

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



**Bc. Lucie Jelínková**

**Ekofyziologická diferenciacce kryptických druhů komplexu *Synura petersenii* (Synurophyceae)**

Ecophysiological differentiation of *Synura petersenii* cryptic species  
(Synurophyceae)

**Diplomová práce**

Školitel:

doc. Mgr. Pavel Škaloud, Ph.D.

Praha 2014



**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, 11. 8. 2014

..... Lucie Jelínková

## **Poděkování**

Velmi děkuji svému školiteli Pavlu Škaloudovi za uvedení do metod algologické praxe a za neocenitelnou pomoc a připomínky při zpracování této diplomové práce. Poděkování patří také všem kolegům a mým přátelům z algologického pracoviště za příjemnou atmosféru nejen na pracovišti, ale i mimo něj. Dále musím poděkovat mé rodině za pomoc a finanční podporu během studia. Za pomoc, a hlavně za trpělivost, kterou se mnou měli, chci poděkovat mému příteli Petru Nulíčkovi a jeho rodině.



## Abstrakt

*Synura petersenii* představuje komplex pseudokryptických druhů. Jedná se o planktonní koloniální organismy náležející do taxonu Chrysophyceae. Hojně jsou na jaře a na podzim, kdy v oligo-mezotrofních sladkých vodách vytvářejí zlato-hnědé vodní květy (zákaly). V této práci byly hodnoceny růstové parametry čtyř druhů tohoto komplexu: *S. petersenii*, *S. americana*, *S. glabra* a *S. conopea* v závislosti na teplotě. Bylo provedeno a posléze statisticky analyzováno několik teplotních experimentů. Dle růstových křivek byla teplota 25 °C většinou již pro tyto organismy stresující. Jedině *S. petersenii* sensu stricto dokázala občas v této teplotě růst. Celkově se významně lišily druhy *S. petersenii* a *S. americana*. *S. petersenii* rostla v rámci všech analyzovaných experimentů nejpomaleji. Tento ubikvitní druh se pravděpodobně chová jako K- strateg. *S. americana* rostla obecně velmi rychle, a to zejména v teplotě 13 °C, která je pro ni zřejmě optimální. Dále byla zjištěna též statisticky významná kmenová specifita, která je v ekofyziologii již velmi dobře doloženým jevem. Signifikantní rozdíly v růstových rychlostech byly zaznamenány mezi teplotami 13 °C a 16 °C, takže všechny testované druhy rostly nejlépe v těchto teplotách. To je v souladu s obecně uznávaným tvrzením o relativní chladnomilnosti těchto organismů. Jediný úžeji ekologicky specializovaný druh je *S. conopea*, jenž vyhledává rašelinné biotopy. Zjištěná fakta jsou v souladu s již publikovanými informacemi o distribuci těchto druhů.

Klíčová slova: distribuce, druhový komplex, ekofyziologie, kmenová specifita, rychlosti růstu, *Synura petersenii*, teplota

## Abstract

*Synura petersenii* represents a complex of pseudo-cryptic species. These are planktonic colonial organisms belonging to the class Chrysophyceae. The species are abundant in spring and autumn, when they produce golden-brown blooms in oligo-mesotrophic waters. In this thesis, I focused on investigating the effect of temperature to growth parameters of four selected species: *S. petersenii*, *S. americana*, *S. glabra* and *S. conopea*. Several temperature experiments were performed and statistically analyzed. According to growth curves the temperature 25 °C was mostly stressful for these organisms. Only *S. petersenii* sensu stricto was sometimes able to growth at this temperature. In general, the significant differences in growth rates were detected between *S. petersenii* and *S. americana*. In all experiments, *S. petersenii* had the lowest growth rate. This ubiquitous species probably acts as a K-strategist. *S. americana* grew generally very quickly, especially at temperature 13 °C that is obviously optimal for it. Further, I observed a significant strain specificity, which is largely a well-known phenomenon in the ecophysiology. Significant differences in growth rates were noted between temperatures 13 °C and 16 °C, where all tested species grew best, as well. This is in accordance with a general recognition of *Synura* species as psychrophilic organisms. *S. conopea* is perhaps a sole species having narrow ecological niche, preferring peat biotopes. My observations are in agreement with formerly published data concerning the distribution of these organisms.

Key words: distribution, ecophysiology, growth rates, species complex, strain specificity, *Synura petersenii*, temperature

# Obsah

1. Úvod.....	3
1.1 Skrytá diverzita.....	3
1.1.1 Obecné příčiny kryptické diverzity.....	3
1.1.2 Kryptická diverzita protist – proč je důležité ji rozumět.....	4
1.1.3 Skrytá diverzita protist a environmentální sekvence.....	5
1.2 Druhové určení - Chrysophyceae.....	6
1.2.1 Základní definice a klasifikace zlativek s křemičitými šupinami.....	6
1.2.2 Morfologický druhový koncept zlativek s křemičitými šupinami.....	7
1.2.3 Molekulární koncept druhu u šupinatých zlativek.....	8
1.2.4 Diverzita v rámci druhového komplexu <i>Synura petersenii</i> .....	10
1.3 Ekofyziologické odlišení druhů .....	13
1.3.1 Teplota jako faktor prostředí.....	13
1.3.2 Ekofyziologické studie u Chrysophyceae.....	15
2. Cíle diplomové práce.....	17
3. Metodika.....	18
3.1 Kultivační experimenty.....	18
3.1.1 Použité kmeny a kultivace.....	18
3.1.2 Průběh experimentů.....	20
3.2 Analýza teplotních experimentů.....	22
3.2.1 Kvantifikace růstu kultur.....	22
3.2.2 Statistické analýzy.....	22
4. Výsledky.....	24
4.1 Charakteristiky odběrových míst a použitých kmenů.....	24
4.2 Základní růstové parametry kmenů.....	26
4.3 Poznatky o růstových rychlostech.....	27
4.4 Statistické analýzy růstových rychlostí.....	29
4.4.1 Pokusy s druhy <i>Synura petersenii</i> , <i>S. americana</i> a <i>S. glabra</i> .....	29
4.4.2 Pokusy s druhy <i>Synura petersenii</i> , <i>S. americana</i> a <i>S. conopea</i> .....	33
5. Diskuse.....	36
5.1 Teplota na lokalitách a biogeografie.....	36
5.2 Základní růstové parametry – ekofyziologické studie.....	38
5.3 Růstové rychlosti.....	41
5.3.1 Kvantifikace růstových rychlostí.....	41
5.3.2 Teplotní optimum růstu in vitro – mezidruhové rozdíly.....	42
5.4 Jiné vlivy teploty na fototrofy.....	48
5.5 Mezidruhové rozdíly – reprodukční izolace?.....	51
6. Závěr.....	52
7. Reference.....	53
8. Přílohy.....	60

# 1. Úvod

## 1.1 Skrytá diverzita

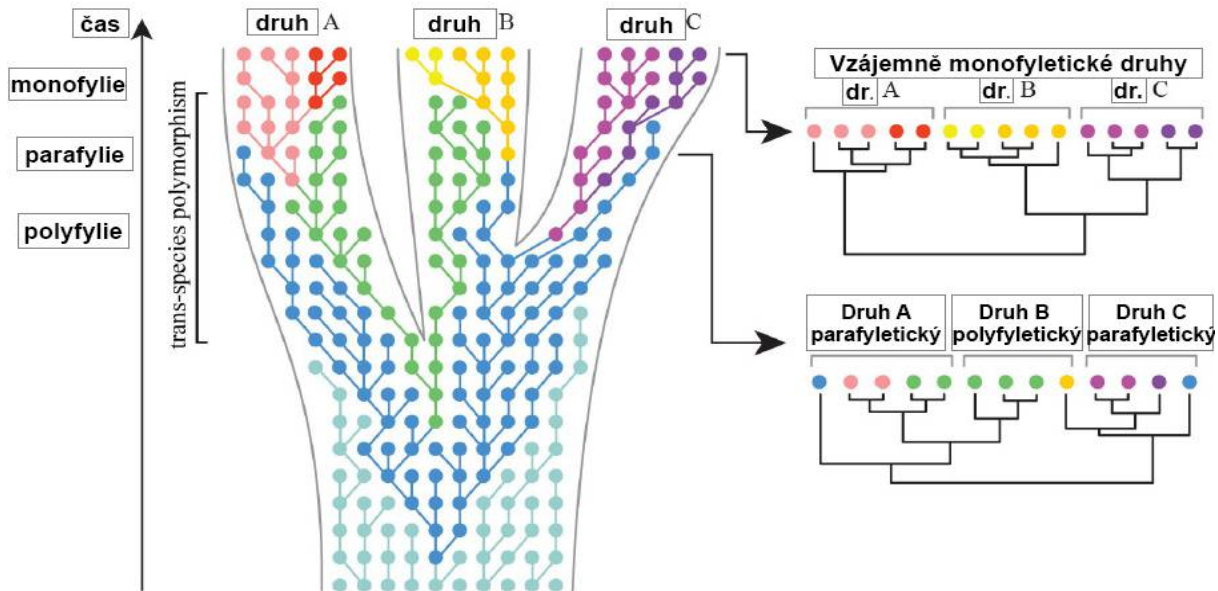
### 1.1.1 Obecné příčiny kryptické diverzity

Kryptická či skrytá diverzita představuje existenci kryptických druhů. Kryptické druhy se nejčastěji definují jako druhy, jenž byly klasifikovány jako jeden nominální druh, jelikož jsou morfologicky nerozeznatelné. Navíc existují různé obměny tohoto pojmu jako sibling druhy či pseudokryptické druhy. Pojem pseudokryptické druhy poukazuje na přítomnost minoritních morfologických rozdílů mezi druhy. Obecně je zajímavé, že se často jedná o druhy blízce příbuzné, což je právě zahrnuto i v pojmu sibling - sourozenecké (Bickford et al. 2006). Co však způsobuje tento zmatek? Člověk se od počátku svých snah o rozlišení a popis organismů vždy řídil spíše vizuálními znaky. I Charles Darwin rozlišoval druhy na základě „mezer v morfologii“ (Ereshefsky 2009). Tento jev má velmi jednoduchou příčinu: většina sensorických informací zpracovávaná lidským mozkem je právě vizuálního charakteru. To vysvětluje, proč jsou „vzhledové znaky“ čili morfologické charakteristiky více využívané než chemické či zvukové pro klasifikaci druhů (Bickford et al. 2006). Je tedy přirozené, že prvním druhovým konceptem je morfologický druhový koncept. Nicméně s rozvojem techniky se rozvíjejí i jiné způsoby klasifikace a existující jsou zdokonalovány (Leliaert et al. 2014). V současnosti existuje velké množství druhových konceptů (Mallet 2007) a také snahy o jejich unifikaci (de Queiroz 2007; Leliaert et al. 2014). Nejčastěji se využívají morfologický, biologický a fylogenetický druhový koncept a jejich společné kombinace (Bickford et al. 2006; de Queiroz 2007; Leliaert et al. 2014; Škaloud et al. 2013). Ovšem je několik důvodů, proč nemusejí být změny v morfologii použitelné při diskriminaci druhů. Dva základní, specifické jsou: kryptické druhy se diferencují nevizuálními sexuálními signály nebo pod selekcí podporující morfologickou stázi. Nevizuální sexuální signály představují např. rozdíly v pohlavních feromonech. Morfologická stáze může být zase způsobena extrémními podmínkami prostředí, a to jak biotickými – (hyper)parazitismus, tak abiotickými (Bickford et al. 2006). Také speciace je velmi komplexní proces. **Obr. 1** ukazuje, jak je speciace složitá v čase byť jen z hlediska genetické informace. U „mladých“ linií, jako jsou třeba *Coccolithophora* (Saéz et al. 2003), ještě například nemuselo dojít k morfologickému rozlišení. A tyto linie jsou tedy klasifikovány na základě rozdílů v sekvencích DNA či reprodukční inkompatibilitě (Bickford et al. 2006; de Queiroz 2007; Leliaert et al. 2014). Nicméně existují taxony jako mlži či kopepodi se starobylými kryptickými druhy (Bickford et al. 2006). Takže zdůvodnění skryté diverzity může být v mnohých případech mnohem prozaičtější. Mnoho kryptických druhů má poměrně morfologicky prostou stavbu (nematodi), chybí jim znaky pro diskriminaci. Také organismy které vysílají reprodukční signály nevizuálně (zvukem, vibracemi, feromony) skýtají možná větší potenciál kryptické diverzifikace, protože změny těchto



vlastností nevyžadují změnu morfologie (Bickford et al. 2006).

Pro protista platí totéž, mají ve srovnání s mnohobuněčnými jednodušší stavbu a také či právě proto vysílají nevizuální signály. Například jen v rámci fotoautotrofních protist existuje množství taxonů, jejichž sexuální rozmnožování řídí feromony či se to předpokládá (Blackburn, Tyler 1987; Sandgren, Flanagan 1986; Tsuchikane et al. 2008; Watson 2003).



**Obr. 1:** Neutrální koalescence jako proces v rámci fylogenetického stromu: koalescence je „splývání“ genetických linií směrem k nejvíce „nejmladšímu“ společnému předku; body představují individuální kopie genu, různé barvy různé alely, čáry spojují kopie genu s jeho „předkem“ v předchozí generaci. V iniciálním stádiu rozdělování linií sesterské druhy sdílí velké množství alel, což má velký význam pro delimitaci druhů. V tomto případě konstrukce fylogenetického stromu v počáteční fázi speciace nepovede k žádné monofyletické linii. Až po uplynutí dostatečně dlouhé doby budou alely kompletně rozříděny, což vyústí ve vzájemnou monofylii všech tří druhů. Převzato z Leliaert et al. 2014.

### 1.1.2 Kryptická diverzita protist – proč je důležité ji rozumět

V poslední době se publikuje velké množství studií, které se zabývají skrytou diverzitou různých taxonů (Bickford et al. 2006; Leliaert et al. 2014); zvláště to platí pro protista. První ukázky protistní kryptické diverzity znamenala aplikace biologického druhového konceptu u nálevníků (Ciliophora) (Sonnenborn 1975) a krásivek (Desmidiaceae) (Blackburn, Tyler 1987) a možná ještě dříve u rozsivek (Mann 1999). Vynález a využití PCR a dalších molekulárních metod výrazně urychlil tento vývoj (Bickford et al. 2006; de Queiroz 2007; Leliaert et al. 2014). Komplexy kryptických druhů byly zjištěny snad ve všech skupinách protist (Leliaert et al. 2014). Neznalost takové již rozsáhlé morfologicky nerozlišitelné diverzity nás však může omezovat či dokonce přijít draho. Správná identifikace druhů obecně je totiž zásadní pro biologickou kontrolu, diagnózu a prevenci nemocí a identifikaci druhů invazivních či škůdců (Bickford et al. 2006). Perkins (2000) zjistila, že původce malárie *Plasmodium azurophilum* představuje komplex dvou kryptických druhů, z nichž jeden napadá pouze červené krvinky a druhý bílé. Také nejčastější

vektor rodu *Plasmodium* komár *Anopheles* představuje komplex sedmi kryptických druhů, které se liší habitatem a hostitelskou preferencí (Besansky 1999, Bickford et al. 2006), a tak představují potenciál pro vyšší skrytou diverzitu u rodu *Plasmodium* (Tibayrenc, Alaya 2002). Některé z druhů komplexu napadají pouze zvířata a ne člověka. Pokud bychom se tedy zaměřili na eradikaci pouze lidských patogenů, mohly by být peněžní zdroje vynaloženy mnohem efektivněji. Že skrytá diverzita není jen diverzitou na úrovni druhů, ale i diverzitou na populační úrovni, mohou dokládat molekulární markery s vysokou mutační rychlostí (Coleman 2003). Nejasné bývá v těchto případech jen to, jaké taxonomické úrovně dosahují takto rozlišené linie. Z praktického hlediska je však důležité, zda jsme nějak schopni rozlišit linie, které jsou škodlivé či ne. U obrněnek (Dinophyceae), které vytvářejí toxické vodní květy, se zjistilo, že některé linie vytvářejí toxiny a jiné ne (Anderson 1998). Takové subpopulace či linie se mohou navíc vyskytovat v jiných geografických oblastech a být reprodukčně nekompatibilní (Blackburn et al. 2001). Také parazit *Toxoplasma gondii* vytváří linie s různou virulencí (Grigg et al. 2001).

Existence druhových komplexů ovlivňuje též využití bioindikačních protist (Bickford et al. 2006). Ku příkladu Coesel (2001) uvádí některé druhy krásivek jako indikátory pro různé specifické a v krajině důležité typy rašelinných biotopů. V současnosti jsou publikovány studie dokládající komplexy druhů právě u krásivek (Nemjová et al. 2011). To může teoreticky zkomplikovat využitelnost indikátorových organismů nebo ji naopak vylepšit. Například některé druhy zlativek (Chrysophyceae) slouží jako bioindikátory oligotrofie a nižšího pH (Cumming et al. 1991; Zeeb, Smol 2001). Jiné, které byly dříve definovány jako druhy s širokou ekologickou valencí, představují komplexy druhů, z nichž některé jsou definovány právě svou ekologií (Škaloud et al. 2012, Škaloud et al. 2014).

### **1.1.3 Skrytá diverzita protist a environmentální sekvence**

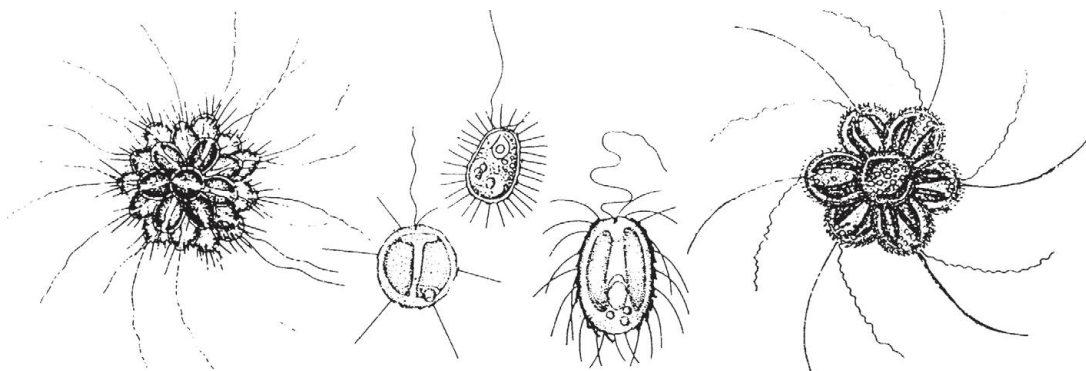
Asi nejnápadnější je skrytá diverzita linií – v širším slova smyslu - při environmentálním sekvenování, jehož vývoj akceleruje s rozvojem molekulárních metod (Campo, Massana 2011; Pawlowski et al. 2011). Stejně jako jsou dané linie organismů neprozkoumané, může být nepoznané i jejich životní prostředí, což má také vliv na přítomnost kryptické diverzity v něm. Právě z tohoto důvodu objevili Pawlowski et al. (2011) na základě sekvenace 18S rDNA v sedimentu hlubokomořského dna přes 7000 nových linií. Avšak valná část celkového množství sekvencí byla velmi dobře známá a patřila dobře probádaným taxonům, např. rozsivky, haptofyta. Jiné trendy ukazuje studie Campo, Massana (2011), která analyzovala sekvence téhož genu u zlativek (Chrysophyceae), trubének (Choanoflagellata) a bicosecidů (Bicosoecida). V rámci těchto taxonů se nachází největší množství heterotrofních bičíkovců, kteří jsou v mořích důležití v potravních řetězcích svou

fagotrofií prokaryot či pikoeukaryot. Jsou to také organismy výrazné a studované ve sladkovodních ekosystémech, jelikož zde vytvářejí bohaté populace klonů. Nicméně většina environmentálních sekvencí, hlavně mořské, byla vzdálená od sekvencí organismů, jež se dají pěstovat v kulturách, a i od podobných sekvencí z jiných studií. Kryptická diverzita byla přítomná i u organismů, které jsou dobře kultivovatelné a tudíž poměrně dobře prozkoumané, např. rod *Paraphysomonas* (Campo, Massana 2011). To vše indikuje stále neobjevenou a výraznou, „pod-analyzovanou“, skrytou diverzitu těchto skupin. Tento fenomén je zvláště zářející u chrysofyt, jež jsou hojně studována (Boo et al. 2010; Kynčlová et al. 2010; Lavau et al. 1997; Škaloud et al. 2012; Škaloud et al. 2013; Škaloud et al. 2014). A právě kryptickou diverzitou u nejstudovanějšího chrysofytního fotoautotrofa se zabývá následující kapitola.

## 1.2 Druhové určení - Chrysophyceae

### 1.2.1 Základní definice a klasifikace zlativek s křemičitými šupinami

Chrysofytní organismy nesoucí na svém povrchu buněk křemičité šupiny patří v současnosti do třídy Chrysophyceae (Sramenopila) a jsou součástí dvou taxonů Synurales (Škaloud et al. 2014) a Paraphysomonadaceae (Lavau et al. 1997). Nejběžnější rody *Synura* a *Mallomonas* jsou sezónně se vyskytující fytoplanktonní bičíkovci sladkých vod, často preferující oligotrofii případně nižší pH (Cumming et al. 1991; Kristiansen 2008; Zeeb, Smol 2001). Další často studované rody jsou *Chrysosphaerella*, *Spiniferomonas*, *Paraphysomonas*. Základní morfologické schéma nejdůležitějších šupinatých zlativek ukazuje **Obr. 2**.



**Obr. 2:** Základní morfologické schéma nejvýznamnějších šupinatých zlativek (Zleva): *Chrysosphaerella*, *Spiniferomonas*, *Paraphysomonas*, *Mallomonas*, *Synura*, převzato z Škaloud et al. 2013.

Jak je vidět, rody *Synura* a *Chrysosphaerella* jsou koloniální, podobně jako ne tak běžné rody *Tessellaria* a *Chrysodidymus*. Dle způsobu výživy jsou výhradními fototrofy organismy patřící do taxonu Synurales: *Synura*, *Mallomonas*, *Tessellaria* a *Chrysodidymus* (Lavau et al. 1997). Synurales měl několik desítek let dokonce status samostatné třídy blízce příbuzné zbytku Chrysophyceae. Synurophyceae byly oficiálně vyčleněny Andersenem (1987, 1989) na základě několika znaků: přítomnosti chlorofylu  $c_1$ , absence stigmatu, paralelního umístění bazálních tělísek,

redukovaných bičíkových kořenů a odlišné stavby a vzniku křemičitých šupin (Kristiansen 2008; Lavau et al. 1997). Existují také názory, že se jedná pouze o přizpůsobení se striktní fototrofii, protože ostatní zlativky jsou mixotrofní (Olrik 1998). Lavau et al. (1997) ukázali monofylii tehdejší třídy Synurophyceae, ale nepodařilo se jim definovat vztah mezi Synurophyceae a Chrysophyceae, a to ani na základě kombinace morfologie šupin a 18S rDNA fylogenetického stromu. Autoři došli pouze k závěru, že se jedná o blízké taxony. Jejich kombinovaná fylogeneze sice podpořila monofylii rodů *Mallomonas* a *Synura*, ale s velmi slabou podporou. Fylogeneze založená čistě na genetické diverzitě doložila pouze rozdělení rodů do několika sekcí.

### 1.2.2 Morfologický druhový koncept zlativek s křemičitými šupinami

Jako u jiných organismů i u šupinatých zlativek byly první pokusy o taxonomickou klasifikaci založeny na základních morfologických znacích (Bickford et al. 2006; Škaloud et al. 2013). Jelikož dosahují tyto organismy velikosti jen několika  $\mu\text{m}$ , musí být k jejich detekci a klasifikaci použit světelný mikroskop. Původní rodové a druhové určení bylo tedy založeno například na poznacích o typu stélky (koloniální, jednobuněčná), barvě buněk (bezbarví heterotrofové) a základním tvaru a hrubé struktuře buněk – konec 18. a 19. století (Lavau et al. 1997; Škaloud et al. 2013). Systematika těchto organismů zaznamenala zvláště velký rozvoj ve 20. století. V důsledku příliš hrubého zobrazení a nutné subjektivitě systematiků docházelo již v počátcích k různým zmatečným klasifikacím. Jen rod *Synura* jevil dostatečně deviantní strukturu buňky, která by mohla být využita jako taxonomický znak, viz. *Synura sphagnicola* původně popsaná dokonce jako nezávislý rod *Skadowskiella* (Korshikov 1927).

Jak je vidět, časnou taxonomií těchto rodů znemožňovala absence dostatečně spolehlivých rozlišovacích znaků. Průlom přinesla až činnost Petersena na počátku 20. století. Petersen vysušil a obarvil materiál s domnělým druhem *Synura uvella* a zjistil, že její buňky pokrývají křemičité šupiny s typickou morfologií (Petersen 1918). Korshikov se nechal touto metodou inspirovat a popsal tak několik dalších druhů rodu *Synura* (Korshikov 1929). Zjistil též, že Petersenova *S. uvella*, není identická s organismem popsaným Steinem, jelikož postrádá ostnaté struktury na povrchu buněk. A tak ji popsal jako *S. petersenii*. Tento koncept byl posléze přijat vznikajícími určovacími klíči. Obdobný vývoj zaznamenala klasifikace ostatních rodů (Škaloud et al. 2013).

Všechna tato zkoumání probíhala pod světelným mikroskopem, který ale není schopen rozlišit struktury menší než  $0,2 \mu\text{m}$ . Proud elektronů s kratší vlnovou délkou má však 1000-krát lepší rozlišovací schopnost, a tak od 50. let 20. století začala elektronová mikroskopie sloužit jako důležitý nástroj pro klasifikaci těchto organismů (Petersen, Hansen 1956, Kristiansen 1979; Škaloud et al. 2013). Dnes existuje mnoho studií využívajících pro kombinovanou identifikaci druhů jeden ze dvou typů elektronového mikroskopu: transmisní (TEM) a skenovací (SEM) (Boo et

al. 2010; Kynčlová et al. 2010; Lavau et al. 1997; Pichrtová, Němcová 2011; Siver et al. 2013; Siver, Lott 2012; Siver, Wolfe 2005; Škaloud et al. 2012; Škaloud et al. 2013; Zeeb, Smol 2001). Tento druhový koncept založený na morfologii šupin bývá obecně považován za jeden z nejlepších k delimitaci druhů protist. Nicméně správné identifikaci druhů může být bráněno existencí vnitrodruhové variability a plynulými morfologickými gradienty ve strukturách šupin (Kristiansen 1979).

V posledních desetiletích se kombinuje maximální množství klasifikačních konceptů a hledají se korelace znaků: jako sexuální kompatibilita a fylogeneze nebo morfologie a fylogeneze atd. U zlativek se dnes využívá zejména kombinace sekvenace několika genů a morfologického konceptu, jenž je založen na elektronové mikroskopii křemičitých šupin (Boo et al. 2010; Kynčlová et al. 2010; Lavau et al. 1997; Škaloud et al. 2012; Škaloud et al. 2013).

Tento chrysofytní morfologický koncept má v důsledku svého historicky delšího využívání (Petersen, Hansen 1956) mnohem širší záběr. Nejenže jsou v jeho rámci popisovány nové druhy, ale druhy již popsáné s publikovanými zobrazeními šupin mohou být určeny dle nejnovějšího systému. To může být přínosné v ekofyziologii (Wagenmann, Gutowski 1995) či při studiu biogeografie (Škaloud et al. 2012; Škaloud et al. 2013; Škaloud et al. 2014).

### 1.2.3 Molekulární koncept druhu u šupinatých zlativek

S rozvojem DNA analýz a sekvenování souvisí boom studií, jež využívají DNA pro určení monofyletických linií na různých taxonomických úrovních. U chrysofyt s křemičitými šupinami se začal tento koncept využívat k vyhodnocení minoritních rozdílů v morfologii křemičitých šupin. Organismy vykazující tyto rozdíly byly někdy klasifikovány jako druhy např. *Synura glabra* a *S. petersenii* (Petersen, Hansen 1956), jindy jako formy či variety např. *S. petersenii* var. *glabra* (Kristiansen 1979; Wagenmann, Gutowski 1995). Navíc se tento koncept dá využít i pro objasnění vztahů mezi organismy a pro osvětlení možných způsobů speciace (Boo et al. 2010; de Queiroz 2007; Kynčlová et al. 2010; Lavau et al. 1997; Škaloud et al. 2012; Škaloud et al. 2013).

První fylogenetickou studii zabývající se pouze chrysofyty s šupinami publikovali Lavau et al. (1997). Autoři isolovali 18S rDNA gen pro 17 druhů zlativek a na základě sekvencí neshledali rody *Mallomonas* a *Synura* monofyletické. O dva roky později byla zkoumána pozice heterotrofního rodu *Paraphysomonas*. Analýza potvrdila nezávislý původ křemičitých šupin u Synurales a Paraphysomonadaceae. Andersen et al. (1999) včleňují Synurophyceae do Chrysophyceae jako jednu ze sedmi linií této třídy, což spolu s absencí bootstrapové podpory pro existenci dvou nezávislých tříd poprvé zpochybňuje status Synurophyceae jako samostatné třídy. Později se přidávají do analýz další geny např. *rbcL*, nicméně pozice tehdejší Synurophyceae

a monofylie rodů *Mallomonas* a *Synura* zůstaly nedořešené (Škaloud et al. 2013). Škaloud et al. (2013) uvádějí možné důvody selhání konstrukcí fylogeneze s využitím *rbcL* genu. Jelikož se jedná o gen velké RUBISCO podjednotky, existuje hypotéza, že může být pod významnou pozitivní selekcí. Ta by mohla vést k fixaci různých adaptivních mutací v různých podmínkách prostředí, což bylo prokázáno u sinic a vyšších rostlin. Adaptivní evoluce tohoto genu, kterou indukovala fyziologická přizpůsobení na pokles obsahu CO<sub>2</sub> v atmosféře, byla navržena dokonce jako hypotéza diverzifikace Chromist - Stramenopil (Young et al. 2012).

