

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra Botaniky



Lucie Jelínková

Reprodukční izolace kryptických druhů protist

Sexual incompatibility of protist cryptic species

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Pavel Škaloud, PhD.
Praha 2011

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.

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat svému školiteli, Pavlu Škaloudovi, za vedení práce, řadu rad a připomínek a také za čas, který mi věnoval. Též bych ráda poděkovala celému týmu algologického pracoviště za příjemnou pracovní atmosféru a pomoc při práci v laboratoři.

Velký dík patří i mé rodině a přátelům za všestrannou pomoc a podporu během celého mého studia.

Abstrakt

Systematická a evoluční biologie se už od počátku své existence snaží definovat druhovou kategorii či taxon. Určité taxony jsou shledávány druhy na základě nejrůznějších kritérií, tedy na základě různých druhových konceptů. Nejvíce takovýchto konceptů vzniklo v minulém století. Biologický druhový koncept byl desetiletí považován za nejzásadnější. Byl založen na přítomnosti reprodukční izolace dvou druhů. Jeho aplikovatelnost byla ovšem zpochybněna zjištěním, že existuje velké množství i starobylých asexuálních linií a také linií sexuálních s vysokou mírou hybridizace mezi uznávanými druhy.

Tato práce se pokouší popsat biologický druhový koncept a jeho změny v průběhu času. A taktéž se pokouší vyřešit otázku jeho současné použitelnosti pro protista.

Klíčová slova: biologický druhový koncept, reprodukční izolace, kryptické druhy, druhový komplex, protista

Abstract

The systematic and the evolutionary biology attempt to define a species category or a species taxon from the beginning of their existence. Specific taxons are considered species on the base of different criteria, so on the base of different species concepts. Most of these concepts emerged previous century. The biological species concept has been assumed to be most important species concept for dozens of times. It was based on a presence of the reproduction isolation of two species. However, its applicability was questioned by the existence of many asexual lineages and also the lineages with a large degree of hybridization between an approved species.

This thesis is trying to give a description of the biological species concept and its changes during the time. And it is also trying to answer the question of its simultaneous usability for protist.

Keywords: the biological species concept, reproduction isolation, cryptic species, species complex, protist

Obsah

1 Úvod	6
2 Druhové koncepty	7
2.1 Termín druh	7
2.2 Původ druhových konceptů	8
2.3 moderní druhové koncepty	8
2.3.1 Evoluční druhový koncept (EvDK)	9
2.3.2 Ekologický druhový koncept (EDK)	9
2.3.3 Fylogenetické druhové koncepty (FDK)	10
2.3.4 Jednotný druhový koncept?	10
3 Biologický druhový koncept (BDK)	12
3.1 Definice	12
3.2 Omezení využitelnosti	12
4 Protista	13
4.1 Velmi stručné vymezení	13
4.2 Potíže při určování druhovosti	14
4.2.1 Kryptické, semikryptické či sibling druhy protist	14
4.2.2 Přítomnost nebo absence sexuálního rozmnožování	15
4.3 Prostředky druhových konceptů protist	17
4.3.1 Morfologie a morfometrika	17
4.3.2 Genetické (molekulární, fylogenetické) analýzy	18
4.3.3 Vztah reprodukční izolace a molekulárních markerů	19
5 Praktické využití BDK u protistních organismů - příklady	21
5.1 Rozsivky (Bacillariophyceae)	21
5.2 Nálevníci (Ciliophora)	23
5.3 Krásivky (Desmidiaceae)	24
5.4 Protistní parazité	25
5.5 Obrněnky (Dinoflagellata)	26
5.6 Zlativky (Chrysophyceae)	26
6 Závěr	28
Použitá literatura:	29

1 Úvod

Jak systematická biologie, tak evoluční biologie jsou obory, které vždy potřebovaly objekty svého zájmu katalogizovat. Tyto objekty se nazývají taxony a za nejnižší taxonomickou a evoluční jednotku byl vždy považován druh. Ten měl ovšem obzvláště v počátcích systematiky výjimečné postavení, které v myslích mnohých přetrvalo i dodnes. To jsou důvody, proč se tolik na druhovost zaměřujeme. Neustále se snažíme nalézt druhovou definici druhový koncept, jenž by byl platný pro všechny organismy.

Nejstarší způsob rozlišování objektů je vnější podoba. Tato tradice pochází už z dob antiky. Biologická věda, která se zabývá vnějšími znaky, se nazývá morfologie. Druhy, ale i neživé objekty na základě vnější podobnosti třídil už Karl Linné. A dokonce i Charles Darwin rozlišoval mezi jednotlivými druhy prostřednictvím tzv. morfologických mezer. Tento koncept se nazývá morfologický.

Ovšem Darwinova teorie přináší změnu hlavně v tom, že druhový koncept nemá jen rozlišit mezi druhy, ale i vysvětlit jejich vznik a vývoj. Postupně tedy hlavně v minulém století vznikaly nové a nové koncepty. Přičemž biologický druhový koncept byl dlouho považován na nejdůležitější.

V současnosti vedle sebe existuje několik desítek konceptů. Nicméně každý je platný jen pro určitý okruh organismů podle kritéria využitého pro druhové rozlišení. Tak snahy o vytvoření sjednoceného konceptu akcelerují. Podle některých autorů mohou být všechny nebo jen některé koncepty využity naráz, budeme-li se držet určitých pravidel. Z toho důvodu si myslím, že biologický druhový koncept může být i dnes ve spojení na příklad s koncepty založenými na molekulárních znacích stále využitelný.

V této práci se budu nejprve zabývat obecněji druhovými koncepty. Pak se zaměřím na biologický druhový koncept a jeho využitelnost. Dále nastíním potíže při určování druhovosti u protist a druhové koncepty u nich používané. Poslední část je nejdůležitější a týká se praktického využití biologického druhového konceptu u jednobuněčných eukaryot.

2 Druhové koncepty

2.1 Termín druh

Tento termín se dá vysvětlit dvojím způsobem, což je zřejmě důsledek vývoje historických událostí ve vědě a filozofii. Například de Quieroz (2005), Ereshefsky (2009) rozlišují druhový taxon a druhovou kategorii.

Druhová kategorie je zde definována jako druh tak, jak ho zřejmě chápal sám Karl Linné v 18. století (podle de Quieroz 2005, Ereshefsky 2009). Druhová podstata je neměnná, druh je jako přírodní zákon, je esencí v aristotelském slova smyslu, byl stvořen Bohem. Linné tedy rozeznával jako druhy také neživé minerály a nerosty, a to na základě vnějších podobností, tedy u organismů morfologie.

Darwin (podle Ereshefsky 2009) takto o druzích asi nepřemýšlel a tento termín použil spíše jako komunikační prostředek nutný k dorozumění mezi ním a jeho kritiky i zastánci. Jestli mohlo být něco druhem nazýváno byl to taxon, linie organismů, čili opravdu jen další člen v taxonomické hierarchii, tedy ne jiný než rod, čeleď (atd.). Což by, nicméně, do linneovské představy nezapadalo.

Ovšem, co je poměrně zajímavé, nerozlišoval mezi druhem a varietou. Cituji: „zkoumal jsem termín druh jako definici náhodně danou kvůli pohodlí skupině individuí velmi podobných jedno druhému a esenciálně se neliší od termínu varieta,“ (Darwin 1859, podle Ereshefsky 2009). A to z toho důvodu, že zde neexistuje žádný zvláštní evoluční mechanismus, který by byl schopen způsobit rozdíl mezi druhem a varietou. Darwin definoval „princip charakterové divergence“, jenž byl založen na existenci divergentní selekce. Tu si můžeme představit takto: V jedné oblasti se nalézají několik blízkých příbuzných skupin organismů. V jedné z těchto skupin jsou selektovány organismy s určitou adaptivní výhodou, v jiné zase další s jinou. Tak postupně v průběhu dalších generací mohou vznikat jakési mezery v morfologii (jež Darwin využíval k rozlišení mezi jednotlivými druhovými liniemi), které tedy odlišují jednu skupinu od rodičovské a sesterské (Darwin 1859, podle Ereshefsky 2009).

Dvojí chápání druhu se samozřejmě přenáší i do současnosti. Někteří (de Quieroz 2005, de Quieroz 2007, Ereshefsky 2009) se domnívají, že druh jako kategorie v obecném slova smyslu, ani jako kategorie biologické organizace odlišná od taxonomických kategorií, prostě neexistuje. A na takovémto tvrzení bychom měli stavět unifikovaný druhový koncept. Jiní se druhový koncept pokoušejí vybudovat na vlastnostech, které považují druh za unikátní kategorii (Simpson 1961, Mayr 1982).

Současná absence jednotného druhového konceptu je způsobena i tím, že autoři druhových konceptů nedokáží rozlišovat mezi druhem jako taxonem a druhovou kategorií (de Quieroz 2005, de Quieroz 2007, Ereshefsky 2009).

2.2 Původ druhových konceptů

Karl Linné položil v 18. století základ takzvaného typologického druhového konceptu, který definoval druhy právě jako neměnné jednotky přírodní hierarchie. Druh byl tedy chápán jako třída (kind, class) sjednocující objekty, jež sdílí jasně definované vlastnosti. V 19. století byl odlišen od neživých tříd hornin a nerostů prostřednictvím pojmenování „natural kind“, což se stalo základem pro termín „species“ (Mayr 1996).

Zhruba v tom samém období vzniká ve Francii nominalismus. Možná právě jako kritika takového chápání. Nominalisté ve zkratce tvrdí, že (takto požímané) druhy jsou pouze lidské konstrukty v přírodě neexistující, že reální jsou pouze jedinci (Mayr 1996). Takové názory mají i dnes své zastánce a není jich málo.

Přelom samozřejmě znamenala Darwinova teorie. A ne ani tak v praktickém využití poznatků pro rozpoznávání druhů jeden od druhého. Ty totiž rozlišuje na základě morfologických kritérií. Ale spíše v pochopení druhu či variety, a tedy nejen individua, jako evoluční linie (Mayr 1996, de Quieroz 2005, Erehefsky 2009). Od tohoto propojení systematiky a evoluce se odvíjí i současné druhové koncepty. Jak se domnívám, snad kromě Biologického druhového konceptu, který prošel trochu odlišnou cestou historického vývoje, ale do kterého byly Darwinovy poznatky zakomponovány.

2.3 moderní druhové koncepty

V prostudované literatuře se dají rozlišit 2 typy studií. První typ pojednává o druhových konceptech (DK) v obecnějším rámci a je psán hlavně evolučními biology a filozofy. Pokouší se nalézt sjednocující DK, který by byl společnou definicí pro všechny druhy organismů a kriticky nahlíží na více prakticky zaměřené práce „systematiků“. Druhý typ představují studie využívající tyto teoretické poznatky v praxi.

