; SEM). Při podrobnějším prohlížení jsou vidět okraje šupinovitých struktur (šipky), které kryjí koncové a středové části zygoty – povijan (incunabula). Iniciální buňka *Sellaphora marvanii* (b) po prvním dělení ve zbytcích roztrženého perizonia, mezi dvěma polovinami rodičovské schránky (SEM). Struktury povijanu ukazuje šipka. Druh byl popsán z rybníka Černý na Dokesku a nese jméno význačného moravského diatomologa Petra Marvana.

8 Párující se buňky rodu *Navicula* v procesu meiotického dělení jader. Snímek z fluorescenčního mikroskopu, barveno jaderným barvivem DAPI

9 a 10 Sladkovodní rozsivka *Pinnularia* – prázdná schránka (SM, obr. 9), buňka s protoplastem a jádrem barveným DAPI ve fluorescenci (10)

11 až 13 Párování miskami u rodu *Pinnularia*. Počínající gametogeneze (obr. 11), kdy jsou gamety těsně po rozdělení buněčného obsahu uloženy podélně vedle sebe. Při pokročilejší gametogenezi (12) se gamety již přeskupily a leží každá v jednom konci gametangia. Uvolněné gamety (13) před splýváním

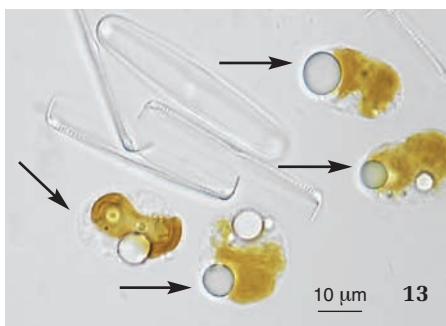
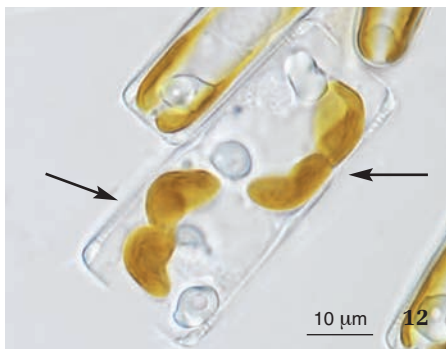
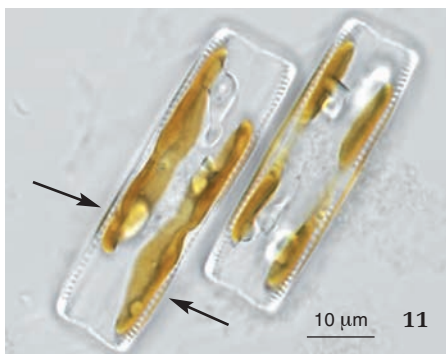
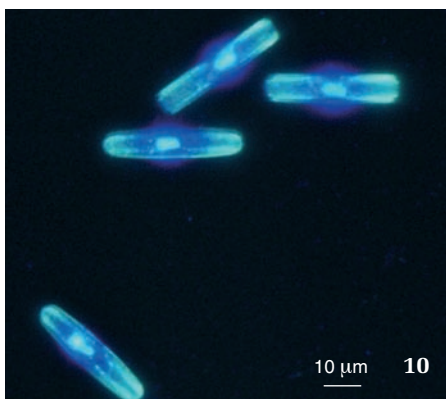
14 Zralé auxosporu rodu *Pinnularia*, obklopené prázdnými schránkami rodičovských buněk. Snímky A. Pouličkové



cyklu rozsivek je nutné znát chování jader, které můžeme studovat ve fluorescenčním mikroskopu po jejich obarvení fluorescenčním barvivem DAPI (obr. 8 a 10).

Proces biparentální, heterotalické auxosporulace si ukážeme na modelové rozsivce *Pinnularia* cf. *gibba*. Buňky se párují tak, že jsou k sobě přiloženy miskami, k pozorovateli leží bokem (obr. 11; na rozdíl od párování bokem u rodů *Placoneis* a *Neidium*, obr. 5). Jádra párujících se buněk procházejí dvěma meiotickými děleními, stávají se gametangii a v každém gametangiu vznikají dvě gamety (obr. 12). Celá konfigurace je uložena v ochranném slizu produkovaném rodičovskými buňkami. Slizy jsou dobře patrné z preparátu obarveného černou tuší (obr. 6). Uvolněné gamety opakčně sexuálně orientovaných gametangií (obr. 13) spolu splývají a vytvoří dvě zygoty (auxospory), které se následně v obou směrech podélně protahují, až dosáhnou maximální délky daného druhu (obr. 14). Popsaný proces od párování po dozrávání auxospor trvá asi 9 dní. Zralé auxospory jsou chráněny perizoniem (obr. 4), uvnitř něhož se vytvoří iniciální buňka, která opustí perizonium jedním koncem.