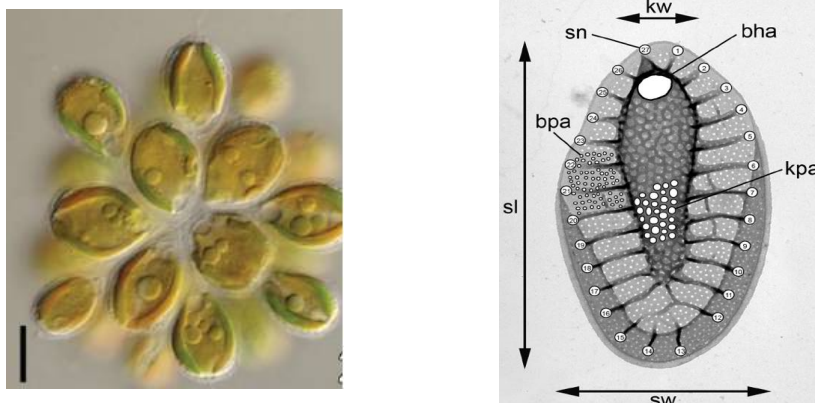
V poslední době se obecně pro rozlišování druhů u fototrofních protist využívá ITS marker (Amato et al. 2007; Vanormelingen et al. 2007; Vanormelingen et al. 2008; Kynčlová et al. 2010). Jedná se o část rDNA, která je relevantní zvláště na úrovni vnitro – či mezi – druhových rozdílů (Godhe et al. 2006; Müller et al. 2007). Nejenže se jako zbytek rDNA vyskytuje v jádře ve velkém množství kopií, ale pro některá hlavně fototrofní protista byl prokázán vztah mezi určitou mírou reprodukční izolace a specifickými záměnami – tzv. CBCs (compensatory base changes), které jsou patrné v sekundární struktuře ITS2 (Coleman 2000, Coleman 2002; Coleman 2003). Nejprve byl tento vztah prokázán u řádu Volvocales (Coleman 2000). O něco později byl zjištěn u rodu *Closterium* (Desmidiaceae), u řádu Laminariales, některých kvetoucích rostlin a mořských organismů. V literatuře bylo nalezeno okolo 1300 organismů, pro něž platí tento vztah: nachází-li se konzervativní část ITS2 byt jen jediná CBC při porovnávání ITS2 u dvou organismů, existuje 93 % pravděpodobnost, že se jedná o rozdílné druhy (Müller et al. 2007). Wolf et al. (2013) doložili u rostlin, že tato pravděpodobnost může být až 99 %. Stejný vztah byl prokázán u některých rozsivek (Pouličková et al. 2010). Také existují důkazy pro vnitřní bariéry genetického toku mezi organismy zvláště na nízkých úrovních divergence mezi jejich ITS2 strukturami (Denbohn et al. 2003; Vanormelingen et al. 2009). Je důležité podotknout, že aplikovatelnost CBC druhového konceptu se opírá o vzájemnou homologii sekundárních struktur ITS2 mezi zkoumanými organismy, jinak by nebylo možné je srovnávat. Nicméně existují organismy, jenž mají takové ITS2 sekundární struktury, pro něž je tedy tento druhový koncept neaplikovatelný. Takové „deviantní“ struktury jsou známy např. z živočišné říše. Pro tři druhy vektora schistosomatózy bylo zjištěno, že na dva z nich může být CBC koncept aplikován, ale na jednoho z nich ne - právě díky nesrovnatelnosti sekundárních struktur (Jørgensen et al. 2013). Dále existují organismy, které nevykazují žádné CBC i mezi dobře rozlišitelnými druhy, což dokládají Caisová et al. (2011) a Caisová et al. (2013) pro Ulvales - Chlorophyta. Ovšem ITS jako molekulární marker na druhové úrovni je, dle mého názoru, stále využitelný, protože je v genomu obsažen ve velkém množství kopií a rychle mutuje (Caisová et al. 2013; Coleman 2003); proto se také hojně používá jako jeden z molekulárních indikátorů druhové diference u zlativek rodu *Synura* (Kynčlová et al. 2010;

Škaloud et al. 2012; Škaloud et al. 2014).

V současnosti vznikají i fylogeneze šupinatých zlativek založené na několika genech – multigenové, interpretují se na základě kongruentních stromů dokonce v kombinaci s jinými znaky – morfologií, atd. (Boo et al. 2010, Škaloud et al. 2012; Škaloud et al. 2013; Škaloud et al. 2014).

#### 1.2.4 Diverzita v rámci druhového komplexu *Synura petersenii*

*Synura* je z chrysofyt s křemičitými šupinami nejnápadnější, vytváří kolonie, v nichž je variabilní počet buněk posteriorně spojen. Vyskytuje se ve fytoplanktonu oligo- až mezotorfních stojatých vod hlavně na jaře a na podzim (Kristiansen 2008), někdy i v zimě pod ledem (Yubuki et al. 2008). Obecně slouží jako bioindikátory nižších teplot vody (Bradley 1964; Kristiansen 2008), některé druhy indikují také nižší pH např. *S. sphagnicola* (Cumming et al. 1991). Křemičité šupiny se často uchovávají v sedimentu, proto je *Synura* využívána v paleolimnologii, podobně jako její cysty (Cumming et al. 1991; Zeeb, Smol 2001). U cyst je však velký problém přiřadit ke každé cystě druh původce. Dle nálezů fosilizovaných křemičitých šupin – mikrofosilií je možné detekovat vývoj rodu v čase. Nejstarší mikrofosilie byly nalezeny v Severní Americe na dvou nalezištích, z nichž jedno je z Eocénu a druhé z Paleocénu. Většina mikrofosilií byla podobná či naprosto schodná se šupinami existujících druhů ze sekce *Synura* a *Peterseniae*. Jen *Synura petersenii* morfortyp byl nalezen pouze na nalezišti z Paleocénu. Druh *S. cronbergiae*, který představuje jeden ze dvou nalezených vyhynulých druhů (Siver 2013), zde byla také nalezena. Vše dokládá, že dvě hlavní sekce rodu byly dobře ustaveny již v časném Cenozoiku (třetihory) (Siver et al. 2013). Podobné závěry přinesl i výpočet molekulárních hodin (Boo et al. 2010).



**Obr. 3:** Vlevo kolonie *S. petersenii* sensu lato (úsečka – 1  $\mu\text{m}$ ), vpravo její šupina: sl-délka šupiny, sw-šířka šupiny, kw-šířka kýlu, bha-velikost „otvoru“, sn-počet podpěr, kpa-plocha pórů kýlu, bpa-plocha pórů basální desky, Převzato z Škaloud et al. (2012) a Škaloud et al. (2014).

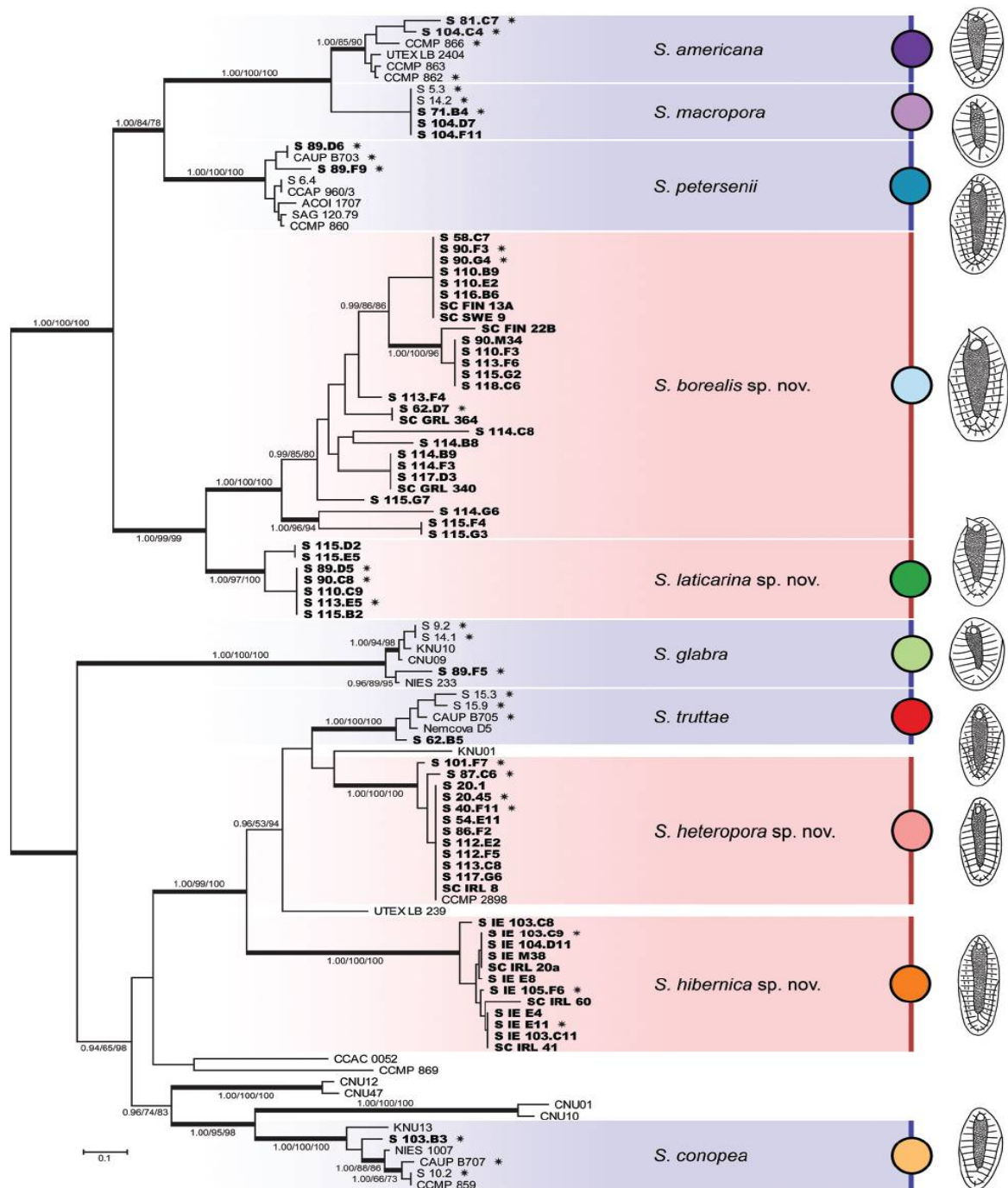
Rod je dnes členěn do pěti sekcí: Echinulatae, Peterseniae, Spinosae, Splendidae a *Synura* (*Uvella*). Taxony náležející do sekce *Peterseniae* jsou dobře charakterizovány „tělovými“ šupinami s centrálním kýlem, jenž může být zakončen strukturou podobnou hrotu (**Obr. 3**). Dlouho se specialisté domnívaly, že *Synura petersenii* sensu lato má širokou ekologickou valenci a rozšíření

(Škaloud et al. 2013). Existuje několik ekofyziologických studií, jež se snažily prověřit bioindikační schopnosti či vztahy mezi jednotlivými varietami morfotypu *Synura petersenii* (Kim et al. 2008; Saxby-Rouen et al. 1997; Wee et al. 1991).

Protože se *Synura petersenii* sensu lato poměrně dobře pěstuje v laboratoři a jeví se jako všudypřítomná, provedlo se právě na ni několik fylogenetických studií. První analýzu provedl Wee et al. (2001), studie zkoumala genetickou variabilitu v ITS rDNA 15 kmenů z různých geografických oblastí. Byla nalezena existence dobře podpořených linií, z nichž jedna měla kosmopolitní rozšíření a druhá byla izolována v Severní Americe. Kynčlová et al. (2010) provedli stejnou analýzu na rozšířeném data-setu 21 isolátů, která odhalila existenci šesti rozdílných linií. Navíc výsledky z tradiční morfologické analýzy a geometrické morfometriky byly v souladu s ITS fylogenezí, což dokládalo existenci kryptických druhů. Téměř současně byla publikována studie Boo et al. (2010), která po provedení multigenových analýz více než 100 isolátů také doložila existenci kryptické diverzity na druhové úrovni. Její výsledky stejně jako výsledky první studie indikovaly existenci kosmopolitních linií a linií endemických. Dva roky na to byla publikována další studie, která morfologicky definovala šest (pseudo)kryptických druhů doložených Kynčlovou et al. (2010) (Škaloud et al. 2012). Druhy byly morfologicky rozlišeny na základě minoritních rozdílů na křemičitých šupinách. Tyto znaky byly navíc v souladu s fylogenetickým stromem vytvořeným na základě několika genů. Na základě dalších morfologicko – fylogenetických analýz byly i jiné pod-druhové kategorie převedeny na druhové, takže druhový komplex *Synura petersenii* sestává dnes z těchto druhů: *Synura petersenii*, *S. americana*, *S. macropora*, *S. glabra*, *S. truttae*, *S. conopea*, *S. borealis*, *S. laticarina*, *S. heteropora*, *S. hibernica*, *S. bjoerkii*, *S. asmudiae* (Škaloud et al. 2012; Škaloud et al. 2013; Škaloud et al. 2014). Nicméně některé popsané taxony sekce *Peterseniae* nejsou ještě molekulárně charakterizovány, takže skrytá diverzita v rámci sekce může být větší. Jsou to například: *S. petersenii* f. *columnata*, *S. petersenii* f. *prae fracta*, *S. petersenii* f. *taymyrensis* a *S. obesa*. Fylogenetický strom 10 druhů se základními typy šupin ukazuje **Obr. 4** (Škaloud et al. 2014). Studie také dokládá znaky, kterými se jednotlivé druhy liší včetně biogeografie. Na šupinách byly definovány tři nejlepší rozlišovací znaky: šířka kýlu, počet podpěr (struts), plocha pórů na bazální desce, další velmi dobrý rozlišovací znak bylo relativní množství propojení mezi podpěrami či tvar šupin a buněk. Nejhůře rozlišitelnou dle všech znaků na šupinách je *S. conopea*. Dobře se i jen dle tvaru buněk a kolonií pod mikroskopem dají rozlišit *S. hibernica* a *S. borealis* (Škaloud et al. 2014). Co se týče biogeografie široce rozšířené jsou druhy *Synura petersenii* sensu stricto, *S. glabra* a *S. conopea*. *S. truttae* byla zatím nalezena jen v ČR a USA. Dle morfologických dat byla *S. macropora* nalezena v některých Evropských státech a Brazílii. Domnělý severoamerický endemit *S. americana* byl nalezen též v Evropě a Jižní Americe (Škaloud



et al. 2012). Čtyři nově vymezené druhy byly objeveny jen v Evropě a v Grónsku, tři z nich vykazují omezenou distribuci. Blízce příbuzné druhy *S. borealis* a *S. laticarina* jsou rozšířené v severní Evropě a *S. borealis* i v Grónsku, což ukazuje na absenci limitace disperze. Jsou také možné adaptace na chladnější teploty, jejich distribuce může být limitována vysokými letními teplotami. *S. hibernica* představuje striktního endemita západního Irsku, nebyla dokonce nalezena ani v ekologicky shodných nikách stejné zeměpisné šířky a klimatu ve Skotsku. *S. heteropora* má opět širší rozšíření (Škaloud et al. 2014). To odpovídá již dříve uvedeným charakteristikám rozšíření komplexu *Synura petersenii*.



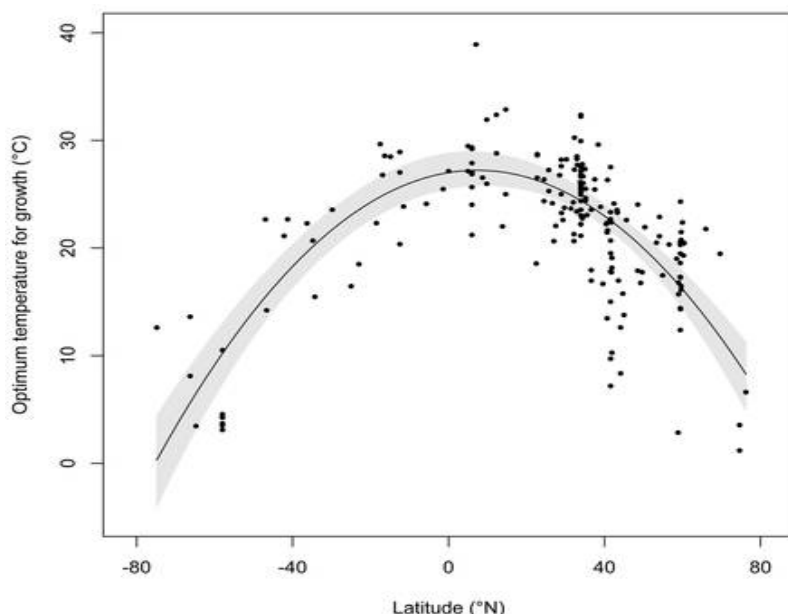
**Obr. 4:** Fylogeneze Peterseniaceae - analýza sekvencí ITS, rbcL a cox1, hodnoty vyjadřují statistickou podporu metodami MrBayes, ML, MP, kmeny pro morfologické analýzy značí \*, dle Škaloud et al. (2014).

### 1.3 Ekofyziologické odlišení druhů

Ekologický druhový koncept definuje druh jako skupinu organismů, jenž obývají jednu niku. Nika přitom představuje abiotické a biotické faktory prostředí, v němž druh vykonává svou funkci v ekosystému. Abiotické faktory jsou teplota, pH, světlo atd. a biotické představují např. predátoři a parazité (Mallet 2007). Ekologická speciace probíhá právě díky rozvoji rozdílů v preferencích určitých faktorů prostředí (de Queiroz 2007). Jedná-li se o diferenciaci na základě abiotických faktorů, tzv. environmentálních parametrů, nazýváme ji ekofyziologickým rozlišováním. Z tohoto důvodu se, i přes omezenou kultivovatelnost protist (Campo, Massana 2011), studují vztahy růstových parametrů populací a environmentálních parametrů *in vitro*. Nejčastěji se zaznamenávají a analyzují růstové rychlosti či tvary růstových křivek. Míra odlišnosti růstových charakteristik může být dále testována statisticky. Tento výzkum ekofyziologie se provádí na různých úrovních diverzity. Ekofyziologií nepříbuzných druhů se zabývali: Coles, Jones (2000); Moser, Weisse (2011); Peters, Breeman (1992); Vijayakumaran et al. (2001). Ekofyziologické rozdíly mezi blízkými příbuznými druhy či druhy druhových komplexů zkoumali: Degerlund et al. (2012); Kaeriyama et al. (2011); Wee et al. (1991). Lowe et al. (2005) se zabývali ekofyziologií v rámci druhu. Studium růstových parametrů protist se ale také užívá pro laboratorní zjištění ekologických preferencí u málo prozkoumaných organismů (Kim et al. 2008; Kim et al. 2009; Moser, Weisse 2011) či pro zkoumání vztahu environmentálních charakteristik a intenzity produkce toxinů nebo olejnatých sloučenin. Hledání souvislostí mezi envi. parametry a množstvím produkovaných toxinů je důležité zejména pro prognózy „chování“ toxických vodních květů (Boer et al. 2005; Laabir et al. 2011; Thessen et al. 2009). Výzkum posledního vztahu je esenciální pro rozvoj řasových biotechnologií (Vega et al. 2010). V poslední době se studium ekofyziologie také využívá pro určení jednotlivých kryptických druhů různých druhových komplexů (Degerlund et al. 2012) právě na základě ekologického druhového konceptu. To si za cíl klade i tato diplomová práce a podrobněji budou výsledky studií spolu s mými zhodnoceny v diskusi. V další kapitole je zdůvodněn výběr teploty jako environmentálního parametru zde zkoumaného.

#### 1.3.1 Teplota jako faktor prostředí

Teplota je významným faktorem ovlivňujícím metabolismus, rozšíření a životní cykly fototrofů (Anderson 1998; Oppliger et al. 2011; Kristiansen 2008; Moser, Wese 2011; Pereira et al. 2005). Různá teplotní optima jsou často specifická pro různé organismy. V širším rozsahu teplot jsou schopny organismy přežít, v užším se rozmnožovat. Brönmark, Hansson (2005) uvádějí teplotní optimum, vyjádřené maximálními růstovými rychlostmi, v intervalu 15 – 25 °C. Optimum růstu se může též lišit dle místa původu na Zemi: tropické druhy mohou vykazovat vyšší optimální teploty pro růst (**Obr. 5**) (Thomas et al. 2012).



**Obr. 5:** Vztah optimální teploty pro růst a zeměpisné šířky, na ose x je zeměpisná šířka ve vztahu k severní polokouli, na ose y teplota optimální pro růst; body představují jednotlivé kmeny mořského fytoplanktonu a regresní křivka (šedá) 95 % konfidenční interval, převzato z Thomas et al. 2012.

Většina fototrofních mikroorganismů obývá vodní prostředí, které se vyznačuje určitými specifiky. Voda má velkou měrnou kapacitu, takže je poměrně stabilní vůči teplotním výkyvům, ať už diurnálním či sezónním (Brönmark, Hansson 2005; Lellák a Kubíček 1991; Voet, Voetová 1994). Naopak na teplotě vody závisí její hustota a viskozita. Nejvyšší hustotu má voda při 4° C, v teplotách pod i nad touto hodnotou je hustota nižší (teplotní anomálie vody), což je v podstatě příčinou teplotní stratifikace hlubších vodních těles (Voet, Voetová 1994). Pro vodní organismy se takto mohou vytvářet různé niky s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které se v průběhu roku mění (Lellák a Kubíček 1991). Viskozita také s rostoucí teplotou klesá, což sice usnadňuje jednobuněčným organismům pohyb, ale urychluje jejich klesání mimo fotickou zónu. Dalším specifikem je nižší rozpustnost plynů ve vodě, která dále klesá s rostoucí teplotou. A právě obsah O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> hraje klíčovou roli pro existenci živého v tomto ekosystému (Lellák a Kubíček 1991).

Teplota má významný vliv i na rychlost chemických reakcí, protože enzymy fungují optimálně také jen v určitém rozmezí teplot. Rychlost reakcí nejprve stoupá, po dosažení určité hraniční teploty stagnuje a pokud se teplota dále zvyšuje, začne docházet k denuraci proteinů, enzymů a membrán (teplotní stres) (Voet, Voetová 1994). Protože teplota ovlivňuje veškeré metabolické pochody, s rostoucí teplotou se obecně zvyšuje i růstová rychlost jedinců a populací (Reynolds 2006). Rychlost metabolismu závisí též na příjmu živin: čím rychleji jsou živiny zpracovávány, tím vyšší je po nich poptávka. Co se týče jednobuněčných organismů, je vhodné mít s rostoucí teplotou menší buňky. Menší buňky mají větší povrch ku objemu a látky jsou v buňce snáze transportovány. To je také jedna z hypotéz, která se pokouší vysvětlit klesající objem buněk s rostoucí teplotou mimo extrémy (Atkinson et al. 2003). Autoři dokládají, že se buňky protist

skutečně s rostoucí teplotou většinou zmenšují o 2,5 % na 1 °C - tzv. TSR – temperature size rule.

Existují ještě další hypotézy, které se snaží zdůvodnit TSR. Za prvé se nabízí vysvětlení, které by mohlo objasnit existenci některých adaptací u planktonních organismů. S rostoucí teplotou viskozita vody klesá a menší objem buněk by mohl toto klesání zastavit, srovnáváme-li pouze kulovitý tvar. Druhá hypotéza vychází z evoluční teorie: buňky jsou malé, protože se v rychle rostoucí populaci musí dělit co nejrychleji, aby co nejvíce proliferovaly (Atkinson et al. 2003). Tuto hypotézu by podporovaly výsledky studie Neustupa et al. (2008). Krásivka *Micrasterias rotata* měla s rostoucí teplotou mělčí zářezy, což by mohlo odpovídat časnému dělení bez dokončení morfogeneze. Nicméně tyto výsledky popírají hypotézu o snaze maximalizovat poměr povrch/objemu.

Pichrtová, Němcová (2011) dokládají TRS pro zlativky *Synura petersenii* a *Mallomonas tonsurata*. U zkoumaných kmenů též prokázaly, že s rostoucí teplotou se zmenšuje i velikost křemičitých šupin. To se dá jednoduše vysvětlit tak, že menší buňky vytváří menší šupiny; nebo také hypotézou o maximalizaci rychlosti dělení, jelikož šupiny ve vyšších teplotách (mimo extrémy) měly trochu redukované některé znaky. Nicméně jen jeden ze tří kmenů studie Wagenmann, Gutowski (1995) vykazoval signifikantní pokles velikosti šupin s rostoucí teplotou. Ovšem domnívám se, že v této studii byly použity spíše druhy *Synura macropora* (Škaloud et al. 2012) a *Synura glabra*.

### 1.3.2 Ekofyziologické studie u Chrysophyceae

Vztah růstových charakteristik a vybraných environmentálních parametrů byl *in vitro* studován i u zlativek, zejména taxonu Synurales. Většinou se jedná o studie, které měly ozřejmit, bez jakéhokoli vztahu ke kryptické diverzitě, jak se organismy rodů *Mallomonas* a *Synura* chovají v rámci různých teplot, pH, osvětlení či obsahu živin v baňkových experimentech - batch cultures (Kim et al. 2008; Kim et al. 2009; Lee, Kim 2007; Lee et al. 2012; Saxby-Rouen et al. 1997; Saxby-Rouen et al. 1998; Wee et al. 1991). Protože teplota a pH jsou pro tyto organismy určujícími faktory prostředí (Kristiansen 2008; Zeeb, Smol 2001), byly nejprve studovány na mezidruhové či vnitrodruhové úrovni růstové parametry a rychlosti ve vztahu k těmto parametrům. Menší množství studií existuje pro druhy rodu *Mallomonas* než pro organismy definované jako *Synura petersenii*. Lee, Kim (2007) se zabývali růstovými charakteristikami druhů *Mallomonas acaroides*, *M. areolata* a *M. caudata* v závislosti na teplotě a pH. Druhy byly definovány prostřednictvím SEM, k experimentu byly použity tři kmeny *M. caudata* a po jednom kmeni zbylých druhů, každý kmen ve třech opakováních. Kmeny byly izolovány z pěti různých vodních nádrží. Monoklonální kultury byly pěstovány v šesti experimentálních teplotách v rozsahu 9 – 23 °C a v šesti hodnotách pH od 4

do 9 jednotek. *M. acaroides* a *M. caudata* vykazovaly maximální růstové rychlosti ve 21 °C, kdežto *M. areolata* i v 18 °C. *M. caudata* také nejrychleji rostl v pH 7, ostatní druhy v pH 6. Ačkoli byl populační růst udržován v poměrně rozsáhlém rozmezí teplot a pH, druhy vykazovaly druhově specifickou odpověď na rozličné hodnoty pH a teplot (Lee, Kim 2007). Růstové charakteristiky se lišily i v rámci druhu *M. caudata*, což značí, že každý kmen může vykazovat kmenově specifické adaptace (Lee, Kim 2007); tento závěr ale nebyl podepřen žádnou statistickou analýzou. Tři kmeny *M. caudata* ze tří různých vodních nádrží byly použity k prověření efektu obsahu nitrátu, fosfátu, silikátu a intenzity osvětlení na populační růst a růstovou rychlost *in vitro* (Kim et al. 2009). Opět byla zjištěna určitá úroveň kmenově-specifické odpovědi na koncentrace nitrátu a fosfátů, obsah silikátů neměl žádný vliv na růstové rychlosti, maximální růstové rychlosti byly zaznamenány v obvyklém rozmezí osvětlení v závislosti na kmeni a teplotě v kultuře. Obdobný design a výsledky mají studie, jenž se zabývají organismy morfologicky definovanými jako *Synura petersenii* (Kim et al. 2008; Lee et al. 2012). Statistické metody k analýzám ekofyziologie jednoho kmene ve vícero opakování v rámci jediného experimentu využily studie Saxby-Rouen et al. (1997) a Saxby-Rouen et al. (1998).

Wee et al. (1991) představuje jedinou studii, která se pokusila analyzovat variabilitu v rámci druhového komplexu *Synura petersenii*. Analyzovaly se dva druhy, které byly definovány prostřednictvím TEM a označeny jako morfortyp *S. glabra* a morfortyp *S. petersenii*. Hodnocen byl vztah růstových parametrů několika kmenů v závislosti na pH *in vitro* prostřednictvím statistických metod. Zjistila se signifikantní kmenová specifita čili vnitrodruhová variabilita růstových parametrů a pH. Vztah druhů a růstových parametrů nemohl být testován, protože druhy byly nedostatečně definovány. Respektive, autoři se domnívali, že v rámci morfortypu *S. glabra* stále existovala určitá variabilita: některé šupiny byly definovány jako přechodné mezi morfologiemi těchto dvou druhů. Bezpečně byl na základě morfologie šupin určen jen jediný kmen UTEX LB 239 jako *S. petersenii*.

Celkově se dá design a výsledky ekofyziologických studií shrnout takto: ekofyziologie organismů se *in vitro* zkoumá pouze v rámci jediného experimentu někdy i za využití jediného kmene, hodnotí se zejména prostřednictvím maximálních růstových rychlostí a výsledky vykazují kmenovou specifitu (Coles, Jones 2000; Degerlund et al. 2012; Moser, Weisse 2011; Peters, Breeman 1992; Vijayakumaran et al. 2001; Wee et al. 1991). Navíc analýza provedená pouze v rámci růstových rychlostí představuje poměrně velké zjednodušení, jedná se totiž o jediné číslo. Podle mého názoru by se mohly více hodnotit i růstové křivky (Wee et al. 1991). Totéž platí pro výzkum rodů *Mallomonas* a *Synura*; pro tyto organismy s určitou mírou kryptické diverzity navíc vůbec neexistují studie, jenž by se zabývaly ekofyziologickým zhodnocením této skryté diverzity, ani není mnoho výzkumných prací, které by studovaly ekofyziologii těchto organismů

v laboratoři.

Podrobně budou výsledky ekofyziologických studií zhodnoceny spolu s mými výsledky v diskusi.