V následujících kapitolách bych ráda zhodnotila obecně DK a jejich výhody a nevýhody. Biologický druhový koncept (BDK), jenž definuje druhy na základě tvrzení: „druh je taková skupina křížících se nebo se potenciálně křížících (ve smyslu sexuálně kompatibilních) populací, která je od ostatních reprodukčně izolována“ (Mayr 1942), zhodnotím až posléze. Přestože je tento koncept druhu stále oblíbený např. u protist, v zoologii a botanice se již příliš nevyužívá a je nahrazován alternativními, novějšími druhovými koncepty. Je tomu tak především ze dvou důvodů. Za prvé není použitelný pro asexuálně se rozmnožující organismy (Sonneborn 1957). Za druhé je těžko uplatnitelný na organismy, které hybridizují (van Valen 1976). I když Mayr svůj koncept upravil tak, aby toto již problém nepředstavovalo (Mayr 1970).

Sonnebornovy myšlenky (Sonneborn 1957) zřejmě vedly k rozkolu mezi dnešními botanickými a zoologickými druhovými definicemi a DK pro protozoology. Ty se dnes tedy liší zejména v nástrojích (např. jiné genetické markery) a vlastnostech (např. reprodukční izolace), jež

se využívají k rozpoznání druhů. Rozdíly mezi jednotlivými koncepty se někteří autoři v posledních pár desítkách let snaží eliminovat (de Quieroz 2005, 2007)

Přestože Sonneborn (1957) stál u zrodu myšlenky vytvořit jiné alternativní koncepty, které by byli platné i pro asexuální organismy, jeho poznatky našly uplatnění pouze v protozoální části biologie. A to například z toho důvodu, že se jedná pouze o práci na některých aspektech protozoologie (Simpson 1958).

Že dnes existuje nepřeberné množství různých DK, dokazuje na příklad Mayden (2002). Zde stručně nastíním jen některé základní teze, bližší zkoumání je mimo rozsah této práce.

2.3.1 Evoluční druhový koncept (EvDK)

Tento DK je jedním z prvních alternativních druhových konceptů, které by měly být platné i pro asexuální organismy. Byl vytvořen paleontologem Simpsonem. Simpson (1951) definoval druh jako linii - soustavu populací vyvíjejících se od rodičovské k dceřiné – evolučně nezávislou na ostatních liniích. Řečeno jinými slovy, druhy odlišují evoluční procesy, jež je ustavují. Simpson tedy sleduje vývoj jedné populace v čase, a to je jeho největším přínosem. Přičemž BDK nemá tento rozměr, což může taktéž souviset s jeho nesčetnými kritikami.

Dalším předním zastáncem tohoto konceptu byl E. Willey, který druhy definoval takto: „druh je každá linie dceřiných populací organismů, která si zachovává svou identitu před jinými takovými liniemi a která má své vlastní historické tendence a historický osud“ (Wiley 1978). Výhodou tohoto DK je, že takto vyjádřené kritérium druhovosti druhy identifikuje jako základní jednotky evoluce. A tedy nevyžaduje morfologické či fenetické rozdíly pro druhové určení. Což by v opačném případě mohlo vést při nedostatečném pozorování ekosystému k přecenění nebo podcenění druhové bohatosti. Ovšem asi nejzásadnější problém tohoto konceptu je to, že neobsahuje žádná dostatečná operační kritéria („vlastnosti“ linie, které by byly použitelné v praxi) pro rozlišení jednotlivých populací, než jen to, že se pohybují po oddělených evolučních trajektoriích (Sites, Crandall 1997).

Od tohoto byly dále odvozeny například ekologický a fylogenetický DK.

2.3.2 Ekologický druhový koncept (EDK)

Myšlenka stojící u jeho zrodu je asi prvně vyslovena van Valenem (1976). Ten říká, že druh je (podobně jako u EvDK) linie - soustava populací vyvíjejících se od rodičovské k dceřiné v evolučním procesu. Ovšem tato linie obývá jen jedinou ekologickou niku nebo adaptivní zónu, což jsou všechny komponenty prostředí, se kterými dané organismy interagují. Toto bylo založeno ku příkladu na zjištění, že bdelloidní vířníci jsou rozdělováni do snadno rozpoznatelných skupin na základě morfologie, definovaných jako druhy, přestože se rozmnožují asexuálně. A toto velmi pravděpodobně způsobuje kompetice zodpovědná za úmrtnost intermediálních jedinců

(Hutchinson 1968). Jiný příklad nalézáme u dubů. Ty jsou také rozpoznávány jako jednotlivé druhy i přes značný stupeň hybridizace v této skupině rostlin (van Valen 1976). Už z definice je evidentní, že se Van Valen snažil, aby jeho druhový koncept byl použitelný i pro asexuální organismy. Jelikož ekologické faktory dle něj působí na všechny organismy stejně. Ovšem jako příklad využívá sexuálně se rozmnožující organismy, duby. A dalším problémem je to, že podle de Quieroz (2005) stejně jako evoluční druhový koncept stále shledává genový tok jako hlavní mechanismus pro udržování druhové stability. Jak ale může docházet ke genovému toku mezi asexuálními individui?

Oba dva výše zmíněné koncepty jsou shledávány jako tzv. lineage – based DK (Barclough a Hernou 2003, Mallet 2007, de Quieroz 2005, de Quieroz 2007)

2.3.3 Fylogenetické druhové koncepty (FDK)

Kladistika je část systematické biologie, která se začala vytvářet poté, co se zakořenila představa vývoje jako evolučního stromu, jeho částí jako evolučních linií. A velkého rozvoje dosáhla s rozvojem našich znalostí o nukleových kyselinách a jejich možným využitím v systematice. Pro kladisty je zásadní kritérium monofylie. Monofyletický je takový taxon, jenž obsahuje linie předka a všech jeho potomků. Ostatní taxony jsou nepřírozená, člověkem vytvořená uskupení, která by neměla být používána v taxonomii (Mallet 2007). Hennig (1966) založil na myšlence kritéria monofylie druhu první fylogenetický DK: druh vzniká tak, že se reprodukčně kompatibilní (interbrední) populace rozdělí do dvou částí, které si mezi sebou již nevyměňují genetický materiál, (genetický tok mezi nimi se zastavil). Jak je vidět, toto je modifikovaný BDK a je otázkou, do jaké míry je použitelný pro asexuální organismy. Avšak ostatní důležité FDK z něj čerpají.

Nicméně asi největší nevýhodou tohoto konceptu je, že monofylie sama o sobě nemůže být kritériem druhovosti, protože v hierarchii druhů, rodů, čeledí se vyskytuje na všech těchto úrovních. Není tedy jasné, na jaké systematické úrovni je druh druhem (Mallet 2007) a to je asi důvod, proč vznikaly další FDK.

Cracraft (1983) nabízí propojení lineage – based DK a konceptů vycházejících z kladistiky (FDK): druh se stává v jeho podání nejmenším diagnostikovatelným klastrem individuí, mezi nimiž nalezneme vztah předků a potomků. I přes nesčetné kritiky (Sites, Crandall 1997) bývá využíván v praxi.

Bohužel na podrobnější analýzy mi nezbyvá prostor. A není to ani cílem této práce.

2.3.4 Jednotný druhový koncept?

Ereshefsky (2009) a de Quieroz (2005, 2007) se shodují na tom, že evoluční procesy, které ustanovují druhy (speciace), ale i vyšší taxony, jsou velmi složité a komplexní v čase a prostoru.

Takže jakýkoli koncept, který shledává pouze jeden aspekt evolučního procesu jako rozlišovací znak mezi dvěma liniemi na úrovni druhů, alespoň v některých případech selhává. Právě to je důvodem existence takového množství druhových konceptů, kterého jsme dnes svědky. Ereshefsky (2009) přináší řešení tohoto „druhového problému“ pouze na teoretické úrovni. Nicméně de Quieroz (2005, 2007) se pokouší nalézt východisko, které by mohlo být užitečné.

De Quieroz (2005, 2007) nalézá jedno, co je všem současným konceptům společné: druh je odděleně se vyvíjející metapopulační linie (Mallet 2007; Sites, Crandall 1997; Mayr 1996; Barreclough, Hernou 2003). A též tvrdí, že to by mělo být základem pro jednotný DK. Dále stejně jako Ereshefsky (2009) říká, že by se mělo striktně rozlišovat mezi teoretickou představou druhu (druh jako kategorie) a jejím skutečným praktickým vymezením - jako taxonu. To kromě sjednocujícího kritéria druhu jako části metapopulace zahrnuje i „sekundární“ druhová kritéria tzv. operační kritéria. To jsou kritéria skutečně užitá v praxi pro druhové vymezení, která se organismus od organismu vždy lišila, podle toho, co vědci shledávali za důkaz separace. Tato kritéria se mají využívat jako nezávislé soubory „důkazů“, jenž dokládají, že se skutečně jedná o takovou separovaně se vyvíjející linii. Jinak řečeno všechny DK definují druhy jako separovaně se vyvíjející linie metapopulace, ale například při požití BDK tato linie musí být také reprodukčně izolována od ostatních linií, u EDK musí obývat jinou niku než další linie, při užití monofyletické verze FDK by měla být také monofyletická, atd.

Protože speciace je proces velmi komplexní v čase a prostoru a takovéto „operační“ vlastnosti linie jsou jejím produktem, hromadí se postupně v čase jedna po druhé. A tak se nedá říci, že by některá z nich byla pro odlišení více relevantní než jiná. Z toho vyplývá, že všechny jsou relevantní stejně a že kterákoli z nich může být pro určení druhu použita. Problém je jen v tom, že někteří definují linie jako druhy již v časně fázi diverzifikace, kdy existují jen některé její důkazy, např. vzájemná monofýlie. Zatímco jiní později, až když dojde k reprodukční inkompatibilitě mezi liniemi (de Quieroz 2005, 2007), případně linie začnou obývat jiné niky. Jinými slovy, čím více je takových evidencí, tím více vědců se shodne na tom, že se skutečně jedná o dva či několik samostatných druhů. Takže se dá říci, že čím více takovýchto rozlišujících vlastností budu moci u dvou linií nalézt, tím více mých kolegů se mnou bude souhlasit. To je to, o co se vědci v současnosti snaží. Dle mě je právě toto asi hlavní důvod hledání co největšího množství rozdílů mezi liniemi, což dnes dokládají četné studie.

Zde musím také konstatovat, že jsem se zabývala hlavně studiemi týkajícími se protozoí, tedy jednobuněčných eukaryot. A také, že není důležité, který druhový koncept použijeme pro rozlišení dvou linií jako samostatných druhů. Ovšem je zřejmě lepší využívat více rozdělovajících vlastností.

3 Biologický druhový koncept (BDK)

3.1 Definice

Pokud bychom chtěli ve stručnosti definovat tento koncept, mohli bychom ocitovat výrok Ernsta Mayera: „druh je taková skupina křížících se nebo se potenciálně křížících populací, která je od ostatních reprodukčně izolována“ (Mayr 1942).

