

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Bakalářská práce

## **Diferenciace populací u ochrofytních řas**

Population differentiation of Ochrophytes

**Anna Mensová**

Školitelka

Mgr. Katarína Nemjová

Praha 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 5. 2012

Anna Mensová

## **Shrnutí**

Předkládaná bakalářská práce se zabývá diferenciací populací u ochrofytních řas (fotosyntetická Stramenopiles). Přírodní populace se mohou lišit v mnoha aspektech a jejich odlišení může zasahovat do několika rovin. Ekofyziologické a morfologické rozdíly jsou často způsobeny fenotypovou plasticitou, která je flexibilní odpovědí na podmínky prostředí. Při dlouhodobé izolaci populací může dojít k omezení genového toku mezi nimi a následné genetické diferenciaci. Vznik genetické diferenciaci může být způsoben adaptací na lokální podmínky prostředí a náhodnými evolučními událostmi jako je například efekt zakladatele a genetický drift. Studium populací vede k odhalení faktorů, které diferenciaci ovlivňují, a zároveň napomáhá pochopení mechanismů speciace. Práce shrnuje současné poznatky o jednotlivých typech variability pro třídy ochrofytních řas, u kterých byla diferenciaci na různých úrovních studována.

**Klíčová slova:** diferenciaci populací, ekotypové odlišení, fenotypová plasticita, fyziologická variabilita, genetická diferenciaci, morfologická variabilita, Ochrophyta

## **Abstract**

This bachelor thesis deals with a differentiation of populations of Ochrophytes (photosynthetic Stramenopiles). Natural populations can differ in many aspects and their differentiation is observed on several levels. Ecophysiological and morphological differences are very often caused by phenotypic plasticity, which is a flexible answer to changing conditions of habitats. Genetic differentiation could express an adaptation to the local environmental conditions. The adaptation and a long-term isolation of populations are considered to be the leading factors in genetic differentiation. The other factors contributing to genetic differentiation are random evolutionary events such as founder effect or genetic drift. Detailed studies of populations lead to uncover the factors that cause the differentiation of populations as well as they contribute to the understanding of speciation mechanisms. The thesis compiled the information about different types of variability among populations within the classes of Ochrophytes.

**Key words:** ecotypes, genetic differentiation, morphological variability, Ochrophyta, phenotypic plasticity, physiological variability, population differentiation

## Obsah

1. Úvod.....	3
2. Diferenciace populací .....	4
2.1. Fenotypová plasticita .....	4
2.2. Problematika kryptických a pseudokryptických druhových komplexů.....	6
2.3. Genetická diferenciace .....	6
2.3.1. <i>Ekotyp</i> .....	7
3. Disperzní potenciál a biogeografie .....	9
4. Ochrophyta (fotosyntetická Stramenopiles).....	11
4.1. Obecná charakteristika .....	11
4.2. Chrysophyceae s. str. ....	11
4.3. Synurophyceae.....	12
4.3.1. <i>Vliv teploty</i> .....	13
4.3.2. <i>Vliv pH</i> .....	15
4.3.3. <i>Vliv koncentrace živin v prostředí</i> .....	15
4.4. Bacillariophyceae (rozsivky).....	16
4.4.1. <i>Vliv faktorů prostředí</i> .....	17
4.4.2. <i>Diferenciace populací ověřená více metodami</i> .....	18
4.5. Phaeophyceae (chaluhy).....	21
4.5.1. <i>Vliv salinity</i> .....	22
4.5.2. <i>Vliv expozice vlnám</i> .....	23
4.5.3. <i>Ekotypová (genetická) diferenciace</i> .....	25
4.6. Dictyochophyceae.....	28
4.7. Raphidophyceae.....	28
4.8. Eustigmatophyceae .....	30
5. Závěr .....	31
Literatura.....	32

# 1. Úvod

Základním úkolem vědecké systematiky je klasifikace organismů. Zařazování organismů do příslušných skupin je založeno zejména na jejich podobnosti. Od 19. století je tato podobnost dávána do souvislosti se změnami v rámci evolučního vývoje a operuje se s faktem, že recentní vlastnosti organismů reflektují jejich evoluční minulost.

Tyto koncepční změny v klasifikaci zásadním způsobem ovlivnily vnímání druhu jakožto systematické kategorie. Jelikož měl stále zůstat taxonomickou jednotkou, musel na něj být vyvinut nový pohled. Druhy se staly subjekty vznikajícími díky komplexním vývojovým procesům. Obecně drží pohromadě na základě toku genů a jsou odděleny reprodukční bariérou. Ke koncepčním problémům spojeným s obecným vymezením druhů se řadí i problém technologického vývoje, který nám nabízí stále nové metody k jejich determinaci (Beszteri 2005). Ve snaze o co nejpřesnější a nejobecnější vymezení druhů dochází ke vzniku celé řady druhových konceptů (Mallet 2007, Mayr & Ashlock 1991).

U mikroorganismů na problémy s klasifikací narážíme snad nejčastěji. Vymezení jejich druhů je často netriviálním vědeckým úkolem. Při jeho plnění by měla být komplexně zohledněna široká škála údajů, jako je například vzájemná interfertilita a především znalost dostatečného množství dat o vnitrodruhové genotypové a fenotypové variabilitě, která je u mikroorganismů nebývale široká (Beszteri 2005, Mann 1999).

Pro získání klíčových informací o této variabilitě může být velmi nápomocné studium jednotlivých populací v rámci druhu. Jejich vzájemné porovnávání a zjišťování signifikantních odlišností mezi nimi může být hlavním nástrojem pro následné zmapování působících ekologických a evolučních faktorů. Pozorování populačních struktur napomáhá komplexnímu odhalení vlivů, které mohou být hnací silou evolučních procesů. Studium populací vede k pochopení vývoje jednotlivých fylogenetických skupin a poskytuje celou škálu informací o jejich historii, fenotypové plasticitě a vzájemné interakci. Zároveň často vhodným způsobem odhaluje diverzitu, která může zůstat při méně důkladném pozorování skryta.

Moje práce je zaměřena právě na variabilitu mezi jednotlivými populacemi daného druhu. Jejím cílem je shrnout poznatky o genetické, morfologické i ekofyziologické diferenciaci populací u ochrofytních řas. Popsat parametry, které mohou mít na daný jev vliv a nastínit možnosti vzniku variability u jednotlivých tříd Ochrophyt, u kterých byla diferenciaci populací studována.

## 2. Diferenciace populací

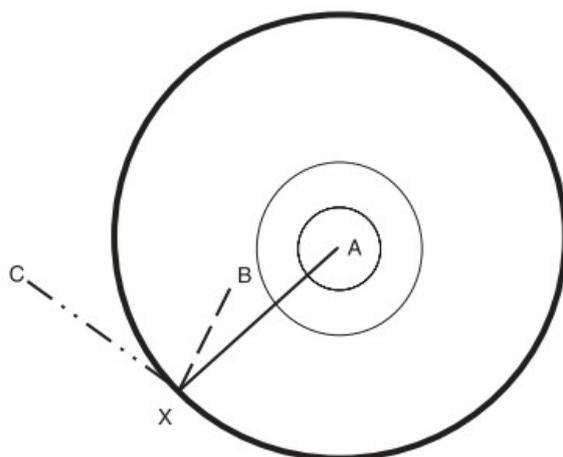
Studium populací je zcela zásadní pro pochopení evolučních mechanismů. Přehled o schopnosti šíření, frekvenci sexuálního rozmnožování, míře genového toku a ekologických parametrech prostředí může osvětlit speciální procesy. Při pohledu z vnějšku se populace jednotlivých druhů mohou lišit na základě mnoha faktorů. Může docházet k patrným změnám v morfologii či k vzniku populačně specifických fyziologických vlastností. Jenom při bližším prozkoumání lze zjistit, zda za těmito rozdíly stojí vnitrodruhová genetická diferenciace nebo jsou pouhou plastickou odpovědí na konkrétní podněty z prostředí.

V následujících kapitolách se budu stručně věnovat fenotypové plasticitě, problematice kryptických a pseudokryptických druhů, genetické diferenciaci a tvorbě ekotypů. Poté krátce pojednám o disperzním potenciálu a biogeografii řas. Ve čtvrté kapitole shrnu informace o pozorované diferenciaci populací u ochrofytních řas.

### 2.1. Fenotypová plasticita

Rozdíly pozorované mezi populacemi jednoho druhu mohou být vysvětleny fenotypovou plasticitou. Jedná se o adaptivní odpověď organismu na environmentální vlivy, schopnost účelně se přizpůsobovat lokálním podmínkám. Do jisté míry má genetický materiál na tyto odpovědi vliv, neboť v sobě uchovává dispozice k určitému přizpůsobení. Tato plasticita je jakousi souhrou faktorů prostředí a genotypu (Alpert & Simms 2002). Přirozený výběr upřednostňuje fenotypovou plasticitu před fixací konkrétního fenotypu v případě, že se organismus nachází ve velmi proměnlivém prostředí a schopnost tvorby alternativního fenotypu zvyšuje jeho fitness. To platí samozřejmě jen v případě, kdy nejsou náklady na plasticitu vyšší než získaná fitness (Harvell 1990, Tollrian & Harvell 1999).

Rozlišujeme dva typy fenotypové plasticity, a to adaptivní a neadaptivní. Adaptivní fenotypová plasticita je reakční normou na podmínky prostředí, která vyústí v tvorbu optimálního fenotypu. Jedná se tedy o schopnost organismu flexibilně se přizpůsobit běžnému rozmezí podmínek v přírodě. Tato adaptivní schopnost hraje velkou roli při osidlování nových lokalit populacemi daného druhu. Neadaptivní fenotypová plasticita se zpravidla projevuje při působení stresových podmínek. Jedná se o změny, které obecně spíše nepřispívají zvýšení fitness, a výsledný fenotyp je tedy relativně vzdálen optimu. (Obr. 1)



Obr. 1. Roli plasticity umožňující kolonizaci a následnou adaptaci na nové stanoviště lze ilustrovat pomocí Fisherova geometrického modelu adaptace. Na tomto obrázku vyjadřuje silný vnější kruh n-rozměrný fenotyp původní (ancestrální) populace, X. Optimální fenotyp pro nové prostředí se nachází ve středu kruhu. Dále jsou zde uvedeny tři typy fenotypové plasticity. A představuje genotyp s dokonalou adaptivní plasticitou – nové prostředí způsobí optimální změnu fenotypu v přímém směru vektoru. B představuje genotyp, jehož plasticita je také adaptivní, ale neúplná, a umísťuje fenotypy jedinců mírně od optima. U genotypu C je plasticita neadaptivní a příslušná individua zcela odchyluje od optimálního fenotypu. (převzato z Ghalambor et al. 2007)

Při působení stresu může být také odhalena genetická variabilita, která umožňuje některým zástupcům tolerovat podmínky stresu. Jedná se pravděpodobně o kryptickou diverzitu, která má za následek vzrůst fenotypových a genotypových rozdílů, které zůstávaly v normálních podmínkách skryty (Bradshaw et al. 1989, Ghalambor et al. 2007).

Konkrétní změny ve fenotypu mohou být zachovány i po několika generacích, ovšem při velkých nákladech může být zbytečná plasticita odstraněna selekcí (Edelaar et al. 2005). Někdy se jedná o změny reverzibilní. Pominou například ihned poté, co přestane působit vliv, který je vyvolal (de Jong 2004, Price et al. 2003).

Je předmětem mnoha diskuzí, jakou roli hraje fenotypová plasticita v evoluci. Není jasné, zda plasticita chrání genotyp před selekcí nebo k ní naopak vytváří nové příležitosti. Podle některých autorů plasticita zahrnuje rozmanitost environmentálně vyvolaných odpovědí, což může vést k potenciálním evolučním důsledkům (Ghalambor et al. 2007, Pigliucci et al. 2006). Adaptivní plasticita pravděpodobně přispívá k usnadnění adaptivní evoluce, neboť napomáhá tvorbě optimálního fenotypu v novém prostředí a přes genetickou asimilaci<sup>1</sup> může dojít k jeho fixaci (Pigliucci et al. 2006). V případě neadaptivní plasticity může být selekce výsledkem působení stresu (Bradshaw et al. 1989, Ghalambor et al. 2007).

<sup>1</sup> fenotyp, jenž byl dříve vyvolán konkrétním podnětem, přetrvává, i když podnět již nepůsobí

## 2.2. Problematika kryptických a pseudokryptických druhových komplexů

Díky častému užití morfologických kritérií k determinaci druhů dochází k jejich chybnému vymezení. Na základě tohoto způsobu určování lze zcela přehlédnout přítomnost kryptických a pseudokryptických druhových komplexů. Z definice plyne, že tyto komplexy obsahují populace morfologicky identických nebo jen nepatrně se lišících jedinců, kteří jsou ovšem geneticky natolik odlišní, že mezi nimi vládne reprodukční izolace (Mann 1999, Mayr 1970). Množící se molekulární analýzy v kombinaci s jinými kritérii determinace (morfologie, fyziologie, vzájemná interfertilita) napomáhají odhalení této kryptické diverzity (Behnke et al. 2004, Lundholm et al. 2006, Vanomerlingen et al. 2008). V rámci Ochrophyt jsou z tohoto pohledu nejkomplikovanějšími skupinami Synurophyceae a Bacillariophyceae, u nichž se k této problematice stručně vrátím.

## 2.3. Genetická diference

Genetická diference je definována jako akumulace rozdílů ve frekvenci alel. Dochází k ní zejména mezi částečně nebo úplně separovanými populacemi (Lowe et al. 2004). Je tedy následkem omezení genového toku a působení evolučních sil. Separace může být způsobena geografickou vzdáleností nebo jinou, pro organismus nepřekonatelnou, bariérou. Působením selekce mohou vznikat ekotypy adaptované na konkrétní prostředí (rozebráno v 2.3.1. *Ekotyp*). Ke genetické diferenciaci dochází mimo jiné i vlivem náhodných evolučních událostí, jako je efekt zakladatele a genetický drift (Innes 1984, Slatkin 1978).

Na formování geneticky diferencovaných populací má vliv samozřejmě i fylogeografická minulost druhů. Při posledním glaciálním maximu (před 18 000–20 000 lety) byly organismy zatlačeny do refugií, ze kterých expandovali až po oteplení klimatu. Díky této dlouhodobé izolaci se očekává velká druhová diverzita v rámci konkrétního útočiště a vysoká vnitrodruhová genetická odlišnost mezi refugii (Hewitt 1996). V současné době je možné molekulárními metodami odhalit místa, kde se refugia pravděpodobně nacházela a také rekolonizační cesty organismů po oteplení. Refugia se vyznačují přítomností endemických haplotypů a vysokou haplotypovou diverzitou (Hoarau et al. 2007). Studium rekolonizačních cest z refugií je zajímavé pro polemiku o průběhu adaptace organismů na lokální podmínky (Coyer et al. 2003).

Míru diference lze vyjádřit Neiovou genetickou distancí ( $D$ ) nebo fixačním indexem ( $F_{ST}$ ). Nei (1971) objevil statistickou metodu, která odhaduje počet kodonových rozdílů a dobu divergence mezi dvěma blízce příbuznými druhy. Později tuto metodu modifikoval pro studium genetických rozdílů v rámci druhu. Modifikace spočívala v přihlídnutí



k polymorfismu uvnitř populace. Definoval normalizovanou identitu (shodnost) genů mezi populacemi, která odpovídá identitě proteinů. To pak vztáhl k počtu akumulovaných rozdílů na lokus (Nei 1972, 1971). Wrightův fixační index vyjadřuje genetickou diferenciaci mezi populacemi a je založen na datech genetického polymorfismu, jako je jednonukleotidový polymorfismus a mikrosatelity. Vyjadřuje korelaci výskytu náhodně zvolených alel v rámci jedné subpopulace a v rámci celé populace, zároveň podíl genetické diverzity způsobený rozdíly ve frekvencích alel mezi populacemi (Holsinger et al. 2009).