## **2. Cíle diplomové práce**

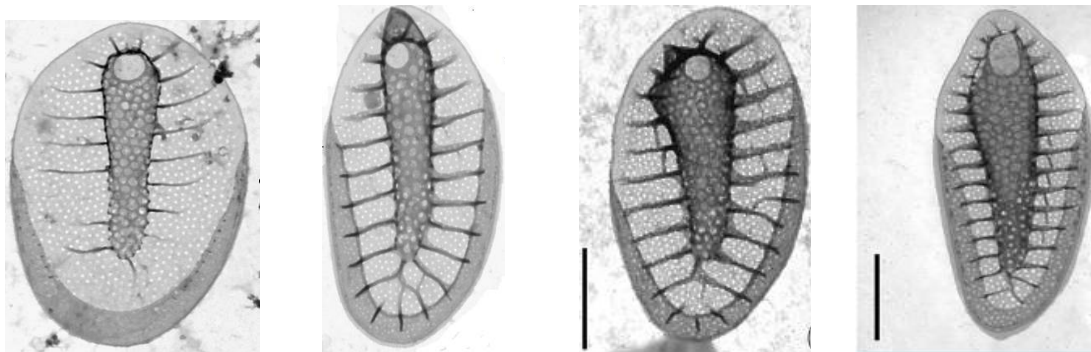
Cílem této práce je zhodnocení rozdílů v růstových parametrech několika druhů komplexu *Synura petersenni* v závislosti na teplotě *in vitro*. Prostřednictvím rozboru růstových křivek a statistické analýzy maximálních růstových rychlostí se pokusím nalézt rozdíly mezi druhy komplexu. Také zkusím zhodnotit vliv provedení několika pokusů se stejnými druhy. Budou-li zjištěny statisticky významné rozdíly mezi druhy komplexu, vyhodnotím je v závislosti na ekologii a distribuci druhů a v návaznosti na podobné studie.

### 3. Metodika

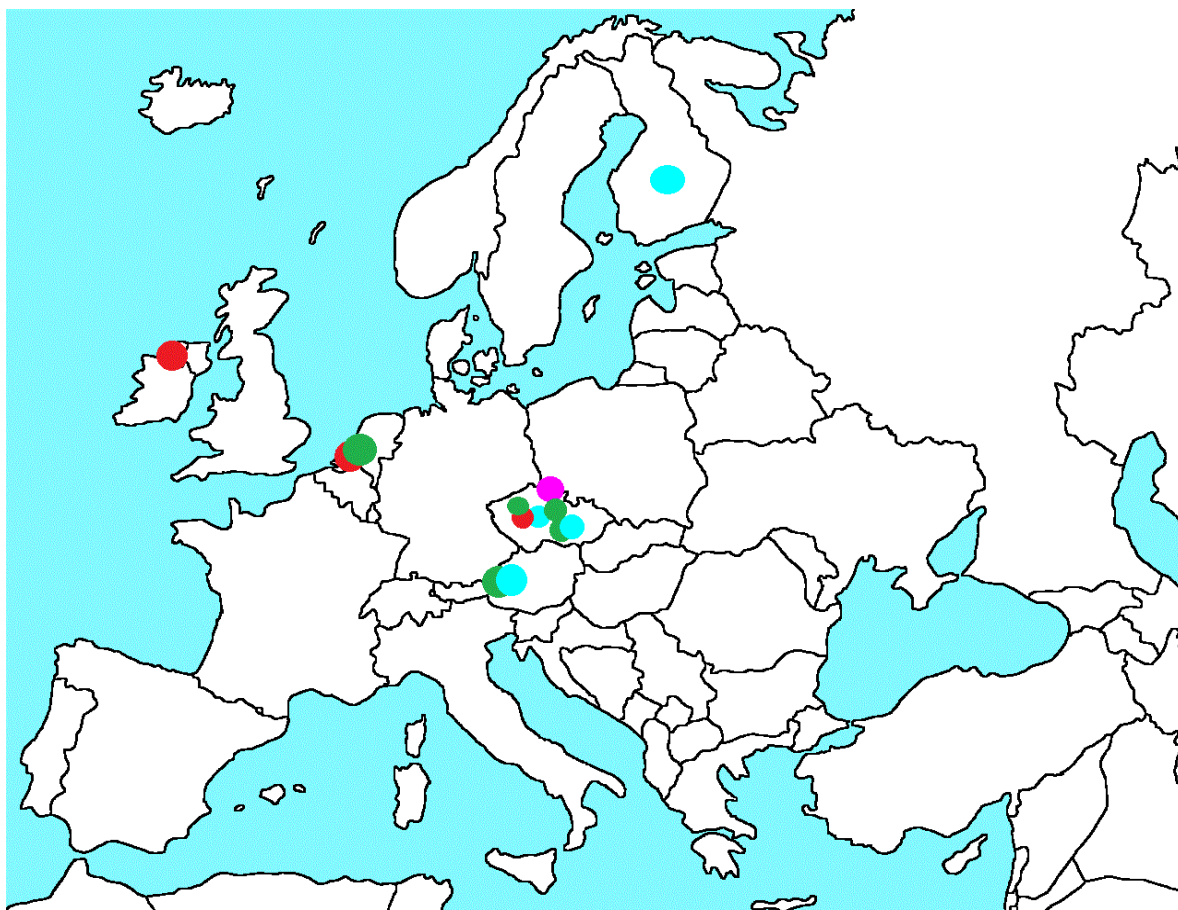
#### 3.1 Kultivační experimenty

##### 3.1.1 Použité kmeny a kultivace

Pro experimenty jsem použila monoklonální kultury – kmeny - čtyř druhů komplexu *Synura petersenii*: *S. petersenii* sensu stricto, *S. americana*, *Synura glabra* a *S. conopea*; morfologie šupin je znázorněna na **Obr. 6**. Kmeny byly izolovány ze vzorků odebraných na několika lokalitách v Evropě. Vzorky byly odebírány planktonní sítí s šířkou ok 20  $\mu\text{m}$  či vyždímáním vodních rostlin. Na lokalitách byly zaznamenány GPS souřadnice a někdy i environmentální parametry – teplota, pH, konduktivita vody – pomocí měřiče Combo pH & 7 EC HI 98129, Hanna instruments. Teploty na nejbližších meteorologických stanicích za rok či poslední 2 měsíce byly zjištěny na serveru [www.wunderground.com](http://www.wunderground.com). Jednotlivé charakteristiky kmenů shrnují tabulky v příloze 1 (Tab. 1 a Tab. 2) a odběrové lokality pro jednotlivé druhy jsou zobrazeny na **Obr. 7**. Druh byl u kmenů definován sekvenací ITS rDNA regionu Pavlem Škaloudem. Není-li uvedeno jinak, jsou sekvence ITS totožné či vykazují nevýznamnou variabilitu.



**Obr. 6:** Fotografie křemičitých tělních šupin druhů komplexu *Synura petersenii*, **zleva:** *S. glabra*; *S. petersenii*, šupiny pocházejí z přírodního vzorku z Milíčovských rybníků; *S. americana* a *S. conopea* převzato z Škaloud et al. (2012); úsečka představuje 1  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 7:** Mapa odběrových míst: zeleně je zobrazena *S. petersenii*, červeně *S. americana*, modře *S. glabra* a růžově *S. conopea*

Pro izolaci jednotlivých kolonií byla použita skleněná pipeta vytažená v kapiláru, tzv. mikropipeta. Kolonie byla vždy protažena několika kapkami sterilního média a přenesena do plastové kultivační destičky. Po měsíci růstu byly již narostlé kmeny přeočkovány do 50 ml Erlenmayerových baněk se sterilním modifikovaným DYIV médiem (**Tab. 1**). Takto byly vytvořeny tzv. zásobní kultury jednotlivých kmenů, které byly kultivovány pod stálým osvětlením 50–200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  při teplotě 15 °C. Každý měsíc byl 1 ml těchto kultur přeočkován do nového média, tzv. „kontinuální“ kultivace. Většinou byl použit pufr HEPES ( $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S } \frac{1}{2} \text{Na}$ ) a pH bylo upraveno přidáním 0,1 M HCl na hodnotu 7. V případě kmenů *S. conopea* bylo při kultivaci pro aklimatizaci nejprve použito médium s pufrem MES o pH 6,2, protože kmeny pocházely z pH 5. Později byly kmeny úspěšně přeočkovány do média s pH 7.



**Tab. 1:** Složení modifikovaného DYIV média s pufrý HEPES či MES a jeho příprava - Nejdříve jsou připraveny zásobní roztoky; z každého zásobního roztoku je 1 ml přidán do destilované vody, výsledný objem média je 1 l. Pro přípravu zásobního roztoku stopových prvků se jednotlivé množství chemikálií rozpustí v 10 ml destilované vody, poté se jednotlivé roztoky smísí a objem se doplní do 100 ml destilovanou vodou. Vitamíny se rozpustí v 80 ml destilované vody a pak se doplní na objem 100 ml; převzato z Řezáčová (2003).

Množství	Chemikálie	Zásobní roztok
1,0 ml	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,0 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	KCl	0,3 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	NH <sub>4</sub> Cl	0,268 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	NaNO <sub>3</sub>	2,0 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	β-glycerolfosfát	0,216 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,08 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	Na <sub>2</sub> EDTA	0,7g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
2,0 ml	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0,6 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,166 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
1,0 ml	CaCl <sub>2</sub>	7,5 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O
243 mg (200 mg)	HEPES (MES)	-
1,0 ml	stopové prvky	
1,0 ml	vitamínový roztok	

Stopové prvky: Množství	Chemikálie
31,4 mg	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O
4,5 mg	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O
1,46 mg	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
2,35 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
0,13 mg	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>
0,27 mg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
Vitamíny: Množství	Chemikálie
1,0 ml	B12 0,5 g/l dest. H <sub>2</sub> O
10 mg	Thiamin HCl

### 3.1.2 Průběh experimentů

Pro účely teplotního pokusu byly vytvořeny tzv. experimentální kultury přeočkováním kontinuálně kultivovaných kmenů po 30 dnech do čerstvého média. Výběr zásobních kultur pro vznik experimentálních probíhal na základě viditelnosti zákalu v baňkách, vždy byly vybrány kmeny s nejhustším zákalem. Životaschopnost kultur byla zhodnocena pod světelným mikroskopem. Poté byl přeočkován 1 ml viditelně viabilní zásobní kultury do jedné 50 ml Erlenmayerovy baňky se sterilním DYIV HEPES médiem o pH 7 (2 ml Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>). Bylo zvoleno 6 experimentálních teplot: 10 °C, 13 °C, 16 °C, 19 °C, 22 °C a 25 °C, dle poznatků z již provedených studií (Kim et al. 2008; Saxby-Ruen et al. 1998). Z každé jednotlivé kultury nakonec vzniklo 12 experimentálních kultur, v každé teplotě se nacházelo po dvou opakováních – klon A a B.

Experimenty probíhaly v lednici s teplotními boxy (**Obr. 8**), z nichž každý měl požadovanou teplotu udržovanou systémem termostatů EUROTEMP SALUS 1500. Stálé osvětlení v lednici o hodnotě asi  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zajišťovala zářivka OSRAM FLUORA 18 W/77. Jednotlivý experiment trval vždy minimálně měsíc. Nárůst zákalu byl sledován prostřednictvím absorbance zákalu při 750 nm spektrofotometrem Spekol 1300, Analytic Jena, 1-2 krát v týdnu, tak aby bylo dosaženo alespoň 4-6 měření. Oprávněnost využití hodnot absorbance zákalu jako ukazatele populačního růstu v kultuře byla vyjádřena lineární regresí absorbance a počtu buněk. Pro absorbanci a počty buněk v ml či hustotu platí vztah přímé úměry. Celkem proběhlo 9 teplotních experimentů s různými kmeny čtyř druhů komplexu *Synura petersenii*. Kmeny použité v experimentech jsou uvedeny v příloze 1, Tab.1.



**Obr. 8:** Umístění experimentálních kultur v ledničce s termostaty, ty se nacházejí na průhledných boxech, které jsou uzavřené v průběhu experimentu, v lednici se udržuje termostatem teplota  $10^\circ\text{C}$

## 3.2 Analýza teplotních experimentů

### 3.2.1 Kvantifikace růstu kultur

Všechny hodnoty absorbancí byly zaznamenány pomocí programu MS Office Excel 2003, v němž byly také provedeny základní analýzy, vyneseny růstové grafy dle kmene a teploty a spočtena růstová rychlost. Růstová rychlost byla vyjádřena vzorcem  $\mu = (\ln A2 - \ln A1) / (t2 - t1)$ , kde  $\mu$  značí (specifickou) růstovou rychlost,  $\ln A2$  a  $\ln A1$  je přirozený logaritmus absorbance v čase  $t2$  a  $t1$  od počátku měření (Roubeix, Lancelot 2008). Čas je uváděn ve dnech, růstové rychlosti tedy představují změny hustot kultur za den v jednotkách  $\text{den}^{-1}$ . Rychlosti byly pro každý kmen spočteny zvlášť v závislosti na podobě grafů růstu. Analyzovány byly tak maximální růstové rychlosti, které definují exponenciální fázi růstu (Kim et al. 2008; Wee et al. 1991). Některé grafy růstu jsou pro demonstraci uvedeny v příloze 2. Obr. 1, grafy růstových rychlostí vytvořené v programu STATISTICA for Windows 8, Statsoft, Inc. 1998, jsou uvedeny v příloze 2, Obr. 2 a 3 a jsou rozděleny dle jednotlivých pokusů.

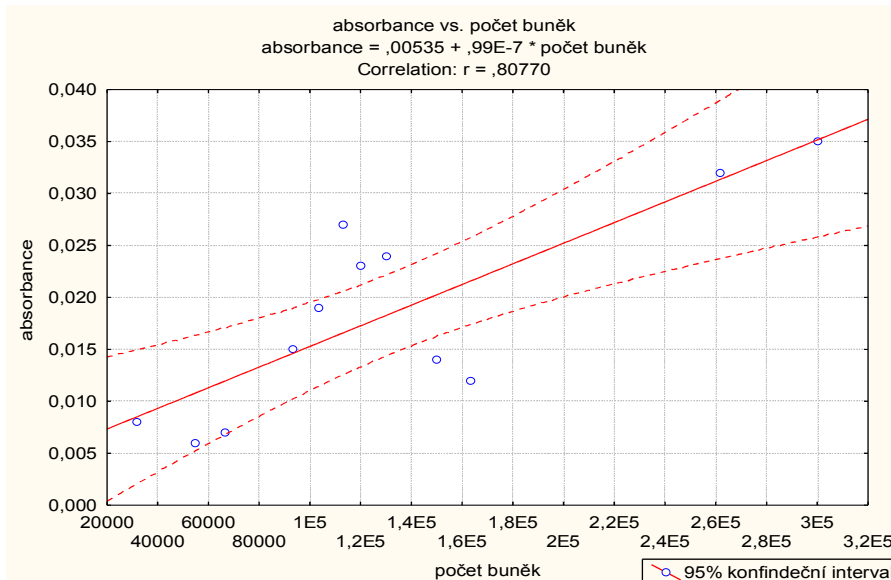
### 3.2.2 Statistické analýzy

Všechny statistické analýzy probíhaly v programu STATISTICA for Windows 8, Statsoft, Inc. 1998. Regresí byl definován vztah mezi skutečnými počty buněk a hodnotami absorbancí. Data pro tuto regresí byla v pilotním pokusu - 1. pokus - získána takto: 27. den růstu, když byly všechny kultury dostatečně narostlé, jsem náhodně vybrala 12 kultur. Z každé z těchto 12 kultur byl 1 ml fixován Lugolem. Do dvou týdnů od fixace byly spočteny buňky v Bürkerově komůrce.

Regresní vztah počtu buněk a absorbance ukazuje **Obr. 9**. V tabulce (**Tab.2**) je uvedeno shrnutí výstupů lineární regrese. Z analýzy vyplývá, že je korelace mezi počtem buněk a absorbancí silně signifikantní – p hodnota je 0,00148 - a hodnota korelace je přes 80 %. Takže se dá říci, že absorbance velmi dobře vyjadřuje skutečné počty buněk a změny absorbance v průběhu času vyjadřují změny populační hustoty v experimentálních kulturách.

**Tab. 2:** Shrnutí výstupů regrese počtu buněk a absorbance, Multiple R je mnohonásobný korelační koeficient - r, R2 značí hodnotu r<sup>2</sup> čili R a adjusted R představuje R „seřazené“, vyjadřující „čistý samostatný vliv“

Statistic	Value
Multiple R	0,80770
Multiple R2	0,65238
Adjusted R2	0,61762
F(1,10)	18,76728
p	0,00148
Std.Err. of Estimate	0,00604



**Obr. 9:** Regresní vztah počtu buněk v 1 ml a absorbance, vyjádřený z hodnot v pilotním pokuse, závislá proměnná představuje absorbanci, body představují jednotlivé hodnoty, přímka je funkcí absorbance v závislosti na počtu buněk, E5 na ose x značí statisíce, r je základní korelační koeficient; Vytvořeno v programu STATISTICA for Windows 8, Statsoft, Inc. 1998.

Pro vyhodnocení rozdílů mezi růstovými rychlostmi v závislosti na experimentální teplotě, druhu a čase byla použita ANOVA opakovaných měření (Wee et al. 1991). Jako kategoriální nezávislé proměnné byly definovány faktory druh, teplota a čas (pokus) – vnitřní efekt, rychlost byla jedinou závislou proměnou. Opakovaná měření byla prováděna na faktoru druh. Signifikantní výsledky byly hodnoceny Tukeyho testem. Vzhledem k experimentálnímu designu: v každém pokusu byly použity jiné kmeny téhož druhu, je faktor kmen netestovatelný a je zahrnut ve faktoru čas. Nicméně cílem této práce je zjistit, zda existují nějaké rozdíly v růstových parametrech mezi druhy, nikoli kmeny. Splněné předpoklady ANOVY pro dané soubory dat uvádím v příloze 4, sféricita byla testována Mauchlyho testem. V důsledku nerovnoměrného testování různých druhů v různých experimentech, byly experimenty pro testování rozděleny na dvě části. Druhy *Synura petersenii*, *S. americana* a *S. glabra* byly použity v 6 experimentech z 9, a to v pokusech 1, 2, 3, 5, 7 a 8. Druhy *Synura petersenii*, *S. americana* a *S. conopea* byly testovány v pokusech 4 a 9, pokus 6 nebyl nakonec vyhodnocen. Růstové rychlosti dle jednotlivých pokusů uvádím v příloze 3. Chybějící data byla nahrazena celkovými průměry růstových rychlostí, nahrazená data jsou zvýrazněna. Analýzou předpokladů ANOVA opakovaných měření bylo zjištěno, že data z 1 a 3 experimentu nemají homogenní variance s daty z experimentů 2, 5, 7 a 8, proto byly z analýzy vyloučeny. Po vynesení průměrných hodnot rychlostí na pokus bylo totiž zjištěno, že rychlosti pokusu 1 jsou příliš nízké. Jednalo se o pilotní pokus a absorbance byly měřeny příliš pozdě. Pokus 3 zase vykazoval nejvyšší podíl nahrazených hodnot, nahrazena musela být 1/3 všech hodnot v důsledku zániku většiny kultur druhu *Synura glabra* v průběhu experimentu. Jednalo se o kmen S87.F7, který byl před vznikem experimentálních kultur pod světelným mikroskopem plně viabilní.

## 4. Výsledky

### 4.1 Charakteristiky odběrových míst a použitých kmenů

Všechny odběrové lokality použitých kmenů se nacházejí v Evropě (viz Příloha 1). Nejvíce kmenů – 13 – pochází z České republiky, 10 kmenů je z Nizozemska z předměstí Amsterdamu, 3 kmeny z Irska, 2 kmeny z Rakouska a 1 kmen z Finska. Všechny lokality jsou sladkovodní, oligo-mezotrofní, některé eutrofní – tři odběrová místa v Nizozemsku. V ČR se většinou jedná o menší vodní nádrže, ale kmeny druhu *Synura conopea* byly izolovány z oligotrofní rašelinné tůně. V Čechách byly izolovány všechny zkoumané druhy komplexu. Nizozemské kmeny, které byly odebrány ve splavných městských kanálech, pocházejí v podstatě z jedné lokality se třemi odběrovými místy. Z Nizozemí pochází jen kmeny druhů *Synura petersenii* a *S. americana*. Irské kmeny náležejí pouze druhu *Synura americana* a pocházejí z jednoho odběrového místa, mělké oligo-mezotrofní tůně vedle silnice. Rakouské kmeny *S. glabra* a *S. petersenii* pocházejí ze dvou alpských jezer. Finský kmen *S. glabra* byl izolován z jezera. **Obr. 10** a **Obr. 11** ukazují některé lokality.



**Obr. 10:** Některá odběrová místa – nahoře je Bundoran, Irsko; vlevo Schilkenbos, Nizozemsko; vpravo dole Oosteinderweg, Nizozemsko, copyright GoogleMaps.

Sympatrické kmeny, tzn. kmeny z jediného odběrového místa, odebrané v rámci jednoho vzorku, jsou irské *S. americana* z lokality Bundoran, nizozemské *S. petersenii* a *S. americana* z kanálů Schinkelbos a Oosteinderweg, české *S. petersenii* z lokality Blešno-Kuzov a *S. petersenii*, *S. glabra* z Pílské nádrže a *S. conopea* z tůně z Jizerských hor. V rámci jediného teplotního experimentu však byly testovány pouze sympatrické kmeny z kanálu Oosteinderweg a Pílské nádrže, pokus 4 a 5. Ostatní sympatrické kmeny jsou součástí v čase nezávislých teplotních pokusů. Uvažují-li i jiné mnou kultivované zásobní kultury, které nebyly použity k teplotním experimentům, ve sladkovodních nádržích se většinou vyskytovaly na jaře a na podzim jednotlivé druhy

samostatně v podobě abundatních „vodních zákalů“. Je zajímavé, že pokud se na odběrovém místě vyskytovaly i jiné druhy mikrořas či sinic, isolovala jsem z něj více druhů druhového komplexu. Příkladem může být Pilská nádrž, kde byly ve fytoplanktonu odběrového vzorku přítomné též sinice *Microcystis* a zelené řasy. Rod *Synura* zde nebyl příliš abundatní.



**Obr. 11:** Někteřá odběrová místa – nahoře vlevo je Schwartzsee, nahoře vpravo Wildsee, Rakousko; vlevo dole Milíčovský rybník, vpravo dole Pilská nádrž, Česká republika, copyright GoogleMaps

Teplota, pH či konduktivita byla při odběru změřena na 2/3 odběrových lokalit, nebylo totiž cílem práce zabývat se environmentálními parametry prostředí při odběru. Jediný parametr - teplota vody, který by mě mohl zajímat, je během dne variabilní. Nicméně z dat, která mám k dispozici, vyplývá: Všechny naměřené hodnoty pH se pohybují v rozmezí od 5 do 8,1 jednotek. Konduktivita nabývá celkově hodnot 40 – 1319  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . A teplota vody v čase odběru je v intervalu od 1 °C do 6,3 °C. Druh *Synura petersenii* byl izolován z lokalit o teplotě 1 °C – 3,7 °C, pH 7,8 – 8,1 a konduktivitě 850 – 1319  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . *S. americana* se vyskytovala na lokalitách o teplotě 3,3 °C – 5,2 °C, pH 6,5 – 7,9 a konduktivitě 330 – 1257  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . *S. glabra* byla izolována z teploty 4 °C – 6,1 °C, pH 6,9 – 7,7 a konduktivity 767  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . *S. conopea* byla nalezena v teplotě 6,1 °C, pH 5 a konduktivitě 40  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Teplota vzduchu na nejbližší meteorologické stanici byla pro všechny odběrové lokality zjišťována za rok a za poslední dva měsíce. Pro kmeny z Pilské nádrže se nepodařilo zjistit průměrnou roční teplotu. Celkově se teplota vzduchu za poslední dva měsíce před odběrem

na všech odběrových místech pohybovala od 1 °C do 13,6 °C a roční teplota byla většinou v intervalu 8 °C – 10,7 °C. Jedinou výjimkou je finský kmen druhu *Synura glabra* s roční průměrem 3 °C. *Synura petersenii* pocházela z lokalit o roční průměrné teplotě vzduchu 8,2 °C – 10,7 °C a o teplotě vzduchu za poslední dva měsíce 2,2 °C – 14 °C. *S. americana* byla izolována z lokalit o ročních průměrech teplot 9,3 °C – 10,7 °C a teploty za předchozí měsíce nabývaly hodnot 1 °C až 13 °C. *S. glabra* pocházela většinou ze vzorků odebraných na lokalitách s roční průměrnou teplotou 8 °C – 9,8 °C a s teplotou za poslední měsíce 1 °C – 14 °C. Na lokalitě druhu *S. conopea* byla roční průměrná teplota 8,6 °C a v posledních dvou měsících 13,6 °C.

#### **4.2 Základní růstové parametry kmenů**

Základní růstové parametry zkoumaných kmenů jsou patrné z růstových grafů, jejichž příklad uvádím v Příloze 2. Celkem bylo provedeno devět experimentů, přičemž první pokus byl zároveň pokusem pilotním. V pilotním experimentu jsem chtěla zjistit, jak dlouho trvá exponenciální fáze růstu, a tedy kdy začíná stacionární fáze růstu. Cílem práce bylo totiž zjistit rychlosti růstu a ty se získávají v exponenciální fázi růstu. Po zjištění, kdy tyto fáze končí, byly ostatní experimenty navrženy tak, aby probíhaly právě do konce exponenciální fáze růstu. Experimenty se lišily testovanými druhy. V šesti pokusech byly testovány druhy *Synura petersenii*, *S. americana* a *S. glabra*. Ve dvou pokusech byla *S. glabra* nahrazena druhem *S. conopea*, který měl být také testován.

V pilotním experimentu – pokus 1 – bylo tedy zjištěno, že exponenciální fáze růstu netrvá déle než měsíc kultivace. Pilotní pokus trval 54 dní a hustota (míra absorbance) většiny kultur se po exponenciální fázi růstu začala velmi rychle snižovat. Zánik kultur však nebyl pozorován, i když občas kultury vytvořily částečné palmelové stádium. U některých kultur byla sledována jakási oscilace po nástupu jejich nejvyšších hustot. To se však týkalo spíše kmenů, které nenabývaly maxim absorbancí pro daný druh v rámci jednoho experimentu. Chování kultur z jiných experimentů po skončení exponenciální fáze růstu nebylo monitorováno.

Pro kultury rostoucí v teplotách 10 °C – 22 °C byla exponenciální fáze růstu většinou patrná a končila okolo 25. - 30. dne. Výjimkou byly ty kmeny, jimž evidentně růstové podmínky nevyhovovaly po celou dobu kultivace. Např. v 5. experimentu kmen druhu *Synura petersenii* ve všech teplotách pouze osciloval a ve srovnání s ostatními druhy v tomto pokusu nabýval velmi nízkých hodnot absorbance – hodnoty byly i třikrát nižší. Ve 25 °C bylo často dosahováno nízkých hustot a jejich hodnoty oscilovaly. Tato teplota zřejmě již vyvolává teplotní stres. Jedině kmeny *Synura petersenii* v 5. a 6. experimentu a *S. glabra* v posledním pokusu vykazovaly ve 25 °C růst. Navíc byl-li růst patrný, dosahovalo se podobných hodnot absorbance jako v jiných teplotách.

Nejkratší exponenciální fáze růstu byla zaznamenána u klonů *S. conopea* v 6. experimentu v teplotách 13 °C a 16 °C a trvala pouze 15 dní. Hodnoty absorbance však byly trochu nižší ve srovnání s jinými druhy v tomto pokusu.

Mezi druhy v rámci jednotlivých pokusů nebyly nalezeny významné rozdíly v růstových parametrech. Ovšem *Synura americana* v teplotách do 19 °C často ukončovala exponenciální fázi růstu o několik dní dříve než *S. petersenii* a nabývala přitom obdobných či o něco vyšších hodnot absorbance. Podobně se chovala i *S. conopea*. Porovnáme-li růstové parametry sympatrických kmenů použitých v jednom experimentu – pokus 4 a 5, právě v 5. experimentu kmen *S. petersenii* ve srovnání se *S. americana* spíše „živořil“. Ale kmen *S. glabra* ve 4. experimentu rostl v teplotách do 22 °C stejně dobře jako sympatrický kmen *S. petersenii*; jen ve 25 °C jeho hustoty oscilovaly.

Absolutní hodnoty absorbance byly v teplotách do 22 °C nejčastěji v rozsahu 0,03 – 0,05, v teplotě 22 °C byly o něco nižší a v teplotě 25 °C byly většinou v rozsahu 0,01 – 0,015. Vůbec nejvyšší hodnota 0,09 byla zaznamenána pro kmen *S. conopea* v 9. pokusu. V témže pokusu bylo evidováno i maximum pro *S. americana* 0,08. Nejvyšší absorbance - 0,045 pro *S. glabra* byla dosažena dvakrát a pro *S. petersenii* byla 0,055. Maximální absorbance obecně definovaly konec exponenciální fáze růstu.

#### **4.3 Poznátky o růstových rychlostech**

Hodnoty růstových rychlostí uvádím v příloze 3 a grafy těchto rychlostí jsou v Příloze 2. Nyní se budu zabývat základní charakterizací hodnot růstových rychlostí zjištěných z exponenciální fáze růstu. Budu tedy hodnotit růstové rychlosti v dané teplotě u určitého kmene.

V pokusech 1-3, 5, 7-8 byly testovány druhy *Synura petersenii*, *S. americana* a *S. glabra*. Celková průměrná rychlost z těchto pokusů nabývala hodnoty  $0,262 \pm 0,012 \text{ den}^{-1}$ . V pokusech 4 a 9 byly testovány druhy *S. petersenii*, *S. americana* a *S. conopea*. Celkový průměr rychlostí z těchto pokusů je  $0,22 \pm 0,012 \text{ den}^{-1}$ .

Pro *S. petersenii* napříč všemi experimenty a všemi testovanými teplotami platí: Růstové rychlosti byly v rozsahu  $0,026 - 0,723 \text{ den}^{-1}$ , včetně extrémů. Maximální růstová rychlost byla zaznamenána ve 13 °C a minimální v 10 °C. Celková průměrná růstová rychlost byla  $0,0242 \pm 0,014 \text{ den}^{-1}$ . Nejvyšší průměrná růstová rychlost byla  $0,292 \text{ den}^{-1}$  v teplotě 25 °C. Ale nejvíce maximálních růstových rychlostí v rámci jednotlivých pokusů bylo dosaženo v teplotě 10 °C. Rychlosti kmenů *S. americana* se pohybovaly v intervalu  $0,015 - 0,708 \text{ den}^{-1}$ , krajní hodnoty byly evidovány v teplotách 22 °C a 13 °C. Maxima růstu obou druhů byla tedy dosažena ve 13 °C. Průměr růstových rychlostí pro *S. americana* byl  $0,0263 \pm 0,017 \text{ den}^{-1}$ . Nejvyšší průměrnou růstovou rychlost  $0,389 \text{ den}^{-1}$  a nejvyšší počet maximálních hodnot v rámci jednotlivých pokusů jsem taktéž zaznamenána



ve 13 °C. Rychlosti růstu *S. glabra* byly v rozmezí 0,029 – 0,693 den<sup>-1</sup>, minimum se nacházelo v teplotě 22 °C a maximum v 10 °C. Průměrná rychlost byla 0,275 ± 0,017 den<sup>-1</sup>, nejvyšší průměrná rychlost a největší počet maximálních hodnot byly evidovány také v 10 °C. Růstové rychlosti *S. conopea* nabývaly hodnot 0,069 – 0,459 den<sup>-1</sup>, celkový průměr byl 0,231 ± 0,017 den<sup>-1</sup>. Minimum bylo evidováno v teplotě 13 °C a maximum v 10 °C. Nejvyšší průměrná hodnota 0,321 den<sup>-1</sup> a nejvíce maximálních hodnot v rámci jednotlivých pokusů bylo také zaznamenáno v 10 °C.

