

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Pavla Slámová

**Kryptická diverzita u sladkovodní řasy *Synura sphagnicola*
(Chrysophyceae, Stramenopiles)**

Cryptic diversity of freshwater alga *Synura sphagnicola* (Chrysophyceae,
Stramenopiles)

Diplomová práce

Školitel:
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, 30. 4. 2014

..... Pavla Slámová

Poděkování

Děkuji všem kolegům algologického pracoviště za příjemnou, přátelskou atmosféru. Poděkování patří zejména mému školiteli Pavlovi Škaloudovi za naučení a vysvětlení metod využitých v práci a za rady a připomínky během celého studia. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům, obzvlášť Jirkovi Doskočilovi, za podporu a pomoc při tvorbě práce.

Abstrakt

Synura sphagnicola se vyskytuje v oligotrofních mírně kyselých sladkých vodách. V rámci tohoto nominálně definovaného druhu nebyla zaznamenána přítomnost kryptické diverzity. Známé sekvence SSU rDNA vykazují jen velmi malé rozdíly. Předpokládala jsem ale, že pokud vnitrodruhová kryptická diverzita existuje, variabilita by se projevila ve struktuře ITS regionu.

Získala jsem 36 sekvencí ITS regionu *S. sphagnicola* z Evropy a 1 z Koreje. V rámci tohoto úseku jsem zaznamenala rozdíly signalizující jasné rozdělení izolátů do dvou druhů (pracovně označených jako SP1 a SP2). Morfologické analýzy 14 kultivovaných kmenů (6 z linie SP1 a 8 z linie SP2) potvrdily rozdělení na základě genetických rozdílů. Prokázaly se signifikantní rozdíly mezi 4 měřenými morfologickými znaky (délka šupiny, šířka šupiny, délka ostnu, délka rimu). Nejznatelnější rozdíly jsou mezi délkami ostnu, který je připevněn k šupině. Analýza šupin převzatých z publikací potvrdila, že dva druhy je možné rozlišit i v přírodních podmínkách.

Dle analýzy náčrtků k popisu druhu *S. sphagnicola* jsem zjistila, že se jedná o druh SP2 (druh, který má delší ostny). Druh označovaný jako SP1 je pravděpodobně ještě nepopsaným druhem.

Přestože oba se oba druhy mohou vyskytovat v jednom habitatu, analýza ekologických podmínek lokalit, odkud byly pořízeny ukázala, že se jejich podmínky mírně liší. Druh SP2 se vyskytuje spíše v nižší konduktivitě, zatímco druh SP1 je schopen obývat prostředí s širším rozmezím konduktivity. Konduktivita je pravděpodobně spojena s množstvím srážek. Druh SP2 se vyskytuje v deštivějších oblastech.

Klíčová slova: *Synura sphagnicola*, kryptické druhy, skrytá diverzita, morfologie, šupina, Chrysophyceae

Abstract

A common alga of oligotrophic slightly acidic fresh water habitats, *Synura sphagnicola*, has never been suspected for a presence of cryptic diversity. The publicly available SSU rDNA sequences showed very slight genetic differences between the *S. sphagnicola* isolates. However, I suspected that if any cryptic lineages exist, the sequencing of ITS region will show the differences between them.

A total of 37 *S. sphagnicola* sequences (36 from Europe and 1 from Korea) were analyzed in this thesis. The ITS rDNA sequencing clearly recognized the presence of two distinct cryptic species, referred here as lineage SP1 and SP2. The morphological analysis of 14 cultivated strains (6 belonging to the lineage SP1 and 8 to the lineage SP2) validated the genetic distinction. The statistical analyses showed that 4 morphological aspects (length of a scale, width of a scale, length of a spine, length of a rim) were found to have significant differences in length of measured factors between species. The most visible difference is in the length of a spine that is connected to the scale. The analysis of published *S. sphagnicola* scales showed that the two lineages can be morphologically distinguished also in natural conditions. According to the morphological analyses, the lineage SP2 (species with a longer spine) corresponds with the description of *S. sphagnicola*. The SP1 lineage probably represents yet unsubscribed species.

Despite the species can co-occur in nature, analysis of ecological data showed that their optima of some environmental conditions slightly differ. Whereas the species SP2 prefers low conductivity, the species SP1 occurs in a wider range of conductivity. The conductivity is probably connected with the amount of precipitation, since the species SP2 occurs in more rainy regions.

Key words: *Synura sphagnicola*, cryptic species, hidden diversity, morphology, scale, Chrysophyceae

Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1	Diverzita a rozšíření protist.....	1
1.2	Skrytá diverzita- genetické a morfologické rozdíly na příkladu protistních řas.....	4
1.3	Druhový koncept řas produkujících pevné struktury	6
1.4	Křemičité šupiny	7
1.5	<i>Synura sphagnicola</i>	8
1.6	Cíle práce	11
2.	Materiál a metody	12
2.1	Izolace a kultivace	12
2.2	Analýza DNA.....	14
2.2.1	PCR amplifikace a sekvenace ITS rDNA úseku	14
2.2.2	Zpracování sekvencí	14
2.3	Morfologická analýza	15
2.3.1	Příprava vzorků pro TEM	15
2.3.2	Měření šupin.....	15
2.4	Statistické zpracování dat	16
2.4.1	Kultury	17
2.4.2	Data dohledaná v člancích.....	18
2.4.3	Analýza podmínek prostředí	19
3.	Výsledky.....	20
3.1	Charakteristika kultivovaných kmenů	20
3.1.1	Fylogenetická analýza.....	20
3.1.2	Charakteristika odběrových míst kultivovaných kmenů.....	21
3.1.3	Morfologická analýza kultivovaných kmenů	22
3.2	Testování závislosti morfologických vlastností kultivovaných kmenů na podmínkách prostředí.....	27
3.3	Rozdíly v parametrech prostředí získaných sekvencí.....	29
3.4	Analýza šupin získaných z publikací.....	32
3.5	Zjištění, do které z linií patří popsáný druh <i>S. sphagnicola</i>	40
3.6	Zařazení <i>Synura bioretii</i>	40
4.	Diskuze	42
4.1	Rozlišení dvou kryptických druhů <i>Synura sphagnicola</i>	42

4.2	Podpora molekulárních dat zjištěnou morfologickou variabilitou kultivovaných kmenů.....	43
4.3	Vliv podmínek prostředí na morfologii šupin.....	44
4.4	Rozdíly ekologických nároků mezi druhy.....	44
4.4.1	Důvod přítomnosti delších ostnů v prostředí s nižší konduktivitou.....	45
4.4.2	Kompetice druhu SP1 a SP2.....	46
4.5	Analýza převzatých šupin.....	47
4.5.1	Určení druhů převzatých šupin.....	48
4.5.2	Porovnání ekologických nároků všech získaných <i>S. sphagnicola</i>	48
4.5.3	Možné důvody nesrovnalostí mezi výstupy porovnání ekologických rozmezí druhů při analýze kultur a sekvencí vs. převzatých šupin.....	48
4.6	Která z linií je původní <i>S. sphagnicola</i> ?.....	49
4.7	<i>Synura bioretii</i>	49
4.8	Rozdílná množství kryptických druhů.....	50
4.9	Schopnost šíření rozlišených druhů.....	51
5.	Závěr.....	52
6.	Seznam literatury:.....	53
7.	Přílohy.....	63

1. Úvod

Biodiverzita a geografie protist je neznámá. Dříve byly druhy rozpoznávané převážně na základě morfologických metod. Nepředpokládalo se, že množství protist bude tak velké, jako dnes předkládají environmentální studie. Křížící experimenty a molekulární studie ukazují, že druhy definované morfologickými přístupy, velmi podhodnocují skutečnou protistní diverzitu (Pawlowski et al. 2012, Stoeck et al. 2010). Metodami environmentálního sekvenování je v dnešní době odhalováno obrovské množství druhů. V současnosti ale neexistuje jednotný druhový koncept, který by mohl být aplikován na všechny skupiny protist (Pawlowski et al. 2012).

1.1 Diverzita a rozšíření protist

V otázce rozmanitosti a druhové bohatosti protist se střetají dvě odlišné hypotézy. Ty úzce souvisí s názory o rozšíření protist. Zatímco první hypotéza předpokládá, ve srovnání s makroskopickými organismy, jen velmi malou diverzitu, druhá považuje dosud známé množství druhů za výrazně podhodnocené.

Zastánci nízké protistní diverzity vychází z teorie ubikvitního rozšíření protistních organismů. Ubikvitní teorie předpokládá, že pokud budeme dostatečně dlouho studovat diverzitu určité skupiny mikroorganismů (o velikosti do 1 mm), byť na jediném místě, můžeme časem objevit téměř všechny popsané druhy (Finlay a Clarke 1999). Finlay a Clarke (1999) po 700 hodinách hledání skutečně našli 78 % všech známých druhů rodu *Paraphysomonas* v 1 cm² sedimentu sladkovodního jezírka. Z toho následně vyvozují, že téměř všechny druhy sladkovodních protist by mohly být nalezeny v jakémkoli vhodném biotopu (Finlay a Esteban 1998). Organismy se samozřejmě liší svou specializací na jednotlivé habitaty (Fenchel a Finlay 2004). Jedním z důkazů vysoké schopnosti disperze protist, i těch, kteří mají užší ekologické nároky (nikoli jen těch, kteří mají vhodné habitaty nepřítliš od sebe vzdálené), je dokumentace chladnomilných druhů obývajících Arktidu a Antarktidu. Dochází mezi nimi totiž ke genetickému toku (Darling et al. 2000). Vzhledem ke schopnosti globálního šíření by mohla distribuce nejmenších organismů záviset pouze na vlastnostech prostředí. Byly by tak schopny rozšířit se všude tam, kde jsou pro ně vhodné podmínky (Finlay 2002). V rozšíření mikroorganismů by tudíž neměly hrát roli historické faktory jako tomu je u větších organismů (Fenchel a Finlay 2003). Vlivem genetického toku a všudypřítomnosti protist by tedy nebyla prakticky možná lokální extinkce (Fenchel a Finlay

2004). Tato teorie ústí v názor, že většina druhů již byla objevena a že reálná diverzita se od doposud popsané příliš neliší. Důvod neustálého objevování nových druhů přičítají zastánci ubikvitní hypotézy tomu, že jsou zkoumány habitaty, kterým dosud nebyla věnována pozornost (Fenchel a Finlay 2004).

Zcela odlišný náhled na biodiverzitu mají zastánci hypotézy o velké druhové bohatosti protist. Tato hypotéza předpokládá výrazné podhodnocení našich současných pohledů na protistní diverzitu. Je založena převážně na molekulárních datech a teorii moderátní endemicity protistních druhů (Foissner 1999). Teorie moderátní endemicity druhů předpokládá, že protista mají v podstatě podobné rozšíření jako rostliny a živočichové s tím rozdílem, že se mezi nimi nachází víc kosmopolitních druhů. Mezi protisty existují endemiti a také druhy s omezenou geografickou distribucí (Foissner 1999). Endemismus některých druhů dokládají mnohé morfologické i molekulární studie.

Foissner (1999) hypotézu ubikvity svou studií velmi zpochybňuje. V analýze druhového složení půdních ciliátů prováděl 17 odběrů na 100 m² během dvou let. Při současném stavu 1000 popsaných druhů půdních ciliátů byl počet 160 druhů, které na tomto místě našel poměrně nízký. Kumulativní křivka celkového počtu nalezených druhů se vyrovnala již po 13. odběru.

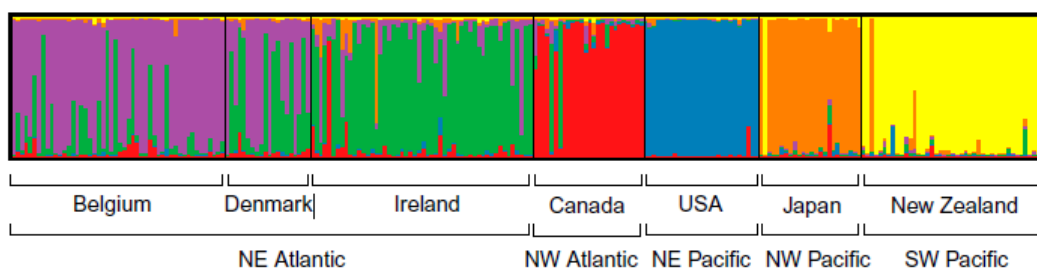
I přesto, že ubikvitní hypotéza tento názor nepodporuje, ukazuje se, že rozšíření protist je závislé na historických faktorech, a to v některých případech i na jejich Gondwanském/Laurasijském původu (Foissner 2006). Velice patrné to je na velmi dobře rozpoznatelných druzích, tzv. „flagship species“. Pokud se v lokalitě vyskytují, jsou téměř nepřehlédnutelné, a přesto jsou evidovány pouze na určitých místech. Mnoho takových druhů existuje například u nálevníků (ciliátů) či sladkovodních i mořských řas (Foissner 2006). Analýza mnoha ciliátních „flagship species“ odhalila, že většina z nich jsou regionálními, lokálními či historickými endemity (Foissner et al. 2008).

Protistní diverzita se z pohledu této hypotézy jednoznačně jeví jako velice podhodnocená. Jako příklad uvádí Foissner (1999) své studie ciliátů. Finlay a Esteban (1998) považuje diverzitu ciliátů za již téměř prozkoumanou. Odhaduje 3000 ciliátních druhů. Tento počet zpochybňuje Foissner (1997). Uvádí, že ročně je popsáno několik set nových druhů. V některých studiích se odhaduje, že počet protistních druhů je přibližně 300 000 (Foissner a Wilhelm 2008) nebo také $1,46 \times 10^5$ až $1,66 \times 10^6$ (Adl et al. 2007).

Podhodnocené odhady současné diverzity spočívají nemalou částí v celkově nízké prozkoumanosti Země. Značnou část poznané diverzity některých druhů tvoří nálezy pouze

několika vědců, kteří se zabývali "svými oblíbenými" habitaty. A tak největší množství lokalit zůstává neprozkoumaných (Foissner 1999). Dosud malý počet poznáných druhů tedy není dán jen obtížnou rozeznatelností některých druhů, ale také malým počtem taxonomů, od kterého se odvíjí nízký počet odběrů, a tudíž malá prozkoumanost protistní diverzity (Foissner 2006). Z hlediska těchto argumentů se zdá být diverzita protist skutečně velmi podhodnocená, a to i v případě uvažování pouze morfologicky odlišitelných druhů. Ale i veškeré molekulární analýzy naráží na problém "oblíbených odběrových míst", stejně jako je tomu u analýz morfologických.

Zastánci hypotézy velkého počtu druhů předpokládají, že v mnoha skupinách protist nebylo dosud popsáno ani 50 % všech existujících druhů (Foissner 2006, Adl et al. 2007). Zatímco ubikvitní hypotéza by prakticky neumožňovala populační diferenciaci a z ní plynoucí alopatickou speciaci, mezi podpůrci vysoké diverzity existují zastánci názoru, že protista jednotlivé populace vytvářejí. Analýza mikrosatelitů mořské planktonní rozsivky *Pseudo-nitzschia pungens* (Casteleyn et al. 2010) ukazuje přítomnost různých populací a to i přesto, že mořský plankton nemá prakticky žádné příliš výrazné disperzní bariéry.



Obr. 1: Populační struktura *Pseudo-nitzschia pungens*, každý izolát je zakreslen vertikální čarou, která je rozdělena do barevných sekcí o délce proporcionální k míře příslušnosti k danému klastru (Casteleyn et al. 2010)

Sledování jednotlivých populací pomocí analýzy mikrosatelitů bylo prováděno také na benthické sladkovodní rozsivce *Sellaphora capitata*. Ukázalo se, že izoláty vykazují rozdíly závislé na lokalitě, ze které pocházejí. Jednotlivé populace jsou sexuálně kompatibilní, ale vzhledem k omezené schopnosti šíření těchto organismů by v přírodě ke křížení těžko došlo a tudíž by časem alopatická speciace byla možná (Evans et al. 2009).

Většina známých sekvencí popsaných protist je pořízena z klonálních kultur. Ty nevypovídají o variabilitě společenstev v přírodních podmínkách. Vnitrodruhová a vnitrogenomová variabilita v rámci přírodních protistních populací je stále většinou

neznámá (Pawlowski et al. 2012). Pro studium reálné diverzity protist přináší výhodu metoda pyrosekvenování. Globální druhová bohatost je velmi omezena na znalost sekvencí kultivovaných kmenů (Stoeck et al. 2010). Metoda pyrosekvenování přináší možnost získat sekvence i z velmi málo abundantních druhů. A přesto, že je touto metodou odhaleno velké množství druhů, není toto množství ani pro konkrétní habitat konečné, pokud je provedeno nedostatečné množství odběrů. Nolte et al. (2010) se zabýval rozmanitostí přírodních populací protist. Na deseti odběrech ze stejného místa zkoumal časovou variabilitu výskytu jednotlivých druhů. V rozmezí 3 týdnů se ukázalo, že 50 % organismů bylo nalezeno maximálně ve 3 vzorcích současně. 25 % bylo unikátních pro každý vzorek. Sezónní dynamika je velmi význačným faktorem, ovlivňujícím diverzitu protistních organismů (Sommer 1986) nejen ve vodě, ale například i v půdě (Adl & Gupta 2006). Některé taxony bývají v malém množství zastoupeny celý rok, ale spousta druhů je omezena pouze na konkrétní podmínky. Procento nalezených řas v jedné lokalitě by se jistě zvýšilo větším počtem odběrů v průběhu roku. Jednoodběrová studie je tudíž poměrně nespolehlivým ukazatelem diverzity lokality. Dále je při použití metody pyrosekvenování nutné přihlížet na vysoké procento chybovosti. A proto je dobré takto pořízené výsledky brát s určitou rezervou (Nolte et al. 2010).

Jako další příklad obrovské diverzity, která ještě nebyla prozkoumaná, lze uvést výtrusovce (Apicomplexa). Apicomplexa jsou obligátními parazity (např. *Plasmodium*, *Toxoplasma*). Jejich variabilita se dá odhadovat až na $1,26 \times 10^6$ druhů, pokud bychom uvažovali, že každý druh je specializován na svého živočišného hostitele. Tento model by se dal aplikovat také na protistní parazity ryb či rostlin (Pawlowski et al. 2012). Jeden z příkladů specializovaných parazitických druhů, *Plasmodium azurophilum*, byl považován za jeden druh. Toto ustanovení bylo založené na morfologických znacích a životním cyklu. Posléze se ale ukázalo, se ve skutečnosti jedná o dva reprodukčně izolované druhy. Jeden z nich infikuje červené krvinky, druhý bílé krvinky (Perkins 2000).

1.2 Skrytá diverzita- genetické a morfologické rozdíly na příkladu protistních řas

Taxonomie jednobuněčných planktonních organismů je dnes stále ještě převážně založena na morfologických znacích. Jedním z problémů odhadování protistní diverzity je skrytá (kryptická) diverzita, kdy v rámci nominálně definovaného druhu je odhalena přítomnost více druhů. Kryptická diverzita je zjišťována téměř u všech druhů, které jsou detailněji zkoumané.

Mnoho nově objevených druhů je charakterizováno pouze genetickými rozdíly. Např. u pikoplanktonní řasy *Micromonas pusilla* bylo pomocí sekvenování jaderného, mitochondriálního a chloroplastového genomu odhaleno 5 rozlišných linií. Dvě z nich byly ubikvitní, zatímco ostatní se vyskytovaly pouze lokálně. Morfologicky byl *M. pusilla* považován za jediný druh (Šlapeta et al. 2006). Pomocí molekulárních přístupů byly objeveny také další neznámé linie ciliátů. Jednalo se nejen o sekvence v rámci tříd a podtříd, ale také sekvence, které bylo obtížné klasifikovat do nějaké z již popsanych tříd či podtříd (Šlapeta et al. 2005). Finlay (2002) ale upozorňuje na určitou rezervu molekulárních metod. V některých případech totiž kryptické druhy mohou být geneticky odlišné, jiné kryptické druhy genetické rozdíly postrádají. Fenchel a Finlay (2006) zastávají názor, že introdukce genetických dat vnáší do studia protistní diverzity spíše zmatek a vysoký počet druhů objevených na genetické úrovni je zavádějící. Molekulární druhový koncept považují za pouhý teoretický konstrukt, přičemž pro skutečnou definici druhů doporučují studium fyziologických a morfologických znaků.

Kromě toho, že bylo pomocí molekulárních metod objeveno velké množství nepopsaných druhů, vnesly tyto přístupy do systému eukaryot lepší fylogenetickou organizovanost. U velkého množství kryptických druhů je problém nalézt vhodné morfologické znaky pro rozlišení mezi nimi. Zatímco se mnoho morfologických znaků tradičně využívaných pro determinaci druhů ukázalo být ve světle molekulárních dat zcela nevhodné (velikost buněk, přítomnost slizu, velikost externalit (Krienitz a Bock, 2012), přítomnost pyrenoidu v chloroplastu (Krienitz et al. 2001), jiné morfologické znaky se při rozlišení mezi kryptickými druhy dají stále efektivně využívat. Mnoho morfologických znaků, které se jeví jako vhodné pro rozlišení mezi kryptickými druhy bývá nalezeno u druhů, které jsou schopné produkovat pevné struktury. Jedná se často o různé druhy schránek. Např. Amato et al. (2007) odhalili kryptickou diverzitu u rozsivek rodu *Pseudo-nitzschia*. Mann et al. (2004) studovali kryptickou diverzitu rozsivky *Sellaphora pupula* a definovali 5 nových druhů. Kryptické druhy byly nalezeny i u *Desmodesmus serratus* (Fawley et al. 2011). Škaloudová a Škaloud (2013) zjistili kryptickou diverzitu v rámci rodu *Chryso-sphaerella*. Popsali nový druh z Finska a doplnili, že našli v dřívější literatuře zmínky o rozdílných křemičitých šupinách tohoto rodu. Ty nejspíše budou také patřit dalším kryptickým druhům. Skryté druhy se pravděpodobně signifikantně liší v ekologických nárocích (Škaloudová a Škaloud 2013). U rozsivek (*Sellaphora pupula*) je možné kryptické druhy definovat s využitím elektronového mikroskopu. Výsledky ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) se shodují

s výsledky molekulárními (Mann et al. 2008). Poměrně dobrých výsledků lze dosáhnout v morfologii také metodou geometrické morfometriky (GM).

Morfologie ale mnohem méně vypovídá o fylogenetických vztazích. Např. rod *Mallomonas* je na základě podobnosti křemičitých struktur rozdělen do několika sekcí (Kristiansen a Preisig 2007). Toto rozdělení ale neodpovídá skutečné evoluci rodu (Jo et al. 2011). Jak správně rozlišit fylogenetické vztahy publikovala Coleman (2003). Analyzovala, které molekulární markery je vhodné využít pro rozlišení diverzity na různých úrovních fylogeneze. Pro zjištění vnitrodruhové variability byl jako nejlepší vyhodnocen ITS region. LSU a SSU rDNA úseky jsou schopny rozlišit pouze do úrovně rodu. Coleman (2008) se zabývala i biologickým konceptem druhů u zelených řas. Ve své práci publikovala hypotézu, že pokud jsou v sekundární struktuře ITS2 přítomny CBCs (compensatory base changes= reciproční změny bází) a hemi CBCs, (one sided CBCs), jsou mezi druhy přítomny i reprodukční bariéry. Tento model ale lze uplatnit jen u některých skupin řas (Caisová et al. 2011).

Přítomnost a počet CBC může navíc pouze reflektovat vzrůstající genetické odlišení dvou druhů po speciální události. Neznamená to, že CBC předchází speciální události. Proto může být přítomnost CBC dostatečným ale ne nutným ukazatelem rozdílnosti druhů. Odhaluje spíše minimální počet druhů (Müller et al. 2007).

1.3 Druhový koncept řas produkujících pevné struktury

Prvotní studie využívaly k určování protist pouze morfologické znaky. Pozorování morfologie ve světelném mikroskopu bylo později obohaceno o studie založené na elektronové mikroskopii. A tak mohl vzniknout rozsáhlý přehled o protistní druhové bohatosti. Například u bentických/planktonních obrněnek rodu *Prorocentrum* se začalo rozlišovat mezi některými druhy až ve chvíli, kdy byla v SEM objevena struktura jejich periflagelárních plátů (Lim et al. 2013). Morfologické druhy ostatních běžných obrněnek s velkými destičkami byly již dříve ve světelném mikroskopu rozpoznávané. Podobně tomu je i u šupinatých chrysomonád. Jejich druhový koncept je dlouholetou tradicí založen na specifické morfologii křemičitých šupin. Světelným mikroskopem dokážeme odhalit pouze jasně zřetelné rozdíly (Kristiansen a Preisig 2007). V mnoha případech je často obtížné zhodnotit, které z odlišností poukazují na mezidruhovou variabilitu a které nikoliv (Němcová et al. 2013). Pro reálné zhodnocení druhové diverzity je u morfologicky příbuzných druhů nezbytné použití molekulárních metod. A teprve poté se věnovat morfologickému rozlišení.

Jelikož se ukazuje, že pomocí morfologie je možné rozlišit pouze některé molekulárně definované druhy, pro studium kryptické diverzity jsem si vybrala druh, který vytváří pevné struktury. Kromě zjištění, zda se v rámci vybraného druhu vyskytují genetické rozdíly, bude možné detailně sledovat i morfologii na křemičitých šupinách.

