

Effekt av temperatur og fosforkonsentrasjon på celle- og genomstørrelse av *Chlamydomonas reinhardtii*

Ola Tobias Hafslund



Masteroppgave

Senter for økologisk og evolusjonær syntese (CEES)

Universitetet i Oslo

01.juni 2014

© Ola Tobias Hafslund

2014

Effekt av temperatur og fosforkonsentrasjon på celle- og genomstørrelse av *Chlamydomonas reinhardtii*

Ola Tobias Hafslund

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

En reduksjon av kropps- eller cellestørrelse hos ektotherme organismer er blitt foreslått som en vanlig respons på økt temperatur. Flere studier har vist dette, men mekanismen(e) bak har forblitt uavklart. En temperaturøkning i akvatiske systemer endrer også graden av termisk sjikting og kan redusere konsentrasjoner av oppløste næringssalter i den eutrofe sonen. I denne oppgaven har effekten av temperatur fosfor(P)konsentrasjon på cellestørrelse blitt testet på den encellede grønnalgen *Chlamydomonas reinhardtii*.

For å separere effekten av temperatur og næringssaltkonsentrasjon ble et faktorielt eksperiment med *C. reinhardtii* i batch-kulturer gjennomført i kombinasjoner av høy og lav temperatur og høy og lav P

Resultatene viste entydig, ved flere uavhengige indikatorer, en klar respons på P-konsentrasjon, til dels også temperatur. Resultatene viser at fosfatbegrensning samt temperatur påvirket cellestørrelsen hos *C. reinhardtii*, men tolkningen av resultatene var ikke entydig. Eksperimentet viste at vekstraten bare er temperaturavhengig hvis det er mye fosfor tilgjengelig. Både ekspresjon av alkalisk fosfatase, innholdet av RNA i cellene samt deres C:P-forhold var sterkt påvirket av om algene var P-begrenset eller ikke.

Den videre effekten av dette på celle- og genomstørrelse var derimot ikke entydig. Siden de forskjellige behandlingen gav forskjellig cellyklus kan dette ha påvirket målingene til tross for at det ble lagt vekt på å ta prøver til samme tidspunkt etter antatt gjennomført celledeling. Når det gjelder utslagene på genomstørrelse, analysert ved flowcytometri, tilsier den til dels påfallende effektene at videre studier bør utføres, selv om det var indikasjoner på en klar P-effekt på genomstørrelse over 50 generasjoner. En oppfølging av dette ved f.eks sekvensering kan gi svar på om det faktisk har skjedd genomiske endringer.

Lærdommen fra dette eksperimentet er at behandlingsform (turbidostat vs. kjemostat), temperatur og fosforkonsentrasjon, spiller inn på *C. reinhardtii*'s cellyklus. Dette viser viktigheten av kjenne til, og ta høyde for, cellyklus ved lignende eksperimenter med samme eller andre algearter.

Takk!

Om noen for 10 år siden hadde fortalt meg at jeg skulle levere en mastergrad i biologi omhandlende alger, hadde jeg bare begynt å le. Derfor er det viktig å kreditere de personene som har gjort det mulig, for uten dem hadde dette aldri skjedd og jeg er dem for alltid takknemlig.

Først og fremst er jeg en takk skyldig Norith Eckbo som pekte meg i retning av min fantastiske hovedveileder Dag Hessen og hans kollegium. Dag Hessen har vært en bauta gjennom mine år i fjerde etasje på Kristine Bonnevis hus, og han kommer til å fortsette å være en kilde til inspirasjon.

En stor takk til Tom Andersen, og hans alltid åpne dør, som har gitt livsviktige innspill i alt fra Kruskal-Wallis tester til TV-serie-referanser og næringsinnholdet i gulrøtter.

Takk til Nita Shala som med sin tålmodighet og godhet har bedrevet en enorm overføring av erfaringer og tips fra sitt hode til mitt, med bare en teskje som hjelpemiddel.

Stor takk til Marcin Wojewodzic. Uten ham ville denne oppgaven strandet. Hans hjelp på labben har vært uvurderlig, og jeg er evig takknemlig for at han har ofret utallige timer over DNA-prøver i is for min skyld.

Stor takk til Per Johan Færøvig som har gått igjennom utrolige arbeidsøkter for å skaffe meg kalkrikt vann og gitt meg innføring i alt fra vannfiltre til flowcytometrianalyser.

Stor takk til Catharina Broch som tappert og trofast har holdt hånden min gjennom alt arbeidet jeg har gjort ved siden av denne oppgaven. Jeg vet fortsatt ikke helt hva en gradientanalyse er, men det er mine mangler som elev, ikke hennes lærerferdigheter, som er skyldig i det.

Tusen takk til Jan Erik Thrane som nærmest har vært min tredje veileder og hjulpet til med stort og smått. Du vil fortsette å være en inspirasjon for min videre progresjon i benkpress.

Takk til Marwa Jalal for hjelp med flowcytometrianalyser, til Berit Kassa for støkiometrianalyser, til Lars Fredrik Skau for å holde algene mine i live og Sissel Brubak for nyttige innspill om algekulturer og bufferløsninger.

En spesiell takk til alle på 4624, 4604 og 4611. Dere er bra folk!

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Kroppsstørrelse	3
1.1.1	Cellestørrelse	3
1.2	Faktorer som påvirker cellestørrelse	3
1.2.1	Hva gjør store alger store?	4
1.2.2	Genomstørrelse som indikator på cellestørrelse	5
1.3	Mekanismer for endringer av genomstørrelse	5
1.4	Hypotese og mål med oppgaven	7
2	Materialer og metoder	8
2.1	Modellorganisme	8
2.2	Eksperimentelt oppsett	8
2.3	Medium	9
2.4	System for dyrking av <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10
2.5	Fortynningsrate	11
2.6	Beregning av antall, størrelse og vekstrate	12
2.7	Genom- og kjernestørrelse	13
2.8	Transplantasjonseksperiment	15
2.9	Døgnsyklus	16
2.10	Støkiometri	16
2.11	RNA-analyse	17
2.12	Alkalisk fosfatase	18
2.13	Statistikk	19
3	Resultater	20
3.1	Fosforkonsentrasjon i mediene	20
3.2	Vekstrate	21
3.3	Cellestørrelse	22
3.3.1	Gjennomsnittsdiameter	22
3.3.2	Maksdiameter	23
3.3.3	Korrelasjon mellom gjennomsnitts- og maksdiameter	24
3.4	Cellesyklus og celledeling	26
3.5	Flowcytometer og cellesyklus	34
3.6	Støkiometri	37
3.6.1	Karbon til fosfor forhold (C:P ratio)	37
3.6.2	Karbon til nitrogen forhold (C:N ratio)	39
3.6.3	Nitrogen til fosfor forhold (N:P ratio)	40
3.7	Mengde RNA	41
3.8	Alkalisk fosfatase aktivitet	43
3.9	Transplantasjonseksperiment	44
3.10	Genomstørrelse	45
4	Diskusjon	49
4.1	Fosforbegrensing	49
4.2	Støkiometri	50
4.3	Vekstrate	50
4.4	Cellesyklus	51
4.5	Cellestørrelse	52
4.6	Mengden RNA	53
4.7	Genomstørrelse	54
4.8	Mulige feilkilder	55

4.8.1	Modellorganisme.....	55
4.8.2	Prøvetaking.....	55
4.8.3	CASY.....	55
4.8.4	Medium.....	56
4.8.5	Flowcytometer	56
4.9	Oppsummering.....	57
4.10	Forslag til videre undersøkelser	58
	Litteraturliste	60

1 Introduksjon

2013 markerte en symbolsk milepæl for menneskeheten, idet CO₂-konsentrasjonen for første gang i mennesket historie oversteg 400 ppm. Den globale temperaturøkningen som er forventet som en følge av økt CO₂-kontrasjon vil ha en rekke konsekvenser for livet på landjorda og i havet (Finkel et al., 2009). Det vil skje endringer i artssammensetning og artsutbredelse, endring i fenologi og endring i genotyp og fenotyp (Gardner et al., 2011). I denne sammenhengen er spesielt koblingen mellom organismers størrelse og temperatur interessant. Det er en generell observasjon at organismer ofte er større ved lavere temperatur, og en rekke studier vis

r at kroppsstørrelse er negativt korrelert med temperatur (Karl & Fischer, 2008, Gardner et al., 2011).

Med global oppvarming er det derfor predikert at størrelse hos spesielt ektoterme organismer kan avta, og at cellestørrelsen til encellede organismer som planktonalger kan minke, både inter- og intraspesifikt (Hessen et al., 2013). Konsekvensene av dette kan bli mange. Som grunnlaget for akvatiske næringskjeder vil en endring i planteplanktonbiomasse kunne gi endringer innad i økosystemer på samfunnsstruktur, størrelse og eventuelt produksjon. Dette kan få store effekter for høyere trofiske nivå. Globalt står planteplankton for rundt 50% av klodens oksygenproduksjon (Finkel et al., 2009), og er dermed en stor bidragsyter i karbonkretsløpet og fikseringen av uorganisk karbon. Om reduksjon av cellestørrelse hos planktonalger virkelig følger av en temperaturøkning, kan dette også påvirke produksjon av organisk materiale i ferskvann og hav. Mindre fiksert CO₂, gir høyere konsentrasjon av CO₂ i atmosfæren som forsterker oppvarmingseffekten og dermed global oppvarming. Det er derfor interessant og viktig å undersøke hvorvidt temperatur har en effekt på planteplanktonstørrelse, hvorvidt, og gjennom hvilke mekanismer.

Den første som etablerte en klar kobling mellom temperatur og kroppsstørrelse var den tyske 1800-tallsbiologen Carl Bergmann. Han observerte at kroppsstørrelse hadde en geografisk trend. Jo lengre nord man kom desto større ble individene som oppholdt seg der (Bergmann, 1847). Bergmann, som studerte endoterme organismer, mente at denne sammenhengen kunne forklares av at varmetapet reduseres når overflate til volum forholdet øker. Større individer vil ha et mer energieffektivt varmebudsjett enn mindre individer og dermed ha en fordel i

nordlige områder. Teorien har blitt støttet av senere studier som syntes å bekrefte at individer fra samme art generelt var mindre i områder hvor det er varmt, sammenlignet med individer fra områder med lavere temperatur (James, 1970). Med den økende bevisstheten om global oppvarming har interessen for hvilke effekter temperatur har på organismer også økt. Dette har resultert i en rekke studier som undersøker sammenhengen mellom temperatur og kroppsstørrelse, mange studier viser en omvendt proporsjonalitet mellom temperatur og kroppsstørrelse og at trenden er nærmest universell for ektoterme organismer (Daufresne et al., 2009, Karl & Fischer, 2008, Gardner et al., 2011)). Siden trenden observeres for endoterme så vel som ektoterme organismer må det ligge andre mekanismer bak enn varmetapteorien til Bergmann (Walters & Hassall, 2006). I tillegg er det observert avvik fra trenden som viser at livshistorietrekk og adaptasjoner også spiller inn (Chown & Gaston, 2010).

Den empiriske sammenhengen, mellom temperatur og størrelse som er observert har blitt betegnet temperature-size-rule (TSR). TSR predikerer større kroppsstørrelse i kjølige områder (Kozłowski et al., 2004).

En temperaturendring i et område kan føre med seg en rekke endringer for habitatet og dets biota, som kan være vanskelig å skille fra hverandre. En temperaturendring i en innsjø kan for eksempel endre predatorsammensetningen, gassløselighet, sjiktning og løseligheten til salter. Alle disse faktorene kan påvirke organismers cellestørrelse og de kan samvariere. Det er viktig å gjennomføre faktorielle eksperimenter for å se hvilke faktorer som påvirker cellestørrelse mest og frikoble interaksjonene.

Det fundamentale spørsmålet som TSR reiser er hvordan temperatur kan endre kropps- og cellestørrelse hos organismer. En organismes kroppsstørrelse er gitt av organismens arvestoff og dens miljø og den kan variere enten som følge av antallet celler, mengde ekstracellulær matrix eller som følge av cellenes størrelse (Arendt, 2007). For encellede organismer følger det naturlig at den eneste måten de kan regulere sin kroppsstørrelse er å regulere cellestørrelsen. Mikroalgen *Chlamydomonas reinhardtii* er encellet organisme og vil derfor bare kunne regulere sin størrelse ved å regulere cellevolum. Det vil derfor være interessant å se hvilke faktorer som er med på å regulere *C. reinhardtii* cellestørrelse.

En interessant observasjon i denne sammenheng er at kjernestørrelse oftest er positivt korrelert med cellestørrelse (Gregory, 2001). Det kan derfor tenkes at organismer i kalde omgivelser responderer på temperaturen ved å øke størrelsen på cellekjernen for å øke cellestørrelsen. Størrelsen på cellekjernen er gitt av størrelsen på genomet, som igjen er gitt av mengden DNA og/eller genomets struktur. Denne oppgaven tar sikte på å redegjøre for grønnalgen *Chlamydomonas reinhardtii*'s respons på temperatur og næringskonsentrasjon, med særlig fokus på sammenhengen mellom genomstørrelse og cellestørrelse.

1.1 Kroppsstørrelse

1.1.1 Cellestørrelse

Cellestørrelsen hos mikroalger påvirker en rekke fysiologiske og økologiske funksjoner inkludert metabolsk rate (vekst, fotosyntese og respirasjon), livshistoriestrategier, lysabsorpsjon, næringsopptak og gassutveksling (diffusjonsrate), næringsinnhold (støkiometri), synkningsrate, tetthet og beitbarhet (Finkel et al., 2009). Som primærprodusent er fytoplankton grunnpilaren for akvatiske næringsnett og økosystemer (Brönmark og Hansson, 2005).

Størrelse er en viktig del av den evolusjonære strategi, og setter samtidig også fysiske grenser for metabolisme og interaksjon med habitatet (Finkel et al., 2009). Siden cellestørrelse har så mye å si for mikroalger på individ- så vel som økosystemnivå, er det av stor interesse å nøste opp hvilke faktorer som bestemmer cellestørrelsen både på faktorer som bestemmer cellestørrelsen hos planktonalger nivå.

1.2 Faktorer som påvirker cellestørrelse

Den interspesifikke variasjon i cellestørrelse hos encellede alger omfatter alger på under en mikrometer (*Ostreococcus tauri*) til flere centimeter i diameter (*Valonia ventricosa*). Denne oppgaven tar imidlertid sikte på å forklare *intraspesifikk* cellestørrelsesvariasjon. Det interessante spørsmålet er hvorfor og hvordan alger fra samme art, til og med samme klon, kan variere i cellestørrelse. Det er åpenbart at ulikt beitepress fra dyreplankton kan påvirke størrelsesfordeling, men også næringssaltnivå og temperatur er antatt å spille en rolle.

1.2.1 Hva gjør store alger store?

Biologiske faktorer

Alger i naturen inngår alltid i en næringskjede, dermed vil både abiotiske og biotiske faktorer være med på å regulere cellestørrelse. For eksempel vil forskjellig predatorpress forsterke seleksjon for cellestørrelse. Om en predator jevnt over gresser på store alger, vil dette føre til en reduksjon i populasjonens gjennomsnittlige cellestørrelse (Brönmark og Hansson, 2005). En slik "top-down" regulering kan forklare variasjonen man ser i algebiomasse fra systemer med samme næringskonsentrasjon. Data fra Moss et al., (1996) og Hansson (1992b) gjengitt i Brönmark og Hansson (2005) viser at det er stor variasjon i algebiomasse i innsjøer med samme nitrogen- (N) og fosfor- (P) konsentrasjon, men med ulike trofiske nivåer.

Abiotiske faktorer

I tillegg til de biotiske faktorene setter de abiotiske forholdene grenser for størrelse. Et byggverks størrelse er naturligvis styrt av tilgangen på byggemateriale, og på samme måte er cellestørrelse på mange måter diktet av næringstilgang. Det er vist at eutrofe innsjøer generelt ikke bare har høyere biomasse av alger, men at det også oftest er større arter og celler der enn i oligotrofe systemer (Peter & Sommer, 2013). Små, tynnveggede og rasktvoksende alger vil ha et konkurransemessig fortrinn i oligotrofe systemer, da overflatevolum forholdet er størst og dermed opptaket av N og P er mer effektivt (Hessen et al, 2013). For hvert atom biotilgjengelig fosfor (P) som ender i en innsjø vil omtrent 150 karbon-atomer (C) bli bundet av autotrofe organismer (Hessen et al., 2006). Ved omregning til vektenheter vil det tilsvare at med ett gram økt tilgjengelig P – forutsatt P-begrenset vekst - øker fytoplanktonbiomassen med 400 g, gitt at omtrent 10% av algers våtvekt består av C (Montagnes & Berges, 1994). Andre abiotiske forhold vil også spille inn på cellestørrelse. Lysintensitet, lyskvalitet og konsentrasjoner av næringssalter og uorganisk karbon styrer fotosyntesen og er derfor, ikke overraskende, koblet til vekstrate og cellestørrelse (Finkel et al., 2009). Temperatur er som nevnt en annen potensielt bestemmende faktor for cellestørrelse, men årsakssammenhengen er her langt fra avklart. Trenden mellom temperatur og størrelse er imidlertid så universell for ektotermiske organismer, inkludert mikroalger, at temperatur må være en reell forklaringsvariabel (Atkinson, 1994).

Temperatureffekten er vist på organismer isolert fra andre arter. Organismer som vokser opp i kalde omgivelser blir større enn de som vokser ved høyere temperatur (Forster et al., 2013). Reduksjon i fytoplanktonstørrelse som følge av høyere temperatur ser også ut til å bli mediert av redusert næringstilgang (Peter & Sommer, 2013). Dette fenomenet gjelder for øvrig for flere arter enn de unicellulære (Hessen et al., 2013). Effekten er vist for kjente modellorganismer som *Daphnia* (Jalal et al., 2013), *Drosophila melanogaster*, samt en rekke andre pro- og eukaryoter (Arendt, 2007).

1.2.2 Genomstørrelse som indikator på cellestørrelse

Det er observert at cellestørrelse er sterkt korrelert med kjernestørrelse (Gregory, 2001). Denne observasjonen bygger opp under *skeletal DNA theory*, som sier at størrelsen på genomet dikterer kjernestørrelsen som igjen dikterer cellevolum, og som igjen vil bli optimalisert av seleksjon (Cavalier-Smith, 2005). Er det slik at den intraspesifikke cellestørrelsesvariasjonen kan forklares av genomstørrelse? I så fall hvordan kan en organisme endre genomstørrelse, og hvilke faktorer spiller inn?

1.3 Mekanismer for endringer av genomstørrelse

Genomets størrelse er bestemt av to hovedfaktorer, mengde DNA eller struktureringen av DNA. Det er ingen åpenbar korrelasjon mellom arters kompleksitet eller antall gener og størrelse på genomet. Samtidig er det en enorm diversitet i genomstørrelse mellom organismer (Gregory, 2005). Denne diversiteten er nesten utelukkende tilskrevet mengde ikke-kodende DNA (Gregory, 2005). Jo mer ikke-kodende DNA, desto større genom.

Ikke-kodende DNAs opphav og funksjon er mye debattert. Mange biologer støtter seg på teorien om at ikke-kodende DNA (som transposons) er selvkopierende ”blindpassasjerer” som nærmest fungerer som ”parasittisk” DNA (Dawkins, 2006) og som kan dominere genomet fullstendig i forhold til proteinkodende regioner (altså de egentlige genene). Andre biologer tilskriver ikke-kodende DNA en mer adaptiv rolle, for eksempel at genomstørrelsen har en direkte innvirkning på seleksjonsutsatte trekk (Petrov, 2001). Til sist finnes det de som sier at ikke-kodende DNA må sees i et historisk og populasjonsgenetisk perspektiv og som hevder at mye av variasjonen kan tilskrives ”nøytrale” prosesser og at seleksjonspresset mot

proliferasjonen av ikke-kodende DNA avgjøres primært av populasjonsstørrelse (Lynch, 2007).

Mengde total DNA kan variere enten i form av en endring i C-verdi (mengde haploid DNA i picogram), eller ved forskjellige varianter av polyploidiseringer (duplisering av hele eller deler av genomet) (Hessen et al., 2013). Små endringer i C-verdi vil oftest skje ved en profilering av nukleotider gjennom forekomsten av ikke-kodende elementer som repetert DNA, transposons eller retrotransosons, men også ved gen-dupliseringer (Gregory, 2005, Lynch 2007). Store og hurtige endringer av genomstørrelse er knyttet til polyploidisering, som fører til en økning i antall kromosompar (Fox & Wolf, 2006). Den romlige strukturen til DNA, og dermed hvor mye ”plass” det tar, bestemmes først og fremst av graden av kondensering (Jalal et al., 2013). Heterokromatin tar mindre plass enn eukromatin (Cavalier-Smith, 2005).

Genomstørrelse kan variere mye i nært beslektede arter og innenfor en art. Selv om graden av intraspesifikk genomvariasjon kan skyldes målefeil ved tidlige deteksjonsteknikker og data materialet kan derfor være skeivt (Greilhuber, 1998).

Gitt koblingen mellom genom- og cellestørrelse, og den fundamentale effekten begge disse parameterne har på alt fra gen-ekspresjon til vekstrate og cellestørrelse, samt videre effekter av dette oppover i næringskjedene, er det viktig å forstå hvordan tilgangen av næringsalter og temperatur, påvirker genom- og cellestørrelse.

