

Dr. S. PRÁT:

Terminála a regenerace mořských řas.

Ústav pro fyziologii rostlin Karlovy university.

Toto sdělení navazuje ve dvou směrech na činnost profesora dr. B. NĚMCE. Na činnost organizační tým, že tyto pokusy byly provedeny na ostrově Rabu v Dalmácii, kde už před válkou prof. NĚMEC navrhoval zřízení biologické stanice; částečné uskutečnění tohoto plánu nastalo založením společnosti Rab, za předsednictví prof. dr. NĚMCE, když p. A. MACHAŘ dal k dispozici pracovní místnosti a umožnil pobyt na Rabu. Vedle toho jsou tyto pokusy přímým navázáním na serii experimentálních studií profesora NĚMCE o regeneraci, speciálně na jeho pokusy o regeneraci u *Stypocaulon* (NĚMEC 5).

Materiál a metodika.

Látky, jejichž vliv na regeneraci jsem zkoumal, je možno rozdělit do dvou skupin:

1. Poněvadž předběžné pokusy ukázaly regeneraci i v roztocích o vysokém osmotickém tlaku, byla sledována regenerace v mořské vodě, jejíž osmotický tlak byl přidáním různých látek zvýšen.

2. Poněvadž látky snižující povrchové napětí působí urychlení růstu, bylo vybráno několik látek snižujících povrchové napětí a sledován jejich vliv na regeneraci.

Postup při pokusech byl velmi jednoduchý. Čerstvě z přírody (nejčastěji ze zálivu Eufamija pod biskupstvím) donesený materiál byl rozstříhán na $\frac{1}{2}$ až 1 cm dlouhé úseky; tyto byly přeneseny do misek s připravenými roztoky (nádobky na 20 až 200 ccm roztoku) a v intervalech pozorovány.

1. Vliv osmotické hodnoty na regeneraci mořských řas.

Když se prof. dr. B. NĚMEC (5) na jaře roku 1924 ve Villefranche zabýval studiem regenerace u *Stypocaulon*, vybídl mne ke sledování plasmolysy u této řasy. Při tom jsem zjistil velmi zvláštní chování této řasy v hypertonickém roztoku (sacharosa v mořské vodě): v plasmolysovaných buňkách se dělila jádra a resulytovaly drobné buňky se šikmými přehrádkami (PRÁT 7).

Na Rabu (jaro a léto 1931) jsem v těchto pokusech pokračoval a zjistil, že dělení jader a buněk není specifická reakce na působení cukru (sacharosy), nýbrž že je to reakce na zvýšení osmotické hodnoty prostředí (osmoreakce, případně osmomorfosa).

Dělení jader (bez přehrádek) a pak tvoření malých nepravidelných buněk s šikmými přehrádkami se u *Stypocaulon* objevovalo v těchto roztocích:

m/2 sacharosa, m/3 sacharosa.

m/5, m/4 glycerin.

m/2 glycerin, někdy i m glycerin.

I když byly roztoky často měněny (zvláště roztoky sacharosy bylo nutno obnovovati), objevovalo se po 8 až 10 dnech na vlákních hodně slizu, v němž se zachytily bakterie. Působením těchto pak řasy trpěly, asi po 20 dnech odumíraly.

m/4 $MgCl_2$; terminály odumírají, ale objevují se v meristemu hustě šikmá dělení až do regenerované terminály.

Stypocaulon v roztocích sacharosy v mořské vodě rostl lépe než kontrolní v mořské vodě, jak ukazuje tento případ:

Terminála	kontrola (mořská voda)	sacharosa :		
		m/5	m/4	m/3
		v mořské vodě		
	normální	často odumírá	často odumírá	často odumírá, šikmá dělení
Normální meristem, počet vrstev buněk	2—4	jen regenerovaný meristem		
Počet vrstev buněk vrcholového rege- nerátu	—	přes 50 vrstev (2—3 mm)	13 vrstev	16 vrstev
meristem regenerátu má vrstev	—	3—5	3—5	2—4
Postranní regenerace (větve)	—	16—35 vrstev	—	—
Regenerace na basi, počet vrstev buněk	±	2—5	3—18	5—10