### **2.3.1. Ekotyp**

Většina studií, které se v minulosti zabývaly získáním více informací o genetické diferenciaci populací, se zaměřovala zejména na ekotypovou rozmanitost.

Pojem ekotyp (Tureson 1922) je definován jako geneticky odlišná ekologická jednotka jednoho druhu (tj. populace nebo skupina populací), která se liší svým fyziologickým, resp. morfologickým charakterem v závislosti na podmínkách místa výskytu. Vykazuje tak schopnost genetické odpovědi na povahu prostředí. Fyziologické ekotypy ukazují u jednotlivců jejich reakci na různé podmínky (teplota, salinita, aj.). Existence morfologických ekotypů je rovněž vysvětlována jako odpověď na charakteristiku místa expozice organismu. O samotné organizaci genetické odlišnosti v rámci a mezi populacemi řas existuje stále jen malé množství informací, i když studií na toto téma stále přibývá (Engelen et al. 2001, Fietz et al. 2005, atd.).

Výskyt ekotypové variace by podle Turessona (1922) měl být důkazem genetické diferenciaci mezi populacemi, vyplývající ze schopnosti adaptace na podmínky konkrétního prostředí. Míra rozšíření organismu a následný genový tok ovlivní úroveň genetické diferenciaci mezi populacemi. U některých druhů s malým rozšířením může být diferenciaci způsobena efektem zakladatele s následnou fixací výhodných znaků. (Innes 1984, Mathieson et al. 1981). Pokud jsou populace geograficky izolovány a genový tok je minimalizován nebo úplně přerušen, je pravděpodobnost genetické odlišnosti a vzniku ekotypu vyšší (Kopczak et al. 1991, Slatkin 1978).

Genetická diferenciaci je pouze jeden ze způsobů, jakým mohou populace odpovídat na heterogenitu prostředí a nemusí být pravidlem. Jak bylo již výše zmíněno, populace si mohou zachovat společný genotyp a přitom vykazovat fenotypové změny v závislosti na environmentálních podmínkách. Některé tyto změny mohou být i pouhou reverzibilní modifikací (viz 2.1. Fenotypová plasticita) (Mayr 1970).

V případě odhalení morfologických a fyziologických změn mezi populacemi jednoho druhu (Cousens 1982, Choi et al. 2009, Lee & Kim 2007, Peckol et al. 1988 atd.) je k potvrzování geneticky podmíněné variability používáno metody přesazování a křížících experimentů (Espinoza & Chapman 1983, Fowler-Walker et al. 2006, de Paula & de Oliveira 1982). Reciproční přesazování spočívá v pozorování chování konkrétní populace při kultivaci v podmínkách populace odlišné. Při zjevné nepřizpůsobivosti jedinců se usuzuje, že je jejich fenotyp geneticky kódován a nejedná se tedy o plastickou odpověď. Tyto pokusy lze provádět ve speciálních nádržích nebo simulací v laboratoři. Křížící experimenty jsou založeny na pravidlech klasické genetiky a zabývají se dědičností konkrétních znaků u vzniknuvších hybridů.

Nyní je výzkum této oblasti obohacen o molekulární studie (Engelen et al. 2001, Tatarenkov et al. 2007, atd.). Pro populační studie je využívána jaderná, chloroplastová i mitochondriální DNA. K odhalení míry genového toku a závislosti genetické diferenciace na vzdálenosti populací se hojně využívá selektivně neutrálních molekulárních markerů. Kromě genetické struktury populací a migrace mezi nimi mohou odhalit i historické události jako je dlouhodobá izolace. K výzkumu diferenciace populací jsou často používány mikrosatelity. Jsou to opakující se jednonukleotidové sekvence. Jedná se o kodominantní velmi variabilní molekulární markery (SSRs - *simple sequence repeats* nebo STRs - *short tandem repeats*). Mikrosatelity jsou užitečné ke zjištění genového toku, historie populací a migrace (Kameyama et al. 2001, Casteleyn et al. 2010). Pro studium populací jsou vhodné například i RAPD markery (*random amplified polymorphic DNA*). Princip je založen na amplifikaci fragmentů DNA za použití pouze jednoho oligonukleotidového primeru. Užívají se často pro studium vzácných organismů, neboť nevyžadují díky RAPD-PCR (*polymerase chain reaction*) velké množství genetického materiálu. Mohou být úspěšně použity k vyjádření pozitivního vztahu mezi velikostí populace a genetickou variabilitou (Fisher et al. 2000). Dále se využívá technika AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), jejíž princip je založen na selektivní amplifikaci restrikčních fragmentů celého genomu. Kromě struktury populací reflektuje reprodukční systém a především historické procesy, jako je dlouhodobá izolovanost. Výhodou je zejména vysoký stupeň polymorfismu (Tribisch et al. 2002, Mueller & Wolfenbarger 1999).

Sekvenování jaderné rDNA je vhodné k odhalení průběhu a rychlosti evoluce, rozkrývá podobnost a příbuznost jednotlivých taxonů (Alverson 2008). Malé ribozomální podjednotky (SSU nebo 18S) jsou vhodné k rekonstrukci vyšších fylogenetických vztahů v rámci tříd (Alverson et al. 2006, Sorhannus 2004). Zatímco velké podjednotky (LSU nebo 28S) D1-D3

a mezeríkové oblasti (ITS - *internal transcribed spacer*) jsou užívány především ke zjištění vztahů mezi blízce příbuznými rody, ale mohou řešit i fylogenezi na úrovni populací (Benkhe et al. 2004, Lundholm et al. 2006, Vanomerlingen et al. 2008). Mitochondriální (např. *cox1*) a plastidové (např. *rbcL*) markery jsou používány zejména k vyjasnění fylogenetických vztahů na úrovni druhů (Casteleyn et al. 2009a). Samotná variabilita v sekvencích DNA však nemá biologickou výpovědní hodnotu, je nutné ji kombinovat s jinými metodami. Neutrální molekulární markery jsou užitečnými indikátory populační struktury a genového toku, ale nevypovídají o konkrétní adaptaci na lokální habitat (Weisse 2008). Molekulární data často spíše jen doplňují nebo usměrňují další data týkající se morfologie, fyziologie, reprodukční izolace atd. (Casteleyn et al. 2010, Evans et al. 2009).

### 3. Disperzní potenciál a biogeografie

Důležitým faktorem pro problematiku diferenciací populací je schopnost šíření daného organismu a schopnost šíření jeho rozmnožovacích stádií. Při limitované možnosti disperse lze předpokládat, že bude omezen genový tok mezi vzdálenějšími populacemi. Tím může dojít k větší vnitrodruhové genetické odlišnosti. Do úvah o disperzním potenciálu jednotlivých organismů je třeba zahrnout i vlivy, které ho mohou posílit nebo naopak snížit.

U některých makroskopických řas bylo zjištěno, že jednotlivá stádia životního cyklu (vaječné buňky, spermie, zygota, embryo) jsou fotosynteticky plně kompetentní, přičemž vaječné buňky jsou schopné samostatné existence o něco delší dobu (dny) než spermie (hodiny) (McLachlan et al. 1978). U některých zástupců třídy Phaeophyceae byla prokázána různá intenzita fotosyntézy spor (Amsler & Neushul 1991) i určena doba jejich šíření v závislosti na světle (Reed et al. 1992).

I přes tuto nespornou výhodu dočasné samostatné výživy a pohyblivost některých životních stádií je disperzní potenciál makroskopických řas značně omezen. Často na pouhých několika metrech od mateřské rostliny (Kendrick & Walker 1995). Růst a životaschopnost embryí mohou být navíc limitovány teplotami okolí (Arrontes 1993). U některých makrořas byla objevena zvýšená možnost šíření a to v souvislosti s vysokou turbulencí vody, např. při bouři. Za takových podmínek se mohou stádia spory dostat do velkých vzdáleností od původního stanoviště (Reed et al. 1988). Podobným způsobem mohou putovat i reprodukčně zralé rostliny a tím rozšířit potenciální okruh genové výměny (Tatarenkov et al. 2007).

Mnohem diskutovanějším tématem je potenciál šíření mikroskopických organismů, tedy bakterií a protist. Donedávna byl všeobecně uznáván neutrální model ubikvitního rozšíření.

Původně byl formulován Beijerinckem jako tvrzení „*everything is everywhere*“ a později přispěl modifikujícím dodatkem „*the environment select*“ dánský mikrobiolog Baas-Becking (shrnutí v de Wit & Bouvier 2006). Tento model navrhoval pro mikroorganismy kosmopolitní distribuci. Úvaha byla založena na předpokladu, že malá velikost umožňuje organismům menším než 1mm snazší šíření (Finlay 2002). Mnoho mikroorganismů má navíc schopnost tvorby dormantních odolných stádií a je šířena kolonizačními vektory jako jsou ptáci, hmyz a vítr. Jejich disperze tedy teoreticky nemůže být omezena téměř žádnými bariérami. Ubikvitní rozšíření těmto organismům zajistí vznik obrovských populací, u kterých nedochází k alopatrické speciaci ani k lokální extinkci. Druhová diverzita konkrétní lokality je podle tohoto modelu pouze odrazem vlastností prostředí (Finlay & Fenchel 2004, Finlay 2002). Podle této teorie tedy žijí organismy menší než 1000 $\mu$ m všude, kde jim to podmínky prostředí umožňují a tvoří tak po celém svém rozsahu geneticky homogenní populaci (Medlin et al. 2000).

Jak se ukázalo, má tento model zřejmě hned několik slabých míst, které shrnul ve své práci Wilhelm Foissner (2008). Teorie ubikvitního rozšíření (i) značně zanedbává pravděpodobně mimořádné speciální možnosti protist, které jsou dané jejich krátkou generační dobou, a ignoruje schopnost mnohých mikroorganismů přežít po dlouhá geologická období (ii) nebere v potaz skutečnost, že vysoká abundance se nevztahuje na všechna protista, ale pouze na několik málo druhů (iii) ignoruje literární záznamy dokumentující výskyt druhů s omezenou distribucí (iv) opomíjí vliv člověka na šíření protist, i když je někdy značný, např. zátěžové vody na lodích (Foissner 2006) (v) tvrdí, že jejich malá velikost je příčinou kosmopolitního rozšíření (Foissner 2008). Vymezení schopnosti disperze ohraničené velikostí 1mm se zdá být irelevantní například v souvislosti s velikostí propagulí makrořas a vyšších rostlin, které nepřesahují řádově velikost desítek mikrometrů (Berger et al. 2001). I když byl Wilkinsonem (2001) navržen horní hraniční limit pro kosmopolitní druhy 100 $\mu$ m, stále existují organismy, jejichž propagule této velikosti nedosahují a i tak je jejich disperze omezena, neboť tvoří geneticky strukturované populace. (Szovényi et al. 2007, Tatarenkov et al. 2007).

V současné době přibývá studií, které dokazují populační genetickou strukturu některých planktonních protist a tím i jejich zjevně omezené rozšíření. Pro příklad můžeme uvést populace rozsivek (Ryner et al. 2006, Evans et al. 2009), prymnesiophyt (Iglesias-Rodríguez et al. 2006) a dinoflagelátů (Alpermann et al. 2009), které vykazují vysoký stupeň genotypové diverzity. S přihlédnutím k výsledkům řady výzkumů z posledních let se tedy zdá pravděpodobnější teorie umírněného ubikvitního modelu (Bass et al. 2007, Foissner 2006),

kteřá sice připouští kosmopolitní rozšíření pro některé druhy protist, ale u jiných zase uznává jejich endemismus a omezení jejich distribuce geografickými bariérami. Foissner kromě výše uvedených nedostatků ubikvitní teorie zdůrazňuje, že odolná stádia, kterými by se mikroorganismy mohly potenciálně šířit, mají často omezenou životnost (Foissner 1997). Podle Thomase Weisse (2008) nelze ani u protistních organismů pominout fakt, že skutečná časoprostorová dimenze aktivních buněk (tzv. home range) je mnohem menší než prostor, který by potenciálně mohli okupovat pasivním šířením klidových stádií. Pro mikroorganismy navrhuje stejný pohled na biogeografii jako pro makroorganismy (Weisse 2008). Na rozdíl od mnohobuněčných organismů, není biogeografie protist tak zjevná, neboť zřejmě mají širší rozsah, jsou celkově málo prozkoumány a jejich diverzita není pravděpodobně popsána ani z poloviny. To platí zejména pro vzácné druhy, které mají omezenou distribuci (Foissner 2006).

## **4. Ochrophyta (fotosyntetická Stramenopiles)**

### **4.1. Obecná charakteristika**

Jedná se o velmi rozmanitou monofyletickou skupinu, která tvoří větev uvnitř fylogenetického stromu skupiny Stramenopiles. Nalezneme je převážně v mořských, ale i v sladkovodních a terestrických biotopech. Mohou mít vláknitou, koloniální, jednobuněčnou i mnohobuněčnou stélku. Jejich velikost se pohybuje od několika mikrometrů (např. Dictyochophyceae) až po desítky metrů (Phaeophyceae) (Riisberg et al. 2009).

Mezi synapomorfní znaky patří přítomnost plastidu se čtyřmi obalnými membránami a dvou bičků odlišného tvaru a funkce (Cavalier-Smith & Chao 2009). Tyto znaky jsou ovšem společné pro všechna Heterokontophyta.

Mezi Ochrophyta se v současné době řadí 16 tříd. Některé jsou druhově velmi početné, jiné obsahují jen několik málo rodů.

V následující části se budu věnovat pouze skupinám, u kterých byla pozorována diferenciace populací.

### **4.2. Chrysophyceae s. str.**

Z třídy Chrysophyceae byla v roce 1987 vyčleněna třída Synurophyceae na základě odlišnosti některých ultrastrukturálních znaků a absence chlorofylu  $c_2$  (Andersen 1987). Jelikož se Chrysophyceae s. str. jeví jako parafyletická skupina, uvažuje se o zpětném zařazení této třídy do Chrysophyceae s. l. (Cavalier-Smith 1993, Kai et al. 2008).

Chrysophyceae neboli zlativky jsou charakteristické svou zlatohnědou barvou, která je způsobená přítomností většího množství fukoxantinu v jejich plastidech, které obsahují i chlorofyl *a*, *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub>. Kromě autotrofní výživy u nich nalezneme také mixotrofii (plastid nesoucí buňka se přiživuje osmotrofně či fagotrofně). V případě, že mají plastid, který nenese žádné pigmenty (leukoplast) a jejich buňka neobsahuje chloroplast, mohou se živit i heterotrofně (*Paraphysomonas*). Primárně se zástupci této třídy vyskytují ve sladkých vodách, ale jsou známy i mořské druhy. V rámci této třídy nalezneme jedince s pohyblivými i nepohyblivými buňkami či koloniemi. Jejich buňky mohou být holé nebo kryté pouzdrem z křemičitých šupin. Důležitou adaptační schopností je pro ně endogenní tvorba silifikovaných klidových stádií, tzv. stomatocyst (Graham & Wilcox 2000). Toto odpočívací stádium nabízí širší možnosti disperze (Kristiansen 2000).