1.4 Hypotese og mål med oppgaven

Hypotese

Opgaven har to sentrale hypoteser:

- 1: Lav veksttemperatur gir langsommere vekstrate, men større cellevolum.
- 2: Lite tilgjengelig fosfor gir redusert vekstrate, og gir redusert cellestørrelse ved redusert genomstørrelse.

Algecellenes størrelse vil være negativt korrelert med temperatur og positivt korrelert med tilgjengelig fosfor. Tanken er at reduksjonen i cellestørrelse hos mikroalger skyldes en reduksjon av genomstørrelsen forårsaket av en fysisk reduksjon av DNA-sekvensen ved bortfall av ikke-kodende DNA. Det er tenkt at genomstørrelse kan være relatert til vekstrate og at i situasjoner som fremmer en høy vekstrate, som høy temperatur, hvor det samtidig er lite tilgjengelig fosfor (P), vil det være et behov for reallokering av P fra DNA til RNA for å maksimere proteinsyntese og vekstraten hos organismer, (Hessen et al., 2010). Denne reallokeringen av P fra DNA til RNA vil i stor grad være tilknyttet ikke-kodende DNA. Reallokering fra kodende DNA vil ha en effekt på fenotypen som vil kunne ha en effekt på fitness. Man vil forvente redusert cellestørrelse og økt vekstrate med bortfall av ikke-kodende DNA som følge av en seleksjon mot høyere vekstrate ved høye temperaturer. Samtidig er det forventet at økte temperaturer vil kunne gi redusert cellestørrelse, eventuelt også redusert genomstørrelse.

For å teste denne hypotesen ble det designet et faktorielt oppsett med to forskjellige temperaturer og to forskjellige næringskonsentrasjoner (mengde P i $\mu\text{Mol P L}^{-1}$). Jeg ønsker med dette kunne teste om genom- og cellestørrelse er koblet til næringstilgang, temperatur eller en kombinasjon av disse.

2 Materialer og metoder

2.1 Modellorganisme

Valg av modellorganisme falt på den encellede grønnalgen *Chlamydomonas reinhardtii*. *C. reinhardtii* er den hyppigst brukte algen i forskning innen celle- og molekylærbiologi. Linjen som ble brukt i eksperimentet var CC-1690 wt mt+ [sager 21gr] fra Chlamydomonas Resource Senter (Universitet i Minnesota). Denne linjen stammer fra den første isoleringen av arten fra 1945 (Sager, 1955). Linjen er godt kjent og mye forsket på, den ble også brukt i opprettelsen av et bibliotek for cDNA for Chlamydomonas Genome Project (Pröschold et al., 2005).

Slekten *Chlamydomonas* er i klassen grønnalger (Chlorophyta). Slekten er kosmopolitisk, og finnes jord, ferskvann, hav og snø. *Chlamydomonas reinhardtii* er kjent for sin kopplignende kloroplast og sine to flageller som brukes til bevegelse og parring. Seksuell reproduksjon forekommer ikke med mindre det er to forskjellige matings types samt lite nitrogen til stede (Graham et al., 2009). Arten har en cellevegg bestående av glycoproteiner. *C. reinhardtii* er haploid, har 17 kromosomer i kjernen og genomstørrelsen er på rundt 120 mB (Merchant et al., 2007). «Fanget»-mitose forekommer ofte, og morcellen kan ofte produsere 2, 4, 8, 16 datterceller ved suksessiv mitotisk divisjon inne i celleveggen (Graham et al., 2009). Antallet datterceller avhenger av størrelsen på morcellen (Craigie & Cavalier-Smith, 1982), og dattercellene blir først frigjort etter at alle celledelingene er ferdige ved hjelp av en enzymatisk degradering av celleveggen (Schlösser, 1966).

2.2 Eksperimentelt oppsett

I et faktorielt oppsett ble *C. reinhardtii* dyrket ved høy og lav temperatur (19 °C og 13 °C) og i et medium med høy og lav fosfatkonsentrasjon (25 $\mu\text{Mol PL}^{-1}$ eller 5 $\mu\text{Mol PL}^{-1}$) gjennom 4 måneder.

1. Høy temp x høy P, heretter omtalt som 19+
2. Høy temp x lav P, heretter omtalt som 19-
3. Lav temp x høy P, heretter omtalt som 13+
4. Lav temp x lav P, heretter omtalt som 13-

Hver behandling hadde triplikater, totalt $4 \times 3 = 12$ flasker. Hver av flaskene inneholdt 40mL medium.

Når jeg beskriver begge behandlingene på lav fosfor heretter vil jeg skrive -P, og behandlingene på høy fosfor omtales som +P.

2.3 Medium

I eksperimentet ble det brukt et modifisert WC medium (Guillard & Lorenzen, 1972), med lokalt naturlig innsjøvann. Mediet ble fremstilt av vann hentet fra Gullerudtjern i Ringerike kommune. Dette tjernet ligger på kalkrik berggrunn og har derfor en naturlig god bufferkapasitet. Siden eksperimentet bare tok sikte på å redegjøre for effekten av temperatur og fosfortilgang var det viktig at algene ikke opplevde CO₂-begrensning. En begrensning som kunne innvirket på eksperimentet og gitt feilaktige resultater da CO₂-begrensning er vist å ha effekt på cellestørrelse (Finkel et al., 2009).

Testforsøk viste at *C. reinhardtii* ikke hadde gode vekstbetingelser bare med det lokale innsjøvannet, trolig fordi det meste av fosforet var bundet og lite biotilgjengelig. Dette gjorde at jeg valgte å tilsette ekstra fosfat også i den behandlingen som skulle ha fosforbegrensning. Mediet som skulle gi fosforbegrenset vekst ble derfor tilsatt $5 \mu\text{Mol PL}^{-1}$ mens algene som ble dyrket uten P-begrensning fikk $25 \mu\text{Mol P L}^{-1}$. Det ble i tillegg tilsatt nitrat (NaNO₃) i en konsentrasjon på $1000 \mu\text{Mol N L}^{-1}$, dette for å sikre at P skulle være det begrensende element.

Siden fosfat ble tilsatt i ulik mengde i for begge temperaturer ble den totale fosforkonsentrasjonen i mediet, før og etter tilsatt P, analysert for å se hvor mye fosfor algene hadde tilgjengelig i de forskjellige mediene.

Bestemmelse av totalfosfor ble gjort med oppløsning av kaliumperoksoedisulfat (K₂S₂O₈).

To ganger 10 ml av hvert av mediene ble samlet slik at man hadde et replikat.

2 x 10 ml av grunnmediet fra Gullerudtjern uten tilsatt fosfat.

2 x 10 ml av grunnmediet tilsatt med $25 \mu\text{Mol P L}^{-1}$.

2 x 10 ml av grunnmediet tilsatt med 5 $\mu\text{Mol P L}^{-1}$.

Total fosforkonsentrasjon i mediene ble analysert etter metoder beskrevet på side 18.

80 liter vann ble hentet den 4. September 2013, på en meters dybde fra midten av tjernet. Dette ble filtrert for partikler ved hjelp av et GF/F (Whatman) glassfiberfilter med maskevidde på ca. 0,9 mikrometer (μm). Og satt til ”bobling”, tilførsel av luft, med sorte søppelsekker over seg for å hindre eventuell primærproduksjon og kontaminering. Vannet ble så filtrert igjen, denne gangen med maskevidde 0,22 μm med en 500mL Bottle Top Vacuum Filter før nitrat, fosfat, vitaminer og spormetaller ble tilsatt i henhold til oppsettet. Mediet ble satt på klimarom ved enten 19°C eller 13°C, og filtrert på nytt med 0,2 μm filter, Særstedt Filtropus S, før algene ble tilsatt.

2.4 System for dyrking av *Chlamydomonas reinhardtii*

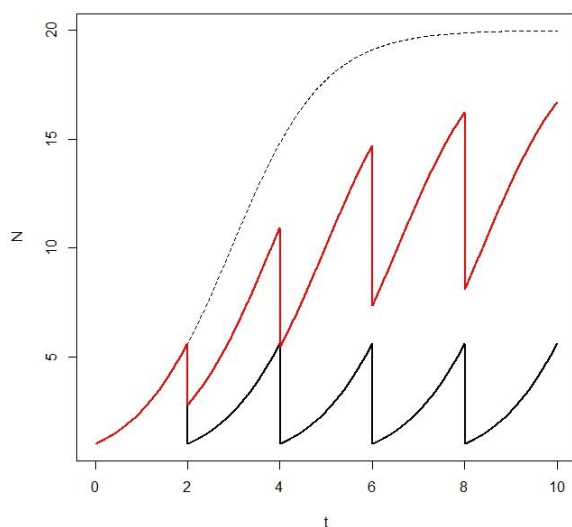
Algedyrkingen skjedde på to separate klimarom (19°C og 13°C) på Institutt for Biovitenskap ved Universitet i Oslo. Det ble laget to eksakte kopier av belysningsoppsettet, slik at algene på begge klimarom fikk samme lysintensitet (85-90 μMol kvanter PAR). Lys:mørke-syklus ble satt til 12 lyst og 12 timer mørkt. Flaskene som kulturene ble dyrket i var Nunclon Delta Surface 40 mL Filtercap.



Figur 1: Belysningsoppsett for algene i hvert av klimarommene.

2.5 Fortynningsrate

Algene som gikk på lav konsentrasjon av P ble holdt i en batch-kultur og ble manuelt fortynnet som en semi-kontinuerlig kjemostat. En kjemostat har en fast fortynningsrate i mL, uavhengig av antall celler. På denne måten vil det til slutt oppnås en likevekt der algene holdes i den stasjonære delen av vekstfasen, dette bidrar til P begrensning. I dette eksperimentet ble halvparten av mediumet (20 mL) skiftet ut ved hver fortynning. Fortynningene skjedde mandag, onsdag og fredag hver uke. Ingen av behandlingen ble fortynnet ekstra på fredagen, til tross for at det var tre dager til neste fortynning. Dette fordi kjemostatene uansett skulle ha begrensning og ekstra fortynning ville virket mot denne hensikten. For turbidostatene viste en test før eksperimentet at maks antall celler pr. mL lå på rundt 2 millioner celler pr. mL. Dette er langt unna antall celler målt pr. mL tre dager etter fortynning for behandlingen med høyest vekstrate 19+ (omtrent 700.000 celler pr. mL ved fortynning på mandag).



Figur 2: Viser vekstforholdene i en batch-kultur. Den stiplede linjen er uten fortynning. Den røde linjen er for en semi-kontinuerlig kjemostat. Og den sorte linjen er for en semi-kontinuerlig turbidostat.

Algene som gikk på høy konsentrasjon av P ble manuelt fortynnet ned til 50.000 celler/mL som i en turbidostat hver mandag, onsdag og fredag. Det ble altså fortynnet ulikt medium fra gang til gang. Turbidostatfortynningen gjorde at algene holdes i logaritmiske delen av vekstfasen og dermed ikke opplever noen P begrensninger.

Fortynningene ble hele tiden gjort til nye kulturflasker. Dette fordi algene kunne feste seg til veggene i flaskene og dermed begrense lysmengden.

2.6 Beregning av antall, størrelse og vekstrate

Størrelsen på cellene og antall celler pr. ml (c/ml) ble målt med CASY Cell Counter + (Scharfe System GmbH). Før cellene ble målt i CASY, ble de fortynnet slik at de skulle komme innenfor deteksjonsnivået til CASY Cell Counter +, som maks kan telle 20.000 c/ml. Instrumentet ble satt til å bare telle partikler mellom 2 og 20 μm ekvivalent sfærisk diameter, med fem innsugningssyklus à 200 μl .

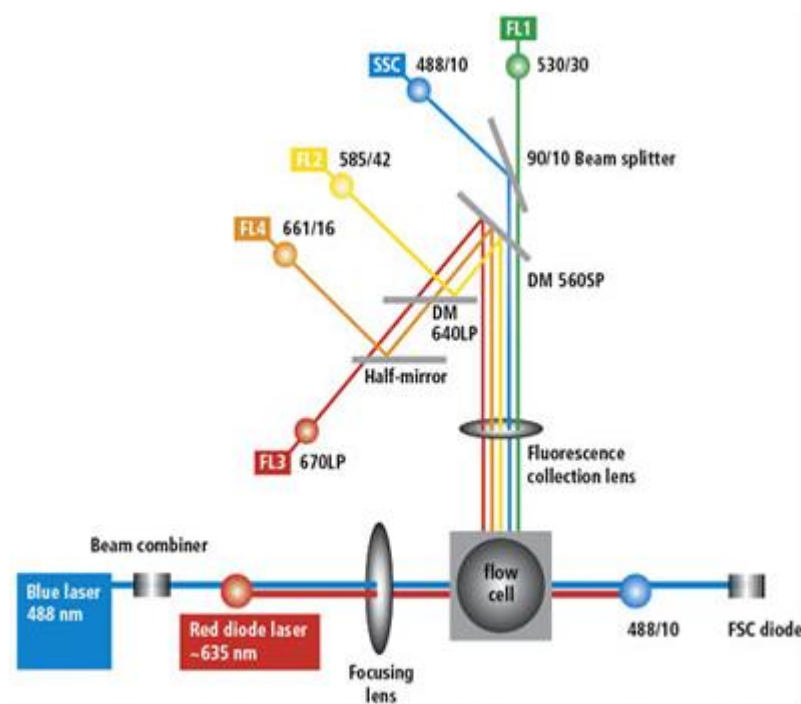
Algene ble fortynnet i en elektrolytt, CASYton (Roche Prime Supply). CASY teknologien bygger på cellene pumpes gjennom kapillær med 100 μm diameter, med en svak elektrisk strøm mellom endene av kapillæret. Siden plasmamembranene til cellene fungerer som en isolator vil motstanden øke hver gang en celle passerer gjennom kapillæret, noe som igjen gjør at spenningen øker. Høyden på spenningspulsen er proporsjonal med cellevolumet slik at CASY-instrumentet kan måle både antallet av og volum på algene i løsningen.

Siden cellyklus har en effekt på størrelse og fordeling (Oldenhof et al., 2007) var det viktig at prøvene ble gjort på samme tidspunkt over hele innsamlingsperioden. Prøvene ble tatt tidlig på morgenen mellom 07.00 og 08.00 rett før lyset ble skrudd på. Det ble også gjennomført dag og døgntester for å se hvordan cellyklus endret seg med tidspunktet på døgnet og når algene gjennomførte celledeling. Det ble registrert to verdier for volum. En for maksdiameter (peak) og en for gjennomsnittlig diameter (mean). Dette fordi noen av behandlingene ikke var normalfordelt.

Den spesifikke vekstraten μ (d^{-1}) er gitt av den relative endringen i celledetthet over tid. Ved å måle antall celler i kulturen på to tidspunkt kan man kalkulere vekstraten pr. dag mellom de to målingene. $\text{Log}(t_2 / t_1) / d = \mu$, der t_1 er antall ved førstemåling, t_2 er antall ved siste måling, og d er antall dager (Sternier og Elser, 2002).

2.7 Genom- og kjernestørrelse

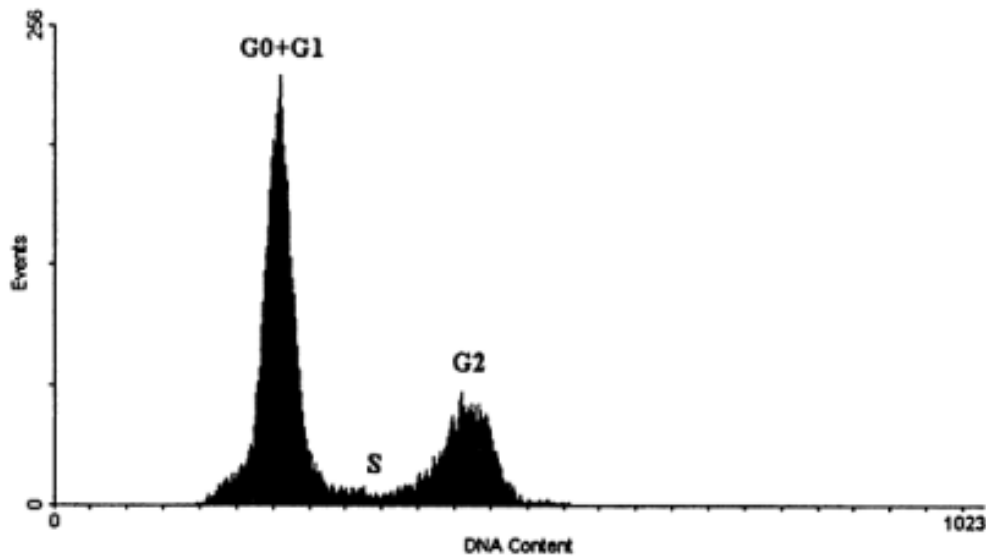
Nukleus- og genomstørrelsen ble estimert ved flowcytometry (FCM) med veiledning fra Dr. Marwa Jalal og Per-Johan Færøvig. I følge Animal Genome Database, er FCM den nest hyppigst brukte metoden for å estimere genomstørrelse (Gregory, 2014). FCM er en laserbasert teknologi som kan brukes til å måle utseendet og strukturen til partikler som celler, cellekjerner eller kuler. Ved hjelp av et innsugningssystem, blir en og en partikkel dratt igjennom et rør hvor den blir bestrålt av en lyskilde. Ved å måle spredningen på lyset på en detektor som ligger rett bak lyskilden (FSC, forward scatter), kan man måle størrelsen på partikkelen. Granularitet (kornetheten eller kompleksiteten til partikkelen) kan måles med en detektor som ligger til siden for lyskilden ("side scatter").



Figur 3: FACS Calibur optical system. Figuren viser et diagram over oppsettet. Figuren er hentet fra produsentens hjemmesider (<http://www.bdbiosciences.com/eu/instruments/facscalibur/features/index.jsp>)

Det målte fluorescenssignalet av et fluorokrom bundet til DNA er antatt å være direkte proporsjonal med mengden DNA i kjernen, og dette ble brukt som metode for å estimere DNA-mengde. Flowcytometerets virkemåte blir i detalj gjennomgått i *Larger Daphnia at lower temperature a role for cell size and genome configuration?* (Jalal et al., 2013).

FCM gir også innsikt i cellesyklus (Current Protocols of Cytometry, 2005). Cellesyklus deles som regel inn i fire faser, G₀/G₁, S (DNA syntese), G₂, og M (mitose). En oversikt vises i figur 4.



Figur 4 : FCM kan brukes til å skille mellom de ulike fasene i cellesyklus. Figuren er hentet fra (Cytometry, 2001)

Protokoll for kjerneekstraksjon og DNA farging av *Chlamydomonas Reinhardtii*

Protokollen som følger er en modifisert gjennomføring av Marie et al., (2001)

1 ml fra hver av kulturene (som inneholdt fra 200.000 til 500.000 celler ml⁻¹) ble samlet i 2ml eppendorf-rør og sentrifugert i 5 min på 1200 rpm ved 10°C. Overflødig vann ble fjernet. Deretter ble 1ml Nucleus Isolering Buffer (NIB) tilsatt. NIB ødelegger alt i cellen bortsett fra kjernen. Som intern og ekstern standard ble blodceller fra kylling (*Gallus gallus domesticus*) (CRBC) brukt. Siden vi kjenner den nøyaktige genomstørrelsen av hønseblodceller (Johnston, Bennett, Rayburn, Galbraith, & Price, 1999) så kan CRBC brukes som standard og referansemål i flowcytometer-målinger (Current Protocols of Cytometry, 2005). Det var på forhånd laget en hønseblodfortynning, bestående av 1ml NIB og 10µl hønseblod. 1µl av denne fortynningen tilsvarer om lag 500.000 CRBC-kjerner, hvor hver av kjernene er omtrent 2.5 pg DNA store.

Følgende steg ble gjort på is, og mellom hver behandling ble prøvene forsiktig ristet. 1 µl av hønseblodfortynningen ble tilsatt alle prøvene. Deretter ble 5µl RNAase A tilsatt. Dette denaturer alt RNA, slik at fargen som ble tilsatt i neste ledd bare skulle farge DNAet. Så ble prøvene dekket til med aluminiumsfolie og lyset skrudd av. 50µl av propidium iodide (PI) ble tilsatt. PI farger DNA. Prøvene ble så inkubert mørkt i rundt 30 minutter.

Løsningen ble til sist filtrert direkte til testtuben, gjennom en BD Falcon cell strainer cap med en maskevidde på 35µm. Test tubene ble så kjørt i FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA). Testresultatene ble registrert av softwaren CellQuest Pro (Becton Dickinson, San Jose, USA). Det ble detektert 10.000 celler av hver av prøvene og gjennomstrømningsraten lå på omtrent 100 celler sek⁻¹.

Resultatene fra den første FCM-analysene viste at det var store forskjeller i genomstørrelse (figur 26). Responsen var så sterk og merkelig at jeg bestemte meg for å ta tre FCM-prøver gjennom en dag for å se hvorvidt cellyklus kunne ha påvirket genomstørrelse-estimatene. Resultatet er vist i figur 27. Dette viste at cellyklus spilte en stor rolle på genomstørrelsen. Dette gjorde at jeg valgte å gjennomføre et transplantasjonsforsøk, slik at alle behandlingene skulle få samme cellyklus. Når jeg visste at alle behandlingene var i samme stadium av cellyklus kunne jeg igjen ta en ny FCM-prøve som da ville gi mer sammenliknbare mål på genomstørrelse. Resultatet er vist i figur 28.