Z výše uvedeného vyplývá, že *Synura petersenii* a *S. conopea* měly napříč všemi pokusy neoptimálnější rychlosti růstu zřejmě 10 °C, pro *S. americana* a *S. glabra* to bylo 13 °C. Nejnižší růstová rychlost vůbec byla evidována pro *S. americana* ve 22 °C a nejvyšší pro *S. petersenii* ve 13 °C. Rozsahy hodnot rychlostí byly mimo rychlosti *S. conopea* srovnatelné.

Z grafů růstových rychlostí uvedených v příloze 2, Obr. 2 a 3 vyplývají tyto skutečnosti: Nejčastěji se rozsahy rychlostí v rámci různých experimentů pohybovaly od hodnot 0,1 – 0,6. V 1., 4. a 9. experimentu do hodnot 0,4. Často je patrný pokles růstových rychlostí v 16 °C a vyšší růst v teplotách nižších. V pokusu 3 většina kultur kmene *Synura glabra* zanikla. Výrazně je patrná kmenová specifita mezi jednotlivými experimenty. V 7. experimentu se kmenům nedařilo ve vysokých teplotách, teplota 25 °C úplně chybí. Až na pokus 1 jsou rozsahy rychlostí srovnatelné. V 1. experimentu rostla mimo teploty 10 °C a 25 °C nejrychleji *S. glabra* a *S. petersenii* zase nejpomaleji. Ve 2. experimentu má kmen *S. americana* nejvyšší růstové rychlosti v teplotách 13 °C, 19 °C a 22 °C, v teplotách 10 °C a 16 °C roste rychleji *S. petersenii*. V pokusu 3 se dařilo lépe kmeni *S. petersenii*, *S. americana* ji předčila pouze v teplotě 13 °C. V 5. experimentu rostl mnohem lépe v teplotách 10 °C – 16 °C kmen druhu *S. americana*. *S. petersenii* rostl nejrychleji v 19 °C a byl sympatrický s kmenem *S. glabra*. V pokusu 7 rostla mimo teplotu 16 °C a 22 °C *S. petersenii* nejpomaleji, nejrychleji rostla v 10 °C a 16 °C *S. glabra* a *S. americana* vítězila ve 13 °C. V pokusu 8 mimo teploty 19 °C a 25 °C měla nejnižší rychlosti růstu *S. petersenii*. *S. americana* rostla nejvíce v teplotě 16 °C a *S. glabra* v teplotách 10 °C a 13 °C. Rychlosti byly nápadně vyšší v teplotě 10 °C. Pokusy 4 a 9 měli nižší rozsahy dat než předchozí experimenty. Ve 4. experimentu rostla v teplotách 10 °C, 13 °C a 19 °C nejlépe *Synura conopea*. V 16 °C měla nejvyšší růstové rychlosti *S. petersenii*, *S. americana* rostla nejvíce ve 22 °C – jedná se o sympatrické kmeny. V 6. pokusu *S. conopea* rostla rychle v 10 °C, *S. petersenii* byla nejpomalejší celkově. V experimentu 9 mimo teploty 10 °C a 19 °C *S. petersenii* nejpomaleji, ve 13 °C rostla nejlépe *S. americana*.

Z výše uvedeného plyne, že většinou ve 13 °C rostla nejrychleji *Synura americana*, kmeny *S. petersenii* rostly často poměrně pomalu a *S. conopea* rostla poměrně rychle v nižších teplotách.

#### 4.4 Statistické analýzy růstových rychlostí

V této kapitole se nejprve zabývám pokusy s kmeny *Synura petersenii*, *S. americana* a *S. glabra*, poté výsledky statistických analýz růstových rychlostí z experimentů s kmeny *S. conopea*.

##### 4.4.1 Pokusy s druhy *Synura petersenii*, *S. americana* a *S. glabra*

Z analýzy byla vyjmuta data z experimentů 1 a 3, jelikož nesplňovaly předpoklady vybrané statistické metody. Pokus 1 – pilotní a pokus 3 měly nehomogenní variance růstových rychlostí s ostatními pokusy. V pilotním pokusu byly totiž růstové rychlosti nízké, protože jsem začala měřit absorbance od počátku experimentu pozdě. V pokusu 3 bylo chybělo příliš hodnot rychlostí růstu, z 12 kultur *S. glabra* jich 9 zaniklo. Zde se tudíž zabývám pouze výsledky analýzy pokusů 2, 5, 7 a 8. Data jsem analyzovala metodou ANOVA opakovaných měření na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Výsledky poukázaly na statisticky významný vliv faktoru **druh** s p hodnotou 0,0296, **teplota** - p hodnota 0,0342 a kombinace faktorů **pokus\*teplota\*druh** s p hodnotou 0,048 (**Tab. 3**). Signifikantní kombinace faktorů **pokus\*teplota\*druh** značí, že se druhy lišily v rámci různých teplot a pokusů.

**Tab. 3:** Sumarizace výstupů ANOVA opakovaných měření, pokusy 2,5,7 a 8 - Efekt představuje kategoriální nezávislou proměnnou, tedy faktor, jehož vliv na závislou proměnnou testujeme. Efekty jako **teplota\*druh** znamenají kombinace jednotlivých faktorů, efekt **pokus** indikuje jednotlivá opakování. Je-li p nižší než 0,05 – červené hodnoty, je vliv faktoru na dané hladině významnosti signifikantní. Efekt Intercept značí zbytkovou, nevysvětlenou variabilitu.

Faktor	Stupně volnosti	F	p
Intercept	1	967,5309	0,000000
<b>teplota</b>	5	3,2299	0,029610
<b>druh</b>	2	4,0943	0,034233
<b>teplota*druh</b>	10	1,5062	0,215823
Error	18		
<b>pokus</b>	3	2,3914	0,078651
<b>pokus*teplota</b>	15	1,7437	0,069428
<b>pokus*druh</b>	6	0,9221	0,486496
<b>pokus*teplota*druh</b>	30	1,6805	0,048023
Error	54		

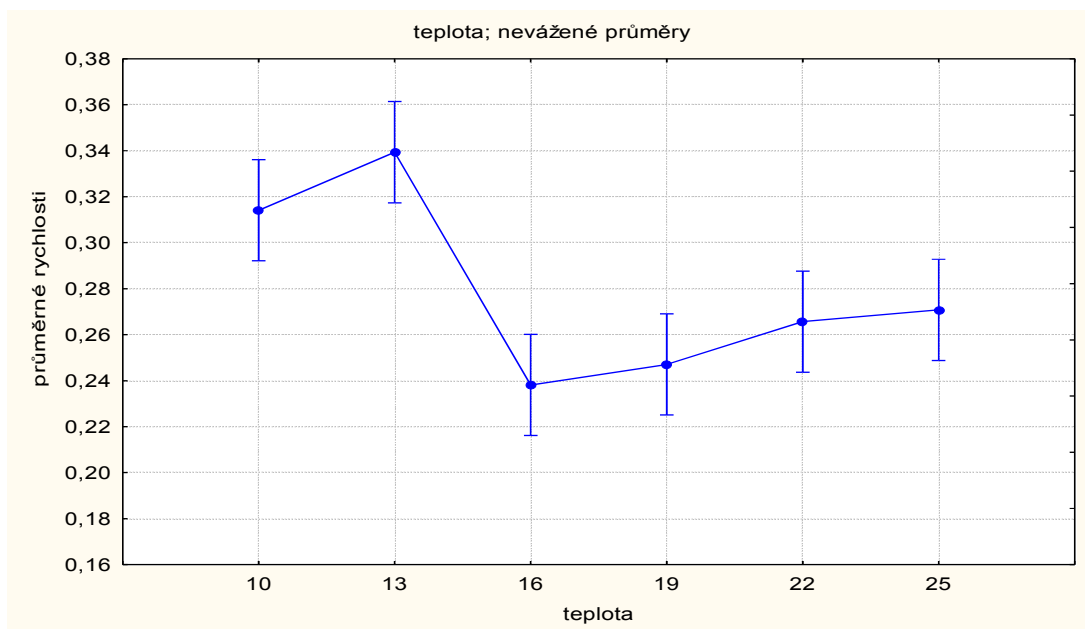
Signifikantní vlivy faktorů na růstovou rychlost byly dále testovány Tukeyho testem, abych prokázala, které hladiny faktorů mají signifikantní vlivy na rychlost. Výsledky Tukeyho testu pro kombinaci faktorů **pokus\*teplota\*druh** v důsledku objemu výsledné matice neuvádím. Signifikantní jsou rozdíly mezi **druhy** *Synura petersenii* a *S. americana* a mezi **teplotami** 13 °C a 16 °C (**Tab. 4**). Pro kombinaci faktorů **pokus\*teplota\*druh** jsou statisticky významné rozdíly mezi kmeny *S. americana* pokus 2 v 19 °C a *S. petersenii* pokus 5 ve 25 °C a také mezi *S. americana* z pokus 2 z 19 °C a z pokusu 7 v 16 °C a *S. petersenii* pokus 7 v 19 °C.

**Tab. 4:** Tukeyho test hladiny faktoru **druh** (nahore): faktor **druh** má 3 hladiny – pet, am, gl, tyto představují 3 druhy komplexu *Synura petersenii*, *S. americana* a *S. glabra*, signifikantní jsou hodnoty p menší než 0,05 označené červeně; dole je výsledek Tukeyho testu faktoru **teplota** s 6 hladinami: 10 °C, 13 °C, 16 °C, 19 °C, 22 °C a 25 °C

Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,01160, df = 18,000				
Označení	druh	{1}	{2}	{3}
1	pet		0,034376	0,121282
2	am	0,034376		0,792091
3	gl	0,121282	0,792091	

Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,01160, df = 18,000							
Označení	Teplota ( °C)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
1	10		0,961376	0,193793	0,305051	0,635019	0,731144
2	13	0,961376		0,042973	0,075354	0,218521	0,282910
3	16	0,193793	0,042973		0,999700	0,945124	0,894325
4	19	0,305051	0,075354	0,999700		0,989866	0,970497
5	22	0,635019	0,218521	0,945124	0,989866		0,999981
6	25	0,731144	0,282910	0,894325	0,970497	0,999981	

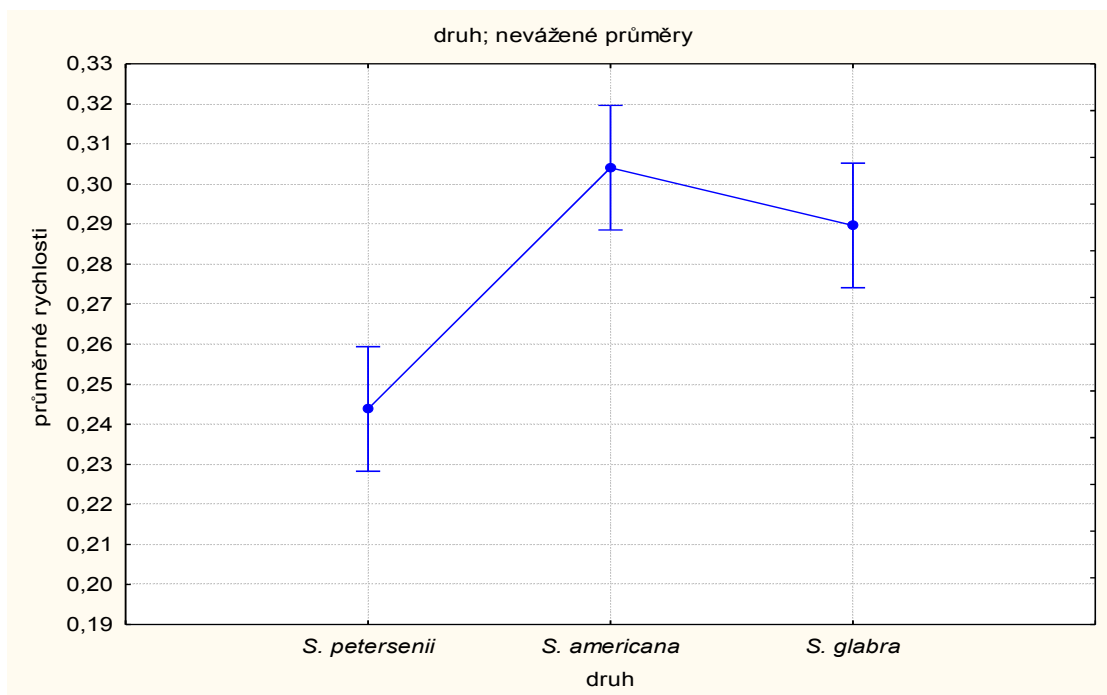
Skutečně existuje rozdíl mezi **teplotami** 13 °C a 16 °C (**Obr. 12**). Teploty 10 °C a 13 °C byly pro všechny kmeny ve všech opakováních pro růst optimálnější. Teplota 16 °C byla suboptimální, přestože byly kmeny ve formě zásobních kultur v teplotě jen o stupeň nižší pěstovány poměrně dlouho.



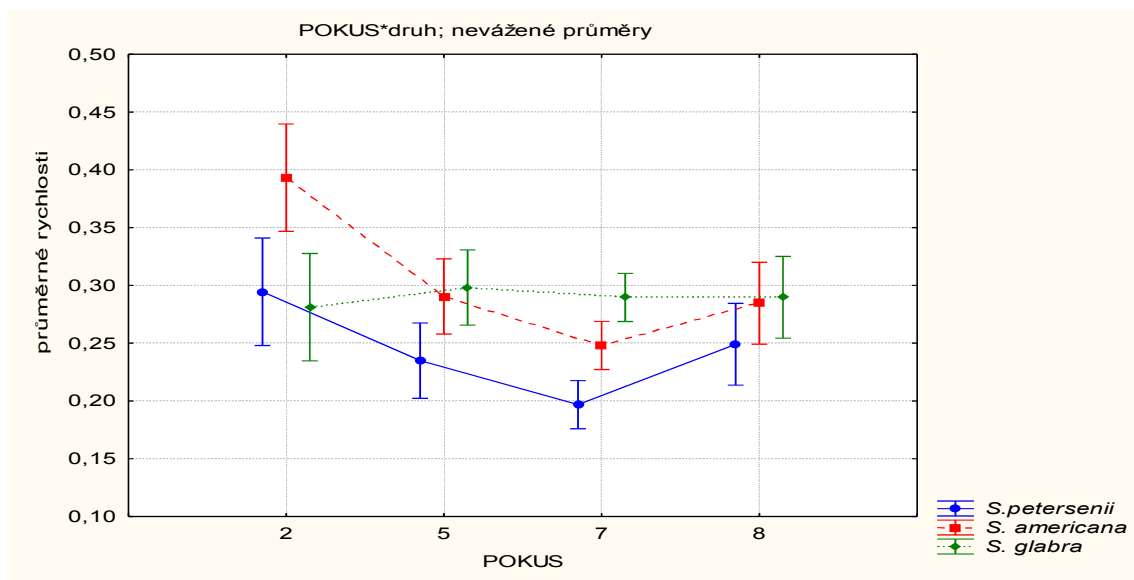
**Obr. 12:** Průměry růstových rychlostí v závislosti na **teplotě**; aktuální efekt –  $F(5, 18) = 3,2299$ ,  $p = 0,02961$ ; vertikální úsečky značí  $\pm$  střední chyby; rozsah na ose y odpovídá rozsahu v grafu na Obr. 16, umožňující srovnání mezi analýzami.

Signifikantní výsledky celkové analýzy vztahu průměrných růstových rychlostí a faktoru **druh** (Obr. 13) poukazují na to, že *Synura petersenii* rostla nejpomaleji, nejrychleji přitom rostla *S. americana*. Nicméně z testování, jak se liší celkové průměrné růstové rychlosti v závislosti na druhu a experimentu – kombinace faktorů **pokus\*druh** není tento závěr tak jasný (Obr. 14). Je sice zřejmé, že *S. petersenii* měla nejnižší růstové rychlosti. To však neplatí pro 2. experiment. *S. americana* také nedosahovala nejvyšších růstových rychlostí, v pokusech 5 – 8 ji překonala *S. glabra*. Nicméně je důležité poznamenat, že průměrné rychlosti růstu *S. petersenii* a *S. americana* ve 2. experimentu poměrně převyšují rozsahy průměrů z jiných experimentů. Celkově lze ovšem nalézt rozdíl mezi kmeny *S. petersenii* a *S. americana*, což potvrdil i Tukeyho test (Tab. 5). *S. americana* v rámci jednotlivých pokusů měla celkově vyšší průměrné růstové rychlosti než *S. petersenii*, i když tento vztah není signifikantní.

Dále srovnám-li průměrné růstové rychlosti mezi pokusy, kmen *S. petersenii* z 2 pokusu měl srovnatelné růstové rychlosti s kmeny *S. americana* z ostatních pokusů. I rozsahy průměrných rychlostí *S. americana* a *S. glabra* jsou v pokusech 5 a 8 obdobné. V 7. experimentu rostla nejrychleji *S. glabra*.

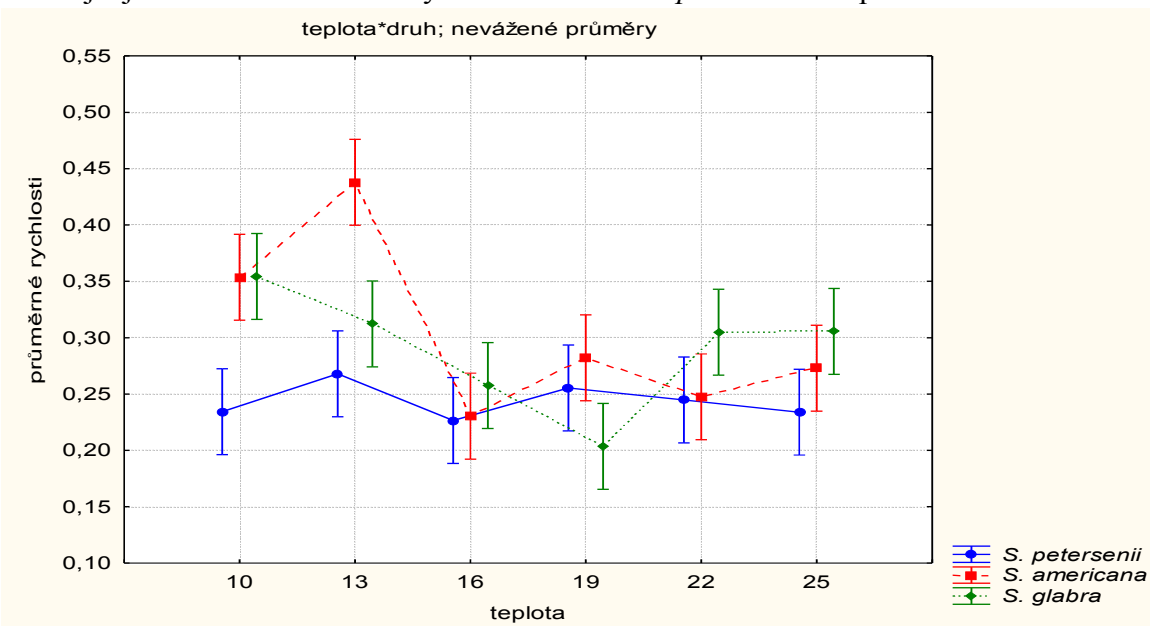


**Obr. 13:** Nevážené průměry růstových rychlostí v závislosti na **druhu**; aktuální efekt –  $F(2, 18) = 4,0943$ ,  $p = 0,03423$ ; vertikální úsečky  $\pm$  střední chyby; rozsah na ose y odpovídá rozsahu v grafu na Obr. 18, umožňující srovnání mezi analýzami.



**Obr. 14:** Nevážené průměry růstových rychlostí v závislosti na kombinaci faktorů **pokus\*druh**; aktuální efekt –  $F(6, 54) = 0,92212$ ,  $p = 0,4865$ ; vertikální úsečky značí  $\pm$  střední chyby; rozsah na ose y odpovídá rozsahu v grafu na Obr. 19, umožňující srovnání mezi analýzami.

Analýza odlišné reakce druhů na teplotu čili test kombinace faktorů **teplota\*druh** také nemá statisticky významný vliv na růstové rychlosti (**Obr. 15**). Z obrázku je patrné, že kmeny *Synura petersenii* dosahovaly nejnižších průměrných růstových rychlostí ve všech testovaných experimentech a ve většině teplot. *S. americana* vůbec nejlépe rostla v teplotě 13 °C, její průměrný růst byl v 10 °C obdobný jako růst druhu *S. glabra*. Nicméně v teplotách 16 °C až 25 °C nejsou viditelné již tak výrazné rozdíly mezi druhy jako právě v teplotách 10 °C a 13 °C. *S. glabra* rostla nejrychleji ve srovnání s ostatními druhy ještě v teplotách 16 °C, 22 °C a 25 °C, a v teplotě 19 °C nejpomaleji. *S. americana* rostla nejlépe také v teplotě 19 °C ve srovnání s jinými druhy. Nejznatelnější je asi rozdíl mezi kmeny *S. americana* a *S. petersenii* v teplotách 10 °C a 13 °C.



**Obr. 15:** Nevážené průměry růstových rychlostí v závislosti na kombinaci faktorů **teplota\*druh**; aktuální efekt –  $F(10, 18) = 1,5062$ ,  $p = 0,21582$ ; vertikální úsečky značí  $\pm$  střední chyby; rozsah na ose y odpovídá rozsahu v grafu na Obr. 17, umožňující srovnání mezi analýzami.

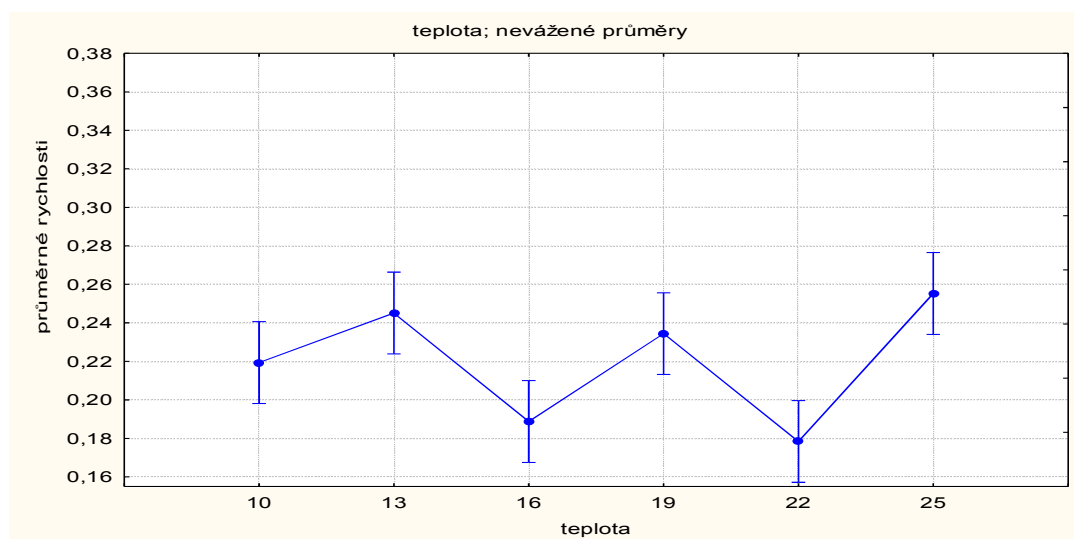
#### 4.4.2 Pokusy s druhy *Synura petersenii*, *S. americana* a *S. conopea*

Analyzovány byly pokusy 4 a 9 metodou ANOVA opakovaných měření na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Tyto experimenty byly analyzovány zvlášť, jelikož zde byl testován odlišný druh druhového komplexu. Výsledky značí, že žádný z testovaných faktorů ani jejich kombinací neměl statisticky významný vliv na růstové rychlosti (**Tab. 5**). Silně signifikantní je pouze vliv nevysvětlené variability. Z tohoto důvodu nebyly provedeny žádné post-hoc testy a dále uvádím pouze grafické ilustrace.

**Tab. 5:** Sumarizace výstupů ANOVA opakovaných měření, pokusy 4 a 9 - efekt představuje kategoriální nezávislou proměnnou, tedy faktor, jejichž vliv na závislou proměnnou testujeme; efekty jako **teplota\*druh** znamenají kombinace jednotlivých faktorů, efekt **pokus** indikuje jednotlivá opakování; je-li  $p$  nižší než 0,05 – červené hodnoty, je vliv faktoru na dané hladině významnosti signifikantní. Efekt „Intercept“ značí zbytkovou, nevysvětlenou variabilitu.

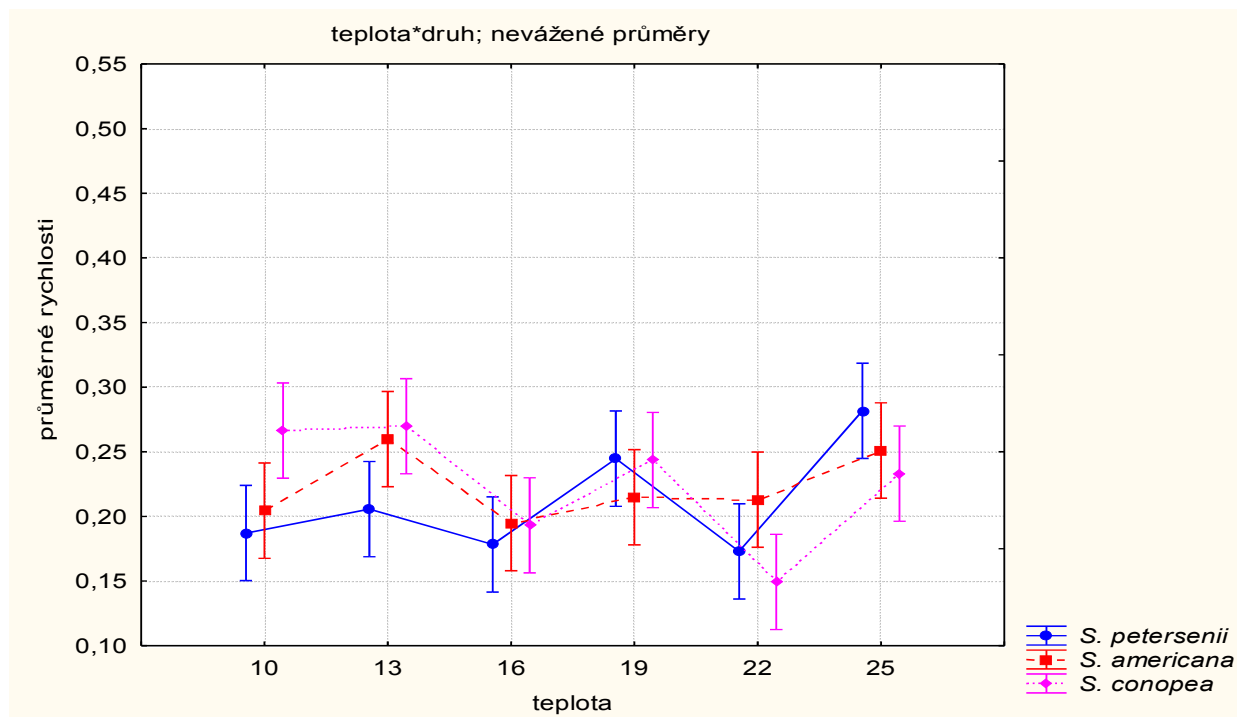
Faktor	Stupně volnosti	F	p
Intercept	1	643,8173	0,000000
<b>teplota</b>	5	2,1181	0,110054
<b>druh</b>	2	0,2476	0,783315
<b>teplota*druh</b>	10	0,6784	0,730810
Error	18		
<b>pokus</b>	1	2,0982	0,164667
<b>pokus*teplota</b>	5	2,3966	0,078270
<b>pokus*druh</b>	2	1,9667	0,168855
<b>pokus*teplota*druh</b>	10	1,2277	0,337971
Error	18		

Nevážené průměry růstových rychlostí v závislosti na **teplotě** v obou experimentech značí, že obecně jsou růstové rychlosti a tedy i jejich průměry poměrně nízké a mezi sebou mimo teploty 16 °C a 22 °C srovnatelné (**Obr. 16**).



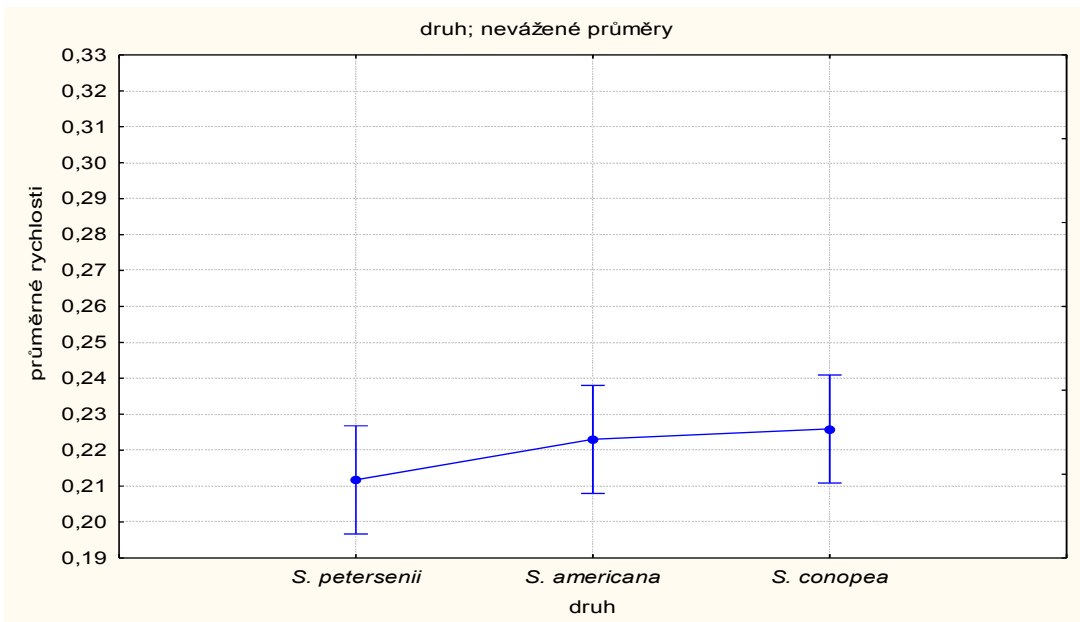
**Obr. 16:** Nevážené průměry růstových rychlostí v závislosti na faktoru **teplota**; aktuální efekt –  $F(5,18) = 2,1181$ ,  $p = 0,11005$ ; vertikální úsečky značí střední chyby; rozsah na ose y odpovídá rozsahu v grafu na Obr. 12, umožňující srovnání mezi analýzami.