Mayr svým konceptem navazoval na Dobzanského DK (Dobzansky 1935). Tento ruský genetik pracoval v laboratoři se sexuálně se rozmnožujícím organismem *Drosophila* sp. Přičemž shledal za nejrelevantnější rozdíl mezi dvěma druhy schopnost ochrany vyváženého genového potenciálu daného druhu (genového poolu) tzv. isolačními mechanismy. A také tvrdí (Dobzansky 1950), že „biologický druh je největší a nejinkluzivnější mendelovská populace“, která je považována za reprodukční komunitu individuí sdílející společný genový pool. Mayr (1942) tento náhled na druhovost při studiích provedených na jiných sexuálně se rozmnožujících organismech - ptácích – převzal. A později se stal jedním z největších obhájců tohoto i v současnosti oblíbeného konceptu.

Termín isolační mechanismy byl zaměněn za termín reprodukční izolace. A není důležité, klademe-li při zkoumání druhovosti větší důraz na její první elementární složku postzygotickou (např. neživotoschopnost hybridního potomstva, sterilita hybridů) nebo na prezygotické mechanismy (tvorba gamet, ale absence zygoty; nerozpoznání nevhodného partnera jako sexuálního partnera) (Mayr 1970, 1982, 1996).

3.2 Omezení využitelnosti

Ovšem nejvíce kritiky BDK plyne ze zjištění, že existuje velké procento asexuálních organismů, pro než tento koncept podle některých autorů nemá vůbec žádný význam. BDK je tedy neobjektivní a neměl by se používat. E. Mayr (Mayr 1949b) totiž i při své obhajobě reálné existence druhů v přírodě říká, že je velmi jednoduché představit si svět bez druhovosti. V takovém světě existují pouze jednoduše se rozmnožující komunity individuí, každé jedinečné a schopné se rozmnožovat jen s jemu nejpodobnějšími. V každé generaci budou mít určitá individua genový komplex speciálně adaptovaný na určité ekologické podmínky. Ovšem většina z těchto zvýhodňujících kombinací bude zničena, pokud dojde ke spojení dvou genomů individuí adaptovaných na jiné ekologické podmínky. Jedinou obranou proti takové destrukci vhodných genomů je sexuální rozmnožování, respektive zabránění genetickému toku mezi odlišnějšími a to reprodukčně - isolačními mechanismy. Jediné systémy, které takto hospodaří jsou biologické druhy. Z tohoto tvrzení skutečně vyplývá, že sex je pro biologické druhy arbitrem. A tudíž by se BDK měl aplikovat pouze na druhy se sexuálním rozmnožováním.

Zajímavé je také zjištění, že tato Mayrova definice (Mayr 1949b) odpovídá absenci rozdílu mezi varietou a druhem. Tedy hranice určení druhu jsou skutečně záležitostí velmi subjektivní,

přestože existují snahy (jako univerzální – sjednocený koncept) vymezit je objektivně i napříč říší živého.

Postupně se také zjišťovalo, že výše jmenované definice nebudou asi úplně správné, ani v rámci sexuálně se rozmnožujících organismů. Tak například botanici brzy zjistili, že někdy probíhá hybridizace i mezi druhy, které se zdají být dobře vymezené a jsou sympatrické (čili na stejném území). Takové blízce příbuzné druhy mohou být skutečně obohacovány geny jeden od druhého. Tento fenomén byl nazván (introgresní) hybridizací (Anderson 1949; Mayr 1996). Mayr sám tedy ve světle těchto skutečností starší definice reprodukční izolace přeformuloval z úplné bariéry na biologické vlastnosti individuů (například schopnost se rozpoznat v rámci jednoho druhu), jež brání fúzi populací (hybridizaci druhů) (Mayr, 1942, 1949b, 1970). Isolační mechanismy tedy ne vždy brání rozmnožování mezi dvěma individui různých druhů, nicméně ochraňují před kompletní fúzí populací dvou druhů (Mayr 1996). Proto musíme při aplikaci tohoto konceptu v praxi dodržovat určitá pravidla (Coleman 2000), která se týkají všeobecných zjištění, že takovýto kříženci mívají neživotaschopné nebo sterilní potomstvo.

Podle de Quieroz (2005, 2007) je Mayrův druhový koncept jedním z těch, které zapadají do rámce sjednoceného druhového konceptu. BDK pohlíží totiž na druh jako na separovaně se vyvíjející metapopulační linii. Tak se domnívám, že i v dnešní době je využitelný pro zkoumání druhovosti u sexuálních organismů, ovšem až s přihlédnutím k dalším operačním vlastnostem (markerům).

4 Protista

4.1 Velmi stručné vymezení

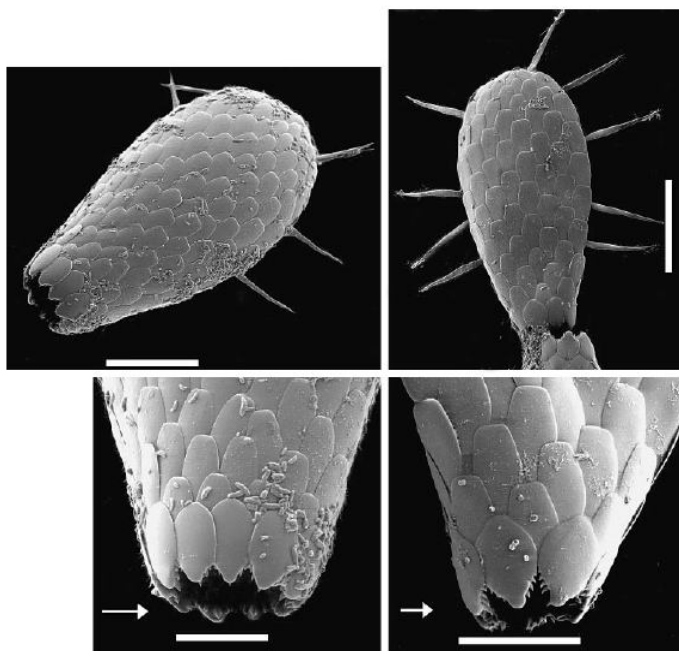
Protista (protozoa) bývají definována jako jednobuněčné, koloniální, případně coenobiální eukaryotní organismy. Bývají v zásadě fotosyntetické, heterotrofní nebo se živí mixotrofně (např. krásnoočka, zlativky). Jejich zástupce nalezneme ve všech skupinách systému Simsona a Rogera (2004). Jsou to organismy pro člověka velmi významné. Jsou to na příklad velmi významní původci nebezpečných chorob - například malárie (*Plasmodium* sp.; Perkins 2000) a toxoplasmózy (*Toxoplasma gondii*; Grigg et al. 2001). Dále jsou významnými primárními producenty obzvláště ve vodních ekosystémech. Například jedním z mála, a tudíž významným producentem oceánských pouští je pikoplanktonní (do 1 μ m) řasa *Ostreococcus* (Worden 2006).

4.2 Potíže při určování druhovosti

4.2.1 Kryptické, semikryptické či sibling druhy protist

Morfologické rozdíly jako rozlišovací znaky druhů jsou využívány již Linnéem a Darwinem. Posléze se staly všeobecným druhovým kritériem pod pojmenováním morfologický druhový koncept. Dnes jsou označovány za tradiční způsoby vymezení druhů a bývají spolu s jinými kritérii moderních druhových konceptů stále užívány pro druhové vymezení (jakési multifázové analýzy neboli „vícestupňové hledání důkazů“; Schlegel a Meisterfeld 2003; Mann 1999; Pröschold a Leliaert 2007; de Quieroz 2005, 2007). Ovšem jako i jiné DK není tento platný ve všech případech a to hned ze dvou příčin. První určitě nalezneme v říši makroskopických organismů. Jak opět Mayr (1996) napsal. Velmi často nalezneme mnoho morfologických typů v rámci biologického druhu a to buď jako důsledek genetické variace, nebo v důsledku jiné fáze životního cyklu (mláďata, samice, samci). Tito se liší jeden od druhého morfologicky dokonce více než příslušníci dvou rozdílných druhů. Druhou příčinou je existence jinými parametry dobře podpořených druhů, např. reprodukční izolací, ekologií, fyziologií, genetickými markery a jejich různou kombinací (Schlegel a Meisterfeld 2003; Mann 1999; Pröschold a Leliaert 2007), které jsou od sebe ale morfologicky nerozeznatelné a nebo se odlišují jen minoritními znaky (Sonneborn 1957, Sonneborn 1975, Mayr 1948). Takové druhy jsou hojné ve všech skupinách organismů. Běžně se vyskytují u protozoí a byly nejprve nazývány sibling druhy (Sonneborn 1975). Dnes je u více užíváno označení druhy kryptické. Přičemž termín „sibling“ definuje druhy hlavně na základě genetických rozdílů (Sonneborn 1975). Kdežto termín „kryptický“ je zastřešující. Znamená morfologickou jednotu a odlišnost v kterémkoli parametru využívaném pro rozlišení dvou druhů.

Ještě existuje označení pseudokryptické druhy. Takto se často označují rozdílné genetické linie, u kterých byly nalezeny minoritní rozdíly v morfologii – Obr.1 (Kynčlová et al.2010; Vanormelingen 2007; Amato et al. 2007; Nemjová et al. 2011; Mann 1999; Schlegel a Meisterfeld 2003 atd.). Druhům, jenž sdílejí takovéto společné znaky, se někdy říká druhové komplexy.



Obr.1. Detailní morfologická analýza ukazující, že kmeny druhu *Euglypha filifera*, představující odlišné větve fylogenetického stromu vzniklého na základě sekvenace genu pro malou ribozomální jednotku, se liší i v nepatrných (minoritních) morfologických znacích – hlavně ve tvaru křemičitých šupin. V levé části obrázku se nacházejí izoláty z Austrálie, v pravé z Kostariky. Úsečky v horní části obrázku odpovídají 20 μm , v dolní části 10 μm . Převzato z Schlegel a Meisterfeld (2003).

4.2.2 Přítomnost nebo absence sexuálního rozmnožování

Jak už Sonneborn proklamoval, BDK není použitelný pro asexuálně se rozmnožující linie organismů (Sonneborn 1957). Těch je ovšem mezi jednobuněčnými obzvláště velké množství. Asexuálním vegetativním dělením také tráví největší část svého životního cyklu i ti, kteří jsou schopni sexuálního rozmnožování (Bogdanov 2002; Parrow a Burkholder 2003; Parrow et al. 2002; Dunthorn a Katz 2010; Ryneerson a Armbrust 2005; Grigg et al. 2001; von Dassow a Montresor 2010). To může být také jedním z důvodů, proč sexuální rozmnožování známe jen u malého množství jednobuněčných organismů (dalším může být např. to, že sex prostě mít nemusí, jelikož je příliš „drahý“ (Bogdanov 2002)). Takže taktéž použití BDK je u protist omezené.