Det ble komplikasjoner med forsyningen av ferskt hønseblod i løpet av eksperimentet, derfor ble FCM analysene av kulturene på slutten av eksperimentet forkastet fra oppgaven.

2.8 Transplantasjonseksperiment

Dataene fra de to første gjennomkjøringene på flowcytometer gav nesten litt for gode resultater. Derfor ble det gjennomført et transplantasjonseksperiment, for å si i hvilken grad våre første målinger på FCM kunne stoles på, eller om det bare var et resultat av cellyklus.

Tre måneder inn i eksperimentet ble alger fra alle behandlingene satt på 19 ° C og full fosforkonsentrasjon (+P) i et annet belyningsoppsett, helt likt det de tidligere hadde vært i. Det ble gjort tett oppfølging av algene i 10 dager med 4 CASY-målinger som ga informasjon

om vekstrate og størrelse. Ved hver fortykning ble disse behandlingene fortyknet ned til 25000 celler pr mL. På slutten av disse 10 dagene ble cellene kjørt i FCM.

2.9 Døgnsyklus

For å se i hvilken grad cellestørrelse og celleantall endret seg over et døgn, ble det ved to tidspunkter målt celleantall og cellestørrelse over tid. 18.okt 2013, ble 6 målinger foretatt fra kl. 07.20 til kl. 21.35. 1.mars 2014 ble gjennomført 10 målinger over et døgn. Resultatene gir innsikt i cellesyklus og celledeling til *C. reinhardtii* ved de forskjellige behandlingene.

2.10 Støkiometri

Forholdet mellom nøkkelementene karbon, nitrogen og fosfor (C:N:P) gir informasjon om graden av elementbegrensing, og er også normalt korrelert til vekstrate (Hessen et al., 2013). Elementinnhold og forholdet mellom elementene (støkiometrien) ble derfor analysert som en indikator på graden av P-begrensing.

Elementsammensetningen i de forskjellige behandlingene av *C. reinhardtii* ble gjort med en elementanalysator (karbon og nitrogen) og en autoanalyser (fosfor) utført av Berit Kaasa (UiO). Både ved analyse av C:N og P ble algene først samlet på et GF/C filter. GF/C filtrere ble bakt på 530° C i 4 timer før samplingen.

C:N

Når man analyserer karboninnholdet til en organisme får man med data om nitrogeninnholdet. Karbon- og nitrogenkonsentrasjonen ble målt med en Thermo Finnegan EA 1112 Series Flash Elemental Analyser (ThermoFisher Scientific). Denne maskinen kan analysere cellers innhold av C og N ved å brenne små mengder av prøven i ren oksygen (Dumas metode/"flash combustion"). Forbrenningsproduktene blir ført gjennom en katalysator hvor de omdannes til N₂ og CO₂. N₂ og CO₂ blir så separert i en gasskromatografisk kolonne og detektert gjennom endring i termisk ledningsevne.

P

Bestemmelse av totalfosfor ble gjort med oppløsning av kaliumperoxodisulfat (K₂S₂O₈). Metoden er basert på Murphy og Riley (Murphy & Riley, 1962) hvor det måles orthofosfat i vann. Prøvene ble det tilsatt 10 ml 1% K₂S₂O₈ ved 121°C i 30 minutter. Så ble prøvene kjørt i

en BRAN+LUEBBE autoanalyser III med metode-No. G-297-03 (Multitest MT). Dette er en kolorimetrisk metode hvor det dannes et gult kompleks av orthofosfat, molybdat og antimon. Dette komplekset reduserer av askorbinsyre ved $\text{pH} < 1$. Dette blå fosfor-molybdat komplekset måles i et kolorimeter ved 880 nm. Mengden C:N:P ble normalisert mot antall celler.

2.11 RNA-analyse

Mengden RNA i cellene ble også inkludert som en uavhengig indikator for graden av P-begrensning og antatt potensiale for realisert vekst. "Growth rate hypothesis" (GRH) postulerer at den totale mengden RNA gjenspeiler mengden ribosomal RNA (rRNA / ribosomer) (Flynn et al., 2010). Derfor er GRH koblet både til fosforbegrensning og til vekstrate. Med lite tilgjengelig fosfor er det forventet mindre RNA. Med mindre RNA er det forventet lavere vekstrate som følge av den lavere andelen av ribosomer. Mengden RNA ble normalisert mot antall celler.

Før analysen ble omtrent 500.000 alger fra hver av de 12 flaskene fanget på et filter (nitrocellulose-membran, 0,65 μm DAWP, Millipore). Dette filteret ble lagt i et nukleotidfritt mikrosentrifuge-rør og røret ble lagt i flytende nitrogen og lagret i en -80°C fryser til analysene ble gjennomført. På analysedagen ble rørene plassert på is og tilført 120 μl av ekstraksjonsbuffer (1% sarcosyl (w/v), Sigma). Deretter ble tubene homogenisert av en *sonificator* (Branson Sonifier, S450A) i et *cuphorn* (Branson 101147048) i 2 minutter under konstant *duty cycle* og *output 80*. Dette gjorde at algene falt av filteret og ble løst i bufferen. Opptil seks prøver ble homogenisert av gangen. Rett etter sonifiseringen ble tubene plassert på is og tilsatt 600 μl TE x 1 (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5). Noen av prøvene fikk for sterkt signal og måtte fortynnes ytterligere, dette ble korrigert for. Deretter ble 75 μl av løsningen i hver av tubene pipettert individuelt til brønnene på en 96-brønnsplate (655076, Greiner Bio-One, USA). Hver tube ble tilført i to brønner, en av brønnene inneholdt 20 μl nukleotidfritt vann (GibcoBRL 1071), mens den andre inneholdt 20 μl av 0,1 μg RNAase A (A7973, Promega). Deretter fulgte 25 minutter med varmeinkubasjon (37°C) på en ristebord (400 rpm) slik at RNAasen skulle bli jevnt fordelt og gitt nok tid til degradere alt RNA. Etter inkubasjonen ble 75 μl , av en 100 x fortynning av RiboGreen fargestoff (R-11490, Molecular Probes, USA) mot TE buffer, tilsatt med en automatisk 8-kanals pipette. Fargestoffet binder seg til alle nukleotider i prøven, og vil emittere lys ved eksitasjon. Tilslutt ble brønnplaten

analysert ved hjelp av en BioTek FL MX plateleser (BioTek, USA) med eksitasjonsbølgelengde på 480/20 nm og en emisjonsbølgelengde på 525/20 nm (sensitivitet 09). Ved å subtrahere fluorescenssignalet målt i brønnen med RNAase A (inneholdt bare DNA) mot brønnen med nukleotidfritt vann (inneholder RNA og DNA), lot RNA mengden seg kvantifiseres. Ved å fortynne en rRNA-standard (Invitrogen, R11490) laget jeg et kalibreringskurve som ble utgangspunktet for analysearbeidet (se appendiks). Det ble også lagt ut blanker i brønnplaten som bare inneholdt standard bufferen (75 µl of sarcosil + TE, 1:5). Analysene av RNA innhold ble gjort i samarbeid med Dr. Marcin Wojewodzic (UiO, Oslo), og ble normalisert mot antall celler.

2.12 Alkalisk fosfatase

Som en tredje indikator på fysiologisk tilstand relatert til P-begrensing, temperatur og vekst ble aktiviteten av alkalisk fosfatase (AP) analysert. AP er et hydrolase-enzym som kutter av fosfatgrupper fra mange typer molekyler, inkludert nukleotider, proteiner og alkaloids. Organismer som har lite tilgjengelig fosfat vil oppregulerer ekspresjonen av AP (Wojewodzic, Kyle, Elser, Hessen, & Andersen, 2011). Organismer med høyt innhold AP kan derfor sies å være fosforbegrenset.

Metoden for deteksjon av AP aktivitet var CDP-Star kjemoluminiscens-metode (Wojewodzic et al., 2011). Mengden AP aktivitet ble normalisert mot celleantall.

Før analysen ble omtrent 500.000 alger fra hver av de 12 flaskene fanget på et filter (nitrocellulose membran, 0,65 µm DAWP, Millipore). Dette filteret ble lagt i en nukleotidfri mikrosentrifuge-tube og tuben ble lagt i flytende nitrogen og lagret i en -80°C fryser. På analysedagen ble tubene plassert på is og tilført 0,5 mL Triton X-100 (T8787, Sigma, heretter Triton). Deretter ble de sonifisert på samme måte som i RNA-analysene.

Standarder ble preparert ved å bruke AP type VII-S (P5521, Sigma). Standardkurven gikk fra 2 til 100 µU av AP, fortynnet med 1% Triton. Tradisjonelt er en U (unit) definert som den mengden av enzymet som trengs for å hydrolysere 1 µM 4-nitrophenyl fosfat pr. minutt i pH 9,8 ved 37 °C.

20 μL av prøvene og standardene ble så pipettert til en 96-brønnsplate (pyrofosfatfrie plater, Nunc, 236105) som sto på is. 200 μL av klar-til-bruk CDP-Star (LifeTechnologies, T2214) ble så tilført alle brønnene. CDP-star binder seg til AP og emitterer et foton hver gang AP kløyver en binding.

Platen ble satt i en BioTek FL MX plateleser (BioTek, USA). AP klipper fosfatgrupper på CDP. Da degraderes CDP-molekylet og det emitteres fotoner som plateleseren kan detektere. AP aktivitet ble målt hvert 10 minutt i 1.5 timer. Deretter integrerte jeg arealet under kurven fra 0-40 minutter. Det integralet ble brukt til å lage en kalibreringskurve.

Analysene av RNA innhold ble gjort i samarbeid med Dr. Marcin Wojewodzic (UiO, Oslo)

2.13 Statistikk

For de statistiske beregningene brukte jeg R v.3.0.3 (R Development Core Team, 2014). Alle beregninger bygger på lineære modeller som igjen bygger på antagelser om uavhengighet, linearitet, og normalitet. For å se om dataene oppfylte forutsetningene for lineære modeller kjørte jeg en rekke diagnostiske plott, hvor spesielt den grafiske framstillingen av residualvariansen (Q-Q plott) ble vektlagt. Dataene var generelt normalfordelt. Dataene fra støkiometri, RNA og APA analysen var ofte forskjøvet mot høyre, og dataene ble derfor log-transformering før statistisk behandling.

Grunnet eksperimentets faktorielle oppsett kunne effekten av temperatur og fosforkonsentrasjon, samt interaksjonseffekten mellom dem testes. Eksperimentet mitt er også en rundt 100 dager lang tidsserie. Dette gir ofte litt vanskelig data (autokorrelasjon), da man opplever en mangel på uavhengighet mellom suksessive observasjonene.

Ved grafisk fremstilling av celledørrelse og vekstrate ble ”Lattice” pakken til R benyttet.

3 Resultater

3.1 Fosforkonsentrasjon i mediene

Analysen av total fosforkonsentrasjon fra Gullerudtjern viste at innsjøen i utgangspunktet er en mesotrof innsjø og at det ble etablert en markert gradient i total P som følge av tilsatt fosfat.

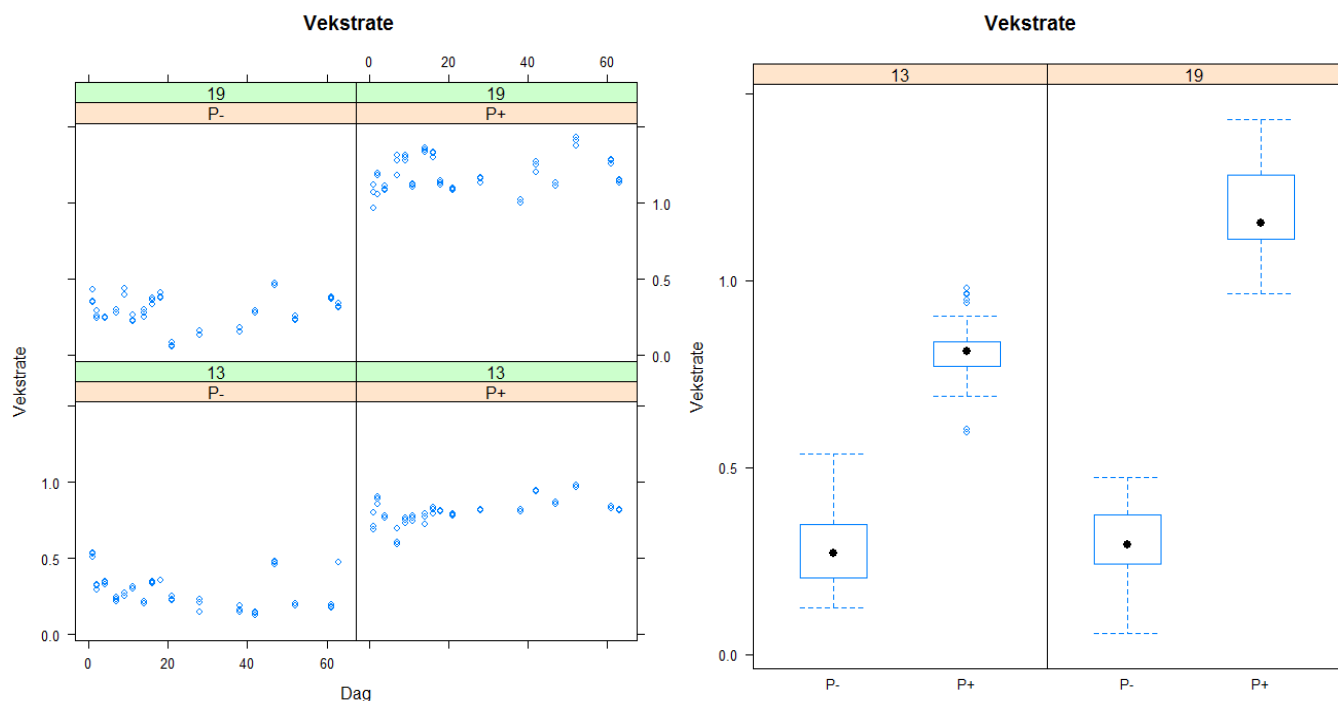
Tabell 1. Fosforkonsentrasjon i medium.

	Total fosforkonsentrasjon
Gullerudtjernvann Uten tilsatt fosfat	17 $\mu\text{g P/l}^{-1}$
Gullerudtjernvann Tilsatt 5 $\mu\text{Mol PL}^{-1}$ fosfat (-P)	109 $\mu\text{g P/l}^{-1}$
Gullerudtjernvann Tilsatt 25 $\mu\text{Mol PL}^{-1}$ fosfat (+P)	618 $\mu\text{g P/l}^{-1}$

Tabell 1: Viser den totale fosforkonsentrasjonen i de ulike mediene. I mediet hvor det er tilsatt mest fosfat er det også mest fosfor.

3.2 Vekstrate

Vekstraten (d^{-1}) ble påvirket av fosforkonsentrasjonen, med en vesentlig høyere vekstrate ved +P ved begge temperaturer (Fig. 5). Temperatureffekt på vekstraten sees bare på behandlingene som ble kjørt som turbidostater (+P).



Figur 5: Plottet viser vekstraten (d^{-1}) til de forskjellige behandlingene fra 14.okt 2013 til 11.des 2013.

Dataene oppfylte kravene til analyse ved en lineær modell, og denne viste at tidspunkt, temperatur og fosforkonsentrasjon og interaksjonseffekten mellom dem forklarte over 93% av variasjonen.

Tabell 2.

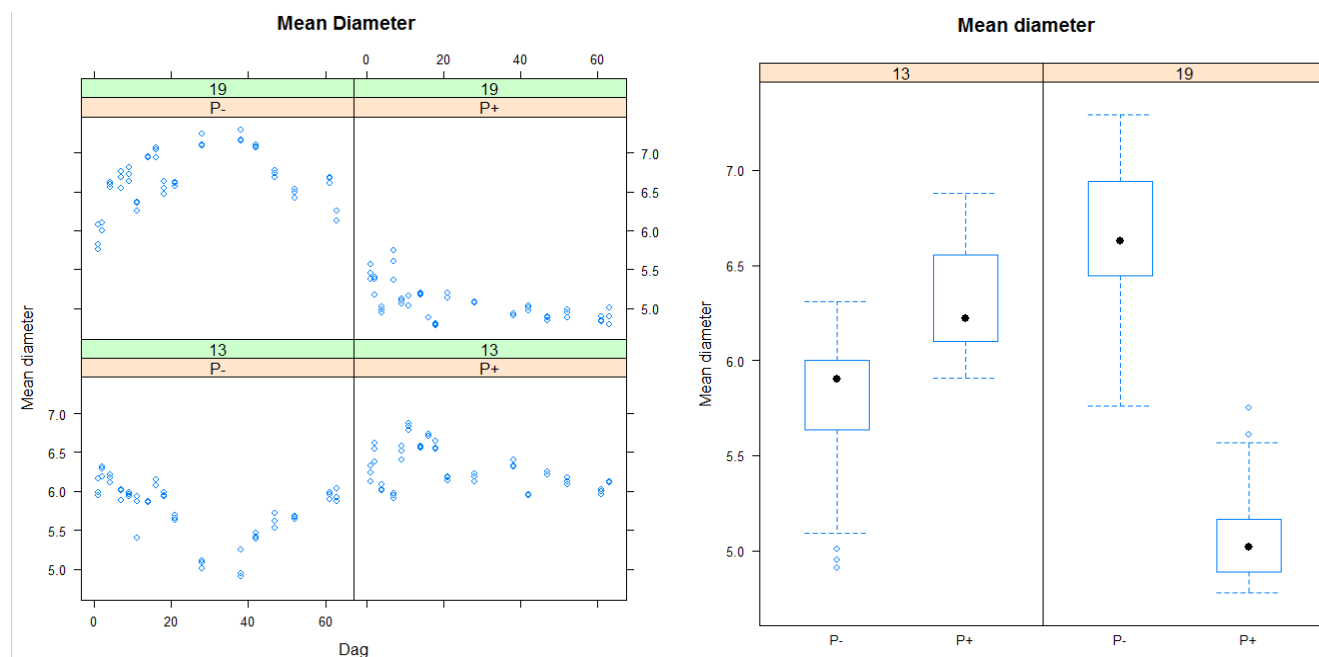
	Forklaringsvariabelkoeffisient i prosent	P-verdi
Fosforkonsentrasjon	81%	< 0.001
Temperatur	6%	< 0.001
Fosforkonsentrasjon x temperatur	6%	< 0.001

Tabell 2: Viser i hvilken grad de ulike variablene påvirker vekstraten.

3.3 Cellestørrelse

3.3.1 Gjennomsnittsdiameter

De ulike behandlingene resulterte i noe ulik gjennomsnittsdiameter, men med en invers respons mellom behandlingene (Fig. 6). Det ble funnet størst celler i -P ved 19 °C, mens ved +P er det størst alger på 13 grader. -P behandlingene viste imidlertid en mer variabel forløp enn +P (Fig. 6, venstre panel).



Figur 6. Plottet viser fordelingen av gjennomsnitts (mean) diameteren til de forskjellige behandlingene.

Også her var kravet til en lineær analyse oppfylt, og en lineær modell viste at tidspunkt, temperatur og fosforkonsentrasjon og interaksjonseffekten mellom dem forklarte over 80% av observert variasjon.

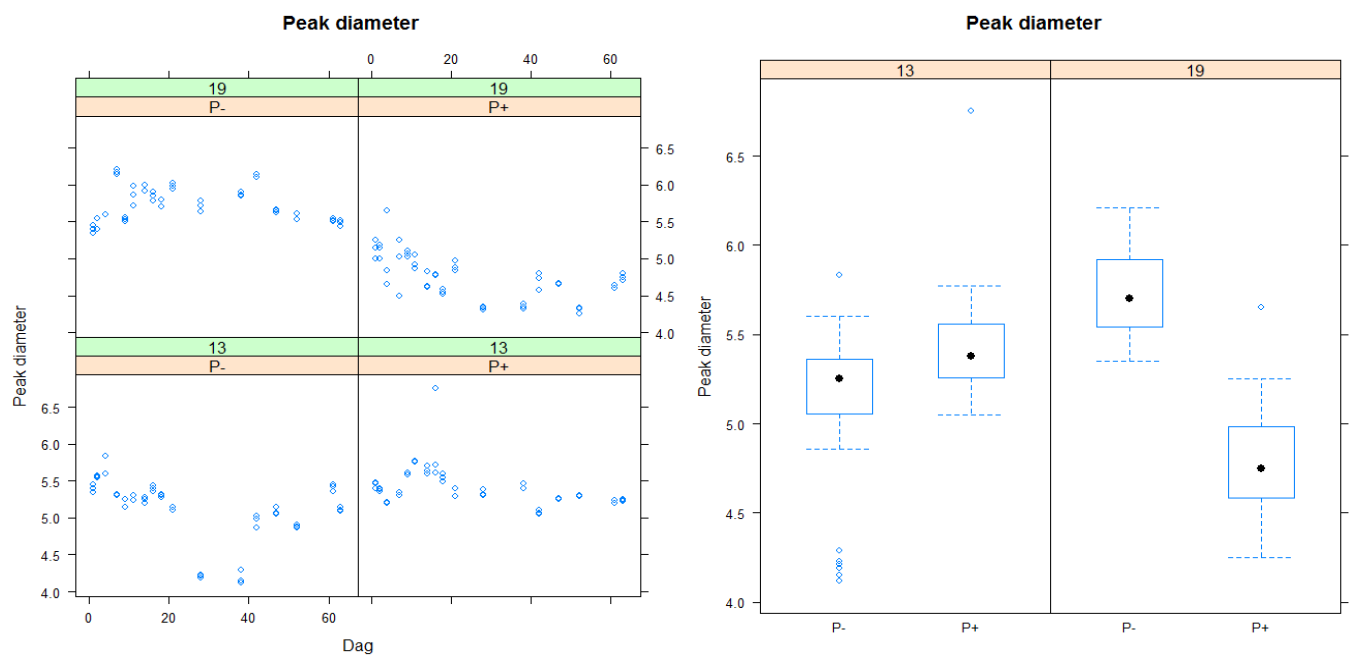
Tabell 3.

