

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra botaniky



Bakalářská práce

Kryptická diverzita rozsivek a metody pro její odhalení

Cryptic diversity of diatoms
and the methods for its evaluation

Lucie Vančurová

Praha 2009

Školitel: Mgr. Pavel Škaloud, PhD.

ABSTRAKT

Rozsivky (Bacillariophyceae, odd. Heterokontophyta) jsou jednobuněčné řasy žijící samostatně nebo v koloniích. Jsou významnými primárními producenty a značnou měrou se podílejí na globálním cyklu křemíku. V současné době je kryptická nebo pseudokryptická diverzita odhalována v mnoha tradičně uznávaných druzích rozsivek. Testy reprodukční kompatibility (křížící experimenty) napomáhají k nalezení hranic biologického druhu. Nadále se používají morfologické znaky, na kterých byl původně založen celý taxonomický systém, ale jsou konfrontovány s molekulárními daty. Většina současných studií zabývajících se fylogenezí rozsivek se opírá o molekulární data. Patří mezi ně ITS, LSU rDNA a 18 S rDNA, které se v genomu vyskytují v mnoha kopiích, což usnadňuje jejich PCR amplifikaci, ale přináší problémy s intragenomickým polymorfismem (především u oblasti ITS). Nejvariabilnější z nich je ITS, nejméně variabilní 18 S rDNA, která nejčastěji slouží k zařazení druhu v rámci třídy. Pro odlišení biologických druhů se osvědčily modely sekundární struktury ITS-2. Výhodou protein-kódujících oblastí DNA je snadné vytvoření alignmentu. Organelové geny se vyskytují v genomu pouze v jedné kopii, což předchází některým metodickým obtížím. Mezi ně patří plastidové geny *rbcL*, *psaA* a *psbA* a mitochondriální gen *cox1*. Při použití plastidových genů je na rozdíl od mitochondriálních minimální nebezpečí kontaminace DNA jiných organismů. Nevýhodou je nedostatečná znalost dědičnosti a dalších vlastností organelové DNA. Různé molekulární markery mohou poskytovat protichůdné výsledky. Zvláště to platí při současném využití jaderných a organelových markerů.

Klíčová slova: rozsivky, kryptická diverzita, reprodukční izolace, morfologie, rDNA, cpDNA, mtDNA, *Luticola*, *psbA*

ABSTRACT

Diatoms (Bacillariophyceae, Heterokontophyta) are single-cell algae. They are important primary producers and greatly contribute to the global cycle of silicon. Cryptic diversity is discovered in many traditional species nowadays. Tests of reproductive compatibility (mating experiments) help to find the borders of biological species. Morphological features (which formed the basis of the taxonomic system) are still used, but they are confronted with the molecular data. The most of present phylogenetic studies use molecular data. These include the ITS, LSU rDNA and 18 S rDNA, which are in the genome occur in multiple copies, thus facilitating PCR amplification, but have problems with intragenomic polymorphism (especially ITS). Most variable of them is ITS. 18 S rDNA, which is most frequently used for the classification of species within the class, is least variable. Models of secondary structure of ITS-2 are well-proven for the distinction of biological species. The advantage of protein-coding genes is easy to align. Every gene occur normally only once in genome of organelles. This fact prevents some methodical difficulties. I present here protein-coding chloroplast genes *rbcL*, *psaA* and *psbA* and mitochondrial gene *cox1*. Using of chloroplast genes prevent contamination by other DNA. The disadvantage of this genes is lack of knowledge of heredity and other properties cpDNA and mtDNA. Various molecular markers may provide conflicting results.

Key words: diatoms, cryptic diversity, reproductive isolation, morphology, rDNA, cpDNA, mtDNA, *Luticola*, *psbA*

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především svému školiteli Mgr. Pavlu Škaloudovi, PhD., který mě s velkou trpělivostí naučil mnoha metodám a vždy ochotně zodpověděl všechny mé otázky. Díky patří za mnoho teoretických i praktických rad také Mgr. Janě Veselé a dalším členům algologického pracoviště. Děkuji rovněž Doc. RNDr. Aloisii Poulíčkové, CSc. za poskytnutí kultur rozsivek rodu *Luticola*, které jsem využila v praktické části této práce.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. KRYPTICKÁ DIVERZITA ROZSIVEK.....	7
2.1. Rozsivky (Bacillariophyceae)	7
2.1.1. Základní charakteristika	7
2.1.2. Stavba buňky	8
2.1.3. Ekologie a význam v přírodě	9
2.2. Modelové rody	9
3. ZNAKY POUŽÍVANÉ PRO ROZLIŠENÍ DRUHŮ.....	12
3.1. Křížící experimenty	12
3.1.1. Biologický koncept druhu	12
3.1.2. Reprodukčně izolační mechanismy	12
3.1.3. Výsledky a jejich interpretace	13
3.2. Morfologie valvy	14
3.3. Molekulární data	15
3.3.1. Jaderné markery	15
3.3.1.1. ITS rDNA	16
3.3.1.2. Sekundární struktura ITS-2	18
3.3.1.3. LSU rDNA	19
3.3.1.4. SSU (18 S) rDNA	20
3.3.2. Plastidové markery	21
3.3.2.1. rbcL	22
3.3.2.2. psaA a psbA	23
3.3.3. Mitochondriální markery	24
3.3.3.1. cox1	24
4. PRAKTICKÁ ČÁST.....	26
4.1. Úvod.....	26
4.2. Materiál a metody	27
4.2.1. Přehled použitých klonů	27
4.3.1. Sběr a kultivace	28
4.3.2. PCR a sekvenování	28
4.3.3. Zpracování dat	29
4.3.4. Pozorování buněk	29
4.4. Výsledky a diskuse	29
5. ZÁVĚR	32
POUŽITÁ LITERATURA	34

1. ÚVOD

Rozsivky (Bacillariophyceae) jsou celosvětově rozšířené a hrají důležitou roli v mořských, sledkovodních i suchozemských ekosystémech. Patří mezi významné primární producenty a velkou měrou se podílí na globálním cyklu křemíku. Jejich schránky přitahovaly pozornost vědců i laiků již na začátku 19. století (Round et al., 1990). Přesto je toho ještě stále mnoho, co o nich nevíme.

Momentálně probíhá rozsáhlá revize jejich taxonomického systému, který byl původně založen na morfologii křemičitých schránek. V současné době existují různé přístupy k odlišení druhů i vyšších taxonomických jednotek a velmi častá je snaha kombinovat více metod najednou.

Je známo, že rozsivky mají obrovskou kryptickou a pseudokryptickou diverzitu, ale současné odhady skutečného počtu druhů se řádově liší (Mann, 1999). Cílem této práce je shrnout nejčastěji využívané znaky sloužící k odhalování této diverzity, poukázat na jejich výhody a nevýhody a také na to, pro jaké typy studií se nejlépe hodí.

Zaměřila jsem se na křížící experimenty, tradiční i moderní morfologické znaky a molekulární data, představovaná sekvencemi jaderné, plastidové i mitochondriální DNA. Samozřejmě existuje celá řada metod, které ve své práci nezmiňuji. Vybírala jsem jednak velmi často používané znaky, jednak ty, o jejichž využití uvažuji ve své diplomové práci, která se bude zabývat molekulární diverzitou rodu *Luticola*. Tohoto tématu se také dotýká praktická část, ve které jsem se nejen seznámila s řadou metod, ale poskytuje i dílčí výsledky.

2. KRYPTICKÁ DIVERZITA ROZSIVEK

Jako kryptické jsou označovány druhy, které jsou morfologicky shodné, ale geneticky oddělené. Druhy odlišující se pouze nepatrnými morfologickými znaky, které bývají často objeveny až na základě výsledků molekulárních analýz se nazývají semi- nebo pseudo-kryptické (Alverson, 2008).

Odhady počtu druhů vytvořené na základě tradičních morfologických metod (především znaky na křemičité schránce pozorovaných světelným mikroskopem) značně podceňují skutečnou diverzitu rozsivek (Mann, 1999). Mnohem více variability zachycují ultrastrukturní znaky pozorované pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (Alverson, 2008). V posledních letech je obrovská skrytá diverzita odhalována pomocí molekulárních metod.

Jedním z možných vysvětlení toho, že některé tradiční druhy jsou i dle molekulárních dat uniformní nezávisle na geografickém rozšíření a dalších faktorech a jiné vykazují značnou kryptickou diverzitu, je větší evoluční stáří rozrůzněných druhů (Coleman et al., 1994).

2.1. Rozsivky (Bacillariophyceae)

2.1.1. Základní charakteristika

Rozsivky (Bacillariophyceae, odd. Heterokontophyta) jsou jednobuněčné řasy žijící samostatně nebo v koloniích. Tvoří schránky s bilaterální nebo radiální symetrií z amorfního polymeru oxidu křemičitého. Chloroplasty obsahují chlorofyly a, c1, c2, c3, β -karoten, fukoxantin, diatoxantin, diadinoxantin a další xantofyly. Zásobní látkou je olej a chrysolaminaran (β -1,3-glukan) (Kalina, 2005).

Rozsivky se rozmnožují dělením, při kterém vznikají 2 dceřiné buňky, které si ponechávají půl mateřské schránky a druhou polovinu si vytvářejí (Obr. 1, str. 8). Tento mechanismus dělení vede ke zmenšování buněk spojenému se změnami jejich tvaru (Kaczmarska et al., 2008), původní velikost je obnovena při pohlavním procesu.

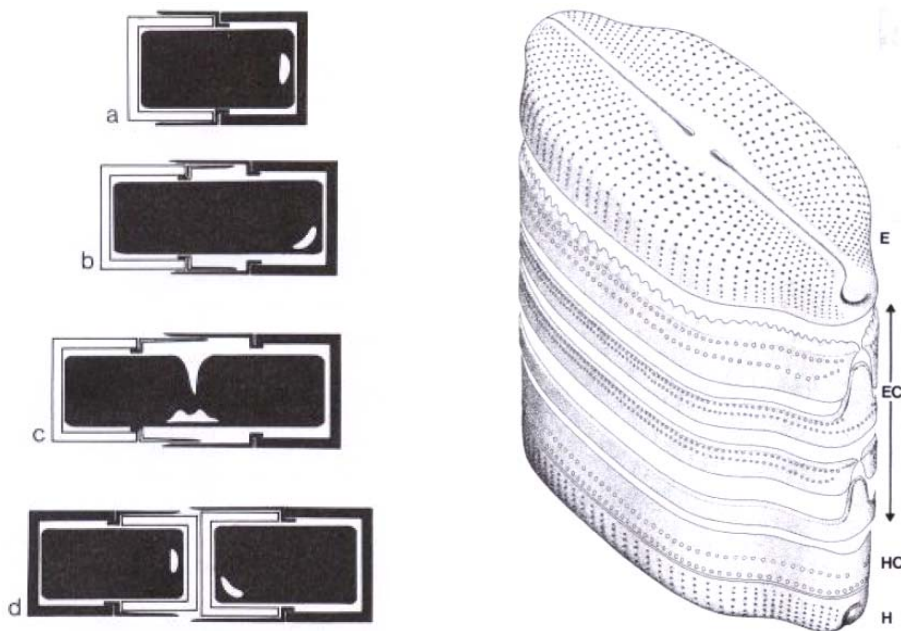
U centrických rozsivek je pohlavní proces oogamický, zatímco u penálních je izogamní – jako gamety vystupují celé protoplasty. Po fúzi gamet vzniká specializovaná zygota – auxospora, která se zvětšuje a ze které vzniká iniciální buňka o maximální velikosti. Vyskytují se homothallické i heterothallické druhy. U heterothallických lze rozeznat pasivní (samičí) a aktivní (samčí) klony (Kaczmarska et al., 2008). U homothallických druhů může docházet k pohlavnímu rozmnožování mezi buňkami jednoho klonu (kultury vzniklé dělením jedné

buňky). Tento typ rozmnožování byl pozorován např. u zástupců druhu *Luticola dismutica* (Poulickova, 2008).

2.1.2. Stavba buňky

Schránka (frustula) rozsivek (Obr. 2) se skládá ze dvou částí – ték. Každou z nich tvoří valva a boční pás (cingulum), ten může být složen z několika prstencovitých částí, jejich počet se během života buňky mění (tímto způsobem zvětšuje schránka svůj objem). Nové pásy se ale mohou připojovat pouze ke spodní části schránky (hypotéce), pásy epitéky pocházejí z mateřské buňky (Round et al., 1990).

Důležité morfologické znaky se nacházejí především na ploše valvy. Ve světelném mikroskopu je vidět systém areol nebo pórů uspořádaných do strií. V podélném směru může probíhat raphe, která sestává ze dvou větví. Obě větve začínají ve středové ztlustlině (centrální nodulus) a končí polární ztlustlinou (polární nodulus). Raphe může být na obou tékách nebo jen na jedné z nich. Rozeznáváme štěrbinovou a kanálkovou raphe, ta je tvořena trubicí s křemitými můstky (fibuly) a otvory (portuly) (Kalina, 2005).



Obr. 1 Růst schránky a dělení buňky. Každá dceřinná buňka si ponechává půl mateřské schránky a vytváří si druhou polovinu (Převzato z Round et al., 1990).