Choi et al. (1992) se ve své studii zabývali vnitrodruhovou variabilitou psychrofilního (chladnomilného) heterotrofního bičíkovce *Paraphysomonas imperforata*. Zkoumali působení teploty na růstovou rychlost buněk a denzitu populací. Izoláty pocházely ze Severního ledového oceánu, kde se teploty vody v průběhu roku pohybují pod 2°C a z Conception Bay (Newfoundland) v Atlantickém oceánu s teplotami nad 5°C. V laboratorních podmínkách jim byl zajištěn přísun potravy a byl zkoumán jejich růst v rozmezí teplot -1,5, 6 a 15°C. S rostoucí teplotou se zvyšoval i populační růst, růstové rychlosti byly však pro obě populace specifické. Velikost buněk se v různých teplotách signifikantně lišila. Buňky z izolátu z Conception Bay byly větší při nejnižších teplotách a ve vyšších teplotách se nacházely buňky výrazně menší. Arktický vzorek měl sice také největší buňky v teplotě -1,5°C, ale teplejší podmínky způsobily jen malý pokles velikosti. V porovnání s populací z Conception Bay ukázala Arktická populace celkově větší růstovou rychlost při nízkých teplotách. Z tohoto výsledku je patrná její adaptace na chladnější podmínky. Rozdíly mezi oběma populacemi byly vysvětleny jako diference geneticky odlišných ekotypů, neboť obě populace si tyto vlastnosti zachovaly po celé dva roky v laboratoři.

### 4.3. Synurophyceae

Synurophyceae jsou jednobuněční nebo koloniální sladkovodní bičíkovci. Stejně jako předešlá třída vytvářejí endogenně odpočívající stadia – stomatocysty. Na rozdíl od Chrysophyceae postrádají chlorofyl *c*<sub>2</sub> a nejsou schopni fagotrofie. Jejich buňky jsou kryty křemičitými šupinami a ostny (Andersen 1987, Graham & Wilcox 2000).

Struktura křemičitých šupin je hlavní determinační znak pro určování druhů. V posledních letech je ale jasné, že tento způsob určování není zcela dostačující, neboť morfologická

variabilita je u zástupců třídy Synurophyceae častým jevem. Šupiny se mohou lišit nejen mezi jednotlivými populacemi, ale také podle svého postavení na buňce (Neustupa et al. 2010). Tato široká variabilita vedla mnoho autorů k popisování nových forem a variet v rámci druhu (Siver 1987, 1988). U *Synura petersenii* dokonce podněcuje návrhy, zda by se nemohlo jednat o druhový komplex. Tento předpoklad je podpořen studií Kynčlová et al. (2010), ve které byla odhalena variabilita ITS regionu a byla za pomoci morfometrických metod porovnána s odlišností stavby šupin. K podobnému závěru došli na základě proteinové a multigenové analýzy i Boo et al. (2011). Vnitrodruhovou genetickou variabilitu objevili u *S.petersenii* i Wee et al. (2001), ale bohužel nesledovali korelaci s morfologickými rozdíly jednotlivých kmenů. Níže popsaná široká variabilita v rámci tohoto druhu může tedy podporovat skutečnost, že se jedná o pseudokryptický druhový komplex.

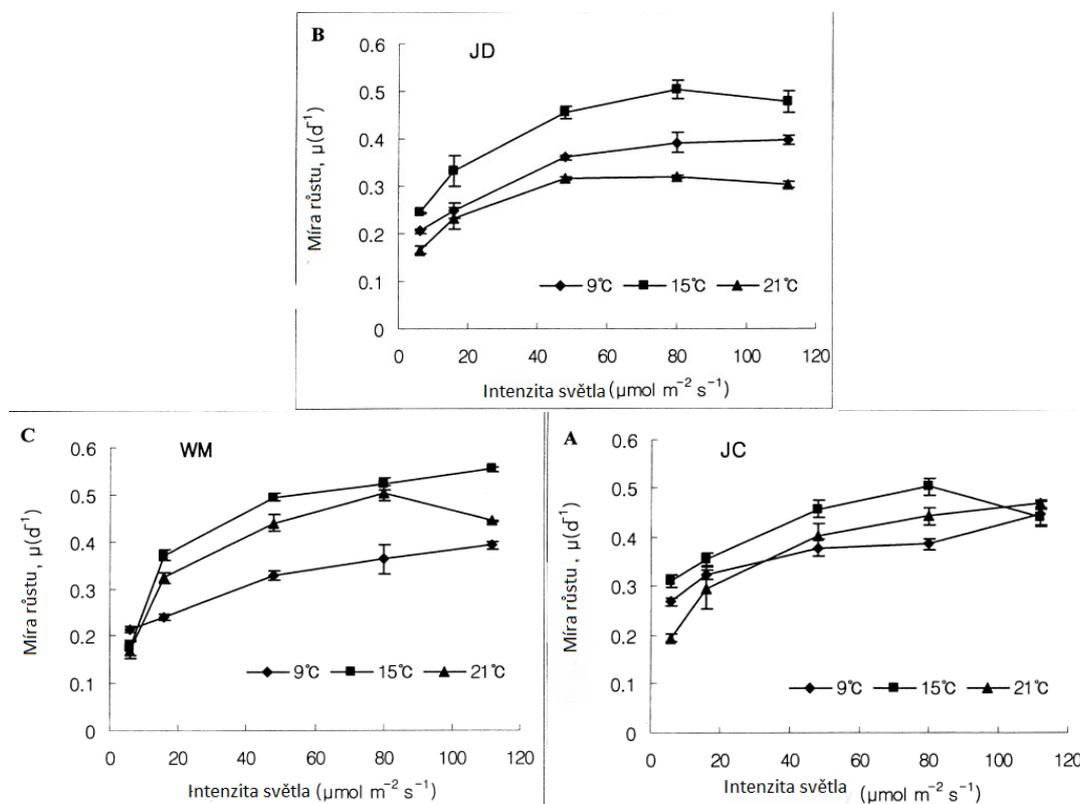
Řada studií se zabývala působením různých faktorů na buňky chrysomonád a u mnoha z nich prokázali přímý vliv na jejich fyziologii a morfologii. Mezi tyto vlivy patří například teplota, intenzita světla, hodnota pH, stáří kultury a koncentrace některých živin (dusík, křemík). Diskutuje se zejména o tom, zda jsou kmenově specifické rozdíly důkazem existence forem druhu nebo jen projevem fenotypové plasticity či genetické diferenciacie ekotypů (Martin-Wageman et al. 1995, Sandgren et al. 1996).

#### **4.3.1. Vliv teploty**

Přímý vliv teploty na růstovou rychlost izolátů (Saxby-Rouen et al. 1997), velikost a tvar šupin (Němcová et al. 2010, Pichrtová & Němcová 2011) byl testován na několika druzích třídy Synurophyceae. Bylo prokázáno, že teplota v kombinaci s intenzitou světelného záření ovlivňuje morfologii a velikost šupin *Synura echinulata* (Němcová et al. 2010). Tento druh se vyskytuje na velmi odlišných biotopech s širokou ekologickou tolerancí. Pozorované rozdíly ve vlastnostech šupin jsou podle autorů projevem neadaptivní fenotypové plasticity, neboť vzrůstající fenotypová plasticita koreluje se stresem (Ghalambor et al. 2007). Při zastínění kombinovaném se snížením teploty se v kultuře objevily i stomatocysty (Němcová et al. 2010).

Podle Kim et al. (2008) je u *Synura petersenii* teplotou a intenzitou dopadajícího světelného záření ovlivněna fyziologická variabilita. Působení těchto faktorů zkoumali v laboratorních podmínkách na vzorcích s odlišným sezónním obdobím vodního květu. Pozorovali, jakým způsobem ovlivňuje teplota rychlost populačního růstu. Teplotní optimum bylo pro růst všech kmenů stejné (15°C), ale populace se lišily rychlostí růstu v jednotlivých teplotách. Znatelné

rozdíly mezi růstem populací byly pozorovány ve vnímání různých intenzit světelného záření v souvislosti s teplotou (obr. 2).



Obr. 2. Grafy zobrazují kmenově specifické rozdíly kmenů JC, JD a WM na intenzitě světelného záření při působení tří různých teplot. Upraveno podle Kim et al. (2008).

Pozorované rozdíly mezi růstovými rychlostmi populací jsou podle autorů pravděpodobně důkazem adaptace na lokální podmínky. Ale jak již bylo zmíněno, *Synura petersenii* je pravděpodobně komplexem druhů, proto může být sledovaná variabilita vysvětlena tímto faktem.

Kmenově specifické rozdíly v růstu populací u *Mallomonas caudata* byly pozorovány u klonálních kultur ze vzorků izolovaných z pěti přírodních lokalit v Koreji (Lee & Kim 2007). Jednotlivé kmeny se lišily nejen teplotním optimem pro populační růst, ale také teplotou, při které byla pozorována maximální růstová rychlost buněk. Zatímco při teplotě 21°C dva ze tří kmenů vykazovaly nízkou denzitu populací a růstovou rychlost, třetí populace zažívala teplotní optimum. Zajímavá byla též skutečnost, že optimum bylo pro všechny tři kmeny ve vyšších teplotách, než ve kterých se pohybovali v přírodě (Lee & Kim 2007).

Závislost na teplotě a stáří kultury objevili Martin-Wagemann et al. (1995) u *Synura petersenii*. V laboratorních podmínkách zkoumali tři klony z přírodních vzorků a odhalili



kmenově specifické změny v délce i šířce šupin v závislosti na stáří kultury. Tyto rozdíly umožňují rozeznávání dvou forem tohoto druhu - *S. petersenii* f. *petersenii* a *S. petersenii* f. *glabra*. Třetí kmen byl označen jako přechodná forma, se stářím se však přibližoval morfologii *S. petersenii* f. *glabra*. V závislosti na teplotě nebyly změny tak výrazné, ale opět byly zhodnoceny jako kmenově specifické (Martin-Wagemann et al. 1995).

U většiny zástupců třídy Synurophyceae je teplota důležitá především pro populační růst (Kim et al. 2008, Lee & Kim 2007). Při vytvoření světelného a teplotního stresu může ovlivňovat i morfologické vlastnosti (Němcová et al. 2010).

#### **4.3.2. Vliv pH**

Lee & Kim (2007) objevili při výzkumu zabývajícím se variabilitou růstu tří různých druhů *Mallomonas* rozdíly v růstových rychlostech tří klonálních kultur u druhu *Mallomonas caudata*. Jednotlivé kmeny se signifikantně lišily růstovými rychlostmi v závislosti na hodnotě pH.

Vlivem hodnoty pH na rychlosti růstu tří izolovaných populací *Synura petersenii* se zabývali Kim et al. (2008). Rozdíly mezi izoláty byly jen nepatrné, ale jedna populace zastavila růst v pH 8,2, přičemž ostatní dvě populace v růstu pokračovaly až do pH 8,5 (Kim et al. 2008). Obecně je za limitní hodnotu pro růst *S.petersenii* považováno pH v rozsahu 8,0 - 8,4 (Saxby-Rouen et al. 1997).

Gavrilova et al. (2005) pozorovali změny v morfologii *Synura petersenii* při kultivaci v kyselém (pH 5,5) a alkalickém (pH 8,5) médiu a porovnávali nastalé odchylky mezi dvěma kmeny. Morfometrická analýza odhalila změny v délce a šířce šupin při působení stresových podmínek. V kyselém prostředí byly šupiny obou kmenů kratší, užší a méně silifikované. Při vysokých hodnotách pH docházelo k celkové redukci a deformaci šupin, přičemž jeden kmen reagoval o mnoho citlivěji, než kmen druhý. Z tohoto pokusu je jasně patrný přímý vliv pH na morfologii šupin *S. petersenii*. Typ změn byl závislý na příslušnosti ke konkrétnímu kmenu. Hodnoty pH ovlivňují zejména distribuci chrysomonád (Siver & Hamer 1989). Působí tedy i na populační růst (Lee & Kim 2007, Kim et al. 2008) a extrémní hodnoty mohou způsobovat změny v morfologii šupin (Gavrilova et al. 2005).

#### **4.3.3. Vliv koncentrace živin v prostředí**

Přímý vliv křemíku a dalších látek na morfologii, fyziologii a silikátový metabolismus chrysomonád byl v minulosti několikrát testován (Klaveness & Guillard 1975, Sandgren & Barlow 1989, aj.). Ze studií je patrné, že koncentrace křemíku v okolí zásadním způsobem

ovlivňuje morfologii šupin chrysomonád, ale nijak nesnižuje životaschopnost jejich buněk. Je dokonce navrhováno, že jsou schopny nahrazovat křemík látkami s podobnými chemickými vlastnostmi (Klaveness & Guillard 1975).

Kim et al. (2009) se zabýval závislostí populačního růstu na koncentracích dusičnanů a křemičitanů u *Mallomonas caudata*. Jednotlivé populace rozdílně odpovídaly na měnící se koncentrace dusičnanů v experimentálních podmínkách. Koncentrace křemičitanů neměly na růstovou rychlost signifikantní efekt. Variabilita je pravděpodobně kmenově specifickou adaptací na environmentální faktory.

Sandgren et al. (1996) pozorovali, jak působí změny v hladinách křemíku na morfologii šupin *Synura petersenii*. Zjistili, že koncentrace tohoto prvku má na morfologii rozhodující vliv. Ornamentace šupin se s klesající hladinou křemíku v médiu měnila. Docházelo k postupné redukci šupin a nakonec až ke vzniku nahých buněk. Tento proces byl ovšem reverzibilní. Již 2 hodiny po přidání křemíku do média začaly buňky vytvářet nové šupiny. Během tohoto pokusu byly na *Synura petersenii f. petersenii* pozorovány šupiny, které připomínaly ornamentace šupin jiných forem *S. petersenii*. Nabízele by se možnost, že morfologická variabilita v přírodních populacích je z větší části výsledkem křemíkového stresu a nejedná se tedy pravděpodobně o oddělené taxony (Sandgren et al. 1996). Existence forem tohoto druhu je diskutovaným tématem a je často zpochybňována (Martin-Wagemann et al. 1995).

Morfologické rozdíly mezi populacemi *Mallomonas caudata* objevili Řezáčová & Škaloud (2005). Za pomoci transmisní elektronové mikroskopie porovnávali vzorky ze čtyř lokalit ze dvou oblastí v Irsku. Šupiny jednotlivých populací se lišily především svojí šířkou. Podle autorů mohou být tyto rozdíly způsobeny odlišnou dostupností křemíku na jednotlivých lokalitách nebo dobou zkoumání v závislosti na vývoji buňky.

Je zřejmé, že tato třída zahrnuje mnoho fenotypově plastických druhů. Některé výzkumy naznačují, že by se mohlo jednat o skutečnou adaptaci na lokální podmínky a tedy i diferenciaci ekotypů. Většinou jsou tyto závěry jen předmětem diskuze a nejsou nijak empiricky ověřeny.

#### **4.4. Bacillariophyceae (rozsivky)**

Rozsivky jsou jednobuněčné organismy žijící samostatně nebo v koloniích. Jejich buňky jsou kryty křemičitou schránkou. Jedná se o specifickou strukturu (frustula), jenž se skládá ze dvou částí – epitéky a hypotéky, které do sebe zapadají. Svrchní plocha schránky se nazývá epivalva, spodní hypoalva. Při dělení buněk během nepohlavního rozmnožování dochází vždy k dotvoření druhé poloviny a tím logicky k postupnému zmenšování vzniknuvších

jedinců. Původní velikost může být obnovena až pohlavním rozmnožením (Chepurnov 2008, Graham & Wilcox 2000). Některé druhy produkují nebezpečné neurotoxiny, které mohou způsobovat závažná onemocnění (Mos 2001).

