©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Horn, Austria)	**Vol. 31**	Fasc. 1	157–169	9. 8. 1991

Untersuchungen zur Kultivierung und Formvariabilität von *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata**)

Von

Mirko GÄRTNER und Ursula MEINDL**)

Mit 6 Abbildungen

Eingelangt am 28. November 1990

Key words: *Desmidiaceae, Micrasterias,* cell culture, cell shaping, modification

Summary

GÄRTNER M. & MEINDL U. 1990. Studies on cultivation and shape variability in *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata.* – Phyton (Horn, Austria) 31 (1): 157–169, 6 figures. – German with English summary.

The growth of clone cultures of the single cell algae *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata* is investigated in dependence of nutrient medium concentration (osmolality), type of the applied soil extract and pH-value of the medium. It is shown that all these factors have a strong influence on the cell multiplication rate. – Based on long time observations of clone cultures 3 phases of the culture-growth are distinguished according to different cell multiplication rates. Moreover a description of a „chaotic phase" of the culture starting in the middle of the second growth phase is given. Possible reasons for both, occurence of distinct growth phases and „chaotic phase" are discussed. – Additionally it is shown that *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata* regularily transforms into their normal form (*M. th.* f. *thomasiana*) and that the transforming frequency in a culture depends on the concentration of the nutrient solution. The transforming procedure by transition stages is described too. Based on these results it is supposed that *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata* probably is a modification and not a mutation.

Zusammenfassung

GÄRTNER M. & MEINDL U. 1990. Untersuchungen zur Kultivierung und Formvariabilität von *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata.* – Phyton (Horn, Austria) 31 (1): 157–169, 6 Abbildungen. – Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

---

*) Herrn Univ.-Prof. Dr. Otto HÄRTEL zum 80. Geburtstag gewidmet.

**) Mag. M. GÄRTNER und Doz. Dr. U. MEINDL, Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Salzburg, Hellbrunnerstraße 34, A-5020 Salzburg (Austria).

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Es wird das Wachstum von Klonkulturen der einzelligen Alge *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata* in Abhängigkeit von der Nährmedienkonzentration (Osmolalität), der Art des verwendeten Erdextraktes und dem pH-Wert des Mediums untersucht und gezeigt, daß diese Faktoren einen starken Einfluß auf die Zellvermehrungsrate haben. – Basierend auf Langzeitbeobachtungen der Klonkulturen werden 3 Phasen des Wachstums aufgrund unterschiedlicher Zellvermehrungsraten unterschieden. Darüber hinaus wird eine „Chaotisierungsphase" der Zellkultur, welche in der Mitte der zweiten Wachstumsphase einsetzt, beschrieben. Die möglichen Gründe für beide Phänomene, dem Auftreten von distinkten Wachstumsphasen und einer „Chaotisierungsphase", werden diskutiert. – Weiters wird gezeigt, daß *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata* sich stets wieder in ihre Normalform (*M. th.* f. *thomasiana*) unwandelt und daß die Umwandlungshäufigkeit in einer Kultur von der Konzentration des Nährmediums abhängt. Der Umwandlungsprozeß über Übergangsstadien wird ebenfalls beschrieben. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, daß es sich bei *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata* wahrscheinlich um eine Modifikation und keine Mutation handelt.

1. Einleitung

Obwohl die meisten *Desmidiaceae*-Arten unter Laborbedingungen und in künstlichen Wachstumsmedien kultivierbar sind (PRINGSHEIM 1930, 1949, WARIS 1950 a, SCHLÖSSER 1982), ist nur sehr wenig über die verschiedenen Einflußparameter auf Vermehrung und Entwicklung dieser Algen bekannt und auch bei Parametern wie pH-Wert (PRINGSHEIM 1930, 1949, WARIS 1939, KOVASK 1971, VAMMEN 1977, BROOK 1981), Osmolalität (KALLIO 1951, KIERMAYER 1964, 1966, URL & KUSEL-FETZMANN 1973, MEINDL & al. 1989), qualitative und quantitative Ionenzusammensetzung des Nährmediums (PRINGSHEIM 1930, 1949, WARIS 1939, 1950 a, SCHLÖSSER 1982), sowie Einfluß organischer Komponenten im Medium (KIES 1967, BROOK 1981), bei welchen im allgemeinen ein Einfluß nachgewiesen werden konnte, sind gerade die artspezifischen Wirkungen zumeist unbekannt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung unterschiedlicher Nährmedienkonzentrationen (Osmolalitäten), der Art des für das semisynthetische Nährmedium verwendeten Erdextraktes und dem pH-Wert des Mediums auf Vermehrung und Entwicklung von *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata* (Abb. 1) in Klonkultur.