Analýza odlišné reakce druhů na teplotu čili test kombinace faktorů **teplota\*druh** na růstové rychlosti v obou experimentech značí, že jsou růstové rychlosti poměrně nízké a srovnatelné ve všech teplotách (**Obr. 17**). Nicméně zde existují viditelné, ale nesignifikantní rozdíly mezi jednotlivými druhy: *Synura petersenii* rostla v teplotách 10 °C – 16 °C ze všech druhů nejpomaleji a v teplotách 19 °C a 25 °C naopak nejrychleji. *S. conopea* měla svá růstová maxima v teplotách 10 °C a 13 °C a minima v teplotách 22 °C a 25 °C. *S. americana* rostla ve srovnání s ostatními druhy v teplotě 19 °C nejpomaleji a v teplotě 22 °C nejrychleji. Ovšem své růstové maximum měla v teplotě 13 °C a minimum v 16 °C, v nichž rostla obdobně jako *S. conopea*.

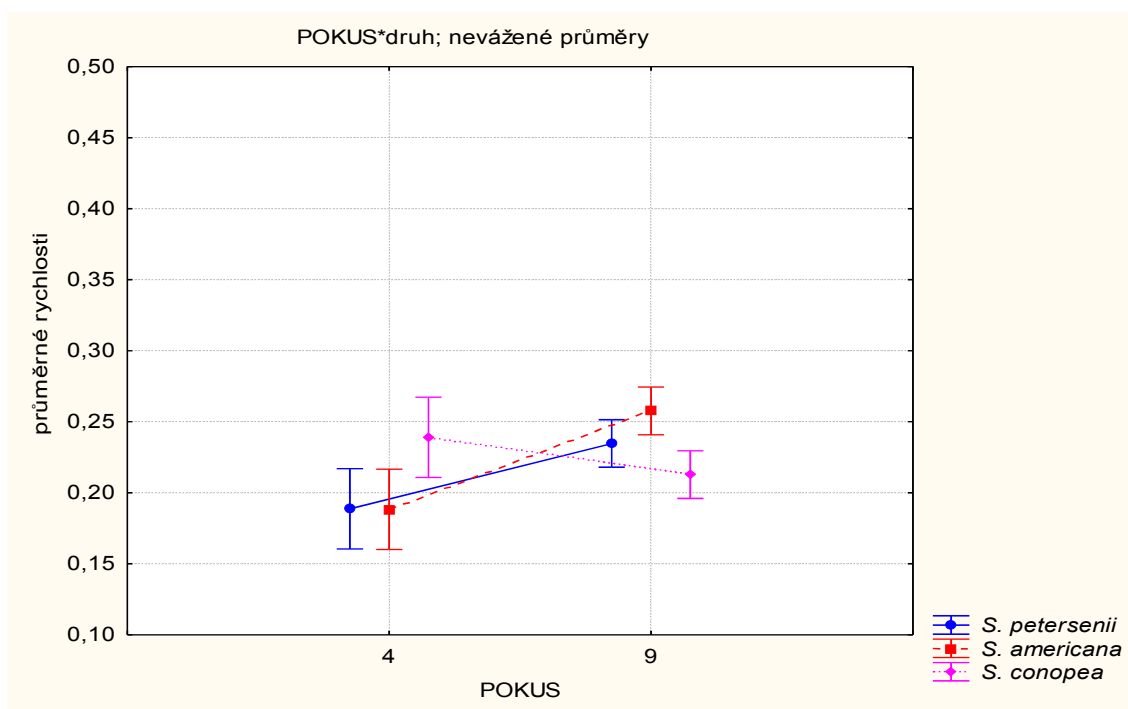


**Obr. 17:** Nevážené průměry růstových rychlostí v závislosti na kombinaci faktorů **teplota\*druh**; aktuální efekt –  $F(10,18) = 0,67836$ ,  $p = 0,73081$ ; vertikální úsečky značí  $\pm$  střední chyby; rozsah na ose y odpovídá rozsahu v grafu na Obr. 15, umožňující srovnání mezi analýzami.

Celkový vztah faktoru **druh** a průměrů růstových rychlostí vykazuje obdobné růstové rychlosti všech tří druhů (**Obr. 18**). To platí pro druhy *S. petersenii* a *S. americana* i v případě, vynesu-li vliv faktoru druh v rámci různých pokusů na průměrné rychlosti (**Obr. 19**). V pokusu 4 byly pro tyto dva druhy růstové rychlosti nižší než pokusu 9. Nicméně *S. conopea* vykazuje odlišný trend. V pokusu 4 byly sice nejvyšší růstové rychlosti zaznamenány u kmene druhu *S. conopea*, avšak v 9. experimentu měl stejný druh nejnižší růstové rychlosti.



**Obr. 18:** Nevážené průměry růstových rychlostí v závislosti na faktoru **druh**; aktuální efekt –  $F(2,18) = 0,24756$ ,  $p = 0,78332$ ; vertikální úsečky značí  $\pm$  střední chyby; rozsah na ose y odpovídá rozsahu v grafu na Obr. 13, umožňující srovnání mezi analýzami.



**Obr. 19:** Nevážené průměry růstových rychlostí v závislosti na faktoru **pokus\*druh**; aktuální efekt –  $F(2,18) = 1,9667$ ,  $p = 0,16885$ ; vertikální úsečky značí  $\pm$  střední chyby; rozsah na ose y odpovídá rozsahu v grafu na Obr. 14, umožňující srovnání mezi analýzami.



## 5. Diskuse

### 5.1 Teplota na lokalitách a biogeografie

Teplota na lokalitách v době izolace bývá implicitně považována za optimální teplotu růstu *in vivo* (Kim et al. 2008; Kristiansen 2008; Saxby-Rouen et al. 1997). *S. americana* se vyskytovala na lokalitách o teplotě 3,3 °C – 5,2 °C. Ve studiích Škaloud et al. (2012) a Škaloud et al. (2014) bylo použito také několik kmenů z USA databáze kmenů NCMA (<https://ncma.bigelow.org>). Z tohoto propojení informací vyplývá, že americké izoláty *S. americana* mají známé rozmezí teplot od 4 °C do 16 °C či 30 °C. Nižší teplotní interval je dán lokalitou odběru – sever Kanady. Zde studované kmeny byly nalezeny v teplotách nižších, jelikož byly izolovány v březnu či prosinci roku 2012, kdy byla teplota vzduchu za předchozí dva měsíce na všech lokalitách 0,9 °C do 4,8 °C. Český kmen *S. americana* byl nalezen pod ledem a holandské kmeny pocházely z prosince. Většina vůbec izolovaných kmenů tohoto druhu v Čechách pocházela z lokalit pod ledem či těsně po jeho roztátí. Teplota vody se pohybovala okolo 5 °C (Pavel Škaloud – osobní sdělení 2014). V červnu 2010 bylo izolováno několik kultur ze vzorku z Modřanských tůní v době, kdy již několik dní panovaly teploty okolo 30 °C. Po sekvenaci ITS bylo zjištěno, že se jedná vždy o druh *S. americana*. Kolonie nebyly ve vzorku příliš hojné a po izolaci se je nepodařilo ani kultivovat. Nebyly již viabilní. V Čechách bylo tedy celkově izolováno od roku 2008 pouze 10 kmenů (Pavel Škaloud – osobní sdělení 2014). Poslední tři testované kmeny tohoto druhu pocházejí z října z Irska. Informace o teplotě vody sice chybí, ale teplota vzduchu za předchozí dva měsíce a uplynulý rok byla 13 °C a 10 °C. Zde se jednalo o jednodruhový vodní zákal. Celkově tedy není výskyt *S. americana* v Evropě příliš častý, přestože je tento druh běžný v USA a Kanadě (<https://ncma.bigelow.org>; Škaloud et al. 2012). Byl nalezen ještě v Dánsku, Německu a Kolumbii, což vyplývá z morfologických dat (Škaloud et al. 2012). Informace o teplotě vody v době odběru v Evropě jsou tedy úzce vázány na lokalitu a období odběru. Nicméně z nich vyplývá, že *S. americana* v Evropě preferuje teploty vody od 3,3 °C do asi 15 °C.

To, že je druh *S. petersenii* široce rozšířen a je běžný (Škaloud et al. 2012), podporují i data v databázích (<http://chrysophytes.eu>, <https://ncma.bigelow.org>). Americké izoláty – NCMA - se vyskytovaly ve známém rozmezí teplot od 4 °C do 16 °C či 30 °C, což je shodné s druhem *S. americana*. Dle databáze Chrysophyceae byla *S. petersenii* odebírána z vody o teplotách v rozsahu 3,5 – 26,7 °C. Nejnižší teplota byla evidována u kmene z ČR a nejvyšší teploty z francouzské Akvitánie. Nejčastěji byly tedy kmeny tohoto druhu evidovány v teplotách pod 20 °C. V této práci studované kmeny druhu *Synura petersenii* byly izolovány z lokalit o teplotě 1 – 3,7 °C. Na těchto lokalitách byla teplota ze předchozí měsíce v intervalu 2,8 °C a 4,8 °C. Teploty vody jsou tedy opět nižší než uvádí NCMA a také nižší než rozsah teplot dle databáze <http://chrysophytes.eu>.

To je dáno opět použitými kmeny, které byly odebrány na daných lokalitách v temperátu v březnu a prosinci nebo koncem dubna v horské oblasti (Příloha 1). Některé kmeny byly také izolovány pod ledem. Nicméně na lokalitách, kde nebyla k dispozici teplota vody, byla tato teplota vzduchu 2,2 – 3 °C a 14 °C. Isoláty z lokality, kde byla průměrná teplota za předchozí měsíce 14 °C, pocházejí z října 2012 a ve vzorku byly patrné ještě i sinice. Celkově jsou tedy rozsahy teplot výskytu druhu *S. petersenii* širší. A přestože se tento druh vyskytoval nejčastěji v teplotách pod 20 °C, byl evidován i v teplotách nad 25 °C. To je bez pochyby v souladu s růstovými limity 0 - 31 °C (Saxby-Rouen et al. 1997). Také byl dle osobního sdělení Pavla Škalouda (2014) často sympatrický s jinými druhy rodu *Synura*.

*S. glabra* použitá v této práci byla izolována z teploty 4 – 6,1 °C. Druh *S. glabra* nebyl v databázi NCMA zaznamenán vůbec. V chrysofytní databázi se vyskytoval v teplotách 6,3 - 12 °C, přičemž nejnižší teplota byla evidována ve Finsku (<http://chrysophytes.eu>). Dle osobního sdělení Pavla Škalouda (2014) pocházely izoláty tohoto druhu v ČR nejvýše z teploty 14,4 °C a byly často sympatrické se *S. petersenii*. Z publikovaných morfologických dat vyplývá, že je tento druh široce rozšířen po celém světě (Škaloud et al. 2012). Z teplotních intervalů plyne, že se obecně jedná spíše o chladnomilný druh s obdobným rozsahem teplot, v jakém se vyskytovala v Evropě *S. americana*. Nicméně Kies, Berndt (1984) na základě morfologie tvrdí, že se *S. glabra* nevyskytuje v teplotách pod 6,5 °C. Druh také úplně chybí na Aljašce (Asmund 1968). Mělo by se tedy jednat v porovnání s jinými druhy komplexu spíše o teplomilný organismus (Škaloud et al. 2012). Publikovaná data a zjištěné teplotní intervaly výskytu tedy nejsou shodné. To může být opět způsobeno dobou odběru či místem odběru. Nebo to může být důsledek nedostatečně přesné definice druhu v daných studiích (Wagenmann, Gutowski 1995; Wee et al. 1991). Nicméně jednodruhové husté zákaly tohoto druhu jsem pravidelně pozorovala na jaře a na podzim v Miličovckých rybnících a v Modřanských tůňích v případě, že teplota vzduchu byla přes den alespoň 12 °C.

V této práci byly také použity kmeny druhu *S. conopea*, které pocházely z jediného odběrového místa s teplotou vody 6,1 °C. Kmeny byly izolovány z rašelinné tůně v Jizerských horách. Jediný isolát tohoto druhu je v americké databázi nevyhledatelný, takže není znám ani jeho rozsah teplot. Nicméně v chrysofytní databázi jsou údaje o dvou irských izolátech z rašelinných tůňích o teplotě 18,2 °C (<http://chrysophytes.eu>). A dle sdělení Pavla Škalouda (2014) existuje několik kmenů z teplot 9,2 - 16 °C z ČR, Norska a Švédska. Všechny kmeny pocházejí stejně jako mé z nižšího pH o hodnotách 5 – 7 a nízké konduktivity o rozsahu 18 – 124 μS/cm. Většinou se jedná o oligotrofní rašelinné biotopy. Rozsahy teplot jsou užší, *S. conopea* byla nalezena v teplotách pod 19 °C. Přesto, že je tento druh nejhůře rozeznatelný na základě morfologie šupin ve srovnání s ostatními druhy komplexu (Škaloud et al. 2014), jeví se jako ekologicky dobře rozlišitelný.

Obecně není tak běžný, ale je rozšířen celosvětově (Škaloud et al. 2012).

Celkově jsou tedy zkoumané druhy komplexu na základě dat z přírodních vzorků mimo *S. petersenii* spíše chladnomilné. Jedině *S. petersenii* je široce rozšířená a má i poměrně široké ekologické valence. *S. americana* je běžná v Severní Americe, ale v Evropě již tak ne. *S. conopea* preferuje určitý typ biotopů. A *S. glabra* je známá z celého světa. To vše je v souladu s výsledky studií Boo et al. (2010), Kynčlová et al. (2010), Škaloud et al. (2012) a Škaloud et al. (2014). Tyto studie dokládají, že v rámci druhového komplexu *S. petersenii* existuje ještě stále jisté procento nepopsané variability, a také, že zde existují jak druhy s ubikvitním rozšířením a širokou ekologickou valencí – *S. petersenii*, tak i linie endemické.

## **5.2 Základní růstové parametry – ekofyziologické studie**

Kvantifikace změn počtů buněk v kultivovaných experimentálních kulturách probíhala skrze měření absorbancí zákalů v daných monoklonálních kulturách. Ve všech pokusech bylo provedeno minimálně 4 – 6 měření absorbací jednou nebo dvakrát týdně. Absorbance je přímo úměrná počtu buněk, vyjadřuje tedy hustotu buněk v kultuře (Sorokin 1973; Tang, Vincent 2000; Wee et al. 1991). Pro ilustraci, jak se mění hustota buněk v čase, byly hodnoty absorbance vyneseny v závislosti na počtu dní od začátku experimentu – tedy pomocí růstových grafů. Podobně sestrojili své růstové grafy i Vijayakumaran et al. (2001). Přestože se jedná o vynesení surových hodnot absorbancí, byly v jejich i mých grafech patrné jednotlivé fáze růstu buněk v kultuře. V mnou vytvořených grafech však občas nebyla evidována lag fáze růstu.

Exponenciální fáze růstu v mých experimentech trvala obecně do 25.-30. dne růstu v teplotách do 22 °C, kdy začínala stacionární fáze růstu a růst zpomaloval až stagnoval či osciloval. Nicméně výsledky publikovaných ekofyziologických studií ukazují, že většinou je exponenciální fáze pro morfotyp *Synura petersenii* v intervalu trvající nejvýše do 12. - 14. dne růstu kultur (Kim et al. 2008; Sandgren, Flanagan 1986; Saxby-Rouen 1997; Wee et al. 1991). Tento požadavek splňoval pouze kmen *S. conopea* v 6. experimentu. Tn v teplotách 13 °C a 16 °C rozhodně nevykazoval lag fázi. Domnívám se, že tato nesourodost v mých datech v porovnání s již publikovanými výsledky nesouvisí s odlišností iniciálních koncentrací buněk. Wee et al. (1991) totiž na počátku naočkovali jen 2500 buněk/ml a exponenciální fáze růstu byla v rozsahu 3 - 9 dní. Saxby-Rouen et al. (1997) dále dokládají exponenciální fázi růstu do 12. dne s inokulem 5000 buněk/ml. Tuto disproporci spíše zapříčinila odlišnost metodiky vyhodnocování experimentů. V mých experimentech chybělo období aklimatizace, což zapříčinilo, že byly absorbance měřeny až po týdnů od inokulace do experimentálních kultur. Pokud tento čas odečtu, získám obdobné rozsahy období exponenciálního růstu jako v experimentech z publikovaných studií výše. Přesto jsem

nalezla drobné rozdíly v délce exponenciálního růstu mezi mnou zkoumanými druhy: *Synura americana* v teplotách do 19 °C často ukončovala exponenciální fázi růstu o několik dní dříve než *S. petersenii* a nabývala přitom obdobných či o něco vyšších hodnot absorbance. Zda existuje nějaká patrná druhová specifita v trvání exponenciální fáze růstu v závislosti na zkoumaném parametru prostředí *in vitro* bývá ale obecně těžké určit. Délka této fáze růstu může být jistým způsobem ovlivněna koncentrací buněk v počátečním inokulu. Růstové křivky se často neuvádějí (Wee et al. 1991). A také je nutné dokázat přesně definovat tuto fázi růstu (Saxby-Rouen et al. 1997; Wee et al. 1991). Srovnám-li růstové křivky druhů rodu *Mallomonas* a *Synura*, trvá sice jejich exponenciální fáze růstu maximálně 15 dnů (Lee, Kim 2007; Kim et al. 2008; Kim et al. 2009). Ale zdá se, že kmeny morfotypu *S. petersenii* mívají období zrychleného růstu o několik málo dní kratší (Lee et al. 2012). Zda jsou takovéto rozdíly mezi druhy signifikantní nebylo nikým testováno. Různé druhy organismů mohou mít tedy i při optimálních podmínkách růstu trochu odlišná období maximálního růstu, ale také je mít nemusejí. Pokud například srovnám růstové křivky teplomilných druhů rodu *Amphora* a *Chaetoceros* (Rajadurai et al. 2005), jejich exponenciální fáze růstu v optimálních teplotách trvala stejně dlouho – 8 dní. Rozsahy exponenciální fáze růstu u nepříbuzných druhů řas se liší ve studii Knowles, Zingmark (1978).

Z růstových grafů také vyplývá, že teplota 25 °C není pro růst zkoumaných druhů příliš optimální. Absorbance většinou oscilovaly a bylo dosahováno nižších hustot, obecně hodnoty dvakrát až třikrát menší ve srovnání s nižšími teplotami. To je v souladu s tvrzením, že *Synura petersenii* *sensu lato in vitro* roste nejlépe v 15°C (Sandgren, Flanagan 1986; Wee et al. 1991; Kim et al. 2008) nebo ve 20° C (Knowles, Zingmark 1978; Saxby-Rouen et al. 1997; Wagenmann, Gutowski 1995). Růstové rychlosti však tento trend zřejmě reflektují nedostatečně, jelikož byly ve vyšších teplotách srovnatelné. V teplotě 25 °C sice zaniklo nejvíce kultur, ale zbylé rostly poměrně rychle. Po srovnání většiny růstových rychlostí s odpovídajícími růstovými grafy jsem došla k závěru, že se jedná o artefakt výpočtu růstové rychlosti. Ta se totiž počítá často pouze ze dvou hodnot odrážejících počty buněk v exponenciální fázi růstu (Coles, Jones 2000; Degerlund et al. 2012; Kaeriyama et al. 2011; Kim et al. 2008, Kim et al. 2009; Lee, Kim 2007; Lee et al. 2012; Lombard et al. 2009; Lowe et al. 2005; Moser, Weisse 2011; Rajadurai et al. 2005; Ribeiro et al. 2013; Röder et al. 2012; Yubuki et al. 2008). A mé hodnoty růstových rychlostí byly získány stejným způsobem. Pokud tedy existuje několik neklesajících hodnot absorbancí, počtů buněk atd. a rychlost růstu se počítá pouze ze dvou hodnot, může taková metodika vyústit v kladné hodnoty růstových rychlostí. A to i v případě, že jsou růstové rychlosti získány z růstových křivek vzniklých pomocí regrese (Wee et al. 1991). Proto se domnívám, že v některých případech je lepší analyzovat jak růstové rychlosti tak růstové křivky či grafy. To platí zvláště v případech, kdy se pokoušíme

zjistit, jaké hodnoty environmentálních parametrů jsou pro dané organismy optimální a jaké nejsou. Wee et al. (1991) také přímo tvrdí, že analýzy růstových křivek a růstových rychlostí ne vždy poskytují stejné výsledky. Růstové křivky odrážejí totiž změny biomasy v čase, kdežto růstové rychlosti okamžité změny v růstu během exponenciální fáze. V závislosti na požadovaném typu informací může být růst řas v odpovědi na environmentální či chemické parametry prostředí lépe pochopen při využití informací jak z růstových křivek, tak z růstových rychlostí. Tato zjištění se samozřejmě netýkají jen neoptimálních teplot. Ale platí obecně v případě, že kultura nějakého kmene sice vykazuje kladnou hodnotu růstové rychlosti, avšak hodnoty v růstovém grafu oscilují a jsou příliš nízké. V mém případě to platí např. pro kmen *S. petersenii* ve všech experimentálních teplotách v 5. pokusu. Na tomto místě bych chtěla ještě podotknout, že nehodnocení růstových křivek není jediným zjednodušením, které může mít neblahý vliv na výsledky ekofyziologické studie. Ekofyziologie protist je většinou analyzována pouze prostřednictvím jediného experimentu na několika kmenech nebo také jediného experimentu na jediném kmeni v závislosti na jednom parametru prostředí (Coles, Jones 2000; Degerlund et al. 2012; Kaeriyama et al. 2011; Kim et al. 2008, Kim et al. 2009; Lee, Kim 2007; Lee et al. 2012; Lombard et al. 2009; Lowe et al. 2005; Moser, Weisse 2011; Rajadurai et al. 2005; Ribeiro et al. 2013; Röder et al. 2012; Yubuki et al. 2008). Provedení většího množství experimentů na vícero různých kmenech sice může vnést do analýzy další nevysvětlitelnou variabilitu či může posílit vliv kmenové specifity. Ale, jak ukazují mé výsledky dále, hlavní biologické trendy nemusí být zastřeny a výsledky mohou být zajímavější. Např. mohou být signifikantně odlišeny blízkce příbuzné druhy druhového komplexu – viz níže.

Celkově jsem nenalezla ani žádný signifikantní rozdíl mezi růstovými rychlostmi v teplotách nad 16 °C, přestože byla teplota 25 °C dle růstových křivek zjevně suboptimální. Výrazný pokles růstových rychlostí v teplotě 25 °C nenalezli ani Saxby-Rouen et al. (1997). Stejně jako u kultur ze studie Knowles, Zingmark (1978), které v teplotě 30 °C již nevykazovaly vůbec žádný růst. Vyšší teplota 23 °C byla *in vitro* suboptimální i pro většinu kmenů tří druhů rodu *Mallomonas* (Lee, Kim 2007). Tyto kmeny vykazovaly čtyřikrát až osmkrát nižší počty buněk ve srovnání s maximální denzitou. A růstové rychlosti byly v této mezní teplotě již poměrně nízké. Je tedy možné, že *in vitro* kultivované kmeny druhu *Mallomonas* mají svou růstovou hranici v o několik stupňů nižších teplotách než zkoumané druhy komplexu *S. petersenii*. Druhy rodu *Mallomonas* totiž vykazovaly deviantní růstové křivky a zároveň nižší růstové rychlosti ve 23 °C. Ale druhy komplexu *S. petersenii* vykazovaly obecně v teplotě 25 °C obdobné růstové rychlosti jako v teplotách nad 16 °C. Z jejich růstových křivek je ale již patrné, že jim tato teplota nevyhovuje (viz výše).

## 5.3 Růstové rychlosti

### 5.3.1 Kvantifikace růstových rychlostí

Růstové rychlosti jsou často preferovanou odpovědí na zkoumané environmentální parametry prostředí *in vitro*. Efekt konkrétního testovaného parametru může být totiž ztracen kvůli rozličným mechanismům působícím v průběhu experimentů (Wee et al. 1991). A růstové rychlosti navíc dovolují vyhnout se nesourodým koncentracím buněk v počátečním inokulu či důsledkům rozdílných biomas kontrolních a experimentálních kultur (Wee et al. 1991).

Nejčastěji se růstové rychlosti vyjadřují semilogaritmicky – logaritmem 10 či přirozeným logaritmem takto:  $(\ln X_2 - \ln X_1) / t_2 - t_1$ . Rozdíl  $t_1 - t_2$  poukazuje na hodnoty veličiny  $X$  v exponenciální fázi růstu. Veličina  $X$  představuje jakoukoli veličinu odrážející koncentrace buněk. Mohou to být přímé počty buněk, optická denzita či hodnoty absorbance nebo transmitance již vztažené ke „slepému vzorku“, obsah chlorofylu, množství sušiny či různé kombinace (např. Degerlund et al. 2012; Foy, Gibson 1993; Kim et al. 2008; Lee et al. 2012; Lombard et al. 2009; Lowe et al. 2005; Rajadurai et al. 2005; Ribeiro et al. 2013; Röder et al. 2012; Roubex, Lancelot 2008). Způsobů jak měřit změny buněčných koncentrací v čase je mnoho, ale růstová rychlost bývá vyjadřována stále stejným způsobem. Pro hodnocení ekofyziologie různých organismů prostřednictvím jejich růstových rychlostí *in vitro* existuje předpoklad, že nejvyšších hodnot by měla rychlost růstu dosahovat v exponenciální fázi růstu v optimálních podmínkách prostředí. Tento předpoklad bývá ve studiích buď přímo vyjádřen, či je pouze implicitně zahrnut. Interpretace je takováto: Dosáhl-li daný organismus v určité hodnotě environmentálního parametru maximální růstové rychlosti je tato hodnota parametru prostředí pro něj zjevně optimální. Dále bývá často testována statistická významnost rozdílů v růstových rychlostech mezi různými izoláty, druhy atd. (Coles, Jones 2000; Degerlund et al. 2012; Foy, Gibson 1993; Kaeriyama et al. 2011; Kim et al. 2008, Kim et al. 2009; Lee, Kim 2007; Lee et al. 2012; Lombard et al. 2009; Lowe et al. 2005; Moore et al. 1995; Moser, Weisse 2011; Rajadurai et al. 2005; Ribeiro et al. 2013; Röder et al. 2012; Roubex, Lancelot 2008; Yubuki et al. 2008). Také jsem při hodnocení ekofyziologie druhového komplexu *Synura petersenii* postupovala stejně. Byla-li detekována lag fáze při růstu kultur, neměla na hodnoty mých růstových rychlostí žádný vliv. Ty byly totiž počítány pro každý kmen i klon zvlášť a celkové rozsahy hodnot jsou srovnatelné – viz dále (Kim et al. 2008). Navíc jsem v úvahu brala pouze nejvyšší hodnoty, které charakterizují exponenciální fázi růstu (Saxby-Rouen et al. 1997).