Rozsivky zahrnují mořské i sladkovodní zástupce a jsou pravděpodobně druhově nejbohatší skupinou řas, přičemž jejich diverzita je v současné době značně podceněna (Mann 1999). Mají zásadní podíl na globálním cyklu uhlíku a křemíku (Brzezinski et al. 1998) a na rozdíl od dvou předešlých tříd jsou Bacillariophyceae na dostupnosti křemíku závislé (Sandgren 1996). Jsou stále více užívány k ekologickému monitoringu a paleoekologickým rekonstrukcím (Bennion et al. 1999, Juggins & Cameron 1999). Navzdory jejich aplikovanému využití a nutnosti rozlišit toxické a netoxické druhy, je druhová taxonomie rozsivek poněkud chaotická a postrádá praktický koncepční základ (Round et al. 1990). Ukazuje se, že determinační hranice, byly pravděpodobně vymezeny příliš široce a mnoho druhů patrně obsahuje reprodukčně izolované jednotky, které mají ve skutečnosti hodnotu samostatného druhu. Morfologická diverzita je často následkem fyziologické diferenciaci, která je způsobena dělením buněk a jinými variacemi v rámci životního cyklu (Cerino et al. 2005, Joint et al. 1987, Mann 1999). U přírodních populací lze pozorovat polymorfismus či fenotypovou plasticitu, neboť jednotlivé části buňky jsou tvořeny v jinou dobu a pravděpodobně i za odlišných podmínek. K výzkumu polymorfismu a fenotypové plasticity mohou být nápomocny tzv. Janusovy buňky, které mají odlišnou morfologii epivalvy a hypoalvy (Mann 1999).

Od určování druhů dle morfologických parametrů se tedy přechází k využití tzv. *Waltonian species concept* (Mann 1999). Jedná se o komplexnější a méně teoretické pojetí druhového konceptu, které pracuje s údaji o morfologii, genetické variabilitě, fyziologii, reprodukčním systému i sexuální kompatibilitě. Je ideálním způsobem k odhalení kryptické a pseudokryptické diverzity a jemnějšímu vymezení druhů (Behnke et al. 2004, Lundholm et al. 2006, Mann 1999, Vanomerlingen et al. 2008). Bližší znalost genetické organizace populačních jednotek v rámci druhu by také mohla ozřejmit potenciální speciální mechanismy rozsivek a tím i jejich evoluční minulost (Ryner et al. 2009).

#### **4.4.1. Vliv faktorů prostředí**

U rozsivek je často patrna fyziologická i morfologická variabilita závislá na různých faktorech prostředí. Získaná data o této rozmanitosti mohou pomoci k odhalování pseudokryptických druhů. Ty někdy vykazují vnitrodruhové odlišnosti zejména ve fyziologických vlastnostech, jako je reakce na různé teploty, hodnoty salinity a koncentrace

živin (Balzano et al. 2011, Créach et al. 2006, Mann 1999, Thessen et al. 2009). Byl zaznamenán výrazný vliv prostorové dostupnosti křemíku na morfologii rozsivek (Shimada & Tanimura 2006). Teplota může zase značně ovlivňovat některé jejich fyziologické vlastnosti, jako je například populační růstová rychlost a případně i obsah kyseliny domoikové (DA) (Santiago-Morales & García-Mendoza 2011).

Morfologická i fyziologická variabilita je u rozsivkových druhů neuvěřitelně široká. Není však vždy ověřeno, zda se skutečně jedná o variabilitu v rámci jednoho druhu. Proto se dále budu zabývat spíše komplexnějšími studii rozsivek, které zahrnují aplikaci více metod a dávají do souvislostí širší škálu dat.

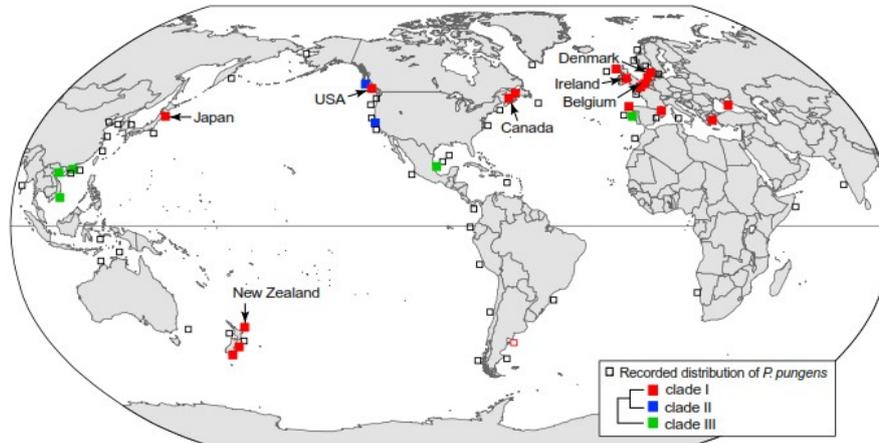
#### **4.4.2. Diferenciace populací ověřená více metodami**

Díky problematickému vymezení druhů rozsivek je obtížné identifikovat vnitrodruhovou variabilitu. Ale při použití kombinace více metod je odhalení diferenciace populací v rámci druhů možné.

U bentické sladkovodní rozsivky *Sellaphora capitata* byl využitím mikrosatelitových markerů a ITS sekvencí zjištěn vysoký stupeň genetické diferenciace mezi populacemi, který pravděpodobně souvisí se sníženou schopností šíření buněk. Nejdříve byla pomocí morfologických parametrů a molekulárních metod ověřena totožnost 70 kmenů *S. capitata* z jezer ze Skotska, Belgie, Velké Británie a Austrálie. Izoláty ze všech lokalit byly sexuálně kompatibilní. Populace byly zřetelně diferencované a analýza v programu STRUCTURE napomohla zobrazení klastrů, které odpovídaly místu výskytu izolátů. Bylo pozorováno lehké promíšení populací, které bylo ovšem pravděpodobně způsobeno náhodnou introdukcí (např. vliv člověka) (Evans et al. 2009). Objevení geneticky odlišených populací u sladkovodních rozsivek není z hlediska nesporné separace jednotlivých vodních útvarů příliš překvapivým faktem. O mnoho zajímavější je tvorba geneticky strukturovaných populací u mořských druhů, které by v kompaktní vodní ploše teoreticky mohly vykazovat větší schopnost disperze.

Genetická a morfologická variabilita s přihlédnutím k reprodukční izolaci byla zkoumána u 193 kmenů *Pseudo-nitzschia pungens*, které byly geneticky rozlišeny do tří fylogenetických skupin označovaných jako *clade I*, *II*, a *III* (Casteleyn et al. 2008). Tyto kmene mají status variet, ale na základě genetických a morfologických nespojitostí by pravděpodobně mohly být označovány jako nezávislé druhové linie (Casteleyn et al. 2010, 2008). *Clade I* a *II* byly geneticky velmi dobře odlišené a genetické rozdíly mezi nimi korelovaly s mírnou morfologickou odlišností. Byl zaznamenán příležitostný výskyt hybridů *clade I* a *II*

ve společné zóně jejich výskytu, což naznačuje nekompletní reprodukční izolaci (Casteleyn et al. 2009a). *Clade III* nemohl být porovnán s ostatními ve všech parametrech, neboť byla k dispozici jen molekulární data. U *clade II* a *III* byl zjištěn omezený geografický výskyt, přičemž *clade I* vykazoval kosmopolitní rozšíření v temperátních vodách Atlantického oceánu a Pacifiku (Casteleyn et al. 2008). (obr. 3)

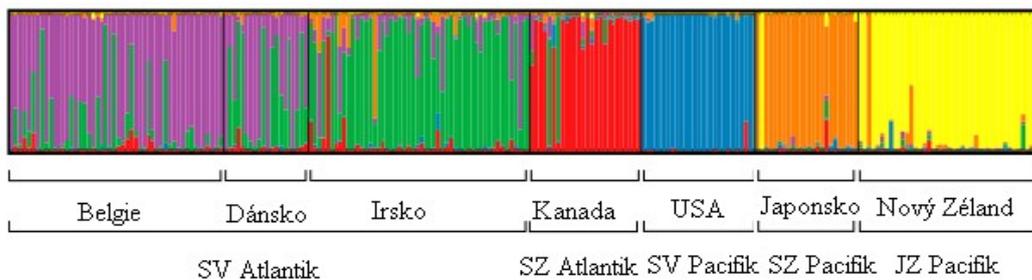


Obr. 3. Geografická distribuce *Pseudo-nitzschia pungens*. Prázdné čtverečky naznačují identifikaci kmenů založenou pouze na morfologii. Barevné značky značí izoláty ověřené na základě sekvenování DNA. Šípkami jsou označena místa, odkud byly vzorky použity k další analýze. (Casteleyn et al. 2010)

Diverzifikace a geografická distribuce *clade I* a *II* a jejich výskyt na společných oblastech může být vysvětlen dvěma způsoby (i) obě linie se vyvíjely sympatricky podél severovýchodního pobřeží Pacifiku (ii) došlo k sekundárnímu kontaktu alo- a parapatricky diferencovaných linií (Casteleyn et al. 2010). Pravděpodobnější se zdá druhá varianta, neboť mezi oběma *clade* je patrně možná hybridizace (Casteleyn et al. 2009a) a také byly nalezeny ve stejných vzorcích (Adams et al. 2009), což indikuje absenci ekologické diference (Casteleyn et al. 2010). To hovoří proti sympatrické speciaci asociované s ekologickými mechanismy (Bolnick & Fitzpatrick 2007).

Casteleyn et al. (2010) se zaměřili na *clade I*. Příslušnost k jednomu druhu byla ověřena na základě shodnosti ITS a *rbcL* sekvencí u všech jedinců z geograficky vzdálených oblastí (Casteleyn et al. 2008, 2009a). Na základě dalších molekulárních analýz bylo určeno, že se nejedná o jednu globální panmiktickou populaci (Casteleyn et al. 2010).

Zatímco v rámci Severního moře *Pseudo-nitzschia pungens* populační strukturu nevykazuje (Evans et al. 2005, Casteleyn et al. 2009b), ve větším geografickém měřítku se ukázala restrikce genového toku. Analýza v programu STRUCTURE odhalila šest genetických klastrů indikujících jasnou genetickou strukturu jednotlivých skupin izolátů. (obr. 4)



Obr. 4. Strukturální *plot* pro  $K = 6$ . Každý izolát je zastoupen vertikální čarou, které jsou rozděleny do  $K$  barevných sekcí. Jednotlivé segmenty reprezentují příslušnost izolátů ke konkrétním populacím, které jsou odděleny šedou linií. Upraveno podle Casteleyn et al. (2010).

Omezené promíchávání populací v globálním měřítku může být způsobeno existencí pre- a postkolonizačních bariér (Marshall et al. 2010). Z výsledků studie ale spíše vyplývá, že se jedná o prekolonizační bariéru. To znamená, že problém tkví patrně v disperzním potenciálu, neboť genetické rozdíly jsou závislé na vzdálenosti. Není zcela vyloučeno, že určitou roli mohou hrát i ekologické bariéry například v podobě nevyhovujících teplot, neboť *clade I* se vyskytuje výhradně v temperátních pobřežních oblastech. Vysvětlením pro sníženou možnost zaoceánského šíření *Pseudo-nitzschia pungens* je fakt, že pro průběh svého životního cyklu vyžaduje specifické podmínky a nemá možnost tvorby odolných stádií (Casteleyn et al. 2010). Výsledky populační studie *P. pungens* tedy naznačují, že přetrvávající omezený genový tok geograficky oddělených populací může i navzdory obrovským populačním velikostem vést k diferenciaci populací, alopatrické speciaci a vysoké rozmanitosti planktonních organismů (Casteleyn et al. 2010).

Metapopulační struktury odhalené u rozsivky *Dytilum brightwelli* mohou také naznačovat potenciální mechanismus speciace způsobený sníženou hladinou genového toku (Ryneaerson et al. 2009). U *D. brightwelli* byly geneticky diferencované populace objeveny opakovaně (Ryneaerson et al. 2006, Ryneaerson & Armbrust 2004).

K podobnému závěru došli i Evans et al. (2004), kteří se zabývali potenciálně velmi rozšířenou planktonní rozsivkou *Pseudo-nitzschia multiseriis*. Populace se lišily jak geneticky, tak některými fyziologickými vlastnostmi, přičemž u nich byla potvrzena vzájemná interfertilita.

Geograficky separované populace *Skeletonema marinoi* z Gullmar Fjordu a z otevřeného moře podrobili molekulární analýze Godhe et al. (2010). Mikrosatelitové markery odhalily jednu endogenní populaci *S. marinoi* z fjordu, která se výrazně lišila od ostatních z volného moře. Do analýzy zahrnuli nejen planktonní jedince, ale i bentická klidová stádia z Fjordu. Planktonní populace se od bentické neodlišovala. V průběhu roku ovšem byla zaznamenána lehká genetická variace mezi planktonními populacemi. Vysvětlením může být potenciální

přítomnost geneticky diferencovaných subpopulací uvnitř fjordu, které se během sezóny liší v dominanci.

O tom, že populace nemusí být odděleny jen prostorově, ale i časově svědčí výzkum Ryneerson & Armbrust (2004), kteří zaznamenali výskyt geneticky odlišných populací. Tyto populace měly specifické fyziologické vlastnosti a tvořily vodní květ za rozdílných environmentálních podmínek na stejném území (Ryneerson & Armbrust 2004).

K obdobným výsledkům dospěli i D'Allelio et al. (2009), kteří zjišťovali molekulární variabilitu mezi časově oddělenými vodními květy *Pseudo-nitzschia multistriata*. Všechny tři kmeny byly geneticky diferencované, morfologicky identické, ale zároveň sexuálně kompatibilní, což vylučuje přítomnost kryptických druhů.

V průběhu roku mohou tedy v rámci velmi malého území dominovat různé geneticky a fyziologicky diverzifikované populace. Tato adaptace zajistí postupně sukcesi více skupinám jednoho druhu v závislosti na sezónních podmínkách (Saravan & Godhe 2010).

Fyziologické a genetické přizpůsobení jednotlivých populací, které chtějí uspět na stejném území, je jeden z příkladů potenciální sympatrické speciace.

Z výsledků výzkumů týkajících se tvorby odlišených populací u rozsivek vyplývá, že jejich schopnost šíření je navzdory jejich malé velikosti a časté schopnosti tvorby odolných stádií pravděpodobně omezena. To platí patrně jak pro sladkovodní, tak pro mořské druhy (Evans et al. 2009, Casteleyn et al. 2010). V případě objevení genetické diferenciace u populací na stejném území hraje roli především nutnost časového oddělení vodních květů (D'Allelio et al. 2009).