1.4 Křemičité šupiny

Rod *Synura* (Stramenopiles, Chrysophyceae) a další příbuzné rody produkují křemičité šupiny se specifickými tvary a ornamentací. Tyto šupiny se dají dobře využít k rozlišení druhů, a to jak z čerstvých odběrů, tak z fosilního materiálu. Šupiny skupiny Chrysophyceae zůstávají využitelné pro určení druhů i miliony let (Smol 1995, Siver a Wolfe 2005). Některé z fosilních šupin jsou velmi podobné těm, které produkují reentní druhy Synurales (Siver et al. 2013).

Šupiny jsou produkovány intracelulárně v silikon-depozitních váčcích, které jsou umístěné v řadách podél povrchu jednoho z chloroplastů. Jsou asociované s periplastidálním ER (Leadbeater 1990). Silikon-depozitní váčky vznikají splýváním váčků, produkováných Golgi aparátem (Zeeb a Smol 2001). Mikrotubulární cytoskelet je důležitý pro přemístění šupin k povrchu buňky a jejich exocytózu. Jakmile je šupina na povrchu buňky, cytoskelet se rozloží (Leadbeater 1984). Rozmístění šupin na povrch buňky je spirální (Leadbeater 1984, Siver & Glew 1990, Zeeb a Smol 2001), přičemž exocytóza probíhá na několika místech současně (Sandgren et al. 1996). Všechny šupiny jsou připevněné k buňce svou bazální stranou. Bazální strana je kryta distální stranou šupin vyšších řad. Tímto způsobem je obrněna celá buňka (Leadbeater 1990).

U Synurales existuje více druhů šupin. Označují se jako přední (anteriorní), tělní a zadní (posteriorní), které se od sebe částečně liší svou morfologií (Siver 1988). Předpokládá se, že šupiny mají přibližně určenou budoucí destinaci již při svém vzniku (Leadbeater 1990).

Přechod mezi morfologií šupin na buňce je postupný (Siver 1988, Škaloud et al. 2012). K druhové determinaci je využíváno tělních šupin, protože jsou velké a mají nejvyvinutější ornamentaci (Škaloud et al. 2012). Posterioerní šupiny jsou kratší, sice nesou základy ornamentace, ale ta není plně vyvinuta (Wee 1997). U některých druhů jsou ke správné determinaci potřebné i apikální šupiny nebo ostny (Kristiansen 1978).

Křemík je důležitým elementem naší planety. Tvoří 28 % zemské krusty (Leadbeater a Baker 1995).

Když jsou Synurales limitovány křemíkem, vytváří méně silifikované šupiny. Kultivací v médiu s absencí křemíku bylo zjištěno, že jsou schopni žít i zcela bez šupin (Sandgren et al. 1996). Při vyšších koncentracích křemíku se šupiny protahují a zužují (Hahn et al. 1996).

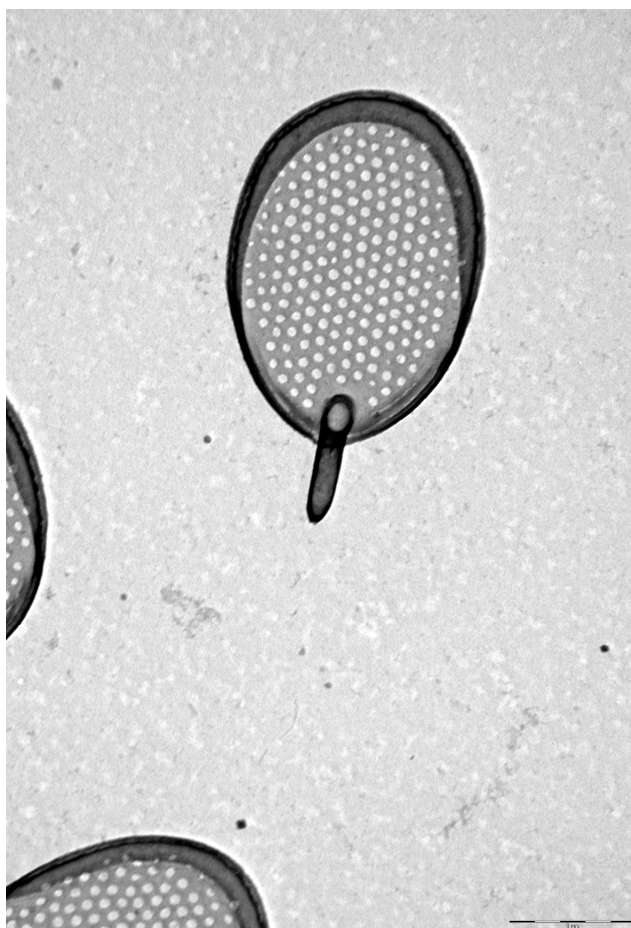
Faktory prostředí, ve kterém buňky žijí, dokáží tvar šupin ovlivnit i v průběhu života. Nejhorší dopad na strukturu šupin má prostředí disturbované lidskou činností. Takovéto šupiny bývají deformované (Gavrilova et al. 2005). Ve znečištěné vodě nemohou žít zdravé organismy. Nicméně se alespoň mohou stát dobře sledovatelným ukazatelem čistoty prostředí.

1.5 *Synura sphagnicola*

Ukazuje se, že velká část popsaných druhů ve skutečnosti zahrnuje více morfologicky nepopsaných variant. Molekulární přístupy dokáží vyvolat impuls k tomu, aby tyto druhy byly detailněji prostudovány z hlediska morfologie a zrevidovány. Tento impuls inspiroval i mou diplomovou práci. Fylogenetická analýza (Škaloud et al. 2013a) uvádí přítomnost kryptické diverzity i v rámci dalších nominálních druhů s křemičitými šupinami (*Synura. S. curtispina*, *S. mammilosa*, *S. sphagnicola* a *S. uvella*).

Synura sphagnicola (Stramenopiles, Chrysophyceae) obývá biotopy kyselých oligotrofních vod. Rašeliništní tůňky, horské rybníčky nebo jezera s kyselějším pH jsou lokality, kde se tento druh nejčastěji vyskytuje.

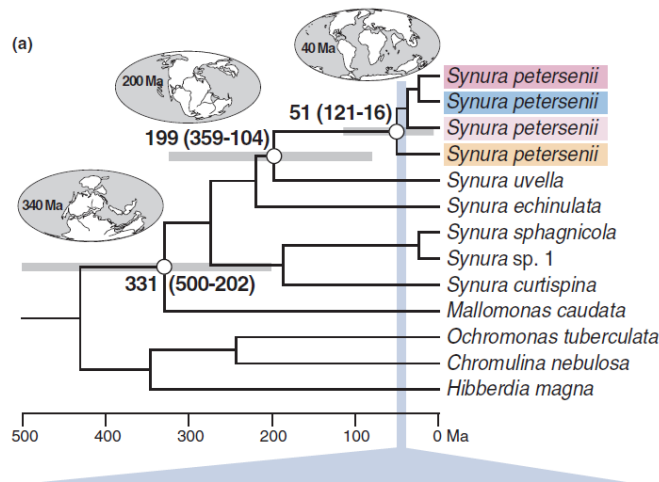
Šupiny mají oválný tvar. Bazální deska je perforovaná. Na proximální straně šupiny se nachází přehnutý okraj (rim). Na distální straně šupiny je připevněn dlouhý osten (obr 2).



Obr. 2 Tělní šupina *S. sphagnicola*, vlastní kultura

Ve světelném mikroskopu je možné druh *S. sphagnicola* rozlišit snadno od ostatních druhů rodu *Synura*, jelikož se v buňce často vyskytují olejové kapičky načervenalé barvy. Při pozornějším sledování na větším zvětšení lze okolo buněk vidět i poměrně dlouhé osténky. Kolonie jsou kulaté, často mají spíš menší počet buněk (4-16).

Synura sphagnicola byla do dnešní doby považována za velmi dobře definovaný, morfologicky jasně vymezený druh. V článku Bo et al. (2010) byla do analýzy zahrnuta sekvence *S. sphagnicola* (viz obr.xx *Synura sphagnicola*), kmen CCMP 2897 (The Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton). Molekulární analýza odhalila blízkou příbuznost tohoto kmene s blíže neurčeným kmenem *Synura* sp. 1, CNU 52, (obr. 3 „*Synura* sp. 1), který pochází z odběrů z Jižní Koreje. V databázi GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) se nachází dalších 28 různých sekvencí *S. sphagnicola*, vyizolovaných z 22 různých kmenů. Dvě ze sekvencí nebyly publikovány.



Obr. 3: Fylogenetická pozice *S. sphagnicola*- příbuznost s kmenem *Synura sp.1*, převzato z Boo et al. 2010).

Mezi těmito 28 sekvencemi se nachází 8 sekvencí genu pro 18S rRNA. Šest těchto sekvencí (LO228-6, LO228-7, LO228-33, LO234-7, LO234-8, LO234-9) pochází z publikace Auinger et al. (2008), zabývající se metodou identifikace protist pomocí single-cell PCR. V tomto článku bylo zjištěno, že některé morfotypy (*Ochromonas sp.*, *Dinobryon divergens*) vykazují genetickou variabilitu při sezónních odběrech či při odběrech z odlišných jezer. V případě sezónně odebraných a vyizolovaných kolonií druhu *Synura sphagnicola* byly získané sekvence až na jednu delecí shodné. Další ze sekvencí 18S rDNA (kmen spssu) pochází ze studie věnující se molekulární diverzitě apusomonád (Kim et al. 2006). Studovaný kmen byl vyizolován z jezera ve Wisconsinu, USA. Poslední ze sekvencí 18S rDNA (CCMP 1705) byla publikována v rámci fylogenetické analýzy Chrysophyt (Lavau et al. 1997).

Porovnání existujících sekvencí genu pro 18S rRNA ukazuje, že u většina druhů má zcela identické sekvence. Kmen LO228-6 (délka 1218 párů bazí) se od ostatních liší jednou delecí. Kmen spssu se liší ve třech bazích. Blíže příbuzný kmen *Synura sp. 1* (obr. 3) (CNU 52) se v genu pro 18S rRNA od ostatních kmenů *S. sphagnicola* liší v 8 bazích.

Mírná variabilita 18S rDNA v rámci druhu *S. sphagnicola* tedy existuje. Mnohem zajímavější by jistě bylo zkoumat variabilnější úsek - ITS region, který vhodný pro rozlišování mezidruhových rozdílů u řady skupin protist (Coleman 2003). Na variabilitě tohoto markeru by se vnitrodruhové rozdíly, pokud existují, měly zvýraznit.

Genetické diverzitě *S. sphagnicola* dosud nebyla věnována žádná pozornost. Studium vnitrodruhové variability tohoto druhu by proto mohlo přinést zajímavé výsledky využitelné v ekologických studiích. A také přispět k současné diskuzi ohledně diverzity protist.

1.6 Cíle práce

Hlavním cílem mé práce je zjistit, zda se v rámci morfologicky definovaného druhu *S. sphagnicola* vyskytují kryptické druhy. Pokud bude možné druhy rozlišit morfologicky, stanovit kritérium, dle kterého je lze rozpoznat.

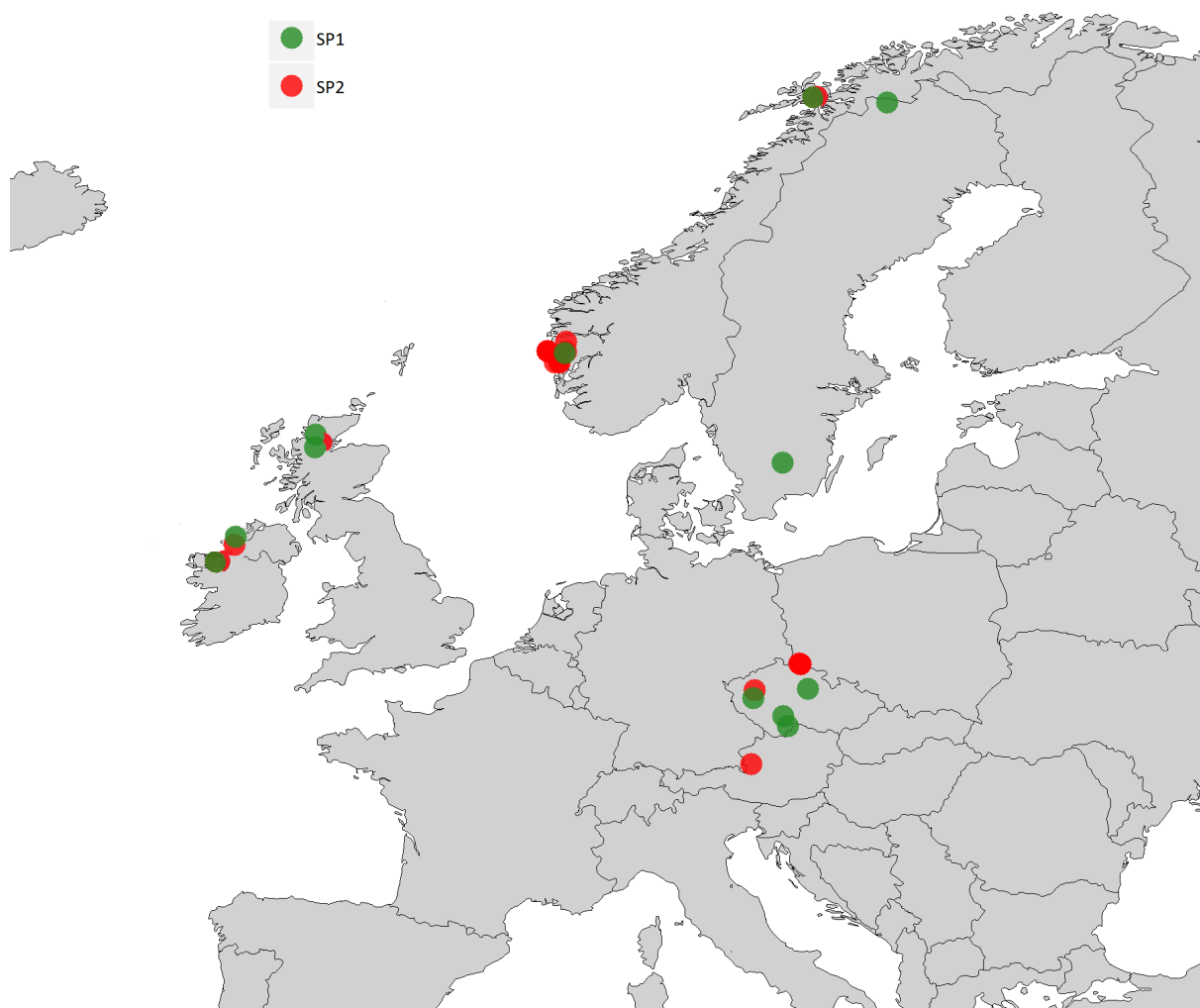
Vedlejším cílem je analýza existující literatury, která se týká druhu *Synura sphagnicola*. Ta bude spočívat v analýze publikovaných šupin a ekologických podmínek lokalit, ze kterých šupiny pocházejí.

Revize *S. sphagnicola* a výzkum kryptické diverzity uvnitř tohoto druhu napomůže zdokonalit přehled o diverzitě a rozšíření protistních organismů.

2. Materiál a metody

2.1 Izolace a kultivace

Pro výzkum diverzity druhu *Synura sphagnicola* byly odebrány vzorky z několika lokalit v rámci Evropy. Vzorky pochází z České republiky, Norska, Skotska, Švédska (obr .4). Z kultur byla vyizolována a nasekvenována DNA a byly připraveny preparáty pro transmisní elektronový mikroskop (TEM).



Obr. 4 : Mapa odběrových míst získaných sekvencí *S. sphagnicola*.

Odběr vzorků byl prováděn s použitím planktonní sítě s šířkou ok 20 μm nebo vyždímáním vodních rostlin. Současně byly zaznamenány GPS souřadnice jednotlivých

lokalit a na místech odběru změřeno pH, konduktivita a teplota vody pomocí měřiče Combo pH & 7 EC HI 98129, Hanna instruments.

K izolaci jednotlivých kolonií ze vzorků byla použita skleněná pipeta vytažená v kapiláru. Monoklonální kultury byly pěstovány v plastových kultivačních destičkách se sterilním modifikovaným médiem DYIV (složení- viz níže) s pH 6 při konstantní teplotě 15°C za přirozeného a zároveň přidaného slabého umělého osvětlení. Po třiceti dnech (+- 3 dny) byl z narostlé kultury odebrán vzorek o objemu 200 µl do 1ml mikrozkušavky Eppendorf sterilní pipetou a zmražen (- 20°C).

Složení média DY IV – modif.:

Do 950 ml destilované vody přidat:

-1,0 ml MgSO₄.7H₂O 5,0 g/100 ml dH₂O

-1,0 ml KCl 0,3 g/100 ml dH₂O

-1,0 ml NH₄Cl 0,268 g/100 ml dH₂O

-1,0 ml NaNO₃ 2,0 g/100 ml dH₂O

-1,0 ml β – glycerofosfát 0,216 g/100 ml dH₂O

-1,0 ml H₃BO₃ 0,08 g/100 ml dH₂O

-1,0 ml Na₂EDTA 0,7 g/100 ml dH₂O

-1,0 ml Na₂SiO₃ 0,6 g/100 ml dH₂O

-1,0 ml FeCl₃ .6 H₂O 0,166 g/100 ml dH₂O

-1,0 ml CaCl₂ 7,5 g/100 ml dH₂O

200 mg MES – pufr

1,0 ml stopové prvky viz níže

1,0 ml vitamínový roztok viz níže

Stopové prvky :

Rozpustit každou chemikálii samostatně v 10 ml:

destilované vody. Poté smíchat těchto 6 roztoků

a doplnit do 100,0 ml destilovanou vodou.

31,4 mg MnCl₂ . 4 H₂O

4,5 mg MnSO₄ . H₂O

1,46 mg CoCl₂ . 6 H₂O

2,35 mg Na₂MoO₄ . 2 H₂O

0,13 mg NH₄VO₃

0,27 mg Na₂SeO₃

Vitamínový roztok:

Rozpustit každou chemikálii samostatně v 10 ml Do 80 ml destilované vody přidat:

1,0 ml B12 0,5 g/l d H₂O

10,0 mg Thiamin HCl

Doplnit na konečný objem 100 ml destilovanou vodou.

Kompletní médium doplnit na 1,0 l destilovanou vodou a upravit pH pomocí NaOH či HCl na 6,0.

Médium bylo sterilizováno v autoklávu.

2.2 Analýza DNA

2.2.1 PCR amplifikace a sekvenace ITS rDNA úseku

Pro zjištění přítomnosti či nepřítomnosti genetické variability kultivovaných kmenů bylo využito markeru ITS. Variabilita tohoto úseku dobře vystihuje rozdíly v DNA na úrovni druhů (Coleman 2003).

Připravené vzorky byly v pokojové teplotě pozvolna rozmrazeny. Rozmražené vzorky byly přemístěny přímo do reakční směsi pro PCR. Amplifikace sekvencí ITS rDNA (ITS1, 5,8S, ITS2) byla provedena s použitím primerů Kn1.1 (5'-CAA GGT TTC CGT AGG TGA ACC-3'; Wee et al. 2001) a Kn4.1 (5'-TCA GCG GGT AAT CTT GAC TG-3'; Wee et al. 2001). Mastermix obsahoval: 15.1 µl sterilní Milli-Q vody, 2 µl 10' PCR pufr (Sigma), 0.4 µl dNTP (10 µM), 0.25 µl každého z primerů (25 pmol/ml), 0.5 µl Red Taq DNA Polymeráza (Sigma) (1U/ml), 0.5 µl of MgCl₂, 1 µl rozmraženého vzorku. Amplifikace ITS rDNA úseku probíhala v cykleru Touchgene gradient cycler (Techne, Cambridge UK). Po iniciální denaturaci (5 min na 94°C) následoval cyklus: 35x denaturace – 1 min při 94°C + annealing – 1 min při 54 °C + elongace 1 min při 72 °C, prodlužovací fáze 10 min při 72 °C. Výsledný produkt byl detekován na agarózovém gelu s ethidium bromidem. Produkt byl přečištěn kitem JetQuick PCR Purification Kit (Genomed). Sekvenace primery použitými při PCR byla provedena firmou MacroGen, Inc. (Seoul, Korea, <http://dna.macrogen.com>).

2.2.2 Zpracování sekvencí

Získané sekvence byly seřazeny v alignmentu, aby bylo možné sledovat a kvantifikovat rozdíly mezi nimi. Celkem bylo získáno 14 sekvencí ITS regionu kultivovaných kmenů.

K nim byly přidány ještě další sekvence (celkem 23) poskytnuté vedoucím práce. Ze sekvence forward a reverse primeru byla vytvořena konsenzuální sekvence v programu SeqAssem (Hepperle 2004). Alignment sekvencí byl vytvořen za použití programu MEGA, verze 5.05 (Tamura et al. 2011). Metodou maximální parsimonie byla spočítána genetická vzdálenost mezi jednotlivými izoláty a poté byla vytvořena haplotypová síť v programu HapView, verze 4.0. (Salzburger et al. 2011)

2.3 Morfologická analýza

Aby bylo možné zjistit, zda existují morfologické rozdíly mezi jednotlivými kulturami, byly s použitím TEM analyzovány křemičité šupiny kultivovaných kmenů. Byly analyzovány též křemičité šupiny pořízené ze čtyř přírodních vzorků ještě před kultivací, aby mohly být porovnané s kulturami, které z těchto čtyř odběrů narostly.

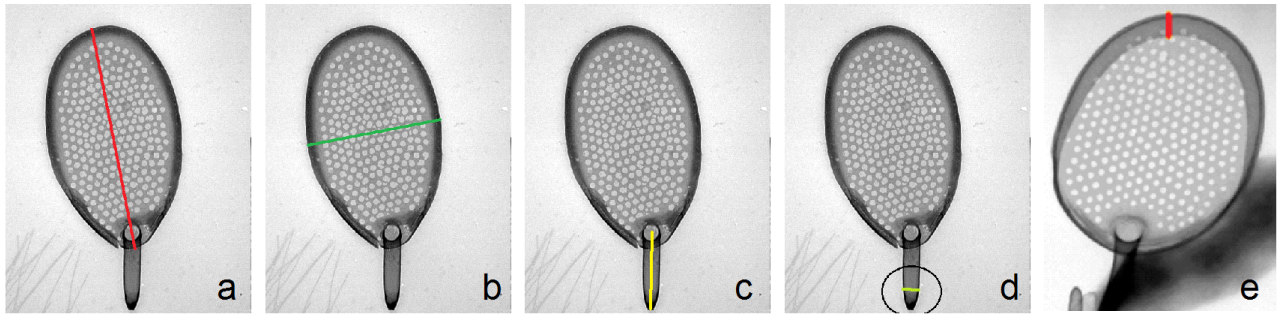
2.3.1 Příprava vzorků pro TEM

Z vypěstovaných kmenů byly po třiceti dnech (+/- 3 dny) připraveny vzorky pro TEM. Vzorky kultur byly nakapány na měděné sítky, pokryté formvarovou blankou. Po zaschnutí byly mřížky třikrát promyty v destilované vodě.

2.3.2 Měření šupin

Pomocí elektronového mikroskopu JEOL 1010 byly prohlédnuty a zdokumentovány křemičité šupiny všech kultur. Pro zjištění rozdílů mezi jednotlivými kulturami bylo pořízeno minimálně 50 fotografií šupin každého kultivovaného kmene.

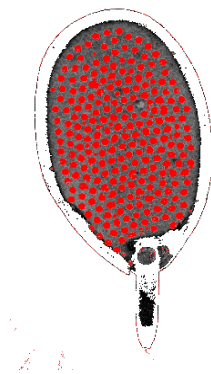
Na nafocených šupinách bylo měřeno 5 parametrů pomocí programu ImageJ (verze 1,46, <http://imagej.nih.gov/ij/>): délka šupiny, šířka šupiny, délka ostnu, šířka ostnu, délka rimu (obr. 5).



Obr. 5: Šupina *S. sphagnicola*: měřené parametry: a- délka šupiny, b- šířka šupiny, c- délka ostnu, d- šířka ostnu, e- délka rimu.

U všech šupin byla délka šupiny měřena v nejdelším místě šupiny, šířka v nejširším místě šupiny. Délka ostnu byla měřena od středu póru bazální desky ke konci ostnu, šířka ostnu byla měřena v nejširším místě ostnu. Délka rimu byla měřena v jeho nejširší části.

Na šupinách pěti kmenů byla měřena také průměrná plocha póru bazální desky šupiny a jeho kulatost (do jaké míry se má povrch kruhu hladce tvarované okraje)(obr. 6.). Tento parametr se ale neukázal jako významný pro rozlišení mezi liniemi, proto nebyl dál měřen.



Obr. 6: Šupina *S. sphagnicola*: červeně vyznačena plocha póru bazální desky šupiny

Na šupinách pocházejících z nákresů k popisu druhu *S. sphagnicola* byly změřeny pouze 3 parametry z důvodu možného zkreslení ostatních. Délka šupiny, šířka šupiny, délka ostnu.

2.4 Statistické zpracování dat

Se získanými daty byly prováděny analýzy v programu STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc. 1998) a PAST (Hammer et al. 2001), aby byla zjištěna morfologická diverzita

druhu *S. sphagnicola* a aby bylo možné prokázat nebo vyloučit, zda se v rámci tohoto druhu vyskytují morfologické rozdíly, které by mohly vystihovat různé kryptické linie.

2.4.1 Kultury

Normální rozložení hodnot měřených znaků bylo otestováno Shapiro-Wilkovým testem normality.

Signifikace rozdílů měřených parametrů mezi dvěma druhy byla testována t-testem. Pro vizualizaci naměřených hodnot byly zhotoveny histogramy a krabicové grafy.