Diese einzellige Alge wurde von WARIS 1950 b als „cytoplasmatische Defektmutante" von *Micrasterias thomasiana* f. *thomasiana* (Normalform, biradiate Form) (Abb. 6) bezeichnet. Ihr fehlen im Vergleich zu der Normalform sämtliche Laterallappen auf der in Abbildung 1 als Seite B gekennzeichneten Seite. Die Zellentwicklung und Formbildung dieser Alge, sowie das Verhalten des Zellkernes wärend des Wachstums wurden bereits in früheren Untersuchungen beschrieben (MEINDL 1985 a, b). In vorliegender Arbeit wird außerdem dem langzeitlichen Kulturverhalten diese Alge Aufmerksamkeit geschenkt. Dies schien besonders deshalb von Interesse, weil bisher nur ungenügend bekannt ist, um welche Vorgänge es sich bei dem

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

von WARIS 1950 b beschriebenen „spontanen Auftreten" dieser Zellform („. . . there appeared spontaneously nine years ago a defective form . . .") und der von ihm als „Remutation" bezeichneten erneuten Ausbildung der Normalform handelt.

2. Material und Methode

Als Untersuchungsobjekt diente *M. thomasiana* f. *uniradiata* und *M. th.* f. *thomasiana*. Die Stammkulturen dieser beiden Algen wurden in Form von Flüssigmischkulturen aus dem Göttinger Institut für Pflanzenphysiologie (BRD) bezogen und seit Jahren am Salzburger Institut für Pflanzenphysiologie weiterhin als semisterile Flüssigmischkulturen subkultiviert. In künstlicher Kultur vermehren sich beide Zelltypen stets vegetativ durch mitotische Zweiteilung.

Das zelluläre Ausgangsmaterial wurde für vorliegende Untersuchungen mit einer sterilen Salzlösung (WARIS 1939, 1950 a) unter sterilen Bedingungen dreimal gewaschen. Hierauf erfolgte die Herstellung von Klonkulturen der beiden Zelltypen. Für die Kultivierungsversuche wurde dann nur Zellmaterial, welches aus diesen Klonkulturen stammte, verwendet. Als Nährmedium diente ein *Desmidiaceae*-Medium mit beigefügtem Erdextrakt (SCHLÖSSER 1982).

Im Zuge der Optimierungsversuche der Zellvermehrungsrate wurden zwei verschiedene Erdextrakte, hergestellt aus Bodenproben mit unterschiedlichen Entnahmeorten, getestet. Die als „Erde Tamsweg" (E. T.) bezeichnete Erde stammte aus dem Randbereich eines Hochmoores am Überling in der Nähe von Tamsweg (Bundesland Salzburg) und die als „Erde Salzburg" (E. S.) bezeichnete Erde stammte aus dem Botanischen Garten der Universität Salzburg. Die mit einem der beiden Erdextrakte hergestellten Nährmedienstammlösungen, sowie die für die Untersuchungen der Medienkonzentrationsdependenz der Zellvermehrungsrate aus den Stammlösungen hergestellten Verdünnungen (1 : 2, 1 : 4, 1 : 6, 1 : 8), wurden 1 Std. lang bei 120° C autoklaviert. Die beiden unterschiedlichen Stammlösungen enthielten nach dem Abkühlen auf 20° C stets eine Osmolalität von 2 mosmol/kg (Messung mittels einem Advanced Digimatic Osmometer von Advanced Instruments Inc.) und einen pH-Wert von 7,0 ± 0,05.

Für die Ermittlung des optimalen pH-Wertes in bezug auf die Zellvermehrungsrate wurde jeweils ein bestimmter pH-Wert (ganze pH-Schritte von pH 2–13 bzw. 0,1 pH-Schritte von pH 5–7) mit 0,1 N HCl bzw. 0,1 N NaOH nach der Medienabkühlung auf 20° C mit Hilfe eines Knick Digital pH-Meters mit einer Ingold-Elektrode 405-60-S7 eingestellt. Die für die Langzeitbeobachtungen von Kulturen notwendige physiologische Pufferung des herausgefundenen optimalen pH-Wertes wurde durch Substitution von KNO_3 durch 0,1 g $(NH_4)_2SO_4$ im Nährmedium (VAMMEN 1977) erzielt. Die pH-Abhängigkeit der Wachstumsraten von *M. thomasiana* f. *uniradiata* wurde nur anhand von Medien, welche mit E. T. versetzt waren, erprobt, da sich bei gleichem pH-Wert (pH 7) Medien, die mit E. T. versetzt waren, durchschnittlich besser auf die Teilungsaktivität und das Zellwachstum auswirkten, als Medien, die mit E. S. versetzt waren.

Das Ziehen der zur Untersuchung gelangten Kulturen erfolgte in hitzesterilisierten Erlenmeyerkolben. Jeder Kolben wurde unter sterilen Bedingungen mit 40 ml, je nach Testansatz veränderter Nährlösung gefüllt, mit einer Zelle beimpft und mit einem Wattepfropfen verschlossen. Die auf diese Weise hergestellten Kulturansätze

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

wurden dann in der von KIERMAYER 1964, 1970, 1980 beschriebenen Form bei einer Temperatur von 20 ± 1° C und einer konstanten Beleuchtungsstärke (ca. 1000 lux) bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 14 zu 10 Std. in einem Kulturschrank gehalten.

