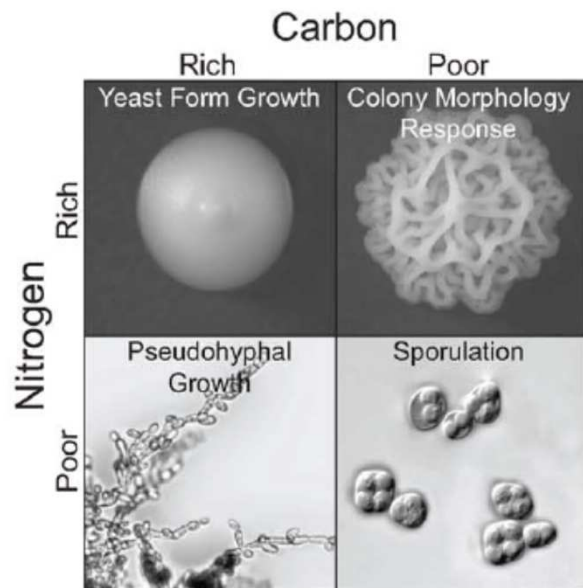


# PRAKTIKUM Z BIOLOGIE KVASINEK

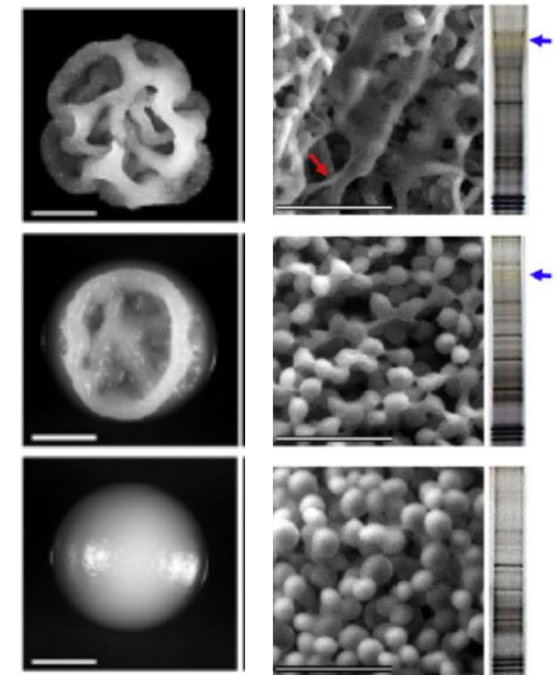
- **1. Makroskopické a mikroskopické pozorování kvasinek** – doc. Paleček
- **2. Konverze buněk na protoplasty** – prof. Svoboda
- **3. Mikroskopické pozorování párování kvasinkových buněk** – doc. Paleček
- **4. Mikroskopické pozorování sporulace u kvasinek *Schizosaccharomyces versatilis*** – prof. Svoboda

# Kolonie

- obvykle krémová barva – červený pigment (*Rhodotorula*)
- různé tvary kolonií:
  - hladké, drsné ... kolonie – kulaté a oválné buňky (*S.cerevisiae*) – závisí na ECM ECM
  - drsné kolonie – protáhlé buňky (*Pichia*)
  - slizovité kolonie – pouzdra (*Lipomyces*)



Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)



Stovicek et al, Fungal Gen Biol (2010)

**Laboratorní kmeny jsou hladké (např. S288C - Genotyp: *MAT $\alpha$*  *SUC2* *gal2* *mal* *mel* *flo1* *flo8-1* *hap1*)**

# Makroskopické a mikroskopické pozorování kvasinek

- *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4a
- *Schizosaccharomyces pombe* 501
- ***Rhodotorula mucilaginosa***
- *Pichia membranifaciens*
- ...

## Makroskopie

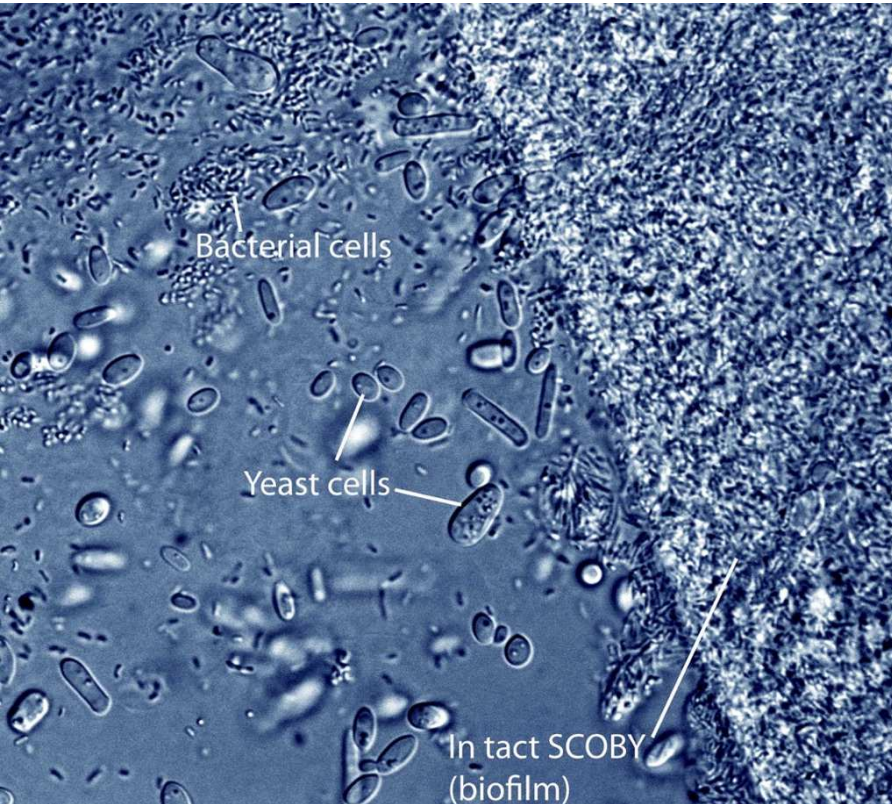
- Barva: lososová, ružová, dočervena
- Povrch: hladký, lesklý, slizovitý
- Okraje: celistvé