Sexuální rozmnožování spočívající v meiotickém dělení a případné genové rekombinaci (Bogdanov 2002) je obligátní v životních cyklech rozsivek (Mann et al. 2003; Cherpunov a Mann 2005; Amato et al. 2007; Pouličková et al. 2010, Pouličková a Mann 2008; Pouličková 2008; Mann a Cherpunov 2005; Vanormelingen et al. 2007; Vanormelingen et al. 2008; Sabbe et al. 2004). Také bylo prokázáno u části protistních parazitů (Perkins 2000; Grigg et al. 2001). Dále je dlouho známé u některých ciliát (Sonneborn 1937). Přičemž u rozsivek je už desítky let využívána

sexuální kompatibilita jako druhové kritérium, protože jsme schopni sex vyvolat i v laboratorních podmínkách. Naopak u nálevníků je situace složitější (Dini a Nyberg 1993). Rozmnožování nálevníku je poměrně složitý proces, u většiny druhů související s přítomností dvou jader, mikronukleu a makronukleu. Makronukleus vzniká po sexuálním spojení, tzv. konjugaci, z nového mikronuklea. Problém je v tom, že u velkého množství nálevníku sexuální množení pozorováno nebylo. Nicméně pokud mají přítomen např. micronukleus ve stavu, kdy je připraven ke konjugaci, tak je možné se domnívat, že sexuální jsou (Dunthorn a Katz 2010). Dále se můžeme opírat o genetické markery. A to tak, že prokážeme existenci genového toku. Nebo můžeme hledat vztahy mezi sexem a variabilitou daných markerů. Takovýmto způsobem byl sex laboratorně potvrzen například u colpodeálního ciliáta *Bursaria truncatella* (Dunthorn a Katz 2010) či v přírodních vzorcích u druhu *Tetrahymena termophila*.

Využití BDK může dále zesložit i přítomnost většího množství pohlaví (tzv. mating types), která byla prokázána právě u druhu *Tetrahymena termophila* (Doerder a spol. 1995).

Pohlavní rozmnožování je dále doloženo a také v praxi využíváno u řádu Desmidiáles (krásivky) třídy Zygnemataceae (spájkivky). Ty se rozmnožují taktéž konjugací. Ta je ale striktně a principiálně odlišná od té u nálevníků: buňky jsou jen jednojaderné a za přítomnosti sexuálního feromonu se jejich protoplasty spojí za vzniku tzv. zygospor. Zygospora slouží tedy jako doklad sexu (Kalina a Váňa 2005). Příkladem je studie provedená na domnělém komplexu druhů *Micrasterias thomasi* (Blackburn a Tyler 1987).

Sex je také prokázán a v praxi využíván v rámci BDK u Volvocales (Chlorophyceae). Zde byl vztahován přímo ke genetickým markerům v naději, že se nalezne variabilita, jež by indikovala přítomnost reprodukčně – isolační bariéry. To se nakonec podařilo (Coleman 1994; Coleman 2000; Coleman 2002) a daný marker je v současné době využíván ve velkém množství druhů vymezujících studií.

U zlativek (Crysophyceae) byl sex sledován v přírodních vzorcích u druhu *Synura petersenii* (Wawrik 1970). Sandgren a Flanagin (Sandgren a Flanagin 1986) vyvolali v laboratoři na izolátech. A také Sandgren (1981) ho doložil u druhu *Dinobryon cylindricum*. Zatím zde byl jen jediný pokus využít tento poznatek v praxi. Přičemž pro danou studii neměl valný význam (Wee, Millie a Walton 1991), možná z důvodu nedostatečných znalostí.

Dále například u malárie způsobujícího protista *Plasmodium* sp. předpokládáme, že k sexu dochází ve středním střevě přenašeče, vektora (často komár rodu *Anopheles* sp.). U parazitických protist bývá přítomnost reprodukčních bariér především dokazována genetickými markery. Příkladem může být i studie Susan Perkins (2000). U druhu *Plasmodium azurophilum* bylo zjištěno již dříve, že se pravděpodobně vyskytuje ve dvou variantách. Přičemž jedna z variant napadá červené krvinky hostitele a druhá bílé. Perkins prokázala za použití mitochondriálního

genu pro cytochrom c, že jedinci nalezení v bílých krvinkách nesdílejí stejnou kopii tohoto genu s jedinci z červených krvinek. Na základě těchto výsledků nazvala dané varianty kryptickými druhy, jež odlišuje domnělá reprodukční izolace. Tudíž je evidentní, že jsme opět odkázáni na genetické markery jako důkaz reprodukční izolace. Dále je sex doložen u *Toxoplasma gondii*, ale také zde není příliš možnost užití sexuálního rozmnožování v rámci BDK pro praktické rozlišení druhů (Grigg et al. 2001).

Ještě zde musím poukázat na skutečnost, že přestože není sex pozorován, neznamená to, že daný organismus musí být nutně asexuální. Toto je popisováno jako fenomén tzv. kryptického sexu. Grimsley a jeho kolegové (Grimsley et al. 2010) doložili prostřednictvím sekvenace celých genomů několika kmenů pikoplanktonního druhu *Ostreococcus tauri* a prostřednictvím dalšího testování těchto sekvencí, že dochází k rekombinacím mezi lokusy i mezi chromosomy.

Také bylo již v minulosti prokázáno, že existují i geny specifické pro meiózu. Ty kódují proteiny pro ni nezbytné (shrnutí v Bogdanov 2002). Tyto geny a dokonce i jejich funkční produkty byly nalezeny u jednoho kmene druhu *Chlorella variabilis* a jsou autory považovány také za důkaz sexu, i když skrytého (Blanc et al. 2010).

Takže jak je vidět, v dnešní době došlo už k poměrně dokonalému propojení BSC a molekulárně genetického určování.

4.3 Prostředky druhových konceptů protist

4.3.1 Morfologie a morfometrika

Rozeznávání na základě určitých vnějších – morfologických – znaků je nejstarším prostředkem i pro rozlišení mezi taxonomickými skupinami protist. A je stále v určité míře využíváno. Nejprve se rozlišovalo na základě znaků viditelných na vyšších úrovních organizace a posléze se postupovalo k nižším organizačním celkům. Jak takové morfologické třídění často vypadalo a vypadá, ukážu na příkladu skupiny Chlorophyceae. Zelené řasy se dlouho dělily do určitých taxonomických jednotek podle typu stélky (u řas velmi oblíbené). Rozlišovaly se typy jednobuněčné a vícebuněčné či mnohobuněčné. Jednobuněčné představují formy bičíkaté (monadoidní), kulaté bez bičíků (a jiných nástrojů pohybu – kokoidní) a dále koky obalené silnou vrstvou slizu (kapsální). Vícebuněčné či mnohobuněčné rozdělujeme na trichální (nanejvýš jednoduché větvení), heterotrichální (větvená, dá se rozlišit hlavní, osní vlákno od větvení), nebo coenocytické – jedna obrovská mnohoaderná buňka (Pröschold a Leliaert 2007).

U různých skupin protist jsou důležité také aparáty pohybu. Zjišťují se počty bičíků a jejich poloha na buňce, způsob obrvení buněk nálevníků. Bylo totiž zjištěno, že struktura obrvení souvisí i s ekologií a životní strategií. Dále byl důležitý například tvar buněk u skupin

Desmidiáles a Euglenales nebo barva plastidů u obrněnek a skrytěnek. Také se zkoumá, co pokrývá nebo nepokrývá povrch buněk a jaký to má tvar a formu: zlativky, testátní améby, dírkonožci, mřížovci, rozsivky. Toto vše je označováno jako tradiční rozlišovací nástroje.

S postupným vývojem metod se postupovalo k nižším úrovním organizace. Díky vzniku a možnosti využití elektronového mikroskopu se objevily nové morfologické znaky použitelné pro zozlišení, které jsou i dnes používané. Jedná se o znaky vnější, například: ornamentace buněčné stěny (Vanormelingen a další 2007), způsoby pokrytí, ornamentace a tvar křemičitých šupin zlativek (Kristiansen 1979), tvar, struktura a ornamentace schránek rozsivek (Mann 1999). Zkoumají se i vnitřní znaky, tzv. ultrastrukturní, na supratenkých řezech fixovaným materiálem, např.: tvar chloroplastů (Trebouxiphyceae), jejich počet a rozložení v buňce, přítomnost a nepřítomnost mitochondrií a jiných organel a jejich uspořádání uvnitř buněk, uspořádání a stavba basálních tělísek bičíků a bičíkových kořenů v buňce (Pröschold a Leliaert 2007).

Na scénu přichází morfometrické metody. Gates (1977) poprvé využil mnohorozměrné statistické metody na prověřování variability a důležitosti tradičních znaků na obrvení (ciliatuře) nálevníků. Což ho vedlo k rozlišení dvou druhů rodu *Euplotes* sp. Dnes se využívá hlavně určitá odvozená forma, tzv. geometrická morfometrika. Ta spočívá v nalezení a vyznačení nejdůležitějších bodů zkoumané struktury (často znaky taxonomicky důležité), tzv. landmarkerů. Dále se označí tzv. semilandmarkery, což jsou často různé okrajové body struktury či její části, které jsou od sebe vždy stejně vzdálené. Poté se toto tvar objektů definovaný landmarkery různými statistickými metodami vyhodnocuje. Rozdíly ve znacích, které jsou podle dané statistické metody významné, se nazývají signifikantní.

Tyto metody se využívají při zkoumání schránek rozsivek (Pouličková 2010), šupin zlativek (Neustupa a Němcová 2007), tvaru buněk krásivek (Nemjová a další 2011) aj. a také v souvislosti s tím, jak se tyto znaky mění, jak jsou variabilní za měnících se abiotických podmínek (Pichrtová a Němcová 2011).

4.3.2 Genetické (molekulární, fylogenetické) analýzy

Využité znaky (markery) se taktéž měnily s vývojem metod. Asi vůbec prvním molekulárním markerem byly výstupy elektroforézy isoenzymů z buněk druhu *Paramecium aurelia*. A právě na jejich základě T. Sonneborn odlišil oněch 14 variet či syngenů tohoto druhového komplexu (Sonneborn 1975). Přičemž termín syngen představuje reprodukčně kompatibilní kmeny (Coleman 2003) nebo také organismy sdílející stejné geny (Sonneborn 1975). Toto našlo u protist široké využití (Schlegel a Meisterfeld 2003).