	Forklaringsvariabelkoeffisient i prosent	P-verdi
Fosforkonsentrasjon	16%	< 0.001
Temperatur	2%	< 0.001
Fosforkonsentrasjon x temperatur	60%	< 0.001

Tabell 3: Viser i hvilken grad de ulike variablene påvirker gjennomsnittsdiameteren til *C. reinhardtii*.

3.3.2 Maksdiameter

Fordelingen av cellestørrelsen hos algene var ikke normalfordelt i alle behandlingene (se kap. se 3.4). Derfor ble det tatt målinger også av maksimumsdiameteren for å eventuelt fjerne innflytelsen av faktorer som ulik cellesyklusfase. Som figur 7 illustrerer er det her, som med gjennomsnittsdiameter, en invers respons mellom behandlingene. Det er størst alger ved 19 grader ved -P, mens ved +P er det størst alger på 13 grader. I figur 7, som i figur 6, er det et mer variabelt forløp for -P enn for +P.



Figur 7. Plottet viser fordelingen av maksdiameteren (peak) til de forskjellige behandlingene.

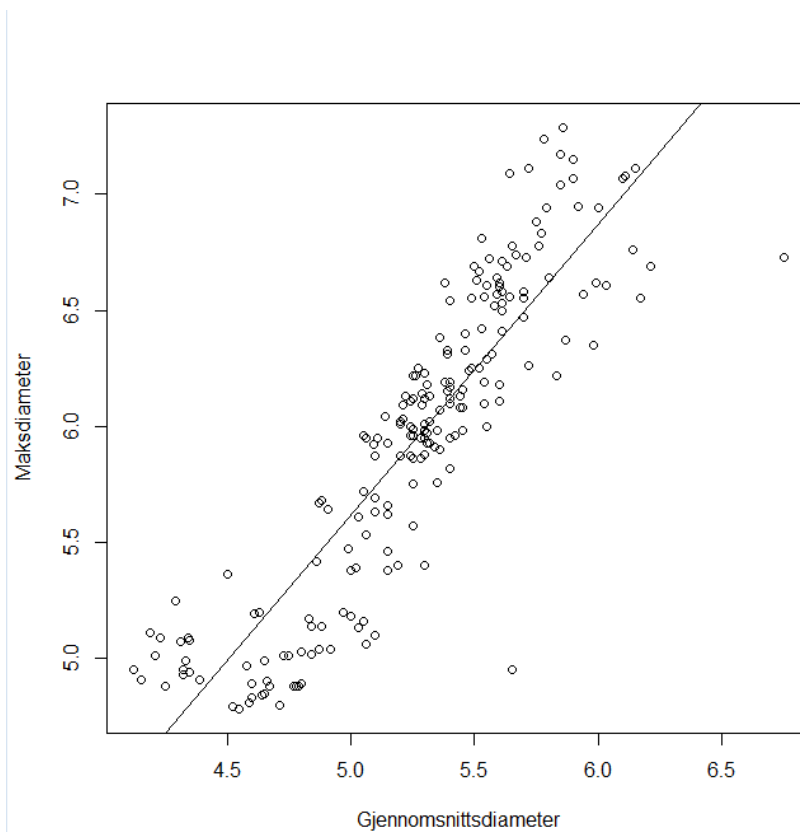
Resultatene oppfylte kravene til lineære modeller, og en lineær modell viste at tidspunkt, temperatur og fosforkonsentrasjon og interaksjonseffekten mellom dem (R^2) forklarte over 65% av variasjonen.

Tabell 4.

	Forklaringsvariabelkoeffisient i prosent	P-verdi
Fosforkonsentrasjon	14%	< 0.001
Temperatur	Ikke signifikant	0.4
Fosforkonsentrasjon x temperatur	45%	< 0.001
Tidspunkt (dato)	6%	< 0.001

Tabell 4: Viser i hvilken grad de ulike variablene påvirker maksdiameter.

3.3.3 Korrelasjon mellom gjennomsnitts- og maksdiameter



Figur 8. Viser korrelasjonen mellom gjennomsnittsdiameteren og maksdiameteren til *C. reinhardtii* over alle behandlinger.

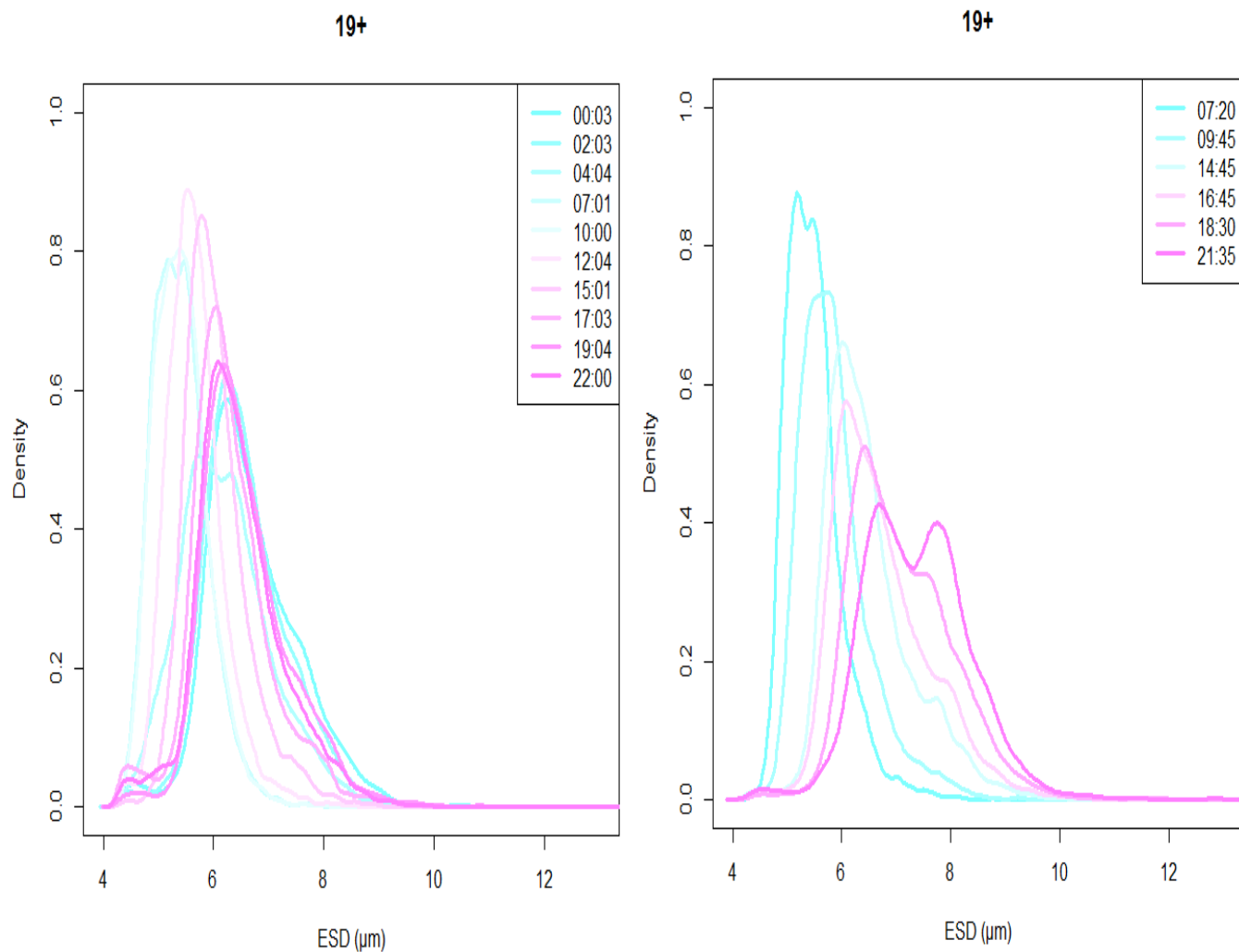
Gjennomsnittsdiameteren korrelerer bra med maksdiameteren. Man kan regne ut

Gjennomsnittsdiameteren med følgende ligning: $1.25x - 0.65$ (P-verdi < 0.001 , $R^2 = 0,78$)

3.4 Cellesyklus og celledeling

I utgangspunktet startet dette eksperimentet tidlig i 2013. Det var på dette tidspunktet ikke noen klare rutiner for hvordan eksperimentet skulle gjennomføres og jeg begynte selv å prøve meg fram. Prøvetagning på CASY ble i starten av eksperimentet gjennomført på ulike tider av døgnet. Dette gav lite konsistente resultater, og jeg ble gjort oppmerksom på at cellesyklus muligens kunne forklare resultatene. Dette ble raskt bekreftet da prøvetidspunktene ble stabile. Jeg har siden den tid vært interessert i akkurat hvor mye cellesyklus har å si på cellestørrelsen og fordelingen på *C. reinhardtii*. Det ble derfor gjennomført to separate prøvetagninger av cellesyklus, henholdsvis i 12 timer og 24 timer på starten (18. okt 2013) og slutten (1. mars 2014) av eksperimentet. Resultatene kan sees i figur 9, 11, 13 og 15.

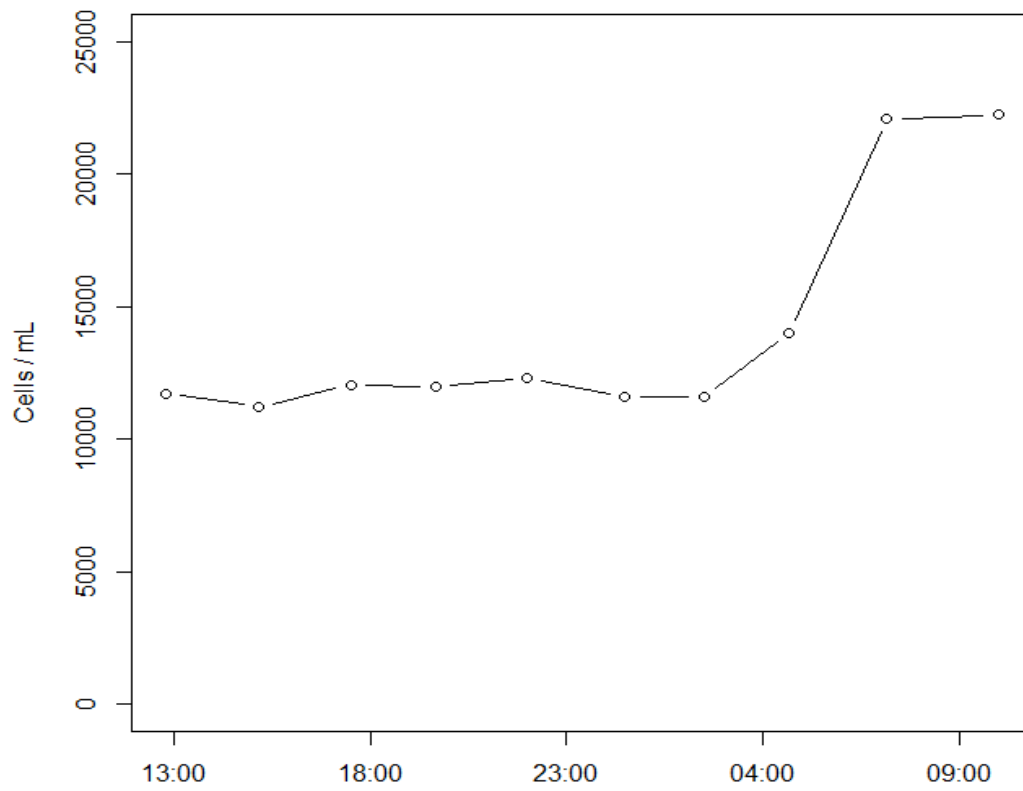
I tillegg har jeg sett på antall celler over samme tidsperiode, disse resultatene kan sees i figur 10, 12, 14 og 15. Grunnet kontaminering har jeg ikke kunne ta prøver av 13- ved slutten av eksperimentet, og har derfor bare brukt data fra 18.okt 2013. Resultatene viser at det er stor forskjell i cellesyklus for de ulike behandlingene, og i hvilken grad de er synkrone eller ikke. En annen interessant bemerkning er at cellesyklus har endret seg fra 18.okt 2013 til 1.mars 2014.



Figur 9: Viser døgnsyklusen og dagsyklus til *C.Reinhardtii* +P Figuren til venstre er fra 1.mars 2014, det ble tatt prøver på CASY i 24 timer. Figuren til høyre er fra 18.oktober 2013, det ble tatt prøver på CASY i 12 timer. X-aksen viser ESD (Estimated Size Diameter) og tallene øpe til høyre viser klokkeslett prøvene ble tatt på.

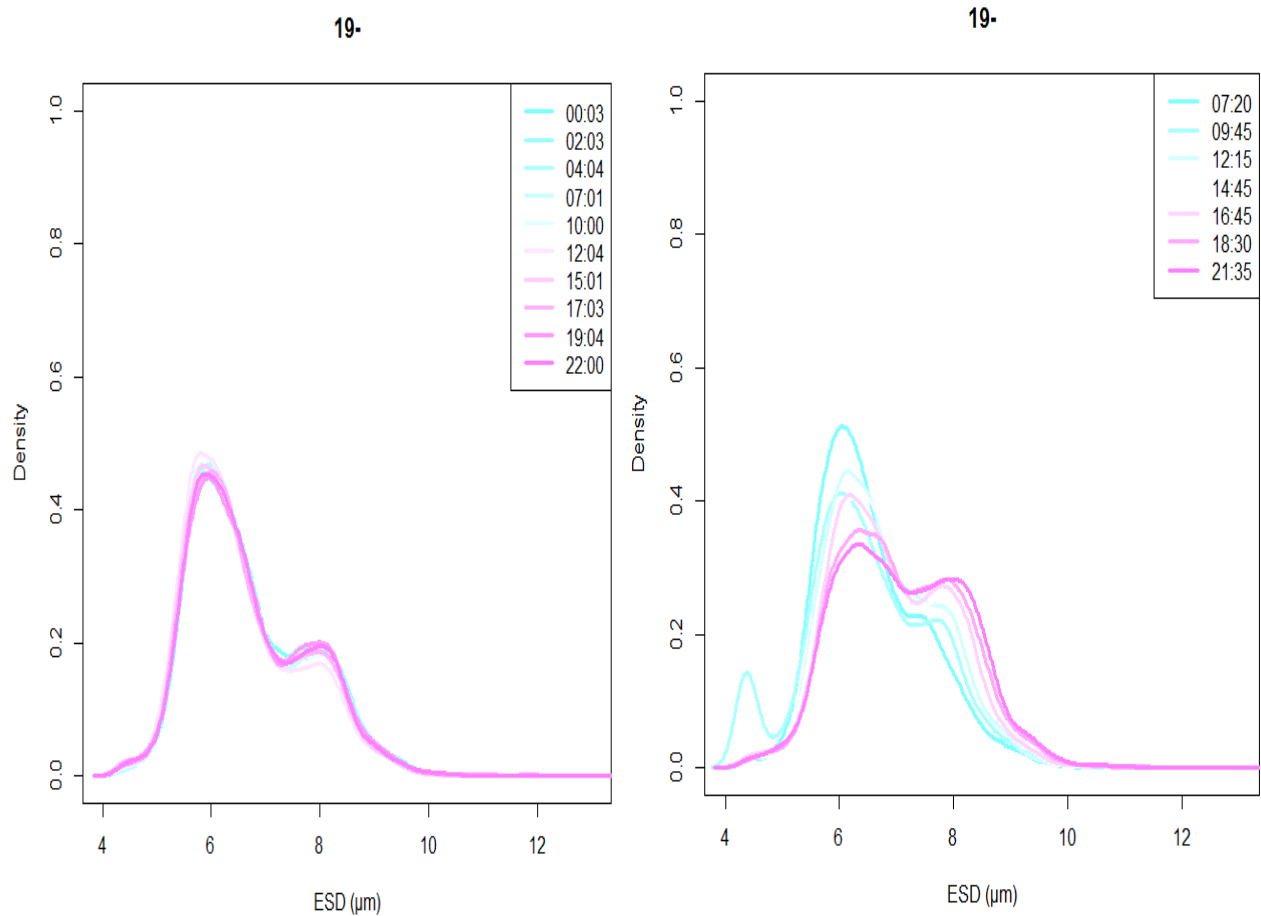
Som man kan lese ut av figur 9 vokser *C. reinhardtii* utover dagen med lyssyklus.

19+



Figur 10. Viser antall celler pr. mL for et døgn. Plottet er fra natt til 1.mars.

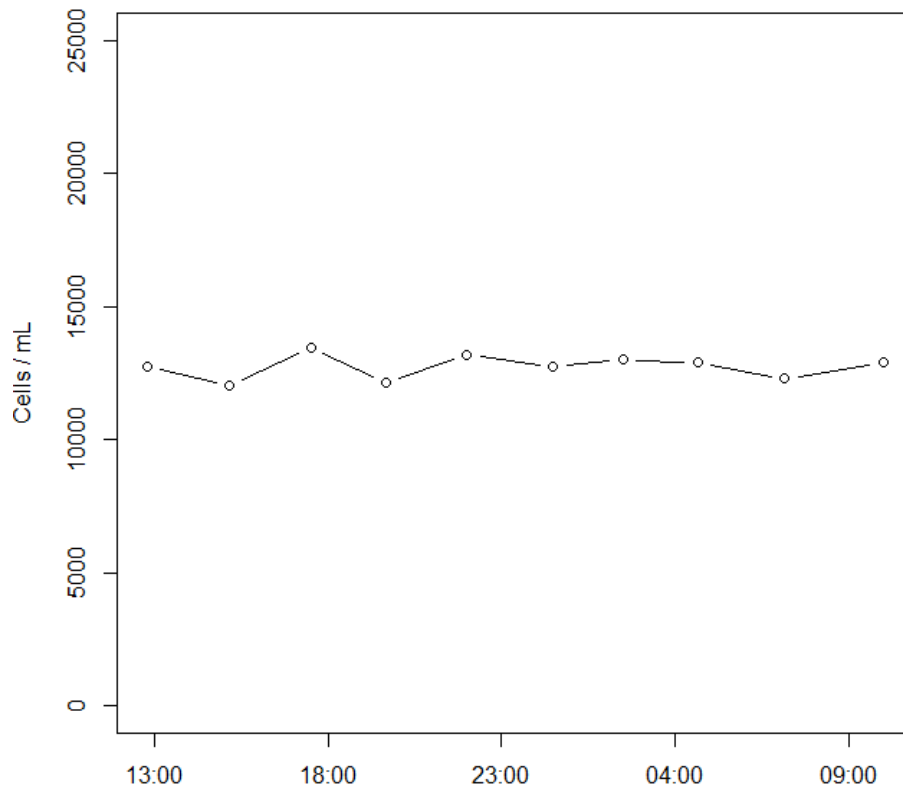
Fra figur 10 kan man lese at celledeling skjer rundt klokken 06.00 i mørkesyklus.



Figur 11: Viser døgnsyklusen og dagsyklus til *C.Reinhardtii* -P. Figuren til venstre er fra 1.mars 2014, det ble tatt prøver på CASY i 24 timer. Figuren til høyre er fra 18.oktober 2013, det ble tatt prøver på CASY i 12 timer. X-aksen viser ESD (Estimated Size Diameter) og tallene oppe til høyre viser klokkeslett prøvene ble tatt på.