Na získaných datech byla provedena analýza hlavních komponent, PCA. Tato metoda využívá techniky, která hlavní trendy tvarové variability dat transformuje do systému vzájemně kolmých a nekorelovaných os. Jednotlivé osy, získané touto analýzou vysvětlují procenta variability. S narůstajícím pořadovým číslem osy klesá míra vysvětlené variability a tak je možné původní dimenzi dat vystihnout v menším počtu dimenzí s minimální ztrátou variability.

Výsledky analýzy hlavních komponent byly graficky znázorněny v dvourozměrném prostoru pomocí ordinačních diagramů, znázorňujících rozložení hodnot podél prvních dvou os PCA (pca 1 a pca 2).

Z důvodu následné analýzy dat fotografií z článků byly vypočítány poměry hodnot pěti parametrů měřených na šupinách, aby se předešlo nebezpečí, že budou analyzovány hodnoty zkeslené nepřesným měřítkem. Spočítáno bylo 10 poměrů: délka šupiny/ šířka šupiny (dš/šš), délka šupiny/délka ostnu (dš/do), délka šupiny/ šířka ostnu (dš/šo), délka šupiny/délka rimu (dš/dr), šířka šupiny/délka ostnu (šš/do), šířka šupiny/šířka ostnu (šš/šo), šířka šupiny/ délka rimu (šš/dr), délka ostnu/šířka ostnu (do/šo), délka ostnu/délka rimu (do/dr), šířka ostnu/délka rimu (šo/dr).

Ke zjištění, které z měřených znaků jsou nejvhodnější k rozlišení mezi dvěma liniemi a na kolik procent je možné obě linie od sebe odlišit bylo využito diskriminační analýzy. Diskriminační analýza je jednou z metod mnohorozměrné statistické analýzy. Je využívána ke zjištění, které znaky jsou důležité pro rozlišení mezi dvěma (nebo více) předem známými skupinami. Diskriminační analýza k posouzení důležitosti znaků při diskriminaci poskytuje několik parametrů. Parametr F-to-remove určuje míru signifikance rozdílů v daném znaku. Čím větší F-to-remove je, tím signifikantněji se v daném znaku dvě linie liší. Hodnota Wilksovy lambdy vypovídá o diskriminační hodnotě znaků, pokud je kombinován s ostatními znaky. Parciální Wilksova lambda určuje diskriminační hodnotu znaku,

posuzujeme-li ho samostatně. Hodnoty Wilksovy lambdy a parciální Wilksovy lambdy se pohybují mezi 1 a 0, přičemž čím nižší hodnota je, tím lepší má daný znak diskriminační schopnost.

K zjištění, zda některý z parametrů prostředí signifikantně ovlivňuje hodnoty či poměry hodnot naměřených na šupinách bylo využito testování korelace. Zhotoveny byly regresní křivky, aby bylo možné sledovat, zda je souvislost lineární. Testováno bylo také, zda první nebo druhá vysvětlující osa PCA (pca 1, pca 2) je ovlivněna parametry prostředí.

2.4.2 Data dohledaná v člancích

Pro prozkoumání co největšího počtu šupin byly mezi publikovanými články vyhledávány ty, které se týkaly *S. sphagnicola*. Z nich byly vybrány ty, které obsahovaly fotografie šupin *S. sphagnicola* a alespoň přibližně definované lokality, odkud šupiny pocházely. Dále byla při hledání šupin *S. sphagnicola* využita databáze chrysophytes.eu (Škaloud et al. 2013b). Některé fotografie šupin byly obdrženy od vedoucího práce. Na dohledaných datech byly z naměřených hodnot (délka šupiny, šířka šupiny, délka ostnu, šířka ostnu, délka rimu) do analýz zahrnuty pouze poměrové znaky: délka šupiny/ šířka šupiny (dš/šš), délka šupiny/délka ostnu (dš/do), délka šupiny/ šířka ostnu (dš/šo), délka šupiny/délka rimu (dš/dr), šířka šupiny/délka ostnu (šš/do), šířka šupiny/šířka ostnu (šš/šo), šířka šupiny/ délka rimu (šš/dr), délka ostnu/šířka ostnu (do/šo), délka ostnu/délka rimu (do/dr), šířka ostnu/délka rimu (šo/dr), aby se předešlo možným chybám díky nepřesně zaznamenanému měřítku.

Aby bylo možné sledovat pozici šupin získaných v člancích vzhledem pozicím šupin kmenů, pro které byla známá DNA, byla provedena diskriminační analýza a PCA na datasetu, který obsahoval poměrové znaky kultur a k nim přidané poměry naměřených hodnot zjištěných z fotografií šupin *S. sphagnicola* v člancích. Vizualizace byla zhotovena pomocí ordinačního diagramu.

Pomocí diskriminační analýzy poměrových znaků dat zjištěných z článků a kultur byly šupiny z článků zařazeny do prvního či druhého genotypu. Tabulka lokalit získaných šupin a k nim zjištěných parametrů prostředí je přiložena (Příloha 1) K některým odběrům bylo získáno více šupin a genotyp mohl být určen spolehlivěji než na základě pouze jedné šupiny. Pokud se mezi šupinami vyskytla neshoda v zařazení do genotypu, proběhlo zařazení pouze do jedné z linií, pokud jednu šupinu zařazenou do opačné linie než ostatní šupiny vyvažovaly alespoň tři šupiny ze skupiny druhé. V některých případech bylo zařazení podpořeno též znalostí ITS regionu.

2.4.3 Analýza podmínek prostředí

Pro obohacení studie o další ekologická data byly zjištěny průměrné roční srážky, teploty, průměrné minimální a průměrné maximální roční teploty v místech odběrů všech studovaných šupin za více než posledních 10 let (měřicí stanice se nacházela maximálně 70 km od místa odběru) z databáze weatherbase.com. Bylo testováno, zda poměry morfologických znaků korelují s přírodními podmínkami. Byly zhotoveny regresní přímky.

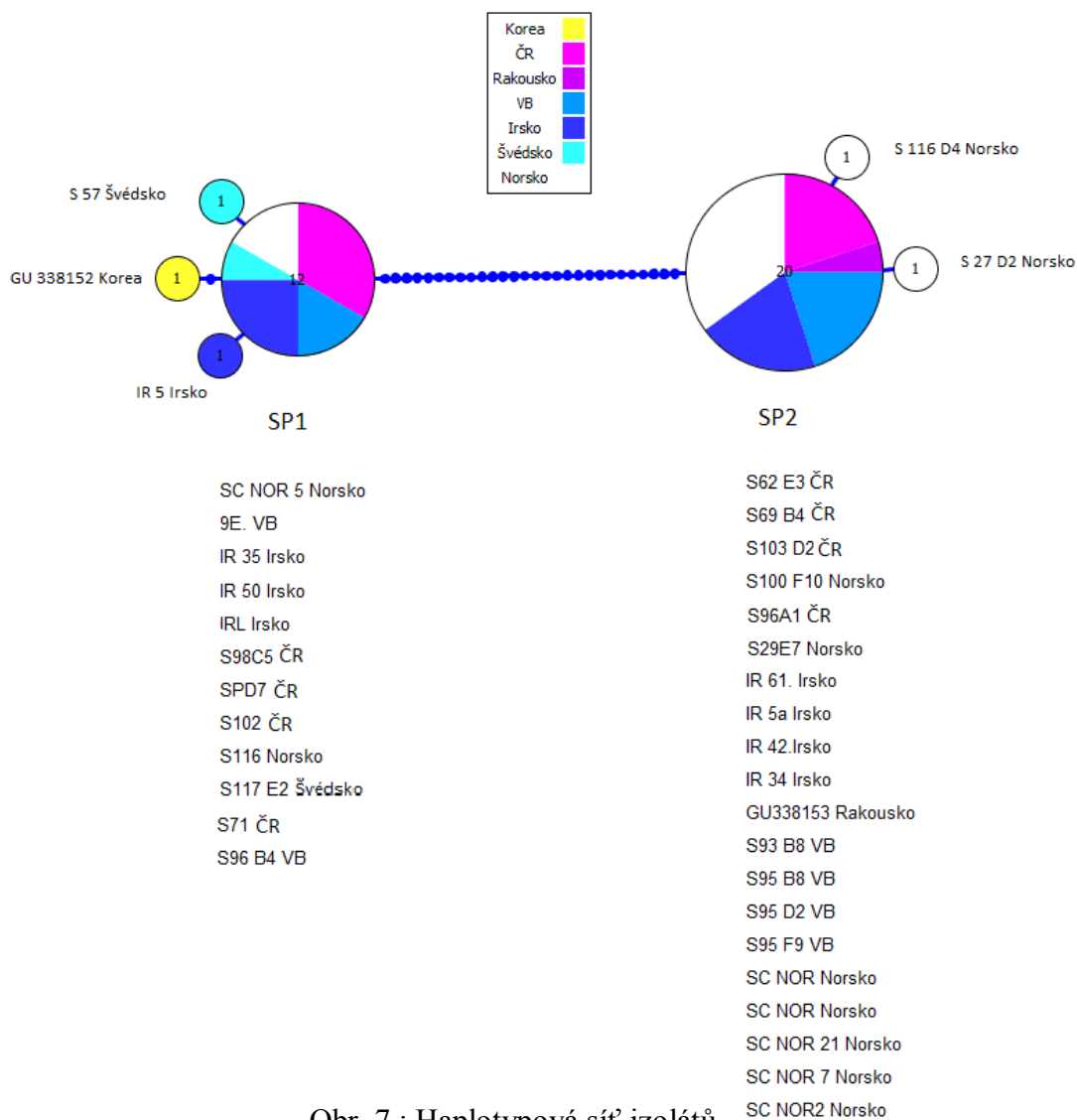
Také k získaným sekvencím byly dohledány průměrné roční teploty, průměrné minimální roční teploty, průměrné maximální roční teploty a srážky v oblasti odběru za více než posledních 10 let (měřicí stanice lokalizovaná maximálně 70 km od místa odběru). Pomocí Kruskal-Wallisova testu bylo zjištěno, zda se rozdíly v rozpětí podmínek prostředí mezi genotypy SP1 a SP2 signifikantně liší. Rozpětí hodnot bylo vizualizované pomocí krabicových grafů.

3. Výsledky

3.1 Charakteristika kultivovaných kmenů

3.1.1 Fylogenetická analýza

Do fylogenetické analýzy bylo zahrnuto celkem 37 sekvencí. ITS region 14 kultivovaných kmenů *S. sphagnicola* byl v alignmentu o délce 418 bází porovnán spolu s ostatními známými sekvencemi ITS regionu *S. sphagnicola*. Zjistilo se, že existují dvě zřetelně odlišené linie. Pravděpodobně by se mohlo jednat o dva druhy. Linie, která byla pracovníě označena jako SP1 se odlišovala od linie označené jako SP2 o 29 bází. Každá z linií - linie SP1 i SP2 byly mírně variabilní. U obou z nich se u několika izolátů nacházely rozdíly v 1 bázi. Odlišné genotypy měly dva norské izoláty druhu SP2, jeden irský a jeden švédský izolát druhu SP1. Korejský izolát se odlišoval o 2 báze od ostatních izolátů genotypu SP1 (obr. 7).



Obr. 7 : Haplotypová síť izolátů.

3.1.2 Charakteristika odběrových míst kultivovaných kmenů

Odběrová místa kultivovaných kmenů pochází z Evropy: 5 kmenů z České Republiky, 3 ze Skotska, 5 z Norska a 1 ze Švédska. Přímě na místě bylo měřeno pH, konduktivita a teplota. Dohledána byla průměrná roční teplota, průměrná minimální a průměrná maximální roční teplota a průměrné roční srážky(tab. 1).

Druh SP1 byl nalezen v prostředí s pH v rozmezí 4,7- 6,5, konduktivitou v rozmezí 17-248 $\mu\text{S/cm}$, teplotou v rozmezí 6,8-16 $^{\circ}\text{C}$ průměrnou roční teplotou -1-9 $^{\circ}\text{C}$, průměrnou minimální roční teplotou -3 $^{\circ}\text{C}$, průměrnou maximální roční teplotou 12 $^{\circ}\text{C}$, průměrnými ročními srážkami 591-1600 mm/rok.

Druh SP2 byl nalezen v prostředí s pH v rozmezí 4,1-6,5 konduktivitou v rozmezí 20-82 $\mu\text{S/cm}$, teplotou v rozmezí -6,1-16 $^{\circ}\text{C}$ průměrnou roční teplotou 3,6-8 $^{\circ}\text{C}$, průměrnou minimální roční teplotou 1,7 $^{\circ}\text{C}$, průměrnou maximální roční teplotou 11 $^{\circ}\text{C}$ průměrnými ročními srážkami 640-2125 mm/rok.

kmen	pH	konduk- tivita ($\mu\text{S/cm}$)	teplota odběru ($^{\circ}\text{C}$)	prům. srážky/rok (mm)	prům. teplota /rok ($^{\circ}\text{C}$)	Prům.min teplota /rok ($^{\circ}\text{C}$)	Prům.max teplota/rok ($^{\circ}\text{C}$)	stát	GPS souřadnice
SP1 S98C8	6,3	218	12	591	8	3	12	ČR	49°47'24.888"N, 13°22'49.922"E
SP1 SPD10	-	248	6,8	570	7	3	12	ČR	50°5'17.750"N, 15°39'54.687"E
SP1 S71G5	6	103	13	730	9	3	12	ČR	49°14'8.023"N 14°37'25.047"E
SP1 S117E4	4,7	17	-	830	-1	-3	1	Švédsko	68°20'53.232"N 18°57'48.916"E
SP1 S116D7	6,5	30	16	1600	3,8	1	5	Norsko	68°30'32.159"N15°52'58.522"E
SP1 S102E7	-	-	-	680	7,5	3	12	ČR	48°55'24.65"N, 14°50'20.78"E
SP2 S95B8	6,3	37	10	640	7	6	11	Skotsko	57°36'39.39"N, 4°51'16.78"W
SP2 S27D2	5,2	47	-	1400	7,2	-	-	Norsko	60°35'51.39"N, 4°49'45.25"E
SP2 S29E7	5,8	82	-	1400	7,2	-	-	Norsko	60°35'57.95"N. 4°49'38.95"E
SP2 S96A1	4,7	41	6,1	1700	7	4	11	ČR	50°51'59.957"N, 15°17'16.048"E
SP2 S95D2	4,1	57	11	1930	3,6	1,7	5,5	Skotsko	57°26'44.69"N, 5°24'49.04"W
SP2 S95F9	6,1	37	10	640	8	6	11	Skotsko	57°21'32.61"N, 4°52'46.14"W
SP2 S116D5	6,5	30	16	1600	3,8	2	6	Norsko	68°30'32.159"N 15°52'58.522"E
SP2 S100F10	4,5	20	-	2125	6,8	5,2	10,5	Norsko	60°53'14.14"N, 5°34'54.21"E

Tab. 1: Parametry prostředí kultivovaných kmenů.

3.1.3 Morfologická analýza kultivovaných kmenů

Hlavním z cílů práce bylo zjistit, zda existují v rámci *S. sphagnicola* kryptické druhy. Dvě kryptické linie byly rozpoznány fylogenetickou analýzou. Dále mě zajímalo, dají-li se kultivované kmeny od sebe morfologicky rozlišit a zda toto rozlišení bude korelovat s rozdělením, které vyšlo z fylogenetické analýzy. S naměřenými parametry šupiny (délka šupiny, šířka šupiny, délka ostnu, šířka ostnu, délka rimu) byly prováděny statistické analýzy. Všechny měřené parametry měly normální rozložení hodnot. Mezi hodnotami parametrů délka šupiny, šířka šupiny, délka ostnu, délka rimu byly prokázány signifikantní rozdíly. F-hodnota t-testů ukazuje sílu testu. Délka ostnu rozliší od sebe linie mnohem silněji než ostatní znaky. U šířky ostnu se signifikantní rozdíl neprokázal (tab. 3). Pomocí krabicových diagramů bylo znázorněno rozpětí parametrů měřených na šupinách. Patrný je rozdíl v rozpětí parametru délka ostnu. Délka ostnu druhu SP1 má užší rozpětí hodnot než délka ostnu druhu SP2 (obr. 9).

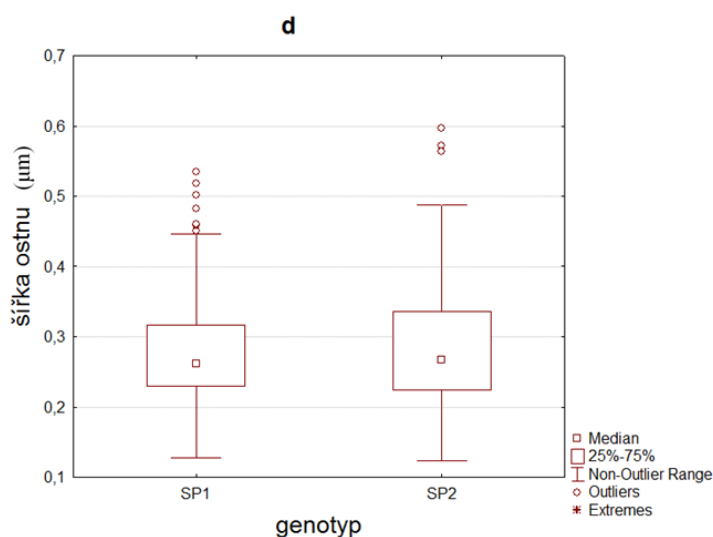
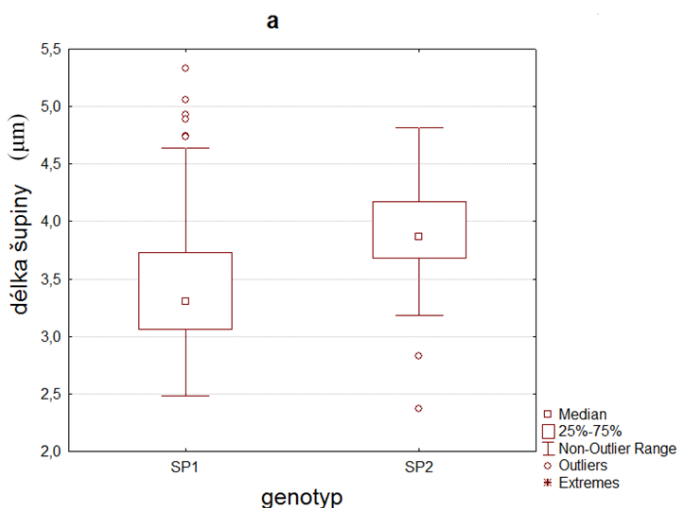
Na pěti kmenech byla měřena plocha póru bazální desky, kulatost póru bazální desky. Tyto parametry nevykazovaly signifikantní rozdíly (tab. 2). Proto dál nebyly měřeny.

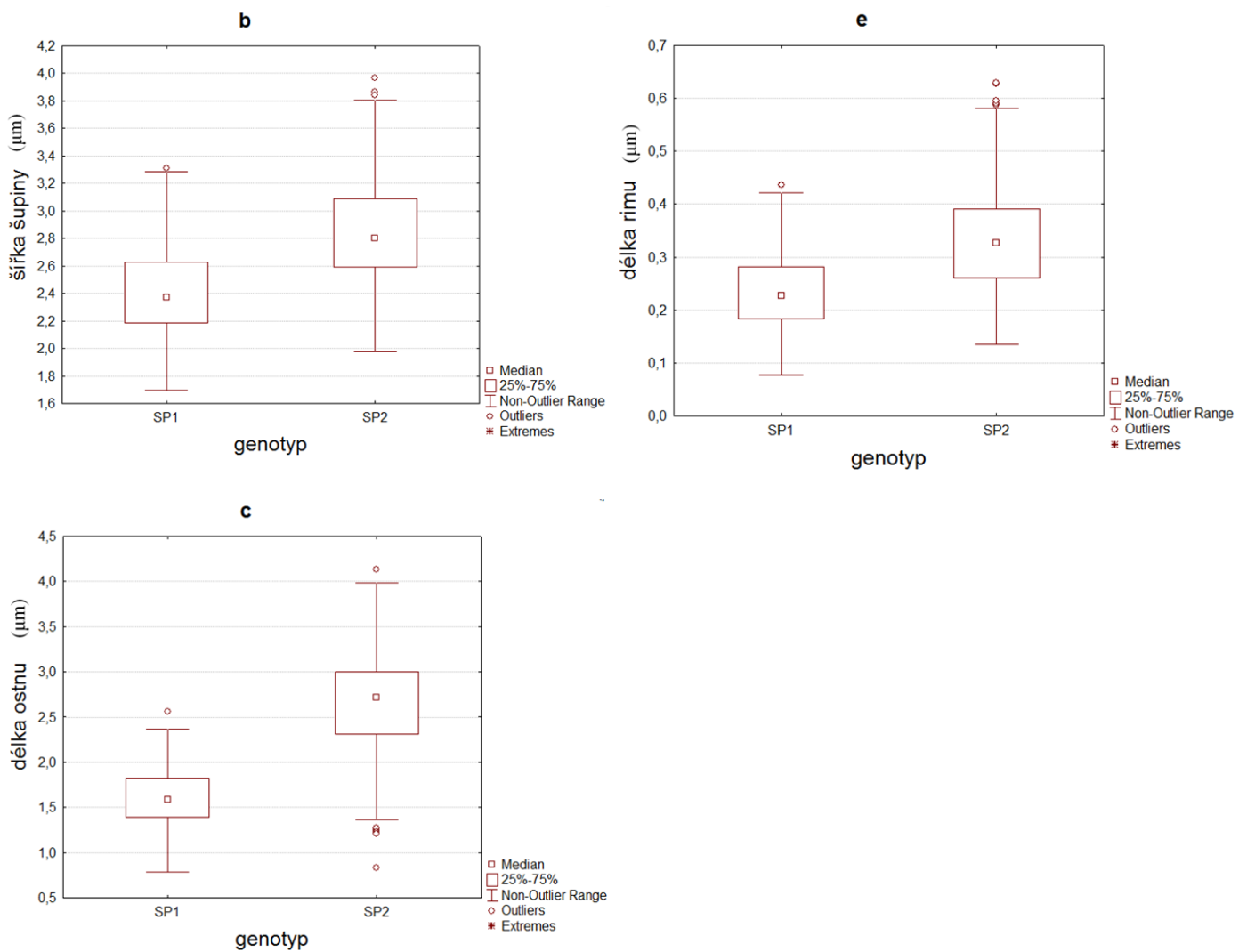
parametr	p-hodnota
plocha díry	0,397
cirkularita	< 0,001
kulatost	0,447

Tab. 2: T-test rozdílů měřených parametrů na póru bazální desky mezi SP1 a SP2

parametr	p- hodnota	f-hodnota
délka šupiny (μm)	< 0,001	2,11
šířka šupiny (μm)	< 0,001	1,27
délka ostnu (μm)	< 0,001	3,3
šířka ostnu (μm)	0	1,24
délka rimu (μm)	< 0,001	1,67

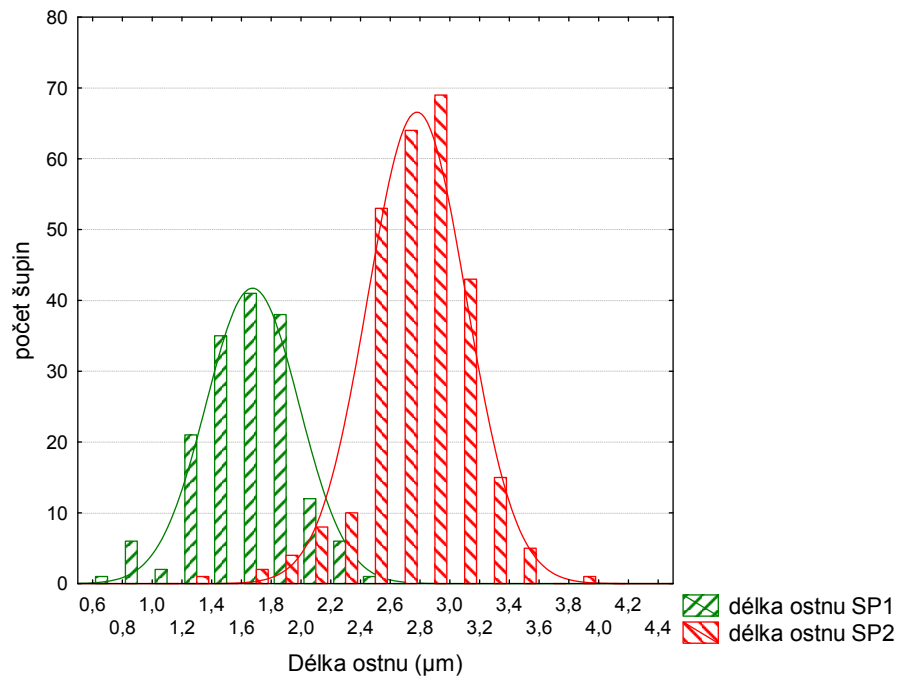
Tab. 3: T- test rozdílů měřených parametrů mezi genotypem SP1 a SP2.