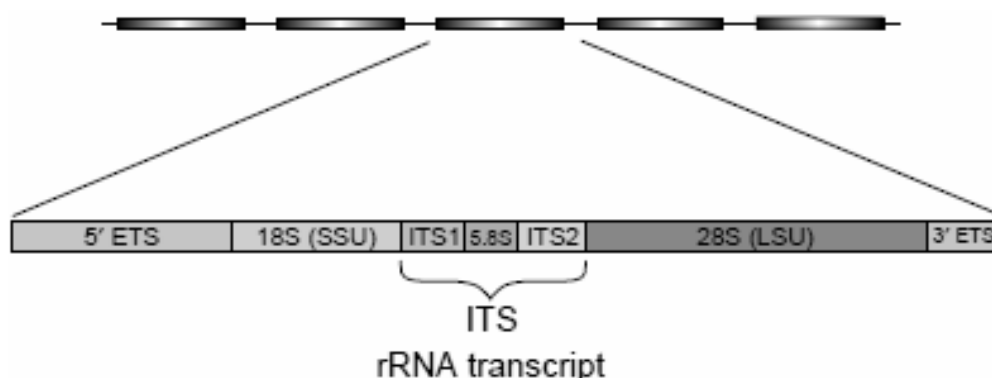
Více sofistikovaná technika, hojně využívaná hlavně v 90. letech, byla založena na enzymatickém štěpení DNA (Schlegel a Meisterfeld 2003; Coleman 1994).

V současnosti jsou fylogenetické stromy založeny na srovnávání sekvencí DNA určitých genů (fylogenetické markery) (Schlegel a Meisterfeld 2003, Pröschold a Leliaert 2007). Hlavně zpočátku to byly a i dnes jsou geny pro ribozomální rRNA (rDNA části), kterých je v genomech velké množství kopií (Schlegel a Meisterfeld 2003, Pröschold a Leliaert 2007, Mann 1999, Lavau a Saunders et al. 1997, Darling et al. 2004). Postupně se přicházelo na to, že pro některé organismy jsou takovéto markery nepřesné, fylogenezi příliš dobře nezobrazující a hledali se jiné. Bohužel se také téměř pro každý jeden organismus našel jiný genetický marker. Velmi důležitým krokem byl vývoj multigenových analýz, jež využívají více nezávislých markerů najednou. Zde je výčet nejčastějších: mitochondriální geny: *cox* spacer, *tuf*; plastidové geny: RUBISCO i RUBISCO spacer a jaderné geny: hlavně rDNA, ale i sekvenace celých genomů. Dnes jsou takové analýzy široce rozšířeny (Schlegel a Meisterfeld 2003, Pröschold a Leliaert 2007, Saéz a další 2003, Grigg et al. 2001; Catania a další 2008).

Je důležité dodat, že tyto molekulární markery se kombinují velmi často s morfologickými a morfometrickými daty. A také se neustále pokoušíme nalézt gen, jež by na základě BDK poukazoval na možnou reprodukční izolaci.

4.3.3 Vztah reprodukční izolace a molekulárních markerů

Dnes je velmi oblíbeným molekulárním markerem tzv. oblast ITS a to zejména u fototrofních protist. ITS (internal transcribed spacer) je část rDNA ležící mezi geny pro velkou a malou ribosomální jednotku (LSU rDNA a SSU rDNA) včetně 5,8 S rDNA. Ta rozděluje ITS sekvence na dvě části: ITS 1 a ITS 2 (Coleman 2003, Obr. 2).



Obr. 2. struktura ITS sekvence rDNA, upraveno podle Coleman (2003).

Tyto sekvence jsou sice z DNA přepisovány, ale poté jsou z primárního transkriptu vystřiženy. Ovšem právě pro správnou úpravu RNA stříhem jsou nesmírně důležité, jelikož se účastní sekundární struktury primárního transkriptu. Přičemž enzymy, které ho provádějí se orientují jedině podle tvaru sekundární struktury, jenž je určován právě sekvencí. Tak tedy z důvodu účasti pouze na sestřihu je v této sekvenci nutná pouze určitá míra konzervativnosti některých jejích částí. A tak jsou ITS sekvence tvořeny úseky oproti genům pro rRNA mnohem více variabilními (Coleman 2003).

Co jsem popsala výše není hlavní důvod obliby tohoto molekulárního markeru. Protože jsou ITS sekvence součástí genů pro ribozomální RNA, vyskytují se v genomu ve velkém množství kopií. A tak jsou tyto sekvence snadno získatelné.

Další výhodou ITS je, že u nich byla totiž objevena závislost mezi určitou variabilitou v konzervativních oblastech a reprodukční kompatibilitou. Coleman et. al. (1994) zjistili, že ITS sekvence se lišily u každého syngenu komplexů druhů *Pandorina morum* a *Gonium pectorale* (Volvocales). V této studii byly zkoumány kmeny z různých geografických oblastí. A zjistilo se, že kmeny z jednoho syngenu se liší v méně než 10 % bp (párů bází), kdežto mezi syngeny byl rozdíl v 10 % - 30%. Coleman a Mai (1997) zjistili, že sekundární struktura ITS má určitou důležitou výpovědní hodnotu. A další analýzy ITS u Volvocales prokázaly, že pokud se dané dva organismy liší kvalitativní změnou bází v konzervativní oblasti ITS 2, a tudíž se sekundární struktury takto pozměněných sekvencí liší z důvodu rozdílného párování bází, tak tyto organismy nevykazují interakci gamet. Takže k vývoji mating genů a takovýchto záměn bází dochází u této skupiny řas současně. Takovéto záměny týkající se obou částí spárovaného úseku sekundární struktury ITS 2 byly nazvány Compensatory base changes (CBC), jelikož párování v daném místě zůstalo zachováno. Taktéž byly označeny za méně pravděpodobné a poukazující na dokonalejší (úplnější: třeba ani nedojde ke tvorbě gamet) reprodukční izolaci. Dále existují tzv. Hemicompensatory base changes (HCBC). Ty ale představují substituci pouze jedné báze z původního páru (Coleman 2000, Coleman 2002, Coleman 2003). Tyto záměny byly prokázány u více jak 20 zástupců řádu Volvocales, u kterých byla zjišťována sexuální kompatibilita v závislosti na sekundární struktuře ITS 2 (Coleman 2000).

Coleman (2000) také definuje tři nejdůležitější aspekty tzv. křížící tabulky (tabulka, kam se zaznamenávají úspěšná nebo neúspěšná křížení mezi kmeny daného organismu). Ty bychom rozhodně měli zohledňovat při rozhodování, jestli dva organismy náleží do jednoho syngenu či podle BDK do jednoho druhu. Tyto aspekty jsou tři: 1) Organismy odebrané ve stejný čas z jedné geografické oblasti (sympatrické) budou maximálně reprodukčně kompatibilní a budou produkovat životaschopné potomstvo. 2) V závislosti na evoluční vzdálenosti dvou organismů bude jejich křížení vykazovat různou životaschopnost F1 generace potomků, různou frekvenci

vzniku zygot a různou absencí zygot. 3) Většina křížení tak nebude srovnatelná ve frekvenci vzniků zygot a jejich životaschopnosti. ITS klád, jehož gamety interagují a tedy vytvářejí zygotu se nazývá Z klád a syngen je zde definován na základě interakce, při níž dochází k vzniku životaschopného potomstva.

Coleman také dodává, že u žádného kmene organismu z Volvocales nebyl nalezen Z klád byť jen s jedinou CBC v konzervativním úseku sekundární struktury ITS 2. Jinými slovy přítomnost těchto CBC poukazuje na bod v evoluci, kdy mating geny diverzifikovaly tak moc, že organismy nejsou schopny interagovat na úrovni gamet (Coleman 2003). Čili dá se říci, že tyto rozdíly jsou pouze doklady toho, že došlo k druhové diverzifikaci (Müller et al. 2007).

Někteří by mohli konstatovat, že souvislost druhové diverzifikace s přítomností CBC může být jen vlastnost vázaná na jednu jedinou skupinu zelených řas, na Volvocales. Ovšem tato souvislost byla doložena i pro jiná eukaryota, např. pro rod *Closterium* (Desmidiaceae), skupinu Laminariales, některé kvetoucí rostliny a některé mořské organismy. Müller et al. (2007) našli v literatuře kolem 1300 organismů, pro které byla doložena shoda mezi takovými substitucemi v ITS a reprodukční izolací. I když nebyla tak striktní - pokaždé se vyskytovala trochu na jiné úrovni izolace. Müller et al. (2007) také doložili, že pokud u těchto organismů nalezneme v konzervativní oblasti ITS 2 i jen jedinou CBC, tak je zde asi 93 % pravděpodobnost, že se jedná o rozdílné druhy. Neplatí to ovšem naopak - pokud zde žádnou CBC nenalezneme, je pravděpodobnost, že se jedná o jeden druh, jen kolem 76 %.

Bylo také zjištěno, že kvůli přílišným genetickým rozdílům na vyšších taxonomických úrovních je ITS sekvence využitelná hlavně na vnitro- a mezidruhové úrovni (Müller et al. 2007; Godhe et al. 2006). Pro rozlišování mezi vyššími taxony je vhodnější využít pomaleji evolující a ne tak variabilní rDNA geny.

Nakonec bych ráda dodala, že pravděpodobně existuje ještě jeden mnohem zásadnější důvod, proč volíme k rozlišování druhů protist spíše molekulární markery. Využití molekulárních markerů není tak náročné jako pokusy s reprodukční izolací v praxi. K těmto pokusům totiž potřebujeme velké množství kmenů daného organismu, zejména pak potřebujeme znát jeho životní cyklus alespoň do té míry, abychom věděli, jestli vůbec má sexuální rozmnožování, a jak ho vyvolat.

5 Praktické využití BDK u protistních organismů - příklady

5.1 Rozsivky (*Bacillariophyceae*)

Rozsivky jsou jednobuněčné eukaryotní organismy. Představují poměrně odvozenou součást taxonu Heterokontophyta, jež náleží do Chromista ze superskupiny Chromalveolata (Simpson a Roger 2004). Dělí se na fylogeneticky původnější centrické a odvozenější penátní. Tyto dva

typy se liší morfologií schránek. Všechny mají křemičité schránky složené ze dvou částí. Větší část nasedá na menší jako víko krabice. Tato schránka se nazývá frustula. Během vegetativního mitotického dělení se právě kvůli její stavbě vždy jedna z dceřiných buněk neustále zmenšuje (dochází k tzv. redukci velikosti), až dosáhne kritické velikosti (Kalina a Váňa 2005; von Dassow a Montresor 2010). Tou je určitý interval délek, po jehož dosažení přestává být buňka životaschopná. V praxi se k této kritické velikosti dosahuje laboratorními pokusy, přičemž je otázkou, jestli se tato velikost vyskytuje i v přírodě (Pouličková 2008; Pouličková et al. 2010). Původně v evoluci byl sex jedinou možností úniku. Po splnutí gamet vzniká zygota, tzv. auxospora, která velikostně expanduje. Tak se zrodí iniciální buňka, která má maximální velikost (Kalina a Váňa 2005). Z tohoto skutečně vyplývá, že sex je původně pro rozsivky obligátní součástí životního cyklu. Je také znám u této skupiny po více než 150 let a umíme ho vyvolat v laboratoři.