Obr. 2 Stavba schránky navikuloidní rozsivky. E: epivalva, EC: epicingulum (svrchní boční pás), HC: hypocingulum (spodní boční pás), H: hypovalva (Převzato z Round et al., 1990).

Základní stavba protoplastu se u centrických a penátních rozsivek liší. U centrických rozsivek je střed buňky vyplněn vakuolou, cytoplazma a organely jsou v periferní poloze. U penátních rozsivek je jádro umístěno v cytoplazmatickém můstku probíhajícím středem buňky. Po obou

stranách jsou velké vakuoly, zbylá cytoplazma tvoří tenkou nástěnnou vrstvu. V buňkách centrických rozsivek bývá několik chloroplastů, většina penátních rozsivek má jeden nebo dva chloroplasty. Chloroplasty mají čtyři obalné membrány, tylakoidy jsou spojené po trojicích v lamely. Za produkci slizu a dalších amorfních polysacharidů, které jsou vylučovány z buňky, jsou zodpovědné diktyozomy. Těmito látkami se buňky spojují do kolonií a přichycují k podkladu. Slouží také k mechanické ochraně buňky.

2.1.3. Ekologie a význam v přírodě

Rozsivky jsou skupina s mimořádným ekologickým významem – podílí se minimálně 20 % na objemu uhlíku fixovaného každoročně během fotosyntézy (Mann, 1999). Představují hlavní složku bentických a planktonních společenstev. Žijí v sladkovodních, mořských i terestrických ekosystémech na celém světě.

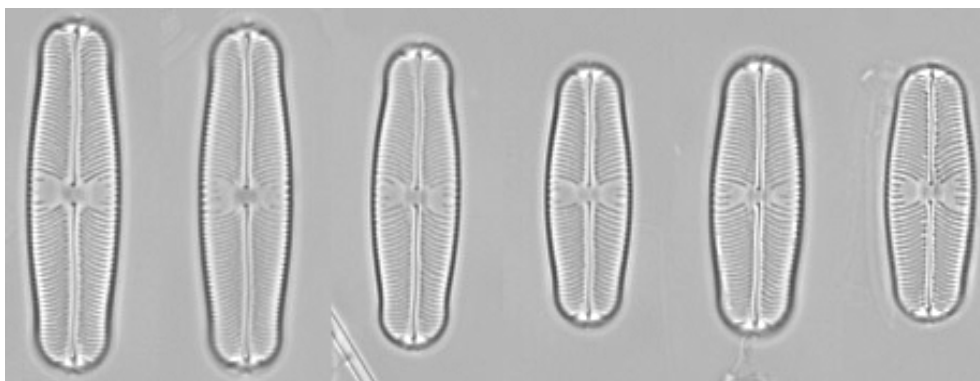
Jedná se o jedinou fotoautotrofní skupinu organismů, jejíž vývoj je plně závislý na přítomnosti rozpustných forem oxidu křemíku v prostředí (Kalina, 2005). Využívají křemík při realizaci základních buněčných procesů, tj. pro syntézu jaderné DNA polymerázy, pro syntézu cyklických nukleotidů a pro syntézu frustuly (Kalina, 2005) a významně se podílejí na globálním cyklu křemíku.

Rozsivky se používají při ekologickém monitoringu, paleoekologických rekonstrukcích a ke stratigrafické korelaci. Některé z nich mohou produkovat toxiny, např. *Pseudo-nitzschia* produkující kyselinu domoikovou – neurotoxin zodpovědný za onemocnění ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) (Amato et al., 2007).

2.2. Modelové rody

Většina studií se zaměřuje na několik významných rodů rozsivek. Obecně se jedná o hojné a celosvětově rozšířené rody, které se snadno kultivují v laboratorních podmínkách. Často mají také praktický význam pro člověka.

Sellaphora (Obr. 3, str. 10) patří mezi penátní rozsivky s raphe (Round et al., 1990). Jde o relativně malý sladkovodní rod (Alverson, 2008), který byl oddělen od rodu *Navicula* na základě struktury chloroplastu už v roce 1902, ale správnost tohoto kroku byla uznána až mnohem později. Na základě 18 S rDNA fylogenetických analýz bylo potvrzeno, že se jedná o monofyletický rod blízký příbuzným rodům *Navicula*, *Eolimna* (nemonofyletické rody) a *Pinnularia* (Behnke et al., 2004). Nejčastěji jsou zkoumány příslušníci druhového komplexu *S. pupula*, který se ukázal být nemonofyletickou skupinou (Evans et al., 2008).

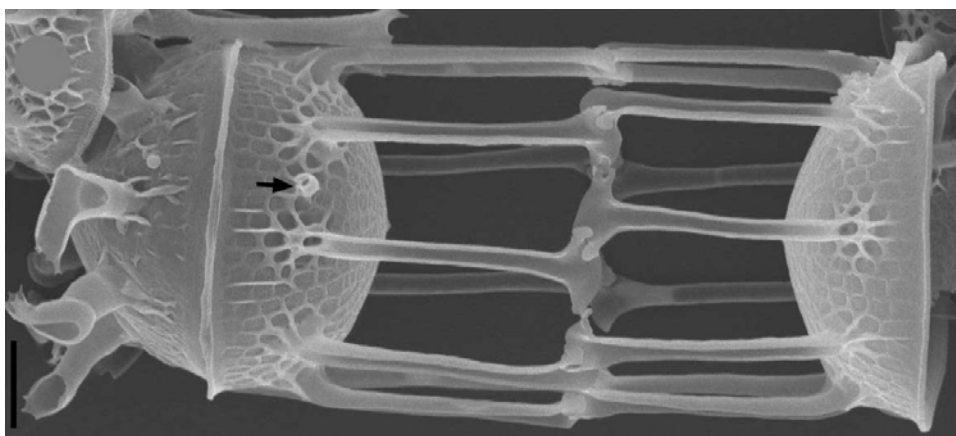


Obr. 3 *Sellaphora*. Vyčištěné valvy pozorované pomocí světelného mikroskopu (Převzato z Behnke et al., 2004).

Zástupci rodu *Pseudo-nitzschia*, taktéž náležící mezi penátní rozsivky, jsou významní a pro člověka potenciálně nebezpeční hlavně produkcí domoikové kyseliny, což je neurotoxin ohrožující vyšší obratlovce včetně lidí. V rámci rodu se rozeznává okolo 30 morfotypů příslušících do 3 kategorií: *Pseudo-nitzschia pungens* complex, *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex a *Pseudo-nitzschia americana* complex (Kaczmarska et al., 2008).

Jedním z nejintenzivněji studovaných druhů sladkovodních centrických rozsivek je *Cyclotella meneghiniana*. Je taxonomicky problematický díky své široké ekologické valenci a velké ultrastrukturní variabilitě. Jeho zástupci vykazují vysokou genetickou variabilitu a zřejmě patří mezi několik reprodukčně oddělených skupin. Má kosmopolitní rozšíření a snadno se kultivuje (Beszteri et al., 2005).

Skeletonema (Obr. 4) patří rovněž mezi centrické rozsivky. Rod je celosvětově rozšířen v planktonu i bentosu moří a významně se podílí na primární produkci, navíc může vytvářet vodní květ (např. v Baltském moři). Zástupci rodu *Skeletonema* se využívají při různých ekologických studiích, což vyžaduje identifikaci jednotlivých druhů (Ellegaard et al., 2008).



Obr. 4 *Skeletonema marinoi*. Jedna celá buňka a připojená valva další buňky. Pozorováno pomocí SEM (Převzato z Ellegaard et al., 2008).

V současné době jsou osekvenovány 2 kompletní genomy rozsivek. První z nich je centrická rozsivka *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al., 2004), druhou je penátní *Phaeodactylum tricornutum* (Bowler et al., 2008). Na základě těchto sekvencí bylo zjištěno, že se centrické

a penátní rozsivky liší v asi 40 % genů, což svědčí o velké rychlosti jejich molekulární evoluce v porovnání s ostatními organismy (Bowler et al., 2008). Na osekvenování několika dalších rozsivkových genomů se momentálně pracuje. Patří mezi ně *Fragilariopsis cylindus* a *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Vardi et al., 2008).

3. ZNAKY POUŽÍVANÉ PRO ROZLIŠENÍ DRUHŮ

3.1. Křížící experimenty

3.1.1. Biologický koncept druhu

Dle biologického pojetí druhu by měly druhy představovat reprodukčně izolované jednotky. Definice biologického druhu podle Mayra (Mayr, 1970) je následující: Druhy sestávají z populací a mají vnitřní genetickou soudržnost. Organismy v rámci druhu tvoří reprodukční jednotku, mohou se vzájemně křížit a vyhledávají se za účelem reprodukce. Druh také tvoří ekologickou jednotku interagující s ostatními druhy v daném prostředí. Členové druhu tvoří genetickou jednotku sdílející společný genofond. Druhy jsou skupiny navzájem se křížících přírodních populací, které jsou reprodukčně izolované od jiných podobných druhů.

3.1.2. Reprodukčně izolační mechanismy

Genofond druhu je chráněn před škodlivým genovým tokem z jiných genofondů reprodukčně izolačními mechanismy. Geny v genofondu vytvářejí kombinace příznivé pro životaschopnost jedince, naopak smísením genů dvou druhů vzniká množství nevhodných kombinací. Mechanismy vedoucí k zamezení takovému genovému toku jsou tedy favorizovány selekcí (Mayr, 1970). Rozlišujeme prezygotické a postzygotické izolační mechanismy. Postzygotické reprodukčně-izolační mechanismy zahrnují neživotaschopnost a sterilitu F1 generace.

Existence geneticky odlišných sympatricky žijících populací *Pseudo-nitzschia delicatissima* (v Neapolském zálivu) potvrzuje přítomnost účinných mechanismů reprodukční izolace. Může se jednat i o ekologické mechanismy (Amato et al., 2007). Podobným příkladem je i existence čtyř geneticky rozrůzněných skupin *Cyclotella meneghiniana*, kterou rovněž nelze vysvětlit geografickou diferenciací (Beszteri et al., 2005).

Absenci prezygotických reprodukčně izolačních mechanismů u geneticky odlišených jedinců lze vysvětlit ekologickou izolací (vyskytují se v odlišných typech vodních nádrží), výskytem postzygotických reprodukčně-izolačních mechanismů, nebo kombinací obojího (Behnke et al., 2004). I u jiných mikroorganismů (např. Volvocales) lze pozorovat absenci prezygotických reprodukčně izolačních mechanismů u geograficky vzdálených populací a následnou sníženou životaschopnost zygot a F1 generace. (Coleman et al., 1994)

Ke křížení příslušníků různých klonálních populací nemusí docházet také proto, že mají pro rozmnožování různá optima (např. teplotní) (Kaczmarska et al., 2008).

3.1.3. Výsledky a jejich interpretace

Většina rozsivek má diplontní životní cyklus s prodlouženou fází mitotického dělení a krátkou sexuální fází. Díky tomu, že dceřinné buňky vznikají uvnitř mateřské se průměrná velikost buněk v populaci časem zmenšuje. Většinou je sexuální rozmnožování jediná možnost, jak uniknout z této „miniaturizační pasti“ (Amato et al., 2007).

Organismy, jejichž gamety navzájem interagují, tvoří Z-clade. Jeden Z-clade může obsahovat několik biologických druhů vzhledem k tomu, že postzygotické izolační mechanismy se vytvářejí rychleji, než prezygotické. Některé tradičně (morfologicky) definované druhy obsahují až 20 Z-clades a 10 CBC-clades¹, u jiných naopak jeden Z-clade zahrnuje několik tradičních druhů. Pomocí výskytu CBC lze predikovat, které organismy jsou potenciálně schopné křížení, čímž lze např. usnadnit křížící pokusy (Coleman, 2000).

Důležitým zjištěním je, že křížící pokusy jsou plně opakovatelné včetně detailů intenzity interakcí (Coleman, 2000). Výsledkem těchto pokusů totiž často není prostá přítomnost párujících se buněk, ale spíše jejich počet nebo intenzita křížení, případně jeho výsledek.

Prezygotické bariéry nemusí fungovat ve všech případech, ale počet spárovaných buněk různých rozmnožovacích typů (mating type) mezi příslušníky různých genetických skupin je (např. u rodu *Eunotia*) 20 – 400x nižší, než mezi příslušníky stejné skupiny (Vanormelingen et al., 2008). U příslušníků rodu *Pseudo-nitzschia* byly pozorovány podobné výsledky: k tvorbě zygot docházelo pouze u klonů se shodnou sekvencí ITS-2 a křížení mezi příslušníky různých geografických skupin bylo mnohem méně časté než uvnitř těchto skupin (Kaczmarska et al., 2008).

Většinou není dále zkoumána dlouhodobá životaschopnost F1 generace (Behnke et al., 2004), přitom by tato data mohla vysvětlit další nejasnosti. Výjimkou je např. Vanormelingena studie (Vanormelingen et al., 2008), ve které se ukazuje, že hybridí vzniklí křížením různých genetických skupin nejsou schopni dalšího rozmnožování.