Methoden für die Ermittlung der Zellvermehrungsraten von *Micrasterias* unter Verwendung einzelner Zellkulturen wurden in zahlreichen Experimenten von WARIS 1926, KALLIO 1951 und MARČENKO 1966 entwickelt. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Zellanzahl bei geringen Zelldichten (< 50 Zellen/40 ml Medium) direkt im Kulturglas des jeweiligen Testansatzes unter einer Stereolupe ermittelt. Bei größeren Zelldichten wurde einer Testkultur ein ml nach gutem Schütteln der Kultur mit einer sterilen Meßpipette entnommen und in eine Petrischale pipettiert. Zur Vermeidung zu großer statistischer Fehler wurden in der Pipette haftende Zellen mit aqua bidest. herausgespült. Die Zellanzahl wurde dann wieder unter einer Stereolupe ermittelt und statistisch hochgerechnet. Die Zellvermehrungsraten in Abhängigkeit von dem verwendeten Erdextrakt, der Nährmedienkonzentration und dem pH-Wert erfolgte jeweils an Hand zweier Parallelversuche pro Testansatz und einer davon zeitlich abgesetzten entsprechenden Wiederholung. Dabei wurde, ausgehend vom Beimpfungstag, täglich und in genau gleichen Zeitabständen gezählt. Die Zellvermehrungsraten aus den Langzeitbeobachtungen der Kulturen wurden an drei Parallelversuchen pro Testansatz und entsprechender Wiederholung gewonnen.

Die lichtmikroskopischen Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einem Leitz Ortholux Mikroskop.

3. Ergebnisse

3.1 Abhängigkeit der Zellvermehrungsrate von der Art des verwendeten Erdextraktes und von der Nährmedienkonzentration.

Wie aus der Tabelle 1 an den ermittelten Zellanzahlen ersichtlich, wirken sich die Art des bei der Nährmedienherstellung verwendeten Erdextraktes, trotz gleicher Osmolalitäten von 2 mosmol/kg der entsprechenden Medienstammlösungen, sowie die Konzentration des verwendeten Mediums stark auf die Zellvermehrungsrate von *M. thomasiana* f. *uniradiata* aus. Ab einem Verdünnungsfaktor von 1 : 6 (Medium: aqua bidest.) zeichnen sich in einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen hinreichend signifikante Zellanzahldifferenzen ab. Es zeigt sich, daß die Zellanzahl nach 14 Tagen bei äquivalenten Verdünnungen der Nährmedien bei dem mit E. T. versetzten Medium mindestens um 50% höher als bei dem mit E. S. versetzten Medium liegt. Die maximale Vermehrungsrate wird mit einem mit E. T. versetzten Medium bei Stammlösungskonzentration erzielt.

3.2 Abhängigkeit der Zellvermehrungsrate von dem pH-Wert des verwendeten Mediums

Um eine weitere Verbesserung der vegetativen Zellvermehrung zu erzielen wurden unterschiedliche pH-Werte der mit E. T. versetzten, unverdünnten Stammlösung erprobt. Aus Tabelle 2 geht deutlich hervor, daß

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 1

Anzahl der Zellen von *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata* in einem Zeitraum von 14 Tagen (d = 1, . . ., 14) bei Verwendung unterschiedlicher Erdextrakte (Erde Tamsweg E. T., Erde Salzburg E. S.) im Nährmedium und unterschiedlichen Medienkonzentrationen (v.) Beide Medien mit einem pH-Wert von 7. Zellanzahlen gemittelt. Nicht ganzzahlig rationale Werte abgerundet.

	Konzentration des Mediums (v)										
E.T.	1:0	1:2	1:4	1:6	1:8	E.S.	1:0	1:2	1:4	1:6	1:8
d											
1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1
2	2	2	1	2	1		2	1	2	1	2
3	4	3	2	2	1		2	1	2	1	2
4	5	4	3	2	2		3	2	2	1	2
5	6	4	3	2	2		4	2	4	2	2
6	8	6	5	4	2		6	3	3	2	2
7	10	8	5	4	4		7	5	4	3	5
8	11	9	7	4	7		9	4	4	3	4
9	13	10	7	6	6		10	6	4	3	4
10	14	12	7	9	6		11	8	6	4	4
11	17	13	9	8	6		12	9	6	4	4
12	20	15	10	8	8		15	9	7	5	6
13	24	16	13	10	8		17	9	8	7	6
14	27	19	13	14	9		18	11	8	7	9

M. thomasiana f. *uniradiata* bei pH-Werten zwischen 5 und 8 eine anhaltende Teilungsaktivität zeigt, wobei das Ausmaß der Zellvermehrung von dem jeweiligen pH-Wert abhängt. Das Optimum der Zellvermehrungsrate liegt nach 14 Tagen mit hinreichender Signifikanz bei pH 6. pH-Werte von 2, 3, 12 und 13 führen zum baldigen Absterben der Zellen. Bei pH 4 treten maximal 2 Zellteilungen in einem Zeitraum von 14 Tagen pro Erlenmeyerkolben auf. Dabei sind an den Chloroplasten der Zellen teilweise lokale Braunfärbungen bei höheren Vergrößerungen unter der Stereolupe erkennbar. Im pH-Bereich von 9 bis 11 treten nur geringe Teilungsaktivitäten mit stark dilatierten Ruhephasen zwischen zwei aufeinander folgenden Teilungen ein. Zudem sind häufig auftretende Lappenmißbildungen beobachtbar. Allgemein nimmt die Teilungsaktivität von dem pH-Optimum 6 aus zu beiden Seiten der pH-Skala hin ab. Eine Verfeinerung der pH-Stufen auf 0,1 pH-Schritte zwischen pH 5 und 7 ergibt im pH-Bereich von pH 5,9 bis 5,5 und 6,1 bis 6,7 eine durchschnittlich 5–10% geringere Zellanzahl wie bei pH 6. pH-Werte darunter (pH 5,4–5) oder darüber (pH 6,8–7) ergeben eine durchschnittlich 15–25%ige Verminderung der Teilungsaktivität zu der bei pH 6 festgestellten Teilungsaktivität.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 2