Vliv sacharosy na regeneraci u řasy *Dictyota* ukazuje tento pokus:

V kontrolní mořské vodě a v roztoku m/5 sacharosy v mořské vodě tvořily rozstříhané pentlice řasy *Dictyota* za 6 dní první terminály. V koncentrovanějších roztocích se terminály tvořily později. Výsledek po 20—22 dnech:

Kontrola: hustě regenerující pentlice, délky 1—6 mm, začíná bifurkace. Z řezné plochy vyrůstají rhizoidy.

m/5 sacharosa: hustě regenerující pentlice délky 1—4 mm, ale nevětví se (nalezena jen jedna bifurkace). Rhizoidy.

m/4 sacharosa: dosti hustě regenerující pentlice délky 1—3 mm. Žádné rhizoidy.

m/3 sacharosa: hustě regenerující pentlice délky 1 mm. Žádné nebo málo rhizoidů.

m/2 sacharosa: skupiny diferencovaných terminál bez dělení.

Dictyota v silně hypertonických roztocích glycerinu odumírala a to: m glycerin za 6 dní odumřelá. 3/4 m glycerin 6 dní odumírá.

Ve zředěnějších roztocích glycerinu v mořské vodě nastávala regenerace (výsledek pokusu po 10 dnech):

m/5 glycerin: hustě vysoké terminály, někde vytvořily i 1—4 vrstvy buněk; řídce 1—3 buněčné rhizoidy.

m/4 glycerin: dosti hojně terminály ve skupinách.

m/3 glycerin: dosti diferencovaných terminál, ale dále se nedělí.

m/2 glycerin: terminály se začaly diferencovati, ale pak všechno odumřelo.

3/4 m glycerin: v 6 dnech odumírá.

m glycerin: odumřelé bez regenerace.

m/4 MgCl_2 : ojediněle celé skupiny sousedních terminál, některé hypertrofické, ale bez dělení. Velmi ojediněle z řezu slabé rhizoidovité prodloužení.

Některé pokusy byly provedeny s vrcholy stélek, jež měly neporušené terminály; asi $\frac{1}{2}$ cm až 1 cm dlouhé vrcholy pentlic byly pěstovány v různých roztocích. Tu se ukázalo, že i při normálně fungující (dělicí se) terminále se v různých částech stélky diferencovaly buňky v nové fungující terminály, takže pentlice se pak bohatě větvily úzkými přírůstky. V roztocích koncentrovanějších se sice terminály diferencovaly, ale dále nedělily. Aby bylo odlišeno tvoření nových terminál při zachované původní, jsou tyto označovány jako aditivní na rozdíl od terminál regenerovaných po odstranění (nebo zabránění funkce) terminály původní. *Dictyota* tvoří aditivní terminály v těchto hypertonických roztocích (v mořské vodě): m/2 sacharosa, m/5 glycerin, m/4 glycerin, m/3 glycerin, (m/2 glycerin), m/4 MgCl_2 .

Ectocarpus tvořil v m/3 glycerinu hodně rhizoidovitých výběžků, ale někdy odumíral. V m/4 glycerinu se tvořily ojediněle krátké větvičky. V roztocích koncentrovanějších (m/2, m glycerin) *Ectocarpus* odumíral.

V m/8, m/6, m/5, m/4 i někdy m/2 sacharosy nastávalo přeslizovatění, tvořila se úzká vlákna, úzké, tenké, dlouhé chlupy. V m/4 MgCl_2 vyháněly husté pokroucené postranní větve (asi poloviny šířky normální), větvily se až do 3. stupně.

2. Působení látek snižujících povrchové napětí.

Povrchové napětí bylo měřeno metodou adhesního platinového kroužku. Roztoky byly změřeny jednak před osazením řasami, jednak v určitých intervalech byla část roztoku nutná pro měření z pokusné nádoby odlita na hodinové sklíčko. Povrchové napětí čisté mořské vody se skoro nelišilo od povrchového napětí destilované vody; znečištěná mořská voda (v přístavu) měla povrchové napětí silně snižené. Poněvadž při pěstování řas povrchové napětí se měnilo a silně kolísalo, nejsou naměřené hodnoty udávány. Kolísání bylo tak nepravidelné, že by z uváděných hodnot nebylo možno tvořiti dedukce. Přece však ve shodě s jinými pokusy (PRÁT a MALKOVSKÝ 8, HERČÍK 1) je možno říci aspoň tolik, že snížením povrchového napětí byla regenerace urychlována (růst stimulován).