Existenci kryptických druhů je třeba odlišit od absence (nebo nízké frekvence) alogamického sexuálního rozmnožování². V prvním případě klonální populace tvoří skupiny, uvnitř nichž se rozmnožují výrazně častěji (ojedinělé rozmnožování napříč skupinami je důsledkem

¹ CBC-clade je skupina organismů, se shodnou sekvencí konzervovaných úseků ITS-2. CBC jsou oboustranné změny (Compensatory Base Change) v této sekvenci, tj. změny na dvou od sebe v primární struktuře vzdálených místech zaručující zachování sekundární struktury. Více v kapitole 3.3.1.2.

² Při alogamickém rozmnožování vzniká jedinec splynutím gamet dvou různých jedinců.

nedokonalých reprodukčních bariér), zatímco v druhém případě se jako taková skupina chová každá klonální populace (Beszteri et al., 2005). U některých zástupců rodu *Eunotia* bylo pozorováno autogamické rozmnožování³, které probíhalo stejně jako alogamické až na absenci druhé buňky. Potomci těchto buněk se rozmnožovali stejným způsobem (Vanormelingen et al., 2008).

Během křížících pokusů s *Gonium pectorale* (Volvocales) bylo zjištěno, že reciproční párování (mezi různými rozmnožovacími typy jednotlivých klonů) neposkytuje stejné výsledky v tvorbě a životaschopnosti zygot (Coleman, 2000). U heterothallických druhů penátních rozsivek je tedy vhodné provádět křížící pokusy s buňkami obou rozmnožovacích typů.

3.2. Morfologie valvy

Morfologií schránek rozsivek se vědci zabývají již od jejich objevení a dlouho byla téměř tím jediným, co bylo na rozsivkách zkoumáno (Round et al., 1990). Tato pozorování byla nejprve prováděna pomocí světelného mikroskopu, postupem času převládlo využívání znaků pozorovatelných elektronovým mikroskopem.

V současnosti mezi používané morfologické znaky patří délka valvy, šířka valvy, počet strií na 10 µm (Vanormelingen et al., 2008), počet pórů ve striích (Kaczmarzka et al., 2008), tvar centrálních a polárních zakončení raphe (Mann, 1999), ale také tendence vytvářet jednobuněčné nebo naopak koloniální formy (Kaczmarzka et al., 2008), počet buněk v kolonii, počet areol na 10 µm, počet fultoportul na buňku a další parametry související s touto strukturou (Ellegaard et al., 2008). Je možno analyzovat i struktury na vnitřní straně schránek (Edgar and Theriot, 2004). Pro rozeznání druhů příslušících k jednomu rodu lze použít parametry různých specifických struktur (např. rohy na valvách *Attheya* (Rampen et al., 2009)).

Výše jmenované znaky jsou obecně považovány za geneticky podmíněné, vzhledem k tomu, že jejich výskyt je relativně uniformní i ve větších taxonomických jednotkách. Existuje ale fenotypová plasticita, kterou lze odhalit na základě přírodních vzorků a nikoliv klonů žijících v kultuře (závisí na salinitě, teplotě a dostupnosti živin) (Mann, 1999). U bentických druhů se projevuje ve větší míře, protože jsou zde podmínky proměnlivější. Jedním z projevů této plasticity mohou být i tzv. Janusovy buňky (každá valva vznikala v jiných podmínkách), pro jejich výskyt ale existují i jiná vysvětlení (Mann, 1999).

³ Při autogamickém rozmnožování splývají gamety produkované jedním jedincem.

Mnohdy jsou morfologické rozdíly mezi druhy nalezeny až po prokázání jejich odlišnosti na základě molekulárních dat (Behnke et al., 2004). Výskyt semikryptických druhů (s malými rozdíly v morfologických znacích) je zřejmě častějším jevem, než se původně předpokládalo (Kaczmarska et al., 2008). U rodu *Pseudo-nitzchia* lze najít malé ale konzistentní rozdíly v architektuře schránky mezi jednotlivými druhy, oproti tomu znaky pozorovatelné světelným mikroskopem o kryptické diverzitě nevyovídají (Amato et al., 2007).

Mezi zástupci *Cyclotella meneghiniana* rozdělenými na základě molekulárních dat do několika skupin lze najít pouze rozdíly ve velikosti buněk, ale žádné ultrastrukturní znaky, které by byly podpořeny molekulárními daty, nebyly pozorovány (Beszteri et al., 2005). V některých případech jsou molekulární a morfologická data v rozporu nebo spolu nesouvisí (Behnke et al., 2004; Ellegaard et al., 2008; Evans et al., 2008).

Stále jsou některé nové druhy popisovány pouze na základě morfologických (většinou ultrastrukturních) znaků, příkladem je pět nových druhů rodu *Luticola* popsáných ze subantarktických ostrovů (Van De Vijver and Mataloni, 2008).

Zvláště pro rozlišení vyšších taxonů se dají využít také cytoplazmatické znaky, jako je charakter a počet chloroplastů (Sato et al., 2008), znaky na Golgiho aparátu, pyrenoidu a typ auxospor (Obr. 10, str. 20; Medlin and Kaczmarska, 2004).

Jednou z nesporných výhod využívání morfologickým znaků na schránkách rozsivek je, že se podle nich na základě fosilního záznamu poměrně dobře daří zařadit do systému vyhynulé druhy (Medlin and Kaczmarska, 2004). V této souvislosti jsou také předpokladem paleoekologických analýz založených na identifikaci fosilií současných (nebo jim příbuzných) druhů se známými ekologickými nároky.

3.3. Molekulární data

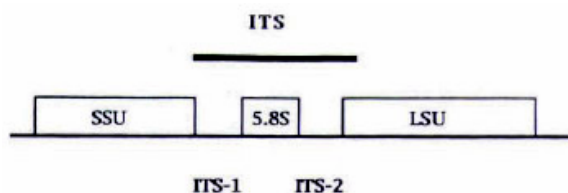
3.3.1. Jaderné markery

Různé úseky sekvence jaderné rDNA (LSU, SSU, ITS) jsou nejčastěji využívanými molekulárními markery nejen u rozsivek z několika důvodů. V genomu jsou obsaženy v mnoha kopiích, což společně s existencí univerzálních primerů velmi usnadňuje PCR amplifikaci a sekvenování. Přítomnost konzervovaných oblastí usnadňuje alignment a současně variabilní oblasti poskytují dostatečné množství fylogeneticky informativních znaků. Další výhodou je rychle se rozrůstající databáze těchto sekvencí. Nevýhodou je poměrně častý intragenomický polymorfismus (Alverson, 2008).

3.3.1.1. ITS rDNA

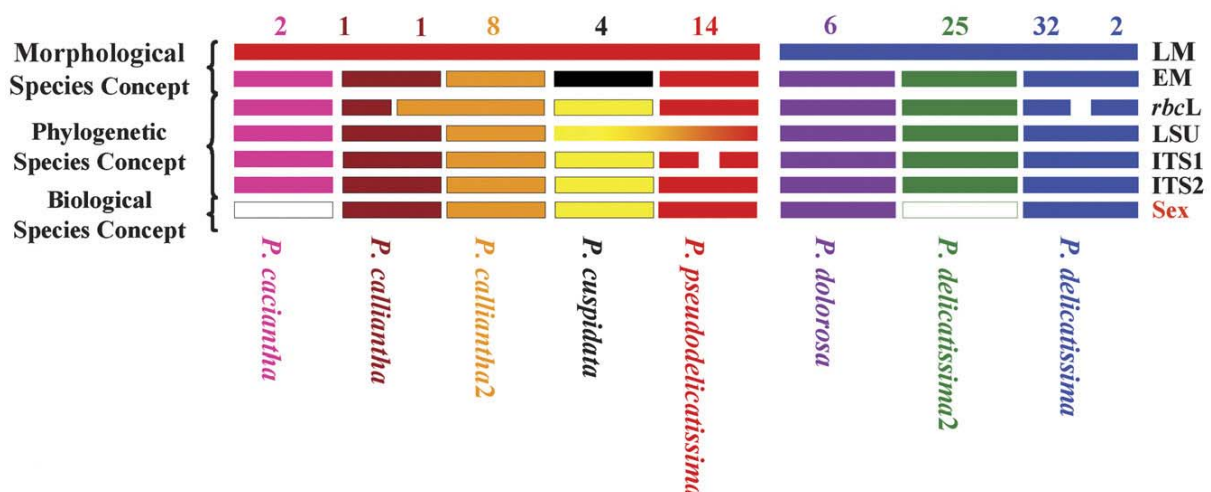
ITS (internal transcribed spacer) se používá u mnoha skupin organismů k fylogenetickým analýzám hlavně na druhové a populační úrovni. Malá velikost ITS regionů a přítomnost konzervovaných sekvencí na jejich okrajích usnadňuje PCR amplifikaci a sekvenování. (Behnke et al., 2004)

ITS leží mezi SSU a LSU rDNA (Obr. 5) a je transkribována vcelku. Dělí se na uvnitř umístěný úsek 5,8 S rDNA, ITS-1, která je připojena na 3' konec SSU, a ITS-2 připojenou na 5' konec LSU. Přítomnost 5,8 S rDNA usnadňuje alignment mezi různými organismy (Coleman et al., 1994) a může být také využita k analýzám společně s ITS-1 a ITS-2 (Behnke et al., 2004). Délka sekvence ITS je však velmi variabilní díky velkému počtu insercí a delecí. Pohybuje se od 700 po téměř 1000 bp. (Beszteri et al., 2005; Vanormelingen et al., 2008) Tento fakt naopak při vytváření alignmentu působí značné potíže.



Obr. 5 Schéma organizace ITS oblasti (Převzato z Coleman et al., 1994).

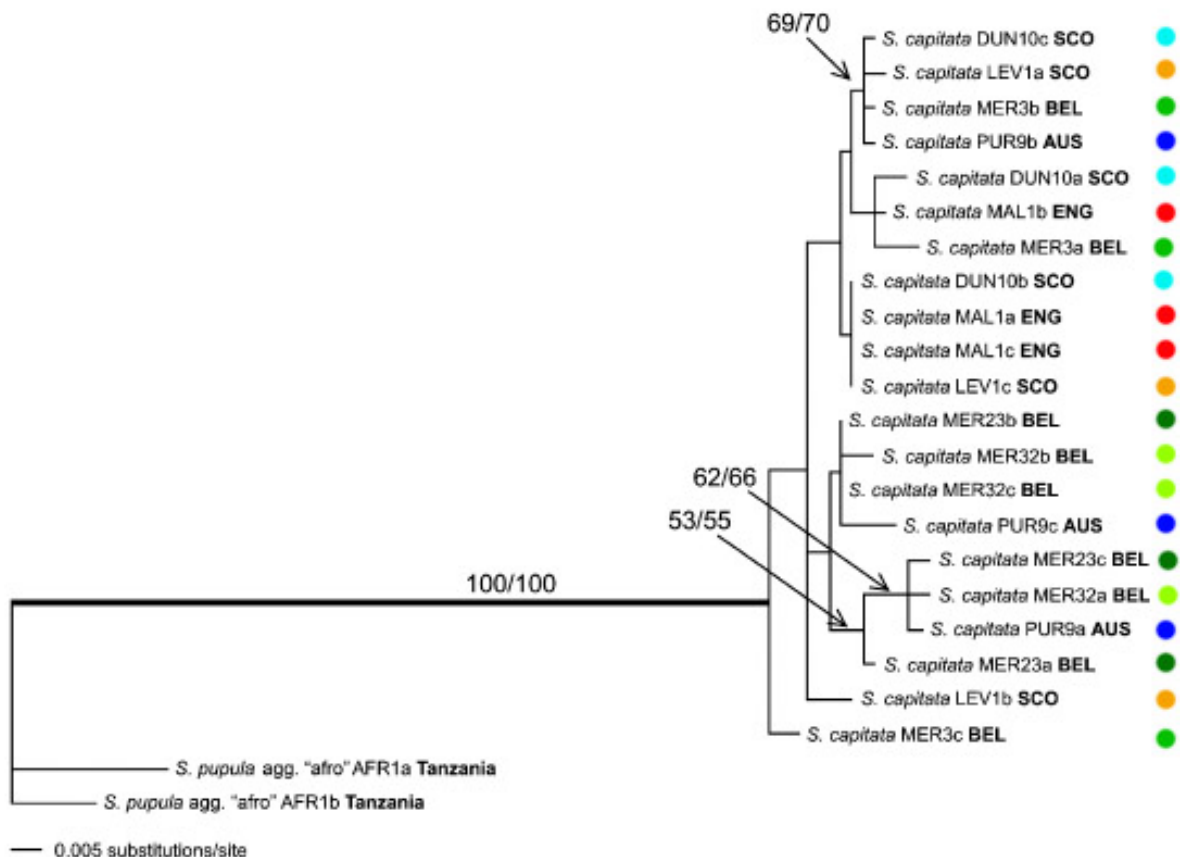
ITS-1 a ITS-2 jsou transkribované oblasti, netvoří součást ribozomů, ale hrají zásadní roli při jejich konstrukci. Především sekundární struktura ITS-2 dokáže přesně vymezit biologické druhy. Dva kmeny se úspěšně kříží, pouze pokud mají shodné ramena sekundární struktury (Amato et al., 2007).