Ze vztahu růstových rychlostí a experimentálních teplot vyplynulo, že mimo nejodlehlejší hodnoty byly růstové rychlosti nejčastěji v rozsahu 0,1 – 0,6 den<sup>-1</sup>. Jen v pilotním pokuse a experimentu 4 a 9 byly tyto rozsahy nižší do hodnot 0,4 den<sup>-1</sup>. Ve studii Kim et al. (2008)

nabývaly růstové rychlosti v teplotním experimentu pro jednotlivé kmeny morfotypu *S. petersenii* hodnot 0,2 – 0,4 den<sup>-1</sup>. Celkově o něco užší rozsahy rychlostí 0,15 – 0,34 den<sup>-1</sup> publikovali pro své kmeny v rámci stejných teplot i Wagenmann, Gutowski (1995). Do studie byl zahrnut i jiný druh komplexu *S. petersenii*. Rozsahy mých hodnot růstových rychlostí jsou tedy s těmi výše uvedenými studii celkově, a to i když se jedná o širší interval hodnot. Pokusy 4 a 9 jsou se svými celkově nižšími hodnotami obdobné jako rychlosti Wagenmann, Gutowski (1995). Vyšší rozsahy růstových rychlostí 0,38 – 0,84 den<sup>-1</sup> a 0,4 – 1 den<sup>-1</sup> našli ve svých experimentech v teplotách 10 - 25°C Knowles, Zingmark (1978) a Saxby-Rouen et al. (1997). Je těžké určit, čím by mohly být tyto odlišnosti v intervalech růstových rychlostí způsobeny. Teplotní experimenty probíhaly v obdobném pH v intervalu 6,7 – 7,5 (Kim et al. 2008, Saxby-Rouen et al. 1997; Wagenmann, Gutowski 1995). Knowles, Zingmark (1978) pH neuvádějí. Saxby-Rouen et al. (1997) zjistili pro tyto hodnoty pH, že růstové rychlosti se liší pouze o 0,1 den<sup>-1</sup>. Shodný byl též vztah růstových rychlostí v závislosti na pH pro kmeny Kim et al. (2008). Dokonce pouze o hodnotu 0,025 den<sup>-1</sup> se v tomto intervalu pH lišily růstové rychlosti ve studii Wee et al. 1991. Z toho se dá usuzovat, že odlišné hodnoty růstových rychlostí z různých teplotních experimentů nesouvisí s hodnotami pH v těchto experimentech. Parametr, který však zřejmě má *in vitro* na hodnoty růstových rychlostí vliv, je světelná intenzita. Kim et al. (2008) zkoumali u tří kmenů morfotypu *S. petersenii* růstové rychlosti v závislosti na světelné intenzitě a teplotě. Zjistili, že všechny kmeny odpovídají na rostoucí intenzitu osvětlení skoro stejně a že v teplotách 9 °C a 21 °C jsou kmeny citlivější na nižší osvětlení. Růstová rychlost byla o několik 0,01 den<sup>-1</sup> nižší. Nejvyšší růstovou rychlost o hodnotách 0,3 – 0,5 den<sup>-1</sup> zaznamenali v 80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> a ve 120 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> již klesala, zřejmě to již způsobila světelná inhibice. V hodnotě 40 byla rychlost v rozsahu 0,25 – 0,4 den<sup>-1</sup>. Přičemž maxima intervalu značí hodnoty v optimální teplotě pro růst daných kmenů. Pro kmen *S. petersenii* ze studie Saxby-Rouen et al. (1997) platilo, že růstová rychlost do intenzity osvětlení 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> prudce rostla a poté stagnovala na hodnotě 1 den<sup>-1</sup> do hodnot světelné intenzity 250 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Při osvětlení 80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> dosahovala již rychlost růstu hodnoty 0,8 den<sup>-1</sup> a v hodnotách okolo 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> byla 0,5 den<sup>-1</sup>. Tento kmen byl však v tomto experimentu pěstován ve své neoptimálnější teplotě růstu, jedná se tedy o maximální možné růstové rychlosti. Pro hodnotu 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> jsou tedy hodnoty růstových rychlostí srovnatelné. Jistě bude mít na růstové rychlosti vliv také kmenová specifita. Variabilní totiž byly i rozsahy růstových rychlostí ve studiích Knowles, Zingmark (1978), Wagenmann, Gutowski (1995) a Kim et al. (2008) přestože osvětlení bylo 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> a 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 5.3.2 Teplotní optimum růstu *in vitro* – mezidruhové rozdíly

Z grafického vynesení růstových rychlostí (Příloha 2) je nejprve evidentní výrazný efekt

kmenové specifity. Ten je nejpatrnější, pokud srovnáváme růstová optima různých druhů, která jsou prezentována maximálními růstovými rychlostmi (Kim et al. 2008; Saxby-rouen et al. 1997), mezi jednotlivými experimenty. Například srovnám-li růstové rychlosti dvou sympatrických kmenů *S. conopea*, ve 4. pokusu rostl její kmen nejrychleji v teplotách 10 °C, 13 °C a 19 °C, rychlosti: 0,36 den<sup>-1</sup>, 0,31 den<sup>-1</sup> a 0,26 den<sup>-1</sup>. V 9. experimentu byl druhý kmen s rychlostmi: 0,25 den<sup>-1</sup>, 0,22 den<sup>-1</sup> překonán kmenem *S. americana* s rychlostmi 0,29 den<sup>-1</sup>, 0,32 den<sup>-1</sup> v teplotách 10 °C, 13 °C. V 19 °C byly rychlosti srovnatelné. Dále ve 2. experimentu měl kmen *S. americana* nejvyšší růstové rychlosti v teplotách 13 °C, 19 °C a 22 °C, v teplotách 10 °C a 16 °C rostla rychleji *S. petersenii* atd. Efekt kmenové specifity v ekofyziologii je již dlouho známý (Coles, Jones 2000; Degerlund et al. 2012; Moser, Weisse 2011; Peters, Breeman 1992; Vijayakumaran et al. 2001; Wee et al. 1991). Mé výsledky jsou tedy v souladu s jinými studiemi. Jsou-li provedeny statistické analýzy výsledků, bývá vliv kmenové specifity na růstové parametry signifikantní (Wee et al. 1991). V mém případě měla kmenová specifita na růstové rychlosti mírně signifikantní vliv – viz dále. Avšak přes evidentní vliv kmenové specifity většinou ve 13 °C rostla nejrychleji *Synura americana*, kmeny *S. petersenii* rostly poměrně pomalu a *S. conopea* měla poměrně vysoké rychlosti růstu v nižších teplotách. Z těchto analýz dále vyplývá, že *Synura petersenii* a *S. conopea* měly neoptimálnější rychlosti růstu zřejmě 10 °C, pro *S. americana* a *S. glabra* to bylo 13 °C. Nejvyšší průměrná růstová rychlost pro *Synura petersenii* byla zaznamenána ve 25 °C. Nejnižší růstová rychlost vůbec byla evidována pro *S. americana* ve 22 °C a nejvyšší pro *S. petersenii* ve 13 °C. Nejnižší celkové průměrné růstové rychlosti byly zaznamenány pro druhy *S. petersenii* a *S. conopea*. A rozsahy hodnot rychlostí byly mimo rychlosti *S. conopea* srovnatelné. Pro zkoumané druhy jsou tedy většinou dle růstových rychlostí optimální spíše nižší teploty 10 °C a 13 °C.

Statisticky byly analyzovány dva soubory dat – pokusy s druhy *S. petersenii*, *S. americana* a *S. glabra* a experimenty s druhem *S. conopea*. Efekt kmene je zahrnut pod faktor **pokus**. Z analýzy prvního souboru dat vyplývá: Celkově se lišily signifikantně růstové rychlosti v různých teplotách nezávisle na druhu. Dle post-hoc testu se lišily teploty 13 °C a 16 °C, což je v souladu i s výstupy grafického znázornění růstových rychlostí a se základními analýzami. Všechny druhy tedy rostly signifikantně lépe v nižších teplotách - 10 °C a 13 °C. To je v podstatě shodné pro morfotyp *S. petersenii* s výstupy studie Kim et al. (2008). Růstové optimum kmenů této studie bylo v 15 °C. Nicméně ve větší části studií bylo zjištěno optimum růstu v teplotě 20 °C (Knowles, Zingmark 1978; Saxby-Rouen et al. 1997; Wagenmann, Gutowski 1995). Svou úlohu zřejmě sehrála opět vnitrodruhová variabilita (Wee et al. 1991), jelikož mé kmeny obecně pocházely z teplot určitě pod 15 °C. Navíc vliv kmenové specifity byl nakonec mírně signifikantní. Jak dlouho je schopen daný izolát „udržovat“ dané růstové charakteristiky v závislosti na parametrech



prostředí, z něhož pochází, zřejmě zatím nikdo nestudoval. Nicméně zajímavé je, že celkově jsou růstové rychlosti v 16 °C nižší, i když byly kmeny ve formě zásobních kultur v obdobné teplotě dlouhodobě kultivovány. To je vlastně platné i pro druhy testované jako 2. soubor dat. Dále byly nalezeny signifikantní rozdíly v celkových růstových rychlostech mezi jednotlivými druhy testovanými v 1. souboru dat. Dle Tukeyho testu se statisticky významně lišily rychlosti druhů *S. americana* a *S. petersenii*, přičemž druh *S. americana* rostl nejrychleji a *S. petersenii* nejpomaleji. To, že *S. petersenii* roste pomaleji než *S. americana* bylo patrné též z grafického vynesení růstových rychlostí a z analýzy vztahu **pokus\*druh**. Tato analýza zkoumala vztah mezi různými druhy v rámci různých pokusů, tedy mezi různými kmeny různých druhů a růstovými rychlostmi. *S. americana* zde sice nerostla vždy nejrychleji, ale *S. petersenii* rostla ve všech analyzovaných experimentech znovu nejpomaleji, i když tento vztah nebyl signifikantní.

Nicméně celkově výsledky těchto dvou analýz ukazují, že *S. petersenii* skutečně rostla ze všech druhů ve všech experimentech nejpomaleji. Jak si ale vysvětlit, že je tak široce rozšířená (Škaloud et al. 2012)? Jednak má širší ekologické valence než jiné mnou zkoumané druhy. Celosvětově byla totiž zaznamenána v mnohem širším rozmezí teplot (<https://ncma.bigelow.org>; <http://chrysophytes.eu>). Jako jediná byla odebrána z vod o teplotě vyšší než 22 °C (Němcová et al. 2012). Často se vyskytovala sympatricky s jinými druhy komplexu (<http://chrysophytes.eu>) a dokonce sympatricky se zelenými řasami či sinicemi. Navíc se při dlouhodobé kultivaci jevila i po více než 2 měsících bez přeočkování většinou plně viabilní či pouze sedimentovala ve formě palmel. Chrysophyta mohou být považována za r – strategy (Wyatt 2014) v důsledku své rychlé tvorby hustých vegetačních zákalů na jaře i na podzim (Kristiansen 2008; Zeeb, Smol 2001). Stejně jsou na tom i rozsivky a obrněnky (Wyatt 2014). Nicméně obecně nízká růstová rychlost, evidentní růst i teplotách vyšších než 22 °C a schopnost koexistence s jinými druhy i za podmínek blízkých nosné kapacity prostředí – K (Wyatt 2014) poukazuje na *S. petersenii* jako na K – strategy. Naproti tomu *S. americana* se v Evropě chová spíše jako r - strategy (Wyatt 2014). Vykazuje totiž signifikantně vyšší růstové rychlosti a byla izolována pod ledem nebo těsně po jeho roztátí, případně po jiné disturbanci. *S. americana* navíc není v Evropě ani běžná. Jaké jsou její parametry růstu v Severní Americe, není známo. Existuje zatím jediná ekofyziologická studie, která studovala kmeny *S. americana* společně s jinou nepříbuznou linií (<https://ncma.bigelow.org>; Škaloud et al. 2012; Wee et al. 1991). Ta bohužel v tomto ohledu nepřináší žádné využitelné závěry.

Statistické analýzy druhého souboru dat bohužel nejsou signifikantní zřejmě v důsledku obecně nízkých a srovnatelných růstových rychlostí, což možná opět souvisí s kmenovou specifiitou (Wee et al. 1991). Dále bylo u pokusů 2, 5, 7 a 8 testováno, zda se liší růstové rychlosti různých druhů v různých teplotách. *S. petersenii* skutečně rostla nejpomaleji také téměř ve všech

experimentálních teplotách. V teplotách 10 °C a 13 °C jsou viditelné nejmarkantnější rozdíly mezi druhy. Nejrychleji zde rostla *S. americana* s růstovým maximem ve 13 °C. Totéž platí pro druhou množinu pokusů. Takže se opravdu zdá, že je její optimum ve 13 °C. *S. glabra* rostla v nízkých teplotách středně rychle, ale v teplotě 22 °C a 25 °C nejrychleji ze všech testovaných druhů. Prvé je v souladu s daty v databázi (<http://chrysophytes.eu>). A zjištění, že má tento druh vysoké růstové rychlosti v teplotách nad 22 °C nemusí být artefakt výpočtu růstové rychlosti. Růstové křivky v 25 °C sice nenesou úplně klasické rysy (Waytt 2012), ale růst byl občas patrný. Tvzení, že se jedná o teplomilnější druh tedy nakonec nemusí být úplně mylné (Kies, Berndt 1984; Škaloud et al. 2012). Často se také zjistí, že teplota optimální pro růst *in vitro* je mnohem vyšší než teplota, z níž byl organismus izolován čili pro růst *in vivo* optimální. Vliv na růstovou rychlost mají totiž též jiné faktory jako je kompetice, predace či parazitismus (Pichrtová 2009; Sommer et al. 2012). Nicméně je důležité poznamenat, že vliv druhu a teploty zároveň na růstové rychlosti nebyl signifikantní. Totéž platí pro pokusy s druhem *S. conopea*, i když tento druh viditelně rostl ve srovnání s ostatními druhy v nízkých teplotách rychleji. Důvodem by mohla být kmenová specifita, i kmeny tohoto druhu pocházely z nízkých teplot. Celosvětově byl tento druh evidován v teplotách 10 °C - 19 °C. Ovšem domnívám se, že pro *S. conopea* bude spíše určujícím faktorem jiný parametr prostředí než teplota. Mohla by jím být konduktivita, protože veškeré evidované kmeny byly izolovány z lokalit o konduktivitě nižší než 130  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Zajímavé je, že se vždy jednalo o rašelinné biotopy (Pavel Škaloud – osobní sdělení 2014; <http://chrysophytes.eu>). Nicméně je také možné, že se růstové rychlosti jednotlivých druhů v různých experimentálních teplotách prostě nelišily ve zkoumaném rozmezí teplot. Vyšší teploty jednoduše nejsou většinou *in vivo* pro tyto organismy již optimální, vytvářejí vodní květy nejčastěji na jaře a na podzim (Kristiansen 2008). Také mé kmeny byly izolovány většinou z teplot nižších než 15 °C, mnohdy dle teploty vody a data odběru těsně po roztátí ledu. Jiné kmeny – z Pilské nádrže a z irského Bundoranu - byly odebrány těsně po letních podmínkách. Voda tedy byla ještě částečně stratifikovaná nebo se jednalo o mělkou nádrž, v níž ke stratifikaci nedochází. Teplota vody však zde již musela být také nižší než 15 °C. Teplota vzduchu na daných lokalitách byla totiž za poslední dva měsíce 14 °C a 13 °C. Z těchto důvodů by se druhy mohly signifikantně lišit v nižších teplotách, např. v rozmezí 5 °C až 15 °C. Ovšem například kmeny ze studie Knowles, Zingmark (1978) v teplotě 5 °C nevykazovaly žádný růst. Nicméně taková teplotní adaptace se v čase nemusela vyvinout sama o sobě či jen za spolupůsobení jiných abiotických faktorů prostředí. Mohla by být důsledkem rozdělení nik mezi jednotlivými skupinami fytoplanktonu, které se střídají ve vodě v průběhu roku – PEG model. Tato sukcese planktonu je samozřejmě ovlivňována mnoha abiotickými a biotickými faktory. Ale teplota vody a délka dne či světelná intenzita v přírodním biotopu – vodní nádrži slouží jako primární stimuly růstu jarního či podzimního fytoplanktonu (Sommer et al. 2012). Rozvoj jarního vodního

květu během oteplování obvykle souvisí též s časnějším roztátím ledu nebo časnější teplotní stratifikací. Teplotní stratifikace – v létě či v zimě - totiž omezuje hloubku míchání a snižuje tak pravděpodobnost toho, že se fytoplankton dostane v důsledku míchání mimo fotickou zónu (Sommer et al. 2012). Mezi načasováním rozvoje jarního či podzimního vodního květu (zákalu) a teplotou vody jsou očekávány variabilní vztahy ve vodách nestratifikovaných, bez ledu nebo když vzrůstající stres způsobený větrem neutralizuje efekt oteplování na stratifikaci (Sommer et al. 2012).

Signifikantní vliv na růstové rychlosti měla též kombinace faktorů **pokus\*teplota\*druh** pro pokusy s druhem *S. glabra*. To znamená, že růstové rychlosti jednotlivých kmenů různých druhů v různých teplotách se lišily. Vliv experimentálních teplot na růstové rychlosti druhů je tedy statisticky významný, ale pouze je-li do analýzy zahrnut i faktor kmen. Obdobné výsledky přináší i studie na pH (Wee et al. 1991). To svědčí opět o výrazné kmenové specifitě, která je patrná již grafů růstových rychlostí (Příloha 2). Vnitrodruhová variabilita je pro studie tohoto typu charakteristická (Coles, Jones 2000; Degerlund et al. 2012; Moser, Weisse 2011; Peters, Breeman 1992; Ribeiro et al. 2013; Vijayakumaran et al. 2001; Wee et al. 1991). V pokusech 4 a 9 je patrná pouze nesignifikantní kmenová specifita, viditelná na vztahu **pokus\*druh** a růstových rychlostí. Přestože samostatný vliv vnitrodruhových rozdílů – test faktoru **pokus** - nebyl signifikantní. Vnitrodruhová variabilita je patrná a signifikantní v rámci různých pokusů, experimentálních teplot a druhů, což je viditelné na grafech v Příloze 2.

Z grafů růstových rychlostí je též patrné, že v experimentu 3 chybí větší množství hodnot. *S. glabra*, která se před přípravou experimentálních kultur jevila plně viabilní, téměř všechna zanikla. Domnívám se, že tento jev nesouvisí s kmenovou specifikou, ale spíše s určitým efektem sezóny (McQuoid 2005). Dva roky po sobě se v zimním období (konec ledna, únor), kdy byl proveden tento pokus, zastavil také růst zásobních kultur. Zajímavé jsou i nápadné rozdíly v růstových rychlostech mezi sympatrickými kmeny použitými v témže experimentu – pokus 4 a 5. Tyto rozdíly jsou nejlépe patrné z růstových křivek. V 5. experimentu je sice zřejmý rozdíl mezi sympatrickými kmeny druhů *S. glabra* a *S. petersenii*, ale pouze ve 25 °C, kdy kmen *S. petersenii* rostl a u kmene *S. glabra* jeho absorbance oscilovaly. Nicméně vzhledem k teplotě vody, která na lokalitě zřejmě panovala – přítomné byly i sinice rodu *Microcystis* preferující vodu teplejší než 12 °C (Tan 2011) -, se domnívám, že se nejedná o nevýznamný rozdíl. Navíc ve 4. experimentu, kde byly testovány sympatrické kmeny *S. petersenii* a *S. americana*; *S. petersenii* ve všech teplotách spíše „živořila“. Tato drobná rozlišení růstových parametrů v rámci jediné lokality mohu dokládat, jak se tyto blízké příbuzné druhy chovají v sympatrii. A jelikož se druhy komplexu *S. petersenii* často vyskytují společně nebo současně na dané lokalitě s jinými druhy rodu *Synura*

(<http://chrysophytes.eu>), mohou takové drobné rozdíly, i když, poukazovat na vznik druhů komplexu sympatrickou speciací. Sympatrická speciace je totiž pravděpodobně výsledkem kompetice o zdroje mezi jednotlivými populacemi (Dieckmann, Doebeli 1999). Mohla by se tedy projevat ekologickou specializací, která může vysvětlovat speciace také u sympatrických pseudokryptických kokolitek (Coccolithophorea) či u morfologicky podobných druhů dírkonožců (Foraminifera) (Saéz et al. 2003). Domnívám, že příkladem takové ekologické specializace je druh *S. conopea*, která byla izolována pouze z rašelinných biotopů. Nebo strategie *S. petersenii* doprovázená výskytem v teplotách vyšších než 22 °C (<http://chrysophytes.eu>). *S. petersenii* se totiž chová jako „oportunní“ K-stratég, který dokáže v přírodě růst i v mnohem vyšších teplotách vody než jiné druhy komplexu. To je navíc doloženo jejími růstovými charakteristikami *in vitro*. Vždyť se "areály" výskytu zkoumaných druhů komplexu vlastně překrývají (Škaloud et al. 2012). Ale nedá se říci, že by tento fakt plně ospravedlňoval Finlayho ubikvitní model – životní prostředí vybírá (Finlay 2002). Některé rody komplexu jsou vyloženě endemické, jiné běžné na jediném kontinentu (Škaloud et al. 2012; Škaloud et al. 2014), kde pravděpodobně vznikly alopatricky. Whitaker (2006) na otázku, zda se geograficky oddělené populace mikroorganismů rozrůžňují nezávisle nebo jejich struktura připomíná právě model "vše je všude – jen prostředí vybírá", odpovídá: "Pomocí vysoce rozlišujících genetických a genomických nástrojů pátrání po "mikrobiálních vačnatcích" odhalilo, že ve skutečnosti je obé pravda. Některé druhy mikroorganismů vykazují alopatricky vzniklé odlišnosti, zatímco jiné ne." Že je tento závěr platný i pro druhy komplexu *S. petersenii*, dokládají všechny studie, které se zabývaly molekulární a morfologickou variabilitou těchto druhů (Boo et al. 2010; Kynčlová et al. 2010; Škaloud et al. 2012; Škaloud et al. 2014). Podobně jsou na tom i jiné chrysofytní druhy (Škaloud et al. 2013). Jak je ale možné, že planktonní protista, která udržují obrovské a často i rozptýlené populace (Saéz et al. 2003; Watts et al. 2013) mohou speciovat alopatricky, i když taková speciace vyžaduje menší a více strukturované populace (Saéz et al. 2003; Whitaker 2006)? Zřejmě to souvisí se střídáním planktonní motilní fáze a dormantní fáze cysty, čehož jsou schopné snad všechny planktonní řasy (Anderson 1998; Bravo, Figueroa 2014; Granéli et al. 2011; Kristiansen 2008; Sgroso et al. 2001; Zeeb, Smol 2001). Watts et al. (2013) ukazují, že právě díky střídání těchto dvou fází životního cyklu jsou efektivní velikosti populací planktonních protist o mnoho nižší, než se dříve uvažovalo, a jsou dokonce srovnatelné s efektivními velikostmi populací makroskopických organismů. Tvorba cyst totiž představuje pro genetickou variabilitu dané populace vegetativních buněk jakési hrdlo láhve, ne všechny buňky vodního květu totiž encystují (Anderson 1998). Dále se domnívám, že speciace sympatrická, speciace v rámci jedné lokality, může být určitým způsobem urychlována díky již existující vnitrodruhové variabilitě v podobě kmenové specifity. Pokud se na lokalitu pomocí nějakého vektora, kterých je poměrně mnoho (Kristiansen 2008), dostanou viabilní vegetativní buňky či cysty z různých míst a prostředí není

vyloženě nevhodné pro jejich germinaci a růst, mohou tyto kmeny různých druhů koexistovat v dané lokalitě. A když se vlivem abiotických a biotických podmínek prostředí na lokalitě prohloubí úroveň jejich ekologické specializace, může dojít k přerušení genového toku a k sympatrické speciaci vlastně prostřednictvím ekologické speciace (van Valen 1976). Pocházejí-li totiž z různých lokalit a uchovávají-li si své růstové charakteristiky z původních míst, mohou být od začátku ekologicky částečně specializovány. Je sice otázka, jak dlouho jsou kmeny schopné zachovávat si své růstové charakteristiky z míst, odkud pocházejí, ale mé výsledky ukazují, že si je kmeny mohou uchovávat poměrně dlouho od izolace. Také výsledky studie Ribeiro et al. (2013) ukazují, že vegetativní buňky získané z cyst zkoumané obrněnky si i přes změny klimatu až 100 let uchovaly své růstové charakteristiky.

#### **5.4 Jiné vlivy teploty na fototrofy**

Jelikož jsem prokázala signifikantní vlivy kmenové specifity na růstové rychlosti různých druhů v různých teplotách a zjistila jsem, že si kmeny své specifické růstové parametry udržovaly poměrně dlouho, domnívám se, že tyto efekty zapříčinily, že jsem nenalezla signifikantní rozdíly mezi růstovými rychlostmi druhů v různých teplotách. Podobné výsledky týkající se kmenové specifity zjistila i Ribeiro et al. (2013). Všechny její kmeny pocházely z cyst a ty jsou velmi důležitou fází životního cyklu. Obrněnky, zlativky a rozsivky vytvářejí za vhodných podmínek prostředí na jaře a na podzim abundantní vodní květy (Anderson 1998; Bravo, Figueroa 2014; Granéli et al. 2011; Kristiansen 2008; Ribeiro et al. 2013; Sgrosso et al. 2001; Zeeb, Smol 2001). Protože se v ekofyziologii u planktonních protist často prokáže silný vliv kmenové specifity (Coles, Jones 2000; Degerlund et al. 2012; Moser, Weisse 2011; Peters, Breeman 1992; Ribeiro et al. 2013; Vijayakumaran et al. 2001; Wee et al. 1991), je možné, že si vegetativní buňky zkoumaných kmenů daných organismů "pamatují" na podmínky prostředí při své encystaci? Tímto se ještě nikdo nezabýval. Nicméně ať si kmeny zachovávají růstové parametry v závislosti na parametrech prostředí při encystaci či nikoli, teplota má u planktonních protist velký vliv na celé životní cykly – viz níže. Ve srovnání s vlivem na životní cykly ovlivňuje teplota poněkud méně zřetelně růstové parametry vegetativních buněk *in vitro* (Kim et al. 2008). Avšak možná opět v důsledku příliš vysokých experimentálních teplot či příliš jednoduchého experimentálního designu, kde chybí např. biotické interakce (Pichrtová 2009).

Teplota má vliv na celé životní cykly fototrofů, jako příklad mohu uvést životní cykly některých obrněnek. Obrněnky vytvářejí „odpočívající“ stádia - cysty podobně jako jiné významné skupiny jarního a podzimního fytoplanktonu např. rozsivky (Bacillariophyceae), zlativky (Chrysophyceae) (Anderson 1998; Bravo, Figueroa 2014; Granéli et al. 2011; Kristiansen 2008; Sgrosso et al. 2001; Zeeb, Smol 2001). Tyto cysty jsou vytvářeny asexuálně či sexuálně a jsou

uloženy v sedimentu. U obrněnek můžeme rozlišit cysty dvojího typu: pelikulární s užší buněčnou stěnou a „odpočinkové“ (resting, dormant) cysty s dvojitou buněčnou stěnou, obé vznikají sexuálně i asexuálně (Anderson 1998; Bravo, Figueroa 2014). Ornamentace a tvary zvláště dormantních cyst bývají ovlivněné změnami teplot, salinity a obsahem živin či na environmentálních parametrech závislou délkou encystačního procesu. U druhů *Alexandrium taylori* a *Gymnodinium catenatum* byla klíčivost (germinace) a viabilita stejná pro oba typy cyst, i když délka viability nebyla zkoumána (Bravo, Figueroa 2014). Je ale známo, že nedefinované cysty *Pentapaharsodinium dalei* jsou schopny klíčit i po více než 100 letech (Ribeiro et al. 2013). Bravo, Figueroa (2014) také uvádějí poměrně rozsáhlý seznam ekologických funkcí, k nimž mohou cysty sloužit: ochrana před „spásáči“ (grazer) či před parazity nebo k přečkání nepříznivých abiotických podmínek prostředí. Obecně převládá názor, že encystaci u obrněnek vyvolává druhově specificky nedostatek živin a změny teploty (Sgrosso et al. 2001). Některé studie dokonce korelovaly tyto parametry prostředí s tvorbou pelikulárních cyst (Bravo, Figueroa 2014). Anderson (1998) podrobně shrnuje poznatky o životním cyklu toxické obrněnky *Alexandrium tamarense*. Sex u této obrněnky bývá laboratorně vyvolán nedostatkem živin, zejména dusíku a fosforu, podobně jako u jiných obrněnek (Bravo, Figueroa 2014). Planozygota si po týdnu vytváří cystu, která padá do sedimentu, kde prochází jakýmisi dvěma fázemi: dormancí a nehybností. Dormance představuje odklad růstu prostřednictvím aktivní endogenní inhibice a nehybnost odklad díky nevhodným podmínkám prostředí (Anderson 1998; Bravo, Figueroa 2014). Takže cysta v dormantní fázi nemůže klíčit ani ve vhodných podmínkách prostředí, kdežto znehybněná cysta je schopna klíčit, ale nestane se tak, dokud nenastanou vhodné podmínky. Cysty obvykle projdou nutnou dormantní fází – tj. fyziologickou maturací (zráním). Doba maturace se liší u každé obrněnky, ale zvýšení teploty tento proces urychluje; přičemž trvání zrání může mít významný vliv na výskyt toxických vodních květů. Cysty s krátkou dobou zrání totiž mohou za rok vytvořit vícero květů. Nicméně u toxického druhu *Gymnodinium catenatum* bylo doloženo, že cysty s krátkou dobou maturace klíčí průběžně, což redukuje efekt vodního květu (Anderson 1998).

Faktory, které ukončují nehybnost zralých cyst, nejsou u většiny druhů rodu *Alexandrium* známy. Ale u *A. tamarense* a *A. minutum* je uváděn posun teplot do optimálních hodnot související se sezónním ochlazováním a oteplováním. Cysty ponechané v nízkých teplotách zůstávají nehybné, dokud teplota nestoupne, pokud je teplota příliš vysoká platí totéž. Interval klíčivosti se také nazývá „teplotní okno“ klíčení, pro *A. tamarense* je v hodnotách od 9 – 21 °C v severním temperátu. To také vysvětluje existenci dvou velkých vodních květů na jaře a na podzim u mysu Cod (Anderson 1998). Teplota tedy může nejen udržovat nehybnost a určovat čas dormance, ale také synchronizovat populaci cyst do více uniformního klíčení a iniciovat excystaci (Anderson 1998). Významný vliv

může mít též obsah kyslíku v okolním prostředí, jelikož sediment je anoxický (Anderson 1998).

Granéli et al. (2011) se zabývali pohyblivou fází životního cyklu obrněnky - epifyta *Ostreopsis ovata*. Ve svých experimentech zkoumali optimální růstovou teplotu, interakci s rozsivkami a ciliáty a závislost teploty na produkci toxinů. Již dříve bylo zjištěno, že nižší teplota snižuje růstovou rychlost a zvyšuje produkci PSP toxinů u *Alexandrium catenella*, *A. cohorticula* a *Gymnodinium catenatum*. A globální oteplování může zapříčinit zvětšení areálu výskytu toxických vodních květů (Granéli et al. 2011). Obecně jsou změny obsahu toxinů asociovány se stresem způsobeným narušenou fyziologií (pH, teplota, salinita, nedostatek živin). *Ostreopsis ovata* měl v dané studii optimum růstu v 26 – 30 °C a maximální koncentrace toxinů skutečně produkoval v teplotách nižších okolo 20 °C, když byly jeho abundance nejnižší. Autoři také uvádějí, že by to mohlo souviset i se stářím kultur. A dokládají to výsledky z jiných studií, kdy bylo zjištěno, že toxiny jsou produkovány spíše ve stacionární fázi růstu kultury, jelikož zde se na růstové křivky nezaměřovali.