Anzahl der Zellen von *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata* in einem mit einem Erdextrakt aus Tamsweger Erde (E. T.) versetzten, unverdünnten Nährmedium bei unterschiedlichen pH-Werten in einem Zeitraum von 14 Tagen (d = 1, . . ., 14). Zellanzahlen gemittelt. Nicht ganzzahlig rationale Werte von N abgerundet.

	pH-Wert des Mediums											
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
d												
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2	0	0	1	1	2	2	1	1	1	1	1	0
3	0	0	1	2	4	3	2	1	2	1	1	0
4	0	0	2	2	5	4	2	2	2	1	1	0
5	0	0	2	3	7	4	3	2	2	2	0	0
6	0	0	2	5	10	6	4	2	2	2	0	0
7	0	0	3	6	12	7	4	2	3	2	0	0
8	0	0	3	9	15	9	6	2	3	2	0	0
9	0	0	3	13	16	12	8	2	3	2	0	0
10	0	0	3	14	20	12	11	4	3	2	0	0
11	0	0	3	16	24	15	13	4	3	2	0	0
12	0	0	4	19	26	18	14	5	3	2	0	0
13	0	0	4	21	29	20	17	5	3	2	0	0
14	0	0	4	23	34	26	17	5	3	2	0	0

3.3 Zellvermehrungsverhalten unter den im Rahmen von Abschnitt 3.1 und 3.2 ermittelten Optimalbedingungen innerhalb großer Zeiträume

Wenn Klonkulturen von *M. thomasiana* f. *uniradiata* unter den im Rahmen der beschriebenen Versuche ermittelten Optimalbedingungen gezogen werden, dann erhält man nach einem Monat Vermehrungszeit der Zellen eine statistisch ermittelte durchschnittliche Zellanzahl von 950 Zellen pro 40 ml Medium (Zellanzahlwerte zwischen zwei dekadischen Werten abgerundet!). Das entspricht beinahe einem exponentiellen Wachstum mit einer Zellverdopplungszeit von 3 Tagen. Nach 2 Monaten Vermehrungszeit beträgt die statistisch ermittelte, durchschnittliche Zellanzahl 8000 Zellen pro 40 ml Medium. Daraus ist ersichtlich, daß die Vermehrungsrate im zweiten Vermehrungsmonat stark abnimmt. Nach zweieinhalb Monaten beträgt die durchschnittliche Zellanzahl 8100 Zellen pro 40 ml Medium und es finden ab diesem Zeitpunkt nur noch ein bis zwei Zellteilungen an einem Tag pro Erlenmeyerkolben statt.

Folgende Veränderungen konnten vorerst in den Kulturen festgestellt werden, die zu einer Teilungsaktivitätsreduktion beitragen: Der pH-Wert des Mediums verschiebt sich in einem Zeitraum von zwei Monaten von pH

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

6,0 nach 6,9 bis 7,2. Eine pH-Wert-Abweichung von pH 6 bedeutet, wie im letzten Abschnitt dargelegt, eine Verminderung der Teilungsaktivität. Eine bis zu zweieinhalb Monate anhaltende pH-Stabilisierung konnte durch Substitution von KNO_3 durch $(NH_4)_2SO_4$ im Medium (VAMMEN 1977) erzielt werden. Durch diese Maßnahme steigert sich die Zellanzahl, nach zweieinhalbmonatiger Vermehrungszeit ermittelt, auf durchschnittlich 8410 Zellen pro 40 ml Medium.

Weiters bilden sich in Klonkulturen von *M. thomasiana* f. *uniradiata* stets wieder Zellen der Form von *M. th.* f. *thomasiana* aus. Bei einem Vergleich der Wachstumsraten in Klonkulturen der beiden Zelltypen, die unter genau gleichen Bedingungen gezogen wurden, zeigte sich, daß *M. th.* f. *thomasiana* in unverdünnter Stammlösung eine bis zu 50% geringere Teilungsaktivität aufweist als *M. th.* f. *uniradiata* (siehe dazu auch Abschnitt 3.4!).