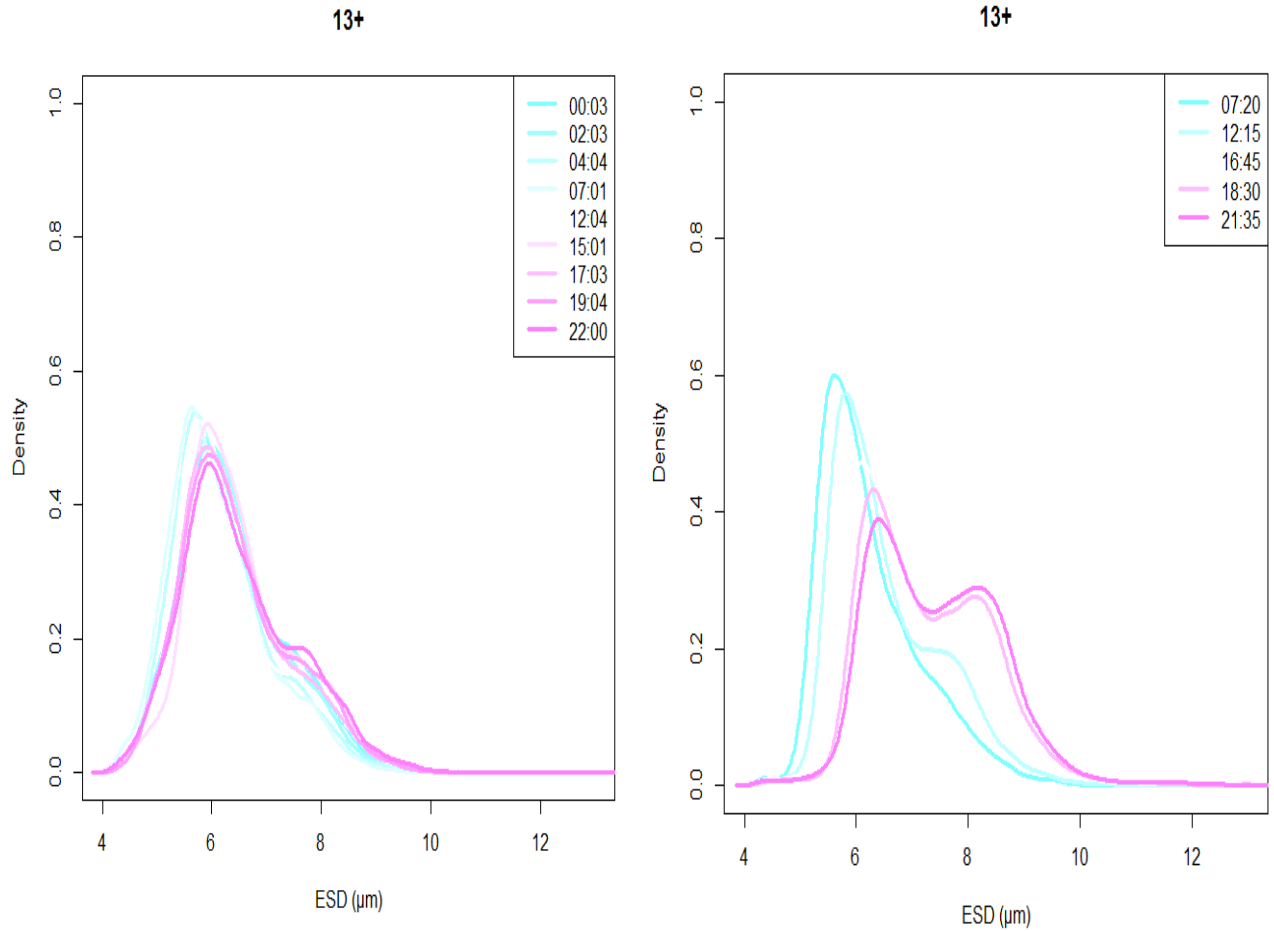
Som man kan lese ut av figur 11 later det ikke til at *C. reinhardtii* vokser i størrelse utover 1.mars 2014. I motsetning til 18.okt 2013, hvor *C. reinhardtii* vokser i størrelse i løpet av lyssyklus.

19-



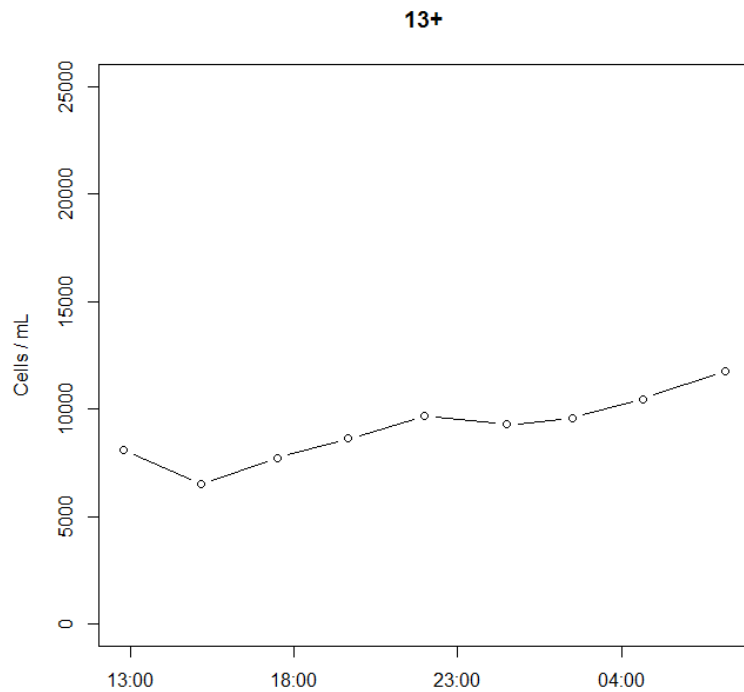
Figur 12: Viser antall celler pr. mL for et døgn. Plottet er fra natt til 1.mars.

I prøvene tatt 1. mars ble det ikke observert noen endring i celletall gjennom døgnet (Fig. 12)



Figur 13: Viser døgnsyklusen til *C. Reinhardtii* ved lav temperatur og høyt fosforinnhold. Figuren til venstre er fra 1.mars 2014, det ble tatt prøver på CASY i 24 timer. Figuren til høyre er fra 18.oktober 2013, det ble tatt prøver på CASY i 12 timer. X-aksen viser ESD (Equivalent Spherical Diameter) og tallene oppe til høyre viser klokkeslett prøvene ble tatt på.

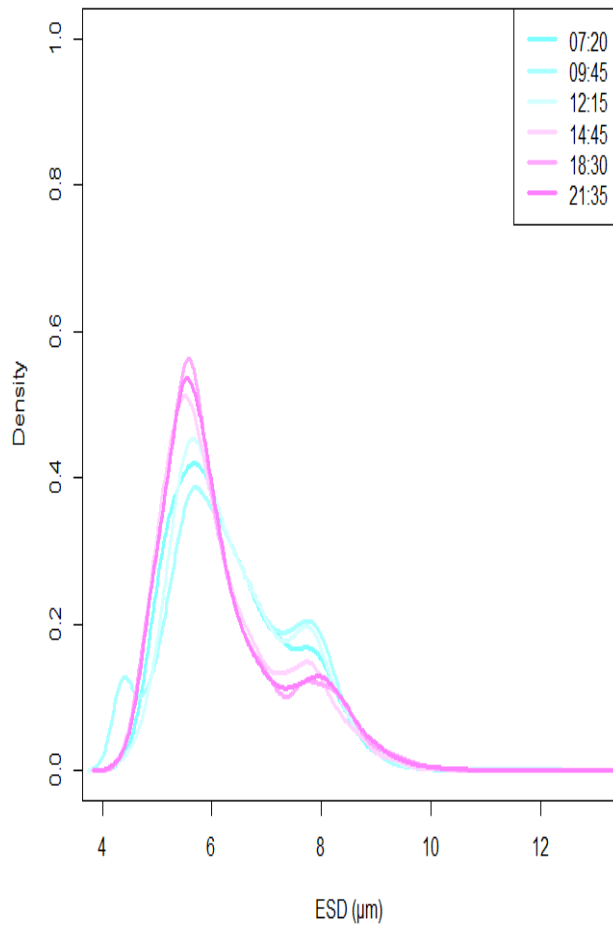
Som man kan lese ut av figur 13 vokser *C. reinhardtii* utover dagen med lyssyklus i prøvene tatt 18.oktober, mens det er lite endring i prøvene fra 1.mars 2014



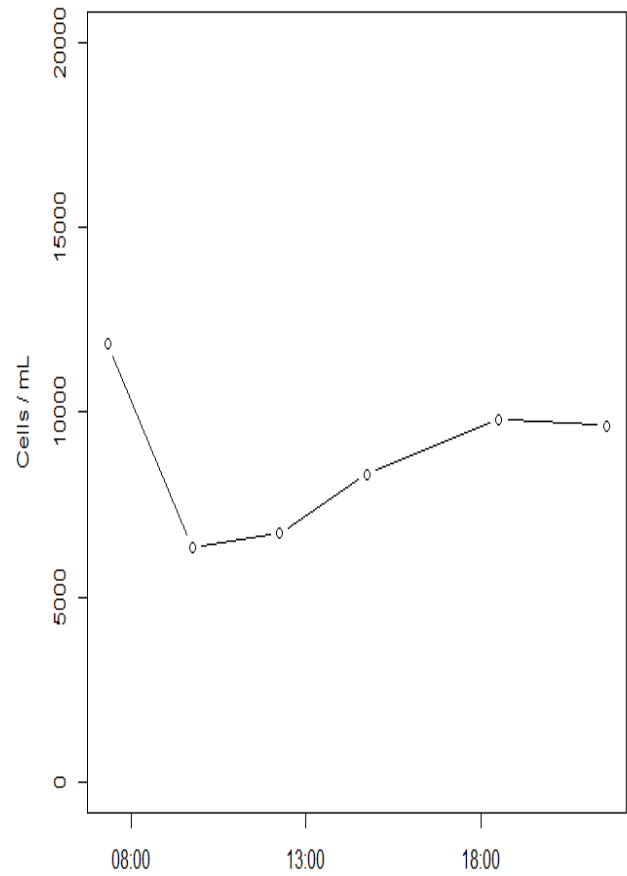
Figur 14. Viser antall celler pr. mL for et døgn. Plottet er fra natt til 1.mars. Målingen fra klokken 16.45 er nok ikke reell. Problemer mer pipetteringen gav mindre volum enn ved de andre prøvetagningene, gir færre celler enn det faktiske antallet.

Fra figur 14 kan det se ut til at celledeling skjer utover hele dagen for 13+ behandlingen, og at cellene ikke har synkron cellyklus.

13-



13-

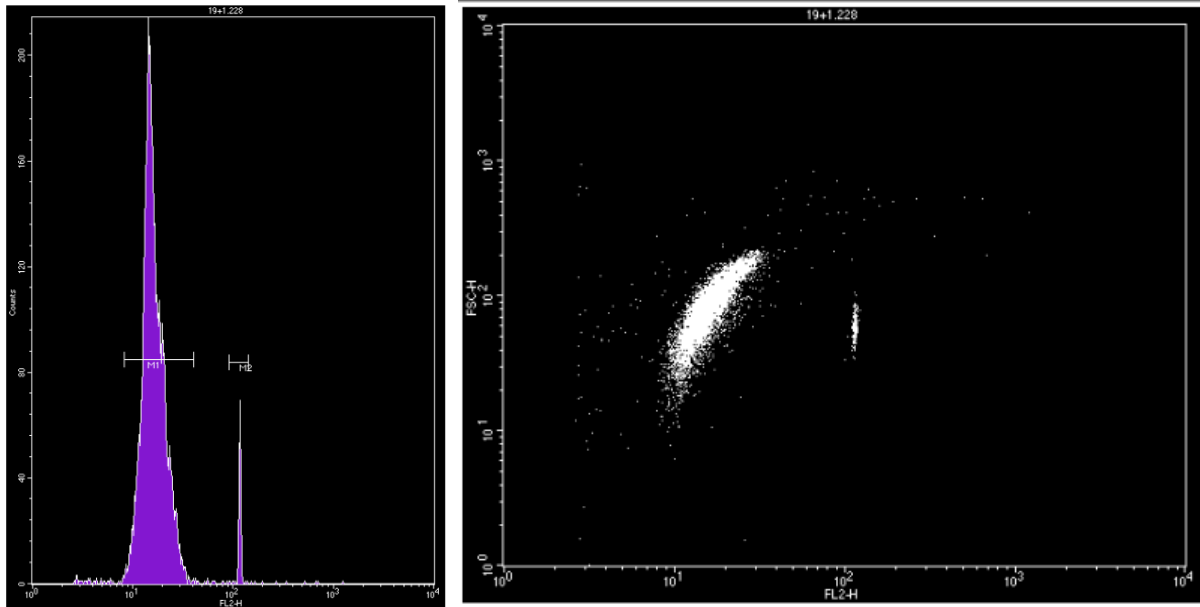


Figur 15. Antall celler og fordelingen av dem for *C. Reinhardtii* den 18.okt 2013. Årsaken til at celleantallen halveres fra første målingen til neste er at de ble fortynnet 1:1 mellom første og andre måling.

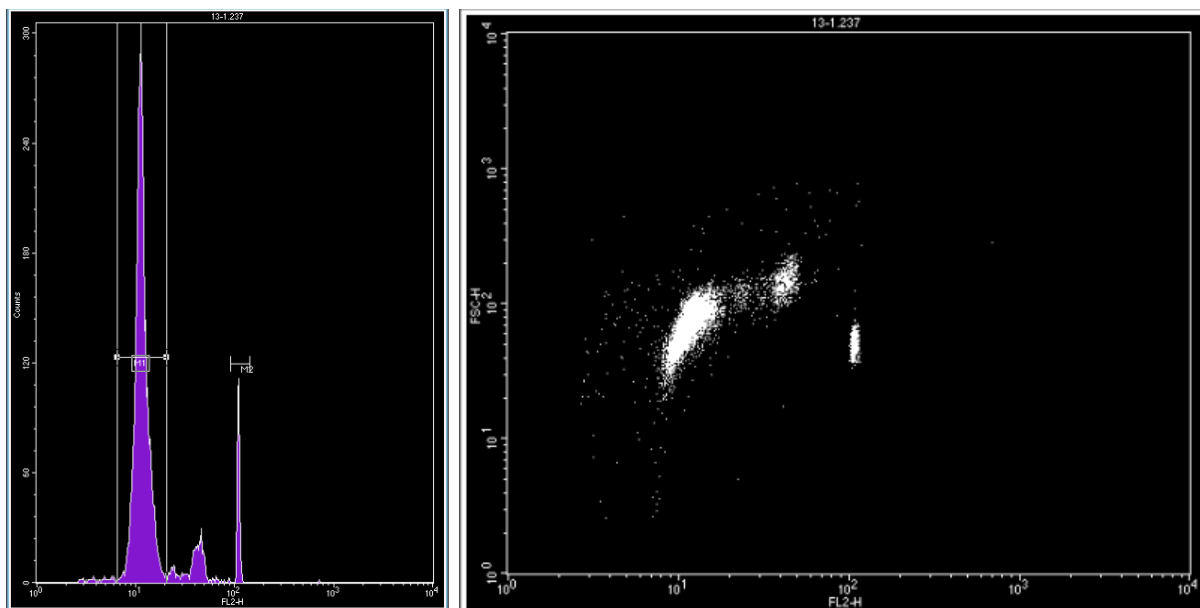
En kontaminering av 13- behandlingene fra 1.mars 2014, gjorde at resultatene fra denne målingen ikke er med i oppgaven. Figur 15 er derfor basert på data fra 18.okt 2013.

3.5 Flowcytometer og cellyklus

Analysene fra flowcytometeret viser at algene er i ulike stadier av cellyklus på samme tidspunkt på dagen. Derfor ble det gjennomført et transplantasjonsforsøk for å minimere effekten av cellyklus på celle- og genomstørrelse. Figur 16 og 17 er for å eksemplifisere forskjellene i cellyklus før transplantasjonsforsøket. Figur 18 og 19 viser etter transplantasjonsforsøket og viser at cellyklus nå er lik.



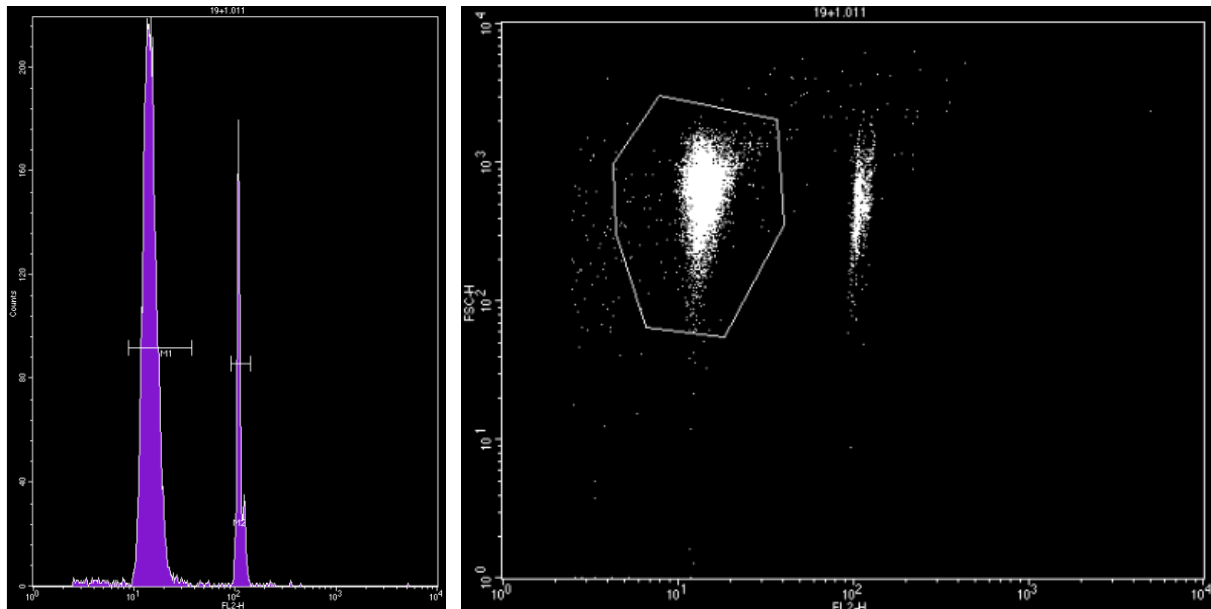
Figur 16 : Viser data fro 19+ fra 2.desember 2013 klokken 10.00. Det er her bare to distinkte topper og to punktskyer. Den største toppen og punktskyen er for algene, den andre er for CRBC (Chicken Red Blood Cell).



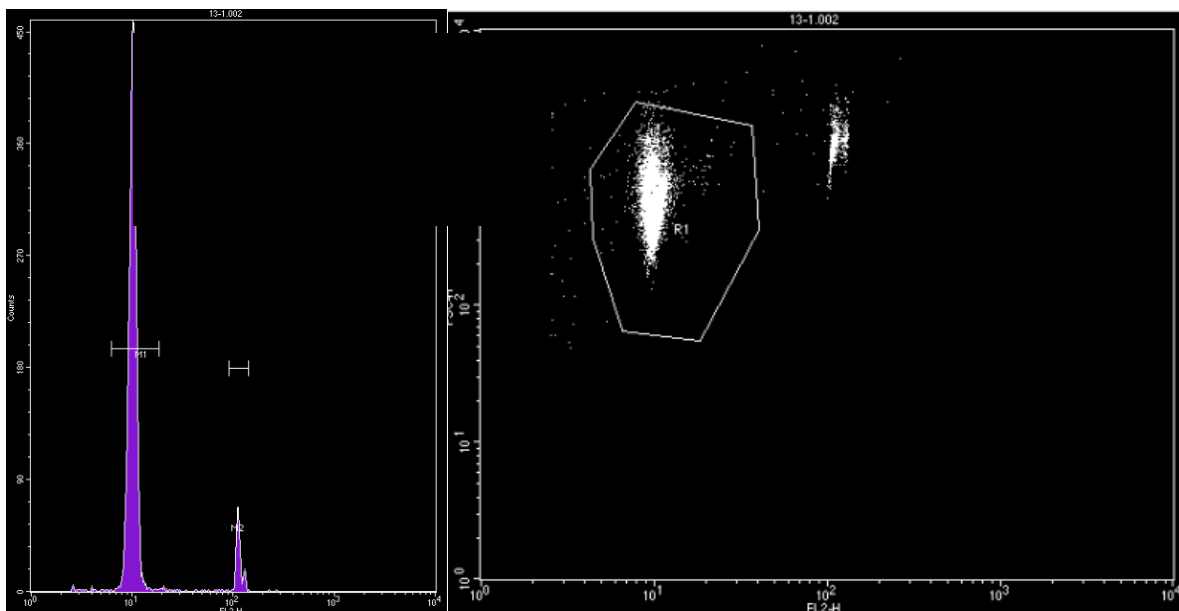
Figur 17: Viser FCM data for 13- fra 2.desember 2013 klokken 10.00. Det er tre distinkte topper i diagrammet til venstre og tre distinkte punktskyer i plottet til høyre. Den toppen og den punktskyen som ligger mest til høyre i hvert av bildene er CRBC.

Disse dataene stemmer forøvrig overens med bimodalitet påvist ved analyse av celledørrelse i CASY tatt samme dag (se Figur 11)

Figur 16 og 17, må sees i sammenheng med figur 18 og 19, som viser 19+ og 13- etter transplantasjonsforsøket hvor begge nå har gått på 19+ behandling i en uke.



Figur 18: Viser data for 19+ behandlingene etter transplantasjonsforsøket. Toppen og punktene til venstre er for algene, de til høyre er for CRBC.