#### **4.5. Phaeophyceae (chaluhy)**

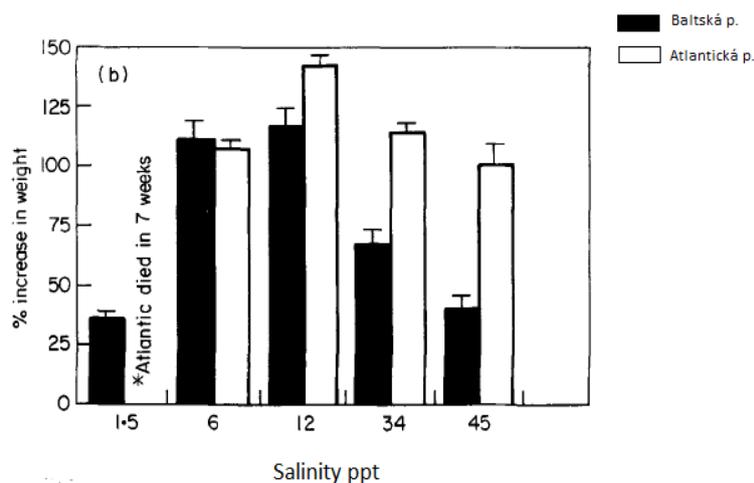
Chaluhy jsou mnohobuněčné, většinou mořské řasy s vláknitou nebo parenchymatickou stélkou. Jejich chloroplasty obsahují chlorofyl *a*, *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub>, fukoxantin a violaxantin. Pro životní cyklus chaluh je typická rodozměna, tedy střídání stádia gametofytu a sporofytu (Adl et al. 2005). U některých zástupců byla navíc zjištěna schopnost fotosyntézy pro jednotlivá stádia cyklu (vaječné buňky, antherozoidy, zygota, embryo), délka jejich samostatného přežívání a tím i možný odhad disperzního potenciálu (McLachlan et al. 1978).

Tato třída obsahuje rody, které jsou známy svou fenotypovou plasticitou (Wernberg et al. 2005, Peckol et al. 1988, Cousens 1982), u některých bylo potvrzeno, že se jedná o geneticky determinovanou variabilitu (Peckol & Ramus 1985, Yoshida et al. 2004, Kopcak et al. 1991). Na vnitrodruhovou variabilitu může mít vliv hodnota salinity, expozice vlnám i mnoho dalších faktorů.

#### 4.5.1. Vliv salinity

Podle Jordan et al. (1972) má na morfoložickou vnitrodruhovou variabilitu *Fucus vesiculosus* vliv hodnota salinity. Při porovnání populací z několika stanovišť s odlišnými hodnotami byly nalezeny rozdíly ve větvení a míře vezikulace. S klesající salinitou se zvyšovala míra vezikulace a intenzita větvení.

Bäck et al. (1992) se zaměřili na přímý vliv salinity na růst chaluhy *Fucus vesiculosus*. Zkoumali populace z Baltského moře (nízká a stabilní hodnota salinity) a v Atlantiku (vyšší hodnoty salinity). Byly řešeny dvě základní otázky, v první řadě (i) zda je růstová rychlost jedinců Baltské a Atlantické populace diametrálně odlišná (ii) jestli je růst rozdílně ovlivněn rozsahem hodnot salinity. Po dobu 11 týdnů byla v laboratorních podmínkách zkoumána reakce jednotlivých populací na gradient salinity. Obě populace vykazovaly maximální růst v 12‰. Pro baltskou populaci se ale ukázaly být v průměru vhodnější nižší hodnoty salinity, přičemž atlantická populace prosperovala lépe ve vyšších hodnotách. Prokázaly tedy adaptaci na své přirozené prostředí. Jedinci atlantické populace měli celkově rychlejší růst (až na hodnoty 1,5‰, při kterých se jejich růst zastavil, a docházelo k odumření). (obr. 5)



Obr. 5. Procentuální zvětšení ( $\pm$  SE) rozměrů stélky jedinců atlantické a baltické populace *Fucus vesiculosus* po 11 týdnech růstu v rozmezí hodnot salinity 1,5 - 45‰ (upraveno podle Bäck et al. 1992).

V obecném měřítku z této studie může vyplývat nedostatečná přizpůsobivost atlantické populace pro růst v podmínkách se sníženou salinitou. Baltická populace je o něco flexibilnější – sice průměrně nedosahuje takových růstových rychlostí, ale je schopná přežít i v nízkých hodnotách salinity (Raven & Samuelsson 1988). Nabízí se tedy vysvětlení, že se může jednat o ekotypovou diferenciaci (Bäck et al. 1992).



#### 4.5.2. Vliv expozice vlnám

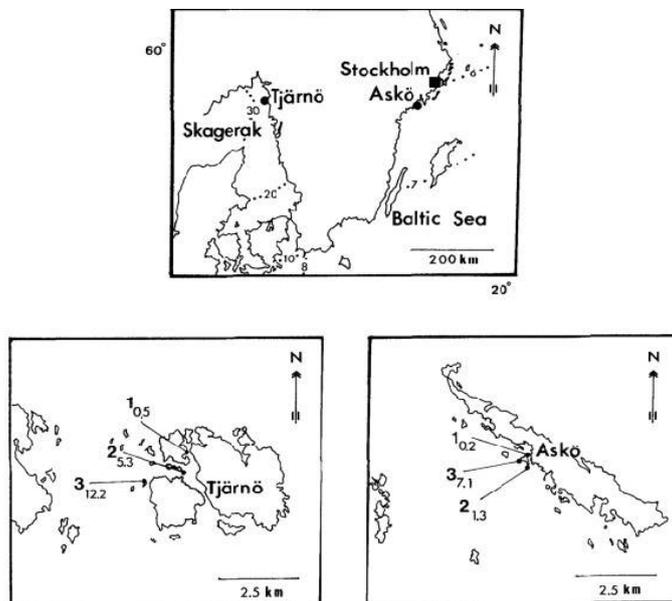
Vnitrodruhová variabilita je vcelku běžným jevem u chaluhy *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). Peckol et al. (1988) u tohoto organismu sledovali dvě sousedící populace na Rhode Island (pobřeží Atlantiku). Jedna populace se nacházela v subtidální zóně (pod linií odlivu) a druhá v zóně intertidální (zóna mezi přílivem a odlivem). Zjistili, že se zástupci jednotlivých populací výrazně liší koncentracemi pigmentů v tkáních. V těchto faktorech byly pozorovány rozdíly nejen mezi populacemi, ale také docházelo ke změnám v průběhu sledování (sezónní proměnlivost).

Při tomto výzkumu ekofyziologických vlastností byla zaznamenána morfologická variabilita mezi oběma populacemi, na něž působily rozdílné ekologické faktory. Jedinci populace ze subtidální zóny byli výrazně drobnější a vysoce větvené (Peckol et al. 1988).

Cousens (1982) zjistil, že výše zmíněné morfologické a fyziologické rozdíly jsou zapříčiněny vystavením působení vln o různých intenzitách. Tento faktor má z hlediska morfologie vliv na délku internodií, hmotnost a tvar receptákulí. Z fyziologického pohledu ovlivňuje koncentraci chlorofylu *a*, *c* a fukoxantinu. Optimální růstové křivky (a tedy největší délky internodií) dosahují rostliny v místech, kde je střední intenzita vlnění. Mechanický efekt vlnění sice do jisté míry limituje intenzitu porostu, ale chemicko-fyzikální efekt středního stupně expozice vlnám je pro růst řas ideální. Stejně tak hmotnost receptákulí koreluje s délkou internodií rostlin. Koncentrace fotosyntetických pigmentů stoupá s rostoucí intenzitou vlnění. Předmětem diskuze se stává fakt, zda je působení vln jediným faktorem, který ovlivňuje tyto rozdíly v morfologii a fyziologii chaluhy *Ascophyllum nodosum*. Zvýšená pozornost byla věnována efektu zastínění, avšak v souvislosti s ním nebyla s mírou růstu internodií pozorována prokazatelná korelace. U velikosti receptákulí je ovšem patrné, že plné denní světlo má spíše negativní vliv na jejich růst, neboť větší velikosti dosahují ty ze zastíněných míst. Koncentrace pigmentů se zvyšuje v závislosti na snižující se intenzitě světelného záření (Cousens 1982). Důležitým faktorem pro variabilitu koncentrace jednotlivých pigmentů fotosyntézy mezi populacemi je tudíž i hloubka, ve které se populace nacházejí (Peckol & Ramus 1985).

Ve studii Kalvas & Kautsky (1993) zjistili variaci morfologie populací u chaluhy *Fucus vesiculosus*. Výzkum byl zaměřen na populace nacházející se v geograficky vzdálených oblastech. Byly vybrány populace z ekologicky odlišných stanovišť, lišících se zejména salinitou – z Baltského moře v Askö (nízké a stabilní hodnoty salinity 5-7‰) a ze západního pobřeží Severního moře ve švédském Tjarnö (vyšší a kolísavé hodnoty salinity mezi 15‰ a 30‰ během roku). Na každém ze stanovišť autoři zvolili tři lokality pro sběr vzorků, aby porovnali vliv stresu a disturbance na vnitropopulační morfologickou variabilitu

(viz obr. 6). Cílem výzkumu bylo posoudit vliv ekologických faktorů, zejména expozice vln a salinity na morfologii mezi populacemi a v rámci populací *Fucus vesiculosus*. Konkrétně na velikost a hmotnost individuí, šířku stélky, intenzitu větvení a na počet a hmotnost receptákulí.



Obr. 6. Na mapách jsou vyznačena stanoviště obou studovaných populací (mapa nahoře) a spodní mapky ukazují místa sběru v rámci jednotlivých populací. (Kalvas & Kautsky 1993)

Nejvýraznější vnitropopulační rozdíly byly zjištěny v závislosti na intenzitě mořského vlnění. Hlavní efekt tohoto faktoru byl u obou stanovišť velmi podobný. Se zvyšující se disturbancí (tj. s rostoucí intenzitou vlnění) se nejen délka, ale i váha rostlin snižovala a zmenšovala se též hustota větvení. To znamená, že rostliny, které byly více vystaveny vlnám, měly na rozdíl od těch více chráněných sníženou plochu odporu (Wernberg et al. 2005).

Zjištěné morfologické rozdíly jsou pravděpodobně ovlivňovány přímým působením ekologických faktorů. Jsou patrně odpovědí na stres a disturbance, tedy projevem fenotypové plasticity. Vzhledem ke geografickému oddělení obou populací a následnému možnému omezení genového toku nemohla být zcela vyloučena genetická intraspecifická diferenciací (Kalvas & Kautsky 1993).

V minulosti se objevila podezření, že morfologické změny zdánlivě způsobené intenzitou expozice skutečně mohou souviset s ekotypovou diferenciací (de Paula & de Oliviera 1982). Časné molekulární studie zabývající se chaluhou *Costaria costata* sice nepotvrdily genetickou variabilitu u populací s morfologickou diferenciací, která prokazatelně koreluje se změnami expozice vln (Bhattacharya et al. 1989), ale genetickému odlišení populací u rodu *Fucus* může

napovídá skutečnost, že některé druhy mají vysoký stupeň samooplození, čímž je do jisté míry limitován genový tok (McLachlan et al. 1971).

Efekt intenzity mořského vlnění na morfologii řas nelze zcela zobecnit. Výše uvedené signifikantní výsledky mohou být způsobeny malou velikostí pásma, na kterém byla studie prováděna nebo srovnáváním malého počtu lokalit. Při provedení komplexnější studie na větším měřítku nebyla u chaluhy *Ecklonia radiata* zjištěna statisticky signifikantní korelace konkrétních morfologických změn s intenzitami vlnění. Reakce na stejnou intenzitu expozice byla například u dvou různých populací zcela opačná. Jediný rys, ve kterém se všichni zástupci druhu *E. radiata* shodovali, byla změna laterální šířky rostliny v závislosti na síle vlnění. Ve všech ostatních měřených morfologických charakteristikách byl způsob formování téměř na každé z lokalit jiný (Wernberg et al. 2005). Je jisté, že vlnění má na morfologii řas dílčí vliv (Rice et al. 1985). Důležitý je ovšem také charakter vlnění, které je velmi komplexním jevem. Mimo to je výsledná morfologická variabilita závislá na mnoha ekologických procesech typických pro danou lokalitu (Wernberg et al. 2005) a je spíše projevem fenotypové plasticity (Fowler-Walker et al. 2006).

#### **4.5.3. Ekotypová (genetická) diference**

Intenzita expozice vln může mít podle Peckol et al. (1988) na svědomí i obsah dusíku v tkáních chaluhy. U řasy *Macrocystis pyrifera* byla zjištěna souvislost tohoto jevu s diferenciací ekotypů. Zástupci geograficky izolovaných populací *M. pyrifera* byli od stádia spor kultivováni v jednotných laboratorních podmínkách, aby se zamezilo možné adaptaci juvenilů na jejich domácí prostředí. I přesto populace, která pocházela z habitatu s nízkou koncentrací dusíku, měla tendenci hromadit prvek v tkáních ve větší míře než ostatní populace a v nižších experimentálních koncentracích dusíku vykazovala rychlejší růst (Kopczak et al. 1991). K podobnému závěru došli i Espinoza & Chapman (1983), kteří se zabývali řasou *Laminaria longicruris*. Na základě výzkumu přírodních vzorků v laboratoři objevili geneticky podmíněné rozdíly v příjmu dusíku u dvou populací *L. longicruris*, přičemž výzkum obohatili o křížící experiment obou populací, kterým potvrdili jejich interfertilitu. Pozorované rozdíly byly rovněž vyhodnoceny jako ekotypová diference. Na přítomnost ekotypů upozorňují i výzkumy týkající se variability v přítomnosti pigmentů v tkáních *Sargassum filipendula* (Peckol & Ramus 1985) a variability v období maturace *Sargassum horneri* (Yoshida et al. 2004).

V posledních letech se mnoho vědců zaměřilo na přímý výzkum genetické variability u vybraných druhů chaluhy za pomoci molekulárních metod (Engelen et al. 2001, Hoarau et al.

2007, Tatarenkov et al. 2007, Zhao et al. 2007, aj.). S ohledem na již zjištěné poznatky o morfologické a fyziologické variabilitě chaluh se snažili poodhalit potenciální genetické strukturace populací a to za použití jiných metod než přímého pozorování kultur v laboratoři, křížících experimentů a recipročního přesazování. Za pomoci molekulárních markerů zkoumali míru genetické odlišnosti nejen v závislosti na fenotypové variabilitě populací (Engelen et al. 2001, Henkel et al. 2007, Miller et al. 2000, aj.), ale pozorovali i korelaci genetické diference s geografickou vzdáleností (Alberto et al. 2011, Zhao et al. 2007, aj). Vycházeli z již zmíněného předpokladu, že většina druhů Phaeophyceae má velmi nízký disperzní potenciál. Jejich propagule se za normálních okolností zřídka šíří do vzdáleností, které by překročily řády metrů (Kendrick & Walker 1995). Z toho důvodu bude míra genového toku mezi vzdálenými populacemi omezena a bude docházet k rozdílům ve frekvenci alel.

Engelen et al. (2001) se zaměřili na genetickou diverzitu a prostorovou genetickou strukturu u *Sargassum polyceratum*. Vybrali několik ekologicky odlišných stanovišť v okolí ostrova Curacao. Sběry probíhaly v různých hloubkách na návětrné i závětrné straně ostrova. Vzhledem k odlišným morfologickým a fyziologickým formám na jednotlivých místech sběru očekávali přítomnost ekotypové diference. Za využití RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) byla mezi stanovišti v jednotlivých zálivech (cca 25km) objevena signifikantní genetická diference. Jedinci se ovšem lišili i mezi místy sběru v rámci zálivu (cca 150-200m). Tato variabilita na malém měřítku by mohla potvrzovat ekotypovou diferenciaci, neboť populace nacházející se v odlišných hloubkách vykazovaly fyziologické rozdíly. Korelaci genetické a fenotypové variability potvrdila i molekulární studie na řase *Pelagophycus porra*. RAPD data potvrdila genetickou diferenciaci mezi řasami z ekologicky odlišně situovaných stanovišť, které se lišily i morfologickými vlastnostmi (Miller et al. 2000).