Obr. 6: Porovnání použitelnosti různých znaků pro odlišení biologických druhů. Čísla v prvním řádku označují počet zkoumaných klonů. Vodorovné pruhy symbolizují rozdělení do skupin podle morfologických a molekulárních znaků a sexuální kompatibility. Ultrastruktura *P. cuspidata* nebyla zkoumána. Křížící pokusy u *P. cacinantha* nebyly prováděny, u *P. delicatissima 2* byly prováděny neúspěšně (Převzato z Amato et al., 2007).

Sekvence ITS-1 je variabilnější než ITS-2 (Obr. 6, str. 16), lze ji používat k analýzám i na nižší než druhové úrovni, pro kterou je někdy příliš variabilní a rozděluje populace příslušící k jednomu biologickému druhu (Amato et al., 2007).

Metodické problémy může činit, že se často vyskytuje více různých sekvencí ITS (paralogů) v jednom genomu. Tyto sekvence se mohou lišit více, než sekvence získané z různých klonů (Obr. 7; Vanormelingen et al., 2008; Evans and Mann, 2009). Při studiu zástupců *Sellaphora pupula* bylo nalezeno vždy několik paralogů lišících se vzájemně až ve 48 pozicích. Intraklonální variabilita byla ale vždy menší, než variabilita interklonální (Behnke et al., 2004). V každé zkoumané klonální populaci druhu *Cyclotella meneghiniana* bylo nalezeno od dvou do pěti paralogů ITS (Beszteri et al., 2005). Mezi paralogy se vyskytuje i délkový polymorfismus znemožňující získání čitelných sekvencí. Tento problém řeší klonování pomocí bakteriálních vektorů (Beszteri et al., 2005; Behnke et al., 2004).



Obr. 7 Sekvence paralogů ITS pocházející z jednoho genomu (vyznačeny tečkami stejné barvy) se mohou lišit více, než sekvence získané z různých klonů. ML (maximum likelihood) fylogenetický strom sestavený na základě ITS-1 a ITS-2 (Upraveno podle Evans and Mann, 2009).

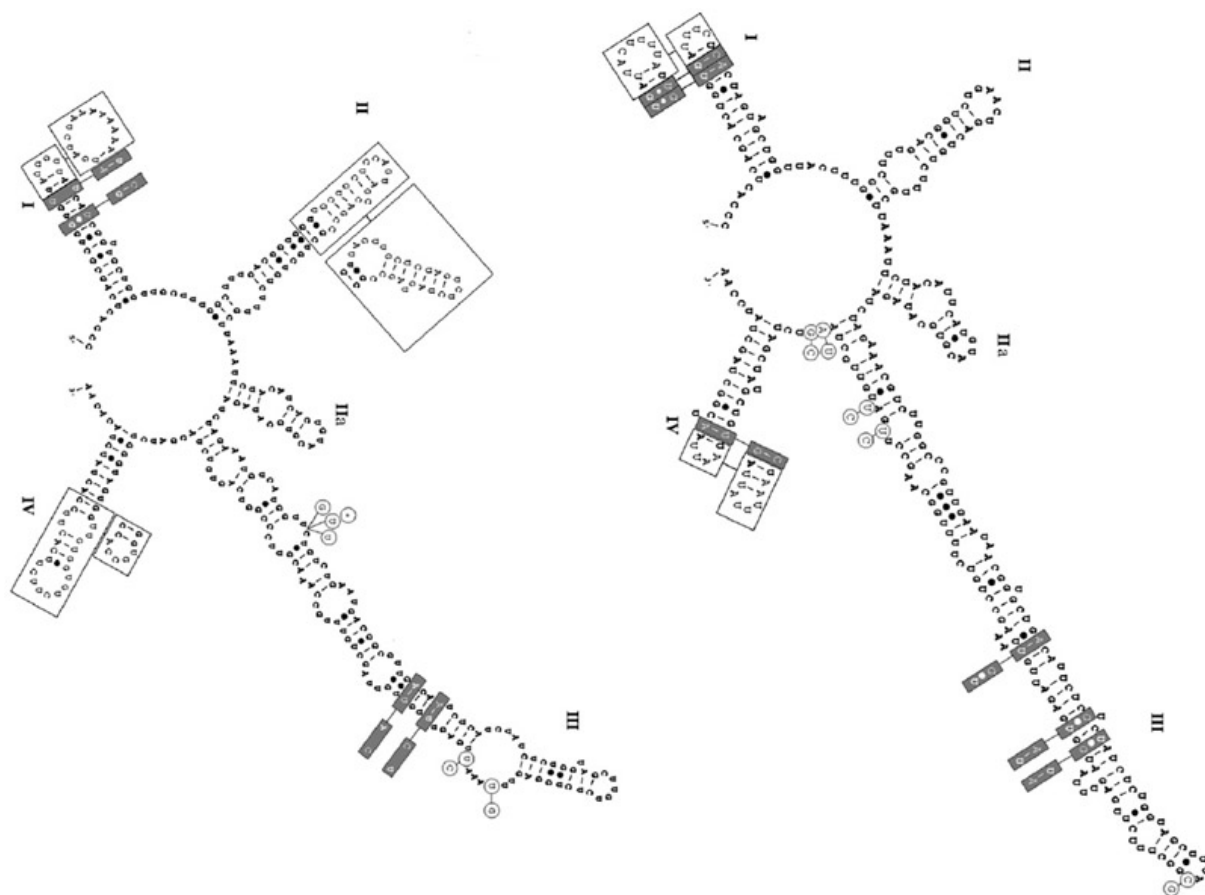
U jedné z geneticky definovaných skupin druhu *Cyclotella meneghiniana* byla pozorována zrychlená evoluce ITS sekvencí. Napovídá tomu velké množství homoplázií a relativně vzdálená pozice vzhledem ke všem ostatním sekvencím (Beszteri et al., 2005). Dalším

zajímavým jevem je výskyt rekombinantních sekvencí ITS, který ale lze považovat za artefakt PCR, i když pro něj existují i jiná vysvětlení (Beszteri et al., 2005).

V případě druhového komplexu *Sellaphora pupula* výsledky fylogenetické analýzy sekvence ITS regionu přesně korelují s výsledky křížících experimentů (Behnke et al., 2004), např. u druhu *Eunotia bilunaris* jsou ve shodě s ultrastrukturními znaky (Vanormelingen et al., 2008).

3.3.1.2. Sekundární struktura ITS-2

Sekvence ITS-2 je celkově méně variabilní, než sekvence ITS-1 (Kaczmarzka et al., 2008), obsahuje však velmi variabilní i konzervativní úseky. Konzervativní úseky jsou důležité pro tvorbu sekundární struktury (Obr. 8). Naopak na koncích smyček (vlásečkové struktury) se nacházejí vysoce informativní úseky s častými insercemi, delecemi a substitucemi (Coleman, 2000).



Obr. 8 Model sekundární struktury ITS-2 pro dva druhy rodu *Pseudo-nitzschia* (Převzato z Amato et al., 2007).

Změny jednotlivých nukleotidů v konzervovaných úsecích ITS-2 jsou vzácné z důvodu zachování párování v sekundární struktuře, ale jejich pravděpodobnost je výrazně vyšší, než pravděpodobnost oboustranných změn (Compensatory Base Change - CBC). Taková změna

vyžaduje změny na dvou od sebe v primární struktuře vzdálených místech splňující požadavky na zachování vodíkových vazeb (Coleman, 2000).

Vzhledem k tomu, že všechny úseky ITS se nevyvíjejí stejně rychle, nelze na evoluční vzdálenost usuzovat čistě z počtu změn v sekvenci, naopak CBCs jsou dobrým měřítkem porovnatelným napříč mnoha skupinami eukaryotických organismů. Mezi organismy tvořícími Z-clade (jejich gamety úspěšně interagují) se nevyskytují žádné CBCs (Coleman, 2000).

Výsledky křížících experimentů u zástupců rodu *Pseudo-nitzschia* dobře korelují s jednotkami vymezenými pomocí ITS-2 (Amato et al., 2007). U druhu *Sellaphora pupula* si Z-clade a CBC také zřejmě odpovídají, ale bude potřeba sestrojít více sekundárních struktur ITS-2 (Behnke et al., 2004).

3.3.1.3. LSU rDNA

LSU je sekvence kódující velkou ribosomální podjednotku, kvůli velké celkové délce sekvence (více než 3000 bp) (Bruder and Medlin, 2007) jsou k fylogenetickým analýzám využívány variabilní domény D1 – D3 (Ellegaard et al., 2008). Délka sekvence se pohybuje mezi 600 a 800 bp (Beszteri et al., 2005; Ellegaard et al., 2008). Je konzervativnější než ITS (Beszteri et al., 2005), v důsledku toho nelze na základě ní v některých případech identifikovat blízké příbuzné druhy. Mezi kmeny se shodnou sekvencí nemusí docházet k úspěšnému křížení (Amato et al., 2007).

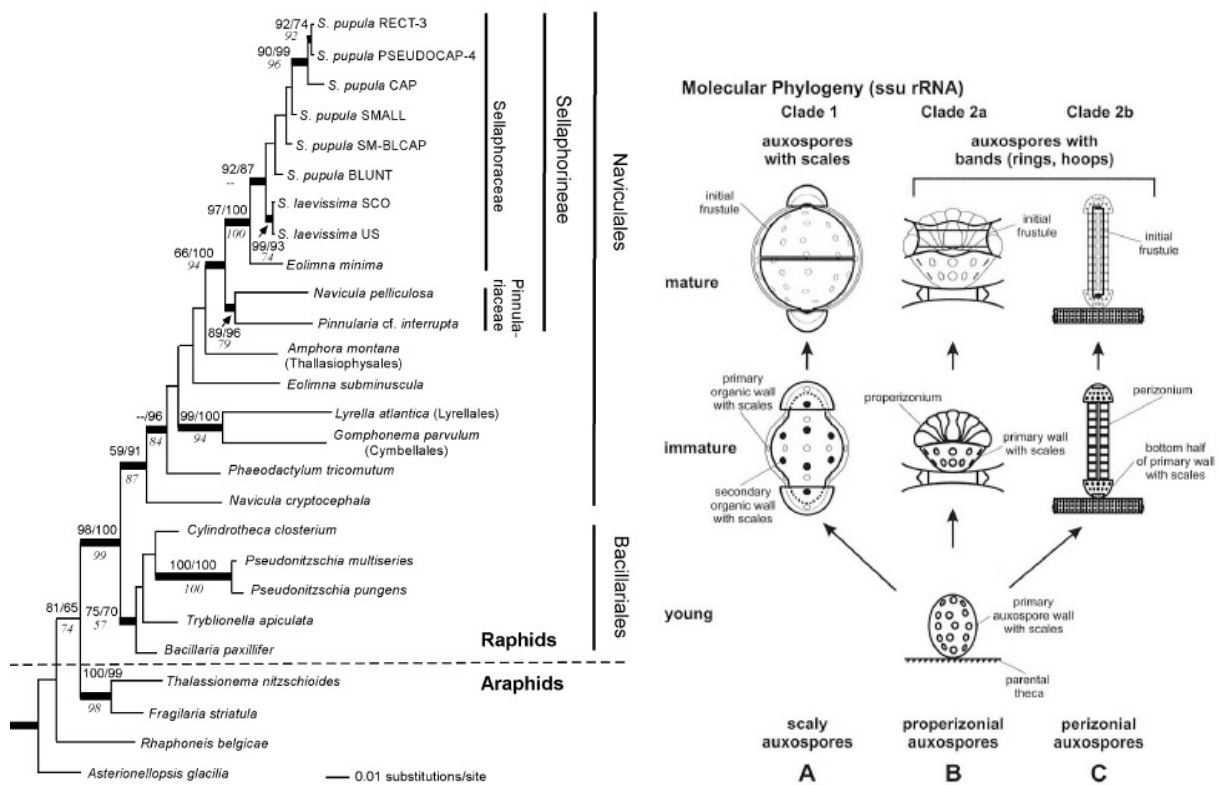
U LSU existuje stejně jako u ITS intragenomická variabilita, i když v mnohem menší míře. Ve studii na druhu *Cyclotella meneghiniana* se sekvence intraklonálně lišili maximálně ve třech z celkového počtu 43 variabilních pozic. V jednom případě se lišili ve 22 pozicích (Beszteri et al., 2005).

Při studiu zástupců druhů *Skeltonema marinoi* a *S. dorhii* byla pozorována stejná sekvence LSU ve 23 z 62 zkoumaných klonů (z různých částí světa), ale naopak byla zjištěna variabilita i mezi buňkami získanými během jednoho odběru. Příčinou heterogenity mohou být odpočívající stádia, která mohou přežívat v sedimentu mnoho let nebo být transportována na velké vzdálenosti z míst s odlišnými podmínkami. Naopak homogenita sekvencí geograficky vzdálených populací může být způsobena dálkovým šířením včetně zavlečení člověkem. Studie odhalila u množství zkoumaných populací souvislost molekulárních a geografických dat (Ellegaard et al., 2008).