Poněvadž HERČÍK před nedávnem sestavil přehled literatury o významu povrchového napětí pro biologii, je možno na tento seznam odkázati (HERČÍK 2) a není třeba uváděti podrobný seznam literatury.

V roztoku saponin crudum (MERCK) koncentrace 0.05% a 0.005% *Dictyota* odumírala. V koncentraci 0.0005% byla regenerace i diferenciace aditivních terminál stimulována. Je-li povrchové napětí čisté mořské vody označeno 100%, bylo povrchové napětí 0.0005% roztoku saponinu na začátku pokusu 92%.

Regenerující pentlice *Dictyota* v 0.0005% saponinu v mořské vodě měly za 16 dní 10—20 řad buněk proti 5—12 řadám kontroly, po 30 dnech byly regenerované pentličky kontroly dlouhé 2—6 mm se začátkem bifurkace, pentličky v saponinu byly dlouhé 6—10 mm s hojnou vyvinutou bifurkací. Růst v roztoku 0.00005% saponinu se podobal kontrole v mořské vodě.

Stypocaulon se choval podobně jako *Dictyota*.

V 0.1% roztoku kyseliny olejové pentlice řasy *Dictyota* částečně odumíraly, částečně regenerovaly. V 0.01% se tvořily aditivní terminály, regenerace byla snad o málo pokročilejší nežli kontrola. V roztoku 0.001% a 0.0001% kyseliny olejové *Dictyota* regenerovala stejně jako v kontrolní mořské vodě. Ale později (mezi 14 až 30 dny) se objevilo urychlení diferenciace terminál (aditivních) i větvení.

Stypocaulon se choval podobně jako *Dictyota*.

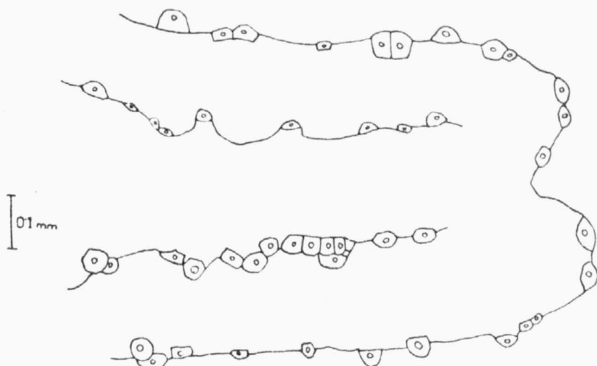


Fig. 1. The thallus of *Dictyota* after 10 days in m/2 glycerol. Many new terminal cells appear at the periphery. Two parts from another ribbon inside the thallus are drawn. The line = 0.1 mm.

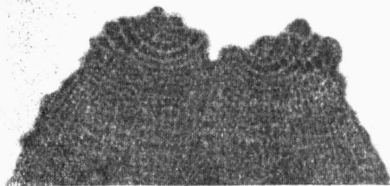


Fig. 2. Thallus of *Dictyota* after 10 days in m/4 $MgCl_2$ in sea water. Differentiation of new terminal cells occurs, but these undergo no further growth (division) unless transferred into seawater.

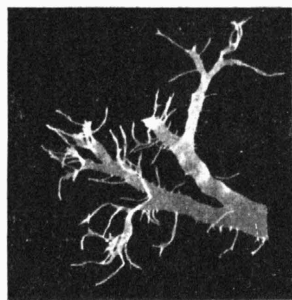


Fig. 3. Thallus of *Dictyota* after 20 days in 0.001% oleic acid in seawater. Many new terminal cells are seen, and small ribbons of regenerated tissue.