Při automixii vzniká auxospora z jedné rodičovské buňky a může mít podobu autogamie, pedogamie nebo apomixie. Pro-



bíhá-li autogamie, jádro se rozdělí a následně splyne, protoplast se procesu neúčastní. Při pedogamii dojde k rozdělení jádra i protoplastu na dvě gamety, které splynou v rámci jednoho gametangia. V několika případech byla u rozsivek popsána i apomixie (proces bez redukčního dělení jader). Původně se předpokládalo, že k automixii u rozsivek dochází velmi vzácně, zdá se však, že byla spíše přehlížena. Výzkum

v posledních letech přinesl desítky pozorování a je pravděpodobné, že uniparentální auxosporulace je evolučně mladší a vyvinula se z biparentální heterotalické auxosporulace (Pouličková a kol. 2015).

Nové poznatky s evolučními souvislostmi byly zjištěny i v případě stavby a složení obalů auxospor. Centrické rozsivky mají kulovité auxospory, pokryté lehce zkřemenělými šupinkami, zatímco auxospory periatních rozsivek chrání komplexní obal – perizonium, který umožňuje jejich zvětšování ve směru podélné osy (bipolární, viz výše) a zachování dvojstranné souměrnosti. Perizonium může být doplněno o další jemně zkřemenělé elementy, označované jako incunabula (česky povijan). Auxospory rodu *Pinnularia* a *Nitzschia* vypadají jako omotané provázkem, u rodů *Neidium* a *Sellaphora* byly objeveny útvary podobné šupinám (obr. 7).

Studium sexuální reprodukce rozsivek není jednoduchou záležitostí. V přírodě trvá zmenšování populace několik let a pohlavní rozmnožování pak proběhne v několika dnech, proto na něj nemusíme vůbec narazit. Párovací typy („samčí“ a „samičí“ označované + a -) nejsou v přírodě zastoupeny rovnoměrně, takže pro rozsivku není snadné najít si opačně laděného partnera, který navíc splňuje velikostní parametry pohlavně zralého jedince. U většiny rozsivek nejsou známy specifické podmínky nutné pro sexuální proces, ani spouštěče sexuálního chování. Většina publikovaných pozorování tohoto chování rozsivek se odehrává v laboratorních podmínkách. Nejříve je třeba izolovat desítky klonových kultur, poté provedeme experimentální křížení (každý s každým) a rozdělíme klony na plus a minus. Měříme velikost buněk jednotlivých klonů, protože nezáměr o pohlavní rozmnožování může pouze znamenat, že klon není ještě v potřebném velikostním rozmezí. Následně pracujeme s kompatibilními klony, vytváříme směsné kultury dvou párujících se klonů v Petriho miskách a pozorujeme je zhruba v hodinových intervalech neinvazivně v inverzním mikroskopu. Snažíme se zachytit jednotlivé fáze – párování, gametogenezi, splývání gamet, expanzi auxospor. Ve sledování musíme pokračovat 24 hodin, protože k uvolnění gamet může dojít čtyři hodiny po půlnoci a o dvě hodiny později už je vše ve fázi zygoty. Nejčastěji je přehlíženo rozmnožování u homotalických druhů, které se pohlavně množí v rámci jednoho klonu. Proces může být tak rychlý, že během několika dnů je kultivační nádoba plná velkých postiniciálních buněk.

I když bylo v posledních letech publikováno několik stovek prací o pohlavním rozmnožování rozsivek, stále jsme při něm většinu neměli možnost pozorovat. Každý nový poznatek přináší odpovědi i nové otázky. Proč vývojově mladší penátní rozsivky opustily vývojově dokonalejší oogamické rozmnožování? Proč gamety ztrácejí bičíky a schopnost pohybu? Výzkum rozsivek stále čeká na nadšené, pracovitě a pečlivě badatele.

Výzkum byl financován Grantovou agenturou ČR (projekt 206/07/0115).

Použitá literatura uvedena na webu Živý.