3.3.1.4. SSU (18 S) rDNA

18 S rDNA kóduje malou ribosomální podjednotku. Celková délka sekvence je přibližně 1800 bp (Beszteri et al., 2005; Medlin and Kaczmarska, 2004), z čehož více než 60 % pozic je konzervováno v rámci rozsivek a mnoho z nich i v rámci všech eukaryot (Alverson et al., 2006). Sekvence 18 S rDNA se používá většinou pro zařazení rodu v rámci třídy a zjištění, zda je rod monofyletický (Behnke et al., 2004; Beszteri et al., 2005; Evans et al., 2007).

Příkladem může být studie na rodu *Sellaphora*, která prokázala, že rod tvoří monofyletickou linii (Obr. 9), a nejbližším příbuzným druhem se ukázala být *Eolimna minima*. Dalším příbuzným druhem je *Navicula peliculosa*. Také se ukázalo, že rody *Eolimna* a *Navicula* nejsou monofyletické (Behnke et al., 2004). Monofyletičnost rodu *Sellaphora* na základě 18 S rDNA potvrdila později i Evans (Evans et al., 2008), která navíc na základě této sekvence zkoumala i pozici jednotlivých druhů rodu *Sellaphora*. Dalším příkladem využití sekvence 18 S rDNA na druhové úrovni je studie popisující nový rod *Psammeis* zahrnující při druhy (Sato et al., 2008).



Obr. 9 ML (maximum likelihood) fylogenetický strom znázorňuje pozici rodu *Sellaphora* v rámci třídy a potvrzuje, že se jedná o monofyletický rod (Převzato z Behnke et al., 2004).

Obr. 10 Tři typy auxospor odpovídají skupinám vzniklým na základě analýzy sekvencí 16 S a 18 S rDNA (Převzato z Medlin and Kaczmarska, 2004).

Na základě 8600 sekvencí 18 S a 16 S⁴ rDNA bylo změněno tradiční vnitřní uspořádání třídy Bacillariophyceae. Vytvořily se dvě velké skupiny: na jedné straně radiální centrické⁵ a na druhé bipolární centrické společně s penátními (dále se dělí na několik menších). Potvrdilo se, že mnoho tradičně používaných morfologických znaků se objevuje nezávisle v různých skupinách, a naopak byly nalezeny jiné morfologické znaky (Obr. 10, str. 20) lépe odpovídající molekulárním datům (Medlin and Kaczmarska, 2004).

Sekvence 18 S rDNA lze použít i analýzám na vyšší taxonomické úrovni. Např. po objevení *Bolidomonas* a současně i nové třídy Bolydophyceae byla na základě 18 S rDNA tato třída označena za sesterskou skupinu rozsivek. Přítomnost stejných pigmentů v buňkách obou skupin toto zjištění podpořila (Guillou et al., 1999).

Stejně jako v případě ITS je možné k fylogenetickým analýzám využít modely sekundární struktury 18 S rDNA. Ty se dají s úspěchem uplatnit při srovnávání velmi odlišných sekvencí, u kterých již nelze vytvořit spolehlivý alignment na základě prostého pořadí nukleotidů (Alverson et al., 2006), ale lze najít odlišnosti i mezi sekundárními strukturami jednotlivých druhů (Sato et al., 2008).

Kooistra a Medlin (Kooistra and Medlin, 1996) na základě sekvence 18 S rDNA třiceti rozsivek a devíti dalších organismů vypočítali stáří rozsivek. Jejich výpočty odpovídají fosilnímu záznamu a ukazují na vysokou rychlost molekulární evoluce této skupiny organismů. Sorhannus (Sorhannus, 2007) později na základě většího množství sekvencí 18 S rDNA a několika kalibračních bodů s využitím *Bolidomonas* jakou outgroup potvrdil, že původ rozsivek sahá do doby před 183 miliony let a navíc vypočítal další důležité události jako oddělení větve vedoucí k penátním rozsivkám (před 96,5 miliony let) a vznik penátní rozsivek s raphe (před 75 miliony let).

Stejně jakou u výše zmíněných sekvencí ribosomální DNA je potřeba i u 18 S rDNA počítat s intragenomickým polymorfismem, který byl prokázán u několika druhů rodu *Skeletonema* (Alverson and Kolnick, 2005).

3.3.2. Plastidové markery

Využití chloroplastových markerů ve fylogenetických analýzách může komplikovat nedostatečná znalost způsobu jejich dědičnosti. Zatímco u většiny vyšších rostlin chloroplasty pochází z mateřské linie (i když existuje řada výjimek), u rozsivek je situace poměrně složitá.

⁴ Malá podjednotka plastidových ribosomů.

⁵ Radiální centrické rozsivky, jak byly prezentovány v této studii, však nejsou monofyletickou, nýbrž parafyletickou skupinou. Monofyletickou skupinu tvoří pouze penátní rozsivky s raphe (Sorhannus 2004).

Většina centrických rozsivek vykazuje rovněž maternální dědičnost chloroplastů, ale některé centrické a zřejmě všechny penátní předávají chloroplasty do další generace biparentálně. Např. u rodu *Sellaphora* získává zygota jeden plastid od každého rodiče (shrnutí v Ghiron et al., 2008).

Ghiron (Ghiron et al., 2008) zkoumal plastidovou dědičnost u rodu *Pseudo-nitzschia* pomocí haplotypů *rbcL*. Z 96 zkoumaných příslušníků F1 generace neslo 16 dva plastidy paternálního původu, 20 maternální plastidy a zbývajících 60 plastidy obou rodičů. Na základě těchto čísel se nepodařilo rozhodnout, zda dochází k (náhodné) eliminaci dvou ze čtyř plastidů již v zygotě, nebo přetrvávají čtyři plastidy, které jsou rozděleny mezi buňky vznikající při následujícím dělení. Zajímavým zjištěním je ale fakt, že buňky zůstávaly heteroplastidické v laboratorních podmínkách i ve vegetativní fázi. Při odběru přírodních vzorků totiž nebyla žádná taková buňka nalezena (Ghiron et al., 2008).

Pouličková (Poulickova, 2008) pozorovala vznik gamet, auxosporulaci a následné dělení u duhu *Luticola dismutica*, jehož vegetativní buňky obsahují jeden chloroplast. Z každé z nich vznikají 2 gamety obsahující po jednom jádru a jednom plastidu. Auxospora a následně i iniciální buňka obsahují 2 plastidy, které jsou poté rozděleny mezi dceřinné buňky.

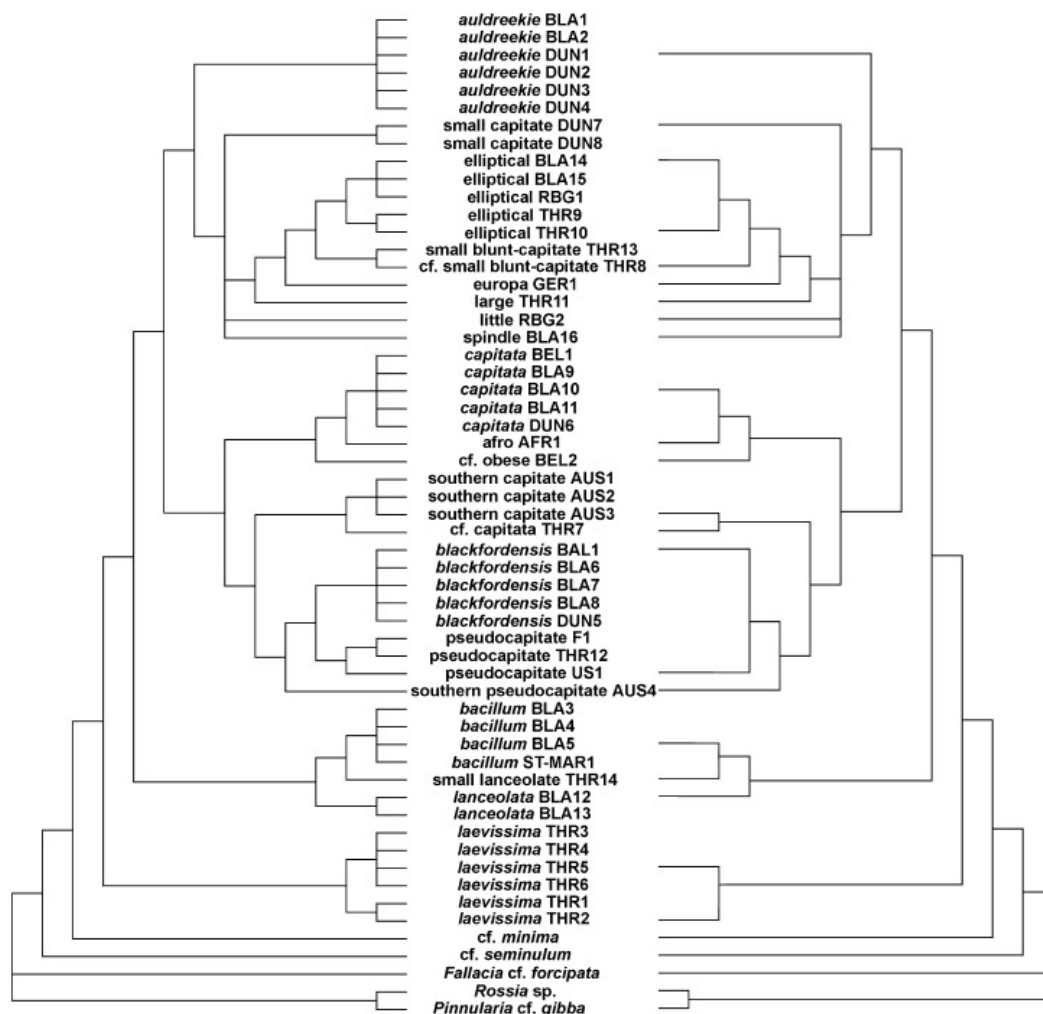
Nespornou výhodou plastidových markerů je minimalizace nebezpečí kontaminace DNA, např. DNA hub (Evans et al., 2007). Plastidový genom obsahuje v normálním případě pouze jednu kopii každého genu (Bruder and Medlin, 2007), což předchází metodickým potížím (např. intragenomický polymorfismus), ale na druhou stranu může být složitější vybraný úsek DNA amplifikovat.

3.3.2.1. *rbcL*

RbcL je protein kódující gen (velká podjednotka RuBisCo - ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa) a neobsahuje inserce/delece, proto je snadné vytvořit alignment získaných sekvencí (Evans et al., 2007). Je poměrně variabilní – v některých případech mohou mít příslušníci stejného biologického druhu rozdílné sekvence *rbcL* (Amato et al., 2007).

Vzhledem k tomu, že se jedná o relativně dlouhou sekvenci (1467 bp (Kim et al., 2006; Cho et al., 2004)), je nutno při sekvenaci celého genu použít vnitřní primery (Amato et al., 2007). Při fylogenetické analýze rodu *Sellaphora* byl sestaven alignment o délce 1399 bp z nichž bylo 252 variabilních (Evans et al., 2007). Výsledky studie na rodu *Gracilaria* (Rodophyta) vypovídají o tom, že je sekvence *rbcL* variabilnější (39,6% variabilních pozic), než sekvence *psbA* (22,7%) (Kim et al., 2006).

Studie zabývající pozicí jednotlivých druhů v rámci rodu *Sellaphora* na základě 18 S rDNA a *rbcL* ukázala téměř absolutní shodu výsledků analýz těchto sekvencí (Obr. 11). V takovém případě může kombinace dat sloužit k získání lépe podpořených výsledků (Evans et al., 2008). Na základě *rbcL* a křížících pokusů se rovněž zjistilo, že druhový komplex *Sellaphora pupula* netvoří monofyletickou skupinu a potvrdilo se, že jednotlivé morfotypy tvoří samostatné druhy. Naopak další druhy zařazené do analýzy (*S. levissima* a *S. bacillum*) jsou monofyletické (Evans et al., 2008).



Obr. 11 Srovnání konsenzuálních stromů vzniklých na základě sekvencí 18 S rDNA a *rbcL*. Analýza sekvence 18 S rDNA nebyla prováděna pro všechny klony (Převzato z Evans et al., 2008).

3.3.2.2. *psaA* a *psbA*

Neexistuje žádná práce využívající sekvence *psaA* a *psbA* při zkoumání fylogeneze u rozsivek, ale Yoonova studie potvrzující příbuznost některých plastidů obrněnek s dnešními haptofytními řasami (Yoon et al., 2002) napovídá tomu, že je možné je k tomuto účelu použít.

Výzkumy prováděné na různých skupinách řas shodně nasvědčují tomu, že *psaA* i *psbA* poskytují data souhlasící s daty získanými na základě sekvence *rbcL* (Kim et al., 2006; Cho et al., 2004) a také na základě ITS a dalších jaderných markerů (Cho et al., 2006).

PsbA je gen pro protein D1 z reakčního centra PSII (Yoon et al., 2002). Jeho sekvence je mnohem kratší než sekvence *rbcL* (*psbA*: 849 bp (Kim et al., 2006), 885 bp (Cho et al., 2004)) což zjednodušuje její PCR amplifikaci i sekvenování.