Další zvláště fytoplanktonní organismy, u nichž byla sledována tvorba cyst v průběhu životního cyklu, jsou zlativky (Chrysophyceae). Tyto organismy a jejich cysty často působí jako bioidiátory oligotrofie a nižšího pH a případně nižších teplot a jsou též známé svou sezónností - jaro, podzim (Kim et al. 2008; Kristiansen 2008; Zeeb, Smol 2001). Cysty zlativek mohou vznikat, jak sexuálně, tak asexuálně (Sandgen, Flanagin 1986; Zeeb, Smol 2001). Sex byl prokázán jen u menšího množství organismů z této skupiny: *Dinobryon cylindricum*, morfotyp *Synura petersenii*, (*Mallomonas akromonos*). Sexuální tvorba dormantních stádií bývá u fytoplanktonu často iniciována vnějšími (exogenními) faktory jako změnou teploty, pH, obsahu nutrientů a světelnými podmínkami. Jistě to platí pro zelené řasy (Chlorophyceae), rozsivky (Bacillariophyceae) či již výše zmíněné obrněnky. U zlativek byly ale zaznamenány jiné trendy. V kulturách nebyly nikdy zaznamenány žádné exogenní stimuly sexu či encystace. Kompatibilní klony jsou vždy schopné sexuální tvorby statospor, dokud je úroveň buněčných zásob živin adekvátní pro tvorbu gamet. Sexuální encystace je tedy zřejmě závislý pouze na endogenní faktorech jako je růstová rychlost či zejména hustota buněk v populaci (kultuře) (Sandgren, Flanagin 1986). Kmeny morfotypu *Synura petersenii* v této studii byly schopné iniciovat sex a encystovat pouze v rámci exponenciální fáze růstu, kdy jsou růstové rychlosti nejvyšší. Yubuki et al. (2008) studovali životní cyklus heterotrofní zlativky *Spumella*. Autoři sice nezaznamenali žádné sexuální rozmnožování, ale doložili, že i u této zlativky encystace závisí na hustotě buněk v kultuře. Encystace též probíhala při maximálních růstových rychlostech - v exponenciální fázi kultury. Nicméně dodávají, že takto endogenně řízená encystace se nemusí vyskytovat u všech Chrysophyceae. Produkuje totiž velká množství statospor na podzim, když zamrzá voda nebo na jaře při rozmrzání. Jaké faktory iniciují excystaci můžeme

pouze odhadovat z nepřímých důkazů, jelikož nikomu se zatím nepodařilo cysty v laboratoři vyklíčit (Anne Lott – osobní sdělení 2012; Sandgen, Flanagin 1986). Z toho je zřejmé, že teplota v použitém rozmezí nad 9 °C zřejmě nebude stimulem speciace těchto organismů, což podporují i mé výsledky, které dokládají nesignifikantní vliv teploty na růstové rychlosti jednotlivých druhů komplexu *S. petersenii*.

U volvoceoidních Chlorophyceae a rozsivek byly také zaznamenány jisté endogenní stimuly sexu a encystace jako přítomnost feromonů nebo regulace velikostí buněk, ale to jsou pouze faktory vedlejší. Sexuální encystace byla u těchto řas vždy vyvolána ve stacionární fázi růstu kultury, kdy docházely živiny, což vyvolalo fyziologický stres, růstová rychlost nabývala i záporných hodnot (Farby et al. 1999; Sandgren, Flanagin 1986).

### **5.5 Mezidruhové rozdíly – reprodukční izolace?**

Zda dané linie organismů představují odlišné druhy, se dá testovat také pomocí biologického druhového konceptu (de Quiroz 2007; Mayr 1942). Pro některé mikrořasy je to již dlouholetou praxí (Blackburn, Tyler 1987; Blackburn et al. 2001; Mann 1999). U chrysofytních organismů dlouho nebylo známo, zda vůbec mají sexuální rozmnožování. Nicméně nakonec byl sex doložen u druhu rodu *Dinobryon* a *S. petersenii* sensu lato (Sandgren; Flanagin 1986). Ve studii Sandgren, Flanagin (1986) bylo také zjištěno, že jeden z kmenů UTEX LB 239 není sexuálně kompatibilní s jinými testovanými kmeny. Při křížících pokusech nevznikaly nikdy žádné sexuální cysty (Sandgren, Flanagin 1986), takže se jednalo o ranou postzygotickou bariéru křížení (Blackburn, Tyler 1987; Coleman 2003). U tří kmenů zkoumaných ve studii Sandgren, Flanagin (1986) byla dále analyzována ekofyziologie v závislosti na pH (Wee et al. 1991). Z výsledků práce Wee et al. (1991) nakonec nevyplynuly zjevně díky výrazné kmenové specifitě žádné smysluplné závěry. Z databáze UTEX (<http://web.biosci.utexas.edu/utex/>) jsem zjistila, že u dvou z těchto kmenů byly analyzovány sekvence DNA ve studiích Škaloud et al. (2012) a Škaloud et al. (2014). Z publikovaných fylogenetických stromů je jasné, že linie Sandgren 2, což je vlastně UTEX LB 2405, a UTEX LB 2404 jsou kmeny druhu *S. americana*. Další kmeny UTEX LB 845 a 2406 patří dle Boo et al. (2010) do stejné linie. A právě kmeny UTEX LB 2403 – 2406, UTEX 845 (<http://web.biosci.utexas.edu/utex/>) byly použity v křížících pokusech společně s kmenem UTEX LB 239, který nebyl s ostatními kmeny sexuálně kompatibilní (Sandgren, Flanagin 1986) a který prokazatelně představuje sesterskou linii druhu *S. heteropora* (Škaloud et al. 2014). Toto zjištění poukazuje na skutečnost, že druhy komplexu *S. petersenii* mohou být reprodukčně izolovány.



## 6. Závěr

Má diplomová práce doložila existenci signifikantních rozdílů v růstových parametrech čtyř druhů komplexu *Synura petersenii*: *S. americana*, *S. glabra*, *S. petersenii*, *S. conopea*. Zjistila jsem, že *in vitro* se druhy *S. petersenii* a *S. americana* signifikantně liší v růstových rychlostech. *S. petersenii* rostla ve všech analyzovaných experimentech nejpomaleji. Všechny druhy rostly statisticky významně nejlépe v teplotách 10°C a 13°C. Dle růstových křivek byl teplota 25°C většinou stresující. Jen *S. petersenii* dokázala v této teplotě růst. Provedení vícero experimentů může poukázat na výrazné rozdíly i mezi blízkce příbuznými druhy *in vitro*.

Druhy rodu *Synura* vytváří vodní květy ve sladkých vodách na jaře a na podzim, takže zde zjištěná teplotní optima jsou v souladu s chováním těchto organismů *in vivo*. Druh *S. petersenii* schopný růst *in vitro* v teplotě vyšší než 22°C byl též v přírodě v těchto teplotách zaznamenán. Často se vyskytoval v sympatrii s jinými druhy komplexu či s řasami odlišných taxonomických skupin. Vzhledem k faktu, že vykazoval v teplotních experimentech nejnižší růstové rychlosti ze všech zkoumaných druhů, může být považován za K-stratéga.

Od počátku systematické biologie byly druhy odlišovány na základě morfologie, později se při rozlišování druhů začala uplatňovat molekulární biologie se svými metodami sekvenace DNA. Stejně zákonitosti platí i pro vývoj druhových konceptů u řas či protist. Ekofyziologické studie se přitom většinou zaměřovaly spíše na prozkoumání ekologických preferencí daných druhů organismů. Nicméně mé výsledky ukazují, že studium růstových parametrů *in vitro* může poukázat na výrazné rozdíly mezi blízkce příbuznými (pseudo)kryptickými druhy protist. Takové protistní druhy totiž často speciuji prostřednictvím ekologické specializace.

## 7. Reference

- Amato, A., Kooistra, W.-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
- Andersen, R.A.** (1987): Synurophyceae classis nov., a new class of algae, *American Journal of Botany* 74 (3): 337-353
- Andersen, R.A.** (1989): The Synurophyceae and their relationship to other golden-brown algae. *Bpjh. zur Noria Hedwigta* 95: 1-26
- Andersen, R. A., Van de Peer, Y., Potter, D., Sexton J.P., Kawachi, M., LaJeunesse, T.** (1999): Phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the Chrysophyceae, *Protist* 150: 245 – 263
- 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
- Asmund, B.** (1968): Studies on Chrysophyceae from some ponds and lakes in Alaska. VI. Occurrence of Synuraspecies, *Hydrobiologia* 31: 497–515
- Atkinson, D., Ciotti, B.J., Montagnes, D.-S.** (2003): Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5 % °C<sup>-1</sup> – *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270(1533): 2605-2611
- Besansky, N.J.** (1999): Complexities in the analysis of cryptic taxa within the genus *Anopheles*, *Parassitologia* 41: 97–100
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N. S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I.** (2006): Cryptic species as a window on diversity and conservation, *TRENDS in Ecology and Evolution* 22: 148-154
- Boo, S.M., Kim, H.S., Shin, W., Boo, G.H., Cho, S.M., Jo, B.Y., Kim, J.-H., Kim, J.H., Yang, E.C., Siver, P.A., Wolfe, A.P., Bhattacharya, D., Andersen, R.A., Yoon, H.S.** (2010): Complex phylogeographic patterns in the freshwater alga *Synura* provide new insights into ubiquity vs. endemism in microbial eukaryotes, *Molecular Ecology* 19: 4328-4338
- 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
- Boer, M.K., Koolmees, E.M., Vrieling E.G., Breeman, A., van Rijssel, M.** (2005): Temperature responses of three *Fibrocapsa japonica* strains (Raphidophyceae) from different climate regions, *Journal of Plankton Research* 27: 47-60
- 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
- Bradley, D.E.** (1964): A Study of the *Mallomonas*, *Synura* and *Chryso-sphaerella* of Northern Iceland, *Journal of General Microbiology* 37: 321-333
- Bravo, I., Figueroa, R.I.** (2014): Towards an ecological understanding of Dinoflagellate cyst functions, *Microorganisms* 2: 11-32

- Brönmark, C., Hansson, L.-A.** (2005): *The Biology of Lakes and Ponds*, Oxford University Press, New York, 285 pp
- Caisová, L., Marin, B., Melkonian, M.** (2011): A close-up view on ITS2 evolution and speciation - a case study in the Ulvophyceae (Chlorophyta, Viridiplantae), *Bmc Evolutionary Biology* 11
- Caisová, L., Marin, B., Melkonian, M.** (2013): A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction, *Protist* 164: 482–496
- Campo, J.D., Massana, R.** (2011): Emerging Diversity within Chrysophytes, Choanoflagellates and Bicosoecids Based on Molecular Surveys, *Protist* 162: 435–448
- Coesel, P.** (2001): A method for quantifying conservation value in lentic freshwater habitats using desmids as indicator organisms, *Biodiversity and Conservation* 10: 177–187
- 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
- Coles, J.F., Jones, R.C.** (2000): Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river, *Journal of Phycology* 36: 7-16
- Cumming, B. F., Smol, J. P., Birks, H. J. B.** (1991): The relationship between sedimentary chrysophyte scales (Chrysophyceae and Synurophyceae) and limnological characteristics in 25 Norwegian lakes, *Nordic Journal of Botany* 11: 231-242.
- de Queiroz, K.** (2007): Species concepts and species delimitation, *Systematic Biology* 56: 879-886
- Degerlund, M., Huseby, S., Zingone, A., Sarno, D., Landfald, B.** (2012): Functional diversity in cryptic species of *Chaetoceros socialis* Lauder (Bacillariophyceae), *Journal of Plankton Research* 34: 416-431
- Denboh, T., Ichimura, T., Hendrayanti, D. and Coleman, A. W.** (2003): *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Charophyceae, Chlorophyta) species complex viewed from the 150 group I intron and ITS2 of nuclear rDNA, *Journal of Phycology* 39: 960–977
- Dieckmann, U., Doebeli M.** (1999): On the origin of species by sympatric speciation, *Nature* 22: 354-357
- Ereshefsky, M.** (2009): Darwin's solution to the species problem, *Springer Science+Business Media B.V.* 175:405–425
- Farby, S., Köhler, A., Coleman, A.W.** (1999): Intraspecies analysis: Comparison of ITS sequence data and gene intron sequence data with breeding data for a worldwide collection of *Gonium pectorale*, *Journal of Molecular Evolution* 48:94–101
- Finlay, B.J.** (2002): Global dispersal of free-living microbial eukaryote species, *Science* 296: 1061-1063
- Foy, R.H., Gibson C.E.** (1993) The influence of irradiance, photoperiod and temperature on the growth kinetics of three planktonic diatoms, *European Journal of Phycology* 28: 203-212
- 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 *Scletonema marinoi* Sarto et Zingone (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* 42: 280–291

- Granéli, E., Vidyarathna, N.K., Funari, E., Cumaranatunga, P.R.T., Scenati, R.** (2011): Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*?, Harmful Algae 10: 165–172
- 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
- Jørgensen, A., Stothard J.R., Madsenc, H., Nalugwad, A., Nyakaanad, S., Rollinso D.** (2013): The ITS2 of the genus *Bulinus*: Novel secondary structure among freshwater snails and potential new taxonomic markers, Acta Tropica 128: 218– 225
- Kaeriyama, H., Katsuki, E., Otsubo, M., Yamada, M., Ichimi, K., Tada, K., Harrison, P.J.** (2011): Effects of temperature and irradiance on growth of strains belonging to seven *Skeletonema* species isolated from Dokai Bay, southern Japan, European Journal of Phycology 46: 113-124
- Kies L., Bernd T.H.** (1984): Die *Synura*-Arten (Chrysophyceae) Hamburgs und seiner nordöstlichen Umgebung, Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik Hamburg 19: 99–122
- 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: 529-544
- Knowles, S.C., Zingmark R.G.** (1978): Mercury and temperature interactions on the growth rates of three species of freshwater phytoplankton, Journal of Phycology 14: 104-109
- Korshikov, A.A.** (1927): *Skadovskielliella sphagnicola*, a new colonial chryomonad, Archiv für Protistenkunde 58: 450–455
- Korshikov, A. A.** (1929): Studies on the Chryomonads. I, Arch. Protistenk. 67: 253-290
- Kristiansen, J.** (1979): Problems in classification and identification of Synuraceae (Chrysophyceae), Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie-Swiss Journal of Hydrology 40: 310–319
- Kristiansen, J.** (2008): Dispersal and biogeography of silica-scaled chrysophytes, Biodiversity Conservation 17: 419–426
- Kynčlová, A., Škaloud, P., Škaloudová, M.** (2010): Unveiling hidden diversity in the *Synura petersenii* species complex (Synurophyceae, Heterokontophyta), Nova Hedwigia, Beiheft 136: 283-298
- Laabir, M., Jauzein, C., Genovesi, B., Masseret, E., Grzebyk, D., Cecchi, P., Vaquer, A., Perrin, Y., Collos, Y.** (2011): Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters, Journal of Plankton Research 33: 1550-1563
- Lavau, S., Sauders, G.W., Wetherbee, R.** (1997): A phylogenetic analysis of the Synurophyceae using molecular data and scale case morphology, Journal of Phycology 33: 135-151
- Lee, K.L., Kim, H.S.**(2007): Growth characteristics of three synurophytes (*Mallomonas* species) at different temperatures and pH, Nova Hedwigia 84: 227-240
- Lee, K.L., Kim J.H., Yoon, H.-S., Kim, H.S.** (2012): Growth characteristics of two bloom-forming synurophytes (*Mallomonas elongata* and *Synura petersenii*) at different nitrate and phosphate concentrations, Nordic Journal of Botany 30: 104–108

- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J.m., Zuccarello, G.C., de Clerk, O.** (2014): DNA-based species delimitation in algae, *European Journal of Phycology* 49: 179-196
- Lellák, J., Kubíček, F.** (1991): *Hydrobiologie*. Karolinum, Praha, 257 pp
- Lombard, F., Labeyrie, L., Michel, E., Spero, H.J., Lea, D.W.** (2009): Modelling the temperature dependent growth rates of planktic foraminifera, *Marine Micropaleontology* 70: 1–7
- Lowe, C.D., Day, A., Kemp, S.J., Montagnes, D.-S.** (2005): There are high levels of functional and genetic diversity in *Oxyrrhis marina*, *Journal of eukaryotic microbiology* 52: 250–257
- Mallet, J.** (2007): Species, Concepts of, in: Levin, S.A. (ed.) *Encyclopedia of Diversity*, Academic Press, Princeton University, New Jersey, U.S.A.: 1-15
- Mann, D.G.** (1999): The species concept in diatoms, *Phycologia* 38: 437-495
- Mayr, E. (1942) *Systematics and the Origin of Species*, Columbia University Press, New York, 315 pp
- McQuoid, M.R.** (2005): Influence of salinity on seasonal germination of resting stages and composition of microplankton on the Swedish west coast, *Marine Ecology Progress Series* 289: 151–16
- Moore, L.R., Goericke, R., Chisholm, S.W.** (1995): Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: Influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties, *Marine Ecology Progress Series* 116: 259-275
- Moser, M., Weisse, T.** (2011): Combined stress effect of pH and temperature narrows the niche width of flagellates in acid mining lakes, *Journal of Plankton Research* 33: 1023-1032
- 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., Šťastný, J., Hodač, L.** (2008): Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*, *Aquatic Microbial Ecology* 51: 77-86.
- Oppliger, L.V., Correa, J.A., Faugeron, S., Beltrán, J., Tellier, F., Valero, M., Destombe C.** (2011): Sex ratio variation in *Thelessonia nigrescens* complex (Laminariales, Phaeophyceae): Effect of latitude, temperature, and marginality, *Journal of Phycology* 47: 5-12
- Orlik, K.** (1998): Ecology of mixotrophic flagellates with special reference to Chrysophyceae in Danish lakes, *Hydrobiologia* 369/370: 329–338
- Pawlowski, J., Christen, R., Lecroq, B., Bachar, D., Shahbazkia, H.R., Amaral-Zettler, L., Guillou, L.** (2011): Eukaryotic richness in the Abyss: Insights from Pyrotag sequencing, *PloS ONE* 6: e18169
- Pereira, R., Yrish, C., Sousa-Pinto, I.** (2006): The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta), *Aquaculture* 252: 66-78
- Perkins, S L.** (2000): Species concept and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*, *Proceedings of the Royal Society B* 267: 2345-2350
- Peters, A.F., Breeman, A.M.** (1992): Temperature responses of disjunct temperate brown algae indicate long-distance dispersal of microthalli across the tropics, *Journal of Phycology* 28: 428-438
- Petersen, J. B.** (1918): Om *Synura uvella* Stein og nogle andre Chrysomonadiner, *Videnskabelige Meddelelser Dansk Naturhistorisk Forening* 69: 345 – 357
- Petersen, J.B., Hansen, J.B.** (1956): On the scales of some *Synura* species, *Biol. Medd. Kgl. Dan.*

- Pichrtová, M.** (2009): Tvarová dynamika křemičitých struktur u modelových populací chrysomonád (Synurophyceae), Diplomová práce, Praha, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra Botaniky, vedoucí práce: Yvonne Němcová, 88 pp
- 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
- 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
- Rajadurai M., Poornima, E.H., Narasimhan, S.V., Rao, V.N.R., Venugopalan V.P.** (2005): Phytoplankton growth under temperature stress: Laboratory studies using two diatoms from a tropical coastal power station site, *Journal of Thermal Biology* 30: 299-305
- Reynolds, C.S.** (2006): Ecology of phytoplankton, Cambridge University Press, 535 pp
- Ribeiro, S., Berge, T., Lundholm, N., Ellegaard, M.** (2013): Hundred years of environmental change and phytoplankton ecophysiological variability archived in coastal sediments, *PLoS ONE* 8: e61184
- Roubex, V., Lancelot, C.** (2008): Effect of salinity on growth, cell size and silicification of an euryhaline freshwater diatom: *Cyclotella meneghiniana* Kütz, *Transitional Water Bulletin* 1: 31-38
- Röder, K., Hantzsch, F.M., Gebühr, C., Miene C., Helbig, T., Krock, B., Hoppenrath, M., Luckas, B., Gerdt, G.** (2012): Effects of salinity, temperature and nutrients on growth, cellular characteristics and yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum*, *Harmful Algae* 15: 59-70
- Řezáčová, M.** (2003): Ekologie a rozšíření chrysomonád s křemičitými šupinami (Chrysophyceae, Synurophyceae), Bakalářská práce, Praha, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra Botaniky, vedoucí práce: Jiří Neustupa, 59 pp,
- Sáez, A.G., Probert, I., Geisen, M., Quinn, P., Young, J.R., Medlin, L.K.** (2003): Pseudo-cryptic speciation in coccolithophores, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 7163-7168
- Sandgren, C.D., Flanagan, J.** (1986): Heterothallic sexuality and density dependent encystment in the chrysophycean alga *Synura petersenii* Korshikov, *Journal of Phycology* 22: 206-216
- Saxby-Rouen, K.J., Leadbeater, B.-C., Reynolds, C.S.** (1997): The growth response of *Synura petersenii* (Synurophyceae) to photon flux density, temperature and pH, *Phycologia* 36: 233-243
- Saxby-Rouen, K.J., Leadbeater, B.-C., Reynolds, C.S.** (1998): The relationship between the growth of *Synura petersenii* (Synurophyceae) and components of the dissolved inorganic carbon system, *Phycologia* 37: 467-477
- Sonneborn, T. M.** (1975): The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species, *Transaction of the American Microscopical Society* 94: 155-178
- Sorokin, C.** (1973): Dry weight, packed cell volume, and optical density. Division rates, in: Stein, J.R. (ed.): *Phycological Methods*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 321-343
- Sgroso, S. Esposito, F., Montresor, M.** (2001): Temperature and daylength regulate encystment in calcareous cyst-forming dinoflagellates, *Marine Ecology Progress Series* 211: 77-87
- Siver, P.A.** (2013): *Synura cronbergiae* sp. nov., a new species described from two paleogene maar lakes in northern Canada, *Nova Hedwigia* 97: 179-187
- Siver, P.A., Lott, A.M.** (2012): Biogeographic patterns in scaled chrysophytes from the east coast of North America, *Freshwater Biology* 57: 451-466

- Siver, P.A., Wolfe, A.P.** (2005): Eocene scaled chrysophytes with pronounced modern affinities, *International Journal of Plant Sciences* 166: 533-536
- Siver, P.A., Lott, A.M., Wolfe, A.P.** (2013): A summary of *Synura* taxa in early Cenozoic deposits from Northern Canada, *Nova Hedwigia* 142: 181-190
- Sommer, U., Adrian, R., Domis, L.-S., Elser, J.J., Ibelings, B., Jeppsen, E., Lüring, Molinero, J.C., Mooij, W.M., van Donk, E., Winder, M.** (2012): Beyond the Plankton Ecology Group (PEG) Model: Mechanisms Driving Plankton Succession, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43: 429–48
- StatSoft Inc.** (1998): STATISTICA for Windows (Computer program electronic manual), Oklahoma, USA
- StatSoft, Inc.** (2013). Electronic Statistics Textbook. Tulsa, OK: StatSoft. WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/>
- Škaloud, P., Kynčlová, A., Benada, O., Kofronova, O., Škaloudová, M.** (2012): Toward a revision of the genus *Synura*, section Petersenianae (Synurophyceae, Heterokontophyta): morphological characterization of six pseudo-cryptic species, *Phycologia* 51: 303-329
- Škaloud, P., Kristiansen, J., Škaloudová, M.** (2013): Developments in the taxonomy of silica-scaled chrysophytes - from morphological and ultrastructural to molecular approaches, *Nordic Journal of Botany* 31: 385-402
- Škaloud, P., Škaloudová, M., Pichrtová, M., Němcová, Y., Kreidlová, J., Pusztai, M.** (2013) b: [www.chrysophytes.eu](http://www.chrysophytes.eu) - a database on distribution and ecology of silica-scaled chrysophytes in Europe, *Nova Hedwigia*: 141-146
- Škaloud, P., Škaloudová, M., Procházková, A., Němcová, Y.** (2014): Morphological delineation and distribution patterns of four newly described species within the *Synura petersenii* species complex (Chrysophyceae, Stramenopiles), *European Journal of Phycology* 49: 213–229
- Tan, X.** (2011): Effects of temperature on recruitment and phytoplankton community composition, *African Journal of Microbiology Research* 5: 5896-5901
- Tang, E.P.Y., Vincent, W.F.** (2000): Effects of daylength and temperature on the growth and photosynthesis of an Arctic cyanobacterium, *Schizothrix calcicola* (Oscillatoriaceae), *European Journal of Phycology* 35: 263-272
- 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: 792–810
- Thomas, M.K., Kremer, C.T., Klausmeier, C.A., Litchman, E.** (2012): A Global Pattern of Thermal Adaptation in Marine Phytoplankton, *Science* 338: 1085-1088
- 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
- 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

- Vanormelingen, P., Vyverman, W., Bock, D.D., Van der Gucht, K., de Meerster, L.** (2009): Local genetic adaptation to grazing pressure of the green alga *Desmodesmus armatus* in a strongly connected pond system, *Limnology Oceanography* 54: 503–511
- Van Valen, L.** (1976): Ecological species, multispecies, and oaks, *Taxon* 25(2/3):233-239
- Vega, J.M.P., Roa, M.A.C., Saavedra, M.D., Ramírez, D.T., Dávalos, C.R.** (2010): Effect of culture medium and nutrient concentration on fatty acid content of *Chaetoceros muelleri*, *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 1(1):6-15
- Vijayakumaran, K., Chittibabu, K., Girijavallabhan K.G.** (2001): Comparative growth of seven species of micro-algae in artificial and natural media, *Journal of The Marine Biological Association of India* 43: 161-167
- Voet, D., Voetová, J. G.** (1994): *Biochemie*, Victoria Publishing a.s., Praha; překlad Arnošt Kotyk a kol.; 1362 pp
- Wagenmann, B., Gutowski, 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
- Watts, P.C., Lundholm, N., Ribeiro, S., Ellegaard, M.** (2013): A century-long genetic record reveals that protist effective population sizes are comparable to those of macroscopic species. *Biological Letters* 9: 20130849
- Watson, S.** (2003): Cyanobacterial and eukaryotic algal odour compounds: signals or by-products? A review of their biological activity, *Phycologia* 42: 332-350
- 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
- 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, Wee, J.L. (eds): *Chrysophytes and related organisms: topic and issues*, Proceedings of the Fifth International Chrysophyte Symposium, Nova Hedwigia Beiheft 122: 245-258
- Whitaker, R.J.** (2006): Allopatric origins of microbial species, *Philosophical Transactions of The Royal Society* 361: 1975–1984
- Wolf, M., Chen, S., Song, J., Ankenbrand, M., Müller, T.** (2013): Compensatory base changes in ITS2 secondary structures correlate with the Biological species concept despite intragenomic variability in ITS2 sequences – a proof of Concept, *PLoS ONE* 8: 1-5
- Wyatt, T.** (2014): Margalef's mandala and phytoplankton bloom strategies, *Deep-Sea Research II* 101: 32–49
- Young, J. N., Rickaby, R.E.M., Kapralov, M.V., Filatov, D.A** (2012): Adaptive signals in algal Rubisco reveal a history of ancient atmospheric carbon dioxide, *Philosophy Transactions of Royal Society B* 367: 483 – 492
- Yubuki, N., Nakayama, T., Inouye, I.** (2008): A unique life cycle and perennation in a colorless chrysophyte *Spumella* sp., *Journal of Phycology* 44: 164-172
- Zeeb, B.A., Smol, J.P.** (2001): Chrysophyte Scales and Cysts. Tracking Environmental Change Using Lake Sediments, *Developments in Paleoenvironmental Research* 3: 203-223
- Web:**  
<http://chrysophytes.eu>; <https://ncma.bigelow.org>; <http://web.biosci.utexas.edu/utex/>
- www.wunderground.com**



## 8. Přílohy

### Příloha 1: Použité kmeny a jejich charakteristiky

**Tab. 1:** Charakteristika kmenů: druhy *Synura petersenii* (**pet**), *S. americana* (**am**), *S. glabra* (**gl**), *S. conopea* (**con**), zvýrazněné pokusy označují pokusy, v nichž byly simultánně použity kmeny z jedné lokality, tučně jsou označeny vícekrát použité kmeny; ryb.-rybníky, státy jsou uvedeny mezinárodními kódy (ISO 31661), stejné lokality odběru jsou zvýrazněné.