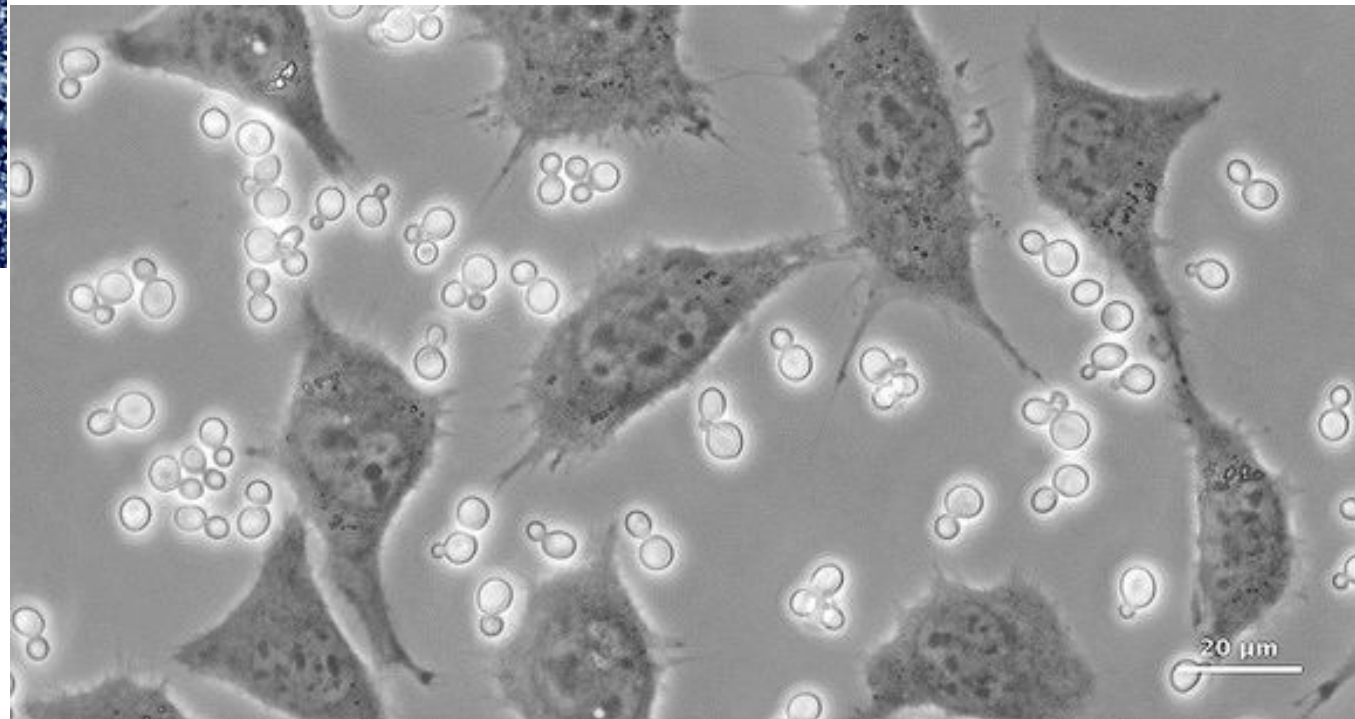
# Mikroskopie - morfologie

- za běžných podmínek převládá kvasinková f.
- rotační elipsoid, kulaté, protáhlé
- 3-15 mikrometrů (bakterie < kvasinky < savčí buňky)
- u jednoho druhu (haploidní < diploidní < polyploidní)

kvasinky < savčí buňky



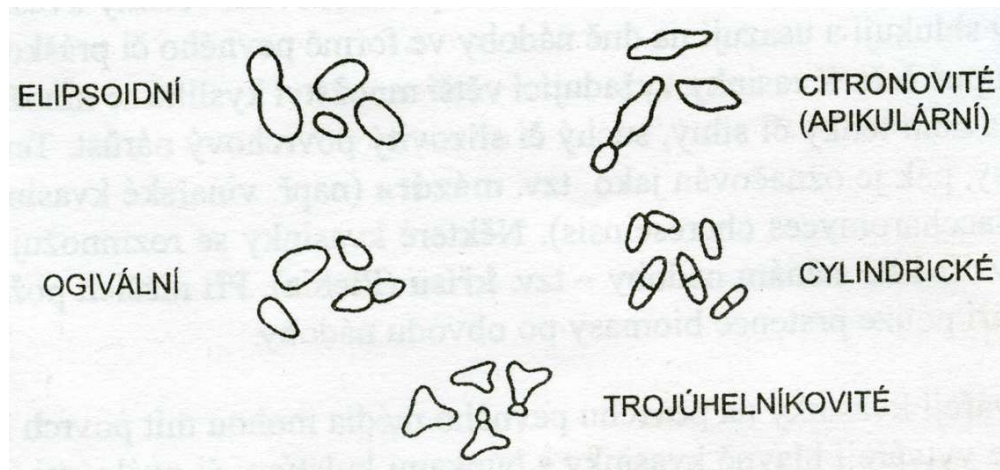
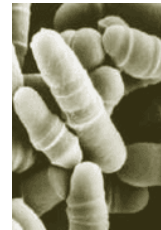
Bakterie < kvasinky