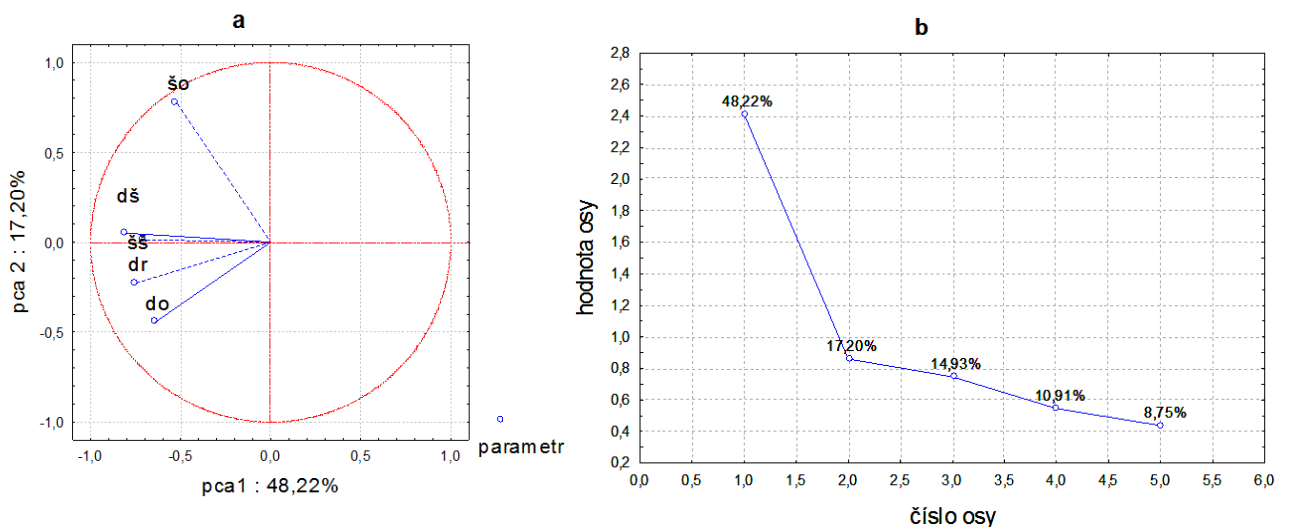
Obr. 9: Krabicové grafy parametrů měřených na šupinách kultivovaných kmenů rozlišené pro linie SP1 a SP2: a- délka šupiny, b- šířka šupiny, c- délka ostnu, d- šířka ostnu, e- délka rimu.

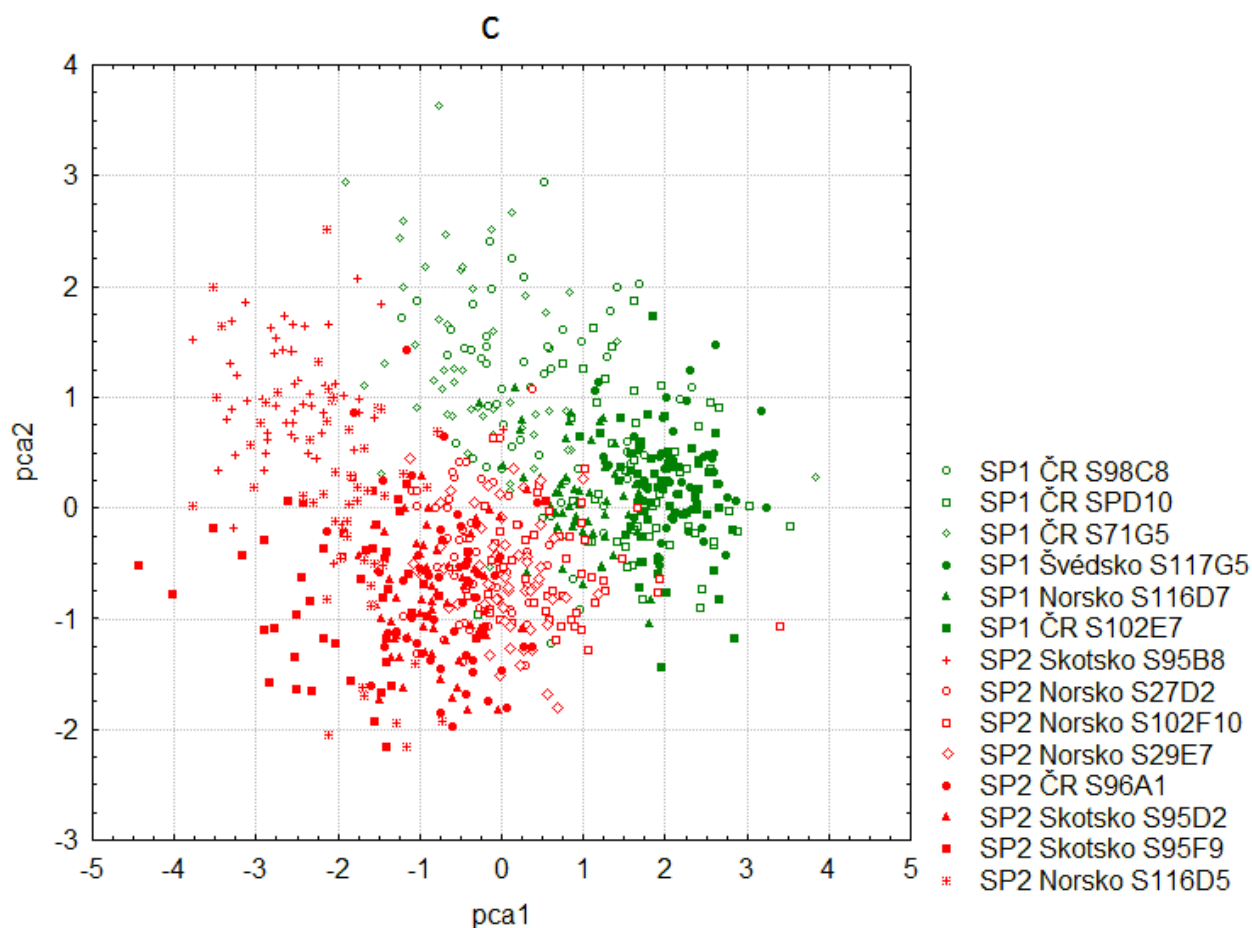
Rozdíly jednotlivých parametrů mezi liniemi SP1 a SP2 byly znázorněny také histogramy. Největší rozdíl vykazoval opět parametr délka ostnu (obr. 10).



Obr. 10: Histogram délek ostnů druhů SP1,SP2.

PCA analýza prováděná se všemi pěti měřenými znaky dokázala druhy poměrně dobře rozdělit. Ordinační diagram vysvětlující variabilitu šupin pomocí prvních dvou os PCA (obr. 11 c) znázorňuje rozdělení jednotlivých kmenů a oddělení linií SP1 a SP2. První osa vysvětluje téměř polovinu variability měřených morfologických znaků (48%) variability, druhá osa vysvětluje 17% (obr. 11 b). Ordinační diagram vysvětluje, které parametry hrají v rozložení šupin roli. Nejvýznamnější rozdíl v rozdělení mezi druhy SP1 a SP2 je v parametru délka ostnu. Naopak šířka ostnu vystihuje spíše variabilitu uvnitř SP1, SP2 (obr. 11 a).





Obr. 11: PCA analýza kultivovaných kmenů: a-ordinační diagram rozložení morfologických znaků podél prvních dvou os, b- míra vysvětlené variability osami PCA, c- ordinační diagram rozložení šupin kultivovaných kmenů podél prvních dvou os.

Pro zjištění, které parametry měřené na šupinách nejlépe vystihují variabilitu mezi liniemi, byla využita diskriminační analýza. Diskriminační analýza (tab. 4) ukázala, že signifikantní rozdíl vykazují všechny na šupinách měřené parametry. F-hodnota potvrzuje, že nejsignifikantnější rozdíly jsou mezi délkami ostnu. Parametry, které nejlépe rozliší mezi druhy, v souboru všech znaků jsou délka rimu a délka šupiny. Pokud bychom posuzovali samostatnou schopnost jednoho parametru rozlišit mezi druhy, nejlepší výsledky by byly dosaženy s parametrem délka ostnu, což je vidět na výsledcích pro parciální lambda. Ostatní parametry samostatně nemají skoro žádnou schopnost spolehlivě mezi druhy rozlišit.

	spolehlivost určení (%)	SP1	SP2
SP1	93,97	312	20
SP2	93,11	30	406
Celkem	93,48	342	426

parametr	Wilksova lambda	parciální Wilksova lambda	f-hodnota	p-hodnota
délka šupiny (μm)	0,291	0,96	31,11	< 0,001
šířka šupiny (μm)	0,345	0,81	177,63	< 0,001
délka ostnu (μm)	0,554	0,504	747,78	< 0,001
šířka ostnu (μm)	0,321	0,87	113,32	< 0,001
délka rimu (μm)	0,288	0,971	22,15	< 0,001

Tab.4 : Diskriminační analýza kultivovaných kmenů.

Diskriminační analýza prováděná na všech pěti měřených znacích má 93,5% spolehlivost určení šupiny do linie SP1 nebo SP2. Diskriminační analýza prováděná s poměry znaků (pro poměry jsou v analýzách jsou využívány zkratky vytvořené z počátečních písmen slov měřených parametrů) udává o 10 % horší rozlišení mezi liniemi 83,5% spolehlivost zařazení (tab. 5). Některé z poměrů (dš/do, dš/dr, šš/do, šo/dr) nevykazují signifikantní rozdíly pro rozlišení mezi liniemi.

	spolehlivost určení (%)	SP1	SP2
SP1	83,13	276	56
SP2	83,94	70	366
Celkem	83,59	346	422

parametr	wilksova lambda	parciální wilksova lambda	f-hodnota	p- hodnota
dš/šš	0,414	0,979	16,18	< 0,001
dš/do	0,405	0,999	0	0,955
dš/šo	0,425	0,953	36,81	< 0,001
dš/dr	0,405	0,999	0,09	0,759
šš/do	0,405	0,999	0,31	0,572
šš/šo	0,428	0,947	41,78	< 0,001
šš/dr	0,408	0,994	4,48	0,034
do/šo	0,422	0,96	30,89	< 0,001
do/dr	0,417	0,971	22,32	< 0,001
šo/dr	0,406	0,998	0,92	0,337

Tab. 5: Diskriminační analýza poměrů parametrů měřených na šupinách

3.2 Testování závislosti morfologických vlastností kultivovaných kmenů na podmínkách prostředí

Bylo zjištěno, že tvar šupin se signifikantně liší mezi genotypem SP1 a SP2. Zdá se tedy, že hlavní variabilitu šupin lze vysvětlit genetickými rozdíly. Šupiny si nesou v genetické informaci adaptaci k prostředí, ze kterého pocházejí a tato adaptace přetrvává. Jelikož byly vypěstovány všechny kmeny ve stejných podmínkách, variabilita, která mezi jednotlivými kmeny v rámci genotypu SP1 a v rámci genotypu SP2 existuje, bude vysvětlena nejspíš markerem, který je variabilnější než ITS region. Záměrem těchto testů bylo zjistit, zda podmínky prostředí, ze kterých kmeny pocházejí souvisí s tím, jaký tvar mají šupiny vypěstované v kultuře a zda nějaký z měřených morfologických znaků či poměrů znaků koreluje s velikostí některého ze získaných parametrů přírodního prostředí. K tomu bylo využito regrese.

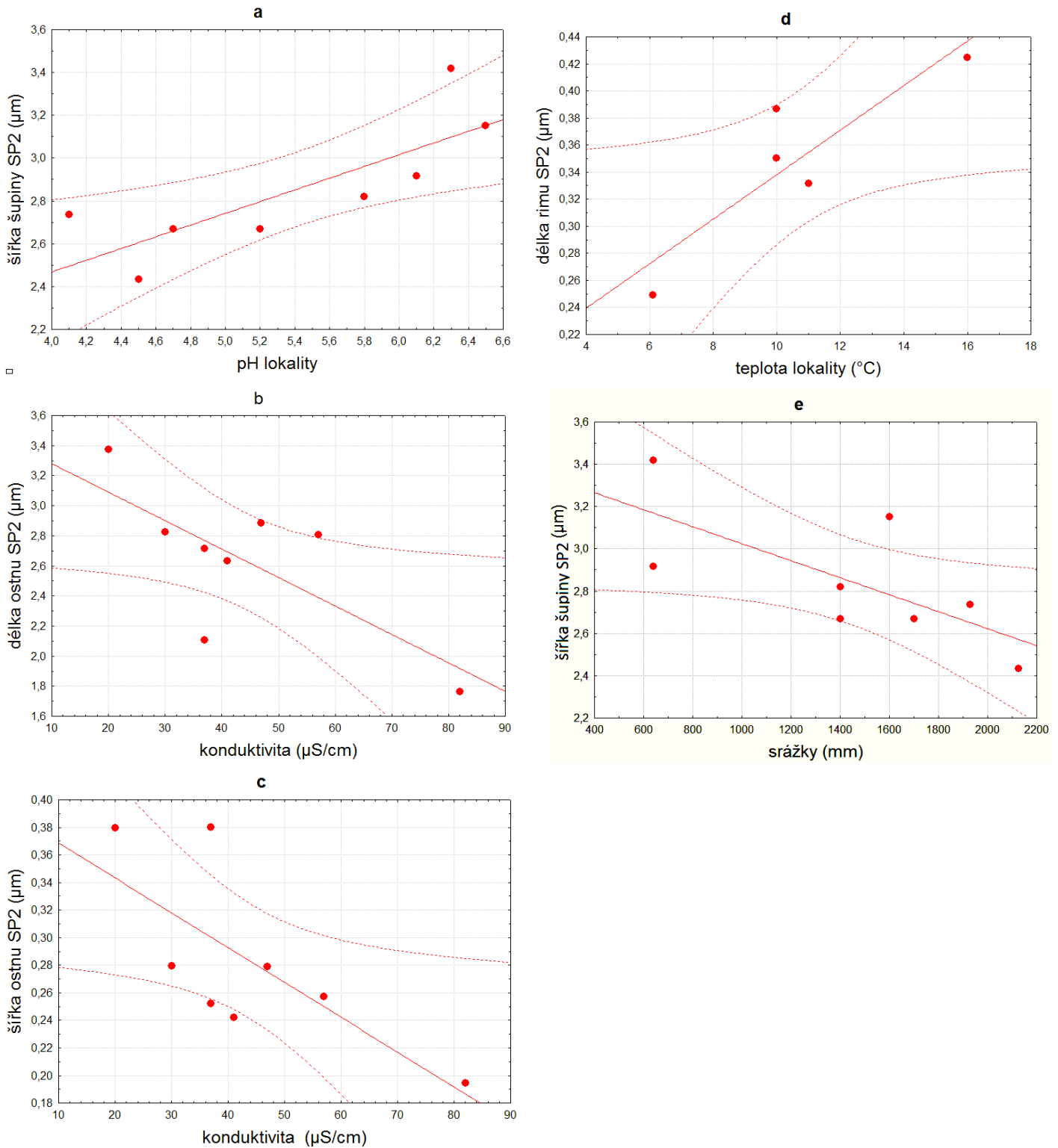
Většina měřených parametrů kultur není přímo závislá na podmínkách prostředí, ze kterých byl prováděn odběr. Ani dlouhodobé podmínky prostředí -průměrné roční teploty lokalit, průměrné minimální a průměrné maximální teploty lokalit a průměrné srážky nehrají ve většině případů významnou roli (tab. 6).

Souvislost byla zjištěna většinou v případě linie SP2: mezi šířkou šupiny a pH lokality, délkou ostnu i šířkou ostnu a konduktivitou, mezi délkou rimu a teplotou odběrového místa (obr. 12). Vzhledem k tomu, že pro linii SP1 existuje nižší počet pozorování, nebylo u ní možné korelace ve většině testovaných případů prokázat.

Je nutné brát též v potaz, že počet pozorování je nízký a korelace jsou podpořené slabě. V některých případech každá z linií vykazuje spíše opačný trend. Zdá se, že linie SP1 na rozdíl od linie SP2 téměř nereaguje na změnu konduktivity.

Parametr (μm)	dš SP1	šš SP1	do SP1	šo SP1	dr SP1	dš SP2	šš SP2	do SP2	šo SP2	dr SP2
srážky (mm)	p=0,82	p=0,88	p=0,10	p=0,49	p=0,05	p=0,95	p=0,04	p=0,17	p=0,94	p=0,80
prům teplota/rok (°C)	p=0,24	p=0,48	p=0,13	p=0,24	p=0,86	p=0,96	p=0,76	p=0,57	p=0,92	p=0,31
min tepl (°C)	p=0,35	p=0,70	p=0,16	p=0,40	p=0,97	p=0,23	p=0,61	p=0,33	p=0,29	p=0,10
max. tepl. /rok (°C)	p=0,44	p=0,68	p=0,07	p=0,34	p=0,61	p=0,23	p=0,60	p=0,33	p=0,29	p=0,09
pH lokality	p=0,47	p=0,58	p=0,69	p=0,60	p=0,22	p=0,89	p=0,01	p=0,23	p=0,98	p=0,32
konduktivita ($\mu\text{S/cm}$)	p=0,95	p=0,99	p=0,09	p=0,55	p=0,66	p=0,08	p=0,93	p=0,04	p=0,03	p=0,10
tepl. lokality (°C)	p=0,56	p=0,55	p=0,56	p=0,85	p=0,20	p=0,80	p=0,44	p=0,59	p=0,81	p=0,04

Tab. 6 : P- hodnoty korelací morfologických znaků a podmínek prostředí (signifikantní hodnoty zvýrazněné).



Obr. 12: Regresní přímky znázorňující závislost morfologie kultivovaných kmenů SP2 u kterých se prokázala regresní závislost na podmínkách prostředí, ze kterého pocházejí: a- šířka šupiny a pH lokality ($r^2=0,63$), b- délka ostnu a konduktivita ($r^2=0,52$), c- šířka ostnu a konduktivita ($r^2=0,53$), d- délka rímu a teplota lokality ($r^2=0,78$), e- šířka šupiny a průměrné roční srážky ($r^2=0,50$).

3.3 Rozdíly v parametrech prostředí získaných sekvencí

Analýzou podmínek prostředí získaných sekvencí byly zjištěné patrné rozdíly v ekologických nárocích i když se, jak již bylo řečeno, oba druhy mohou vyskytovat v jedné lokalitě, jelikož jejich optima podmínek se prolínají. Mezi druhy SP1 a SP2 byl prokázán signifikantní rozdíl v konduktivitě při odběru a průměrných ročních srážkách. (tab.7).

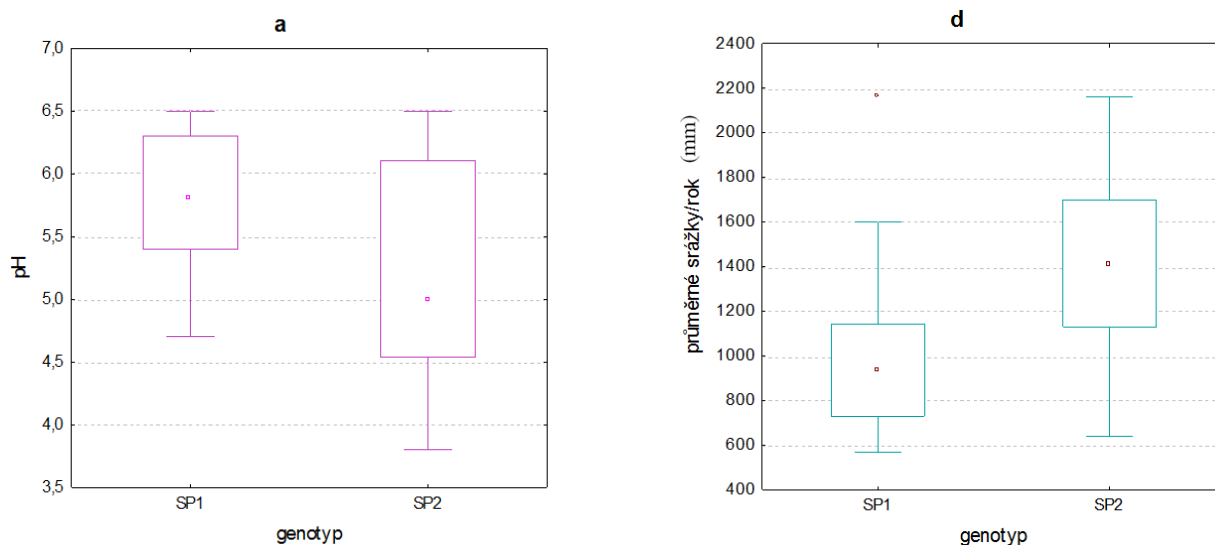
Na krabicovém grafu (obr xx) je ale zřetelné, že linie SP2 je schopna se vyskytovat v nižším pH, než linie SP1. Linie SP1 má širší rozpětí konduktivity, zatímco linie SP2 se vyskytuje pouze v prostředí s nižší konduktivitou. Teploty odběru linie SP2 jsou nepatrně nižší než u linie SP1.

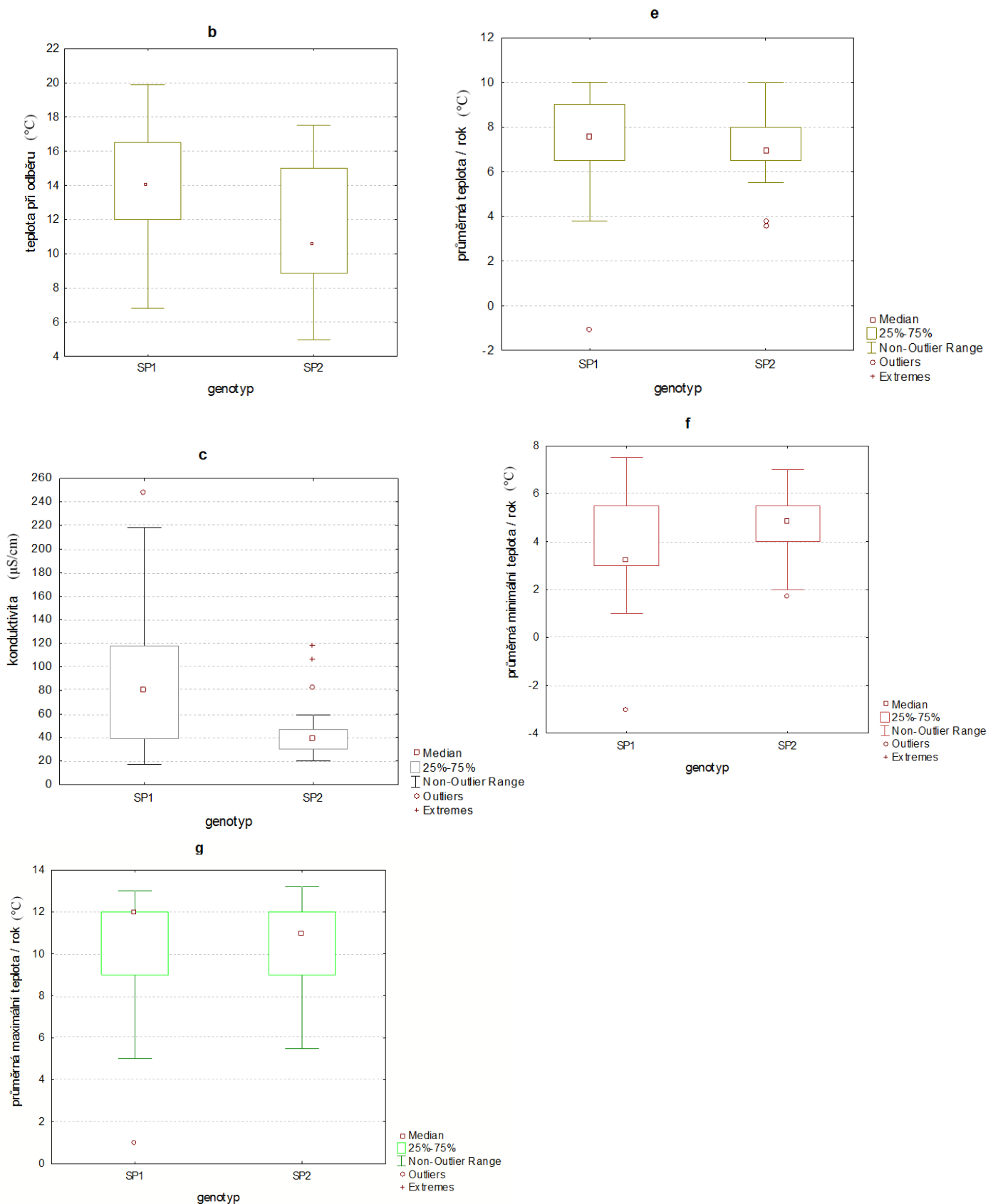
V oblastech, kde byla nalézána linie SP2, jsou vyšší průměrné roční srážky.

Průměrné roční teploty, průměrné roční minimální a maximální teploty se o mnoho neliší. Zajímavé na teplotách je, že linie SP2 má nepatrně nižší teplotu odběru, zatímco průměrná minimální teplota lokality je o něco vyšší než u linie SP1. Průměrné roční teploty a průměrné maximální roční teploty jsou u obou druhů velmi podobné (obr. 13).