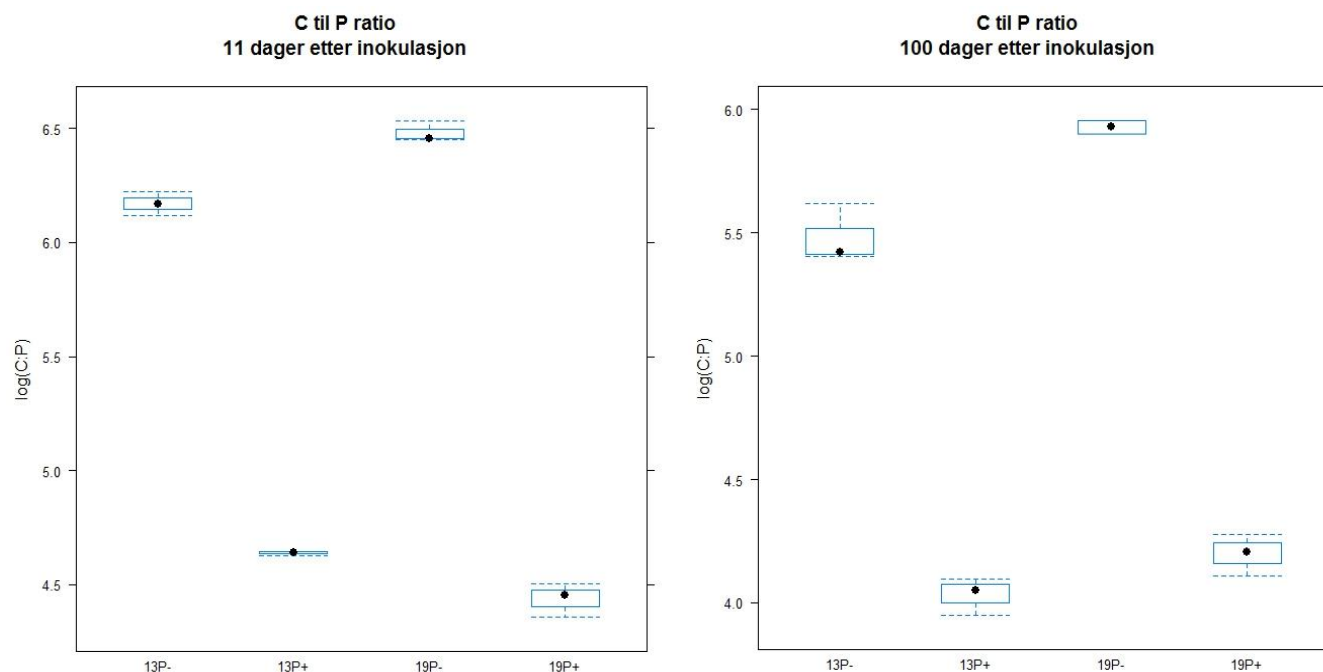
Figur 19: Viser data for 13- etter transplantasjonsforsøket. Toppen og punktene til venstre er for algene, de til høyre er for CRBC

Figur 18 og 19 viser henholdsvis 19+ og 13- etter en uke på 19+ behandling. Det har som forventet ikke skjedd noen store forandringer for 19+ fra figur 16 til figur 18. Men for 13- har det skjedd en forandring. Figur 19 viser at den ikke lengre er i cellesyklus. Dette gir indikasjoner på at eventuelle prøver av cellestørrelse og genomstørrelse for algene som var utsatt for transplantasjonsforsøkene er mer korrekte siden de nå har samme cellesyklus. Alle prøvene, før og etter transplantasjonsforsøket, er tatt klokken 10.00 og er sammenlignbare

3.6 Støkiometri

3.6.1 Karbon til fosfor forhold (C:P ratio)

Som figur 20 illustrerer er det forskjell i ratioen mellom karbon- og fosforinnhold i de forskjellige behandlingene. Det var også en viss forskjell mellom målinger tatt tidlig (11 dager etter inokulering) og sent (100 dager etter inokulering). Algene dyrket ved -P har mye høyere C:P enn algene som var dyrket på +P. C:P forholdet reduseres i samtlige prøver over tid, selv om forskjeller mellom -P og + P behandlingene ble opprettholdt.



Figur 20: Plottet karbon (C) til fosfor (P) forholdet i *C. reinhardtii* for hver av behandlingene. Forholdet mellom C:P halveres nærmest på de 89 dagene. Verdiene er logtransformerte for å redusere variansen.

Resultatene oppfylte kravene til lineære modeller, og temperatur og fosforkonsentrasjon samt interaksjonseffekten mellom dem forklarte over 99% av observert variasjon. Alle forklaringsvariablene var statistisk signifikante, men fosforkonsentrasjon var den totalt dominerende faktoren.

Tabell 5.

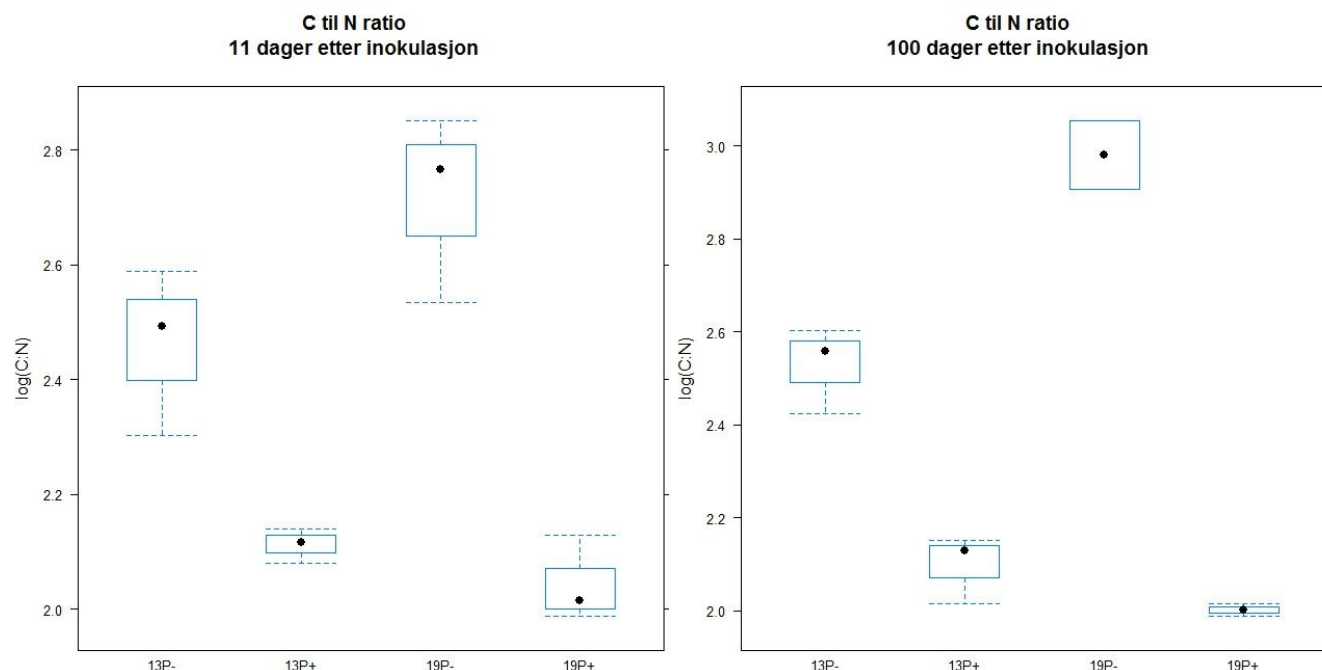
	Forklaringsvariabelkoeffisient i prosent	P-verdi
Fosforkonsentrasjon	85%	< 0.001
Temperatur	0.2%	0.01
Fosforkonsentrasjon x temperatur	1.2%	< 0.001
Tidspunkt (dato)	11%	< 0.001

Tabell 5: Viser i hvilken grad de ulike variablene påvirker C:P ratioen.

Siden verdiene er log-transformerte kan vi tilbake-transformere den variabelen som forklarer mest av utfallet: Fosforkonsentrasjonen $+P : \exp(-1.5) = 0.22$ som betyr at C:P forholdet er fem ganger større for $-P$ enn $+P$.

3.6.2 Karbon til nitrogen forhold (C:N ratio)

Det er forskjell i ratioen mellom karbon- og nitrogeninnhold i de forskjellige behandlingene (Fig 21.). Det er høyere innhold av C:N i algene som gikk på -P. Der er det også en svak temperatureffekt.



Figur 21: Plottet karbon (C) til nitrogen (N) forholdet i *C. reinhardtii* for hver av behandlingene. Verdiene er logtransformerte for å redusere variansen.

Resultatene oppfylte kravene til lineære modeller, og en lineær modell viste at tidspunkt, temperatur og fosforkonsentrasjon og interaksjonseffekten mellom dem (R^2) forklarte over 91% av variasjonen.

Tabell 6.

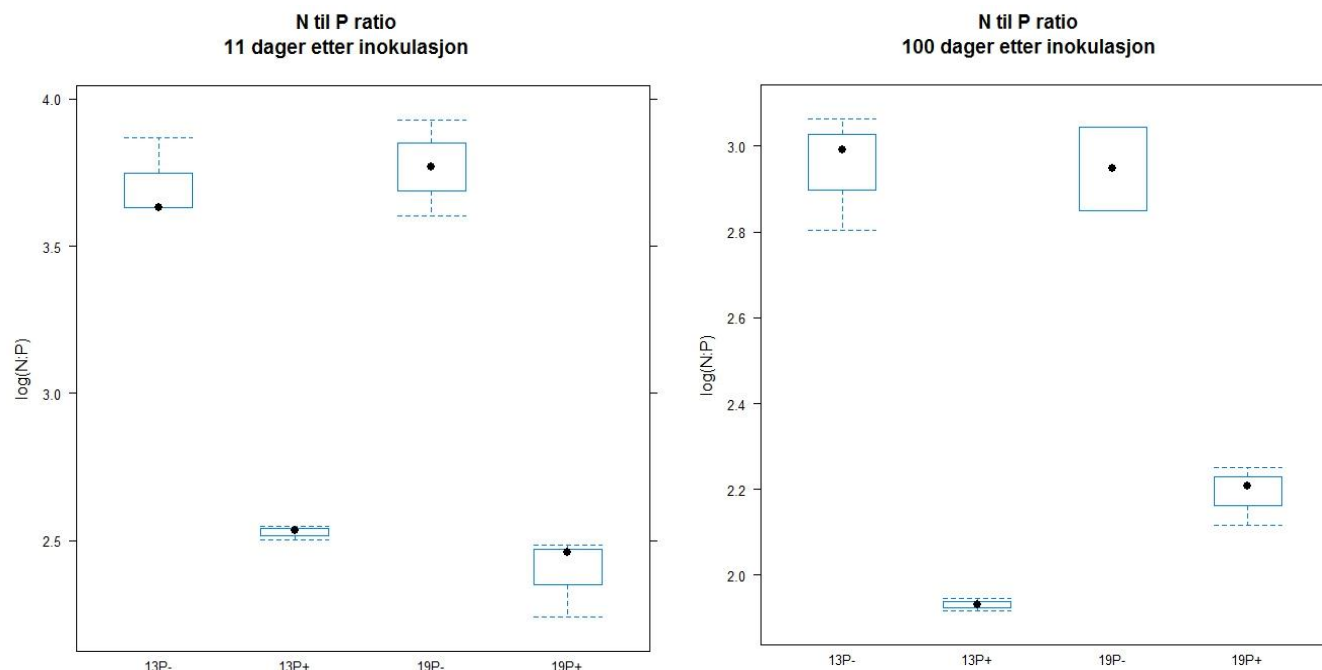
	Forklaringsvariabelkoeffisient i prosent	P-verdi
Fosforkonsentrasjon	80%	< 0.001
Temperatur	1.7%	0.05
Fosforkonsentrasjon x temperatur	11%	< 0.001

Tabell 6: Viser i hvilken grad de ulike variablene påvirker C:N ratioen.

Siden verdiene er log-transformerte kan vi tilbake-transformere den variabelen som forklarer mest av utfallet: Fosforkonsentrasjonen +P : $\exp(-0.30) = 0.74$ som betyr at C:N forholdet er 26% mindre der algene ikke var fosforbegrenset (+P).

3.6.3 Nitrogen til fosfor forhold (N:P ratio)

Det er forskjell i ratioen mellom nitrogen- og fosforinnhold i de forskjellige behandlingene (Fig 22.). Det er høyere innhold av N:P i algene som gikk på -P. Der er ingen klar temperatureffekt, men N:P forholdet reduseres i samtlige prøver over tid.



Figur 22: Plottet nitrogen (N) til fosfor (P) forholdet i *C. reinhardtii* for hver av behandlingene. Verdiene er logtransformerte for å redusere variansen.

Resultatene oppfylte kravene til lineære modeller, og en lineær modell viste at tidspunkt, temperatur og fosforkonsentrasjon og interaksjonseffekten mellom dem (R^2) forklarte over 96% av variasjonen. Bare fosforkonsentrasjonen og tidspunkt var signifikante.

Tabell 7.

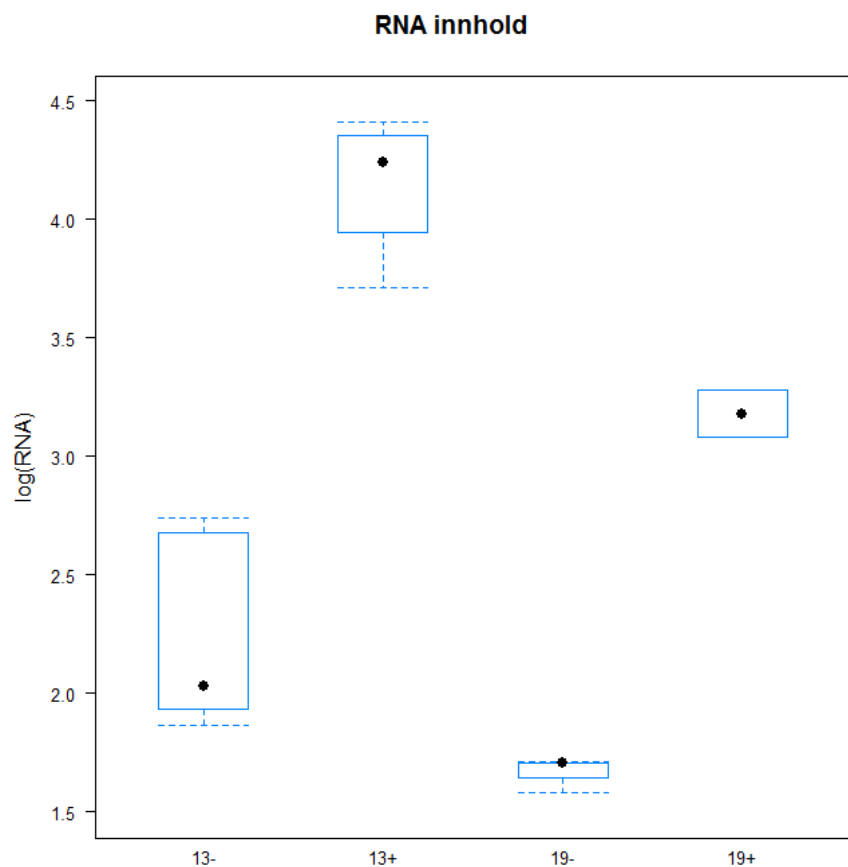
	Forklaringsvariabelkoeffisient i prosent	P-verdi
Fosforkonsentrasjon	70%	< 0.001
Temperatur	Ikke signifikant	0.93
Tidspunkt (dato)	24%	< 0.001

Tabell 7: Viser i hvilken grad de ulike variablene påvirker N:P ratioen.

Siden verdiene er log-transformerte kan vi tilbake-transformere den variabelen som forklarer mest av utfallet: Fosforkonsentrasjonen +P : $\exp(-1.3) = 0.28$ som betyr at N:P forholdet er nesten 75% mindre hos de algene som gikk på +P

3.7 Mengde RNA

Det var høyere RNA-innhold i behandlingene som gikk på +P (fig 13). Det kan også virke som om det er en liten temperatur-effekt. Mye av dataene som figur 23 bygger på kunne ikke stoles på grunnet menneskelige feil ved sampling, og ble derfor forkastet. Det er derfor en skeivhet i datasettet, og for å oppfylle kravene til lineære modeller måtte datointeraksjonen sløyfes.



Figur 23: Plottet viser RNA innholdet i de forskjellige behandlingene. Dataene er logtransformert. Plottet er laget på bakgrunn av dataene samlet 1.nov og 28.des. Det er et skeivhet i datasettet grunnet menneskelige feil.

Uten datointeraksjon kunne en lineærmodell konstrueres med bare temperatur og fosforkonsentrasjonen og interaksjonen mellom dem som forklaringsvariabler. Denne modellen hadde en R^2 på 86%.

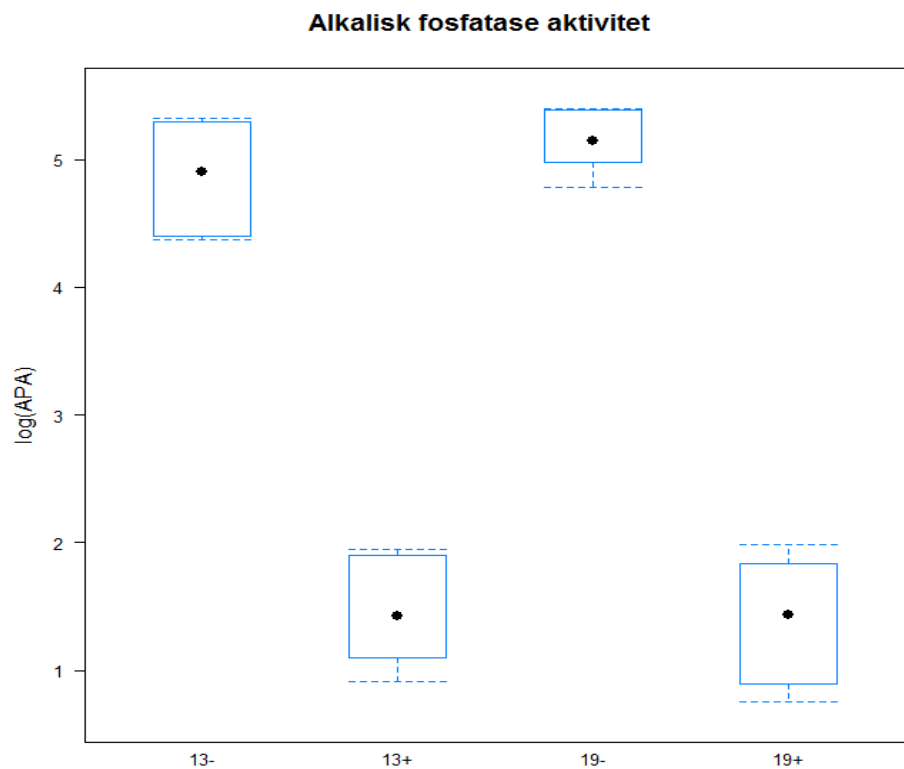
Tabell 8.

	Forklaringsvariabelkoeffisient i prosent	P-verdi
Fosforkonsentrasjon	70%	< 0.001
Temperatur	17%	0.003
Fosforkonsentrasjon x temperatur	11%	0.01

Tabell 8: Viser i hvilken grad de ulike variablene påvirker mengden RNA.

3.8 Alkalisk fosfatase aktivitet

Alkalisk fosfatase aktiviteten (APA) vesentlig høyere for behandlingene som gikk på lav fosforkonsentrasjon (figur 24).



Figur 24: Plottet til venstre viser alkalisk fosfatase aktiviteten (APA) i de forskjellige behandlingene. Dataen er logtransformert. Plottet er laget på bakgrunn av dataene samlet 1.nov og 28.des.

Resultatene oppfylte kravene til lineære modeller, og en lineær modell viste at tidspunkt, temperatur og fosforkonsentrasjon og interaksjonseffekten mellom dem (R^2) forklarte over 95% av variasjonen. Bare fosforkonsentrasjon var signifikant.

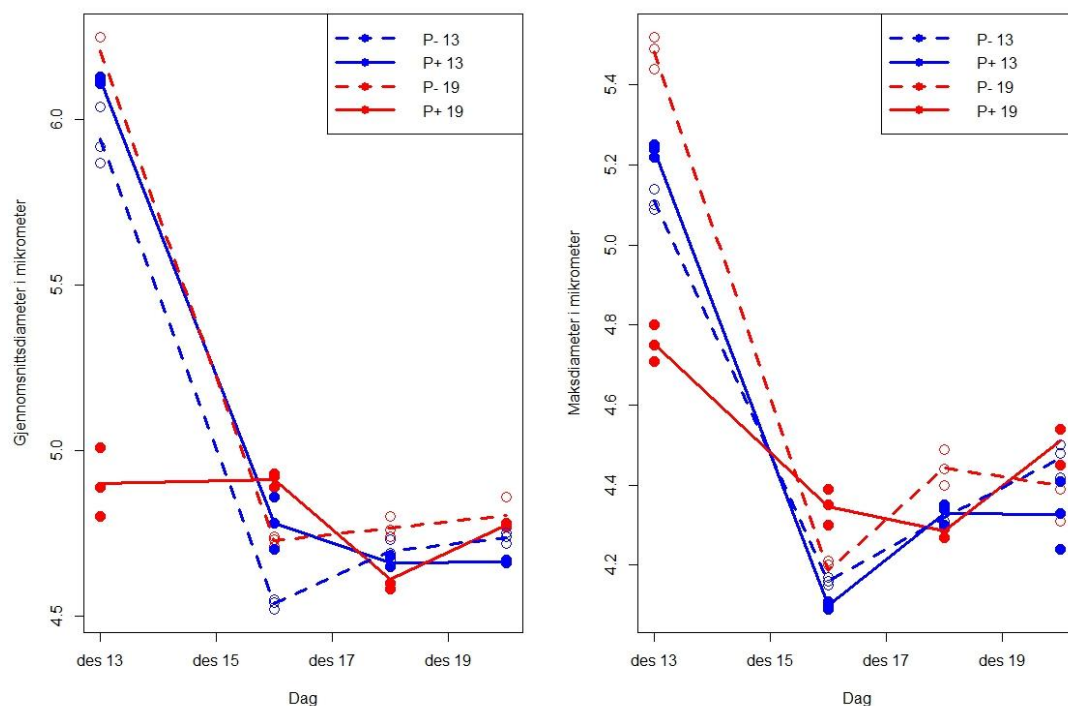
Tabell 9.