Druh	Kmen	Lokalita	GPS	Datum odběru	pokus
pet	S79.D2	<b>Blešno – Kuzov, CZE</b>	50°28'35.460"N, 13°54'4.842"E	11.3.2012	1
am	S70.B1-E	<b>Bundoran, IRL</b>	54°28'47.08"N, 8°15'47.02"W	2.10.2011	1
gl	S 85.G10	Milíčovské ryb.,CZE	50° 1' 36.0603633" N, 14° 32' 39.556675" E	9.3.2012	1
pet	S 88.D7	Alpy, Wildsee, AUT	47°19'20.59"N, 11°11'31.34"E	22.4.2012	2
am	S70.B1-D	<b>Bundoran, IRL</b>	54°28'47.08"N, 8°15'47.02"W	2.10.2011	2
gl	S 89.E6	Kotkavesi, FIN	61°40'16.85"N, 26°50'57.20"E	5.5.2012	2
pet	S 79.B9	<b>Blešno – Kuzov, CZE</b>	50°28'35.460"N, 13°54'4.842"E	11.3.2012	3
am	S70.B1-C	<b>Bundoran, IRL</b>	54°28'47.08"N, 8°15'47.02"W	2.10.2011	3
gl	S 87.F7	Alpy,Schwarzsee, AUT	47°27'20.78"N, 12°21'56.78"E	22.4.2012	3
pet	S 104.D11	<b>Oosteinderweg, NLD</b>	52°17'17.36"N, 4°48'33.20"E	7.12.2012	4
am	S 104.D10	<b>Oosteinderweg, NLD</b>	52°17'17.36"N, 4°48'33.20"E	7.12.2012	4
con	S103.C7	<b>Jizerské hory, CZE</b>	50° 50' 45.80"N, 15° 14' 12.30"E	14.10.2012	4
pet	S 99.C3	<b>Pilská nádrž, CZE</b>	49° 35' 27.96"N, 15° 55' 36.89"E	6.10.2012	5
am	S 104.C4	<b>Schinkelbos, NLD</b>	52°17'57.38"N, 4°48'26.72"E	7.12.2012	5
gl	S 99.C4	<b>Pilská nádrž, CZE</b>	49° 35' 27.96"N, 15° 55' 36.89"E	6.10.2012	5
pet	S 79.B5	<b>Blešno – Kuzov, CZE</b>	50°28'35.460"N, 13°54'4.842"E	11.3.2012	6
con	<b>S103.B3</b>	<b>Jizerské hory, CZE</b>	50° 50' 45.80"N, 15° 14' 12.30"E	14.10.2012	6
gl	S 85.C9	Milíčovské ryb.,CZE	50° 1' 36.0603633" N, 14° 32' 39.556675" E	9.3.2012	6
pet	S 104.B4	Amsterdamse Bos, NLD	52°18'57.92"N, 4°49'4.03"E	7.12.2012	7
am	S 104.F4	Molenpoel, NLD	52°17'25.31"N, 4°47'45.89"E	7.12.2012	7
gl	<b>105.C3</b>	Milíčovský ryb., CZE	50° 1'33.48"N, 14°32'27.68"E	7.1.2013	7
pet	S 104.E3	<b>Oosteinderweg, NLD</b>	52°17'17.36"N, 4°48'33.20"E	7.12.2012	8
am	S 104.D3	<b>Schinkelbos, NLD</b>	52°17'57.38"N, 4°48'26.72"E	7.12.2012	8
gl	<b>105.C3</b>	Milíčovský ryb., CZE	50° 1'33.48"N, 14°32'27.68"E	7.1.2013	8
pet	82.B10	Labská tůň, CZE	50°18'55.832"N, 15°52'34.379"E	1.3.2012	9
am	S 81.D5	Malé záplavy, CZE	50°8'47.143"N, 14°0'49.985"E	19.3.2012	9
con	<b>S103.B3</b>	Jizerské hory, CZE	50° 50' 45.80"N, 15° 14' 12.30"E	14.10.2012	9

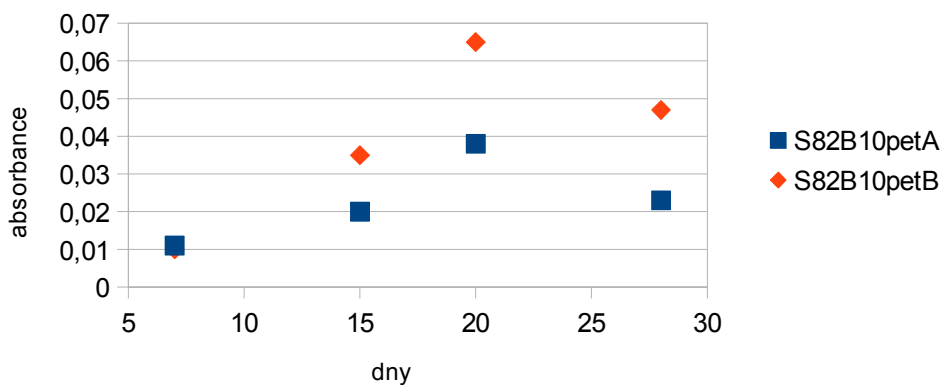
**Tab. 2:** Environmentální parametry odběrového místa: druhy označeny zkratkami (viz výše), kmeny řazeny dle pokusů, pH, konduktivita a teplota jsou parametry měřené na lokalitě, teplota za 2 měsíce představuje průměrnou teplotu vzduchu za poslední 2 měsíce naměřenou na nejbližší meteorologické stanici – zdroj [www.wunderground.com](http://www.wunderground.com).

Druh	Kmen	pH	Konduktivita (μS/cm)	teplota (°C)	Teplota za 2 měsíce	Teplota za rok
pet	S79.D2	-	-	1	2,8	10
am	S70.B1-E	6,5	330	-	13	10
gl	<i>S 85.G10</i>	-	-	-	1	9,8
pet	S 88.D7	8,1	414	-	3	8,2
am	S70.B1-D	6,5	330	-	13	10
gl	S 89.E6	6,9	-	6,3	2,2	3
pet	<i>S 79.B9</i>	-	-	1	2,8	10
am	S70.B1-C	6,5	330	-	13	10
gl	S 87.F7	7,69	247	-	4,1	8
pet	S 104.D11	7,9	850	3,3	4,8	10,7
am	S 104.D10	7,9	850	3,3	4,8	10,7
con	S103.C7	5	40	6,1	13,6	8,6
pet	S 99.C3	-	-	-	14	-
am	S 104.C4	7,9	1257	3,6	4,8	10,7
gl	S 99.C4	-	-	-	14	-
pet	<i>S 79.B5</i>	-	-	1	2,8	10
con	<b>S103.B3</b>	5	40	6,1	13,6	8,6
gl	S 85.C9	-	-	-	1	9,8
pet	S 104.B4	7,8	1319	3,7	4,8	10,7
am	S 104.F4	7,9	946	3,4	4,8	10,7
gl	<b>105.C3</b>	7	767	4	3,8	9,1
pet	S 104.E3	7,9	850	3,3	4,8	10,7
am	S 104.D3	7,8	1229	3,3	4,8	10,7
gl	<b>105.C3</b>	7	767	4	3,8	9,1
pet	82.B10	-	-	-	2,2	9,1
am	S 81.D5	7,2	670	5,2	0,9	9,3
con	<b>S103.B3</b>	5	40	6,1	13,6	8,6

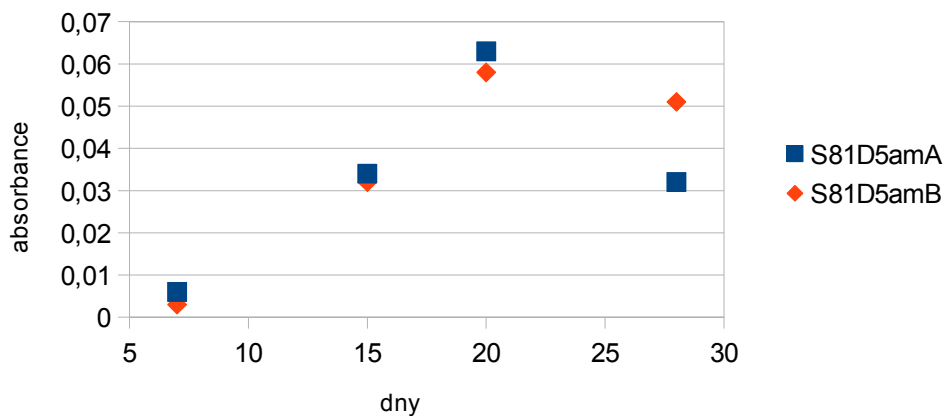
**Příl. 2: Grafy růstových rychlostí a několik příkladů růstových křivek**

**Obr. 1: Příklad růstových křivek dle kmene a teploty – surová data**

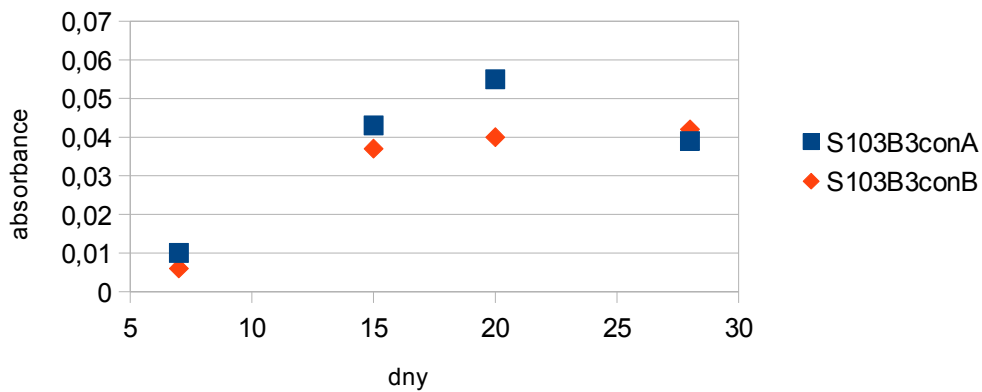
graf růstu S82B10 pet 16° C pokus 9



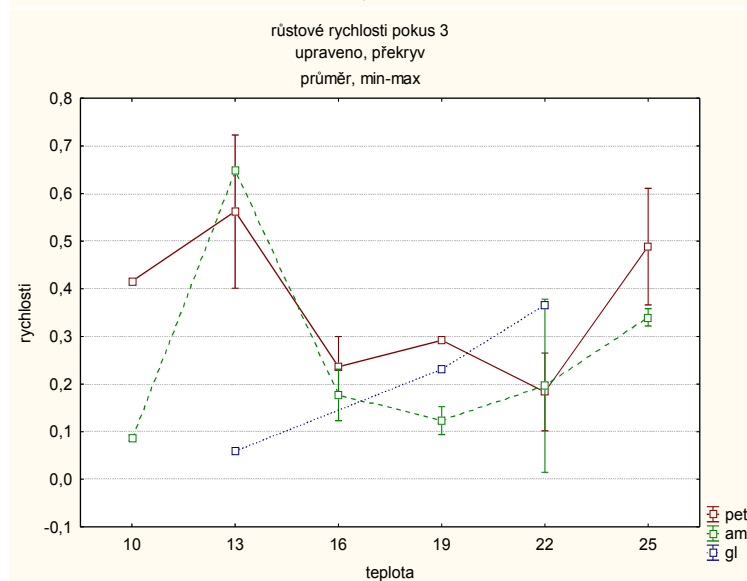
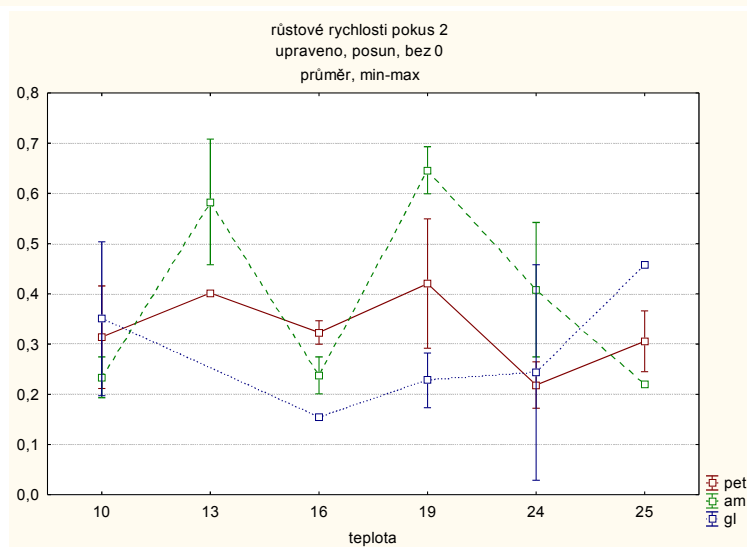
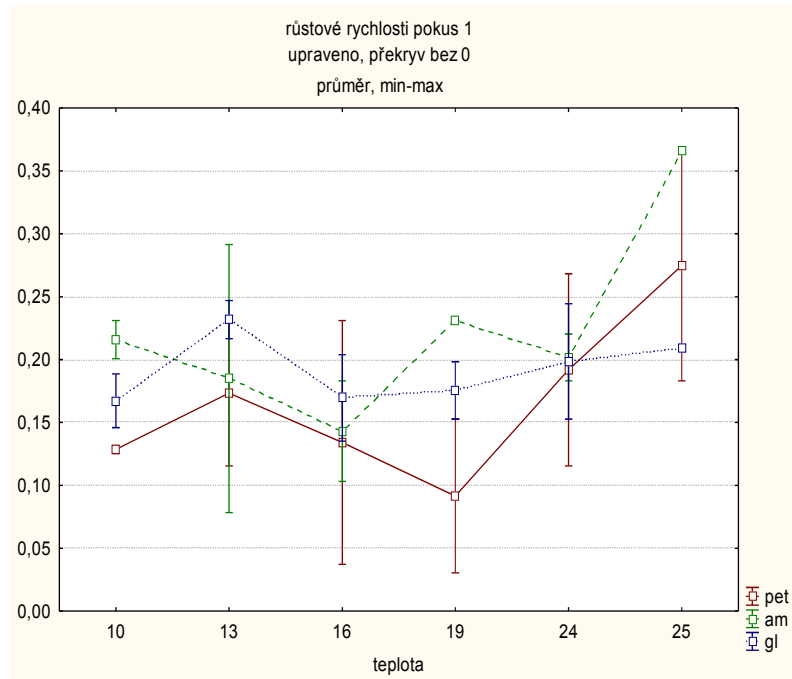
graf růstu S81D5 am 16° C pokus 9

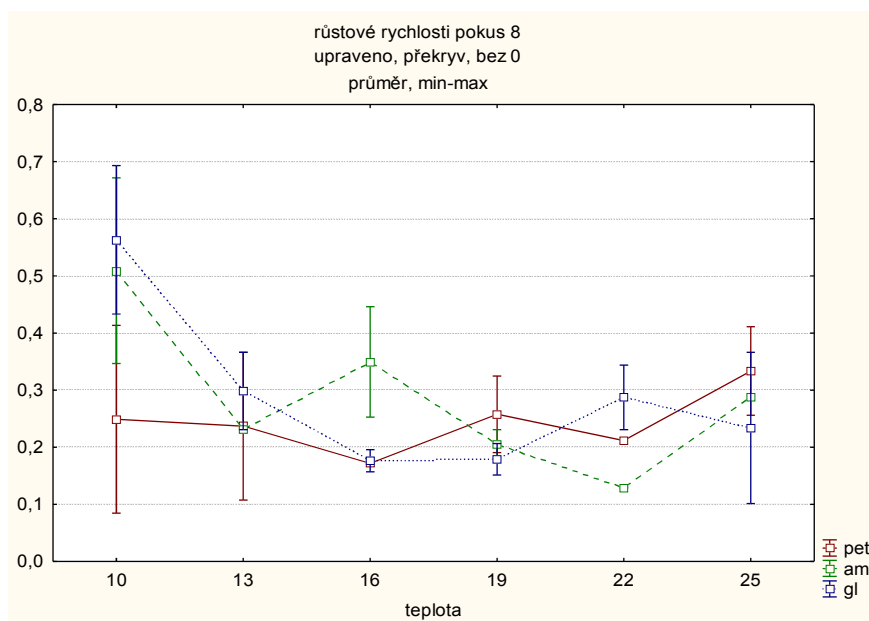
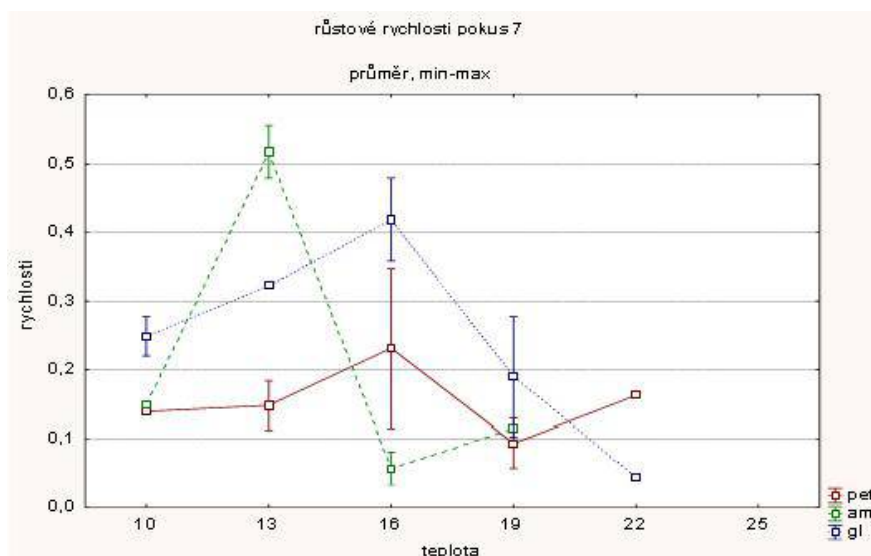
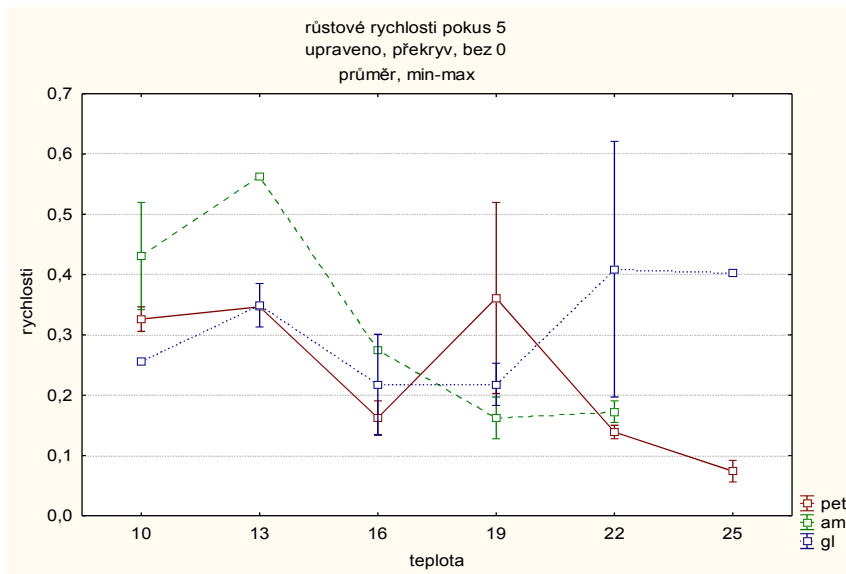


graf růstu S103B3 con 16° C pokus 9

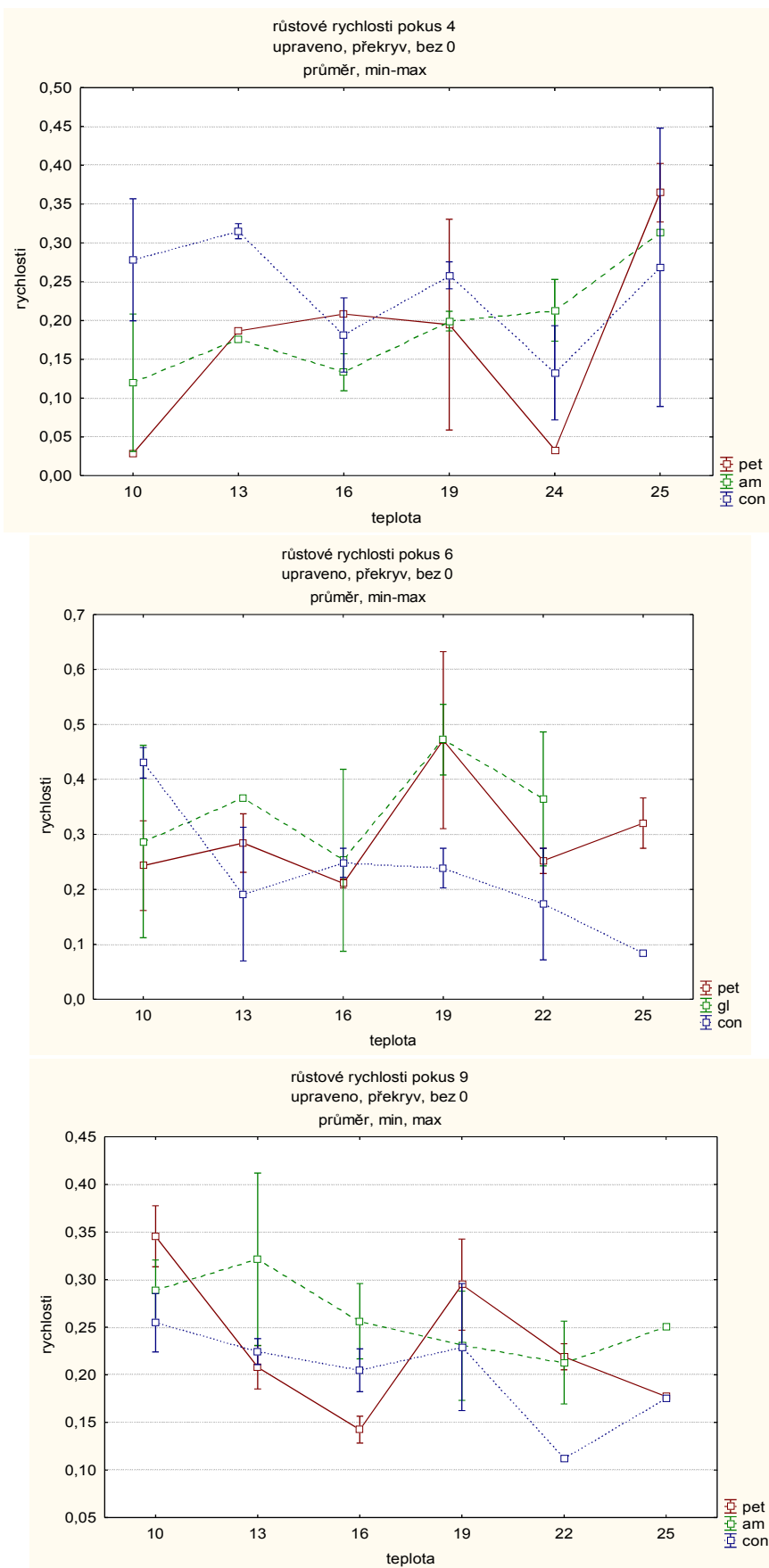


**Obr. 2:** Grafy růstových rychlostí **pokus 1, 2, 3, 5, 7, 8** s druhy *Synura petersenii*, *S. americana* a *S. glabra*, surová data bez chybějících hodnot, grafy zobrazí průměry, minima a maxima, na ose x jsou experimentální teploty, na ose y rychlosti, jednotky  $\text{den}^{-1}$





**Obr. 3:** Grafy růstových rychlostí **pokus 4,6 a 9** s druhy *Synura petersenii*, *S. americana*, *S. conopea* a *S. glabra*, surová data bez chybějících hodnot, grafy zobrazí průměry, minima a maxima, na ose x jsou experimentální teploty, na ose y rychlosti, jednotky den<sup>-1</sup>



### Příloha 3: Soupis růstových rychlostí

Tab. 1: Růstové rychlosti dle pokusů, **pokusy 1, 2, 3, 5, 7 a 8**, zvýrazněná data jsou nahrazena celkovým průměrem, **zvýrazněné jsou analyzované pokusy**, t je experimentální teplota ve °C.

t	druh	Pokus 1	Pokus 2	Pokus 3	Pokus 5	Pokus 7	Pokus 8
10	pet	0,131704198	0,0944446161	0,415888308	0,305943858	0,138629436	0,413339287
10	pet	0,125339783	0,211824465		0,346573590	0,260720936	0,084682228
10	am	0,231049060	0,193297472	0,092861122	0,519860385	0,149442880	0,346573590
10	am	0,200662134	0,274653072	0,081093022	0,341878444	0,331645615	0,671634340
10	gl	0,145911456	0,197114340		0,257404854	0,277258872	0,433094328
10	gl	0,188567019	0,503725755		0,252900228	0,219722458	0,693147181
13	pet	0,115524530	<b>0,279193280</b>	0,401324268	0,346573590	0,111923158	0,107711173
13	pet	0,231049060	0,402359478	0,723017900	0,346573590	0,183258146	0,366204096
13	am	0,078333938	0,458145366	0,648636716	0,562822950	0,554517744	0,224485398
13	am	0,291533309	0,708303336		<b>0,279193280</b>	0,479579055	0,236115402
13	gl	0,216547164	<b>0,279193280</b>	0,058896209	0,385111260	0,321887583	0,231049060
13	gl	0,246934090	<b>0,279193280</b>		0,313190742	0,321887583	0,366204096
16	pet	0,231049060	<b>0,279193280</b>	0,299736909	0,190535013	0,115072829	0,173286795
16	pet	0,037190592	0,402359478	0,172999488	0,134749125	0,346920211	0,170275208
16	am	0,103173201	0,201179739	0,231049060	<b>0,279193280</b>	0,033410817	0,252900228
16	am	0,183102048	0,274653072	0,123037128	0,274653072	0,081093022	0,446213090
16	gl	0,203962572	<b>0,279193280</b>		0,300993201	0,358351894	0,157152165
16	gl	0,135155036	0,154759802		0,133724412	0,479579055	0,195928888
19	pet	0,152715122	0,069314718	0,291822913	0,519860385	0,129325433	0,190535013
19	pet	0,030386926	0,549306144		0,202732554	0,057536415	0,324820746
19	am	0,231049060	0,599473818	0,152428010	0,197114340	0,117557333	0,231049060
19	am	0,231049060	0,693147181	0,094000726	0,127706406	0,111923158	0,179665500
19	gl	0,152715122	0,282432620		0,183102048	0,277258872	0,151533951
19	gl	0,198264011	0,173286795	0,231049060	0,252900228	0,102165125	0,206346403
22	pet	0,268239652	0,575646273	0,264976625	0,150131091	0,162186043	0,211824465
22	pet	0,115524530	0,172276660	0,101793883	0,127706406	<b>0,279193280</b>	<b>0,279193280</b>
22	am	0,220292640	0,542263425	0,014817254	0,154759802	<b>0,279193280</b>	0,130717993
22	am	0,183102048	0,274653072	0,378326644	0,190535013	<b>0,279193280</b>	0,128370420

**Tab. 2:** Růstové rychlosti dle pokusů, **pokusy 4 a 9**, zvýrazněná data jsou nahrazena celkovým průměrem, t je experimentální teplota ve °C.

t	druh	Pokus 4	Pokus 9
10	pet	0,0263401289	0,313511725
10	pet	0,0312907857	0,377553111
10	am	0,0312907857	0,32061867
10	am	0,208227281	0,25768493
10	con	0,356779089	0,223969934
10	con	0,199626924	0,285297798
13	pet	0,186538596	0,185200568
13	pet	<b>0,220216856</b>	0,230728336
13	am	<b>0,220216856</b>	0,230728336
13	am	0,176477836	0,411979608
13	con	0,305430244	0,238029682
13	con	0,324820746	0,210799869
16	pet	0,208227281	0,128370777
16	pet	<b>0,220216856</b>	0,156595371
16	am	0,109501356	0,216825132
16	am	0,157152165	0,295890452
16	con	0,133520621	0,182326878
16	con	0,229072683	0,227394805
19	pet	0,33043896	0,246948893
19	pet	0,0587504537	0,342605003
19	am	0,211824465	0,173286795
19	am	0,186538596	0,287823137
19	con	0,240794561	0,162410373
19	con	0,275559524	0,295890452
22	pet	<b>0,220216856</b>	0,205408452
22	pet	0,0333828482	0,232630162
22	am	0,252900228	0,256408833
22	am	0,173286795	0,169459572
22	con	0,193297472	<b>0,220216856</b>
22	con	0,0719205181	0,111923158
25	pet	0,402359478	<b>0,220216856</b>
25	pet	0,326943084	0,17712193
25	am	<b>0,220216856</b>	<b>0,220216856</b>
25	am	0,313190742	0,250552594
25	con	0,089168736	<b>0,220216856</b>
25	con	0,447939867	0,175093748



#### Příloha 4: Splněné předpoklady ANOVA opakovaných měření

**Tab. 1:** Pokusy 2, 5, 7, 8 - Cochran-Bartlett test homogenity variancí v rámci skupin faktorů (effect), p hodnota větší než 0,05 znamená, přijetí nulové hypotézy, tj. že variance jsou homogenní.

Tests of Homogeneity of Variances (pokusy 2,5,7,8 nahr Effect: teplota					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
2	9,0591	0,36921	8,9169	5	0,11242
5	6,2036	0,36418	4,8120	5	0,43924
7		0,44019	6,8195	4	0,14573
8	13,8799	0,53584	10,0786	5	0,07303

Tests of Homogeneity of Variances (pokusy 2,5,7,8 nahr Effect: druh					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
2	1,99606	0,45923	1,27585	2	0,52838
5	1,15676	0,35750	0,05600	2	0,97238
7	3,31861	0,61208	5,05068	2	0,08003
8	2,12999	0,43119	1,55208	2	0,46022

Tests of Homogeneity of Variances (pokusy 2,5,7,8 nahr Effect: teplota*druh					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
2		0,24677	12,9333	16	0,67762
5		0,39234	21,8849	15	0,11085
7		0,28710	3,9270	11	0,97200
8	19599,6	0,19977	25,5910	17	0,08224

**Tab. 2:** Mauchleyho test sféricity, **pokusy 2, 5, 7 a 8**, p hodnota větší než 0,05 znamená, přijetí nulové hypotézy o sféricitě, tento předpoklad ANOVY opakovaných měření je tedy také splněn

Mauchley Sphericity Test (pokusy 2,5,7,8 Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
Effect	W	Chi-Sqr.	df	p
POKUS	0,712668	5,664485	5	0,340246

**Tab. 3:** Předpoklad normality, pokusy 2, 5, 7, 8 - všechny faktory: **teplota, druh, teplota\*druh**, pokud je p hodnota větší než 0,05 předpokládá se normální rozdělení.

Soubory dat dle faktorů	p hodnota
všechny faktory pokus 2	0,17
všechny faktory pokus 5	0,13
všechny faktory pokus 7	0,12
všechny faktory pokus 8	0,14
faktor teplota pokus 2	0,16
faktor teplota pokus 5	0,12
faktor teplota pokus 7	0,1
faktor teplota pokus 8	0,12
faktor druh pokus 2	0,16
faktor druh pokus 5	0,13
faktor druh pokus 7	0,11

faktor druh pokus 8	0,14
faktor teplota a druh pokus 2	0,12
faktor teplota a druh pokus 5	0,08
faktor teplota a druh pokus 7	0,06
faktor teplota a druh pokus 8	0,09

**Tab. 4:** Pokusy 4 a 9 - Cochran-Bartlett test homogenity variancí v rámci skupin faktorů (effect), p hodnota větší než 0,05 znamená, přijetí nulové hypotézy, tj. že variance jsou homogenní, díky malému počtu opakování nemá test sféricity význam.

Tests of Homogeneity of Variances (pet am con pokusy 4 Effect: teplota)					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
4	7,40223	0,31905	6,58896	5	0,25304
9	7,72004	0,30410	4,81373	5	0,43903
Tests of Homogeneity of Variances (pet am con pokusy 4 Effect: druh)					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
4	3,28187	0,48590	3,60620	2	0,16478
9	2,21344	0,44803	1,64502	2	0,43932
Tests of Homogeneity of Variances (pet am con pokusy 4 Effect: teplota*druh)					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
4	5251,81	0,37235	21,0649	17	0,22339
9	44,33	0,27039	8,0800	17	0,96480

**Tab. 4:** Předpoklad normality, pokusy 4 a 9 - všechny faktory: **teplota, druh, teplota\*druh**, pokud je p hodnota větší než 0,05 předpokládá se normální rozdělení.

Soubory dat dle faktorů	p hodnota
všechny faktory pokus 4	0,1
všechny faktory pokus 9	0,07
faktor teplota pokus 4	0,09
faktor teplota pokus 9	0,06
faktor druh pokus 4	0,1
faktor druh pokus 9	0,06
faktor teplota a druh	0,07