PsaA je gen pro apoprotein A1 ve PSI (Yoon et al., 2002). Podobně jako *rbcL* má *psaA* poměrně dlouhou sekvenci (1488 bp (Cho et al., 2004)), což vyžaduje použití vnitřních primerů (Cho et al., 2004).

Studie prováděná na jednom z řádů třídy Phaeophyceae ukazuje, že *psaA* je téměř stejně variabilní (44,4% variabilních pozic) jako *rbcL* (46,7%), zatímco *psbA* vykazuje menší variabilitu (34,6%). Sekvence *psbA* navíc obsahuje větší počet informativních pozic než sekvence *rbcL* (Cho et al., 2004). Navzdory poměrně velké variabilitě je snadné vytvořit alignment sekvence *psaA* díky absenci inzercí a delecí (Cho et al., 2006).

Cho považuje za velmi vhodné používat ve fylogenetických analýzách kombinaci dat získaných ze sekvencí *psaA*, *psbA* a *rbcL* (Cho et al., 2004).

3.3.3. Mitochondriální markery

Z více než třiceti kódujících genů v rozsivkovém mitochondriálním genomu byly zatím k fylogenetickým analýzám použity pouze dva: *cox1* (podjednotka I cytochrom oxidázy) a *cob* (cytochrom b) (Alverson, 2008).

Výhodou použití kódujících úseků je snadné vytvoření alignmentu. Řadě metodických problémů navíc brání fakt, že se mitochondriální geny kódující proteiny vyskytují vždy pouze v jedné kopii (Alverson, 2008). Nevýhodou je, že může dojít ke kontaminaci cizí DNA (při studii na rodu *Sellaphora* DNA oomycet a bezobratlých) (Evans et al., 2007).

3.3.3.1. *cox1*

Cox 1 je obvykle variabilnější než *rbcL* (Evans et al., 2007) a méně variabilní než ITS (Kaczmarska et al., 2008). Fylogenetické analýzy na základě této sekvence poskytují výsledky souhlasící s těmi získanými na základě ITS (Kaczmarska et al., 2008). Není známo zda dochází u rozsivek k horizontálnímu přenosu mitochondriálních genů, ale pokud by tomu tak bylo, byla by to velká nevýhoda tohoto markeru (Evans et al., 2007).

Problémy mohou nastat také v případě přítomnosti intronů. U druhu *Thalassiosira nordenskiöldii* byl jejich výskyt prokázán. Z toho ale nelze usuzovat na shodnou situaci

u ostatních rozsivek, protože v mtDNA dalšího druhu zařazeného do stejné studie (*Skeletonema costatum*) tyto introny nalezeny nebyly. Blízce příbuzné druhy jiných haptofytních řas se v jejich výskytu rovněž liší. Fylogeneze těchto intronů neodpovídá fylogenezi zkoumaných organismů, což svědčí o jejich horizontálním přenosu (Ehara et al., 2000b).

Také toho víme velmi málo o evoluci mitochondriálního genomu u rozsivek. Velkou výhodou je naopak jednoduché vytvoření alignmentu díky tomu, že se jedná o kódující gen (Evans et al., 2007).

Při studii rodu *Sellaphora* se podařilo amplifikovat 1100 bp dlouhý úsek DNA. Sekvence pak byla získána z 22 z 23 zkoumaných klonů a ze tří ze sedmi druhů zamýšlených jako outgroup. Použité primery (GazF2 a KedtmR) byly vhodné pro většinu penátních raphidních druhů, některé araphidní, ale ne pro centrické druhy. Při sekvenování musel být použit vnitřní primer. Sekvence *cox1* odhalila více variability, než *rbcL*. Sekvence *cox1* i *rbcL* u *Sellaphora capitata* byla identická u geograficky vzdálených populací, zatímco u *S. levissiana* zřejmě odhalila značnou kryptickou diverzitu (divergence 7,9% u *cox1* a 2,2% u *rbcL*). Byl sestaven alignment 624 bp, z nichž 298 bylo variabilních. Fylogenetické stromy sestavené na základě *cox1* a *rbcL* mají velmi podobnou topologii, ale lépe podpořené jsou většinou výsledky získané na základě sekvencí *rbcL* (Evans et al., 2007).

Ehara použila sekvenci *cox 1* pro fylogenetickou analýzu v rámci celé třídy, do které bylo sice zařazeno jen několik málo druhů, nicméně výsledky byly ve shodě s těmi získanými na základě sekvence 18 S rDNA (Ehara et al., 2000a), která se pro studie tohoto typu obecně využívá. Byl také odhalen pozměněný genetický kód v mtDNA (kodón UGA pro tryptofan namísto stop kodónu) dvou ze zkoumaných druhů, který je znám i u jiných skupin organismů (Ehara et al., 2000a).

Dosavadní výzkumy ukazují, že *cox1* může sloužit jako fylogenetický marker stejně dobře, jako jiné delší a obtížněji získatelné sekvence (Evans et al., 2007; Kaczmarzka et al., 2008).

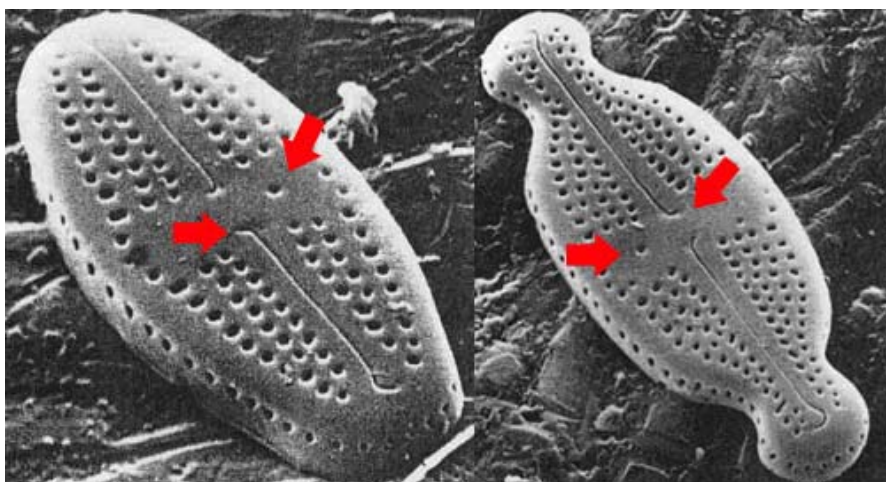
4. PRAKTICKÁ ČÁST

4.1. Úvod

Rod *Luticola* navzdory tomu, že je značně rozšířený a náleží k němu 64 druhů (Catalogue of Diatom Names) popsaných na základě morfolgie, nebyl dosud zkoumán s využitím molekulárních dat. V této práci jsem se zaměřila na molekulární diverzitu patnácti klonů, které mi laskavě poskytla Doc. Aloisie Pouličková.

Testovala jsem možnost využití několika genů (ITS, rbcL, LSU, psaA a psbA), ze kterých jsem si vybrala psbA (gen pro protein D1 z reakčního centra PSII (Yoon et al., 2002)), pro který se mi podařilo optimalizovat metodiku. Tento gen nebyl dosud pro fylogenetické analýzy u rozsivek využíván, ale moje výsledky nasvědčují tomu, že je k tomuto účelu vhodný.

Luticola je sladkovodní, brakický a subaerický rod. Patří mezi penátní rozsivky s raphe. Byl od rodu *Navicula* oddělen v roce 1990 na základě ultrastrukturních znaků na frustule (Round et al., 1990). Mezi morfologické znaky patří především stigma (na sekundární straně) a také středové konce raphe stáčeující se na primární stranu (Obr. 12). Mají pouze jeden chloroplast (na rozdíl od rodu *Navicula*) z pleurálního pohledu ve tvaru H s pyrenoidem na sekundární straně buňky. Naopak jádro je umístěno na primární straně. Tyto a další charakteristiky nasvědčují blízké příbuznosti s rody *Placoneis* a *Dickieia* (Poulickova, 2008).



Obr. 12 Morfologické znaky na schránkách zástupců rodu *Luticola* pozorovaných pomocí SEM. Stigma na sekundární straně valvy, středové konce raphe stáčeující se na primární stranu (Upraveno podle Round et al., 1990).

Výsledky analýzy potvrdily, že zkoumané kultury náleží ke dvěma druhům:

Luticola dismutica: buňky mají kopinatý tvar s mírně paličkovitými konci. Interfázní buňky jsou obvykle pozorovatelné z valvárního pohledu, zatímco dělicí se buňky spíše z pleurálního pohledu. Byly zaznamenány pouze cis-buňky, které mají primární stranu na obou valvách

na stejné straně. U tohoto druhu bylo pozorováno intenzivní homothalické rozmnožování. Křížící pokusy mezi jednotlivými kulturami nebyly prováděny. Vegetativní buňky neprodukují žádný sliz na rozdíl od párujících se buněk a zygot, které jsou obaleny tenkou vrstvou vodnatého slizu (Poulickova, 2008).

Luticola nivalis: byla zaznamenána ve vzorcích z Jeskyní Podkova (Mladeč) a Netopýří (Zbrašov) společně se zástupci rodů *Diademesis*, *Hantzchia*, *Achnantes* a *Orthoseira*. Jedná se o první zaznamenaný výskyt na Moravě za více než 70 let (je známo ze čtyř lokalit z Čech). Po vysetí na agarové plotny tvořily buňky ploché kolonie. Nebylo zaznamenáno žádné sexuální rozmnožování. Z valvárního pohledu je okraj buňky 3x zvlňený. Rozměry vegetativních buněk se pohybovaly v rozmezí 11 – 24 μm (délka) a 6 – 9 μm (šířka), počet strií na 10 μm byl 14 – 20 (Poulickova and Hasler, 2007).

4.2. Materiál a metody

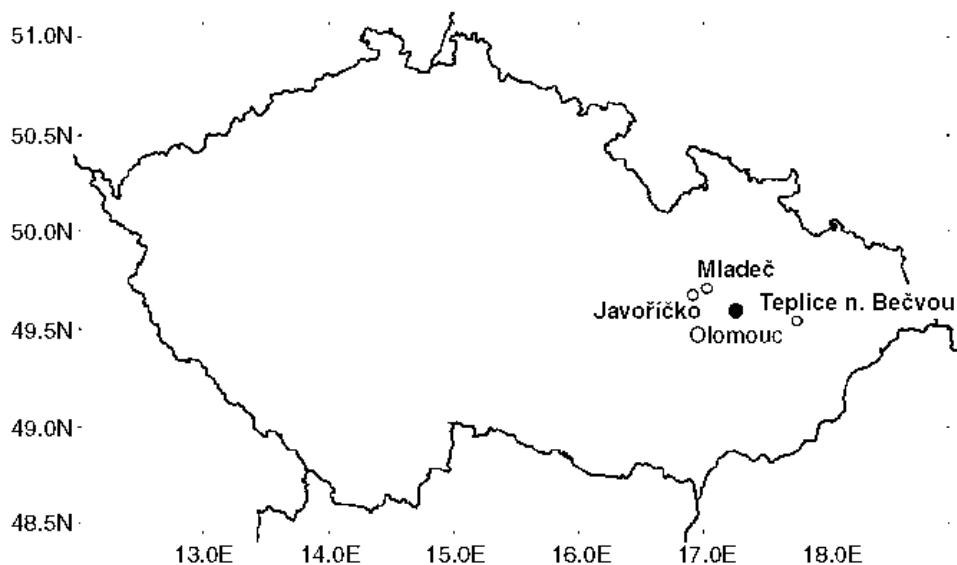
4.2.1. Přehled použitých klonů

K dispozici jsem měla patnáct klonálních kultur, z toho sedm bylo na základě morfologických znaků přiřazeno ke druhu *Luticola dismutica* a pochází z jeskyně Podkova v Mladečském krasu (Olomoucký kraj) (Tab. 1).

Označení kultury	Délka valvy (μm)	Šířka valvy (μm)	Počet strií na 10 μm	Datum odběru
LUT M 45	20 - 23	6 – 7	14 - 18	17. 5. 2006
LUT M 47	13 - 20	5,5 – 6	14 - 18	17. 5. 2006
LUT M 48	15 - 18	6 - 6,5	16 - 18	17. 5. 2006
LUT M 52	20 - 22	6 – 7	16 - 20	29. 6. 2006
LUT M 53	20 - 23	6 - 6,5	16 - 18	29. 6. 2006
LUT M 67	13 - 15	5 - 6,5	13 - 20	29. 6. 2006
LUT M 71	21 - 25	6 – 8	14 - 20	29. 6. 2006

Tab. 1 Klony *Luticola dismutica* (Upraveno podle Poulickova, 2008).

Další kultury s označením LUT 31, LUT 36, LUT 59, LUT 69, LUT 70, LUT 87, LUT 89 a LUT 95 pocházejí z Jeskynních systémů Mladeč a Zbrašov (Obr. 13, str. 28). V těchto lokalitách bylo nalezeno několik druhů rodu *Luticola* (Poulickova and Hasler, 2007).



Obr. 13 Plánek zkoumaných jeskynních systémů. Zástupci rodu *Luticola* byli nalezeni v jeskynních systémech Mladeč a Zbrašov (Teplice nad Bečvou), v jeskynním systému Javoříčko nalezeni nebyli (Převzato z Poulickova and Hasler, 2007).