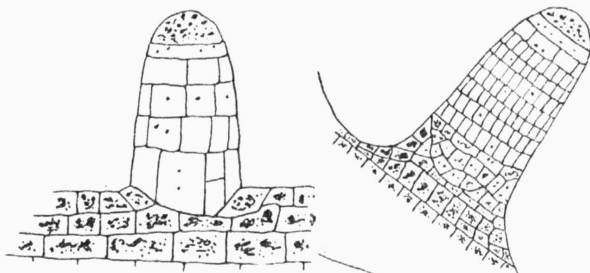


Fig. 4. Thallus of *Dictyota* cultivated in sea water. Stained with brilliant cresyl blue. The terminal cell and the old parts of the thallus are stained (physodes a deep blue). The new parts of the thallus which have been produced by divisions of the terminal cell, contain many physodes (but these do not stain). Only stained physodes are shown in the figure.

Rozpuštěním preparátu Lecithin ex ovo MERCK v mořské vodě byl získán silně kalný roztok (celková koncentrace 0.4%). Po sedimentaci byly jeho ředěním získány roztoky další. Jejich povrchové napětí bylo na začátku pokusu jen o málo nižší nežli povrchové napětí mořské vody. V roztoku zředěném desetkrát *Dictyota* odumírala, v roztoku zředěném stokrát a tisíckrát regenerovala stejně jako kontrola, diferencovalo se více terminál.

Stypocaulon v roztoku zředěném desetkrát neodumíral, ale nerostl. V roztoku zředěném desetkrát a stokrát byl růst a regenerace stejné nebo o málo lepší nežli v kontrole.

Všechna měření velmi zřetelně ukázala, že není možno prováděti pokusy o působení povrchového napětí prostředí na organismy tak, že je přeneseme do určitého (známého) roztoku, v němž je chováme. V každém případě povrchové napětí velmi silně kolísalo. Pro tyto pokusy by bylo nutno buďto naléztí prostředí, jehož povrchové napětí by bylo nějakým způsobem ustáleno, snad obdobně, jako regulátory reakce udržují konstantní pH.

Regulační schopnost sera vůči snížení povrchového napětí uvádí dr. Noüy 1926 (HERČÍK 1, str. 223). Nebo by bylo nutno prováděti tyto pokusy v roztoku stále obnovovaném, kontinuálně protékajícím kulturou. Provedené pokusy ukazují, že látky snižující povrchové napětí mohou urychlovati regeneraci a růst mořských řas, ale nepřipouštějí dedukce o kvantitativních vztazích.

Regenerace a terminála.

V některých případech podněty zvýšení (urychlení) buněčného dělení mohou býti identické s urychlením regenerace (OLTMANN 6). U některých hnědých řas však jsou to pochody protichůdné, poněvadž první podmínkou regenerace není rozrýhování:

U *Sphacelarií* jde při restituci vrcholu nikoli o vytvoření množství nových buněk meristematických, nýbrž o vytvoření nové velké buňky terminální. Proto je možno souditi, že podnět vybarvující regeneraci je rozdílný od podnětu vybarvujícího dělení buněčné, nebo jím aspoň může býti (NĚMEC 5, str. 333). S tím souhlasí zmíněná diferenciace množství terminál u *Dictyota*, jež se pak někdy nedělily.

U řasy *Dictyota* je celkem stejný případ jako u *Sphacelariaceí*; při regeneraci se jedná o produkci jedné veliké, specialisované terminály. U této řasy se také velmi jednoduchým způsobem podařil důkaz, že tato terminála je také látkově specialisována, že podržuje svou individualitu a že buňky vznikající z ní dělením nedostávají úměrnou část z látkových zásob terminály, nýbrž jsou stavěny z nově tvořených látek. Je možno demonstrovati to tímto způsobem: Fysody stélky se rychle a intenzivně vitálně barví (modř brilantkresylová, modř toluidinová, neutrální červeně i jiná barviva).