Nach 3 Monaten sinkt die Teilungsaktivität der Zellen, auch wenn der pH-Wert nur schwach vom Optimum abweicht, wobei sich täglich nur noch 2–4 Zellen pro Erlenmeyerkolben teilen. Dieses Zellteilungsverhalten kann auch noch nach 6 Monaten beobachtet werden. Zudem kann nach 2,5 Monaten eine mit der Zeit zunehmende „Chaotisierung" der Kulturen beobachtet werden. Diese äußert sich im Auftreten variabler werdender Zellgrößen, durch Anhäufung von Zellen mit rudimentär ausgebildeten Seitenlappen und einer größer werdenden Anzahl von Doppelzellen (Beschreibung siehe z. B. KALLIO 1949). Ebenso tritt eine größere Variabilität in der Ausprägung von Übergangszellformen (siehe dazu Abschnitt 3.4!) auf. In Kulturen mit verdünnten Medien tritt eine vergleichbare „Chaotisierung" im allgemeinen erst später ein. Darüber hinaus wird durch schwaches Verdünnen einer Kultur (Zusatz von 10 ml aqua bidest.) stets ein kurzfristiger Anstieg der Teilungsaktivität in der Phase nach 3 Monaten beobachtbar, wie das auch im Zusammenhang mit Kulturen von *Micrasterias denticulata* beobachtet wurde (KIERMAYER 1964, URL & KUSEL-FETZMANN 1973, VAMMEN 1977, KIERMAYER 1980, MEINDL & al. 1989).

3.4 Zellformvariabilität und ihre Abhängigkeit von der Nährmedienkonzentration

In Klonkulturen von *M. thomasiana* f. *uniradiata* treten, wie bereits erwähnt, stets wieder, und zwar unabhängig von der verwendeten Nährmedienkonzentration, Zellen der Form von *M. th.* f. *thomasiana* auf. Dabei erfolgt eine Umwandlung von einer Form in die andere – diese beiden Formen seien als Grenzformen bezeichnet (Abb. 1, 6) – über Übergangsformen mit einer Seitenlappenanzahl, die zwischen denen der Grenzformen liegt (Abb. 2–5). Die Ausbildung zusätzlicher Seitenlappen geschieht hierbei durch sukzessive Seitenlappenanzahlerhöhung im Zuge aufeinanderfolgender Zellteilungen.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

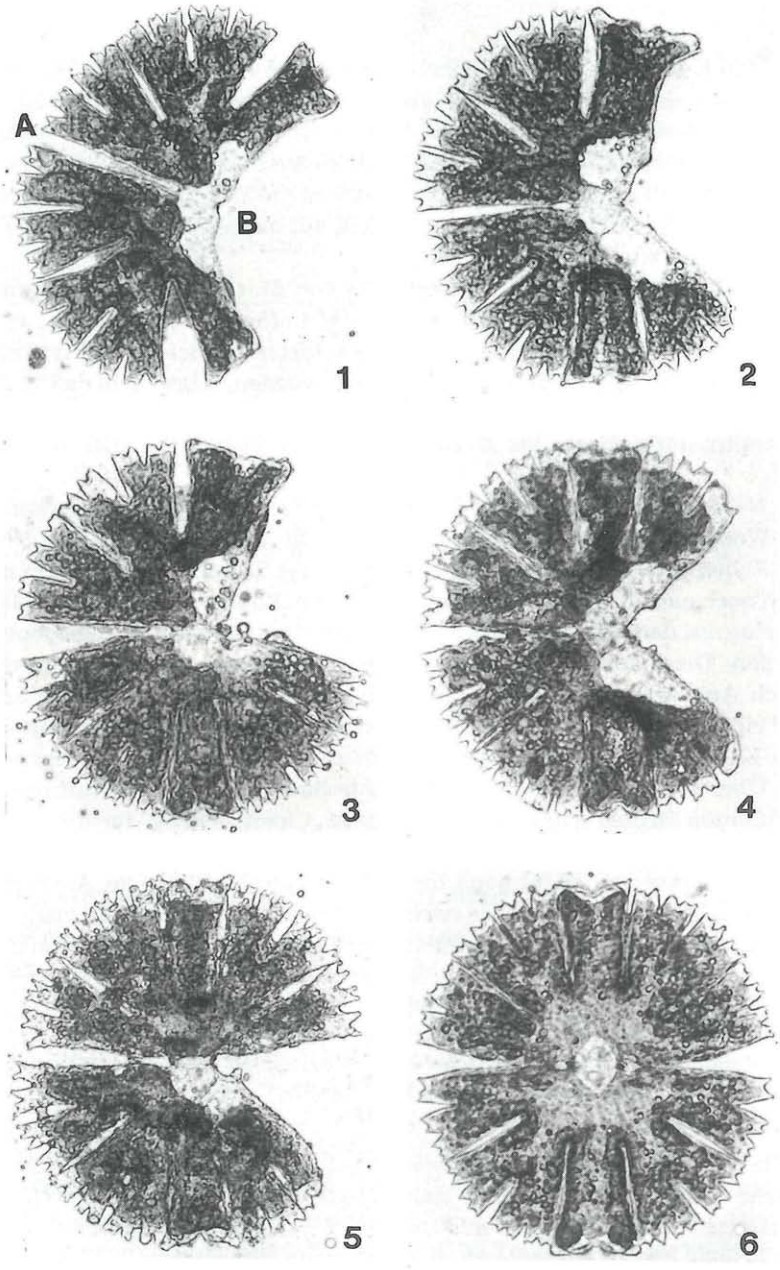


Abb. 1–6. Übergangsreihe von *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata* zu *M. th.* f. *thomasiana*. 1: Ausgangsform – *M. thomasiana* f. *uniradiata*. A: Seite A mit 2 Laterallappen pro Halbzelle. B: Seite B mit fehlender Laterallappenausbildung. 2–4: Übergangsformen mit ansteigender Laterallappenanzahl. 3 ist eine Variante von 4. 6: Endform – *M. th.* f. *thomasiana*. – Sämtliche Zellformen aus einer Klonkultur von *M. thomasiana* f. *uniradiata* isoliert.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