4.3.1. Sběr a kultivace

V této práci jsem používala klonální kultury, které mi laskavě poskytla Doc. Aloisie Pouličková. Vzorky byly odebírány pomocí skalpelu ze stěn vápencových jeskyní a následně vysety na agarové plotny (Poulickova and Hasler, 2007). Kolonie z agaru byly přeneseny do tekutého média.

Kultury bylo nutno namnožit na požadované množství buněk. To jsem prováděla v Petriho miskách o průměru 50 mm při teplotě 15°C v modifikovaném médiu DY IV (<http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media.html#DY4>) pH = 7,5.

4.3.2. PCR a sekvenování

Ze dna misek, ve kterých byly kultury kultivovány, jsem odebrala asi 1 ml média s buňkami. Tyto buňky jsem rozdrtila pomocí skleněných kuliček a vzniklou směs používala do PCR reakční směsi namísto vyizolované DNA (2 µl na 20 µl reakční směsi). PCR (polymerase chain reaction) jsem prováděla na cykleru PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf).

Pro amplifikaci úseku psbA jsem používala primery psbA 500F a psbA R1 (Yoon et al., 2002) a cyklus, který jsem optimalizovala na základě gradientového pokusu:

- iničiální denaturace 94°C 2 minuty
- 35 cyklů 94°C 50s, 54°C 50s, 72°C 2m
- závěrečná elongace 72°C 10 minut

Přítomnost amplifikované DNA v PCR produktu jsem ověřovala pomocí elektroforézy na 1% agarosovém gelu s obsahem etidumbromidu. PCR produkty, které obsahovaly fragmenty DNA o předpokládané délce (v porovnání s proužky O'Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus) jsem přečistila pomocí PCR Product Purification Spin Kit (Jet Quick) dle instrukcí výrobce. Koncentraci DNA jsem měřila pomocí přístroje NanoDrop 1000.

Sekvenování prováděla firma Macrogen pomocí stejných primerů, jaké byly použity pro PCR.

4.3.3. Zpracování dat

Získané sekvence jsem manuálně upravila v programu SeqAssem (Hepplerle D., 2004) a následně vytvořila alignment pomocí programu MEGA verze 4.0 (Tamura et al., 2007). Na základě něj jsem sestavila neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987) fylogenetický strom.

4.3.4. Pozorování buněk

Nejprve jsem pozorovala živé buňky (Obr. 15), které jsem spolu s médiem Pasteurovou pipetou odebrala ze dna misek pomocí mikroskopu Olympus CX31 při zvětšení 1000x s použitím imerzního oleje.

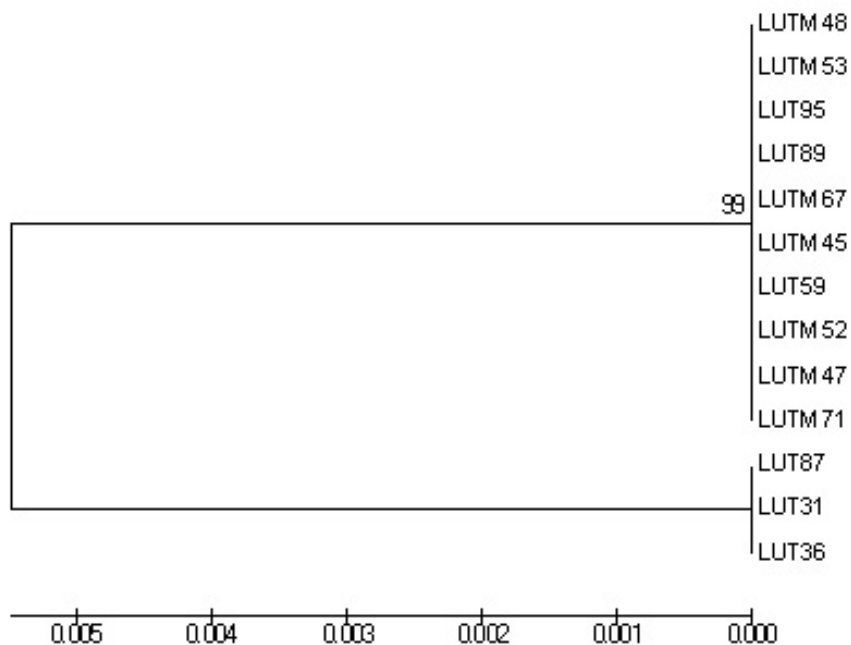
Následně jsem připravila trvalý preparát. Na krycím sklíčku jsem zahříváním nad kahanem odstranila organické části buněk a vysušila veškerou tekutinu. Ověřila jsem, zda není v preparátu příliš mnoho buněk (aby se nepřekrývaly) při zvětšení 400x. Na podložní sklíčko jsem natřela zalévací médium Naphrax a přiložila krycí sklíčko s vysušenými schránkami. Takto jsem preparát zahřívala, dokud se neroztavilo zalévací médium. Po vychlazení jsem při zvětšení 1000x s použitím imerzního oleje pozorovala vyčištěné schránky.

Živé buňky i schránky v trvalém preparátu (Obr. 16, str. 31) jsem fotografovala na mikroskopu Olympus BX51 digitálním fotoaparátem Olympus E30 při zvětšení 1000x.

4.4. Výsledky a diskuse

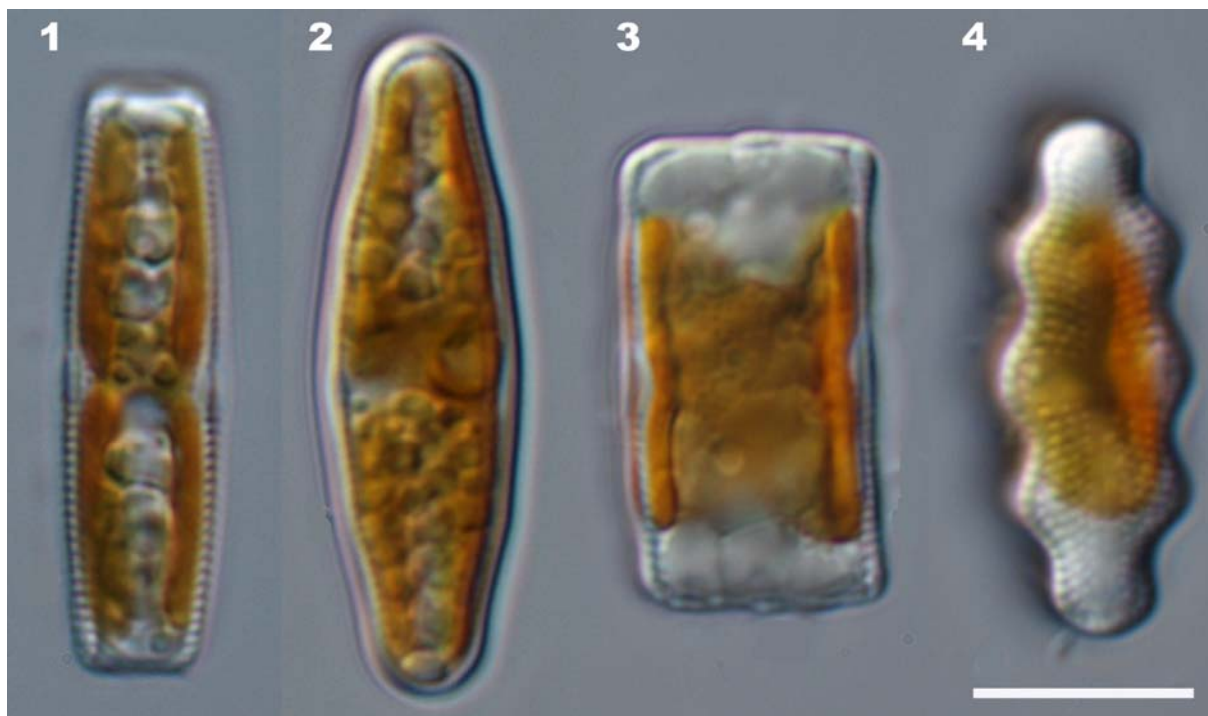
Podařilo se mi získat sekvence ze třinácti z celkového počtu patnácti zkoumaných klonů. Sekvence klonu LUT 69 nebyla jednoznačně čitelná a PCR produkt klonu LUT 70 nevykazoval přítomnost příslušných fragmentů DNA.

Ze zbývajících třinácti sekvencí jsem sestavila alignment o délce 464 bp (okraje, na kterých nebyly některé sekvence jednoznačně čitelné, byly ořezány). Variabilních bylo celkem pět pozic, z toho 4 byly na třetí a jedna na druhé pozici kodónu.



Obr. 14 Neighbour-joining fylogenetický strom vytvořený na základě sekvencí psbA.

Neighbour-joining strom sestavený na základě tohoto alignmentu jasně vymezuje dvě skupiny s bootstrapovou podporou 99 % (Obr. 14). Do jedné z nich náleží všechny kmeny předem morfologicky zařazené do druhu *Luticola dismutica* společně s třemi dalšími (LUT 95, LUT 89 a LUT 59), které morfologii tohoto druhu rovněž odpovídají (Obr. 15.1, 15.2.). Druhou skupinu tvoří klony LUT 87, LUT 31 a LUT 36 morfologicky náležící do druhu *Luticola nivalis* (Obr. 15.3., 15.4.).



Obr. 15 1: klon LUT 89 – pleurální pohled, 2: klon LUT 89 – valvární pohled, 3: klon LUT 36 – pleurální pohled, 4: klon LUT 36 – valvární pohled. Živé buňky pozorované při zvětšení 1000x. Úsečka označuje 10 μ m.



Obr. 16 1: klon LUT 31, 2: klon LUT 36, 3: klon LUT 59, 4: klon LUT M 71, 6: klon LUT M 45. Schránky v trvalém preparátu při zvětšení 1000x. Úsečka označuje 10 μm .

5. ZÁVĚR

V současné době je kryptická nebo pseudokryptická diverzita odhalována v mnoha tradičně uznávaných rodech a druzích rozsivek. Důraz je kladen na biologické pojetí druhu, a proto se velmi často provádějí křížící experimenty. Jejich nevýhodou je, že tato data lze v některých případech získat jen se značnými obtížemi, nebo to není možné vůbec. Dalším nebezpečím je možnost chybné interpretace, protože reprodukční bariéry nemusejí být vždy dokonalé (Vanormelingen et al., 2008).

Nadále se neupouští od morfologických znaků, ale jsou téměř vždy zkoumány v kombinaci s molekulárními daty. Některé morfologické znaky odlišující pseudo- nebo semikryptické druhy jsou nalezeny až na základě výsledků molekulárních dat (Behnke et al., 2004). Existuje snaha nalézt pro různé skupiny rozsivek znaky, které jsou s těmito daty ve shodě (Medlin and Kaczmarek, 2004). Morfologická data jsou nepostradatelná jak pro zařazení fosilních rozsivek, tak při běžném určování přírodních vzorků.

Různé úseky sekvence jaderné rDNA (LSU, SSU, ITS) jsou nejčastěji využívanými molekulárními markery nejen u rozsivek. Právě existence rozsáhlé databáze těchto sekvencí je jednou z jejich výhod, ke kterým patří i to, že se vyskytují v genomu v mnoha kopiích, což usnadňuje jejich amplifikaci (Alverson, 2008). Zvláště v případě ITS je ale velmi často pozorován intragenomický polymorfismus, což způsobuje značné metodické potíže. Variabilita v rámci jednoho organismu navíc může převýšit variabilitu mezi různými populacemi (Evans and Mann, 2009).

ITS je mezi těmito sekvencemi nejvariabilnější, a tak se nejčastěji používá pro rozlišení druhů, či dokonce na úrovni populací (Evans and Mann, 2009), následuje sekvence LSU rDNA, ze které jsou k fylogenetickým analýzám využívány variabilní domény D1 – D3 (Ellegaard et al., 2008) a nejvíce konzervovaná je sekvence 18 S rDNA, která nejčastěji slouží k zařazení druhu v rámci třídy (např. Behnke et al., 2004). Pro odlišení biologických druhů se osvědčily modely sekundární struktury ITS-2 (Amato et al., 2007), které na rozdíl od prosté sekvence zohledňují fakt, že její jednotlivé části se vyvíjejí různou rychlostí (vykazují odlišnou míru variability) (Coleman, 2000).

Mezi plastidovými markery jsem se zabývala pouze kódujícími sekvencemi *rbcL*, která je nejčastěji využívaným plastidovým markerem ve studiích, se kterými jsem se setkala, a *psaA* a *psbA*, které naopak pro studium fylogeneze u rozsivek dosud nebyly použity. Sekvence *psaA* je přibližně stejně variabilní, jako *rbcL*, zatímco *psbA* vykazuje o něco menší variabilitu

(Cho et al., 2004). Velkou výhodou plastidových markerů je minimalizace nebezpečí kontaminace DNA (Evans et al., 2007). Plastidový genom obsahuje v normálním případě pouze jednu kopii každého genu (Bruder and Medlin, 2007), což může přinášet z metodického hlediska výhody i nevýhody. Komplikace může přinášet také nedostatečná znalost dědičnosti plastidů u rozsivek (Ghiron et al., 2008).