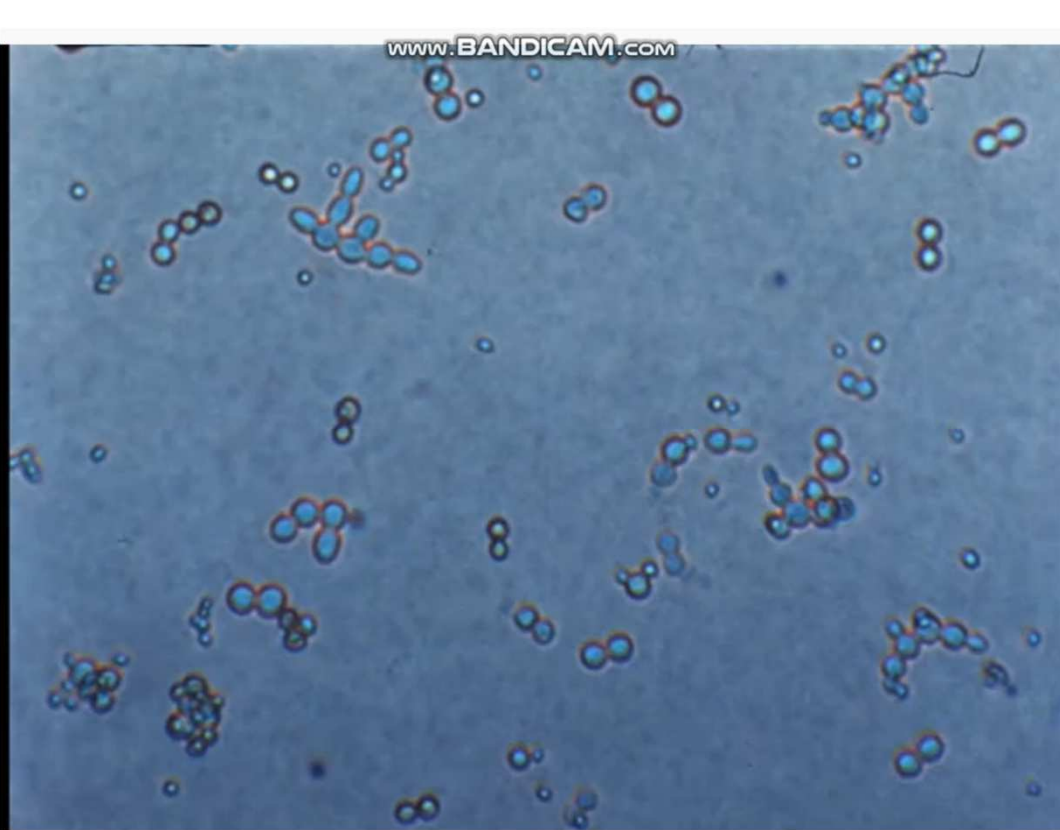


# Kvasinková forma - morfologie

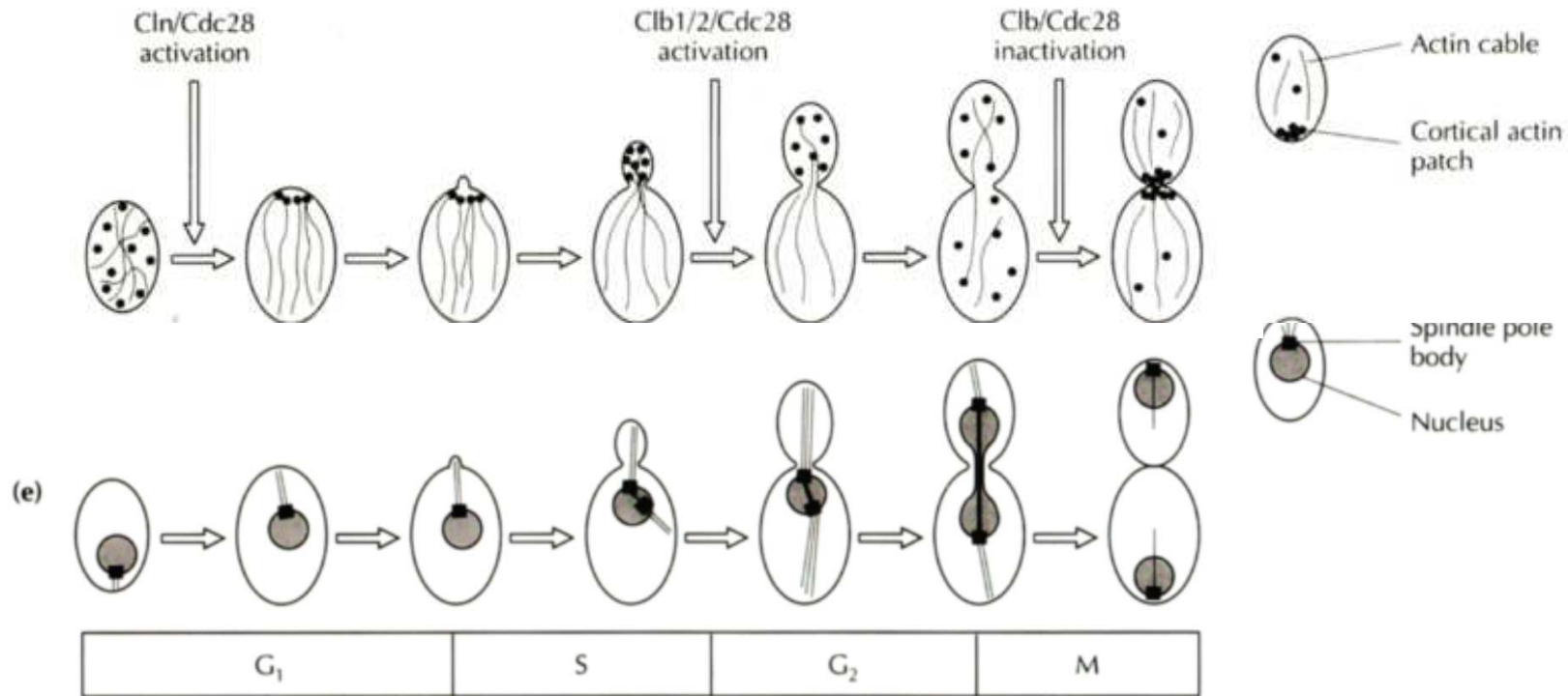
- vegetativní rozmnožování:
  - pučení (budding) – monopolární (rod *Malassezia*), bipolární (střídavě na obou pólech= citronkovitý tvar) nebo multipolární (*Saccharomyces*, kdekoli, ale nikdy ne na stejném místě), na sterigmě (pupen spojen s mateřskou buňkou úzkou stopkou)
  - *Schizosaccharomces* přehrádečné dělení (fission)
  - Zvláštní tvar má za některých kultivačních podmínek rod *Trigonopsis*