In Klonkulturen mit einem Kulturalter bis zu 2,5 Monaten treten in der überwiegenden Mehrzahl Übergangsformen mit 2 zusätzlichen Seitenlappen an einer Halbzelle (Abb. 3) auf. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß in dieser Kulturphase Umwandlungen relativ rasch im Zuge zweier Zellteilungen erfolgen. Aus 2 Zellteilungen geht eine Normalformzelle hervor. In älteren Kulturen häufen sich hingegen in zunehmendem Maße Übergangszellformen, die von diesem Lappenhabitus abweichen (Abb. 2, 4 und 5), ein Vorgang, der mit der zunehmenden „Chaotisierung" der Kulturen in Einklang stehen dürfte. Da Zellwachstum und -entwicklung, wie bereits beschrieben, in dieser Phase ungeklärten Faktoren ausgesetzt zu sein scheinen, die Anzahl sich einstellender Normalformen in der Regel aber noch zunimmt, dürften in dieser Phase auch Umwandlungen stattfinden, die mehr als 2 Zellteilungen in Anspruch nehmen.

Bei einem Versuch der Weiterkultivierung von Übergangszellformen zeigte sich, daß diese Formen nicht stabil sind. In frischem, unverdünntem Medium zeigen sie entweder eine Seitenlappenanzahlserhöhung, d. h. sie bildeten die Normalform aus, oder sie zeigen eine Seitenlappenanzahlsreduktion, d. h. sie bilden die uniradiate Form aus.

In 3 Monate alten Klonkulturen beträgt in unverdünntem Medium das durchschnittliche Verhältnis von *M. thomasiana* f. *uniradiata: M. th.* f. *thomasiana* bei einer durchschnittlichen Gesamtindividuenanzahl von 8450 ungefähr 7 : 1. In gleich alten Kulturen mit 1 : 8 verdünntem Medium hingegen beträgt das Verhältnis zwischen der uniradiaten und der biradiaten Form bei einer durchschnittlichen Gesamtindividuenanzahl von 1240 ungefähr 2 : 3. Das heißt, daß durch ein Verdünnen des Nährmediums eine drastische Erniedrigung der Zellanzahl der uniradiaten Form gegenüber der biradiaten Form erreicht wird. In Klonkulturen von *M. th.* f. *thomasiana* treten unabhängig von der Nährmedienkonzentration in der gleichen Zeitspanne keine uniradiaten Formen auf, obwohl sich solche Zellformen zu späteren Zeitpunkten im Zuge einer bei diesen Kulturen ebenfalls auftretenden „Chaotisierung" einstellen. Die Teilungsaktivität der biradiaten Form ist sowohl in unverdünntem als auch in verdünntem Medium geringer als diejenige der uniradiaten Form und zwar in unverdünntem Medium um 50%, und in 1 : 8 verdünntem Medium um 25%.

4. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen versuchen unter dem Aspekt der Artspezifität die Wirkungen von Nährmedienkonzentration, Art des verwendeten Erdextraktes und pH-Wert des Mediums auf die Zellvermehrung in quantifizierender Weise darzustellen und auf einzelne Phänomene, die sich in Langzeitbeobachtungen der Klonkulturen von *M. thomasiana* f. *uniradiata* immer wieder einstellen, aufmerksam zu machen.

Es wurde gezeigt, daß die Nährmedienkonzentration des Mediums sich erheblich auf die Zellvermehrung auswirkt. Während bei schwacher Ver-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

dünnung des Mediums (siehe 3.3!) ein Anstieg der Teilungsaktivität beobachtbar ist (siehe auch: KIERMAYER 1964, URL & KUSEL-FETZMANN 1973, VAMMEN 1977, KIERMAYER 1980, MEINDL & al. 1989) nimmt bei starker Verdünnung des Mediums das Kulturwachstum stark ab. MEINDL & al. 1989 zeigten im Vergleich dazu, daß auch ein Osmolalitätsanstieg von einem bestimmten Optimum (< 2 mosmol/kg) aus zu einer abnehmenden Zellvermehrungsrate bei *Micrasterias denticulata* führt.

Die Art des verwendeten Erdextraktes wirkt sich auch auf die Zellvermehrungsrate einer Kultur von *M. thomasiana* f. *uniradiata* aus. Dabei ist aber völlig unbekannt, wodurch die durchschnittlich besseren Vermehrungsraten bei Verwendung eines Moorerdenextraktes (E. T.) bewirkt werden. Ein „Osmolalitätsmechanismus" kann nicht vorliegen, da sich bei beiden Erdextrakten (E. S., E. T.) eine gleiche Osmolalität im Nährmedium einstellte. Die von PRINGSHEIM 1930 beschriebene Wachstumsratenreduktion bei *Desmidiaceae*-Kulturen bei Verwendung von Erdextrakten könnte demnach durch Verwendung ungeeigneter Erde bewirkt worden sein.