	Forklaringsvariabelkoeffisient i prosent	P-verdi
Fosforkonsentrasjon	98%	< 0.001

Tabell 9: Tabell 8: Viser i hvilken grad de ulike variablene påvirker mengden RNA.

3.9 Transplantasjonseksperiment

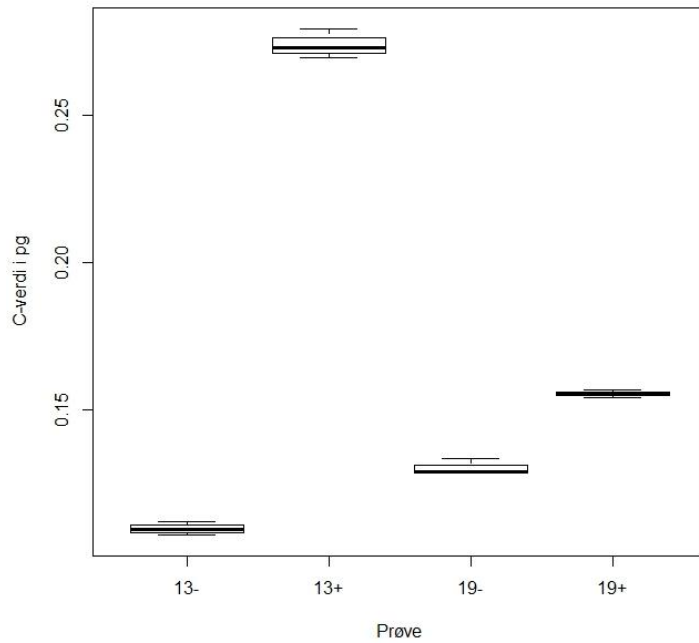
Som figur 25 viser, konvergerer alle behandlingene mot samme cellestørrelse etter bare tre dager. Etter to fortynninger hadde også alle behandlingene fått samme fordeling, en normalfordeling veldig lik fordelingen sett i figur 9, og som figur 18 og 19 viser en synkron cellesyklus.



Figur 25: Plottet viser hvordan cellestørrelse, gjennomsnitt- og maksdiameter, endret seg over tid etter at alle behandlingene var satt på 19 grader og full fosforkonsentrasjon over 10 dager. Datapunktene er basert på målinger fra CASY.

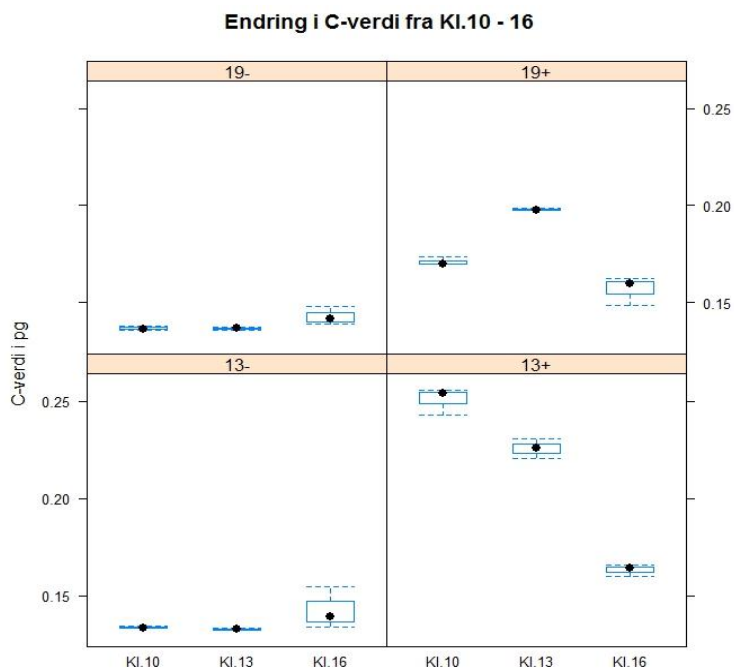
3.10 Genomstørrelse

Det ble funnet påfallende variasjoner i genomstørrelse ved flowcytometri (Fig. 26). Spesielt er genomet til cellene ved 13 °C, +P, påfallende store.



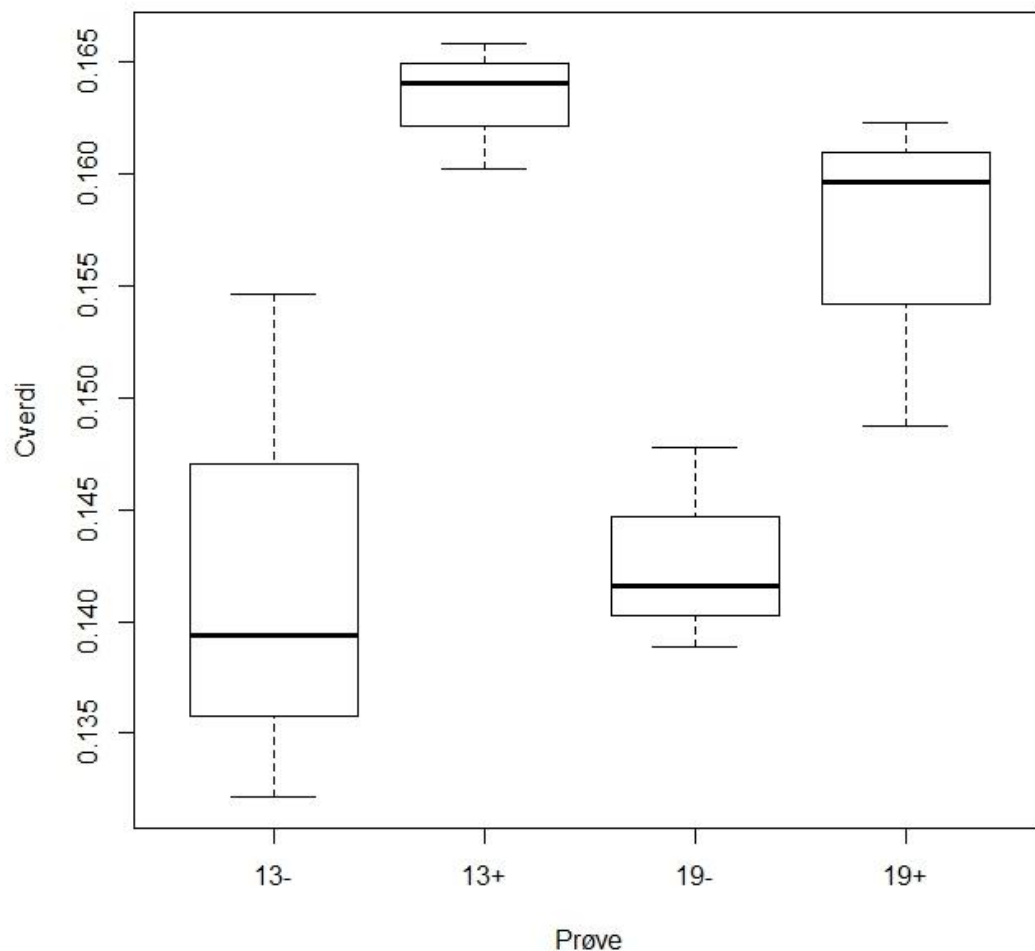
Figur 26: C-verdi for *C. reinhardtii* . Prøvene ble tatt 22.nov 2013

For å bedre forstå årsakene til denne påfallende variasjonen(Figur 26) ble disse analysene fulgt opp med tre påfølgende prøvetidspunkter den 2.desember 2013. Dette viste at det var store endringer i genomstørrelse (slik det framkommer ved flowcytometri) ved ulike tidspunkt i løpet av seks timer (Figur 27) , og spesielt i +P behandlingene, noe som indikerer at det er en cellesykluseffekt.



Figur 27: Endring i C-verdi gjennom 6 timer for *C. Reinhardtii*. Prøvene ble tatt 02.des 2013.

Den observerte variasjon i genomstørrelse i ulike faser av cellesyklus ble testet videre ved et transplantasjonsforsøk der alle behandlingene i teorien skulle få samme cellesyklus. Etter at de ulike behandlingene var synkronisert ble nye flowcytometrianalyser gjennomført den 20.des 2013(Fig. 28).



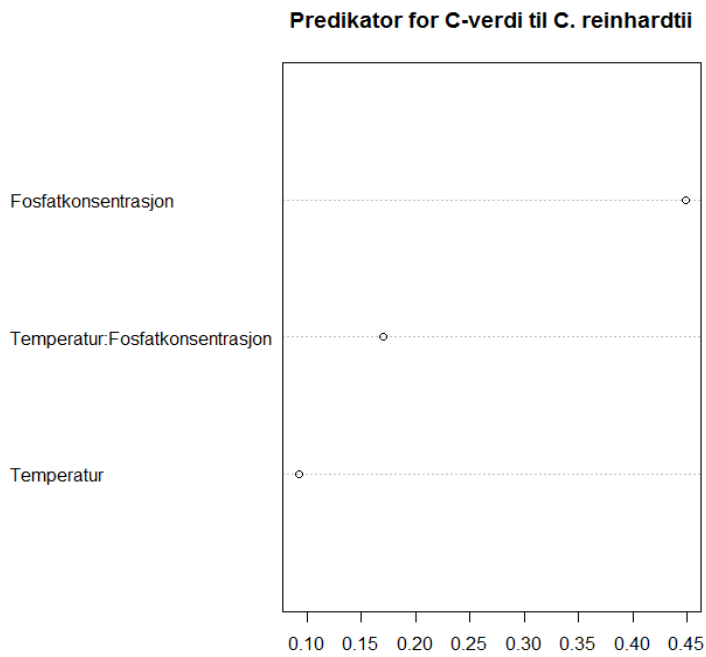
Figur 28: C-verdien for *C. reinhardtii* etter transplantasjonsekperimentet. Prøvene ble tatt 20.des 2013

Figur 28 viser C-verdien for de forskjellige behandlingene etter 7 dager på 19 grader og full (+) fosforkonsentrasjon. Det er en omtrent 12.5% mindre DNA per celle i kulturene som hadde vokst ved lav fosforkonsentrasjon. Det tilsvarer en reduksjon i omtrent 20 millioner basepar på 77 dager, dvs siden forsøksstart.

Jeg gjorde tre statistiske analyser basert på figur 28. Den første var en parametriske to-veis ANOVA test med interaksjonseffekter inkludert. Denne lineære modellen forklarte 68,5% (R^2) av variasjonen. Den andre var en en-veis ANOVA test (Kruskal-Wallis-test) der C-verdien ble modellert av behandlingsform. Kruskal-Wallis-testen viste at minst en av behandlingene var forskjellig fra de andre (P -verdi < 0.05). Dette gjorde at jeg splittet opp behandlingene etter temperatur og fosforkonsentrasjon, og deretter kjørte en Wilcoxon-test.

Wilcoxon-testen viste at fosforkonsentrasjon er signifikant (P-verdi < 0.005), men ikke temperatur (P-verdi = 0.588).

Figur 29 viser hvilke faktorer som påvirker gjennomstørrelse for *C. reinhardtii* og er basert på den parametriske to-veis ANOVA testen. Alle parameterne hadde P-verdi under 0.005.



Figur 29: Korrelasjonskoeffisienten for C-verdi for *C. reinhardtii* i prosent

4 Diskusjon

4.1 Fosforbegrensing

I denne oppgaven ønsket jeg å se i hvilken grad temperatur og fosforkonsentrasjon spiller inn på celle- og genomstørrelsen til *C. reinhardtii*. Å opprettholde en stabil temperatureffekt er uproblematisk i små kulturflasker i temperaturkontrollerte rom. Fosforeffekten er derimot mer problematisk, både fordi graden av fosforbegrensning vil avhenge av celletetthet og andre forhold i kulturene. Fosforkonsentrasjonen var relativt høy i vannet fra Gullerudtjern ($17 \mu\text{g P/l}^{-1}$, se avsnitt 3.1), men måtte allikevel tilsettes noe ekstra P for å få akseptabel algevekst. Gullerudtjern som er blant Norges mest kalkrike innsjøer. Kalk vil binde seg til fosfat og enten fluor, klor eller en hydroksidgruppe og danne apatitt ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F,Cl,OH})$) hvor fosfatet er utilgjengelig. Tjernet har dessuten ikke spesielt høy algevekst, men generelt klart vann. De følgende analysene og testene bekrefter også på ulikt vis at det faktisk var en sterk P-begrensning i -P behandlingene, men ikke i +P behandlingene, og at nivåene av P sammen med fortynningsregimene ga en ønsket effekt.

Forskjellene mellom -P og +P -behandlingene er entydig både når det gjelder vekstrate-, C:P-, RNA innhold- og APA-analysene. Vekstraten (fig 5.) henger sammen med fosforkonsentrasjon, dette støttes av litteraturen (Caraco, 2009). -P behandlingene hadde jevnt mye høyere innhold av C mot P (figur 20). Et høyt forhold mellom C og P er tydelige tegn på fosforbegrensning (Elser et al., 2003). RNA innholdet er også en indikator for fosforbegrensning (Elser et al., 2003). Resultatene mine viser at RNA innholdet jevnt over er mye høyere for +P behandlingene (figur 23). Som en siste indikator på fosforbegrensning er ekspresjon av alkalisk fosfatase (Wojewodzic et al., 2011). Resultatene mine viser at APA er mye høyere i -P behandlingen (figur 24). Om vi tar utgangspunktet i Redfield ratio (106:16:1) (Redfield, 1958) som et mål på balansert vekst tyder også dette på at P virkelig var et begrensende element for -P behandlingene (Hessen et al., 2013). Resultatene fra C:N:P analysen at -P behandlingene hadde en C:P ratio som var opptil 500:1, mens +P behandlingene hadde en C:P ratio som var mindre enn 106:1. Videre viste C:N:P analysen at N:P ratio for -P var større enn 16:1, mens de algene som gikk på +P hadde en N:P ratio som var mindre enn 16:1. Dette stemmer overens med litteraturen (Elser & Loladze, 2011).

Premisset om at algene på $-P$ var fosforbegrenset kontra algene på $+P$ har derfor vært oppfylt.

Det skjedde en viss endring av C:P i algene gjennom forsøksperioden, men om dette reflekterer en adaptasjon eller andre forhold er vanskelig å si. Forsøksoppsett og fortynningsrate ble imidlertid holdt konstant gjennom hele forsøket

4.2 Støkiometri

I tillegg til å bekrefte at algene på $-P$ faktisk var fosforbegrenset, kan resultatene fra støkiometrianalysene si oss noe mer. For det første har fosforbegrensingen en effekt på nitrogeninnholdet til algene. Dette kan vi se fra figur 18. C:N forholdet var 26% mindre for $-P$ behandlingen, noe kan reflektere at også proteinsyntesen nedsettes under sterk P-begrensing. Blant annet vil *C. reinhardtii* få nedsatt ekspresjon av gener tilknyttet fotosyntese ved sterk P begrensing, noe som gir mindre energi (ATP) til proteinsyntesen (Moseley, 2006)

Både C:P og N:P blir lavere over tid. Dette sees ikke så lett fra figurene, henholdsvis figur 20 og figur 22, siden dataene der er logtransformerte. Om vi tilbaketransformerer dataene og ser på forskjellen mellom de to prøvene, ser vi at C:P- og N:P-forholdet nærmest halveres over tid for behandlingene 19-P, 13+P og 13-P. For behandling 19+P er ikke reduksjonen så drastisk. Med tanke på at det var 89 dager mellom de to prøvene, kan det tenkes at det i løpet av den perioden kan ha skjedd en adaptasjon. Interessant nok så har det ikke skjedd en lignende reduksjon i C:N forholdet.

4.3 Vekstrate

Vekstraten viste en klar respons på temperatur og P-nivå over de 100 dagene forsøket varte. Dette medførte også at kulturene hadde gjennomgått et ulikt antall generasjoner ved forsøkets avslutning, selv om varigheten var den samme. Vekstraten pr. døgn for $-P$ behandlingene var 0.5, mens 13+ var 1,25 og 19+ var 1,6. P-begrensingen gav størst utslag på antall generasjoner som varierte fra omtrent 50 generasjoner for begge $-P$ behandlingene til rundt 125 generasjoner for 13+ behandlingen og ca 160 generasjoner for 19+ behandlingen. Temperatur hadde ingen signifikant effekt på vekstrate under P-begrensning, men det er en klar temperatureffekt ved mye tilgjengelig P.

Denne forskjellen i vekstrate, sammen med cellesyklusmålingene (4.4) viser at behandlingene hadde ulik cellesyklus.

4.4 Cellesyklus

På bakgrunn av 4.1 og 4.3 antar jeg med stor sikkerhet at algene som på -P behandlingen var fosforbegrenset. Tatt i betraktning min hypotese om at alger på lav fosforkonsentrasjon ville ha mindre cellestørrelse, er det interessant å se i hvilken grad fosforbegrensning gav et utslag på cellestørrelsen. Men før denne diskusjonen er det viktig å komme med noen bemerkninger med hensyn til cellesyklus og celledeling, som ser ut til å ha stor innvirkning på cellestørrelse. Tidligere forsøk bekrefter at *C. reinhardtii* cellestørrelse kan, under gunstige forutsetninger (høy temperatur og høy P), mangedobles i løpet av cellesyklus (Oldenhof et al., 2007).

Som vist i figurene 9, 11, 13 og 14, endres cellestørrelsen gjennom dagen. Dette er spesielt tydelig i +P behandlingen og analysene 18. okt 2013. Siden målingene fra 1. mars 2014 ikke viser samme dramatiske forandring i fordeling er en mulig forklaring at algene har akklimatisert seg og at det har skjedd en adaptasjon som gjør at cellesyklus stabiliserer seg.

Oldenhof et al., (2007) viser at celledeling forekommer etter at morcellen har nådd en viss størrelse. Målingene mine fra 1. mars viser at cellestørrelseendringene over en dag er relativt små. Dette, sammen med at celleantallet dobles i løpet av mørkesyklus for 19+ (som var min behandling med mest gunstig forhold), tyder på at en morcelle bare blir til to datterceller i mine forsøk, mens en morcelle vanligvis blir til fire eller flere datterceller under mer optimale forhold (Bisová & Zachleder, 2014). Antall datterceller styres av temperatur og lysintensitet ved høy næringskonsentrasjon (Bisová & Zachleder, 2014). Siden det er så lite cellevekst i mine forsøk er det tydelig at mine alger langt fra har optimale forhold. Lysintensiteten min ligger godt over intensiteten hvor cellestørrelsesvekst for *C. reinhardtii* virker å bli forhindret (Vitova, 2011), så det antas at temperaturen, sammen med fosforbegrensning i mine forsøk er det som gir utslaget på redusert cellestørrelsesvekst før celledeling.

Andre eksperimenter viser at *C. reinhardtii* cellesyklus er temperaturavhengig. Knutsen & Lie (1979) viser at *C. reinhardtii* er mest synkron jo mer gunstige vekstbetingelsene er (35°C

var mest optimalt). Dette stemmer overens med mine forsøk, den høyeste temperaturen sammen med full P gav mest synkron vekst og celledeling.

Det er tydelig fra dette eksperimentet at behandlingsform (turbidostat vs. kjemostat), temperatur og fosforkonsentrasjon spiller inn på cellesyklus. Størrelsesmålinger av *C. reinhardtii* kan altså avhenge av tidspunktet man tar prøven på. Denne effekten ble forsøkt minimert ved at prøvene ble tatt på samme tidspunkt rett etter at lyssyklus startet om morgningen. Det er da *C. Reinhardtii* vanligvis nettopp har fullført cellesyklus, men dette ser ut til og bare ha vært tilfellet for 19+ behandlingen min.

Andre bemerkninger er at maksdiameteren ikke responderte på temperatur, men på tidspunktet prøven ble tatt (tabell 4). Dette stemmer godt overens med resultatene fra cellesyklus og celledelingsmålingene. Spesielt tidlig i forsøket endret maksdiameteren seg mye. Dette viser igjen viktigheten av at alle størrelsesmålingene blir gjennomført på samme tidspunkt på dagen, primært rett etter celledeling. Slik at man unngår en bimodalitet i fordelingen av cellestørrelse som følge av ulik cellesyklus.

Ulik cellesyklus hos *C. reinhardtii* gjør at resultatene vedrørende cellestørrelse må tolkes med forbehold.

4.5 Cellestørrelse

På grunn av variasjoner i fordelingen av cellestørrelse for de ulike behandlingene valgte jeg å ta målingen av både gjennomsnittsdiameter og maksdiameter. Som vist i figur 8 er gjennomsnittsdiameter og maksdiameter godt korrelert, og jeg bruker derfor dataene bare fra gjennomsnittsdiametermålingene (figur 6) som utgangspunkt for den videre diskusjonen.