# Pozorování pučící kvasinky *S. cerevisiae*

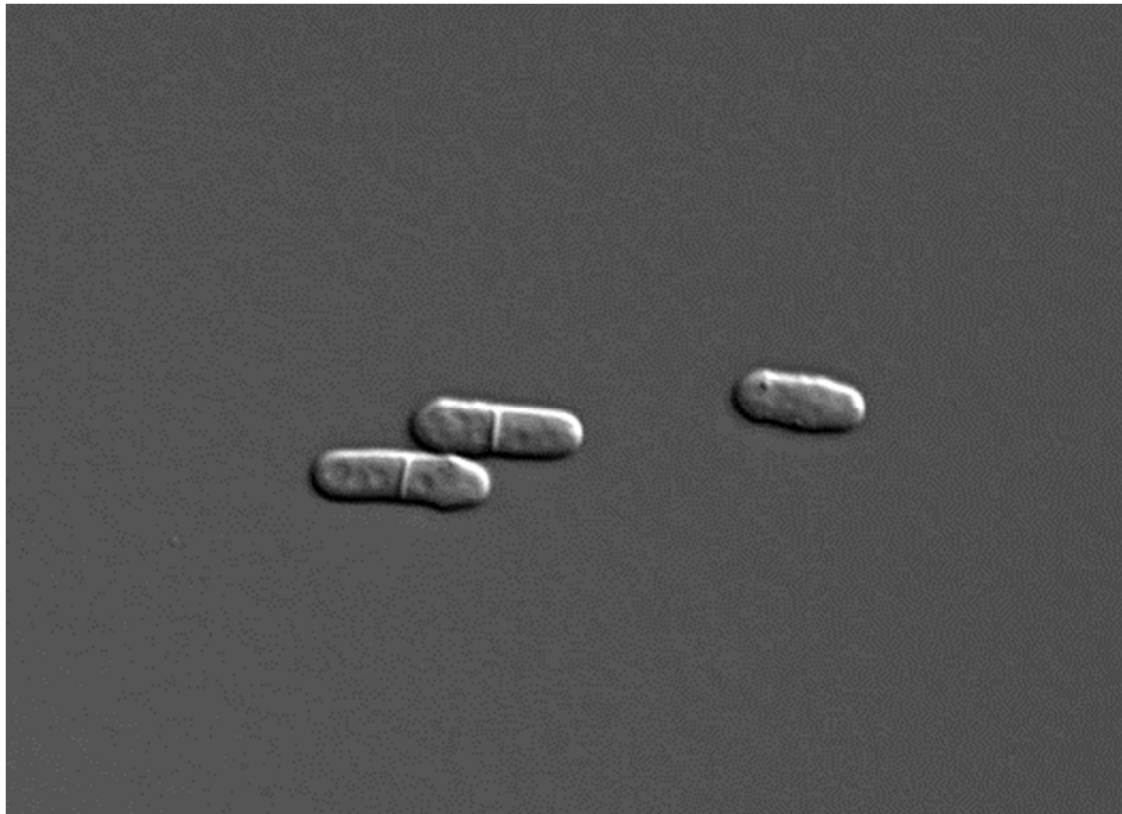


# Buněčný cyklus pučící kvasinky *S. cerevisiae*



- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze – duplikace DNA ...
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G<sub>2</sub> fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (mitózy) – jaderné mikrotubuly odtáhnou chromosomy
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G<sub>1</sub>
- oddělená dceřinná buňka je menší než mateřská – nerovnocenné dělení – pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G<sub>1</sub> fáze

# Pozorování poltivé kvasinky *S. pombe*

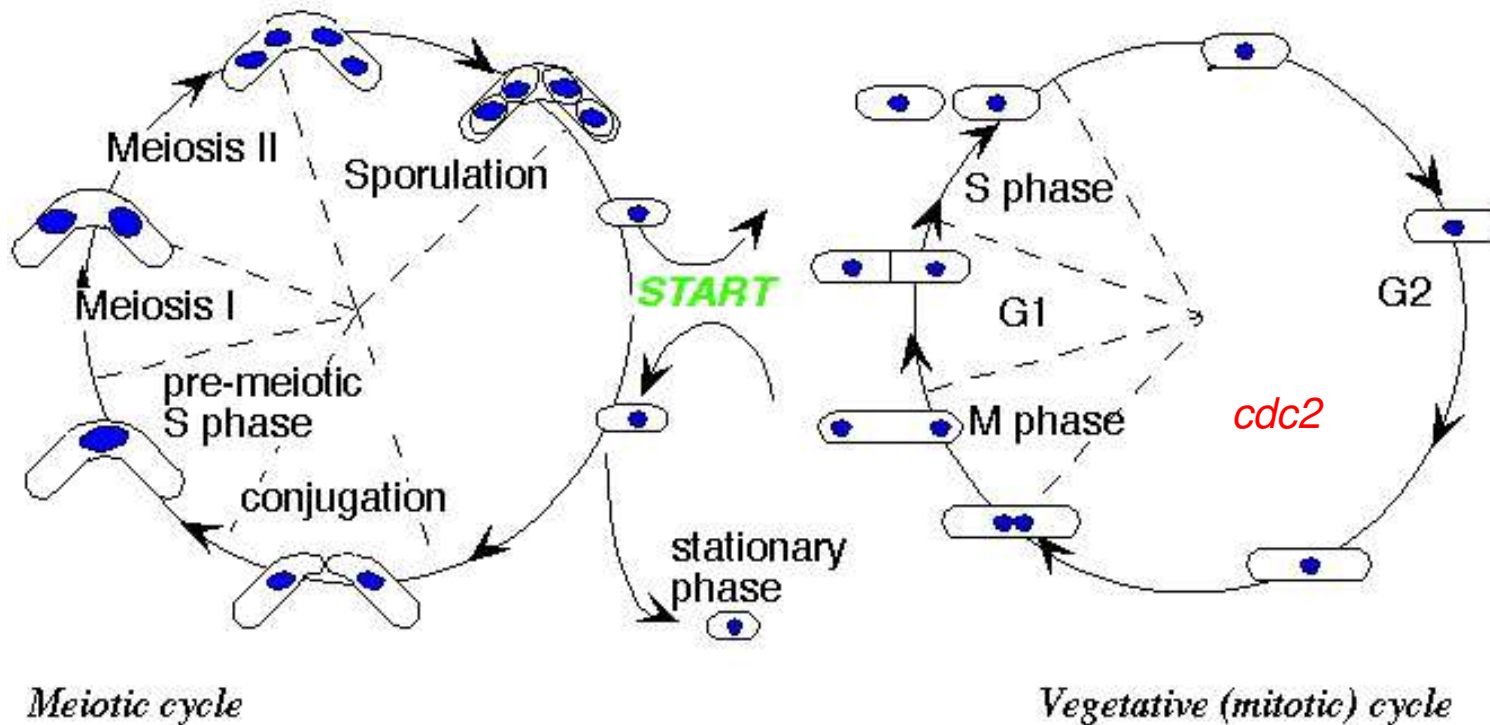


Hoffmann a spol, Genetics, 2015



# Buněčný cyklus *S. pombe*

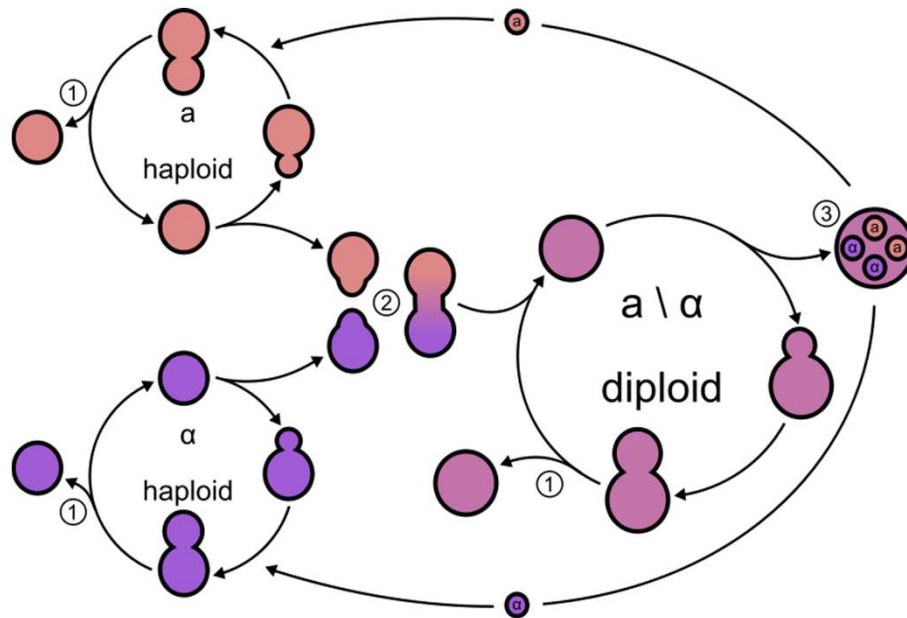
*S. pombe* má **rovnocenné dělení** - vznikají buňky stejné velikosti – hned vstupují do S fáze (jsou dostatečně velké) – pro vstup do mitózy musí být dvojnásobná velikost (kontrola v G2 fázi => nejdelší je G2 fáze)