Ovšem existují druhy, příp. démy (části populace jedné geografické oblasti, sympatrické), ale také celé taxony, jež jsou schopny vytvořit auxosporu i nepohlavním rozmnožováním (Mann 1999). Ty druhy, které se rozmnožují sexuálně, biparentálně, se nazývají (allo)apomiktické nebo také heterothalické či diecísni (Mann a Cherpunov 2003; Cherpunov a Mann 2005; Amato et al. 2007). Ty, jenž dokáží vytvořit auxosporu bez splnutí dvou různých pohlavních buněk, se nazývají automiktické (homotalické, monoecísni). Jiné druhy dokázaly obejít sexuální rozmnožování úplně a iniciální buňku vytvářejí pouze prostým zvětšením (Mann 1999, Pouličková et al. 2010, Pouličková 2008; Mann a Cherpunov 2005; Vanormelingen et al. 2006; Vanormelingen et al. 2008). Avšak i toto můžeme považovat za typ reprodukční izolace. A totiž v případě, objeví-li se několik typů takovýchto „anomalit“ a normálního sexuálního rozmnožování v původně morfologicky definovaném jednotném druhu, je jasné, že takové „části“ původního jednotného druhu se mezi sebou nedokáží rozmnožovat. A co je důležitější, často jsou charakteristické minoritními morfologickými rozdíly (Mann 1999) či genetickou odlišností (Vanormelingen 2008; Pouličková a další 2010).

Reprodukční izolace tedy v současné době nepředstavuje jediné a hlavní kritériem pro odlišení druhů rozsivek. Výsledky křížících tabulek, které sledují nejen jestli auxospora (či iniciální buňka) vzniká a s jakou frekvencí (Mann a Cherpunov 2005; Pouličková 2008), ale také jestli je životaschopná a jak je životaschopné potomstvo (kvůli zamezení zkreslení výsledků hybridizací) (Amato et al. 2007, Vanormelingen et al. 2006, Vanormelingen et al. 2008, Kaczmarška 2009, Mann a Cherpunov 2003, Sabbe et al. 2004), jsou srovnávány nejčastěji s výsledky sekvenací genetických markerů, v současnosti hlavně ITS (Amato et al. 2007; Vanormelingen et al. 2006; Vanormelingen et al. 2008; Pouličková et al. 2010). ITS je pro tento účel výhodný marker, protože i pro některé rozsivky byl stanoven vztah mezi reprodukční izolací

a CBC (Pouličková et al. 2010). A výsledky analýz ITS sekvencí jsou dnes zároveň posuzovány i s výsledky morfologických studií. Využívají se tradiční rozlišovací znaky (určité znaky valvy: intenzita striace, tvar, atd.), které ale mohou být v prostředí a i v průběhu životního cyklu plastické. Také se morfologie hodnotí (geometricko-)morfometrickými metodami (Pouličková et al. 2010). Zohledňována bývá i ekologie, případně i cytologické charakteristiky (Pouličková 2008; Pouličková et al. 2010; Mann 1999) a samozřejmě výše jmenované „sexuální anomálie“ (Mann 1999, Pouličková et al. 2010, Pouličková 2008; Mann a Cherpunov 2005; Vanormelingen et al. 2006; Vanormelingen et al. 2008). Tyto studie jsou tedy příkladem jakési mnohaúrovňové analýzy. Ta bývá považována za průkaznou a varianty mohou být bez větší kritiky nazývány druhy, pokud se všechny její parametry na rozlišení určitých variant v komplexu druhů shodují.

5.2 Nálevníci (*Ciliophora*)

Nálevníci jsou taxonem Alveolát ve superskupině Chromalveolata. Je to poměrně velká heterogenní skupina. Nálevníci se vyznačují přítomností většího množství zkrácených „bičíků“, uspořádaných do řad, cilií neboli brv. Tradiční taxonomie se zakládá právě na morfologických vzorcích uspořádání cilií (Schlegel a Meisterfeld 2003), které bylo později také zkoumáno za využití morfometriky (Gates 1977).

Sexuální rozmnožování je známo jen u některých představitelů tohoto taxonu. Laboratorně využitelné je ale pro ještě menší část z nich (Sonneborn 1937). Asi nejlépe je sexuální rozmnožování prozkoumáno na druhovém komplexu *Paramecium aurelia* (Sonneborn 1937). Sonneborn zjistil, že zde existuje 14 syngenů, které byly na základě ekologických, cytologických a molekulárních dat označeny za samostatné druhy (Sonneborn 1975).

Sexuální rozmnožování je dále prokázáno a zkoumáno např. u druhu *Tetrahynena termophila*. Tento organismus je velmi zajímavý tím, že u něj bylo zjištěno větší množství pohlaví - 7 (Doerder et al. 1995). Paixão et al. (2011) zjistili, že tato pohlaví jsou determinována asi 14 alelami tzv. mat genu, genu určujícího pohlaví. Každá alela specifikuje pouze pravděpodobnost, s jakou se to které pohlaví vyvine. Existence určitého pohlaví ze 7 možných je dána nejen alelou mat genu, ale i vlastnostmi prostředí, hlavně teplotou při jeho specifikaci. Je určitě užitečné znát způsob určení pohlaví u organismu, u něhož se chystáme zkoumat druhovost využitím BDK. Přítomnost takové mnohapohlavnosti by totiž velmi pravděpodobně mohla komplikovat případnou využitelnost pro BDK. Dále byl sex pozorován u druhu *Bursaria truncatella*. To je jediný známý colpodeální ciliát, u něhož bylo sexuální rozmnožování v laboratoři prokázáno. Na základě molekulárních markerů a morfologických indikátorů sexu se předpokládá, že i jeho příbuzní z daného kládu budou schopni sexuálního rozmnožování. Tudíž o těchto organismech víme jen málo (Dunthorn a Katz 2010).

Jak je vidět, laboratorně zatím v rámci BDK nebylo příliš možné sexuální rozmnožování v případě ciliát využít. Nicméně se domnívám, že díky zvětšujícím se znalostem o jejich ekologii a životních cyklech to bude brzy možné. To platí i pro další skupiny, o nichž se zde zmiňuji.

5.3 Krásivky (*Desmidiáles*)

Krásivky jsou součástí taxonu Zygnematophyceae, patřícího do superskupiny Plantae. Jelikož je jejich tvar velmi členitý a složitý, je na něm založena i tradiční taxonomie (Van den Hoek, C. et al. 1995). K analýze tvaru u krásivek se v současnosti využívá též geometrická morfometrika (Nemjová et al. 2011).

Sexuální rozmnožování probíhá prostřednictvím konjugace. Je vyvoláno u všech individuí naráz sexuálním feromonem, který je pro každý druh specifický (Kalina a Váňa 2005). V laboratoři ale bylo sexuální rozmnožování přímo pozorováno jen u některých zástupců řádu Desmidiáles.

BDK byl u krásivek aplikován např. na rodu *Closterium*. U druhového komplexu *Closterium peracerosum–strigosum–littorale* byla zjištěna shoda mezi použitými molekulárními markery a úplnou (prezygotickou) reprodukční izolací, takže se skutečně jedná o komplex kryptických druhů (Tsuchikane et al. 2008). Podobná shoda byla zjištěna u druhového komplexu *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Denboh et. al 2003).

Reprodukční kompatibilita mezi sympatrickými i alopatickými kmeny byla dále studována u možného komplexu *Micrasterias thomasiana*. Na základě zkoumání viability či sterility potomstva bylo zjištěno, že s jejich heterotalickým způsobem rozmnožování to nebude tak jednoduché (Blackburn a Tyler 1987). Blackburn a Tyler definovali jakési 4 stupně reprodukční izolace: 1) párování gamet, 2) vznik zygospor, (tyto dva stupně dohromady – sexuální kompatibilita), 3) životaschopnost F1 generace, 4) úspěšné křížení F1 mezi sebou a/nebo F1 a jednoho z rodičů. Podobné aspekty při aplikaci BDK zohledňuje i Coleman (2000) a některé rozsáhlé studie.

Tento „vícestupňový koncept“ vyzkoušeli Blackburn a Tyler (1987) na svých isolátech. Přičemž předpokládali, jako Coleman (1977), že geneticky vzdálenější kmeny, tedy zde alopatické, rozhodně v rámci všech čtyř stupňů nebudou kompatibilní. Výsledky ukázaly, že jejich předpoklad je v podstatě správný. Sympatrické kmeny vesměs produkovaly životaschopné potomstvo F1 generace. A dokonce 2 kompatibilní isoláty ze stejného místa i času vyprodukovaly viabilní F2. závěr této studie je takový, že *Micrasterias thomasiana* asi sestává z několika syngénů, ovšem sám podle BDK tvoří monofylum. Podobně je na tom i komplex *Closterium peracerosum–strigosum–littorale*. Ovšem zde byly na podporu hypotézy druhového komplexu využity i molekulární markery (Tsuchikane et al. 2008).

5.4 Protistní parazité

Tradičně se rozlišují na základě morfologie a určitých důležitých bodů životního cyklu. Těmi jsou: jaký druh hostitele napadají, jaké buňky, jaká jsou v nich stadia parazita, kde probíhá meióza, atd. (Volf a Horák a kol. 2007). Tomuto rozlišení se říká podobnostní koncept (Perkins 2000).

Sexuální rozmnožování je známo například u druhu *Toxoplasma gondii* (Apikomlexa, Chromalveolata). Grigg et al. (2001) zjistili na základě multigenové analýzy kryptickou diverzitu v klonální linii parazita (tuto linii tvoří asexuálně se rozmnožující individua). U tohoto druhu byly zjištěny tři sublinie. Nejvirulentnější se jevila převládající sublinie, tzv. prvního typu. Křížicími pokusy po vyvolání sexu a zkoumáním F1 potomstva v myších hostitelých dokázali, že linie prvního typu byla potomkem ostatních dvou minoritních sublinií. Toto zjištění odpovídá hypotéze, že takovéto klonální populace protistních patogenů s několika geneticky odlišnými subpopulacemi jsou důsledkem ostrovní povahy hostitelských individuí (Grigg et al. 2001; Timbayrenc a Ayala 2002). Jinými slovy, hostitelé se podle této hypotézy považují za izolovaná území čili ostrovy.

Autoři tedy zjistili existenci geneticky odlišných linií, které jsou ale stále součástí jednoho druhu podle BDK. Jak je ale možné tyto výsledky vyhodnotit? Diverzita v klonálních liniích není nic neobvyklého. Podobná diverzita se nalézá například u rozsivek a obrněnek a to v rámci vodních květů (populační boomy, blooms), např. u mořské rozsivky *Ditylium brightwellii* (Ryneerson a Armbrust 2005; Ryneerson et al. 2008). Podle ITS markeru se jí dokonce vyznačují i vodní květy sladkovodního druhu zlativky *Synura glabra* (Škaloud a Jelínková unpublished). Zkoumání příčin takovéto variability by bylo poměrně zajímavé. Také by to mohlo velmi obohatit naše znalosti o způsobu speciace mikroorganismů, a tudíž usnadnit zkoumání jejich druhové diverzity.