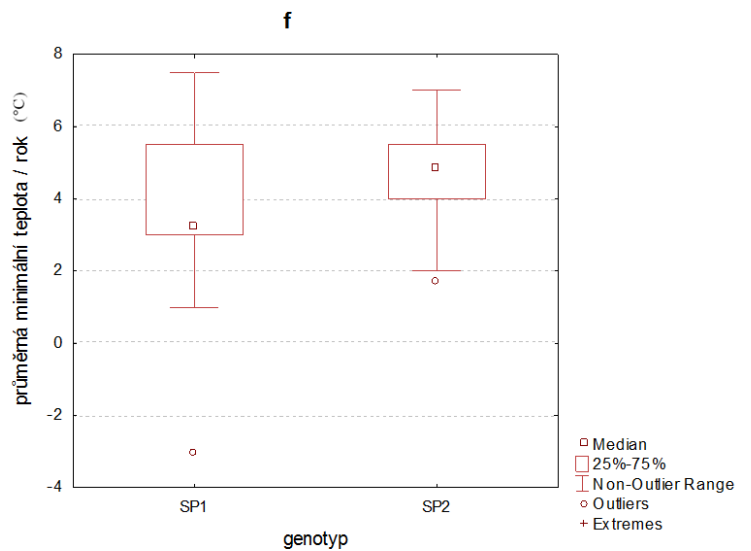
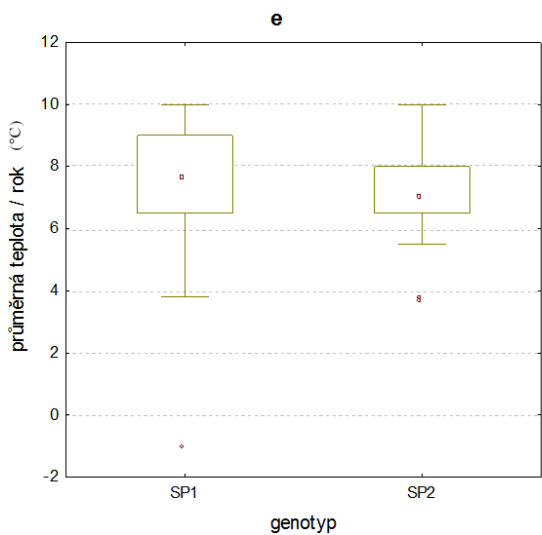
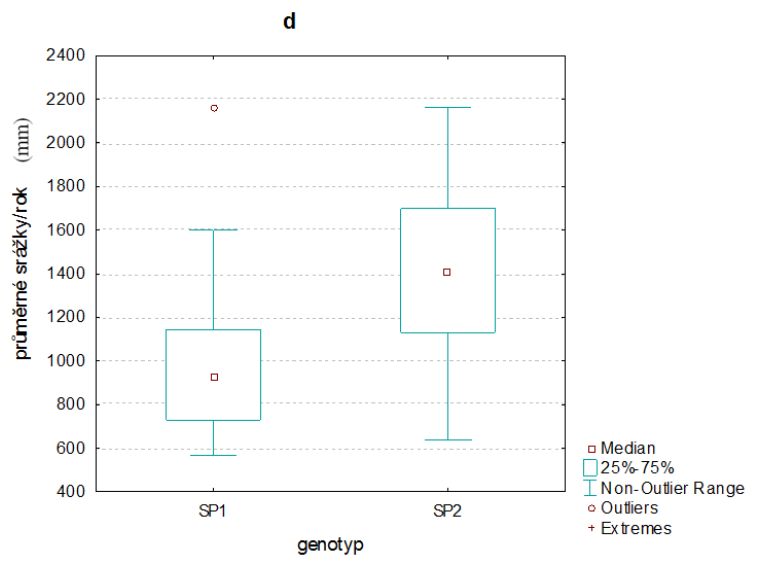
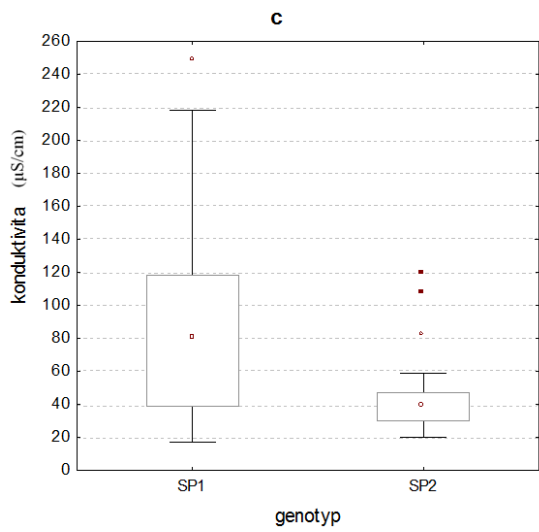
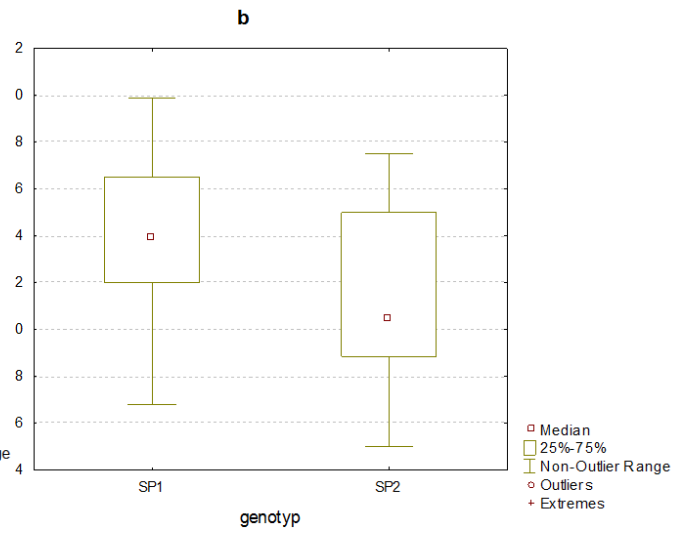
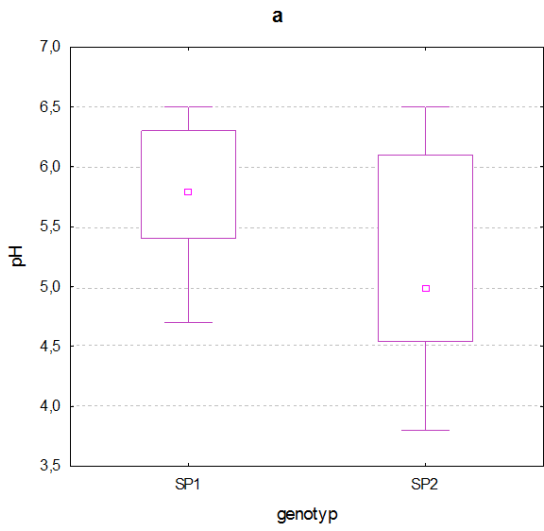
parametr prostředí	p-hodnota	KW-hodnota
pH	0,053	3,75
konduktivita ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	0,038	4,31
teplota odběru ($^{\circ}\text{C}$)	0,121	2,39
srážky (mm /rok)	0,037	4,35
prům. roční teplota ($^{\circ}\text{C}$)	0,441	0,59
prům. min. roční teplota ($^{\circ}\text{C}$)	0,164	1,94
prům max. roční teplota ($^{\circ}\text{C}$)	0,39	0,74

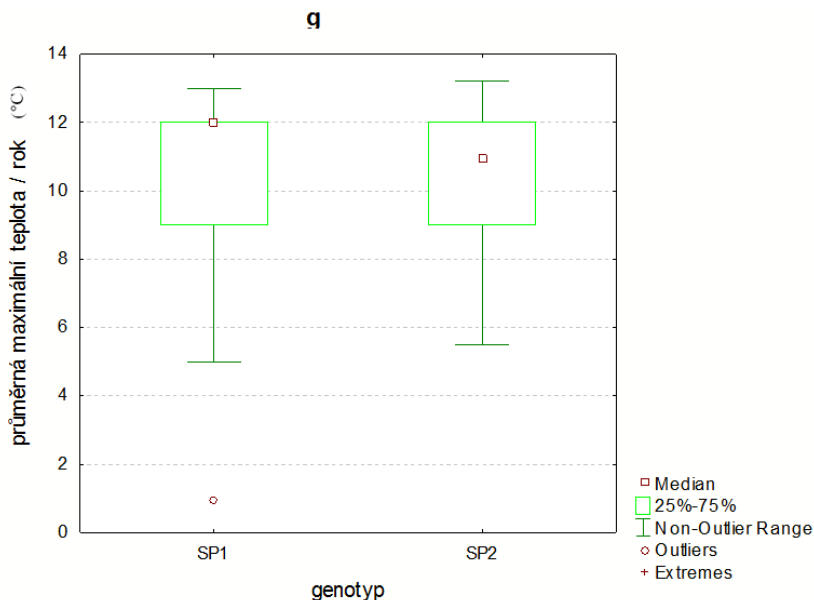
Tab. 7: Kruskal-Wallisův test- rozdíly mezi ekologickými nároky genotypu SP1 a SP2.





Obr. 13: Krabicové grafy vystihující rozdíly mezi ekologickými nároky linie SP1 a SP2 : a- pH odběrového místa, b- konduktivita odběrového místa, c- teplota odběrového místa, d- průměrné roční srážky, e- průměrné roční teploty, f- průměrné minimální roční teploty, g- průměrné maximální roční teploty.





Obr. 14: Krabicové grafy vystihující rozdíly mezi ekologickými nároky linie SP1 a SP2 : a- pH odběrového místa, b- konduktivita odběrového místa, c- teplota odběrového místa, d- průměrné roční srážky, e- průměrné roční teploty, f- průměrné minimální roční teploty, g- průměrné maximální roční teploty.

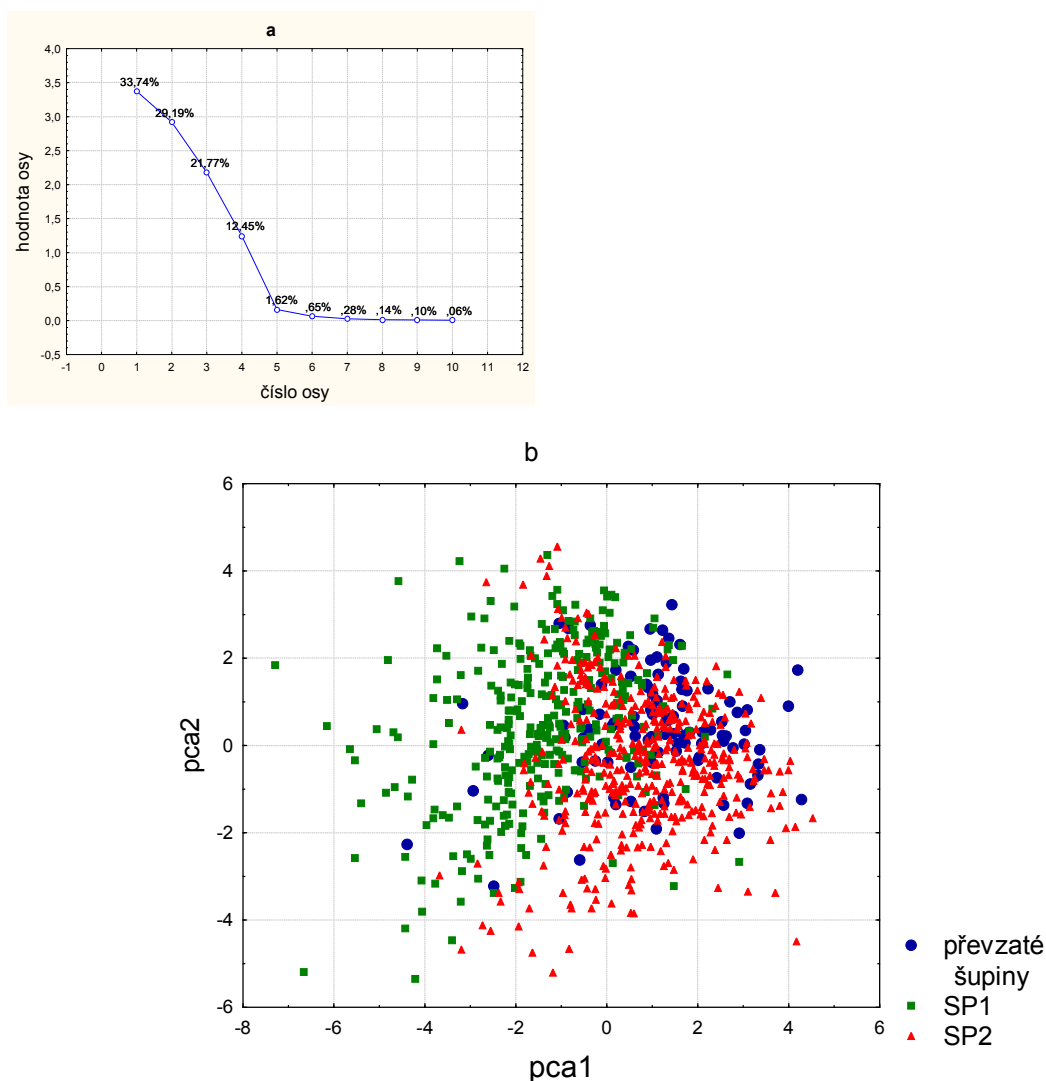
Pro geografický přehled byla vytvořena mapa výskytu získaných sekvencí (obr. 4). Korejský izolát není v mapě vyobrazen. GPS souřadnice se nepodařilo získat. V rámci Evropy se vyskytují na většině oblastí buď ne v přímo v jednom místě obě linie.

3.4 Analýza šupin získaných z publikací

K tomu, aby mohlo být otestováno co nejvíce šupin a tím poskytnuta ucelenější studie, byly prohledávány databáze a publikace, které se o *S. sphagnicola* v minulosti zmiňovaly. Podařilo se shromáždit 99 fotografií šupin *S. sphagnicola*. Některé pocházejí z publikací, další z databáze chrysophytes.eu a některé byly poskytnuté vedoucím práce (pro zjednodušení je v práci používán výraz převzaté šupiny). Z některých lokalit se podařilo získat více šupin. PCA analýza byla provedena na získaných datech současně s kultivovanými kmeny, aby pomocí ordinačního diagramu mohla být znázorněna pozice převzatých šupin mezi šupinami kultur. První osa PCA vysvětluje 34% variability, druhá 29% variability (obr. 15). Na ordinačním diagramu je patrné i horší rozlišení kultivovaných kmenů mezi linie SP1 a SP2 při použití poměrových znaků.

Pozitivní zprávou bylo, že převzaté šupiny leží mezi šupinami kultivovaných kmenů a že netvoří samostatný shluk buď mimo kultivované kmeny, anebo pouze v oblasti jednoho z kultivovaných kmenů. Přesto se většina převzatých šupin řadí k linii SP2. Na tomto souboru

dat byla prováděna také diskriminační analýza, aby se ukázalo, jak se získané šupiny rozřadí mezi linie SP1 a SP2. Většina šupin padla mezi linii SP2. Linie SP2 se z pohledu nashromážděných dat sice jeví jako častější než linie SP1, ale vzhledem k tomu, že se předpokládá jistý efekt kultivace, je toto rozdělení nutné brát s větší rezervou, než jakou udává diskriminační analýza pro kultivované kmeny. Pokud byly kultivované kmeny rozděleny při použití poměrů diskriminační analýzou se správností 83%, odhadem by se dalo říct, že každá třetí až čtvrtá převzatá šupina je zařazena špatně. U některých nálezů se však dá říct téměř s jistotou, do kterého z kmenů patří, jelikož k nim bylo získáno více než jedna šupina, anebo byla známá sekvence ITS regionu.

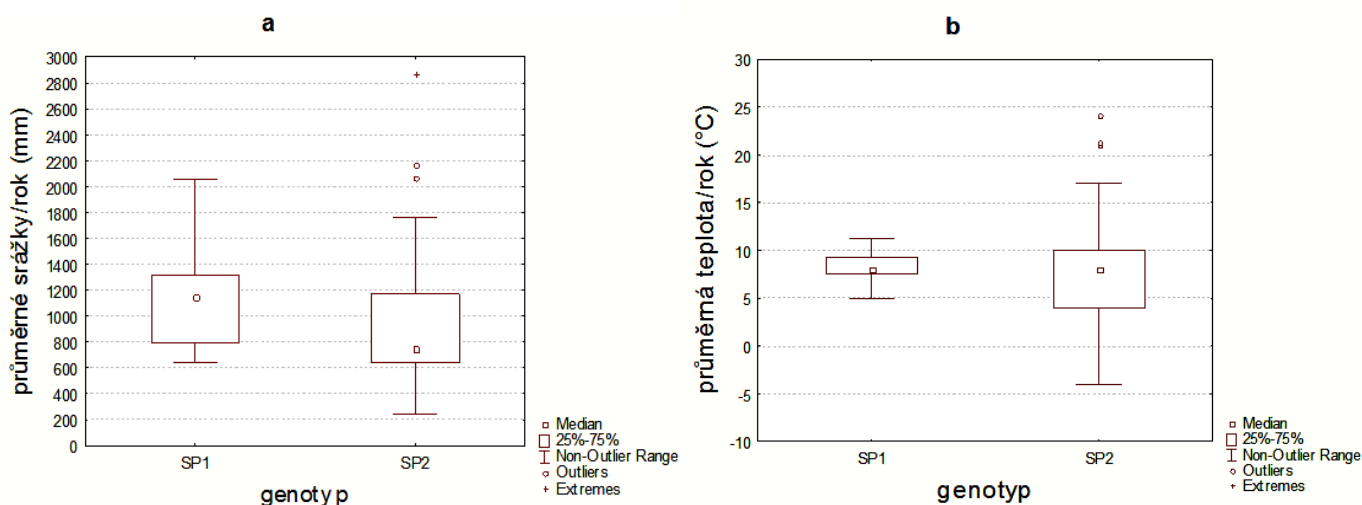


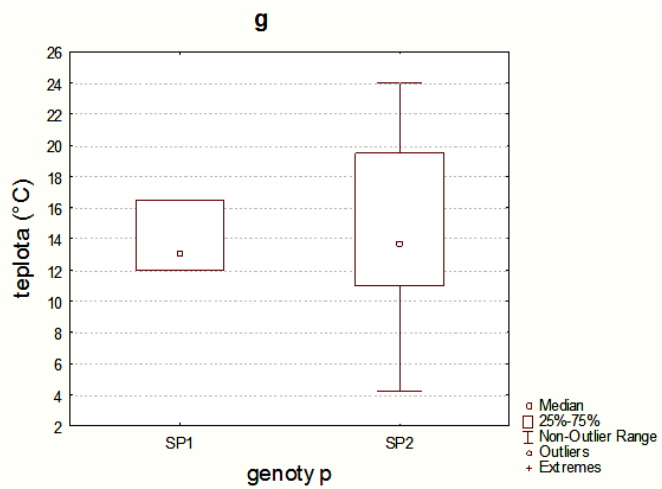
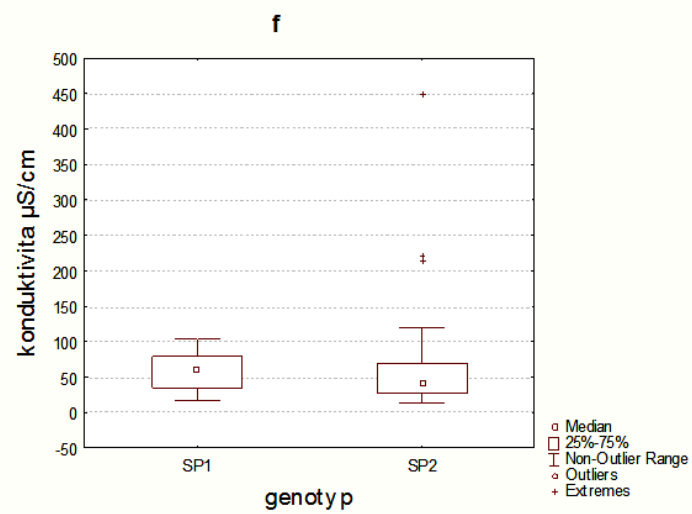
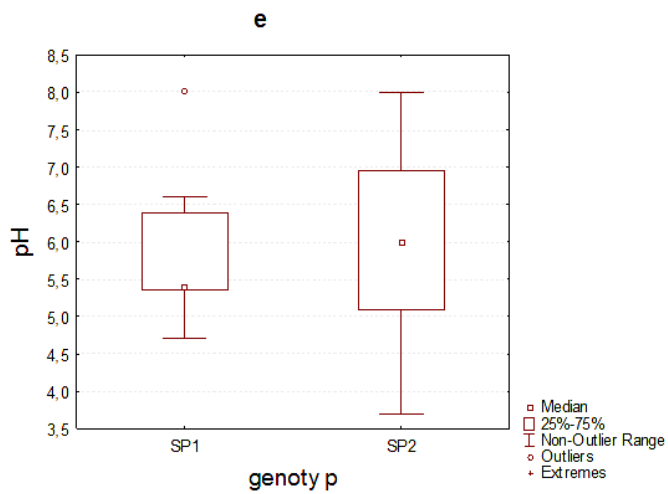
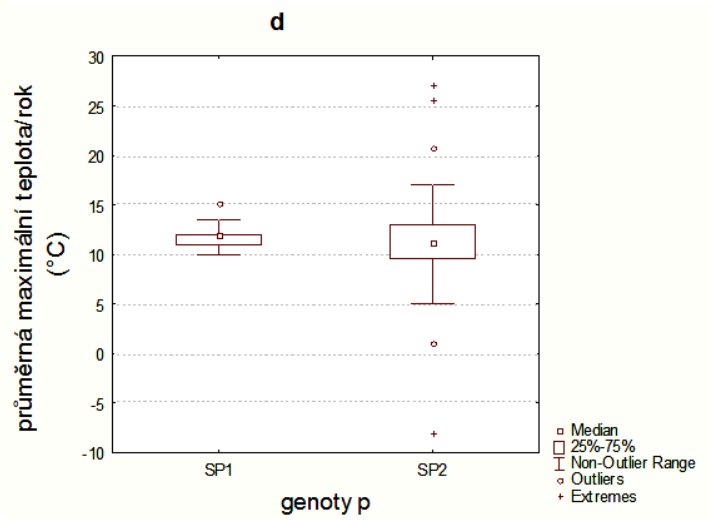
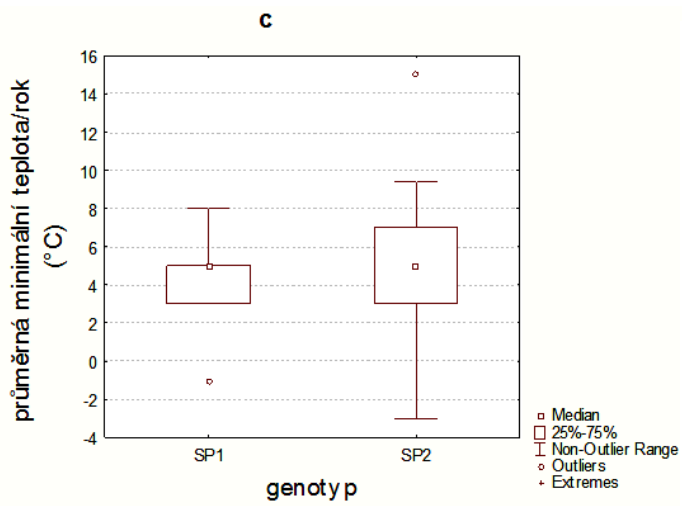
Obr. 15: PCA analýza poměrových znaků šupin z článků a kultivovaných kmenů: a- míra vysvětlené variability osami PCA, b- ordinační diagram rozložení měřených šupin podél prvních dvou os PCA.

Rozdělení šupin diskriminační analýzou bylo provedeno hlavně za účelem zhodnotit na větším datasetu než poskytovalo 14 kultivovaných kmenů, zda je možné blíže specifikovat ekologické nároky obou linií. I když tento aspekt není příliš častý, obě linie je možné nalézt v jednom místě. Nebyly proto předpokládány silné rozdíly, jednalo se spíše o zjištění a porovnání ekologických optim obou linií. K testování rozdílů byl použit Kruskal-Wallisův test. Žádný z parametrů ale nevykazoval mezi liniemi signifikantní rozdíly, přesto je vidět, že naměřené podmínky prostředí každé z linií se mírně liší (tab. 8). Rozpětí podmínek bylo zobrazeno pomocí krabicových grafů, které na několika ekologických podmínkách (průměrná roční teplota, průměrná roční minimální i maximální teplota, teplota odběrového místa) vypovídají o užším spektru podmínek u linie SP1 (obr. 16). Při použití většího datasetu šupin (převzatých) se již nejevily rozdíly mezi přírodními podmínkami druhů tak zřetelné, jako při porovnání nároků kultivovaných kmenů (v kap. 3.1.3.).

parametr	KW- hodnota	p-hodnota
průměrné srážky /rok (mm)	3,22	0,073
průměrná teplota /rok °C	0,51	0,473
průměrná minimální teplota /rok °C	0,21	0,647
průměrná maximální teplota /rok °C	1,11	0,291
pH	0,2	0,656
konduktivita (μS/cm)	0,38	0,538
teplota odb. místa °C	1,21	-

Tab. 8: Kruskal-Wallisův test - rozdíly v ekologických podmínkách mezi liniemi SP1 a SP2 (u převzatých šupin).