In bezug auf den pH-Wert des Mediums zeigt sich, daß ein spezifischer Optimalwert für die Zellvermehrung von *M. thomasiana* f. *uniradiata* vorliegt, und daß abweichende Werte die Zellvermehrung retardieren. Trotzdem ist eine Zellvermehrung innerhalb eines relativ großen pH-Intervalls (pH 5–8) ohne im Lichtmikroskop auffallende Zellschädigungen bzw. -veränderungen möglich. In diesem pH-Intervall bewegt sich auch das natürliche Vorkommen von *M. th.* f. *thomasiana* (KOVASK 1971).

Langzeitbeobachtungen des Kulturverhaltens von *M. thomasiana* f. *uniradiata* unter den im Rahmen der vorangestellten Versuche ermittelten Optimalbedingungen ergeben stets einen distinkten Verlauf der Kulturentwicklung. Beginnend mit einem exponentiellen Verlauf des Wachstums im ersten Wachstumsmonat nimmt das Wachstum im folgenden Monat ab und nach 3 Monaten stellt sich nur noch ganz geringes Wachstum (2–4 Zellteilungen/Tag und Kulturkolben) ein, welches bis zu 6 Monaten relativ konstant bleibt. Die Wachstumskurve von *M. thomasiana* f. *uniradiata* entspricht daher exakt der klassischen, sigmoiden Kurve für Einzelkulturen und läßt sich deutlich in eine log-Phase und eine stationäre Phase unterteilen. Leider liegen kaum Vergleichswerte zur Kulturentwicklung von *Desmidiaceae* vor, da bisher primär qualitative Aussagen über die langzeitlichen Kulturentwicklungen gemacht wurden (PRINGSHEIM 1930, 1949, WARIS 1950 a, b KIERMAYER 1964, SCHLÖSSER 1982). Die Untersuchungen von VAMMEN 1977 über das Kulturverhalten von *Micrasterias denticulata* zeigen, daß auch bei dieser *Micrasterias*-Art die Kulturentwicklung im allgemeinen dem gleichen, eben beschriebenen Schema folgt. Dabei sind aber die Versuchsbedingungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, ganz anderer Natur, sodaß ein direkter Vergleich bezüglich Wachstumsraten und zeitlichem Verlauf der Kulturentwicklung nicht möglich ist. Hier wie dort zeigt sich aber, daß schwaches Verdünnen einer Kultur in der dritten Phase der

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Kulturentwicklung mit aqua bidest. zu einem kurzfristigen Teilungsratenanstieg führt. Demnach kann nicht eine Nährstoffverknappung die Wachstumsratenreduktion bewirkt haben. Ähnlich wie bei anderen Zellkulturen diskutiert wird, müssen ein Ansteigen der Nährmedienkonzentration, Sauerstoffmangel sowie die Akkumulation von Stoffwechselprodukten als teilungshemmende Faktoren angenommen werden (vergleiche auch KIERMAYER 1964, VAMMEN 1977, MEINDL & al. 1989).

Zur Wachstumsratenabnahme trägt bei *M. thomasiana* f. *uniradiata* aber auch eine pH-Verschiebung des Mediums und sich einstellende Normalformen, die sich mit einer geringeren Geschwindigkeit weiterteilen als die Zellen der uniradiaten Form, bei. Die Ursache für die auftretende pH-Verschiebung bleibt zu untersuchen.

Es wurde ferner beschrieben, daß nach 2,5 Monaten eine mit der Zeit sich verstärkende „Chaotisierung" der Kulturen eintritt. Ein Auftreten von aberranten Zellformen in alten Kulturen von *Micrasterias* wurde auch von WARIS 1950 b und KIERMAYER 1964 beschrieben. In verdünnten Medien (geringeres Kulturwachstum!) tritt eine vergleichbare „Chaotisierung" aber erst später ein. Auch hier ist anzunehmen, daß Faktoren, wie die zuvor erwähnten, eine Labilisierung und Irritation der Zellteilung und -entwicklung bewirken.

Der als „spontanes Auftreten" einer defekten Form (*M. thomasiana* f. *uniradiata*) von *M. thomasiana* in alten Kulturen der biradiaten Form von WARIS 1950 b beschriebene Vorgang ist, wie im Zuge der gegenwärtigen Untersuchungen herausgefunden, ein im Verlauf der „Kulturchaotisierung" regulär vorzufindender Vorgang. *M. thomasiana* ist unter „günstigen Wachstumsbedingungen" stabil und erst nach Eintreten der „Chaotisierungsphase" werden neben unterschiedlichen Übergangsformen auch uniradiate Formen ausgebildet. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen der uniradiaten Form auch unter „günstigen Wachstumsbedingungen" Umwandlungen in die biradiate Form (Normalform) – ein Vorgang, der von WARIS 1950 b nicht beobachtet wurde. Dabei zeigt sich, daß das Verhältnis zwischen der Anzahl der uniradiaten und der biradiaten Zellen von der Nährmedienkonzentration abhängt. In konzentrierten Medien überwiegen die uniradiaten Formen (*M. thomasiana* f. *uniradiata*) und in weniger konzentrierten Medien die biradiaten Formen (*M. th.* f. *thomasiana*). Die Ursache für dieses Verhalten bleibt zu untersuchen.