- pro konjugaci je kritická G1 fáze jako u *S. cerevisiae*

# Konverze buněk na protoplasty

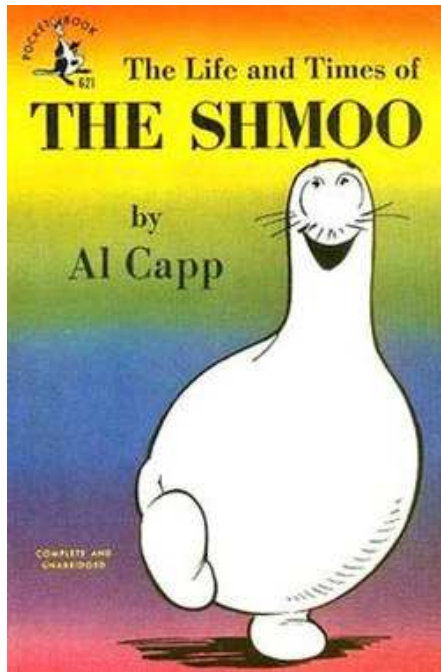
# Mikroskopické pozorování párování kvasinkových buněk



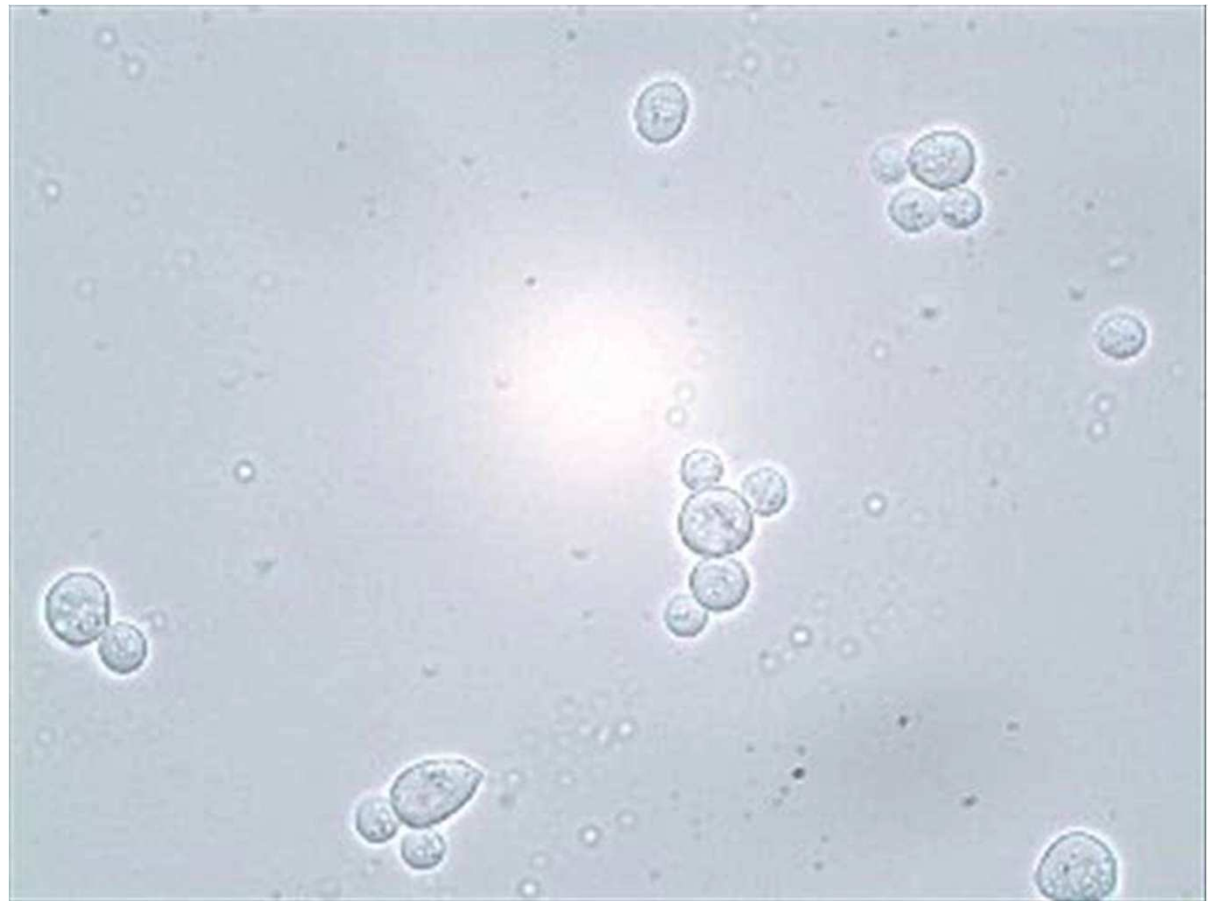
## Životní cyklus kvasinek

- stabilní haploidní i diploidní buňky (*S. cerevisiae* – *S. pombe* okamžitě sporulují)
- haploidní buňky opačného párovacího typu se mohou křížit – diploidní buňky
- diploidní buňky mohou sporulovat – spory obsahují 4 haploidní buňky (po meiotickém dělení) – 2 a 2 opačného párovacího typu
- homothalické buňky přepínají párovací typ a mohou se křížit ...