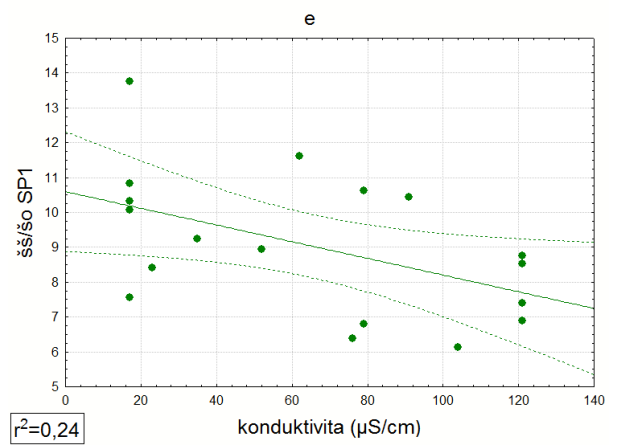
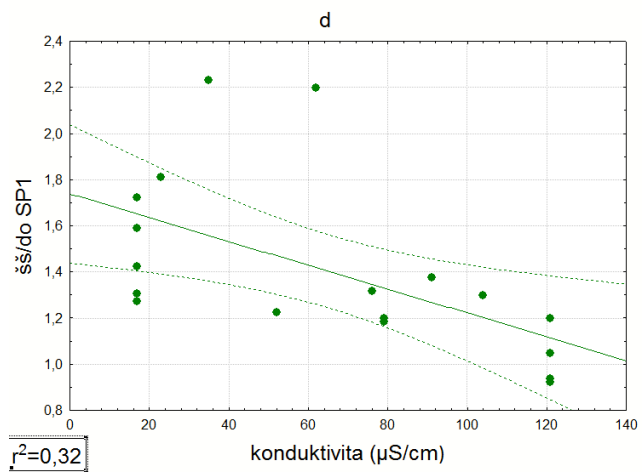
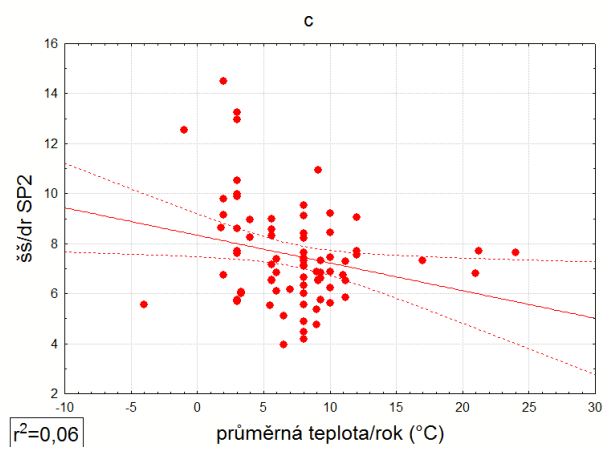
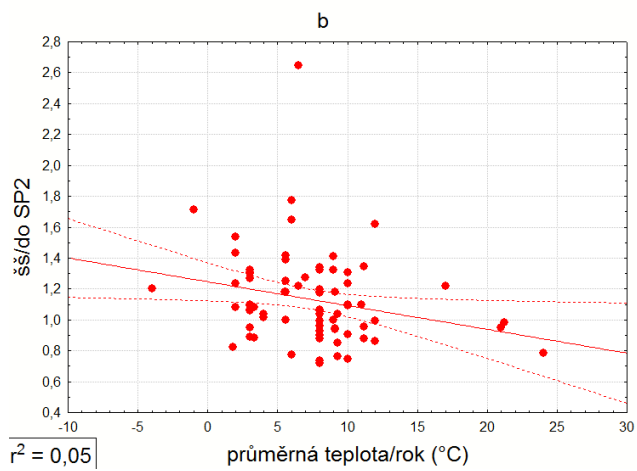
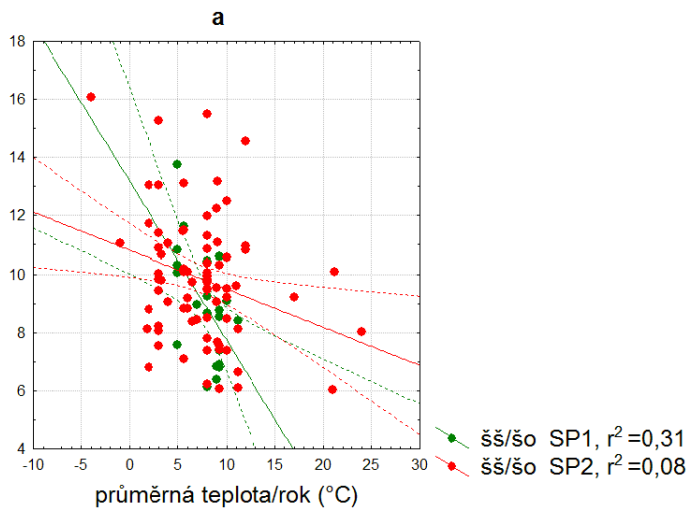
Obr. 16: Krabicové grafy - znázornění rozdílů ekologických podmínek mezi liniemi SP1 a SP2 (u převzatých šupin)

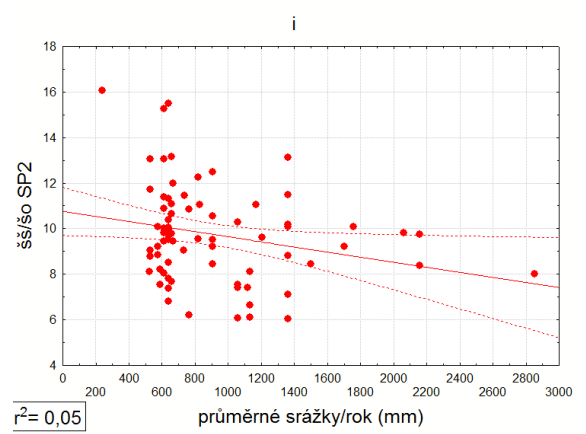
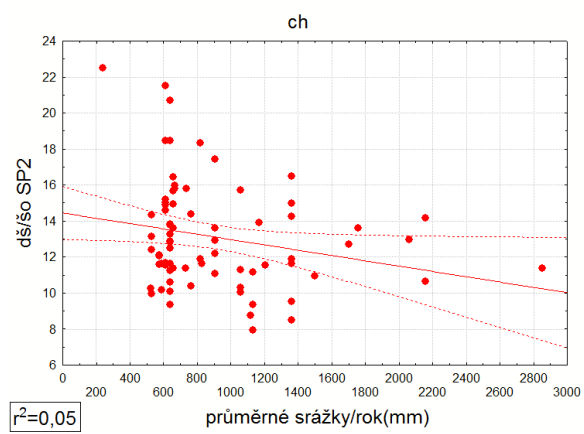
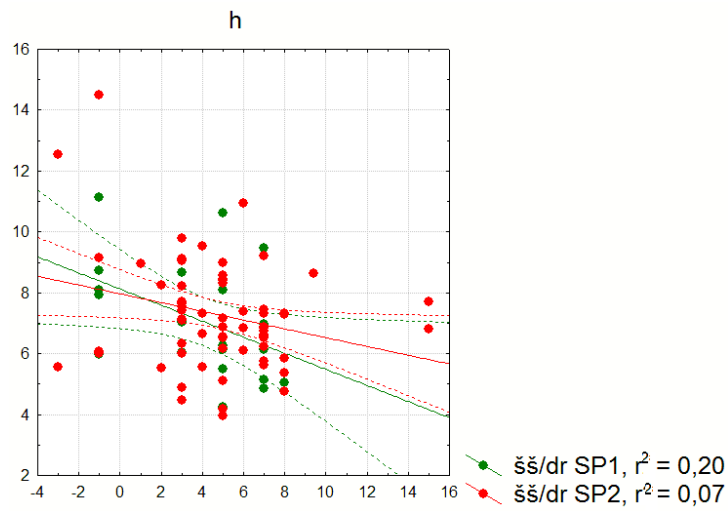
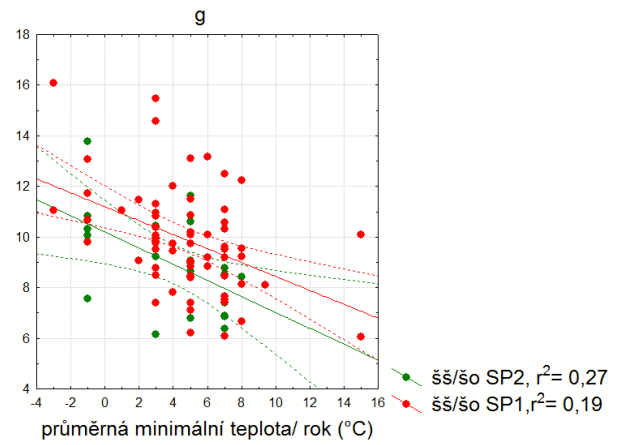
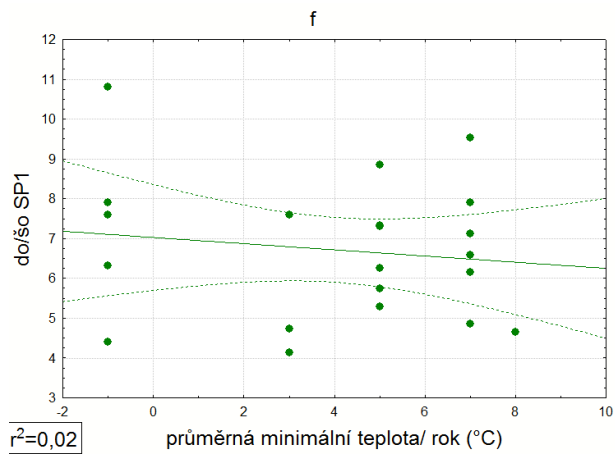
Na získaných datech bylo také zkoumáno, zda a jakým způsobem ekologické podmínky ovlivňují poměry znaků měřených na šupinách. Testovány byly korelace mezi jednotlivými morfologickými znaky a podmínkami prostředí (pH, konduktivita, teplota při odběru z lokality a průměrná teplota, průměrná minimální a maximální teplota, průměrné srážky lokality). Většina poměrů není závislá na žádném z naměřených ani zjištěných parametrů. Několik závislostí se ale prokázalo (tab 9, obr. 17). Ale ani regresní přímky, u kterých vyšly korelace signifikantně bohužel nemají příliš značný sklon. Hodnota R^2 je extrémně nízká, tudíž se jedná o velmi slabé závislosti. Výsledky s vyšší schopností vypovídat o morfologii šupin linie SP1 a SP2 v přírodě a její závislosti na podmínkách prostředí by byly dosaženy analýzou nepoměrových znaků (ta však z výše uvedených důvodů nebyla prováděna) a také možností posuzovat šupiny z článků podle šupin přírodních odběrů, nikoliv kultur.

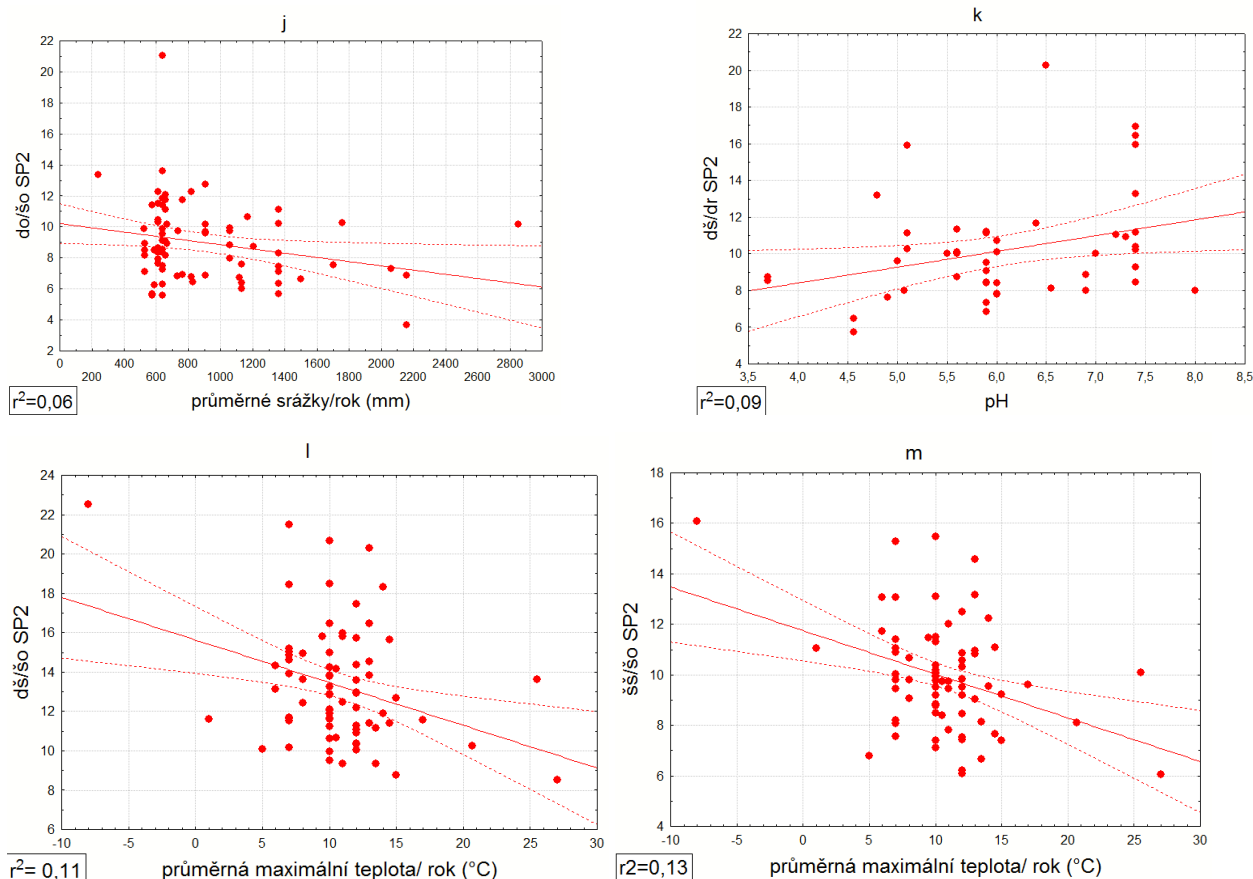
	dš/šš SP1	dš/do SP1	dš/šo SP1	dš/dr SP1	šš/do SP1	šš/šo SP1	šš/dr SP1	do/šo SP1	do/dr SP1	šo/dr SP1
Prům. srážky mm/rok	p=0,21	p=0,88	p=0,37	p=0,88	p=0,53	p=0,81	p=0,57	p=0,57	p=0,92	p=0,42
Prům. teplota mm/rok	p=0,22	p=0,48	p=0,07	p=0,39	p=0,14	p=0,01	p=0,15	p=0,60	p=0,97	p=0,56
pH	p=0,28	p=0,40	p=0,19	p=0,35	p=0,68	p=0,05	p=0,14	p=0,08	p=0,30	p=0,71
konduktivita (μS/cm)	p=0,82	p=0,05	p=0,06	p=0,41	p=0,01	p=0,03	p=0,32	p=0,60	p=0,29	p=0,27
teplota (odběr)°C	p=0,66	p=0,15	p=0,73	p=0,39	p=0,09	p=0,81	p=0,39	p=0,14	p=0,55	p=0,62
Prům. min. teplota/ rok°C	p=0,03	p=0,83	p=0,25	p=0,27	p=0,22	p=0,01	p=0,04	p=0,54	p=0,71	p=0,94
Prům. max. teplota/ rok°C	p=0,66	p=0,07	p=0,70	p=0,27	p=0,08	p=0,93	p=0,22	p=0,21	p=0,06	p=0,29

	dš/šš SP2	dš/do SP2	dš/šo SP2	dš/dr SP2	šš/do SP2	šš/šo SP2	šš/dr SP2	do/šo SP2	do/dr SP2	šo/dr SP2
Prům. srážky mm/rok	p=0,95	p=0,10	p=0,04	p=0,18	p=0,17	p=0,03	p=0,17	p=0,03	p=0,24	p=0,84
Prům. teplota mm/rok	p=0,26	p=0,12	p=0,07	p=0,09	p=0,03	p=0,01	p=0,02	p=0,95	p=0,91	p=0,99
pH	p=0,27	p=0,59	p=0,44	p=0,03	p=0,29	p=0,83	p=0,20	p=0,55	p=0,07	p=0,26
konduktivita (μS/cm)	p=0,76	p=0,71	p=0,30	p=0,70	p=0,81	p=0,36	p=0,73	p=0,60	p=0,85	p=0,75
teplota (odběr) °C	p=0,11	p=0,89	p=0,15	p=0,15	p=0,31	p=0,57	p=0,68	p=0,33	p=0,31	p=0,92
Prům. min. teplota/ rok °C	p=0,11	p=0,48	p=0,01	p=0,21	p=0,12	p=0,02	p=0,04	p=0,23	p=0,80	p=0,29
Prům. max. teplota/ rok°C	p=0,70	p=0,14	p=0,004	p=0,14	p=0,07	p=0,001	p=0,09	p=0,46	p=0,76	p=0,45

Tab. 9: P- hodnoty korelací poměrů morfologických znaků a ekologických faktorů, (signifikantní p-hodnoty jsou zvýrazněné).



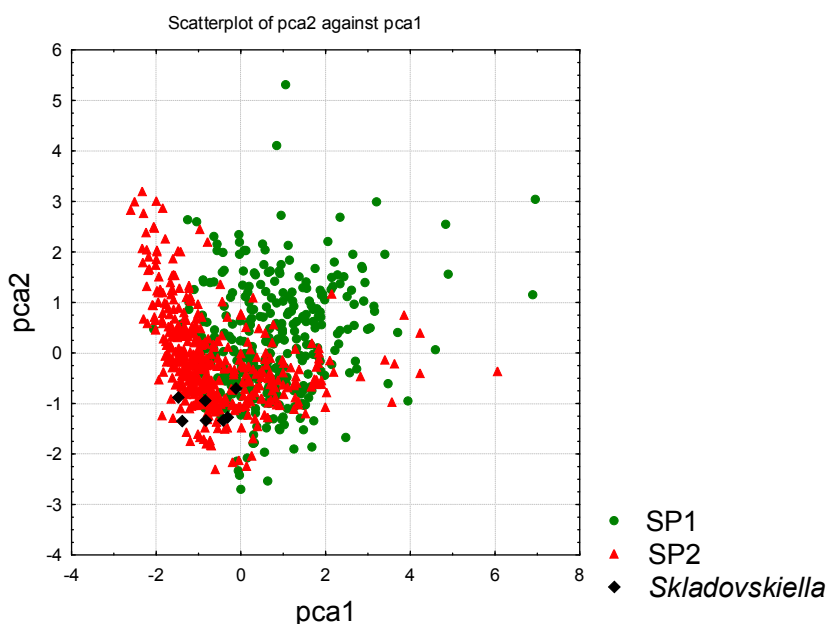




Obr. 17: Regresní přímky závislosti poměrů měřených morfologických znaků na parametrech prostředí (převzaté šupiny): a- šířka šupiny/šířka ostnu SP1,SP2 v závislosti na průměrné roční teplotě, b-šířka šupiny/délka ostnu SP2 v závislosti na průměrné roční teplotě, c- šířka šupiny/délka rimu SP2 v závislosti na průměrné roční teplotě, d-šířka šupiny/délka ostnu SP1 v závislosti na konduktivitě, e- šířka šupiny/šířka ostnu SP1 v závislosti na konduktivitě, f- délka ostnu/šířka ostnu SP1 v závislosti na minimální roční teplotě, g- šířka šupiny/šířka ostnu SP1, SP2 v závislosti na minimální roční teplotě, h- šířka šupiny/délka rimu SP1, SP2 v závislosti na minimální roční teplotě, ch-délka ostnu/šířka ostnu SP2 v závislosti na prům. ročních srážkách, i-šířka ostnu/šířka šupiny SP2 v závislosti na prům. ročních srážkách, j- délka ostnu/šířka ostnu v závislosti na prům. ročních srážkách, k- délka šupiny/ délka rimu SP2 v závislosti na pH, l- délka šupiny/šířka ostnu SP2 v závislosti na maximální roční teplotě, m- šířka šupiny /šířka ostnu SP2 v závislosti na maximální roční teplotě.

3.5 Zjištění, do které z linií patří popsáný druh *S. sphagnicola*

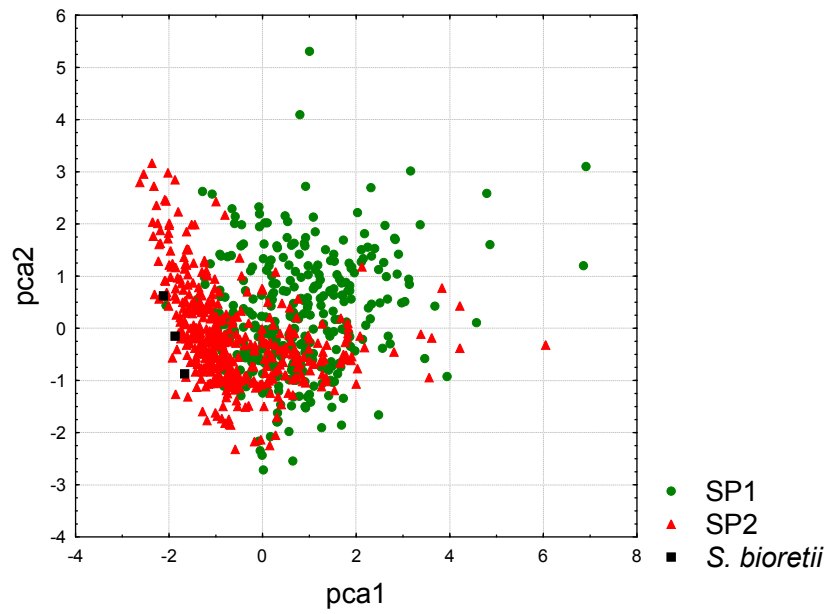
Zajímalo mě, jestli druh popsáný jako *S. sphagnicola* (*Skadovskiella*), bude možné zařadit do jedné z určených linií. V publikaci Korshikov (1927) byly zakresleny šupiny, které tento druh produkuje. Na těchto šupinách byla změřena délka ostnu, šířka šupiny a délka šupiny. Poměry rozměrů měřených znaků byly použity pro rozlišení, který z druhů má k *S. Sphagnicola* blíž, v PCA analýze spolu s kultivovanými kmeny. Tato analýza měla mnohem nižší spolehlivost rozlišení mezi druhy než při znalosti rozměrů všech znaků, ale je vidět téměř jednoznačně, že původní *S. sphagnicola* spadá do linie SP2 (obr 18).



Obr.18 :PCA analýza 3 poměrových znaků šupin *S. sphagnicola* a kultivovaných kmenů: ordinační diagram rozložení měřených šupin podél prvních dvou os PCA.

3.6 Zařazení *Synura bioretii*

Další z řas, podobná druhu *S. sphagnicola*, ke které existují pouze náčrtky podle sledování ve světelném mikroskopu, je *Synura bioretii*. U náčrtků byla měřena délka šupiny, šířka šupiny a délka ostnu a vypočítány poměry měřených znaků. Poměry byly použity pro rozlišení PCA analýze spolu s kultivovanými kmeny. Bylo zjištěno, že šupiny *S. bioretii* se řadí mezi linii SP2 (obr. 19).



Obr. 19 : PCA analýza 3 poměrových znaků šupin *S. bioretii* a kultivovaných kmenů: ordinační diagram rozložení měřených šupin podél prvních dvou os PCA.

4. Diskuze

Pomocí přístupů molekulární fylogenetiky je možné mezi protistními organismy rozlišit velké množství kryptických druhů, které při využití morfologie nebyly odhaleny. U některých mikroskopických organismů je obtížné nalézt znaky, díky kterým lze kryptické druhy spolehlivě rozlišit morfologicky (Krienitz et al. 2001, Krienitz a Bock 2012). Výhodu pro morfologické studie poskytují organismy, které vytváří pevné schránky či struktury. Jejich tvar a ornamentace bývají často klíčové pro rozlišení mezi kryptickými druhy.

Pro výzkum skryté diverzity protist jsem si vybrala sladkovodní zlativku *Synura sphagnicola*, produkující křemičité šupiny. Tento druh není tak běžný jako např. jemu příbuzné *S. petersenii* či *S. glabra*, prosperuje v užším spektru podmínek. Je hojný v oligotrofních vodách s kyselejší pH a nižší konduktivitou. Jak už název *sphagnicola* napovídá, vyskytuje se velmi často v rašeliništních tůňkách. V první řadě mě zajímalo, zda tento doposud hlouběji nestudovaný druh vykazuje vnitrodruhovou genetickou variabilitu. Když jsem při fylogenetické analýze získaných sekvencí zjistila, že ano, bylo dalším předmětem studie shromáždit existující ekologická a morfologická data v co nejvyšším množství a posoudit, zda mezi dvěma odhalenými liniemi existují rozdíly v ekologických nárocích a geografickém rozšíření, aby se studie mohla stát dalším z vodítek, které přibližují názor na diverzitu protist blíže k pravdě.

4.1 Rozlišení dvou kryptických druhů *Synura sphagnicola*

Ke zjištění a rozlišení kryptické diverzity *S. sphagnicola* jsem si vybrala metodu, která využívá molekulární marker ITS k prvotnímu rozlišení genetické variability a poté morfologické přístupy pro zvýšení kvality studie z více úhlů pohledu a též pro podporu tvrzení, které předkládají výsledky fylogenetiky. Tato metoda se osvědčila na velmi příbuzném druhu *S. petersenii* (Kynčlová et al. 2010), u kterého se podařilo objasnit diverzitu a zároveň morfologicky i molekulárně definovat komplex kryptických druhů.

Analýza regionu ITS 1 rozlišila *S. sphagnicola* na 2 druhy, které jsem si pracovníčně označila jako SP1 a SP2. V rámci každého z nich existuje pouze malá vnitrodruhová genetická variabilita (obr. 7). Toto rozlišení signalizuje, že by se mohlo jednat o dva druhy. Morfologické rozdíly i mírné rozdíly v ekologických nárocích podpořily rozdělení na základě genetických rozdílů. Proto se nejspíš o dva druhy skutečně jedná.

Existuje pouze málo oblastí (bráno z geografického nikoliv ekologického pohledu), kde by se vyskytoval pouze druh SP1 nebo SP2 (obr. 4). Ve většině oblastí (ne ve většině odběrových míst), kde byly vzorky pořízeny, se vyskytují oba druhy. Pokud se v některé z geografických oblastí vyskytuje pouze jeden druh, dalo by se to přisuzovat buď specifickým podmínkám nebo malému počtu prozkoumaných regionů. Vzhledem k tomu, že získaná data nasvědčují celoevropskému rozšíření obou druhů, není moc pravděpodobné, že některý z druhů by se do oblasti, kde se nachází sesterský druh, nerozšířil z důvodu omezené schopnosti šíření. Naleziště druhů budou spíše omezena ekologickými nároky, které ve studii byly také sledovány.