Cellestørrelsemålingene ble foretatt mellom 07.00 og 08.00 mandag, onsdag og fredag, og som vist i Tabell 3. bestemmes algenes gjennomsnittsstørrelse i stor grad av interaksjonseffekten mellom fosforkonsentrasjon og temperatur.

Temperatureffekten for *C. reinhardtii* på full fosforkonsentrasjon (+P) er større enn temperatureffekten for de fosforbegrensende algene (-P) (figur 6). Denne observasjonen stemmer overens med lignende forsøk av f.eks, Peter & Sommer (2013). I denne studien ble

ni fytoplanktonarter fra det Østersjøen samlet og satt under ulike temperatur og næringsregimer. Deres resultater sier at: *”Overall, our results support the hypothesis that temperature effects on cell size are to a great extent mediated by nutrient limitation.”* Men Peter og Sommer (2013) nevner ikke om de har tatt høyde for cellesyklus i disse forsøkene. Om fosforkonsentrasjon også påvirker cellesyklus til algene til Peter og Sommer, er det mulig at resultatene er grunnet cellesyklus og ikke av behandlingsform.

I mitt eksperiment deler alle algene på 19+ seg i løpet av nattsyklus rundt klokken 06.00 (figur 10), mens algene på 13+ har ingen synkron celledeling og mitose forekommer jevnt over hele døgnet (figur 14). Dette har en effekt på celledeling som henholdsvis figur 9 og 13 viser. For 19- er det ikke vist at celleantallet øker i løpet av døgnet (figur 12). Mens for 13- øker celleantallet i løpet av lys syklus (figur 15). Forskjellen på disse to behandlingene er at 13- blir fortynnet samme dag som prøvene, mens 19- ble fortynnet dagen før prøvene ble gjennomført. Dette viser at -P behandlingene deler seg rett etter fortynning, når det er mest gunstige forhold.

4.6 Mengden RNA

I tillegg til å være et mål på graden av fosforbegrensning, kan mengden RNA også kobles mot vekstraten. Growth-rate-hypotesis (GRH) postulerer at mengden RNA er korrelert med ribosomer. Lite RNA betyr lite ribosomer som igjen gir lavere grad av proteinsyntese som igjen gir lavere vekstrate (Elser et al., 2003). GRH har bred eksperimentell støtte i limniske systemer (Sardans et al., 2011)

Mine resultatene (figur 5. og figur 23) støtter også GRH. -P behandlingene har både lavere vekstrate og mindre RNA enn +P behandlingene. Dette støttes også av de støkiometriske analysene. -P har jevnt over mindre innhold av P enn +P, uttrykt som markerte forskjeller i C:P.

Jeg tok tre målinger av mengde RNA i løpet av eksperimentet. Disse resultatene var ikke konstante over tid. En endring i mengde RNA over tid kan enten være et resultat av en adaptasjon, en endring i fortynningsrate eller en endring næringskonsentrasjonen i mediet (Elser et al., 2003). Med det datamaterialet jeg har er det vanskelig å trekke noen

konklusjoner over hva som er årsaken til denne variasjonen. Men variasjonen til tross, trenden var klar –P hadde betraktelig mindre innhold av RNA enn +P.

4.7 Genomstørrelse

Genomstørrelsen var markant forskjellig mellom behandlingene (figur 26) og varierte med tid på døgnet (figur 27). Det er lite sannsynlig at reell forskjell i haploid genomstørrelse siden flowcytometri er en standardisert metode for å måle mengden DNA per celle, og standard protokoller ble fulgt i denne prøvetakingen, er det nærliggende å anta at det er strukturelle endringer i DNA koblet til cellyklus som bidrar til disse utslagene, men dette er ikke klarlagt.

Siden utslagene i estimert genomstørrelse var så stor og muligens koblet til ulik cellyklus, har jeg valgt å legge vekt på FCM-målingene etter transplantasjonsforsøket. Cellyklus var etter transplantasjonsforsøket synkron, cellyklusen var den samme, mens genomstørrelsen fortsatt var forskjellig, og konsistent større for behandlingene som hadde vokst ved +P (figur 28). Dette kan tolkes som om det faktisk har foregått en endring i genomstørrelse som funksjon av mengden P i kulturene. Dette stemmer overens med hypotesene om at P-begrensning faktisk kan påvirke genomstørrelsen over størrelsesorden 100 generasjoner, men en endelig verifisering av dette vil kreve en sekvensering også for å se på strukturelle endringer i DNA. Det er imidlertid verdt å merke seg at det ble funnet enda større genomendringer gjennom et døgn (figur 27), og her er i alle fall reelle endringer i genomstørrelse utelukket.

I hvilken grad P-begrensning gir en reduksjon av genomet er fortsatt uklart. En strømlinjing av genomet for å spare P under P-begrensning er foreslått for en rekke organismer i Hessen et al., (2013). Andre forsøk på middelhavsplanter har ikke vist noen endring i genomstørrelse som følge av forskjeller i fosforkonsentrasjon over tid (Pellicer et al., 2010).

4.8 Mulige feilkilder

4.8.1 Modellorganisme

C. reinhardtii er den foretrukne laboratorieorganismen når det kommer til arbeid på mikroalger. Men til dette forsøket har *C. reinhardtii* særlig to negative sider knyttet til seg. Først er det så mange ulike kloner som kan oppføre seg ulikt, så forskningsresultater fra en klon trenger ikke å være representative for andre en annen klon. For det andre har *C. reinhardtii* en cellevegg hvor mitosen foregår innenfor, en morcelle kan derfor produsere mer enn to datterceller om gangen. Om denne celleveggen ikke er helt degradert ved CASY-målinger kan det interferere med resultatet, og jeg kan ha fått feil antall alger pr. mL.

4.8.2 Prøvetaking

Teknikken og metoden man bruker i det man skal samle alger på de ulike filtrere, som skal brukes til analysene for C:N:P forhold, APA og RNA innhold, har mye å si for resultatet. Med lite erfaring med denne type sampling og problemer knyttet til utstyr som ble brukt, måtte særlig de helt første filtrere fra første samplingsdato forkastes fra analysedelen. Dette understreker viktigheten av en god samplingsmetode, og kvalitetssikring, i datainnsamling.

Figur 12 og 14, som viser antall celler over tid i døgnforsøkene for 19+ og 13+, viser noe variasjon i celleantall over tid. De små variasjonene skyldes nok pipetteringsteknikk framfor noen reell variasjon. Jeg har brukt samme pipetter og pipettespisser gjennom hele forsøket, men variasjon i celleantall kan forekomme om jeg har ristet ulikt på kulturene før jeg pipetterte og dermed kan algene ikke ha blitt helt homogent fordelt i mediet.

4.8.3 CASY

Det var ingen intern standard i CASY da målingene foregikk. Fluktuasjoner og feil i apparatet kommer derfor ikke til syne.

Jeg avsluttet den intensive prøvetagningen på CASY før jeg avsluttet eksperimentet. Målingene på CASY var veldig tidkrevende og resultatene var så konsistente at jeg valgte å stole på dem, og gikk ut i fra at de ville holde seg konsistente. Eksperimentet ble i tillegg forlenget ved et par anledninger, av utenforliggende faktorer, som gjorde at det ble et veldig stort sprik mellom siste gode CASY måling over tid og C:N:P, APA, RNA innhold og spesielt flowcytometer målinger. Sporadiske målingen på CASY viste ingen endringer, men

det kan tenkes at jeg gikk glipp av noe. Transplantasjonsforsøket viste at endringene trådte i kraft på under en uke.

4.8.4 Medium

Jeg lagde én liter medium hver gang jeg lagde medium. Siden jeg filtrerer det ferdige mediet før fortynning, ble jeg klar over at filteret noen ganger ble mørkere og mørkere ettersom mediet ble stående lenge. Det er usikkert hva denne brunaktige misfargingen på filteret var, mest sannsynlig var det jernutfelling, men det er mulig det var bakterier/mikroalger og at kvaliteten på mediet sank over tid, noe som kan gi utslag på blant annet vekstrate.

4.8.5 Flowcytometer

FCM er helt avhengig av "*gating*" av resultatene. Denne gatingen er utelukkende subjektiv. Jeg har prøvd å være så konsistent med *gatingen* som overhode mulig, men som alt annet subjektivt er det ingen eksakt parameter som styrer annet enn min intuisjon.

4.9 Oppsummering

Med en stadig økning i utslipp av klimagasser i atmosfæren er det predikert at den globale temperaturen vil øke. Av dette følger det at våre vann også vil bli varmere. Varmere vann fører til en sterkere grad av termisk sjiktning (thermoklin), som igjen kan redusere graden av turnover i holomiktiske vann (større grad av termisk stabilitet). En sterkere termoklin vil gjøre at mindre fosfor blir gjort tilgjengelig for den eutrofe sonen (Peters & Sommer, 2013).

Det følger logisk fra dette at alger i fremtiden i større grad en før vil oppleve en økning i temperatur, men kan samtidig risikere en nedgang i tilgjengelig fosfor som følge av sterkere termisk sjiktning. Med utgangspunktet i disse to parameterne og med mine resultater som datamateriale er det mulig og predikere hvordan størrelsen til alger vil respondere på endringene i temperatur og næringssaltkonsentrasjon i fremtiden?

Oppgaven min hadde to sentrale hypoteser

- 1: Lav veksttemperatur gir langsommere vekstrate, men større cellevolum.
- 2: Lite tilgjengelig fosfor gir redusert vekstrate, og gir redusert algestørrelse ved redusert gjennomstørrelse.

Resultatene viste entydig, ved flere uavhengige indikatorer, at det var en sterk effekt av P-begrensning. P-begrensning gav utslag på vekstrate, men det var bare effekt av temperatur på +P behandlingene.

Den videre effekten av dette på celle- og gjennomstørrelse var derimot ikke entydig. Siden de forskjellige behandlingene gav forskjellig cellesyklus kan man ikke konkludere med sikkerhet at mine resultater er reelle forskjeller i cellestørrelse og ikke artefakter av cellesyklus. Når det gjelder utslagene på gjennomstørrelse tilsier de påfallende effektene at videre studier bør utføres, men på bakgrunn av egne studier er det vanskelig å si noe konklusivt, selv om det var indikasjoner på en P-effekt i løpet av forsøket. Oppgavens predikasjonsverdi for endring i cellestørrelse hos andre arter av alger som funksjon av temperatur og fosforkonsentrasjon er også et spørsmål som kun kan besvares ved tilsvarende analyser på andre algearter.

Lærdommen fra dette eksperimentet er at behandlingsform (turbidostat vs. kjemostat), temperatur og fosforkonsentrasjon, spiller inn på *C. reinhardtii* cellesyklus. Dette viser

viktigheten av kjenne til cellesyklus ved lignende eksperimenter med samme eller andre algearter. Uten å ta høyde for cellesyklus er det umulig å vite om resultatene vedrørende cellestørrelse stammer fra reelle endringer i størrelse grunnet ulike behandlingsfaktorer eller om det bare er en artefakt av ulik cellesyklus.

4.10 Forslag til videre undersøkelser

Å kunne predikere hvordan fremtidens alger kommer til å reagere på en økning i temperatur og nedgang i næringssalttilgang er viktig. Derfor anbefales det å fortsette med lignende eksperimenter for å nøste opp faktorene som styrer cellestørrelse og i hva dette har å si for økosystemet.

Forskjellige algearter kan reagere svært forskjellige på samme behandling. Det foreslås dermed at dette eksperimentelle oppsettet prøves på andre mikroalgearter.

Basert på erfaringen mine fra dette prosjektet vil jeg foreslå følgende endringer til et nytt prosjekt. På grunn av eksperimentets omfang og behovet for kvalitetssikring er stort vil det anbefales at to studenter gjennomfører et lignende eksperiment over 100 dager.

Det anbefales å bruke samme eksperimentelle oppsett, men med en annen mikroalgeart uten cellevegg og med binær fisjon, og med større variasjon i temperaturene i det faktorielle oppsettet. På forhånd må det kartlegges hvordan algens cellesyklus forløper seg, slik at man minimere cellesyklusens påvirkning på resultatene. Det er et pluss hvis genomet er fullsekvensert og at genomstørrelsen er kjent på forhånd. Målinger av cellestørrelse og celleantall på CASY burde gjennomføres hver onsdag og fredag, på samme tidspunkt hver gang og med en intern standard. Fortynningene burde skje mandag, onsdag og fredag, på samme tidspunkt. C:N:P målinger burde gjennomføres hver 25 dag, slik at det totalt blir fire målinger. Det er viktig at disse målingene gjøres på samme ukedag og til samme tid, slik at cellesyklus effekten minimeres. APA og RNA innhold er krevende å sample og å analysere, men viktige testparametere for P-begrensning. Det anbefales tre sampels i prøveperioden, hver 33 dag. Målinger på flowcytometeret bør vektlegges og gjennomføres. Mine resultater viser at det er behov for å se hva som faktisk skjer med genomstørrelsen i løpet av en dag.

Litteraturliste

Arendt, J. (2007). Ecological correlates of body size in relation to cell size and cell number: patterns in flies, fish, fruits and foliage. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 82(2), 241–56.

Atkinson, D. (1994). Temperature and Organism Size-A Law for Ectotherms?, 1–58.

Bergmann, C. (1847). Über *die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Tier zu ihrer Größe*. Goettinger Studien, 1, 595-708.

Bisová, K., & Zachleder, V. (2014). Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *Journal of Experimental Botany*.

Brönmark C. and Hansson L. (2005) *The biology of lakes and ponds* Oxford, New York

Caraco, N. (2009). History of P Research and Basic Chemical Properties of P, 73–78.

Cavalier-Smith, T. (2005). Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion. *Annals of Botany*, 95(1), 147–75.

Chown, S. L. & Gaston, K. J. (2010). *Body size variation in insects: a macroecological perspective*. *Biological Reviews*, 85, 139-169

Craigie R.A., Cavalier-Smith T (1982): *Cell volume and control of the Chlamydomonas cell cycle*. *J.Cell Sci.* **54**, 173–191

Current Protocols in Cytometry (2005) 1.3.1-1.3.21

Copyright 2005 by John Wiley & Sons, Inc.

Daufresne, M., Lengfellner, K., & Sommer, U. (2009). Global warming benefits the small. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31).

Dawkins R (2006) *The Selfish gene 30th anniversary edition* Oxford University Press, Oxford

Elser, J. J., Acharya, K., Kyle, M., Cotner, J., Makino, W., Markow, T., ... Sterner, R. W. (2003). Growth rate-stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecology Letters*, 6(10), 936–943.

Elser J.J & Loladze, I. (2011) *The origins of the Redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein:rRNA ratio*, *Ecology Letters*, 14, 244-250

Finkel, Z. V., Beardall, J., Flynn, K. J., Quigg, a., Rees, T. a. V., & Raven, J. a. (2009). Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research*, 32(1), 119–137.

Flynn, K. J., Raven, J. a., Rees, T. A. V., Finkel, Z., Quigg, A., & Beardall, J. (2010). Is the Growth Rate Hypothesis Applicable To Microalgae?1. *Journal of Phycology*, 46(1), 1–12.

Forster, J., Hirst, A. G., & Esteban, G. F. (2013). Achieving temperature-size changes in a unicellular organism. *The ISME Journal*, 7(1), 28–36.

Fox C. & Wolf J. (2006) *Evolutionary genetics, concepts and case studies* Oxford University Press, Oxford (2006)

Gardner, J. L., Peters, A., Kearney, M. R., Joseph, L., & Heinsohn, R. (2011). Declining body size: a third universal response to warming? *Trends in Ecology & Evolution*, 26(6), 285–91.

Graham L , J. Graham, L. Wilcox (2009) *Algae 2.edition* , Pearson Education, San Francisco

Gregory, T. R. (2001). Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 76(1), 65–101.

Gregory T.R. (2005) *The evolution of the genome* Elsevier Academic, Burlington, MA

Gregory T.R (2014) *Animal Genome Size Database* <http://www.genomesize.com>

Greilhuber, J. (1998). Intraspecific Variation in Genome Size: A Critical Reassessment. *Annals of Botany*, 82, 27–35.

Guillard & Lorenzen. (1972), *Yellow-green algae with Chlorophyllide C*, *Journal of Phycology*. 8: 10-12

Hessen, D. O., Daufresne, M., & Leinaas, H. P. (2013). Temperature-size relations from the cellular-genomic perspective. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 88(2), 476–89.

Hessen, D. O., Elser, J. J., Sterner, R. W., & Urabe, J. (2013). Ecological stoichiometry: An elementary approach using basic principles. *Limnology and Oceanography*, 58(6), 2219–2236.

Hessen, D. O., Faafeng, B. a., Brettum, P., & Andersen, T. (2006). Nutrient Enrichment and Planktonic Biomass Ratios in Lakes. *Ecosystems*, 9(4), 516–527.

Hessen, D. O., Jeyasingh, P. D., Neiman, M., & Weider, L. J. (2010). Genome streamlining and the elemental costs of growth. *Trends in ecology & evolution*, 25(2), pp.75–80.

Hessen, D. O., Ventura, M., & Elser, J. J. (2008). Do phosphorus requirements for RNA limit genome size in crustacean zooplankton? *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil National de Recherches Canada*, 51(9), 685–91.

James, F. C. (1970). *GEOGRAPHIC SIZE VARIATION IN BIRDS AND ITS RELATIONSHIP TO CLIMATE*. *Ecology*, 51, 365-&.

Jalal, M., Wojewodzic, M. W., Laane, C. M. M., & Hessen, D. O. (2013). Larger Daphnia at lower temperature : a role for cell size and genome, *519(June)*, 511–519.

Johnston, J. S., Bennett, M. D., Rayburn, a L., Galbraith, D. W., & Price, H. J. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, 86(5), 609–13.

Karl, I., & Fischer, K. (2008). Why get big in the cold? Towards a solution to a life-history puzzle. *Oecologia*, 155(2), 215–25.

Kozłowski, J., Czarnoleski, M., & Danko, M. (2004). Can optimal resource allocation models explain why ectotherms grow larger in cold? *Integrative and Comparative Biology*, 44(6), 480–93.

Lien, T. & Knutsen, G. (1979). *Synchronous growth of Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae): a review of optimal conditions*. *Journal of Phycology* 15: 191-200

Lynch M (2007) *The origins of genome architecture* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Marie, D., Simon, N., Guillou, L., Partensky, F., & Vaultot, D. (2001). DNA/RNA analysis of phytoplankton by flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry / Editorial Board, J. Paul Robinson, Managing Editor ... [et al.,], Chapter 11, Unit 11.12.*

Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., ... Ren, Q. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5848)

Montagnes, D. J. S., & Berges, J. (1994). Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll a from volum in marie phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 39(5), 1044–1060.

Moseley JL, Chang CW, Grossman AR. (2006). *Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSRI control in Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 5:26–44

Murphy J., & J.P Riley. (1962). A modified singel solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 31–36.

Oldenhof, H., Zachleder, V., & Ende, van den. (2007). The Cell Cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* : the Role of the Commitment Point. *Foilia Microbiology*, 52(1), 53–60.

Pellicer, J., Estiarte, M., Garcia, S., Garnatje, T., Peñuelas, J., Vallès, J., ... Kingdom, U. (2010). Genome size unaffected by moderate changes in climate and phosphorus availability in Mediterranean plants, 9(37), 6070–6077.

Peter, K. H., & Sommer, U. (2013). Phytoplankton cell size reduction in response to warming mediated by nutrient limitation. *PloS One*, 8(9), e71528.

Petrov, D. a. (2001). Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends in Genetics : TIG*, 17(1), 23–8.

Pröschold, T., Harris, E. H., & Coleman, A. W. (2005). Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 170(4), 1601–10

Redfield, A. C. (1958), *The biological control of chemical factors in the environment*, Amer. Sci., 463, 205–221,

Sager, R. (1955). Inheritance in the Green Alga *Chlamydomonas Reinhardi*. *Genetics*, 40(4), 476–89.

Sardans, J., Rivas-Ubach, A., & Peñuelas, J. (2011). The elemental stoichiometry of aquatic and terrestrial ecosystems and its relationships with organismic lifestyle and ecosystem structure and function: a review and perspectives. *Biogeochemistry*, 111(1-3), 1–39.

Schlösser U. (1966): *Enzymatisch gesteuerte Freizetsung von Zoosporen bei Chlamydomonas reinhardtii DANGEARD in Synchronkultur*. *Arch.Mikrobiol.* **54**, 128–133

Sterner, R. W. & Elser, J. J. (2002). *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*, Princeton, N.J., Princeton University Press.

Vítová M, Bišová K, Hlavová M, Kawano S, Zachleder V, Čížková M. (2011). *Chlamydomonas reinhardtii: duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by temperature*. *Planta* 234, 599–608.

Walters, R. J., & Hassall, M. (2006). The temperature-size rule in ectotherms: may a general explanation exist after all? *The American Naturalist*, 167(4), 510–23.

Wojewodzic, M. W., Kyle, M., Elser, J. J., Hessen, D. O., & Andersen, T. (2011). Joint effect of phosphorus limitation and temperature on alkaline phosphatase activity and somatic growth in *Daphnia magna*. *Oecologia*, 165(4), 837–46.