# Pozorování pučící kvasinky *S. cerevisiae* tvorba shmoo

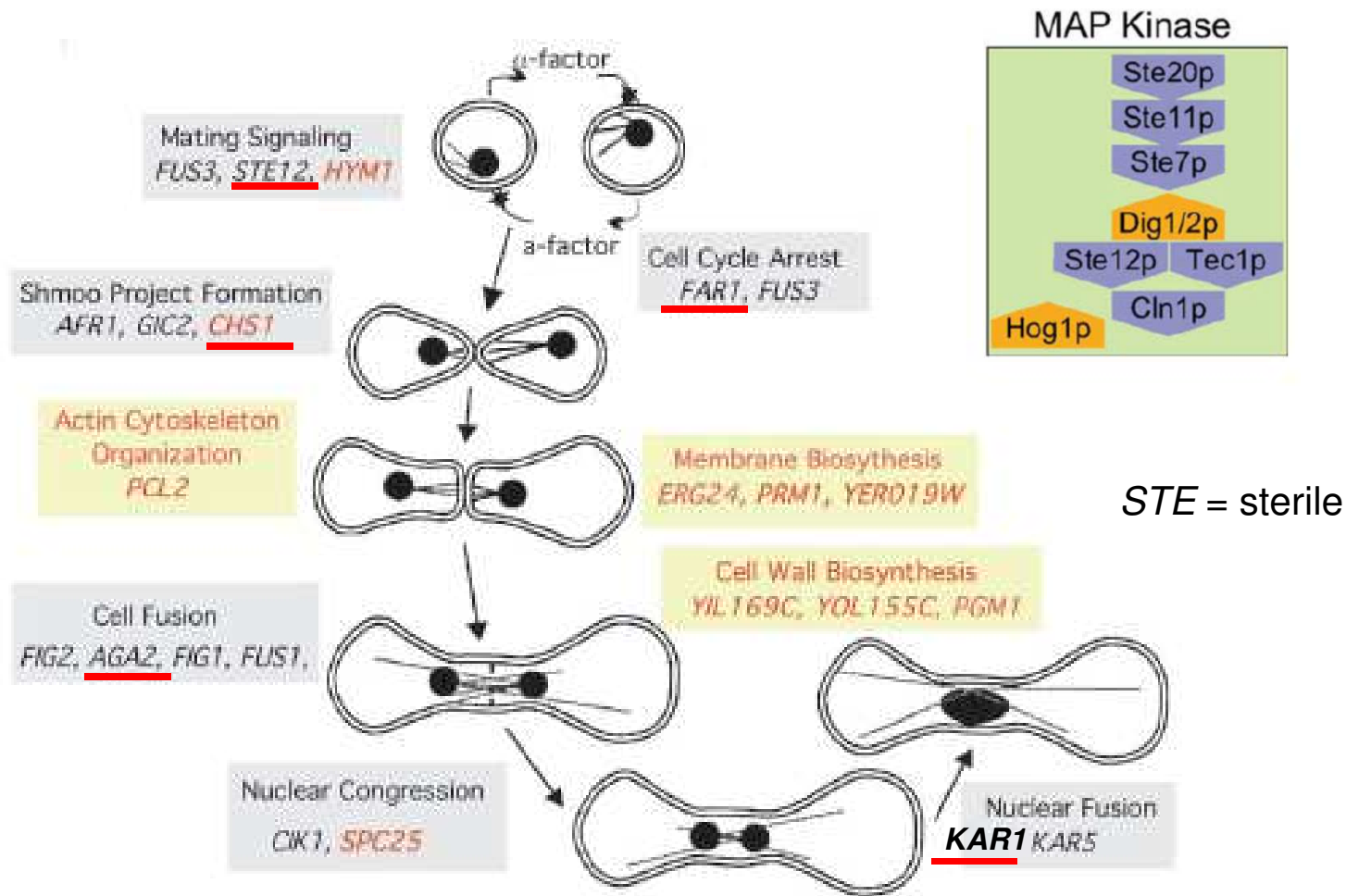


<https://vimeo.com/14316828>



haploidní buňky reagují na přítomnost „partnera“ opačného párovacího typu změnou morfologie a zástavou buněčného cyklu