Když pěstujeme zbarvenou stélku dále v čisté mořské vodě, tvoří se v několika dnech nové postranní pentlice. Při tom jejich terminála (nově diferencovaná) je stále intenzivně zabarvena. Také fysody v původních buňkách mateřské stélky zůstávají intenzivně zabarveny. Ale nově vytvořené buňky postranní rostoucí pentlice obsahují jen sem tam ojediněle zbarvené zrnko. Velmi markantní rozdíl je nejlépe patrný podle obrázku (č. 4.). Když modře zbarvené stélky v tomto stadiu dobarvíme neutrální červení, zůstávají původní fysody modré, v nově diferencovaných buňkách postranní pentlice se však zbarví červeně; to je důkaz, že v těchto buňkách fysody v normálním množství jsou. Původní zbarvené fysody byly zadrženy při dělení v terminále, v nově oddělených buňkách byly vytvořeny fysody nové. Tato pozorování jsou významná pro oceňování individuality a látkové specialisace terminály (embryonálních buněk).

Nechci tento případ paralelisovati přímo s MIEHEOVOU archiplasmou; je však jisto, že se jedná o „heterogenní“ dělení, při němž nastává diferenciace v archiplast a trofoplast, podobně, jak uvádí JOST (3) pro diferenciaci při dělení typu *Chara*.

Případy šikmých buněčných přehrádek u *Stypocaulon* upomínají na nestejnoměrná buněčná dělení popsaná NĚMCEM (4) po působení narkotik, hlavně chloralhydrátu. Zdá se však, že *Stypocaulon* je do té míry případem zvláštním, poněvadž různé vlivy obyčejně jaderné a buněčné dělení zdržující (plasmolysa, narkosa) vedou v prvním stadiu k podnícení intenzivního rýhování buněk (ovšem nepravidelné orientace — hypertonické roztoky, PRÁT 7, chloralhydrát — NĚMEC 5, str. 332).

Podstatný rozdíl mezi kořeny a *Stypocaulon* je ten, že šikmé přehrádky na př. v kořenech bobu značí poruchy před zastavením mitosy, kdežto u *Stypocaulon* jsou drobné buňky se šikmými přehrádkami výsledkem stimulace dělení po působení plasmolytika nebo chloralhydrátu.

The terminal cell and the regeneration of marine algae.

In *Stypocaulon* a hypertonic medium stimulates cell division, and causes the division of nuclei and the production of small irregular cells with oblique walls in protoplasts which are contracted to a considerable degree. Solutions of m/5 and m/4 sucrose in sea water stimulate regeneration and growth of *Stypocaulon*.

In *Dictyota* new terminal cells become differentiated within the original terminal cells in the solutions: m/2 saccharose, m/5, m/4, m/3, m/2 glycerol, m/4 $MgCl_2$, 0.0005% saponin, 0.01%, 0.001%, (0.0001%) oleic acid.

The lowering of the surface tension of the medium accelerates regeneration in some marine algae; but the surface tension of the culture solutions changes irregularly, and so no quantitative relations can be stated; the buffering of the surface tension in the culture or cultivation in streaming solutions would be necessary.

In the *Sphacelariaceae* (and in *Dictyota*) the stimulus for cell division is a different one from the stimulus for regeneration (NĚMEC 1925). The terminal cell of *Dictyota* is constitutionally specialised and preserves the specialisation; this is shown by vital staining (see fig. 4.).

Plant Physiology Laboratory, Charles University.

LITERATURA.

1. HERČÍK, F., Význam povrchového napětí pro vzrůst živé hmoty. Biologické listy 16: 218—228, 1931.
2. HERČÍK, F., Surface tension in biology. Protoplasma 14: 142—160, 1932.
3. JOST, L., Die Determinierung der Wurzelstruktur, Zeitschr. f. Bot. 25: 481—522, 1932.
4. NĚMEC, B., Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere zytologische Fragen. Jena 1910.
5. NĚMEC, B., Regenerace u *Stypocaulon*. Pamětní spis ku oslavě stých narozenin J. G. Mendela. Praha 1925, 329—334.
6. OLTMANN, F., Biologie und Morphologie der Algen. 2. vyd., I.—III. Jena 1922/23.
7. PRÁT, S., Weiteres über Plasmolyse und Permeabilität. Věstník král. čes. spol. nauk. Tř. II. 1925, 1—12.
8. PRÁT, S. a MALKOVSKÝ, K. M., Ursachen des Wachstums und der Zellteilung. Protoplasma 2: 312—367, 1927. Oberflächenspannung, p. 323—324.