4.2 Podpora molekulárních dat zjištěnou morfologickou variabilitou kultivovaných kmenů

Oba druhy byly rozlišeny morfologicky. Při kultivaci za stejných podmínek linie SP1 a SP2 vykazují různou velikost měřených parametrů. To nejspíš znamená, že si druhy ve své genetické informaci nesou to, jaké budou mít šupiny rozměry a ani kultivace ve stejných podmínkách nezapříčiní, že se morfologie stane uniformní a nebude možné dvě linie rozlišit. Přesto, že u všech měřených parametrů nastává překryv hodnot, je možné s 93% jistotou určit podle jedné šupiny, zda se u kultivovaných kmenů jedná o druh SP1 nebo SP2 na základě změření pěti parametrů na šupině (obr. 5). Měření plochy díry bazální desky a její a kulatosti se neprokázala jako vhodná k rozlišení mezi druhy, tudíž nebyla v analýzách dál používána. Největší roli v rozlišení hraje délka ostnu, signifikantní rozdíly jsou mezidruhově i v šířce ostnu, délce šupiny, délce rimu. Mezi šířkami ostnu signifikantní rozdíly nebyly prokázány t-testy, ale diskriminační analýza, pokud z ní šířku ostnu vynecháme, na zbývajících 4 parametrech nevykazuje stejně vysokou míru správného rozlišení druhů (pouze 91%). V diskriminační analýze mají signifikantní p-hodnotu všechny parametry, a proto je lepší raději zůstat u měření všech 5 parametrů.

Metoda měření vybraných znaků na šupině a sledování jejich variability se v hledání rozdílné morfologie kryptických druhů *S. sphagnicola* osvědčila i přesto, že kultivace všech kmenů proběhla za stejných podmínek a že tvar šupin ovlivňují aktuální podmínky (Sandgren et al. 1996, Pichrtová a Němcová 2011). Mezidruhové rozdíly jsou velmi značné a jsou zachovány i při stejném množství živin, teplotě, pH, konduktivitě a osvětlení. Tento fakt silně podporuje domněnku, že se skutečně jedná o dva druhy. Další otázkou by bylo, do jaké míry by se rozdíly mezi dvěma druhy zachovávaly při kultivaci ve stejných podmínkách po delší

dobu. Je možné, že adaptace na laboratorní podmínky by probíhala postupně a časem by byly rozdíly mezi druhy stále menší a menší. K tomu by však byla potřeba další studie.

4.3 Vliv podmínek prostředí na morfologii šupin

Jedna ze studií, kterou jsem prováděla na datech získaných z měření šupin vypěstovaných kultur, měla za úkol porovnat, jestli podmínky prostředí, ve kterých byly vzorky pro kultivaci kmenů pořízeny, jako jsou pH, konduktivita a teplota vody, a dlouhodobé podmínky prostředí jako jsou průměrná roční teplota, průměrná roční minimální a maximální teplota a průměrné roční srážky, mají vliv na to, jaké rozměry mají parametry měřené na šupinách. Jednalo se sice o měření na kmenech kultivovaných při stejné teplotě, pH i konduktivitě a osvětlení, ale předpokladem bylo, že i za těchto podmínek se projeví mezi kmeny rozdíly, podmíněné dlouhodobou adaptací na přirozené prostředí, které bude možné vysvětlit mírou/velikostí některého z ekologických faktorů. V důsledku by rozdílné tvary šupin, efektivně adaptované na prostředí, ze kterého řasy byly odebrány, mohly odrážet existenci populací, přizpůsobených na prostředí svými morfotypy. Vnitrodruhová variabilita šupin (variabilita v rámci SP1 a v rámci SP2) by odrážela v laboratorních podmínkách geneticky podmíněné rozdíly mezi jednotlivými populacemi.

Zajímalo mě, jestli se některý z ekologických faktorů významněji/prokazatelně podílí na vzrůstu některého z morfologických parametrů. Testovala jsem, zda korelují velikosti morfologických znaků jednotlivých kmenů s podmínkami prostředí. Na mnoha ekologických faktorech se závislost neprokázala. Pokud se korelace prokázala, vliv podmínek byl signifikantní pouze u jednoho z druhů (na vině může být také, že pro oba druhy a zvláště pak pro druh SP1 existovalo příliš málo pozorování). Někdy jeden druh vykazoval spíše opačný (či žádný) trend než druhý. To je další podpora pro tvrzení, že se skutečně jedná o dva druhy.

Za zmínku stojí souvislost délky ostnu a konduktivity u druhu SP2. Druh SP2 vykazuje s vyšší konduktivitou nižší délku ostnu a také nižší šířku ostnu (s níž souvisí nejspíš i vyšší poměr $d\bar{s}/\bar{s}o$ a $\bar{s}\bar{s}/\bar{s}o$ s vyšší konduktivitou).

4.4 Rozdíly ekologických nároků mezi druhy

Pro rozsáhlejší analýzu ekologických nároků obou druhů jsem dohledala co největší množství sledovaných faktorů prostředí také k ostatním sekvencím *S. sphagnicola*, které byly

shromážděny pro fylogenetickou analýzu a nebyly k nim napěstovány kultury. V rámci tohoto bodu studie bylo porovnáváno, do jaké míry se liší ekologické parametry výskytu druhů bez porovnávání případných souvislostí s morfologickými daty. Ta u většiny sekvencí nebyla známa. Nejzajímavějším a také nejlépe podpořeným rozdílem v ekologických nárocích mezi druhy je rozdílnost v konduktivitě.

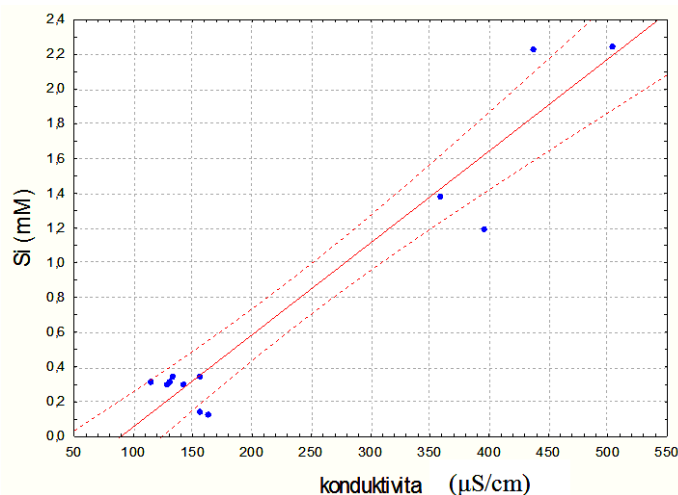
Druh SP2 vyžaduje mnohem nižší konduktivitu než druh SP1. Resp. druh SP1 má velmi široké rozpětí konduktivity, ve které se může vyskytovat a druh SP2 je omezen na konduktivitu nižší. Druh SP2 má obecně delší ostenu než druh SP1 a zároveň se zdá, že toleruje nižší konduktivitu. Druh SP1 toleruje i vysoké konduktivity a jeho ostena je přirozeně kratší. A jelikož rozdíl v délce ostny mezi druhy přetrvává i v prostředí s totožnou konduktivitou (při kultivaci), je zřejmé, že délka ostny není krátkodobou adaptací na určitou konduktivitu nýbrž geneticky zakódovanou adaptací. Adaptace na vyšší konduktivitu by tedy mohla znamenat v praxi produkci kratších ostnů. Ze studie, ve které bylo měřeno zastoupení jednotlivých prvků ve vodě (Opfergelt et al. 2011) jsem zjistila, že množství křemíku nehledě na to, jak se pohybují množství ostatních prvků, přímo úměrně roste s rostoucí konduktivitou (obr. 20).

Konduktivita je pravděpodobně souvislá s množstvím srážek. Čím větší srážky, tím je voda více ředěna, tudíž konduktivita je nižší. Druh SP2 preferuje prostředí s vyššími srážkami a nižší konduktivitou, zatímco druh SP1 se vyskytuje spíše v prostředí s nižšími srážkami, s širším rozpětím konduktivity. I nadále je ale nutné počítat s vysokým překryvem podmínek výskytu, jelikož druhy mohou koexistovat.

4.4.1 Důvod přítomnosti delších ostnů v prostředí s nižší konduktivitou

Řasy produkující křemičité šupiny tvoří tím vyvinutější šupiny, čím více mají křemíku, pro jejich tvorbu nezbytného prvku k dispozici. Na změnu množství křemíku však odpovídají změněnou masivností šupin již v rámci 2 hodin po změně jeho koncentrace (Sandgren et al. 1996). Změna konduktivity (tudíž pravděpodobně i změna množství křemíku) by teoreticky zapříčinila velmi rychlou změnu velikosti ostny. Ke zkrácení ostny by mělo dojít při poklesu množství křemíku (v nižší konduktivitě). Budu-li ale předpokládat, že délka ostny je alespoň rámcově zakódovaná v genetické informaci, náhlá změna množství křemíku by mohla způsobit pouze nepatrné změny ve velikosti délkových znaků (délky ostny a pravděpodobně i v rámci délky a šířky šupiny). Změny v koncentraci křemíku se v krátkém období spíše skutečně projeví na tom, do jaké míry bude šupina masivní. Šupiny tvoří *Synura* pravděpodobně jako obranu proti predátorům (zooplanktonu). K vylepšení obrany jistě

přispívají ostny, které jsou na šupinách připevněné. Čím delší ostny šupiny mají, tím lepší bude mít *Synura* pravděpodobnost přežití. V případě, že se řasa vyskytuje v prostředí s vyšší konduktivitou a tudíž s vyšším množstvím křemíku, má možnost vytvářet masivnější šupiny. Masivní, pevné šupiny poskytnou požadovanou ochranu před predátory. Pokud je ale v prostředí křemíku méně, masivnost šupiny nebude dostatečná. Přesto se buňky musí snažit vyvinout co nejefektivnější obranu. Delší ostny, na který je potřeba poměrně málo materiálu, ale jistě je efektivní, by mohl být jednou z adaptací na prostředí s nižším obsahem křemíku. A proto by se tedy delší ostny vyskytovaly v prostředí s nižší konduktivitou. Rozdílnost jednotlivých kultivovaných kmenů v rozměrech šupiny jistě není rychlou adaptací na aktuální podmínky, jelikož se projevuje jako jeden z morfologických rozdílů mezi jednotlivými kultivovanými liniemi i v laboratorním prostředí, kde nehrozí predace a křemíku je dostatek.



Obr. 20: Regresní křivka: s rostoucí konduktivitou se zvyšuje i množství křemíku (vytvořeno dle Opfergelt et al. 2011)

4.4.2 Kompetice druhu SP1 a SP2

Pokud bychom předpokládali produkci delších šupin jako jeden ze znaků druhu SP2, nebylo by v přírodě možné, aby se oba druhy po delší dobu vyskytovaly v jedné lokalitě. Ve stejné konduktivitě by měly oba druhy stejné množství křemíku k dispozici a oba druhy by měly možnost vytvářet stejně masivní šupiny. S rozdílem toho, že druh SP2 by navíc produkoval dlouhé ostny, díky kterým by pro predátory byl méně přitažlivý, a tak by po čase byl druh SP1 vytěsněn. To se nejspíš v určité míře skutečně děje, jelikož druh SP2 je při nezávislých odběrech nalézán častěji než SP1. Existuje však nějaký důvod, proč se druh

SP2 vyskytuje spíš v nižších konduktivitách a nevytěsňuje druh SP1 ze všech lokalit. A také důvod, proč jsou v některých lokalitách stále přítomné oba druhy.

Jedním z vysvětlení je, že druh SP1 je schopen při stejné koncentraci křemíku tento prvek vychytávat z prostředí efektivněji, a může vytvořit masivnější a mechanicky odolnější šupinu, zatímco druh SP2 vytvoří za stejnou dobu šupinu s dlouhým ostnem, která ve skutečnosti bude křehčí. Je pravděpodobné, že ani při poskytnutí většího množství křemíku by druh SP2 nevytvořil tak masivní šupinu jako druh SP1, jelikož se nejspíš jedná o evoluční odlišnost mezi nimi. V tomto případě by kompetice druhů nebyla již nevyrovnaná. Druh SP2 je schopný tvořit delší ostny, zatímco druh SP1 je schopen vložit více materiálu do masivnosti šupiny a efektivněji si dokáže z vody potřebné minerály vychytat. Vysvětlení pro rozdílnost v délce ostnů by mohlo být jistě mnoho. Roli pravděpodobně nehraje pouze množství křemíku v prostředí.

4.5 Analýza převzatých šupin

Dalším bodem studie bylo zjistit, jestli by se dalo podle stanovených kritérií rozlišit také šupiny, ke kterým většinou nebyla známá DNA a pocházely z různých odběrových míst severní polokoule. Vzhledem k tomu, že se genetické rozdíly pravděpodobně značně podílí na rozdílech ve velikostech morfologických znaků, které byly využity pro rozlišení mezi druhy, dalo by se předpokládat, že i v přírodních podmínkách budou moci být uplatněny rozdíly velikostí morfologických znaků.

Naměřila jsem 5 parametrů na každé z 99 šupin *S. sphagnicola*, které byly převzaty z publikací, pocházely z databáze Chrysophytes.eu nebo byly pořízené vedoucím práce a poskytnuty pro tuto studii. Pro porovnání převzatých šupin spolu s datasetem šupin kultivovaných kmenů jsem používala pouze poměrové znaky. Jednak proto, abych předešla možným neshodám díky nepřesně zaznamenaným měřítkům v publikacích. Dalším z důvodů bylo předejít možným změnám velikostí šupin při kultivaci. I když šupiny mohly také v kultuře reagovat elongací či zkracováním. Například z důvodu změny teploty může dojít ke změně velikosti šupiny a k protahování nebo zkracování (Pichrtová a Němcová 2011). Toto ale nebylo testováno na ostnech, které jsou hlavním aktérem v morfologickém rozlišení kryptických druhů *S. sphagnicola*. Vzhledem k tomu, že délka ostnu nevykazuje závislost na teplotě odběrového místa a jeví se geneticky podmíněná, je možnost ovlivnění velikosti tohoto parametru teplotou velmi nepravděpodobná.

4.5.1 Určení druhů převzatých šupin

Mezi druh SP1 či SP2 jsem šupiny řadila za použití diskriminační analýzy, která byla schopna rozlišit kultivované kmeny pomocí poměrů měřených znaků s 83,5% správností. Na poli kultivovaných šupin bylo tedy možné určit správně, s přihlédnutím na přírodní původ, odhadem 75 % převzatých šupin. K výsledkům a z nich vyvozených tvrzení by bylo nutné přistupovat za předpokladu, že každá třetí až čtvrtá šupina je určena chybně. Ale jelikož u mnoha nálezů bylo možné analyzovat více než jednu šupinu, je zařazení některých vzorků téměř jisté.

Při diskriminaci bylo větší množství vzorků klasifikováno jako druh SP2. Jednak se tento druh jeví v přírodě častější (odhadováno dle kvantit jednotlivých druhů podle nezávislého pořízení vzorků kultur a sekvencí), avšak i zde je do jisté míry přípustná role fenoménu oblíbených lokalit (Foissner 1999) zmiňovaný v kap. 1.1., díky kterému by byl častěji nacházen druh SP2 právě proto, že se jeho naleziště vyskytují v místech, která byla pro odběr z důvodu oblíbenosti vybrána. Druhým možným důvodem většího počtu zařazení do druhu SP2 je podezření, že mohl při kultivaci vzniknout určitý vývojový trend, na základě kterého víc šupin tíhlo k zařazení do SP2. O něco lepší výsledky jsou předpokládány u plánované studie přírodních kmenů, s nimiž budou moci být převzaté šupiny lépe porovnávány.

4.5.2 Porovnání ekologických nároků všech získaných *S. sphagnicola*

Při použití datasetu převzatých šupin k porovnávání rozdílů ekologických nároků mezi druhy jsem zjistila, že na větším množství dat, která nepochází jen z Euroasie, jako tomu bylo u porovnání ekologických nároků kultivovaných kmenů i získaných sekvencí, jsou ekologické nároky obou druhů velmi podobné. Na rozdíl od výsledků dosažených s kulturami a sekvencemi vykazuje druh SP1 nálezy ve vyšších srážkách než druh SP2 a naopak druh SP2 byl pořízen i v lokalitách s vyšší konduktivitou než druh SP1, i když střední hodnota konduktivit druhu SP2 leží stále o něco níže. Druh SP1 byl nalézán v nižším rozmezí teplot. A také jeho průměrné roční, minimální i maximální teploty se pohybovaly v užším rozmezí než u druhu SP2.

4.5.3 Možné důvody nesrovnalostí mezi výstupy porovnání ekologických rozmezí druhů při analýze kultur a sekvencí vs. převzatých šupin

Na větším datasetu, kde byly přítomné mimo Euroasijských vzorků i vzorky z různých kontinentů se tedy jeví, že druh SP2 je schopen obývat prostředí s vyšším rozmezím teplot

a konduktivit než druh SP1. To by mohlo být vysvětleno celkově nižší zastoupeností druhu SP1. Při porovnání průměrných teplot Euroasijských druhů, ke kterým byly známé sekvence, dosahovaly oba druhy průměrných ročních teplot do 10°C. Ano, je to způsobené oblastí, ze které pocházejí, ale zdálo se podle analýzy ekologie sekvencí a kultur, že druh SP2 je spíš chladnomilnější a snáší nižší výkyvy teplot a nižší rozmezí konduktivity než druh SP1. Vysvětlením velkého rozšíření rozpětí vlastností lokalit druhu SP2 při zkoumání obsáhlejšího spektra odběrových míst by mohla být přítomnost ještě jednoho druhu, který diskriminační analýza řadí mezi SP2. Bylo by velmi zajímavé otestovat tuto teorii sběrem molekulárních dat z většího spektra oblastí. Je pravděpodobné, že by mohlo být nalezeno ještě několik dalších kryptických druhů *S. sphagnicola*. O něco méně zajímavějším vysvětlením nesrovnalostí mezi ekologickými daty k sekvencím a ekologickými daty k převzatým šupinám je, že se skutečně mohlo jednat o posun morfologických vlastností při kultivaci, díky kterému byly některé z šupin duhu SP1 řazeny jako SP2.

4.6 Která z linií je původní *S. sphagnicola*?

Druh *Synura sphagnicola* byl objeven v roce 1926 nedaleko Moskvy jako organismus obývající rašeliniště (Korshikov 1927). Tehdy byl popsán jako rod *Skladovskiella*, který se velmi podobá rodu *Synura*. Později ale Korshikov (1929) tento organismus na základě značné podobnosti s rodem *Synura* přejmenoval na *Synura sphagnicola*. K prvotnímu popisu druhu byly přiloženy kreslené obrázky šupin. Tyto šupiny jsem změřila a otestovala, zda budou pomocí PCA analýzy zařazené do jednoho z druhů. I když na kreslených šupinách bylo možné změřit pouze 3 znaky (délka šupiny, šířka šupiny a délka ostnu), jelikož rozměry ostatních znaků by mohly být značně zkreslené, tyto parametry byly k rozlišení pozice původní *S. sphagnicola* dostačující. (obr. 18). Velmi pravděpodobně se jednalo o druh SP2. Z toho vyplývá, že mnoho studií, zmiňující *S. sphagnicola* pojednává o velmi podobném, avšak jiném druhu.

4.7 *Synura bioretii*

Před tím, než bude stanovené, že v případě SP1 se jedná o nový druh, jsem přistoupila ke zjišťování, zda by se nemohlo jednat o nějaký z již existujících druhů. Jednou z možností byl druh *Synura bioretii*, k němuž existují též obrázky šupin kreslené podle pozorování

ve světelném mikroskopu (Huber-Pestalozzi 1941). Tento druh se dle popisu značně podobal *S. sphagnicola*. Byl v Evropě zmiňován do doby, než druhová determinace šupinatých chrysomonád přešla k analýze šupin v TEM. Změřila jsem náčrtky šupin (bylo možné měřit pouze délku šupiny, šířku šupiny a délku ostnu) a vyzkoušela, jestli se zařadí do některého z kryptických druhů *S. sphagnicola sensu lato*. *S. bioretii* byla podle PCA analýzy skutečně zařazena mezi *S. sphagnicola*. Nachází se ale jednoznačně mezi šupinami druhu SP2 stejně tak jako *Skladovskiella*.

4.8 Rozdílná množství kryptických druhů

Na druhu *S. sphagnicola* se mi podařilo ukázat, že stejně tak jako většina dalších protist obsahuje kryptické linie, které doposud nebyly popsány. Detailnějším studiem by pravděpodobně bylo zjištěno, že většina protistních druhů, které nebyly doposud hlouběji prostudovány, je ve skutečnosti komplex kryptických druhů, objevujících se v publikacích pod jedním názvem. Množství kryptických druhů lze ale velmi těžko předpokládat.

I v rámci šupinatých chrysomonád je u každého druhu, na který se hlouběji zaměříme, objevováno variabilní množství kryptických linií. U příbuzného druhu *S. petersenii* bylo objeveno nejprve 6 linií. Ty lze rozlišit molekulárně i morfologickými znaky, 5 z nich bylo přítomných v ČR (Kynčlová et al. 2010). Dále bylo díky dalším 800 odběrům v 15 evropských státech a Grónsku objeveno, že existují ještě jiné 4 nepopsané kryptické druhy. 1 z nich se vyskytuje ve většině Evropy, výskyt ostatních 3 je omezený na určité lokality (Škaloud et al. 2014).

Ve skupině rozsivky (Bacillariophyceae), bylo například objeveno 5 kryptických linií v rámci druhu *Sellaphora pupula* z okolí Edinburgu ve Velké Británii, které se liší morfologicky a mají reprodukční bariéry (Mann et al. 2004). Na základě molekulárních dat se dále ukázalo, že kryptických linií v rámci *S. pupula* je 19 (Evans et al. 2008). U kosmopolitní rozsivky *Skeletonema costatum sensu lato* bylo nalezeno opět několik kryptických linií. Většina z nich, vyjma dvou linií, byla rozlišitelná i na základě morfologických znaků. Zbývající dvě linie bylo možné rozlišit jen molekulárně (Kooistra et al. 2008). U mořských krásivek (Desmidiaceae) rodu *Thalassiosira* byly objeveny tři linie v rámci Atlantského a Pacifického oceánu, lišící se v ITS úseku. Toto rozlišení ale nebylo možné podpořit fyziologickými rozdíly ani rozdílnou délkou genomu či změnami sekundární struktury ITS regionu. Linie jsou dál považovány za jeden druh (Whittaker et al. 2012).

K tomu, aby bylo možné říct, jak se liší množství kryptických linií objevených mezi jednotlivými nominálně definovanými druhy, není třeba uvádět ani kryptickou diverzitu fylogeneticky odlišnějších skupin, i když příkladů by bylo mnoho. Na příkladu *S. sphagnicola* se ukázalo, že detailnější průzkum tohoto nominálně definovaného druhu přinesl rozlišení pouze 2 linií v rámci kontinentu Euroasie.

Nemyslím si, že by bylo možné odhadovat množství protistních druhů tím způsobem, kdy aktuální počet popsáných druhů je vynásoben koeficientem, který se odvíjí od přibližného počtu kryptických druhů, které jsou objevovány při revizích některých druhů. I velmi blízké příbuzné organismy se mnohdy několikanásobně liší počty kryptických linií objevených pro stejnou oblast.

4.9 Schopnost šíření rozlišených druhů

Obě linie se vyskytují většinou ve všech oblastech v Evropě, kde byly odběry prováděny. Byly pouze rozšířené do těch habitatů, kde se pro ně nacházely optimální podmínky a většinou se nenacházely na jednom místě, ale každý z druhů osídlil tůň, která pro něj byla svými podmínkami vhodnější, byť se tato tůň nemusela nacházet daleko od jiné tůně, kde byl rozšířený druhý druh. Toto rozšíření nenasvědčuje tomu, že oba kryptické druhy mají velmi podobnou schopnost šíření. Jedná se o rozšíření na základě vhodných podmínek habitatů. Není vyloučené, že existuje ještě další kryptický druh *S. sphagnicola* rozšířený v Evropě. Buď se nachází pouze v určitém typu habitatu a nemá schopnosti se díky geografickým či disperzním bariérám šířit tam, kam ostatní dva druhy, anebo se příhodné habitaty tohoto druhu nevyskytují v oblastech, kde byly prováděné odběry. V takovém případě by nenalezený druh mohl mít podobnou schopnost šíření se jako dva kryptické druhy *S. sphagnicola*, které jsem v této práci rozlišila. Rozšíření popsáných kryptických druhů *S. petersenii* vykazuje první zmíněnou variantu. Některé druhy jsou nalézány pouze v určitých lokalitách, jiné jsou rozšířené v rámci celého kontinentu nebo i na další kontinenty.

5. Závěr

Nominální druh *S. sphagnicola* obsahuje dva kryptické druhy, které je možné rozlišit na základě rozdílu v ITS regionu DNA a též na základě morfologie křemičitých šupin. Největší část variability mezi jednotlivými kmeny je podmíněna genetickými faktory a tudíž se mezidruhové rozdíly zachovávají i při přenosu řasy do laboratorních podmínek. Rozdíly mezi měřenými morfologickými znaky jsou signifikantní jak v přírodě, tak při kultivaci za stejných podmínek. Na základě měření šupin bylo možné rozlišit již publikované šupiny. Tento aspekt by se dal uplatnit i pro rozlišení šupin ze sedimentů při paleoekologických studiích. *S. sphagnicola* je indikátorem acidických oligotrofních nejčastěji rašelinných vod a rozlišení mezi kryptickými druhy SP1 a SP2 by v případě paleoekologie mohlo napomoci k předpokladu konduktivity a též množství srážek v dané lokalitě.

