

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra botaniky



Bakalářská práce

**Alopatrická a sympatrická diverzita populací penátních
rozsivek (Bacillariophyceae)**

Bachelor thesis

**Allopatric and sympatric diversity in pennate diatom
populations (Bacillariophyceae)**

Pavla Urbánková

Praha 2009

Školitelka:

Mgr. Jana Veselá

Abstrakt

V teoretické části své bakalářské práce jsem shrnula literaturu týkající se teoretického druhového konceptu a jeho praktické aplikace v sympatrických populacích penátních rozsivek spolu se specifickými aspekty jejich biologie, které ovlivňují studium jejich diverzity. V závěru teoretické části se věnuji studiím, které se zabývají diverzitou alopatrických populací. Tyto studie dokazují, že šíření protistních druhů, včetně rozsivek, může být geograficky omezené a že je tedy nutné, zabývat se i jejich biogeografií.

Praktická část této bakalářské práce je úvodem k práci diplomové a zabývá se molekulární variabilitou sympatrických a alopatrických populací kosmopolitního druhu *Frustulia saxonica* Rabenhorst s.l., který je vymezen na základě morfologie.

Klíčová slova: rozsivky, Bacillariophyceae, druhový koncept, biogeografie, *Frustulia saxonica*

Abstract

The theoretical part of my bachelor thesis reviews literature concerning theoretical species concept and its practical application in the research of sympatric diversity in populations of pennate diatoms. Specific aspects of diatom biology with direct implications for this research are mentioned as well. Scientific papers on allopatric diversity are summarized at the end of this part. The overall conclusion of these suggests that dispersal of protist species, including diatoms, may be geographically limited. Therefore, it is necessary to study their biogeography as well.

Practical part is focused on molecular variability in the cosmopolitan diatom morphospecies *Frustulia saxonica* Rabenhorst s.l. and should continue in my master thesis.

Key words: diatom, Bacillariophyceae, species concept, biogeography, *Frustulia saxonica*

1. ÚVOD	4
2. TEORETICKÁ ČÁST	4
2.1 Druhový koncept	4
2.2 Druhový koncept u rozsivek – „Waltonian species concept“	7
a) Morfologie	7
b) Fenotypická plasticita	8
c) Životní cyklus rozsivek a změny morfologie s ním spojené	10
d) Sexuální reprodukce a auxosporulace	11
e) Fyziologie	13
f) Ekologie	14
g) Molekulární variabilita	15
2.3 Biogeografie – Teorie neutrálního rozšíření	18
a) Morfotypy s omezeným rozšířením	18
b) Genotypy s omezeným rozšířením	19
c) Potenciální vektory	20
d) Geografické vs. ekologické faktory rozšíření, neutrální teorie rozšíření	21
2.4 Závěr	22
3. PRAKTICKÁ ČÁST – Molekulární variabilita druhu <i>Frustulia saxonica</i> s.l.	23
3.1 Úvod	23
3.2. Materiál a metody	24
3.3 Výsledky	25
3.4 Závěr	26
4. PODĚKOVÁNÍ	27
5. LITERATURA	27
6. PŘÍLOHY	33

1. ÚVOD

Studium reprodukční izolace rozsivek prostřednictvím křížicích experimentů, které umožňuje přímé vymezení biologických druhů, jasně ukázalo, že dosavadní přístupy ke studiu druhů nejsou schopné popsat reálnou druhovou diverzitu této třídy. Zejména tradiční přístup založený na morfologii křemičité schránky, na kterém je postavený současný taxonomický systém, skutečnou diverzitu rozsivek významně podhodnocuje a mnoho druhů, které byly takto vymezeny, jsou ve skutečnosti komplexem velmi podobných, semikryptických druhů.

Příliš široké pojetí druhu často bránilo pochopení specifických druhových vlastností jako je ekologie, biogeografie či fylogeneze a mnoho druhů bylo v minulosti považováno za kosmopolitních generalisty. Aby bylo možné správně formulovat hypotézy týkající se těchto vlastností, ale i celkové biodiverzity a mechanismů speciace, je nutné přesně vymezit jednotlivé druhy.