Na genetickou diferenciaci související s geografickou vzdáleností narazili Zhao et al. (2007) u *Sargassum muticum* ze Shadong Peninsula v Číně. Pomocí RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) a ISSR (*intersimple sequence repeat*) byla objevena genetická diference mezi populacemi a nízká genetická diverzita v rámci populací. Tyto rozdíly mezi jednotlivými populacemi byly pravděpodobně způsobeny jejich geografickou separací (Zhao et al. 2007).

K podobným výsledkům dospěli i Tatarenkov et al. (2007), kteří zkoumali míru genetické odlišnosti několika populací *Fucus vesiculosus* ze Skagerrak (Severní moře) a z Baltského moře. Populace v Baltském moři se navíc lišily reprodukční strategií – některé se

rozmnožovaly na podzim, jiné v létě. Byla zde tedy velká pravděpodobnost reprodukční separace v těchto obdobích. Vědci předpokládali, že se míra genetické diferenciace bude zvyšovat se vzdáleností a vyšší míru genetické odlišnosti očekávali od populací s rozdílným reprodukčním obdobím.

Nakonec byl naplněn pouze první předpoklad – míra genetické diferenciace rostla úměrně se vzdáleností, ale neukázalo se, že by rozdílné rozmnožovací strategie měly na genetickou variabilitu vliv. I když by se mohlo zdát, že pro mořské řasy bude větším problémem bariéra ve formě pevniny, výsledky tohoto výzkumu naznačují, že se genetické rozdíly zvyšují čistě se vzdáleností, nezávisle na tom, zda populace dělí volné moře nebo část pobřeží (Tatarenkov et al. 2007).

Genetické rozdíly korelující s geografickou vzdáleností byly objeveny i u řasy *Fucus serratus* (Coyer et al. 2003). Byly zkoumány populační struktury podél pásma rozšíření v Severní Evropě a bylo zjištěno, že se genetická diferenciace zvětšuje se vzdáleností lokalit. Minimální velikost panmiktické populace pro *F. serratus* byla odhadnuta na 0,5-2km. Na menším měřítku (do 100m) nebyly zjištěny signifikantní genetické rozdíly. Studie rovněž odhalovala rozdíly v alelické diverzitě jednotlivých lokalit, přičemž vysoká genetická diverzita Britského regionu naznačovala možnost, že by se mohlo jednat o refugium (Coyer et al. 2003).

Touto problematikou se dále zabývali Hoarau et al. (2007) a na základě mtDNA objevili geneticky diverzifikované skupiny *Fucus serratus*, charakteristické přítomností endemických haplotypů. Jejich rozmístění a genetická struktura s nejvyšší pravděpodobností mapuje distribuci glaciálních refugií. K největší expanzi *F. serratus* došlo patrně v období před posledním glaciálním maximem. V důsledku zalednění tedy zřejmě vznikla nejméně tři refugia, jejichž rekolonizační trasy jsou v této studii naznačeny. Nejdůležitější z hlediska následného šíření po oteplení je refugium v jihozápadním Irsku. Jeho rekolonizační cesta se táhne po celém severním pobřeží, což je patrné z genetické příslušnosti tamních populací. Britské ani Iberské refugium patrně nehrálo v postglaciální expanzi tak zásadní roli. Šíření z nich mohlo být omezeno nevhodnými podmínkami (Hoarau et al. 2007). Existence Britského refugia byla již dříve navrhována na základě studie využívající mikrosatelitových markerů. Nebylo ovšem zcela objasněno, zda se skutečně jedná o refugium nebo jestli je vysoká genetická diverzita způsobena spíše promíšením odlišných rekolonizačních událostí (Coyer et al. 2003).

Z výsledků studií zabývajících se genetickou diferenciací závislou na geografické vzdálenosti vyplývá, že chaluhy mají relativně omezenou disperzní schopnost. Ovšem i přes předpokládané minimální rozšíření (cca 2m) od mateřské rostliny (Kendrick & Walker 1995)

se zdá, že skutečný disperzní potenciál je u většiny zástupců větší (Coyer et al. 2003). Existují ale i druhy s extrémně nízkou schopností disperse spor, u kterých je genetická diferenciace patrná již v rozpětí několika metrů. Například u řasy *Postelsia palmaeformis* byla zjištěna extrémně nízká schopnost šíření propagulí a genetická diferenciace byla patrná již mezi populacemi vzdálenými 5m (Kusumo et al. 2006). Dále je častým výsledkem korelace míry genetické variability s fenotypovým odlišením, což naznačuje omezený genový tok mezi populacemi a tedy i zvýšenou pravděpodobnost, že se jedná o ekotypy (Engelen et al. 2011, Miller et al. 2000).

#### **4.6. Dictyochophyceae**

Jedná se o jednobuněčné nebo koloniální bičíkovce, kteří se převážně vyskytují v chladných mořských vodách. Někteří obývají i sladkovodní habitaty (Graham & Wilcox 2005). Třída Dictyochophyceae zahrnuje čtyři řády, a to Dictyochales, Pedinellales, Rhizochromulinales (Adl et al. 2005) a Florenciellales (Edwardsen et al. 2007).

V rámci třídy Dictyochophyceae lze nalézt druhy s autotrofní, heterotrofní i mixotrofní výživou. Jejich chloroplast obsahuje chlorofyl *a*, *c<sub>1</sub>*, *c<sub>2</sub>* a fukoxantin (Graham & Wilcox 2005).

Záznamy o jejich vnitrodruhové variabilitě jsou bohužel jen útržkovité. Na morfologické odlišnosti mezi populacemi *Distephanus speculus* narazili Tsuitsui et al. (2009). Rozdíly v obvodu bazálního kroužku dělily vzorky signifikantně do dvou skupin. Při zahrnutí více morfologických parametrů byla ovšem odhalena variabilita i v rámci pozorovaných populací. Ve studii zabývající se primárně odlišením dvou druhů *Pseudochattonella veruculosa* a *Pseudochattonella facimen*, byla u *P. facimen* odhalena vnitrodruhová genetická variabilita. Kmeny pocházely z odlišných vodních květů izolovaných v různých obdobích. Sedm kmenů *P. facimen* se shodovalo v sekvencích LSU rDNA, *cox1* i *rbcL* – náležely tedy jednomu druhu. Dva molekulární markery ukázaly polymorfismus, přičemž odlišnost ITS rDNA regionů byla větší než u rDNA SSU regionu (Riisberg & Edwardsen 2008).

#### **4.7. Raphidophyceae**

Zástupci třídy Raphidophyceae jsou relativně velcí (30 - 80µm) jednobuněční bičíkovci. Někteří se ovšem mohou vyskytovat v podobě masy nepohyblivých buněk zanořených do slizu. Jejich chloroplast obsahuje chlorofyl *a*, *c<sub>1</sub>*, *c<sub>2</sub>* a v některých případech i fukoxantin.

Obývají sladkovodní i mořské ekosystémy. Někteří zástupci této skupiny jsou zodpovědní za tzv. *red tide*, toxické vegetační zbarvení vody (Graham & Wilcox 2000).

Pro předpověď výskytu těchto nebezpečných vodních květů je vhodné znát fyziologické požadavky a míru fenotypové plasticity jednotlivých druhů, které *red tide* tvoří. Efekt teploty, salinity a intenzity světelného záření se často odráží na růstových vlastnostech, pohyblivosti a morfologii buněk (Khan et al. 1995, Yamaguchi et al. 1997).

Na fenotypovou plasticitu *Chattonella marina* se zaměřili Marshall & Haellegraeff (1999). Porovnávali kmeny z Austrálie a z Japonska. Oba kmeny měly přibližně stejné fyziologické požadavky a jejich tolerance hodnot salinity a teploty byla poměrně široká. U Australského kmene byla objevena adaptace na výrazně vyšší světelnou intenzitu, přičemž takto výrazně odlišný fenotyp se zachoval po celou dobu kultivace. Tato schopnost australského kmene pravděpodobně vede k jeho výraznějším projevům v intenzitě vodního květu na australských pobřežích (Marshall & Haellegraeff 1999). Genetické odlišení jednotlivých kmenů nebylo diskutováno. Tato možnost však nemůže být zcela vyloučena, neboť genetická variabilita byla v rámci rodu *Chattonella* objevena u druhu *Chattonella ovata*, který se rovněž z velké části podílí na tvorbě *red tide* v Japonsku (Nishitani et al. 2007).

Fenotypová variace závislá na teplotě byla pozorována u temperátního bičíkovce *Fibrocapsa japonica*. Tři kmeny izolované z Japonska, Nového Zélandu a Německa se lišily svou přizpůsobivostí na testovaný rozsah teplot. Japonský kmen prokázal vysoký stupeň adaptace na svůj klimatický region. Naproti tomu kmen z německého Wattensee nebyl schopen přežít v teplotách nižších než 4 °C. K přečkání těchto podmínek musí ve svém domácím prostředí pravděpodobně vytvořit odolná stádia. Novozélandský kmen akceptoval mnohem větší rozsah teplot, než jaký ve své lokalitě potřebuje (de Boer et al. 2005). Vnitrodruhová genetická variabilita byla u tohoto druhu studována Kooistra et al. (2001). Zjištěné drobné rozdíly ovšem neodpovídají výše uvedené ekofyziologické variabilitě (de Boer et al. 2005). Nízká genetická variabilita může být způsobena sekundárním kontaktem izolovaných populací. Sexuální rozmnožování u *F. japonica* zatím není známo, ale snížený stupeň genetické variability může podporovat hypotézu o jeho existenci. (Kooistra et al. 2001).

Přítomnost ekotypů u druhu *Heterosigma akashiwo* popsali Frederickson et al. (2011) ze vzorků izolovaných na SZ pobřeží Tichého oceánu. Jednotlivé kmeny posuzovali z několika pohledů a našli rozdíly zejména ve velikosti buněk, maximálním růstu, toleranci salinity, míře fotosyntézy, toxických účincích na predátora *Strombidinopsis acuminatum* a příjmu různých druhů aminokyselin. Ve shodě s dřívějšími výsledky nebyly mezi kmeny objeveny rozdíly v ITS sekvencích (Connell 2000), ale při porovnání chloroplastových genomů byla

nalezena variabilita, která korelovala s fyziologickými rozdíly. Výskyt ekotypů pravděpodobně souvisí s místem izolace a načasováním vodního květu. Izoláty byly pořízeny během dvou let ze sezónně rozdílně situovaných vodních květů. Jednotlivé geneticky odlišné kmeny vykazovaly rozdíly v míře fotosyntézy, příjmu látek a růstové rychlosti. U jednoho z kmenů dokonce nebyly pozorovány toxické účinky na přirozeného predátora. (Frederickson et al. 2011).

Podmínky životního prostředí značným způsobem ovlivňují toxicitu a populační růst zástupců třídy Raphidophyceae a tím i tvorbu škodlivých vodních květů (Ono et al. 2000, Haque & Onoue 2002). Informace o ekotypové diferenciaci jsou proto velmi důležité, neboť napomáhají objasnit konkurenceschopnost jednotlivých ekotypů a usnadňují predikci *red tide*.

#### **4.8. Eustigmatophyceae**

Tato skupina je pojmenována podle extraplastidiálního stigmatu, které je umístěno v apikální části pohyblivých stádií. Byla vyčleněna z třídy Xanthophyceae na základě výrazné ultrastrukturální odlišnosti zoospor a specifického tvaru pyrenoidu u vegetativních buněk (Hibbert & Leedale 1971). Jedná se o jednobuněčné kokální obligátně fotoautotrofní řasy, jejichž zástupce nalezneme ve sladkovodních, mořských i terestrických habitatech. Jejich chloroplast má velmi charakteristické složení pigmentů, obsahuje pouze chlorofyl *a* (Graham & Wilcox 2000, Whittle & Casselton 1975).

U druhu *Nannochloropsis limnetica* byl zaznamenán výskyt fyziologicky odlišených ekotypů (Fietz et al. 2005). Kmeny byly izolovány z jezera Bajkal a byly porovnávány s dříve nalezeným kmenem z malého vodního tělesa ve vnitrozemí Německa. Zajímavostí je, že tento druh byl v minulosti nalezen pouze ve zmiňovaném jezírku v Německu a dále v malém jezeře v Severní Americe. Molekulárními metodami byla ověřena druhová příslušnost nově nalezených kmenů. Poté byla pomocí RAPD-PCR detekována genetická vnitrodruhová variabilita mezi Bajkalskými kmeny a byla zjištěna též odlišnost od kmene z Německa. Ekofyziologické rozdíly mezi jednotlivými kmeny spočívaly především v růstových rychlostech závislých na teplotě a požadavcích na přísun vitaminů. Kmeny se rovněž odlišovaly v obsahu mastných kyselin (Fietz et al. 2005).

Výskyt různých ekotypů u *N. limnetica* může být odpovědí na skutečnost, že se vyskytuje ve všech ročních obdobích. Největší rozvoj byl ovšem zaznamenán spíše v teplejších vodách začátkem léta (Fietz et al. 2005). To je v kontrastu s kmeny ze Severní Ameriky, které prokázaly adaptaci na chladnější podmínky (Fawley et al. 2004).



## 5. Závěr

Ochrophyta jsou velmi rozmanitá a heterogenní skupina. Některé třídy jsou viditelně více prozkoumané, což je způsobeno zejména jejich ekologickou a ekonomickou důležitostí. Vznik toxických vodních květů je většinou závislý na podmínkách prostředí (Ono et al. 2000, Haque & Onoue 2002), a proto je dobré tyto podmínky detailně znát, aby se předešlo nepříjemným následkům. U některých skupin informace o diferenciaci populací zcela chybí. To může být způsobeno skutečností, že se jedná o příliš mladou skupinu (např. Aureanophyceae) nebo o třídu obsahující velmi malý počet druhů (např. Synchronophyceae, Schizocladiphyceae).

Vzhledem k nabídnutému přehledu existujících informací týkajících se diferenciaci populací je jasné, že odchylky v morfologických parametrech, fyziologii a genetice jsou ovlivňovány celou řadou faktorů.

Velkou roli hraje především disperzní potenciál, který má vliv na interakci populací. Ten ale bohužel není možné striktně predikovat, neboť podléhá náhodným mechanismům a je omezován často ne zcela zřejmými bariérami (Foissner 2008, Weisse 2008). Dále lze říci, že některé okruhy variability jsou u většiny skupin ovlivňovány ekologickými faktory (Lee & Kim 2007, aj.). Takto způsobené odlišnosti mohou být matoucí při snaze přesné determinace druhů, která je pro odhalení vnitrodruhové variability nezbytná.

Zejména studium populací protistních organismů je brzděno druhovým konceptem založeným na malém množství morfologických znaků. Při kombinaci více metod výzkumu proto můžeme často narazit na skutečnost, že skupina dříve klasifikovaná jako druh je vlastně komplexem druhů (Kynčlová et al. 2010). Vzhledem k tomu, že u některých potenciálně toxických druhů je důležitá jejich přesná determinace a výzkum vnitrodruhové variability, bylo by vhodné používat k jejich určení data zahrnující širší škálu informací (Mann 1999).