6. Seznam literatury:

- ADL, M.S. & GUPTA, V.V.S.R. 2006. Protists in soil ecology and forest nutrient cycling. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 36: 1805-1817.
- ADL, S.M., LEANDER, B.S., SIMPSON, A.G.B., ARCHIBALD, J.M., ANDERSON, O.R., BASS, D., BOWSER, S.S., BRUGEROLLE, G., FARMER, M.A., KARPOV, S., KOLISKO, M., LANE, C.E., LODGE, D.J., MANN, D.G., MEISTERFELD, R., MENDOZA, L., MOESTRUP, O., MOZLEY-STANDRIDGE, S.E., SMIRNOV, A.V. & SPIEGEL, F. 2007. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic Biology* 56: 684-689.
- AMATO, A., KOOISTRA, W.H.C.F., GHIRON, J.H.L., MANN, D.G., PROSCHOLD, T. & MONTRESOR, M. 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158: 193-207.
- AUINGER, B.M., PFANDL, K. & BOENIGK, J. 2008. Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: Combining microscopic analysis with single-cell PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2505-2510.
- BALONOV I. M & KUZMIN, G. V. 1974. Species of the genus *Synura* Ehr. (Chrysophyta) in the water reservoirs of the Volga Cascade.- Bot. Journal Leningrad 59: 1675-1686.
- BENSON, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L. 2005. GenBank, Nucleic Acids Res. ;33:D34-D38.
WEB: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>
- 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.
- BRADLEY, D.E. 1966. Observations on some Chrysomonads from Scotland. *Journal of Protozoology* 13: 143-&.
- CAISOVA, 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.

- CASTELEYN, G., LELIAERT, F., BACKELJAU, T., DEBEER, A.-E., KOTAKI, Y., RHODES, L., LUNDHOLM, N., SABBE, K. & VYVERMAN, W. 2010. Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 12952-12957.
- COLEMAN, A.W. 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* 19: 370-375.
- COLEMAN, A.W. & VAN OPPEN, M.J.H. 2008. Secondary Structure of the rRNA ITS2 Region Reveals Key Evolutionary Patterns in Acroporid Corals. *Journal of Molecular Evolution* 67: 389-396.
- DARLING, K.F., WADE, C.M., STEWART, I.A., KROON, D., DINGLE, R. & BROWN, A.J.L. 2000. Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. *Nature* 405: 43-47.
- ELORANTA, P. 1989. Scaled Chrysophytes (Chrysophyceae and Synurophyceae) from national park lakes in southern and central Finland. *Nordic Journal of Botany* 8: 671-681.
- EVANS, K.M., WORTLEY, A.H., SIMPSON, G.E., CHEPURNOV, V.A. & MANN, D.G. 2008. A molecular systematic approach to explore diversity within the sellaphora pupula species complex (bacillariophyta). *Journal of Phycology* 44: 215-231.
- EVANS, K.M., CHEPURNOV, V.A., SLUIMAN, H.J., THOMAS, S.J., SPEARS, B.M. & MANN, D.G. 2009. Highly Differentiated Populations of the Freshwater Diatom *Sellaphora capitata* Suggest Limited Dispersal and Opportunities for Allopatric Speciation. *Protist* 160: 386-396.
- FAWLEY, M.W., FAWLEY, K.P. & HEGEWALD, E. 2011. Taxonomy of *Desmodesmus serratus* (Chlorophyceae, Chlorophyta) and related taxa on the basis of morphological and DNA sequence data. *Phycologia* 50: 23-56.
- FENCHEL, T. & FINLAY, B.J. 2003. Is microbial diversity fundamentally different from biodiversity of larger animals and plants? *European Journal of Protistology* 39: 486-490.
- FENCHEL, T. & FINLAY, B.J. 2004. The ubiquity of small species: Patterns of local and global diversity. *Bioscience* 54: 777-784.
- FENCHEL, T. & FINLAY, B.J. 2006. The diversity of microbes: resurgence of the phenotype. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 361: 1965-1973.

- FINLAY, B.J. & ESTEBAN, G.F. 1998. Planktonic ciliate species diversity as an integral component of ecosystem function in a freshwater pond. *Protist* 149: 155-165.
- FINLAY, B.J. & CLARKE, K.J. 1999. Apparent global ubiquity of species in the protist genus *Paraphysomonas*. *Protist* 150: 419-430.
- FINLAY, B.J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061-1063.
- FOISSNER, W. 1997. Global soil ciliate (Protozoa, ciliophora) diversity: a probability-based approach using large sample collections from Africa, Australia and Antarctica. *Biodiversity and Conservation* 6: 1627-1638.
- FOISSNER, W. 1999. Description of two new, mycophagous soil ciliates (Ciliophora, Colpodea): *Fungiphrya strobli* n. g., n. sp. and *Grossglockneria ovata* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 34-42.
- FOISSNER, W. 2006. Biogeography and dispersal of micro-organisms: A review emphasizing protists. *Acta Protozoologica* 45: 111-136.
- FOISSNER, W. 2008. Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodiversity and Conservation* 17: 235-242.
- FOISSNER, W., CHAO, A. & KATZ, L.A. 2008. Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista : Ciliophora). *Biodiversity and Conservation* 17: 345-363
- GAVRILOVA, O.V., NOGINA, N.V. & VOLOSHKO, L.N. 2005. Scale structures and growth characteristics of *Synura petersenii* (Synurophyceae) under different pH conditions. *Nova Hedwigia*: 249-256.
- HAHN, A., GUTOWSKI, A. & GEISSLER, U. 1996. Scale and bristle morphology of *Mallomonas tonsurata* (Synurophyceae) in cultures with varied nutrient supply. *Botanica Acta* 109: 239-247.
- HAMMER,Ř., HARPER, D.A.T., & RYAN, P.D. 2001. PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1): 9.
- HANSEN, P., KRISTIANSEN, J. (1997) Silica-scaled chrysophytes from Aland. *Mem Soc Fauna Flora Fenn* 73:45-52
- HARRIS, K., . & BRADLEYD, . E. (1958). Some unusual Chrysophyceae studied in the electron microscope. *J. gen. Microbiol.* 18, 71.
- HEPPERLE, D. (2004): SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace

- data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version.
- HIBBERD, D.J. 1978. Fine -structure of *Synura sphagnicola* (Korsh) (Chrysophyceae). *British Phycological Journal* 13: 403-412.
- HUBER-PESTALOZZI, G. 1941. Das Phytoplankton des Susswassers. Chrysophyceen, farblose Flagellaten, Heterokonten. 2,1. *Stuttgart*, in: A. Thienemann (Ed.), *Die Binnengewässer*, 16 (2/1) : 1–24
- JO, B.Y., SHIN, W., BOO, S.M., KIM, H.S. & SIVER, P.A. 2011. Studies on ultrastructure and three-gene phylogeny of the genus *Mallomonas* (Synurophyceae) *Journal of Phycology* 47: 415-425.
- KALINA, T., Y. NÌ MCOVÁ & J. NEUSTUPA (2000): Silica-scaled chrysophytes of the Czech Republic 1. District È eská LÍpa (Northern Bohemia) and part of the Central Bohemia. - *Arch.Hydrobiol. Suppl.* 131 (Algol. Stud. 96): 29-47.
- KIES, L. & M. BERNDT (1984): Die *Synura*-Arten (Chrysophyceae) Hamburgs und seiner nordöstlichen Umgebung. - *Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg* 19: 99-122.
- KIM, E., SIMPSON, A.G.B. & GRAHAM, L.E. 2006. Evolutionary relationships of apusomonads inferred from taxon-rich analyses of 6 nuclear encoded genes. *Molecular Biology and Evolution* 23: 2455-2466.
- KIM, J.H. & KIM, H.S. 2011. Seasonal occurrence of silica-scaled chrysophytes in a small eutrophic swamp, South Korea. *Nova Hedwigia* 93: 411-436.
- KOOISTRA, W.H.C.F., SARNO, D., BALZANO, S., GU, H., ANDERSEN, R.A. & ZINGONE, A. 2008. Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (Bacillariophyta). *Protist* 159: 177-193.
- KORSHIKOV, A. A. 1927. *Skadovskiella sphagnicola* , a new colonial chrysomonad. – *Arch. Protistenk.* 58: 450 – 455.
- KORSHIKOV, A. A. 1929. Studies on the Chrysomonads. I. – *Arch. Protistenk.* 67: 253-290.
- KRIENITZ, L., USTINOVA, I., FRIEDL, T. & HUSS, V.A.R. 2001. Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 37: 852-865.
- KRIENITZ, L. & BOCK, C. 2012. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia* 698: 295-326.
- KRISTIANSEN, J. 1975. Studies on Chrysophyceae of Bornholm. *Botanisk Tidsskrift* 70: 126-142.

- KRISTIANSEN, J. 1978. Studies on the Chrysophyceae of Bornholm .2. *Botanisk Tidsskrift* 73: 71-85.
- KRISTIANSEN, J.- (1990): Studies on silica-scaled chrysophytes from Central Asia. From Xinjiang and from Gansu, Qinghai, and Shaanxi Provinces, P. R. China. *Arch. Protistenkd.* 138: 298-303.
- KRISTIANSEN, J. & H.R. PREISIG 2007. Süßwasserflora von Mitteleuropa, vol 1, part 2, Synurophyceae. - Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- KYNCLOVA, A., SKALOUD, P. & SKALOUDOVA, M. 2010. Unveiling hidden diversity in the *Synura petersenii* species complex (Synurophyceae, Heterokontophyta). *Nova Hedwigia*: 283-298.
- LAVAU, S., SAUNDERS, G.W. & WETHERBEE, R. 1997. A phylogenetic analysis of the synurophyceae using molecular data and scale case morphology. *Journal of Phycology* 33: 135-151.
- LEADBEATER, B.S.C. 1984. Construction and assembly of the scale case in *Synura*. *British Phycological Journal* 19: 195-196.
- LEADBEATER, B.S.C. 1990. Ultrastructure and assembly of the scale case (Synurophyceae Andersen. *British Phycological Journal* 25: 117-132.
- LEADBEATER, B.S.C. & BARKER, D.A.N. 1995. Biomineralization and scale production in the Chrysophyta. *Chrysophyte Algae: Ecology, Phylogeny and Development*: 141-164.
- LEE, K.H., JEONG, H.J., PARK, K., KANG, N.S., YOO, Y.D., LEE, M.J., LEE, J.-W., LEE, S., KIM, T., KIM, H.S. & NOH, J.H. 2013. Morphology and molecular characterization of the epiphytic dinoflagellate *Amphidinium massartii*, isolated from the temperate waters off Jeju Island, Korea. *Algae* 28: 213-231.
- MANN, D.G., MCDONALD, S.M., BAYER, M.M., DROOP, S.J.M., CHEPURNOV, V.A., LOKE, R.E., CIOBANU, A. & DU BUF, J.M.H. 2004. The *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyceae): morphometric analysis, ultrastructure and mating data provide evidence for five new species. *Phycologia* 43: 459-482.
- MANN, D.G., THOMAS, S.J. & EVANS, K.M. 2008. Revision of the diatom genus *Sellaphora*: a first account of the larger species in the British Isles. *Fottea* 8: 15-78.
- MUELLER, T., PHILIPPI, N., DANDEKAR, T., SCHULTZ, J. & WOLF, M. 2007. Distinguishing species. *Rna-a Publication of the Rna Society* 13: 1469-1472.
- NEMCOVA, Y., NOVAKOVA, S. & REZACOVA-SKALOUDOVA, M. 2008. *Synura*

- obesa sp nov (Synurophyceae) and other silica-scaled chrysophytes from Abisko (Swedish Lapland). *Nova Hedwigia* 86: 243-254.
- NEMCOVA, Y., KREIDLOVA, J., PUSZTAI, M. & NEUSTUPA, J. 2013. Mallomonas pumilio group (Chrysophyceae/Stramenopiles) - a revision based on the scale/scale-case morphology and analysis of scale shape. *Nova Hedwigia*: 27-49.
- NOLTE, V., PANDEY, R.V., JOST, S., MEDINGER, R., OTTENWAELDER, B., BOENIGK, J. & SCHLOETTERER, C. 2010. Contrasting seasonal niche separation between rare and abundant taxa conceals the extent of protist diversity. *Molecular Ecology* 19: 2908-2915.
- NOVAKOVA, S., NEMCOVA, Y., NEUSTUPA, J., REZACOVA, M., SEJNOHOVA, L. & KALINA, T. 2004. Silica-scaled chrysophytes in acid peat bogs of Bohemian Switzerland (Czech Republic) and Saxonian Switzerland (Germany). *Nova Hedwigia* 78: 507-515.
- OPFERGELT, S., EIRIKSDOTTIR, E.S., BURTON, K.W., EINARSSON, A., SIEBERT, C., GISLASON, S.R. & HALLIDAY, A.N. 2011. Quantifying the impact of freshwater diatom productivity on silicon isotopes and silicon fluxes: Lake Myvatn, Iceland. *Earth and Planetary Science Letters* 305: 73-82.
- PAWLOWSKI, J., AUDIC, S., ADL, S., BASS, D., BELBAHRI, L., BERNEY, C., BOWSER, S.S., CEPICKA, I., DECELLE, J., DUNTHORN, M., FIORE-DONNO, A.M., GILE, G.H., HOLZMANN, M., JAHN, R., JIRKU, M., KEELING, P.J., KOSTKA, M., KUDRYAVTSEV, A., LARA, E., LUKES, J., MANN, D.G., MITCHELL, E.A.D., NITSCHKE, F., ROMERALO, M., SAUNDERS, G.W., SIMPSON, A.G.B., SMIRNOV, A.V., SPOUGE, J.L., STERN, R.F., STOECK, T., ZIMMERMANN, J., SCHINDEL, D. & DE VARGAS, C. 2012. CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. *Plos Biology* 10.
- PERKINS, S.L. 2000. Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 267: 2345-2350.
- PÉTERFI, L. S. - 1965 - Observations on *Synura Ehrenb.* in Rumania with special attention to *Synura splendida* Korshikav. *Rev. Alg.* 1: 52-55
- PETERFI, L.S. & MOMEU, L. 1977. Observations on some *Mallomonas* species from Romania in light and transmission electron- microscopes. *Nova Hedwigia* 28: 155-202.

- PE'FERSEN, J. B. & HANSEN, J. B., 1958. On the scales of some *Synura* species. *Biol. Meddr*, 23(7): 1-13.
- PICHRTOVA, M. & NEMCOVA, Y. 2011. Effect of temperature on size and shape of silica scales in *Synura petersenii* and *Mallomonas tonsurata* (Stramenopiles). *Hydrobiologia* 673: 1-11.
- REZACOVA, M. & SKALOUD, P. 2005. Silica-scaled chrysophytes of Ireland with an appendix: Geographic variation of scale shape of *Mallomonas caudata*. *Nova Hedwigia*: 101-124.
- ROIJACKERS, R.M.M. & KESSELS, H. 1986. Ecological characteristics of scale-bearing Chrysophyceae from the Netherlands. *Nordic Journal of Botany* 6: 373-385.
- SALZBURGER, W., EWING, G. B., HAESLER, A. 2011: The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Mol Ecol* 20:1952-1963
- SANDGREN, C.D., HALL, S.A. & BARLOW, S.B. 1996. Siliceous scale production in chrysophyte and synurophyte algae .1. Effects of silica-limited growth on cell silica content, scale morphology, and the construction of the scale layer of *Synura petersenii*. *Journal of Phycology* 32: 675-692.
- SIVER, P.A. 1988. A new forma of the common Chrysophycean alga *Synura- petersenii*. *Transactions of the American Microscopical Society* 107: 380-385.
- SIVER, P.A. & GLEW, J.R. 1990. The arrangement of scales and bristles on *Mallomonas* (Chrysophyceae) - a proposed mechanism for the formation of the cell covering. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 68: 374-380.
- 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., MORALES, E.A., VAN DE VIJVER, B., SMITS, M., HAMILTON, P.B., LANGE-BERTALOT, H. & HAINS, J.J. 2006. Observations on *Fragilaria longifusiformis* comb. nov et nom. nov (Bacillariophyceae), a widespread planktic diatom documented from North America and Europe. *Phycological Research* 54: 183-192.
- SIVER, P.A., LOTT, A.M. & WOLFE, A.P. 2013. A summary of *Synura* taxa in early Cenozoic deposits from Northern Canada. *Nova Hedwigia*: 181-190.
- SKALOUD, P., KYNCLOVA, A., BENADA, O., KOFRONOVA, O. & SKALOUDOVA, M. 2012. Toward a revision of the genus *Synura*, section

- Petersenianae (Synurophyceae, Heterokontophyta): morphological characterization of six pseudo-cryptic species. *Phycologia* 51: 303-329.
- SKALOUD, P., KRISTIANSEN, J. & SKALOUDOVA, M. 2013a. Developments in the taxonomy of silica-scaled chrysophytes - from morphological and ultrastructural to molecular approaches. *Nordic Journal of Botany* 31: 385-402.
- SKALOUD, P., SKALOUDOVA, M., PICHRTOVA, M., NEMCOVA, Y., KREIDLOVA, J. & PUSZTAI, M. 2013b. www.chrysophytes.eu - a database on distribution and ecology of silica-scaled chrysophytes in Europe. *Nova Hedwigia*: 141-146.
- SKALOUDOVA, M. & SKALOUD, P. 2013. A new species of *Chrysosphaerella* (Chrysophyceae: Chromulinales), *Chrysosphaerella rotundata* sp. nov., from Finland. *Phytotaxa* 130: 34-42.
- SKALOUD, P., SKALOUDOVA, M., PROCHAZKOVA, A. & NEMCOVA, Y. 2014. Morphological delineation and distribution patterns of four newly described species within the *Synura petersenii* species complex (Chrysophyceae, Stramenopiles). *Eur. J. Phycol.*, in press: 1–16.
- SLAPETA, J., MOREIRA, D. & LOPEZ-GARCIA, P. 2005. The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272: 2073-2081.
- SLAPETA, J., LOPEZ-GARCIA, P. & MOREIRA, D. 2006. Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 23: 23-29.
- SMOL, J.P. 1995. Application of Chrysophytes to problems in paleoecology. *Chrysophyte Algae. Ecology, phylogeny and development*. 303- 344.
- SOMMER, U. 1996. Plankton ecology: The past two decades of progress. *Naturwissenschaften* 83: 293-301.
- 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/>.
- STOECK, T., BASS, D., NEBEL, M., CHRISTEN, R., JONES, M.D.M., BREINER, H.W. & RICHARDS, T.A. 2010. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water.

- Molecular Ecology* 19: 21-31.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- WEE, J.L. 1997. Scale biogenesis in synurophycean protists: Phylogenetic implications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16: 497-534.
- WEE, J.L., L.D. FASONE, A. SATTLER, W.W. STARKS & D. L. HURLEY (2001): ITS/5.8S DNA sequence variation in 15 isolates of *Synura petersenii* Korshikov (Synurophyceae). – In SIVER, P.A & J.L. WEE (eds): Chrysophytes and related organisms: topics and issues, Proceedings of the Fifth International Chrysophyte Symposium. – Nova Hedwigia Beiheft 122: 245-258.
- WHITTAKER, K.A., RIGNANESE, D.R., OLSON, R.J. & RYNEARSON, T.A. 2012. Molecular subdivision of the marine diatom *Thalassiosira rotula* in relation to geographic distribution, genome size, and physiology. *Bmc Evolutionary Biology* 12.
- WUJEK, D.E. & DZIEDZIC, R.M. 2005. Crisofitas escamosas de Ecuador. *Gayana Botánica* 62: 1-8.
- WUJEK, D.E. 2013. Silica-Scaled Chrysophytes (Chrysophyceae and Synurophyceae) from New Zealand Freshwaters. II. Additions to the Flora. *Pacific Science* 67: 113-118.
- ZEEB, B.A. & SMOL, J. P. 2001. Chrysophyte Scales and Cysts. Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. *Developments in Paleoenvironmental Research* 3: 203-223.

7. Přílohy

Příloha 1 : Tabulka lokalit získaných šupin

původ	prům. srážky/rok (mm)	prům. teplota/rok (°C)	prům.min. teplota/rok (°C)	prům.max. teplota/rok (°C)	pH lokality	konduktivita lokality (µS/cm)	teplota lokality (°C)	stát	linie
Kies a Berndt (1984)	763	8	5	12				Německo	SP1
Peterfi a Momeu (1977b)	1120	10	5	15				Holandsko	SP1
Magda 17 (chrysophytes.eu)	1260	9	7	12				Irsko	SP1
Irsko-2011-IR35 (nepublikováno)	1173	9,3	5	12	5,4	79	16,5	Irsko	SP1
Irsko-2011-IR50 (nepublikováno)	1173	9,3	5	12	5,4	79	16,5	Irsko	SP1
Laponsko-5b (nepublikováno)	830	5	-1	12	4,7	17		Švédsko	SP1
Norsko-24 (nepublikováno)	1500	7	5	12	5,0 7	52		Norsko	SP1
BBlata-2011(nepublikováno)	2060	8	3	12	6,3 8	91	12	ČR	SP1
Irsko-2009-38a (nepublikováno)	1131	11,2	8	13,5	8	23		Irsko	SP1
Norsko23 (nepublikováno)	1363	5,6	5	10	5,3	62		Norsko	SP1
Skotsko-39 (nepublikováno)	640	8	3	10	6,6	104	12	Skotsko	SP1
Umea-32 (nepublikováno)	640	8	3	10	6,3	35	13	Švédsko	SP1
Řezáčová a Škaloud (2005)	906	10	7	12				Irsko	SP2
Nováková et.al (2004)	667	8	4	11				ČR	SP2
Kalina et al. (2001)	526	1,8	9,4	20,7	7,3	220	20	USA	SP2
Hansen a Kristiansen (1997)	529	4	2	8				Dánsko	SP2
Eloranta (1989)	590	3		7				Finsko	SP2
Kies a Berndt (1984)	763	8	5	12				Německo	SP2
Roijackers a Kessels (1986)	730	9	5	13				Holandsko	SP2
Hibberd (1978)	817	9	8	14				Holandsko	SP2
Kristiansen (1975)	574	6	6	10				Dánsko	SP2
Peterfi (1965)		12	3	13				Rumunsko	SP2
Bradley (1966)	660	9,1	6	13				Skotsko	SP2
Harris a Bradley (1958)	660	9,1	7	14,5				VB	SP2
Petersen a Hansen (1958)	640	8	4	11	3,7			Dánsko	SP2
Balonov a Kuzmin (1974)	660	3,3	-1	8				Rusko	SP2
Janik 16 (chrysophytes.eu)	1170	4	1	7				ČR	SP2
bblat18 (chrysophytes.eu)	2060	8	3	12				ČR	SP2
Kim Kim (2011)	1207	11	7	17	6,5	450	21	Jižní Korea	SP2
Kristiansen (1990)	1700	17	8	15	6		20	Čína	SP2
Němcová (2008)	830	-1	-3	1	4,8	34	24	Švédsko	SP2
Siver a Lott (2006)	1360	21	15	27	5			USA, Florida	SP2
wee et al (1997)	1758	21,2	15	25,5				USA, Louisiana	SP2
Wujek (2005)	2854	24						USA	SP2
Irsko-2009-40 (nepublikováno)	1131	11,2	8	13,5	7,4	37		Irsko	SP2
Irsko-2011-IR34 (nepublikováno)	1057	9,3	7	12	5,6	119	15,5	Irsko	SP2

Norsko-24 (nepublikováno)	1500	7	5	12	5	52		Norsko	SP2
Bornholm-M18 (nepublikováno)	574	6	6	10	6,9	215	15	Dánsko	SP2
Břehyně-secret site (nepublikováno)	667	8	4	11				ČR	SP2
Estonsko-15 (nepublikováno)	735	5,5	2	9,5	4,9	15	19	Estonsko	SP2
Finsko1 (nepublikováno)	640	2		5	7	69	4,2	Finsko	SP2
Finsko13 (nepublikováno)	610	3		7	6,5		9,5	Finsko	SP2
Finsko47 (nepublikováno)	610	3		7	7,4		8	Finsko	SP2
Grónsko366 (nepublikováno)	240	-4	-3	-8	6	50	13,4	Grónsko	SP2
Irsko-2008-23 (nepublikováno)	906	10	7	12	7,2	63		Irsko	SP2
Irsko-2009-38b (nepublikováno)	1131	11,2	8	13,5	8	23		Irsko	SP2
Irsko-2009-3b (nepublikováno)	906	10	7	12	6	42		Irsko	SP2
Norsko-7 (nepublikováno)	2160	6,5	5	10,5	4,5 6	24		Norsko	SP2
Norsko-N7 (nepublikováno)	1363	5,6	5	10				Norsko	SP2
Norsko1 (nepublikováno)	1363	5,6	5	10				Norsko	SP2
Skotsko-24a (nepublikováno)	640	8	3	10	5,9	27	11	Skotsko	SP2
Skotsko-24 b (nepublikováno)	640	8	3	10	5,9	27	11	Skotsko	SP2
Skotsko-24.c (nepublikováno)	640	8	3	10	5,9	27	11	Skotsko	SP2
Skotsko-8 (nepublikováno)	640	8	3	10	6,4	42	14	Skotsko	SP2
Umea-Balt34 (nepublikováno)	530	2	-1	6	5,1	14	13,5	Švédsko	SP2