Z výše popsaných výsledků je taktéž evidentní, že existují molekulární markery, které se dají dobře využít i na vnitrodruhové úrovni. A tyto mohou být velmi užitečné ku příkladu právě při zkoumání virulence u parazitů (Grigg et al. 2001) a nebo toxicity linií obrněnek (Anderson 1998).

Co se dál týče protistních parazitů, Perkins (2000) využila mitochondriální gen pro cytochrom b k prokázání, že *Plasmodium azurophilum* je komplexem dvou kryptických, reprodukčně izolovaných druhů. Perkins (2000) zjistila, že daný haplotyp genu izolovaného z buněk parazita napadajících bílé krvinky hostitele není nikdy přítomen v buňkách infikujících červené krvinky. Nicméně přímé křížicí pokusy nebyly provedeny a to zřejmě z důvodu složitosti jejich proveditelnosti. Jenže podle tak výrazných odlišností, které byly v genu objeveny, a podle jiného cíle v hostiteli, je velmi pravděpodobné, že zde skutečně nedochází ke genovému toku.

Dané dvě linie jsou reprodukčně izolovány. Jinak sexuální rod *Plasmodium* představuje jako celek další možnost aplikace BDK (Tibayrenc 2006).

5.5 Obrněnky (*Dinoflagelata*)

Obrněnky jsou opět tradičně rozlišovány na základě morfologických kritérií (morfologie schránky, velikost buněk, barva plastidů, atd.). Představují jako taxon Dinophyceae součást alveolárních Chromalveolát (Simpson a Roger 2004).

Sexuální proces probíhá prostřednictvím izo- nebo anizogamie (von Dassow a Montresor 2010) a je znám u neustále vzrůstajícího počtu druhů (Parrow a Burkholder 2003).

U druhu *Pfiesteria piscida* popsali sexuální rozmnožování Parrow et al. (2002) a Parrow a Burkholder (2003) u druhu *Pfiesteria shumwayae*.

Prakticky bylo sexuální rozmnožování pro rozlišení biologických druhů použito například u *Gymnodinium catenatum* (Blackburn et al. 2001). Tento organismus má zřejmě hetrothalický typ rozmnožování s více pohlavími, což mohlo zkomplikovat i interpretaci výsledků. Zkoumáno bylo 21 kmenů ze čtyř geograficky vzdálených oblastí. Autoři studie zjistili, že přežívání potomstva je velmi variabilní v rámci mezipopulačních křížení a že každá jedna populace obývající jednu geografickou oblast byla reprodukčně kompatibilní. Přičemž z jejich výsledků vyplývá, že japonské a španělské kmeny jsou příbuznější a australské jsou variabilnější. Důvodem, proč se tyto a podobné studie provádějí, je zjištění, že některé subpopulace vodních květů v oceánech vykazují rozdílnou toxicitu (Anderson et al. 1988, Anderson 1998).

5.6 Zlativky (*Chrysophyceae*)

Zlativky náleží do stramenopilní linie Heterokontofyt superskupiny Chromalveolát. Tradičně se rozlišují na základě určitých morfologických parametrů. Například pokud mají křemičité šupiny, zjišťuje se, jak jsou na buňce uspořádány a jak přesně vypadají. Znaky křemičitých šupin musejí být kvůli jejich malé velikosti zohledněny elektronovým mikroskopem (Petersen a Hansen 1956; Kristiansen 1979).

Sexuální rozmnožování je známo a laboratorně potvrzeno u rodu *Dinobryon* (Sandgren 1981) a druhu či možného komplexu druhů (Kynčlová et al. 2010; Škaloud et al. 2010) *Synura petersenii* (Sandgren a Flanagan 1986). U druhu *S. petersenii* bylo sexuální rozmnožování prvně pozorováno na přírodních vzorcích Wawrikem (Wawrik 1970), a jako rozlišovací znak bylo využito zatím pouze jednou. Jednalo se o pokus rozlišit rozdílně rychle rostoucí klony s morfologiemi šupin druhů *Synura petersenii* a *S. petersenii* var. *glabra*, ovšem s nevalnými výsledky (Wee et al. 1991).

Už poměrně dávno se zjistilo, že pouhá morfologie šupin pro rozlišení druhů stačit nebude. Šupiny jsou totiž typicky morfologicky variabilní (Neustupa a Němcová 2007; Pichrtová

a Němcová 2011; atd.). Specialisté se už delší dobu nemohou shodnout hlavně na základě morfologie šupin ale i genetických analýz (podobně jako u rozsivek (Mann 1999)), jestli se jedná o jeden druh *Synura petersenii* s více varietami (např. *Synura petersenii* var. *glabra*), nebo o několik semikryptických druhů (tj. *Synura petersenii*, *Synura glabra*) (Wee 1991; Kristiansen 1979; Kynčlová 2007). Boo et al. (2011) na základě multigenové a proteinové analýzy (obsahující i ITS marker) zjistili, že *Synura petersenii* pravděpodobně skutečně představuje komplex mnoha druhů. To potvrzuje i studie Kynčlová et al. (2010), analyzující ITS sekvence několika desítek kmenů izolovaných z území České Republiky. Geneticky definované linie se odlišovaly i morfologií křemičitých šupin. Zde toto zmiňuji z toho důvodu, že se sama ve své diplomové práci chystám zabývat reprodukční izolací druhů v rámci komplexu *Synura petersenii sensu lato*.

6 Závěr

Cílem této práce nebyla pouze snaha ukázat postavení a změny biologického druhového konceptu. Bylo jím hlavně pokusit se nastínit jeho dnešní využitelnost v praxi u sexuálních skupin protist. Na tomto konceptu je jasně vidět, že některá témata ve vědě jsou pouze jakousi módní záležitostí.

Biologický druhový koncept byl ve světě makroskopických organismů, rostlin a živočichů velmi oblíben obzvláště v první polovině minulého století. Po zjištění, že není aplikovatelný na asexuální linie mikroskopických organismů a určité linie sexuálních makroskopických organismů, začal být nahrazován jinými koncepty.

Říše protist se z hlediska využitelnosti BDK i jiných druhových konceptů jeví jako zaostávající. Ovšem není tomu tak. Protista jsou unikátní skupinou zahrnující velmi heterogenní organismy různých fylogenetických původů. A tak, jak se snažíme sjednotit koncepce druhovosti všech organismů, je BDK u jednobuněčných eukaryot ve spojení s jinými dnes důležitými koncepty stále aplikovatelný, stejně jako je tomu u mnohobuněčných organismů.

Použitá literatura:

- Amato, A., Kooistra, W.H.C.F., Ghiron, J. H., Mann, D. G., Pröschold, T., Montresor, M. (2007): Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms, *Protist* 158: 193–207
- Anderson, D. M. (1998): Physiology and bloom dynamics of toxic *Alexandrium* species, with emphasis on life cycle transitions, in Anderson, D. M., Cembella, A. D. and Hallegraeff, G. M. (eds): *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, NATO ASI Series, Vol. G 41. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg: 29–48
- Anderson, D. M., Jacobson, D., Bravo, I. & Wrenn, J. H. (1988): The unique microreticulate cyst of the naked dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, *Journal of Phycology* 24: 255–262
- Anderson, E. (1949): Introgressive hybridization, *Biological Reviews* 28: 280–307
- Blackburn, S. I., Bolch, C. J. S., Haskard, K. A. & Hallegraeff, G. M. (2001): Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae), *Phycologia* 40: 78–87
- Blackburn, S. I., Tyler, P. A. (1987): On the nature of eclectic species – a tiered approach to genetic compatibility in the desmid *Micrasterias thomasi*, *Journal of Phycology*: 22: 277–298
- Blanc, G., Duncan, G., Agarkova, I., Borodovsky, M., Gurnon, J., Kuo, A., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Polle, J., Salamov, A., Terry, A., Yamada, T., Dunigan, D. D., Grigoriev, I. V., Claverie, J. –M., Etten, J. L. V. (2010): The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex, *Plant Cell* 22: 2943–2955
- Barracough, T. G. & Herniou, E. (2003): Why do species exist? Insight from asexuals and sexuals, *Zoology* 106: 275–282
- Bogdanov, Y. F. (2002): Variation and Evolution of Meiosis, *Russian Journal of Genetics* 39: 363–381
- 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
- Catania, F., Wurmser, F., Potekhin, A.A. , Przybos, E., Lynch, M. (2008): Genetic Diversity in the *Paramecium aurelia* Species Complex, *Molecular Biology and Evolution* 26: 421–431
- Chepurnov, V. A., Mann, D. G. , Sabbe, K. , Vannerum, K. , Casteleyn, G. , Verleyen, E., Peperzak, L. and Vyverman, W. (2005): Sexual reproduction, mating system, chloroplast

- dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta), *European Journal of Phycology* 40: 379–395
- Coleman, A. W. (1977): Sexual and genetic isolation in the cosmopolitan algal species *Pandorina morum*, *American Journal of Botany* 64: 361-368
- Coleman, A. W. (2000): The Significance of a Coincidence between Evolutionary Landmarks Found in Mating Affinity and a DNA Sequence, *Protist* 151: 1–9
- Coleman, A. W. (2002): Comparison of *Eudorina*/*Pleodorina* ITS sequences of isolates from nature with those from experimental hybrids, *American Journal of Botany* 89: 1523–1530
- Coleman, A. W. (2003): ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons, *Trends in Genetics* 19: 370-375
- Coleman, A. W., Mai, J. C. (1997): Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness, *Journal of Molecular Evolution* 45: 168–177
- Coleman, A. W., Suarez, A., Goff, L. (1994): Molecular delineation of species and syngens in Volvocacean green algae (Chlorophyta), *Journal of Phycology* 30: 80-90
- Cracraft, J. (1983): Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* 1: 159–187
- Darling, K. F., Kucera, M., Pudsey, C. J., Wade C. M. (2004): Molecular evidence links cryptic diversification in polar planktonic protists to Quaternary climate dynamics, *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 101: 7657–7662
- Denboh, T., Ichimura, T., Hendrayanti, D. and Coleman, A. W. (2003): *Closterium moniliferum*-*ehrenbergii* (Charophyceae, Chlorophyta) species complex viewed from the 1506 group I intron and ITS2 of nuclear rDNA, *J. Phycol.* 39: 960–977
- de Quieroz, K. (2005): Ernst Mayr and the modern concept of species, *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 102:6600-6607
- de Queiroz, K. (2007): Species concepts and species delimitation, *Systematic Biology* 56: 879-886
- Dini, F., Nyberg, D. (1993): Sex in ciliates, in: Jones, J.G.(ed), *Advances in microbial ecology*, Plenum Press, New York, pp 85–154
- Dobzhansky, T. (1950): Mendelian populations and their evolution, *American Naturalist* 84: 401–418
- Dobzhansky, T. (1935): A critique of the species concept in biology, *Philosophy of Science* 2: 344-355
- Doerder, F.P., Gates, M.A., Eberhardt, F.P., Arslanyolu, M. (1995): High frequency of sex and equal frequencies of mating types in natural populations of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 8715-8718