Soweit aus diesen Untersuchsungsergebnissen ersichtlich, dürfte es sich bei *M. thomasiana* f. *uniradiata* um eine „Formmodifikante" von *M. th.* f. *thomasiana* und um keine „Mutante" handeln. *M. thomasiana* f. *uniradiata* pflanzt sich nur vegetativ fort und es kommt zu keiner Manifestierung möglicherweise mutativ erworbener Formeigenschaften in der vegetativen Generationenfolge. Zusätzlich trifft auf *M. thomasiana* f. *uniradiata* die Definition einer „Dauermodifikation" (EHRENDORFER 1983) zu, da die Modifikation in der Regel über mehrere Generationen beibehalten wird.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Interessant ist im Zusammenhang mit diesem Aspekt, daß Übergangsformen, die ebenfalls Modifikanten darstellen, wie in Abschnitt 3.4 dargelegt, völlig instabil sind und unter „günstigen Bedingungen" sich sofort in eine der beiden Grenzformen umwandeln. Die Ursachen für das unterschiedliche Stabilitätsverhalten der Modifikanten können aber wahrscheinlich erst untersucht werden, wenn die, die Modifikationen bewirkenden Faktoren bekannt sind.

Literatur

BROOK A. J. 1981. The biology of desmids. – Bot. Monogr. 16. – Oxford Blackwell.

EHRENDORFER F. 1983. Genetik und Evolutionsforschung. – In: DENFFER D., ZIEGLER H., EHRENDORFER F., BRESINSKY A. (Eds.), Lehrbuch der Botanik, p. 484–548. – Stuttgart, New York: Gustav Fischer.

KALLIO P. 1949. Artificially produced binuclear, diploid and anuclear desmids. – Arch. Soc. „Vanamo" 2: 42–44.

— 1951. The significance of nuclear quantity in the genus *Micrasterias*. – Ann. Bot. Soc. Fenn. Vanamo 24 (2): 1–22.

KIERMAYER O. 1964. Untersuchungen über die Morphogenese und Zellwandbildung bei *Micrasterias denticulata* BREB. – Protoplasma 59: 283–420.

— 1966. *Micrasterias denticulata (Desmidiaceae)* – Morphogenese. – Encycl. Cin. Film E 868/1965. Göttingen.

— 1970. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Cytomorphogenese von *Micrasterias denticulata* BREB. – Planta 83: 223–236.

— 1980. Control of morphogenesis in *Micrasterias*. – In: GANTT E. (Ed.), Handbook of physiological methods: developmental and cytological methods, p. 6–12. – Cambridge University Press.

KIES L. 1967. Über Zellteilung und Zygotenbildung bei *Roya obtusa* (BREB.) WEST et WEST. – Mitt. Staatsinst. allg. Bot. Hamburg 12: 35–42.

KOVASK V. 1971. On the ecology of desmids. I. Desmids and water pH. – Eesti NSV TA, Toimet., Biol. 20: 223–230.

MARČENCO E. 1966. Über die Wirkung von γ-Strahlen auf Algen (*Desmidiaceae*). – Protoplasma 62: 157–183.

MEINDL U. 1985 a. Aberrant nuclear migration and microtubule arrangement in a defect mutant cell of *Micrasterias thomasiana*. Protoplasma 126: 74–90.

— 1985 b. Experimental and ultrastructural studies on cell shape formation in the defect mutant cell *Micrasterias thomasiana* f. *uniradiata*. Protoplasma 129: 74–87.

— WITTMANN-PINEGGER D. & KIERMAYER O. 1989. Cell multiplication and ultrastructure of *Micrasterias denticulata (Desmidiaceae)* grown under salt stress. – Pl. Syst. Evol. 164: 197–208.

PRINGSHEIM E. 1930. Die Kultur von *Micrasterias* und *Volvox*. – In: OLTMANNS F. (Ed.), Morphologie und Biologie der Algen, p. 2–49. – Jena: Gustav Fischer.

— 1949. Pure culture of algae. – Cambridge: Cambridge University Press.

SCHLÖSSER U. G. 1982. List of strains. – Ber. deutsch. bot. Ges. 95: 181–206.

URL W. & KUSEL-FETZMANN E. 1973. *Desmidiaceae:* Fortbewegung durch Schleimausscheidung. – Inst. Wiss. Film Göttingen: Film E 1913.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

VAMMEN K. 1977. Studium des Wachstums von *Micrasterias denticulata* in Reinkultur. Thesis, Salzburg.

WARIS (WARÉN) H. 1926: Nahrungsphysiologische Versuche an *Micrasteroas rotata*- – Soc. Scient. Fenn. 2, 8: 1–42.

— 1939. Über den Antagonismus von Wasserstoffionen und Metallkationen bei *Micrasterias*. – Acta bot. fenn. 24: 3–36.

— 1950 a. Cytophysiological studies on *Micrasterias*. I. Nuclear and cell division. – Physiol. Plantarum 3: 1–16.

— 1950 b. Cytophysiological studies on *Micrasterias*. II. The cytoplasmatic framework and its mutation. – Physiol. Plantarum 3: 236–246.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1990/91

Band/Volume: 31_1

Autor(en)/Author(s): Gärtner Mirko, Meindl Ursula

Artikel/Article: Untersuchungen zur Kultivierung und Formvariabilität von Micrasterias thomasiana und uniradiata. 157-169