Je jasné, že nelze u všech druhů aplikovat kombinace všech dostupných metod, například kvůli neznámému způsobu pohlavního rozmnožování. Tento fakt by ale neměl být významnou překážkou. Obecně by bylo žádoucí, kdyby se u více skupin začalo pracovat s kombinací většího množství dat týkajících se genetické variability, morfologie a fyziologie. Případně zahrnout do těchto souvislostí dostupné poznatky o reprodukční izolaci, frekvenci sexuálního rozmnožování a míře genového toku. Souhrn těchto dat by do značné míry přispíval k osvětlení evolučních mechanismů speciace v rámci konkrétních druhů. Došlo by k jasnějšímu ohraničení a vymezení druhů, které je v případě některých skupin velmi zamlžené. Komplexnější přístup by rovněž mohl poodhalit diverzitu protistních organismů, která zůstává stále z větší části skryta.

## Literatura:

- Adams, N. G., Trainer, V. L., Rocap, G., Hervik, R., Hauser, L.** (2009) Genetic population structure of *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) from the Pacific Northwest and the North Sea. *Journal of Phycology*, 45:1037–1045.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standrige, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. & Taylor, M. F. J. R.** (2005), The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52: 399-451.
- Alberto F, P T Raimondi, D C Reed, J R Watson, D A Siegel, S Mitarai, N Coelho, E A Serrao** (2011) Isolation by oceanographic distance accounts for high proportion of genetic differentiation for *Macrocystis pyrifera* in the Santa Barbara Channel. *Molecular Ecology*, 20(12), 2543–2554.
- Alpermann, T., Beszteri, B., John, U., Tillmann, U., Cembella, A. D.** (2009) Implications of life-history transitions on the population genetic structure of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Molecular Ecology*, 18:2122–2133.
- Alpert, P. & Simms, E. L.** (2002) The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology*, 16:285–297.
- Alverson A. J.** (2008): Systematics and the Diatom Species. *Protist*, 159: 339 – 353.
- Alverson A. J., Cannone J.J., Gutell R.R., Theriot E.C.** (2006): The evolution of elongate shape in diatoms. *Journal of Phycology*, 42: 655 – 668.
- Amsler, C. D., Neushul, M.** (1991) Photosynthetic physiology and chemical composition of spores of the kelps *Macrocystis pyrifera*, *Nereocystis lutkeana*, *Laminaria farlowii*, and *Pterygophora californica* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, 27:26-34.
- Andersen, R. A.** (1987) Synurophyceae classis nov., a new class of algae. *American Journal of Botany*, 74: 337-353.
- Arrontes, J.** (1993), Nature of the distributional boundary of *Fucus serratus* on the north shore of Spain. *Marine Ecology Progress Series*, 93:183-193.
- Bäck, S., Collins, J. S., Russel, G.** (1992), Effects of Salinity on Growth of Baltic and Atlantic *Fucus vesiculosus*. *British Phycological Journal*, 27:39-47.
- Balzano, S., Sarno, D., Kooistra, W. H. C** (2011) Effects of salinity on the growth rate and morphology of ten *Skeletonema* strains. *Journal of Plankton Research*, 33(6): 937-945.
- Bass, D., Richards, T. A., Matthai, L., Marsh, V. a Cavalier-Smith, T.** (2007): DNA evidence for global dispersal and probable endemism of protozoa. *BMC Evolutionary*, 7:162-175.
- Behnke A., Friedl T., Chepurinov, V.A., Mann D.G.** (2004): Reproductive compatibility and rDNA analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 40:193-208.
- Bennion, H., Sayer, C. D., Tibby, J., Carrick, H. J.** (1999) Diatoms as a indicators of enviromental change in shallow lakes. In Stoermer, E. F. & Smol, J. P. 1999. The Diatoms. Applications for the Environmental and Earth Sciences. *Cambridge University Press*, Cambridge, 152-173.
- Berger, R., Malm, T., Kautsky, L.** (2001) Two reproductive strategies in Baltic *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). *European Journal of Phycology*, 36:265-273.
- Beszteri, B.** (2005) Morphometric and molecular investigations of species limits in *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyceae) and closely related species. Dissertation zur Erlangung des Akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften, Der Universität Bremen
- Bhattacharya, D., Druehl, L. D.** (1989) Morphological and DNA sequence variation in the kelp *Costaria costata* (Phaeophyta). *Marine Biology*, 102:15-23.

- Bolnick, D., Fitzpatrick, B.** (2007) Sympatric Speciation: Models and Empirical Evidence. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38:459-487.
- Boo, S.M., H.S. Kim, W. Shin, G.H. Boo, Cho, S.M., Jo, B. Y, Kim, J.-H-, Kim, J. H., Yang, E. C., Silver, P.A., P. Wolfe, A. P., Bhattacharya, D. , Andersen, R., Yoon, H. S.** (2010): Complex phylogeographic patterns in the freshwater alga *Synura* provide new insights on ubiquity versus endemism in microbial eukaryotes, *Molecular Ecology* 19: 4328–4338.
- Bradshaw, A. D. & Hardwick, K.** (1989) Evolution and stress-genotypic and phenotypic components. *Biological journal of the Linnean Society*, 37:137-155.
- Brzezinski, M., Villareal, T. A., Lipschultz, F.** (1998) Silica production and the contribution of diatoms to new and primary production in the central North Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 89:104-199.
- Casteleyn G., Adams N.G., Vanormelingen, P., Debeer A., Sabbe K., Vyverman W.** (2009a): Natural hybrids in the marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): genetic and morphological evidence, *Protist*, 160:343-354.
- Casteleyn G., Chepurnov, V.A., Leliaert F., Mann D.G., Bates S.S., Lundholm N., Rhodes L., Sabbe K., Vyverman W.** (2008): *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): A cosmopolitan diatom species? *Harmful Algae*, 7: 241 – 257.
- Casteleyn, G., Evans, K. M., Backeljau, T., D'hondt, S., Chepurnov, V. A., Sabbeand, K., Vyverman, W.** (2009b) Lack of population genetic structuring in the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) in a heterogeneous area in the Southern Bight of the North Sea. *Marine Biology*, 156:1149–1158.
- Casteleyn, G., Leliaert, F., Backeljau, T., Debeer, A., Kotaki, Y., Rhodes, L., Lundholm, N., Sabbe, K., Vyverman, W.** (2010) Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29):12952-12957.
- Cavalier-Smith, T. & Chao, E.E.Y.** (2006): Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). *Journal of Molecular Evolution*, 62:388-420.
- Cavalier-Smith, T.** (1993). Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Review*, 57:953-994.
- Cerino, F., Orsini, L., Sarno, D., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Zingone, A.** (2005) The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae*, 4:33-48.
- Chepurnov, V.A., Mann, D.G., von Dassow, P., Vanormelingen, P., Gillard, J., Inzé, D., Sabbe, K. & Vyverman, W.** (2008): In search of new tractable diatoms for experimental biology. *BioEssays*, 30: 692-702
- Choi, J. W., Peters, F.** (1992) Effects of Temperature on Two Psychrophilic Ecotypes of a Heterotrophic Nanoflagellate, *Paraphysomonas imperforata*. *Applied and environmental microbiology*, 58(2):593-599.
- Connell, L. B.** (2000). Nuclear ITS region of the alga *Heterosigma akashiwo* (Chromophyta: Raphidophyceae) is identical in isolates from Atlantic and Pacific basins. *Marine Biology*, 136:953–60.
- Cousens, R.** (1982). The Effect of Exposure to Wave Action on the Morphology and Pigmentation of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis in South-Eastern Canada. *Botanica Marina*, 25:191-195.
- Coyer, J.A., Peters, A.F., Stam, W.T., Olsen, J.L.** (2003) Post-Ice Age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Fucaceae; Phaeophyta) populations in Northern Europe. *Molecular Ecology*, 12:1817–1829.
- Créach V., Ernst A, Sabbe K., Vanelslander B., Vyverman W., Stal L.J.** (2006): Using quantitative PCR to determine the distribution of a semicryptic benthic diatom, *Navicula phyllepta* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology*, 42: 1142 – 1154.

- D'Alelio, D., Amato, A., Kooistra, W., Procaccini, G., Casotti, R., Montresor, M.** (2009) Internal Transcribed Spacer Polymorphism in *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in the Gulf of Naples: Recent Divergence or Intraspecific Hybridization? *Protist*, 160:9-20.
- de Boer, K., Koolmees, E. M., Vrieling, E. G., Breeman, van Rijssel, M.** (2005) Temperature responses of three *Fibrocapsa japonica* strains (Raphidophyceae) from different climate regions. *Journal of Plankton research*, 27(1):47-60.
- de Jong, G.** (2004) Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytologist*, 166:101-118.
- de Paula, E. J., de Oliveira, E. C.** (1982) Wave exposure and ecotypical differentiation in *Sargassum cymosum* (Phaeophyta – Fucales). *Phycologia*, 21(2):145-153.
- Edelaar, P., Piersma, T., Postma, E.** (2005) Retained non-adaptive plasticity: gene flow or small inherent costs of plasticity? *Evolutionary Ecology Research*, 7:489-495.
- Edvardsen, B., Eikrem, W., Shalchian-Tabrizi, K., Riisberg, I., Johnsen, G., Naustvoll, L. & Thronsen, J.** (2007): *Verrucophora farcimen* gen. et sp. nov. (Dictyochophyceae, Heterokonta) – a bloom-forming ichthyotoxic flagellate from the Skagerrak, Norway. *Journal of Phycology*, 43: 1054-1070.
- Engelen, A., Olsen, J., Breeman, A., Stam, W.** (2001) Genetic differentiation in *Sargassum polyceratum* (Fucales: Phaeophyceae) around the island of Curaçao (Netherlands Antilles), *Marine Biology*, 139(2):267-277.
- Espinoza, J., Chapman, A. R. O.** (1983) Ecotypic differentiation of *Laminaria longicuris* in relation to seawater nitrate concentration. *Marine Biology*, 74:213-218.
- Evans, K. M., Kuhn, S. F., Hayes, P. K.** (2005) High levels of genetic diversity and low levels of genetic differentiation in North Sea *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) populations. *Journal of Phycology*, 41:506-514.
- Evans, K., Bates, S., Medlin, L. K. & Hayes, P. K.** (2004) Microsatellite marker development and genetic variation in the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 40:911-20.
- Evans, K.M., Chepurnov, C., Sluiman, H. J., Thomas, S. J., Spears, B. M., Mann, D. G.** (2009) Highly Differentiated Populations of the Freshwater Diatom *Sellaphora capitata* Suggest Limited Dispersal and Opportunities for Allopatric Speciation. *Protist*, 160:386-396.
- Fawley, K. P., Fawley, M. W.** (2007) Observations on the Diversity and Ecology of Freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with Descriptions of New Taxa. *Protist*, 158:325-336.
- Fietz, S, Bleiss, W, Heperle, D., Koppitz, H., Krienitz, H, Nicklisch, A.** (2005) First record of *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) in the autotrophic picoplankton in lake Baikal. *Journal of Phycology*, 41:780-790.
- Finlay, B. J.** (2002): Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, 296, 1061-1063.
- Finlay, B. J., Fenchel, T.** (2004): Cosmopolitan metapopulations of free-living microbial eukaryotes. *Protist*, 155:237-244.
- Fischer M, Husi R, Prati D, Peintinger M, Kleunen M, Schmid B.** (2000) RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, 87(8):1128-1137.
- Foissner, W.** (1997): Soil ciliates (Protozoa: Ciliophora) from evergreen rain forests of Australia, South America and Costa Rica: diversity and description of new species. *Biology Fertility of Soils*, 25:317-339.
- Foissner, W.** (2006): Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozoologica*, 45:111-136.
- Foissner, W.** (2008): Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodiversity and Conservation*, 17:235-242.

- Fowler-Walker, M. J., Wernberg, T., Connel, S. D.** (2006) Differences in kelp morphology between wave sheltered and exposed localities: morphologically plastic or fixed traits? *Marine Biology*, 148:755-767.
- Fredrickson, K. A., Strom, S. L., Crim, R., Coyne, K. J.** (2011) Interstrain Variability in Physiology and Genetics of *Heterosigma Akashiwo* (Raphidophyceae) From the West Coast of North America. *Journal of Phycology*, 47:25-35.
- Gavrilova, O. V., Nogina, N. V. & Voloshko, L. N.** (2005): Scale structure and growth characteristics of *Synura petersenii* (Synurophyceae) under different pH conditions. *Nova Hedwigia Beiheft*, 128: 249-256.
- Ghalambor, C. K., McKay, J. K., Carrol, S. P., Reznick, D. N.** (2007) Adaptive versus non adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, 21:394-407.
- Godhe, A., Harnström, K.** (2010) Linking the planktonic and benthic habitat: genetic structure of the marine diatom *Skeletonema marinoi*. *Molecular Ecology*, 19(20):4478-4490.
- Graham, L.E. & Wilcox, L.W.** (2000): Algae. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey., 640 pp
- Haque, S. M. & Onoue, Y.** (2002). Effects of salinity on growth and toxin production of a noxious phytoflagellate, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Botanica Marina*. 45:356–63.
- Harvell, C. D.** (1990) The ecology and evolution of inducible defenses. *The quarterly review of biology*, 65(3):323-340.
- Henkel, S. K., Hofmann, G. E., Whitmer, A. C.** (2007) Morphological and genetic variation in *Egredia menziesii* over a latitudinal gradient, *Botanica Marina*. 50:159-170.
- Hewitt, G. M.** (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role, in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58:247-276.
- Hibberd, D.J. & Leedale, G.F.** (1971): A new algal class – the Eustigmatophyceae. *Taxon* 20: 523-525.
- Hoarau, G., Coyer, J. A., Veldsink, J. H., Stam, W. T., Olsen, J. L.** (2007) Glacial refugia and recolonization pathways in the brown seaweed *Fucus serratus*. *Molecular Ecology*, 16:3606-3616.
- Holsinger, K. E., Weir, B. S.** (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating, and interpreting  $F_{ST}$ . *EEB Articles*. Paper 22.
- Inglesias-Rodríguez, M. D., Schofield, O. M., Batley, J., Medlin, L. K., Hayes, P. K.** (2006) Intraspecific genetic diversity in the marine coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae): the use of microsatellite analysis in marine phytoplankton studies. *Journal of Phycology*, 42:526–536.
- Innes, D. J.** (1984) Genetic differentiation among populations of marine algae. *Helgoländer Meeresunters*, 38:401-417.
- Joint, I. R., A.J. Pomroy, G.A. Robinson, R.J. Morris, M.J. McCartney** (1987): Morphological changes in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) during a spring bloom in a marine ecosystem enclosure, *British Phycological Journal*, 22(2):119-124
- Jordan, A. J., Vadas, R. L.** (1972) Influence of environmental parameters on intraspecific variation in *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology*, 14(3):248-252.
- Juggins, S. & Cameron, N. G.** (1999) Diatoms and archeology. In Stoermer, E. F. & Smol, J. P. 1999. The Diatoms. Applications for the Environmental and Earth Sciences. *Cambridge University Press*, Cambridge, 514-522.
- Kai, A., Yoshii, Y., Nakayama, T. & Inouye, I.** (2008): Aurearenophyceae classis nova, a new class of Heterokontophyta based on a new marine unicellular alga *Aurearena cruciata* gen. et sp. nov. inhabiting sandy beaches. *Protist* 159: 435-457