- Dunthorn, M., Katz, L. A. (2010): Secretive ciliates and putative asexuality in microbial eukaryotes, *Trends in Microbiology* 18: 183-188
- Ereshefsky, M. (2009): Darwin's solution to the species problem, Springer Science+Business Media B.V. 175:405–425
- Gates M. A. (1977): Analysis of positional information applied to cirral patterns of the ciliate *Euplotes*, *Nature* 268: 362–364
- Godhe, A., McQuoid, M. R., Karunasagar, I., Karunasagar, I., Rehnstam-Holm, A.-S. (2006): Comparison of three common molecular tools for distinguishing among geographically separated clones of the diatom *Skeletonema marinoi* Sarto et Zingone (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* 42: 280–291
- Grigg, M. E., Bonnefoy, S., Hehl, A. B., Suzuki, Y., Boothroyd, J. C. (2001): Success and Virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries, *Science* 294: 161-165
- Grimsley, N., Péquin, B., Bachy, C., Moreau, H., Piganeau, G. (2010): Cryptic sex in the smallest eukaryotic marine green alga, *Molecular biology and evolution* 27: 47-54
- Hennig, W. (1966): *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana, 263 pp
- Hutchinson, G. E. (1968): When are species necessary?, in: Lewontin, R. C. (ed.) *Population Biology and Evolution*, Syracuse University Press, Syracuse, 177-186 pp
- Kaczmarek, I., Ehrman, J.M., Moniz, M.B.J., Davidovich, N. (2009): Phenotypic and genetic structure of interbreeding populations of the diatom *Tabularia fasciculata* (Bacillariophyta), *Phycologia* 48: 391–403
- Kalina, T., Váňa, J. (2005): *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Karolinum, Praha, 606 pp
- Kristiansen, J. (1979): Problems in classification and identification of Synuraceae (Chrysophyceae), *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie-Swiss Journal of Hydrology* 40: 310–319
- Kynčlová, A. (2007): *Molekulární fylogenetika rodu Synura (Synurophyceae, Heterokontophyta)*, Přírodovědecká Fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha, Bakalářská práce: 60 pp
- Kynčlová, A., Škaloud, P., Škaloudová, M. (2010): Unveiling hidden diversity in the *Synura petersenii* species complex (Synurophyceae, Heterokontophyta), *Nova Hedwigia, Beiheft* 136: 283-298
- Lavau, S., Saunders, G. W., Wetherbee, R. (1997): A phylogenetic analysis of the Synurophyceae using molecular data and scale case morphology, *Journal of Phycology* 33: 135-151
- Mann, D.G. (1999): The species concept in diatoms, *Phycologia* 38: 437-495

- Mann, D. G. Chepurnov, V. A., Idei, M. (2003): Mating system, sexual reproduction and auxospore formation in the anomalous raphid diatom *Eunotia* (Bacillariophyta), *Journal of Phycology* 39: 1067–1084
- 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
- Mayden, R. (2002): On biological species, species concepts and individuation in the natural world, *Fish and Fisheries* 3: 171-196
- Mayr, E. (1942) *Systematics and the Origin of Species*, Columbia University Press, New York, 315 pp
- Mayr, E. (1949b): "Speciation and Systematics," in: G.L. Jepsen, G.G. Simpson, and E. Mayr (eds.) *Genetics, Paleontology, and Evolution*. Princeton: Princeton University Press, pp 281-298
- Mayr, E. (1970): *Populations, Species, and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA
- Mayr, E. (1982): *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA and London
- Mayr, E. (1996): What is a species, and what is not?, *Philosophy of Science* 63(2):262-277
- Müller, T., Philippi, N., Dandekar, T., Schultz, J., Wolf, M. (2007): Distinguishing species, *RNA* 13: 1469-1472
- Nemjová, K., Neustupa, J., Šťastný, J., Škaloud, P. & Veselá, J. (2011): Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*, *Phycological Research* 59: 208-220
- Neustupa, J., Němcová, Y. (2007): A geometric morphometric study of the variation in scales of *Mallomonas striata* (Synurophyceae, Heterokontophyta), *Phycologia* 46: 123–130
- Paixão, T., Phadke, S. S., Azevedo, R. B. R., Zufall, R. A. (2011): Sex ratio evolution under probabilistic sex determination, *Evolution* 65: 2050-2060
- Parrow, M. V., Burkholder, J. M. (2003): Reproduction and sexuality in *Pfiesteria shumwayae* (Dinophyceae), *Journal of Phycology* 39: 697–711
- Parrow, M., Burkholder, J. M., Deamer, N. J., Zhang, C. (2002): Vegetative and sexual reproduction of *Pfiesteria* spp. (Dinophyceae) cultured with algal prey, and inferences for their classification, *Harmful Algae* 1: 5–33
- Perkins, S. L. (2000): Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*, *Proceedings of the Royal Society B* 267: 2345-2350
- Petersen, J. B., J. B. Hansen. 1956. On the scales of some *Synura* species, *Biol. Medd. Kgl. Dan. Vid. Selsk.* 23(2): 3-27
- Pichrtová, M., Němcová, Y. (2011): Effect of temperature on size and shape of silica scales

- in *Synura petersenii* and *Mallomonas tonsurata* (Stramenopiles), *Hydrobiologia*, published online
- Pouličková, A. (2008): Morphology, cytology and sexual reproduction in the aerophytic cave diatom *Luticola dismutica* (Bacillariophyceae), *Preslia* 80: 87–99
- Pouličková, A., Mann, D. G. (2008): Autogamous auxosporulation in *Pinnularia nodosa* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* 44: 350–363
- Pouličková, A., Veselá, J., Neustupa, J. & Škaloud, P. (2010): Pseudocryptic diversity versus cosmopolitanism in diatoms: a case study on *Navicula cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and morphologically similar taxa, *Protist* 161: 353–369
- Pröschold T., Leliaert F. (2007): Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches, in: Brodie J., Lewis J.M. (eds.): *Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics*, CRC Press Taylor and Francis group, pp 123–153
- Rynearson, T. A., Armbrust, E. V. (2005): Maintenance of clonal diversity during a spring bloom of the centric diatom *Ditylum brightwellii*, *Molecular Ecology* 14: 1631–1640
- Rynearson, T.A., Lin, E. O., Armbrust E. V. (2009): Metapopulation structure in the planktonic diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae), *Protist* 160: 111–121
- Sabbe, K., Cherpunov, A. V., Vyverman, W., Mann, D. G. (2004): Apomixis in *Achnanthes* (Bacillariophyceae); development of a model system for diatom reproductive biology, *European Journal of Phycology* 39: 327 – 341
- Sáez, A. G., Probert, I., Geisen, M., et al. (2003): Pseudo-cryptic speciation in coccolithophores, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100:7163–7168
- Sandgren, C.D. (1981): Characteristics of sexual and asexual resting cyst (statospore) formation in *Dinobryon cylindricum* Imhof (Chrysophyceae), *Journal of Phycology* 17: 199–210
- Sandgren, C.D., Flanagan, J. (1986): Heterothallic sexuality and density dependent encystment in the chrysophycean alga *Synura petersenii* Korsh, *Journal of Phycology* 22: 206–216
- Schlegel, M., Meisterfeld, R. (2003): The species problem in protozoa revisited, *European Journal of Protistology* 39: 349–355
- Simpson, G. G. (1951): The species concept, *Evolution* 5: 285–298
- Simpson G. G. (1958): Review of “The species problem”, *Science* 127: 245
- Simpson, G.G. (1961): *Principles of Animal Taxonomy*. Columbia University Press, New York, 247 pp
- Simpson, A. G., Roger, A. J. (2004): The real 'kingdoms' of eukaryotes, *Current biology* 14: 693–696
- Sites, J. W., Crandall K. A. (1997): Testing species boundaries in biodiversity studies, *Conservation Biology* 11: 1289–1297

- Sonneborn, T. M., (1937): Sex, sex inheritance and sex determination in *P. aurelia*, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 23: 378–385
- Sonneborn T. M. (1957): Breeding systems, reproductive methods, and species problems in protozoa, in: Mayr E.(ed.) The species problem. American Association for the Advancement of Science, pp 155–324.
- Sonneborn T. M. (1975): The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species, Transaction of the American Microscopical Society 94: 155–178
- Tibayrenc, M. (2006): The species concept in parasites and other pathogens: a pragmatic approach?, Trends in Parasitology 22: 66-70
- Tibayrenc, M., Ayala, F. J. (2002): The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on, Trends in Parasitology 18: 405-411
- Tsuchikane, Y., Ito, M., Sekimoto, H. (2008): Reproductive isolation by sex pheromones in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae), Journal of Phycology 44: 1197–1203
- Van den Hoek, Ch., Mann, D. G.; Jahns, H. M. (1995): Chlorophyta: Zygnematophyceae, in: Algae: An introduction to Phycology, Cambridge University Press, Cambridge, pp 461-468
- Vanormelingen, P., Hegewald, E., Braband, A., Kitschke, M., Friedl T., Sabbe, K., Vyverman, W. (2007): The systematics of a small spineless *Desmodesmus* species, *D. costato-granulatus* (Sphaeropleales, Chlorophyceae), based on ITS2 rDNA sequence analyses and cell wall morphology, Journal of Phycology 43: 378–396
- Vanormelingen, P., Cherpunov, A. V., Mann, D. G., Cousin, S., Vyverman, W. (2007): Congruence of morphological, reproductive and ITS rDNA sequence data in some Australasian *Eunotia bilunaris* (Bacillariophyta), European Journal of Phycology 42: 61–79
- Vanormelingen, P., Cherpunov, 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
- Van Valen, L. (1976): Ecological species, multispecies, and oaks, Taxon 25(2/3):233-239
- Volf, P., Horák, P. (2007): Paraziti a jejich biologie, Triton, Praha, 318 pp
- von Dassow, P., Montresor, M. (2010): Unveiling the mysteries of phytoplankton life cycles: patterns and opportunities behind complexity, Journal of Plankton Research 33: 3-12
- Wawrik, F. (1970): Isogamie bei *Synura petersenii* Korshikov, Archiv für Protistenkunde 112: 259-61
- Wee, J. L., Millie, D. F., Walton, S. P. (1991): Statistical characterization of growth among clones of *Synura petersenii* (Synurophyceae), Journal of Phycology 27: 570-575

Wiley, E. O. (1978): The evolutionary species concept reconsidered, *Systematic Zoology* 27: 17-26

Worden, A. Z. (2006): Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean, *Aquatic Microbial Ecology* 43:165-175

Sekundární citace:

Linnaeus, C. (1753): *Species Plantarum*, in : de Quieroz, K. (2005): Ernst Mayr and the modern concept of species. *PNAS* 102:6600-6607

Darwin, Ch. (1859): *On the origin of species by means of natural selection*, in: Ereshefsky, M. (2009): *Darwin's solution to the species problem*, Springer Science+Business Media B.V. 175:405–425