Poslední skupinou molekulárních dat, které jsem zařadila do této práce, jsou sekvence mtDNA, především *cox1*. Jeho výhody plynou především ze skutečnosti, že se jedná o kódující sekvenci a vyskytuje se v genomu pouze v jedné kopii (Alverson, 2008). Navíc jsou jeho primery poměrně univerzální, lze použít stejné téměř u všech penátních rozsivek (Evans et al., 2007). Problémy mohou nastat, pokud by se zjistilo, že u rozsivek dochází k horizontálnímu přenosu mitochondriálních genů (Evans et al., 2007), nebo ve skupinách, kde se vyskytují introny (Ehara et al., 2000b). Běžnou komplikací je kontaminace cizí DNA (Evans et al., 2007). *Cox1* je obvykle variabilnější než *rbcL* (Evans et al., 2007) a méně variabilní než ITS (Kaczmarska et al., 2008).

Různé molekulární markery mohou poskytovat protichůdné výsledky. Zvláště to platí při současném využití jaderných a organelových markerů. Příkladem může být studie zabývající se pozicí rodu *Attheya* v rámci třídy na základě sekvencí 18 S rDNA, 16 S rDNA a *rbcL* (Rampen et al., 2009) nebo studie zaměřená na rod *Placoneis* a další naviculoidní rozsivky využívající sekvence 18 S rDNA, LSU rDNA a *rbcL* (Bruder and Medlin, 2007). Naopak téměř v absolutní shodě jsou výsledky získané na základě sekvencí 18 S rDNA a *rbcL* u druhů rodu *Sellaphora* (Evans et al., 2008).

Vhodné je tedy kombinovat několik molekulárních markerů současně. Pokud budou tato data ve shodě, můžeme dosáhnout statisticky lépe podpořených výsledků. Zároveň je důležité zvolit sekvenci se správnou měrou variability vzhledem k tomu, jak taxonomicky vzdálené organismy zkoumáme. Použitím málo variabilní sekvence nezískáme dostatečně silný fylogenetický signál, zatímco věrohodnost výsledků založených na příliš variabilní bude ohrožena saturačním efektem (Bruder and Medlin, 2007).

Na teoretickou i praktickou část této práce hodlám navázat ve své diplomové práci, v rámci níž bych chtěla zabývat molekulární diverzitou rodu *Luticola*, odhalit případnou kryptickou diverzitu a dát ji do souvislosti s ekologickými podmínkami na stanovišti. Pro tyto účely pravděpodobně využiji sekvence *psbA* a LSU rDNA. Také bych chtěla určit pozici rodu *Luticola* v rámci třídy Bacillariophyceae na základě sekvence 18 S rDNA.

POUŽITÁ LITERATURA

- Alverson, A., 2008, Molecular systematics and the diatom species: *PROTIST*, v. 159, p. 339-353.
- Alverson, A., J. Cannone, R. Gutell, and E. Theriot, 2006, The evolution of elongate shape in diatoms: *Journal of Phycology*, v. 42, p. 655-668.
- Alverson, A., and L. Kolnick, 2005, Intragenomic nucleotide polymorphism among small subunit (18s) rDNA paralogs in the diatom genus *Skeletonema* (Bacillariophyta): *Journal of Phycology*, v. 41, p. 1248-1257.
- Amato, A., W. Kooistra, J. Ghiron, D. Mann, T. Proschold, and M. Montresor, 2007, Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms: *Protist*, v. 158, p. 193-207.
- Armbrust, E., J. Berges, C. Bowler, B. Green, D. Martinez, N. Putnam, S. Zhou, A. Allen, K. Apt, M. Bechner, M. Brzezinski, B. Chaal, A. Chiovitti, A. Davis, M. Demarest, J. Detter, T. Glavina, D. Goodstein, M. Hadi, U. Hellsten, M. Hildebrand, B. Jenkins, J. Jurka, V. Kapitonov, N. Kroger, W. Lau, T. Lane, F. Larimer, J. Lippmeier, S. Lucas, M. Medina, A. Montsant, M. Obornik, M. Parker, B. Palenik, G. Pazour, P. Richardson, T. Rynearson, M. Saito, D. Schwartz, K. Thamatrakoln, K. Valentin, A. Vardi, F. Wilkerson, and D. Rokhsar, 2004, The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism: *SCIENCE*, v. 306, p. 79-86.
- Behnke, A., T. Friedl, V. Chepurinov, and D. Mann, 2004, Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta): *Journal of Phycology*, v. 40, p. 193-208.
- Beszteri, B., E. Acs, and L. K. Medlin, 2005, Ribosomal DNA sequence variation among sympatric strains of the *Cyclotella meneghiniana* complex (Bacillariophyceae) reveals cryptic diversity: *Protist*, v. 156, p. 317-333.
- Bowler, C., A. E. Allen, J. H. Badger, J. Grimwood, K. Jabbari, A. Kuo, U. Maheswari, C. Martens, F. Maumus, R. P. Otillar, E. Rayko, A. Salamov, K. Vandepoele, B. Beszteri, A. Gruber, M. Heijde, M. Katinka, T. Mock, K. Valentin, F. Verret, J. A. Berges, C. Brownlee, J. P. Cadoret, A. Chiovitti, C. J. Choi, S. Coesel, A. De Martino, J. C. Detter, C. Durkin, A. Falciatore, J. Fournet, M. Haruta, M. J. J. Huysman, B. D. Jenkins, K. Jiroutova, R. E. Jorgensen, Y. Joubert, A. Kaplan, N. Kroger, P. G. Kroth, J. La Roche, E. Lindquist, M. Lommer, V. Martin-Jezequel, P. J. Lopez, S. Lucas, M. Mangogna, K. McGinnis, L. K. Medlin, A. Montsant, M. P. Oudot-Le Secq, C. Napoli, M. Obornik, M. S. Parker, J. L. Petit, B. M. Porcel, N. Poulsen, M. Robison, L. Rychlewski, T. A. Rynearson, J. Schmutz, H. Shapiro, M. Siaut, M. Stanley, M. R. Sussman, A. R. Taylor, A. Vardi, P. von Dassow, W. Vyverman, A. Willis, L. S. Wyrwicz, D. S. Rokhsar, J. Weissenbach, E. V. Armbrust, B. R. Green, Y. Van De Peer, and I. V. Grigoriev, 2008, The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes: *Nature*, v. 456, p. 239-244.
- Bruder, K., and L. K. Medlin, 2007, Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in the naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*: *Nova Hedwigia*, v. 85, p. 331-352.
- Catalogue of Diatom Names, California Academy of Sciences, On-line Version updated 02 Jul 2009. Compiled by Elisabeth Fourtanier & J. Patrick Kociolek. Available online at <http://research.calacademy.org/research/diatoms/names/index.asp>
- Cho, G., S. Lee, and S. Boo, 2004, A new brown algal order, Ishigeales (Phaeophyceae), established on the basis of plastid protein-coding *rbcL*, *psaA*, and *psbA* region comparisons: *Journal of Phycology*, v. 40, p. 921-936.

- Cho, G., F. Rousseau, B. De Reviere, and S. Boo, 2006, Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) assessed by the photosystem I coding *psaA* sequences: *Phycologia*, v. 45, p. 512-519.
- Coleman, A. W., 2000, The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence: *Protist*, v. 151, p. 1-9.
- Coleman, A. W., A. Suarez, and L. J. Goff, 1994, Molecular delineation of species and syngens in volvocacean green-algae (Chlorophyta): *Journal of Phycology*, v. 30, p. 80-90.
- Edgar, S. M., and E. C. Theriot, 2004, Phylogeny of Aulacoseira (Bacillariophyta) based on molecules and morphology: *Journal of Phycology*, v. 40, p. 772-788.
- Ehara, M., Y. Inagaki, K. Watanabe, and T. Ohama, 2000a, Phylogenetic analysis of diatom *coxI* genes and implications of a fluctuating GC content on mitochondrial genetic code evolution: *Current Genetics*, v. 37, p. 29-33.
- Ehara, M., K. Watanabe, and T. Ohama, 2000b, Distribution of cognates of group II introns detected in mitochondrial *coxI* genes of a diatom and a haptophyte: *Gene*, v. 256, p. 157-167.
- Ellegaard, M., A. Godhe, K. Harnstrom, and M. McQuoid, 2008, The species concept in a marine diatom: LSU rDNA-based phylogenetic differentiation in *Skeletonema marianoii/dohrnii* (Bacillariophyceae) is not reflected in morphology (vol 47, pg 156, 2008): *Phycologia*, v. 47, p. 334-334.
- Evans, K., and D. Mann, 2009, A proposed protocol for nomenclaturally effective DNA barcoding of microalgae: *Phycologia*, v. 48, p. 70-74.
- Evans, K., A. Wortley, and D. Mann, 2007, An assessment of potential diatom "barcode" genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta): *Protist*, v. 158, p. 349-364.
- Evans, K., A. Wortley, G. Simpson, V. Chepurinov, and D. Mann, 2008, A molecular systematic approach to explore diversity within the *Sellaphora pupula* species complex (bacillariophyta): *Journal of Phycology*, v. 44, p. 215-231.
- Ghiron, J., A. Amato, M. Montresor, and W. Kooistra, 2008, Plastid inheritance in the planktonic raphid pennate diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae): *PROTIST*, v. 159, p. 91-98.
- Guillou, L., M. Chretiennot-Dinet, L. Medlin, H. Claustre, S. Loiseaux-de Goer, and D. Vaultot, 1999, *Bolidomonas*: A new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta): *Journal of Phycology*, v. 35, p. 368-381.
- Hepplerle D., 2004, SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualisation tool for molecular sequences.
- Kaczmarek, I., C. Reid, J. L. Martin, and M. B. J. Moniz, 2008, Morphological, biological, and molecular characteristics of the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* from the Canadian Maritimes: *Botany-Botanique*, v. 86, p. 763-772.
- Kalina, T., 2005, *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*: Praha, Karolinum.
- Kim, M., E. Yang, and S. Boo, 2006, Taxonomy and phylogeny of flattened species of *Gracilaria* (Gracilariceae, Rhodophyta) from Korea based on morphology and protein-coding plastid *rbcL* and *psbA* sequences: *Phycologia*, v. 45, p. 520-528.
- Kooistra, W., and L. Medlin, 1996, Evolution of the diatoms (Bacillariophyta) .4. Reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 6, p. 391-407.
- Mann, D., 1999, The species concept in diatoms: *Phycologia*, v. 38, p. 437-495.
- Mayr, E., 1970, *Population, Species, and Evolution: An Abridgment of Animal species and evolution*, Harvard University Press.

- Medlin, L. K., and I. Kaczmarska, 2004, Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision: *Phycologia*, v. 43, p. 245-270.
- Poulickova, A., 2008, Morphology, cytology and sexual reproduction in the aerophytic cave diatom *Luticola dismutica* (Bacillariophyceae): *Preslia*, v. 80, p. 87-99.
- Poulickova, A., and P. Hasler, 2007, Aerophytic diatoms from caves in central Moravia (Czech Republic): *Preslia*, v. 79, p. 185-204.
- Rampen, S., S. Schouten, F. Panoto, M. Brink, R. Andersen, G. Muyzer, B. Abbas, and J. Damste, 2009, Phylogenetic position of *Attheya longicornis* and *Attheya septentrionalis* (Bacillariophyta): *Journal of Phycology*, V. 45, P. 444-453.
- Round, F.E. and Crawford, R.M. & Mann, D.G., 1990, *The Diatoms. Biology & Morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge, 747 pp.
- Saitou, N., And M. Nei, 1987, The Neighbor-joining method - A New method for reconstructing phylogenetic trees: *Molecular Biology and Evolution*, V. 4, P. 406-425.
- Sato, S., W. Kooistra, T. Watanabe, S. Matsumoto, and L. Medlin, 2008, A new araphid diatom genus *Psammoneis* gen. nov (Plagiogrammaceae, Bacillariophyta) with three new species based on SSU and LSU rDNA sequence data and morphology: *Phycologia*, v. 47, p. 510-528.
- Sorhannus, U., 2004, Diatom phylogenetics inferred based on direct optimization of nuclear-encoded SSU rRNA sequences: *Cladistics-The International Journal of The Willi Hennig Society*, v. 20, p. 487-497.
- Sorhannus, U., 2007, A nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNA timescale for diatom evolution: *Marine Micropaleontology*, v. 65, p. 1-12.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S., 2007, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)
- Van De Vijver, B., and G. Mataloni, 2008, New and interesting species in the genus *Luticola* D.G. Mann (Bacillariophyta) from Deception Island (South Shetland Islands): *Phycologia*, v. 47, p. 451-467.
- Vanormelingen, P., V. Chepurinov, D. Mann, K. Sabbe, and W. Vyverman, 2008, Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyta): *Protist*, v. 159, p. 73-90.
- Vardi, A., K. Thamatrakoln, K. D. Bidle, and P. G. Falkowski, 2008, Diatom genomes come of age: *Genome Biology*, v. 9.
- Yoon, H., J. Hackett, and D. Bhattacharya, 2002, A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis: *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, v. 99, p. 11724-11729.