- Kalvas, A., Kautsky, L.** (1993) Geographical variation in *Fucus vesiculosus* morphology in the Baltic and North Seas. *European Journal of Phycology*, 28(2):85-91.
- Kameyama Y, Isagi Y, Nakagoshi, N.** (2001) Patterns and levels of gene flow in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* revealed by microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 10(1):205-216.
- Kendrick, G. A., Walker, D.** (1995) Dispersal of propagules of *Sargassum* spp. (Sargassaceae: Phaeophyta): Observations of local patterns of dispersal and consequences for recruitment and population structure, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 192:273-288.
- Khan, S., Arakawa, O., Ouhne, Y.** (1995) Effects of Physiological Factors on Morphology and Motility of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Botanica Marina*, 38:347-353.
- Kim, J. H., Lee, K. L., Kim, H. S.** (2009) Effect of nutrients and light intensity on growth of *Mallomonas caudata* (Synurophyceae), *Nordic Journal of Botany*, 27:516-522.
- Kim, J. H., Shin, M. O., Lee, K. L., Kim, H. S.** (2008) Effect of environmental conditions on the growth of *Synura petersenii* (Synurophyceae) in vitro and two eutrophic water bodies in Korea. *Nova Hedwigia*, 86:(3-4):529-544.
- Klaveness, D. & Guillard, R.R.L.** (1975): The requirement for silicon in *Synura petersenii*. *Journal of Phycology*, 11:349-55.
- Kooistra, W. H. C. F., De Boer, M. K., Vrieling, E. G., Connell, L. B., Gieskes, W. W. C.** (2001) Variation along ITS markers across strains of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) suggests hybridisation events and recent range expansion. *Journal of Sea Research*, 46:213–222.
- Kopczak, C. D., Zimmerman, R. C., Kremer, J. N.** (1991) Variation in nitrogen physiology and growth among geographically isolated populations of the giant kelp, *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). *Journal of Phycology*, 27:149-158.
- Kristiansen, J.** (2000) Cosmopolitan chrysophytes. *Systematics and Geography of Plants*, 70(2):291-300.
- Kusumo, H. T., Pfister, C. A., Wootton, J. T.** (2006) Small-scale genetic structure in the sea palm *Postelsia palmaeformis* Ruprecht (Phaeophyceae), *Marine Biology*
- Kynčlová, A., Škaloud, P., Škaloudová, M.** (2010): Unveiling hidden diversity in the *Synura petersenii* species complex (Synurophyceae, Heterokontophyta), *Nova Hedwigia Beiheft* 136: 283-298.
- Lee, K. L., Kim, H. S.** (2007) Growth characteristics of three synurophytes (*Mallomonas* species) at different temperatures and pH. *Nova Hedwigia*, 84:227-240.
- Lowe A., Harris S. & Ashton P.** (2004): Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application.
- Lundholm, N., Moestrup, R., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C., Miller, P.** (2006): Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) illustrated by rDNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *Journal of Phycology*, 42:464 – 481.
- Mallet, J.** (2007): Species, Concepts of, in: S. A. Levin (ed.) *Encyclopedia of Diversity*, Academic Press, Princeton University, New Jersey, U.S.A., pp 1-15
- Mann, D. G.** (1999): The species concept in diatoms, *Phycologia*, 38:437-495.
- Marshall, D. J., Monro, K., Bode, M., Keough, M. J., Swearer, S.** (2010) Phenotype-environment mismatches reduce connectivity in the sea. *Ecological Letters*, 13:128–140.
- Marshall, J. A., Hallegraeff, G. M.** (1999) Comparative ecophysiology of harmful algae *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from Australian and Japanese waters. *Journal of Plankton Research*, 21(10):1809-1822.
- Martin-Wagemann, B., Guttowski, A.** (1995) Scale morphology and growth characteristics of clones of *Synura petersenii* (Synurophyceae) at different temperatures. – In: Sandgren, C. D., Smol, J. P., Kristiansen, J. (eds.) *Chrysophyte algae*, pp. 345-360. Cambridge University Press.

- Mathieson, A. C., Norton, T. A., Neushul, M.** (1981) The taxonomic implications of genetic and environmentally induced variations in seaweed morphology. *Botanical Review*, 47(3):313-347.
- Mayr, E. & Ashlock, P. D.** (1991) Principles of systematic zoology. New York: McGraw-Hill. 2nd ed.
- Mayr, E.** (1970) Populations, species, and evolution: an abridgment of Animal species and evolution. Cambridge, MA: Harvard University Press
- McLachlan, J. & Bidwell, R.** (1983) Photosynthesis of eggs, sperm, zygotes and embryos of *F. serratus*. *Canadian Journal of Botany*, 56: 371-373.
- McLachlan, J., Chen, I. C. M., Edelstein, T.** (1971) The culture of four species of *Fucus* under laboratory conditions. *Canadian Journal of Botany*, 49: 1463-1469.
- Medlin, K. L., Lange, M., Nötig, E.** (2000) Genetic diversity in the marine phytoplankton: a review and a consideration of Antarctic phytoplankton. *Antarctic Science*, 72(3):325-333.
- Miller, K. A., Olsen, J. L., Stam, W. T.** (2000) Genetic divergence correlates with morphological and ecological subdivision in the deep-water elk kelp, *Pelagophycus porra* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, 36:862-870.
- Mos, L.** (2001) Domoic acid: a fascinating marine toxin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 9 :79–85.
- Mueller, UG, Wolfenbarger LL.** (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(10):389-394.
- Nei, M.** (1971) Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity. *The American Naturalist*, 105(945):385-398.
- Nei, M.** (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949):282-292.
- Němcová, Y., Neustupa, J., Kviderová, J., Řezáčová-Škaloudová, M.** (2010) Morphological plasticity of silica scales of *Synura echinulata* (Synurophyceae) in crossed gradients of light and temperature - a geometric morphometric approach. *Nova Hedwigia Beiheft*, 136:21-32.
- Neustupa, J., Řezáčová-Škaloudová, M. & Němcová, Y.** (2010) Shape variation of the silica scales of *Mallomonas kalinae* (Mallomonadales, Synurophyceae) in relation to their position on the cell body. *Nova Hedwigia Beiheft* 136:33–42.
- Nishitani, G., Nagai, S., Lian, C., Yamaguchi, H., Sakamoto, S., Yoshimatsu, S., Oyama, K., Itakura, S., Yamaguchi, M.** (2007) Development of compound microsatellite markers in the harmful red tide species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Molecular Ecology Notes*, 7:1251–1253.
- Ono, K., Khan, S. & Onoue, Y.** (2000) Effects of temperature and light intensity on the growth and toxicity of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquaculture Research*, 31:427–33.
- Peckol, P. & Ramus, T.** (1985) Physiological Differentiation of North Carolina Nearshore and Offshore Populations of *Sargassum filipendula* C. Ag. *Botanica Marina*, 28:319-325.
- Peckol, P., Harlin, M. M., Krumscheid, P.** (1988) Physiological and population ecology of intertidal and subtidal *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, 24:192-198.
- Pichrtová, M., Němcová, Y.** (2011) Effect of temperature on size and shape of silica scales in *Synura petersenii* and *Mallomonas tonsurata* (Stramenopiles). *Hydrobiologia*, 673:1-11.
- Pigliucci, M., Murren, C. J., Schlichting, C. D.** (2006) Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The Journal of Experimental Biology*, 209:2362-2367.
- Price, T. D., Qvarnström, A., Irwin, D. E.** (2003) The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceeding Royal Society London*, 270:1433-1440.
- Raven, J. A., Samuelsson, G.** (1988) Ecophysiology of *Fucus vesiculosus* L. Close to Its Northern Limit in the Gulf of Bothnia. *Botanica Marina*, 31:399-410.

- Reed, C. D., Laur, D. R., Ebeling, A. W.** (1988) Variation in Algal Dispersal and Recruitment: The Importance of Episodic Events. *Ecological Monographs*, 58(4):321-335.
- Reed, D. C., Amsler, C. D., Ebeling, A. W.** (1992) Dispersal in kelps: factors affecting spore swimming and competency. *Ecology*, 73(5):1577-1585.
- Řezáčová, M. & Škaloud, P.** (2005): Silica-scaled chrysophytes of Ireland. With an appendix: Geographic variation of scale shape of *Mallomonas caudata*. *Nova Hedwigia Beiheft*, 128:101-124.
- Rice, E. L., Kenchington, T. J., Chapman, A. R. O.** (1985) Intraspecific geographic-morphological variation patterns in *Fucus distichus* and *F. Evaneszens*. *Marine Biology*, 82(2):207-215.
- Riisberg, I., Edvardsen, B.** (2008): Genetic variation in bloom-forming ichthyotoxic *Pseudochattonella* species (Dictyochophyceae, Heterokonta) using nuclear, mitochondrial and plastid DNA sequence data, *European Journal of Phycology*, 43(4):413-422.
- Riisberg, I., Orr, R.J.S., Kluge, R., Shalchian-Tabrizi, K., Bowers, H.A., Patil, V., Edvardsen, B. & Jakobsen, K. S.** (2009): Seven gene phylogeny of heterokonts. *Protist*, 160: 191-204.
- Round, F. E., Crawford, R.M. & Mann D.G.** (1990) The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera. Cambridge University Press, Cambridge. 747 pp.
- Rynearson, T. A. & Armbrust, E. V.** (2004). Genetic differentiation among populations of the planktonic marine diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 40:34–43.
- Rynearson, T. A., Lin, E. O., Armbrust, E. V.** (2009) Metapopulation structure in the planktonic diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae). *Protist*, 160:111–121.
- Rynearson, T. A., Newton, J. A., Armbrust, E. V.** (2006) Spring bloom development, genetic variation, and population succession in the planktonic diatom *Ditylum brightwellii*. *Limnology and Oceanography*, 51:1249–1261.
- Sandgren, C. D. & Barlow, S. B.** (1989): Siliceous scale production in chrysophyte algae. II. SEM observations regarding the effects of metabolic inhibitors on scale regeneration in laboratory populations of scale-free *Synura petersenii* cell. *Nova Hedwigia Beiheft*, 95:27-44.
- Sandgren, C., Hall, S. A., Barlow, S. B.** (1996) Siliceous scale production in Chrysophyte and Synurophyte algae. I. Effects of silica-limited growth on cell-silica content, scale morphology, and the construction of the scale layer of *Synura petersenii*. *Journal of Phycology*, 32:675-692.
- Santiago-Morales, I. S., García-Mendoza, E.** (2011) Growth and domoic acid content of *Pseudo-nitzschia australis* isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two Si:NO<sub>3</sub> ratios. *Harmful Algae*, 12:82-94.
- Saravanan, V., Godhe, A.** (2010) Genetic heterogeneity and physiological variation among seasonally separated clones of *Skeletonema marinoi* (Bacillariophyceae) in the Gullmar Fjord, Sweden. *European Journal of Phycology*, 45:177–190.
- Saxby-Rouen, K. J., Leadbeater, B.S.C. & Reynolds, C.S.** (1997) The growth response of *Synura petersenii* (Synurophyceae) to photon flux density, temperature, and pH. *Phycologia*, 36: 233-243.
- Shimada, C., Tanimura, Y.** (2006) Spatial variability in valve morphology of *Neodenticula seminae*, an oceanic diatom in the subarctic North Pacific and the Bering Sea. *Paleontological Research*, 10(1):79–89.
- Siver, P. A.** (1987) The distribution and variation of *Synura* species (Chrysophyceae) in Connecticut, USA. *Nordic Journal of Botany*, 7: 107-116.
- Siver, P. A., Hamer, J. S.** (1989) Multivariate Statistical Analysis of the Factors Controlling the Distribution of Scaled Chrysophytes. *Limnology and Oceanography*, 34:(2)368-381
- Siver, P. A., Skogstad, A.** (1988) Morphological variation of *Mallomonas crassiquama* (Chrysophyceae). *Nordic Journal of Botany*, 7:99-107.



- Slatkin, M.** (1978) Gene flow and the geographic structure of the natural populations. *Science*, 236:787-792.
- Sorhannus, U.** (2004) Diatom phylogenetics inferred based on direct optimization of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. *Cladistics*, 20:487–497.
- Szövényi, P., Hock, Z., Schneller, J. J., Tóth, Z.** (2007) Multilocus dataset reveals demographic histories of two peat mosses in Europe. *BMC Evolutionary Biology*, 7:144-157.
- Tatarenkov, A., Jönsson, R. B., Kautsky, L., Johennesson, K.** (2007) Genetic structure in populations of *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) over spatial scales from 10 m to 800 km. *Journal of Phycology*, 43:675-685.
- Thessen, A. E., Bowers, H. A., Stoecker, D. K.** (2009) Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources, *Harmful Algae*, 8:782-810.
- Tollrian, R., Harvell, C. D.** (1999) The ecology and evolution of inducible defenses. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Tribsh A, Schönswetter P, Stuessy TF.** (2002) *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the ice age in the European Alps. *American Journal of Botany*, 89(12):2024-2033.
- Tsutsui, H., Takahashi, K., Nishida, S. & Nishiwaki, N.** (2009): Intraspecific morphological variation with biometry of *Distephanus speculum* (Silicoflagellata). *Marine Micropaleontology*, 72: 239-25
- Tureson, G.** (1922) The species and the variety as ecological units. *Hereditas*, 3(1):100-113.
- Vanormelingen P., Chepurinov, V.A., Mann D.G., Sabbe K., Vyverman W.** (2008): Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris sensu lato* (Bacillariophyta), *Protist*, 159: 73-90.
- Wee, J. L., Fasone, L. D., Sattler, A., Starks, W. W. & Hurley, D. L.** (2001): ITS/5.8S DNA sequence variation in 15 isolates of *Synura petersenii* Korshikov (Synurophyceae). – In Siver, P.A & J. L. Wee (eds): Chrysophytes and related organisms: topics and issues, Proceedings of the Fifth International Chrysophyte Symposium. *Nova Hedwigia Beiheft* 122: 245-258.
- Weisse, T.** (2008) Distribution and diversity of aquatic protists: an evolutionary and ecological perspective. *Biodiversity and conservation*, 17(2):243-259.
- Wernberg, T., Thomsen, M. S.** (2005) The effect of wave exposure on the morphology of *Ecklonia radiata*. *Aquatic Botany*, 83:61-70.
- Whittle, S. J. & Casselton, P.J.** (1975): The major chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae. *British Phycological Journal* 10: 179-191
- Wilkinson, D. M.** (2001): What is the upper size limit for cosmopolitan distribution in freeliving microorganisms? *Journal of Biogeography*, 28:285-291.
- Yamaguchi, M., Shigeru, I., Nagasaki, K., Matsuyama, Y., Uchida, T., Imai, I.** (1997) Effects of temperature and salinity on the growth of the red tide flagellates *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae). *Journal of Plankton Research*, 19(8):1167-1174.
- Yoshida, G., Murase, N., Arai, S., Terawaki, T.** (2004) Ecotypic differentiation in maturation seasonality among *Sargassum horneri* (Fucales, Phaeophyta) populations in Hiroshima Bay, Seto Inland Sea, Japan. *Phycologia*. 43(6):703-710.
- Zhao, F., Liu, F., Liu, J., Ang, P., Duan, D.** (2008) Genetic structure analysis of natural *Sargassum muticum* (Fucales, Phaeophyta) populations using RAPD and ISSR markers. *Journal of applied phycology*, 20(2):191-198.