## Funkce jednotlivých proteinů v průběhu párování

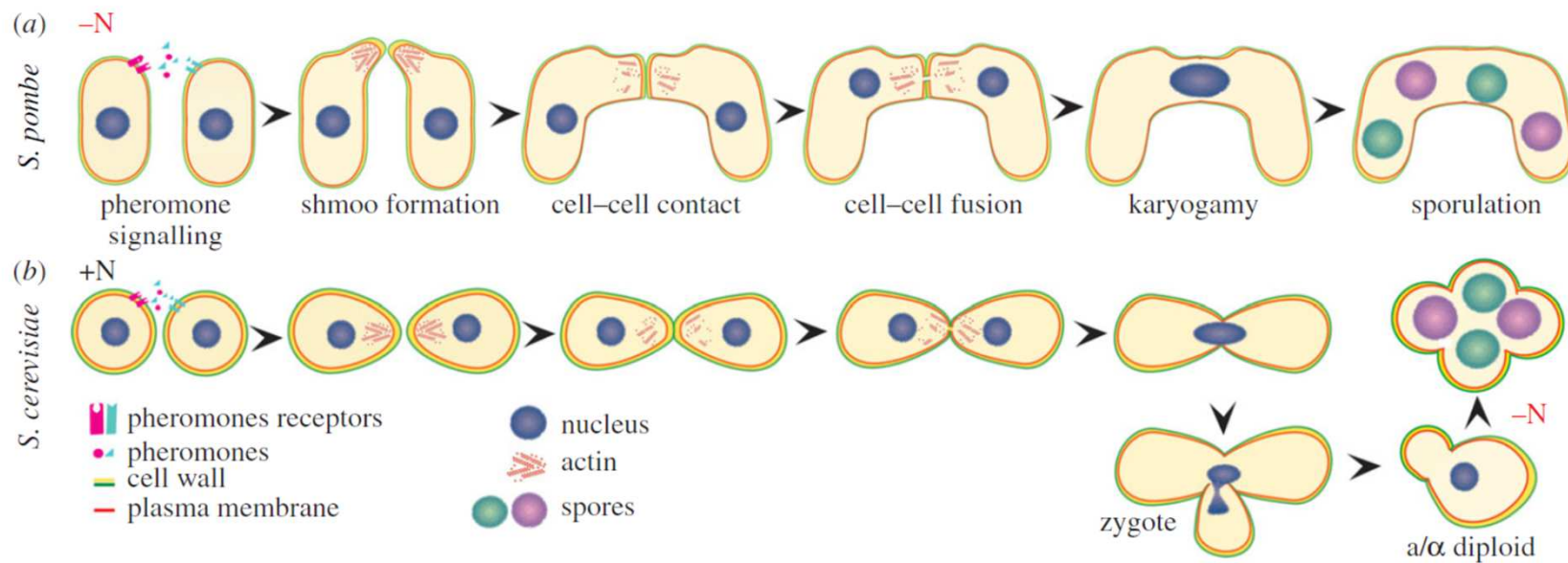


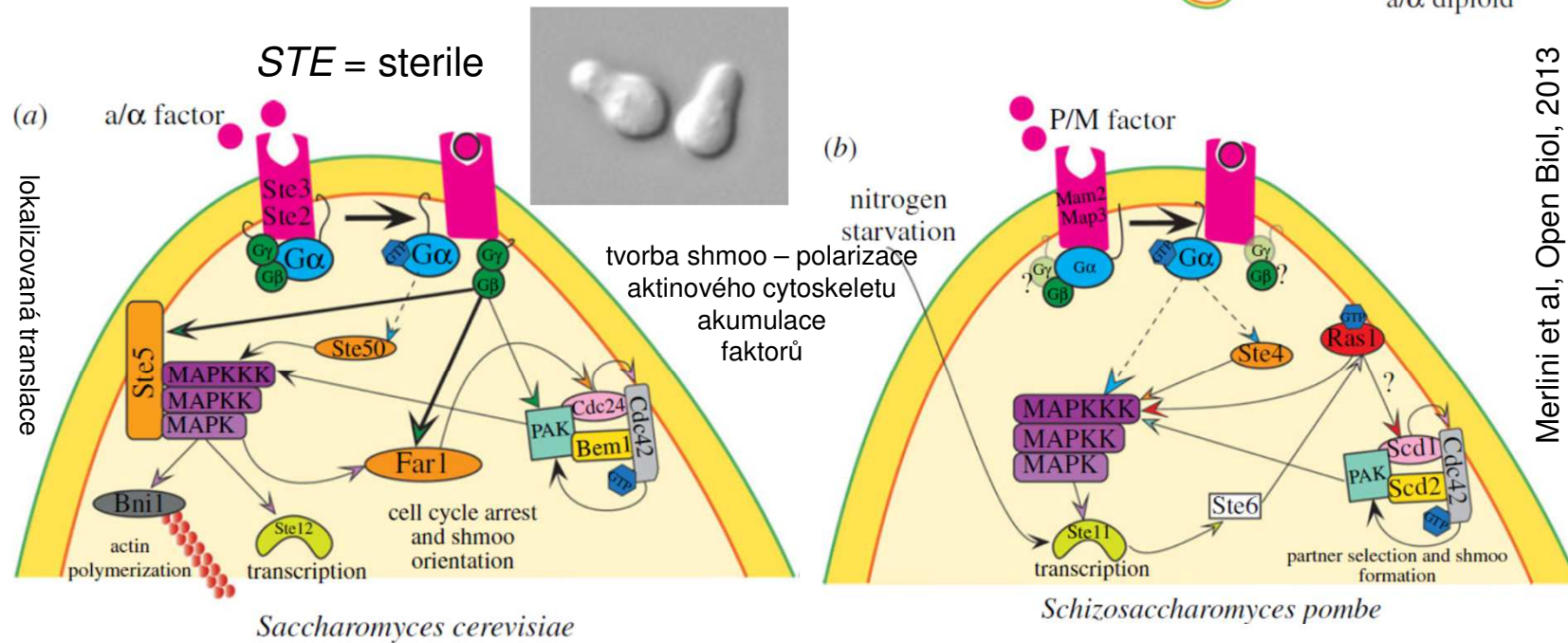
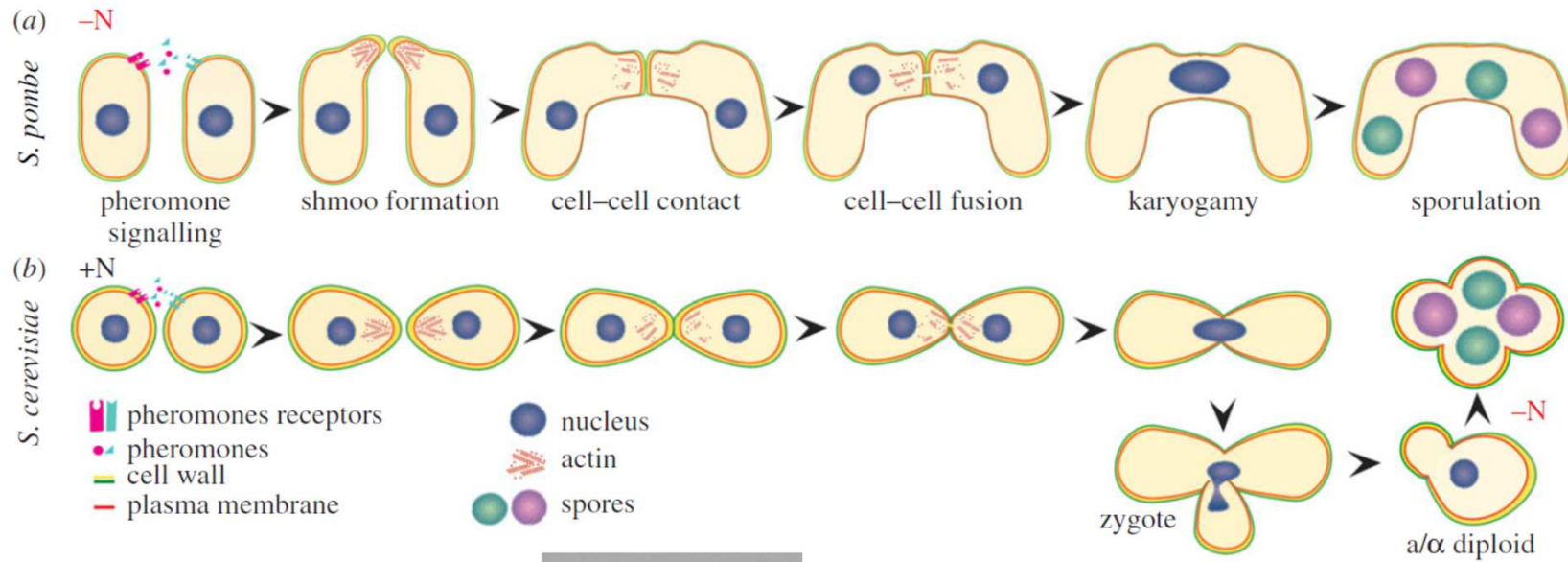
Ren et al., Science, 2000



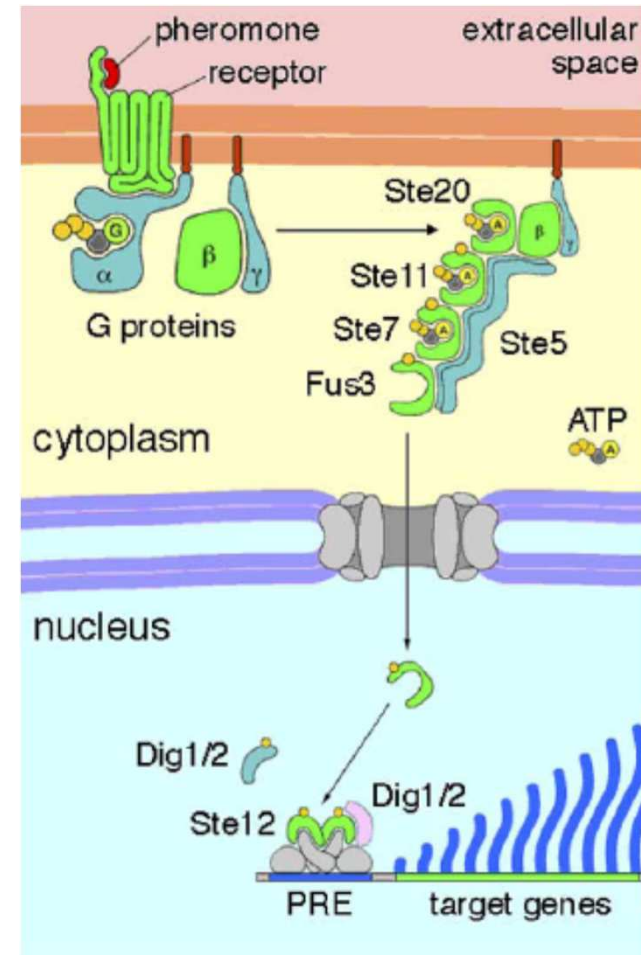
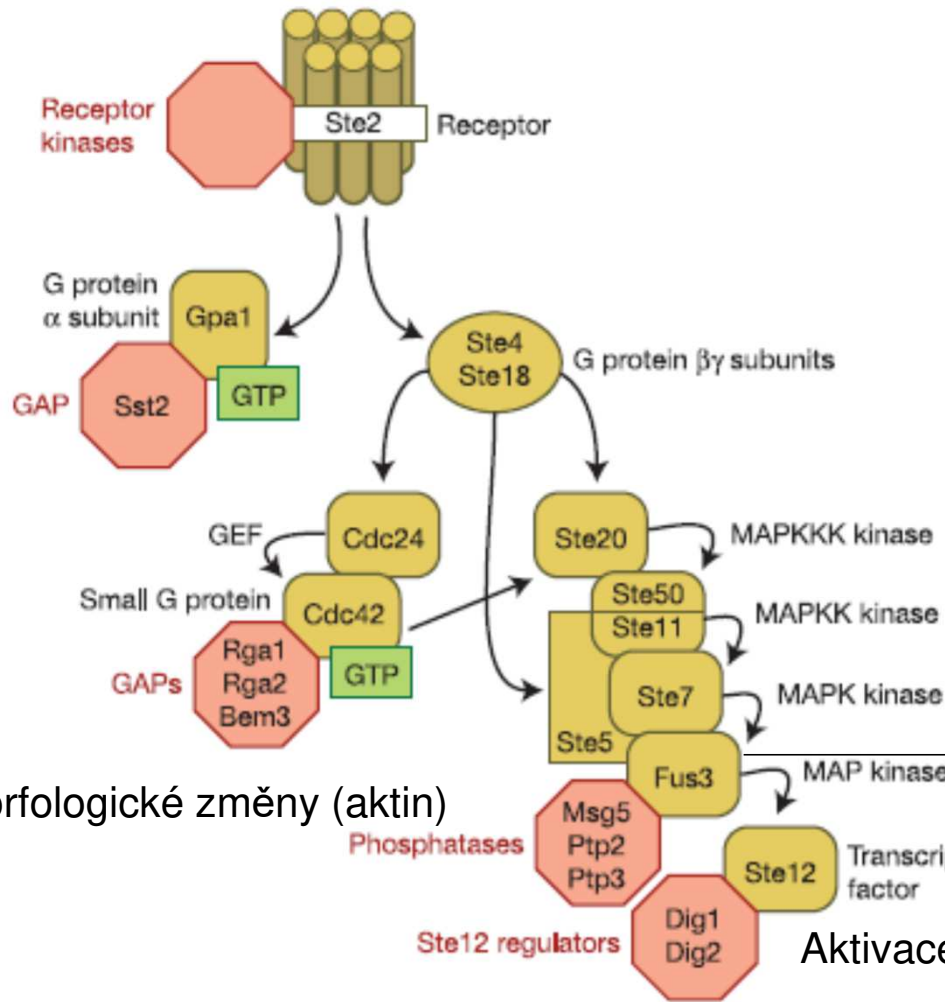
# Pozorování pohlivé kvasinky *S. pombe*

- tvorba shmoo
- konjugace





# Signální dráha – $\alpha$ faktor



# Sporulace

- homothalické buňky *S. pombe* se párují a okamžitě sporulují
- u *S. cerevisiae* dochází k indukci meiosis a sporulaci při nedostatku dusíku v kombinaci s nefermentovatelným uhlíkatým zdrojem



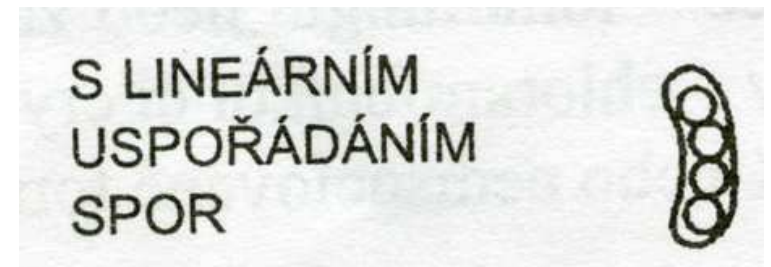
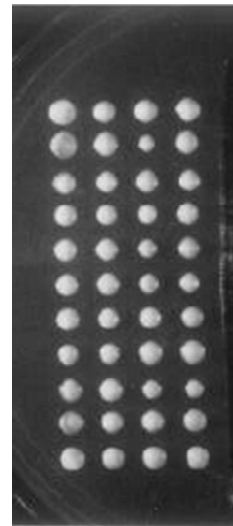
Hoffmann a spol, Genetics, 2015; <http://www.genetics.org/content/suppl/2015/10/02/201.2.403.DC1>







# Sporulace – tetrádová analýza



- pouzdro spory je třeba rozrušit a pomocí mikromanipulátoru získat/přenést jednotlivé haploidní buňky do nových pozic (lze provést i tzv. random sporulation)
- u *S.pombe* jsou diploidní buňky nestálé a okamžitě sporulují (pouzdro se rozpadá samo)

**Mikroskopické pozorování sporulace u kvasinek**  
***Schizosaccharomyces versatilis***