Urgentní potřebu přesného vymezení druhů reflektuje množství studií, které se zabývají sympatrickou a alopatickou diverzitou populací. Ve své práci jsem se pokusila tuto literaturu shrnout: (i) v souvislosti s holistickým přístupem ke studiu druhů a (ii) v souvislosti s biogeografií protistních druhů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Druhový koncept

Druhový koncept vždy byl a stále je jedním z nejvíce diskutovaných témat v biologii. Vedle nominalistického pohledu, který vnímá druhy pouze jako lidský výtvar bez reálného základu v živé přírodě (Hendry et al. 2000), vzniklo v historii mnoho různých druhových konceptů, které vycházejí z toho, že druhy jsou reálné, tzv. naturalistický přístup. Stručný přehled hlavních druhových konceptů je v tabulce 1 (převzato z Mallet 2005).

Alternativní druhové koncepty reflektují odlišné biologické vlastnosti živých organismů a různé přístupy k jejich studiu. Kritéria pro stanovení druhu jsou tedy značně ovlivněna i zaměřením autora tak, aby umožňovala řešit otázky jeho oboru. Problémem je, že hranice mezi druhy a jejich počet stanovený na základě jednotlivých konceptů, nebo jejich různých formulací, mohou být odlišné (de Queiroz 2007).

Tato situace vedla k pokusům o vytvoření jednotného druhového konceptu. Definitivní řešení tohoto problému je však stále v nedohlednu. Někteří biologové prosazují multidisciplinární

(holistický, polyfázický) přístup, založený na kombinaci morfologických, ekologických, fylogenetických a reprodukčních dat (Mann 1999; Johansen & Casamatta 2005). Existuje však i zcela opačný názor, který preferuje výsledky fenotypových a genotypových shlukových analýz před snahou o popsání mechanismů speciace (Mallet 2005).

O sjednocení druhových konceptů se pokusil i Kevin de Queiroz (de Queiroz 2007). Podle něj jsou rozpory mezi jednotlivými koncepty pouze iluzorní. Za jednotlicí prvek považuje teoretické pojetí druhu jako samostatně se vyvíjející metapopulační linie. Určující kritéria pro vymezení druhů použité v alternativních druhových konceptech označuje jako sekundární vlastnosti druhu. To, že tyto vlastnosti vznikají v průběhu speciace v různém čase a pořadí, je podle něj příčinou rozporů mezi jednotlivými koncepty.

Na rozdíl od některých druhových konceptů de Queiroz striktně odděluje teoretickou konceptualizaci druhu a jejich vymezení v praxi. V praxi přítomnost jednotlivých sekundárních vlastností potvrzuje hypotézu o separaci a diverzifikaci linií. Absence jedné nebo několika z těchto vlastností však tuto hypotézu nevyvrací. To je možné pouze v případě absence všech sekundárních vlastností. Silné podpoření hypotézy vyžaduje přítomnost většího počtu sekundárních vlastností (de Queiroz 2007).

Tento přístup je v podstatě totožný s tím, co Mann (1999) nazývá „Waltonian species concept“. Spíše než o teoretickou konceptualizaci, se zde jedná právě o praktický přístup k vymezení druhů. Stejně jako de Queiroz požaduje precizní holistické studium z pohledu odlišných biologických přístupů.

Je však evidentní, že tento postup nelze použít na každý druh. Řešením by mohlo být důkladné prostudování několika druhových komplexů, modelových systémů, s důrazem kladeným na otázky týkající se: (i) založení a původu vlastností, které odlišují jednotlivé druhy; (ii) mechanismů, které tyto vlastnosti u druhů udržují; (iii) mechanismů speciace. Modelové systémy by měly být vybrány tak, aby co nejlépe reprezentovaly celý taxon, druhy z různých habitatů (sladkovodní vs. mořský), fylogeneticky bazální vs. odvozené druhy, apod. (Mann 1999). Několik modelových systémů již vzniklo i pro protistní organismy, například pro druhy *Pandorina morum* nebo *Closterium ehrenbergii* (shrnuto v Mann 1999), a v posledních 20 letech jsou usilovně studovány i u rozsivek.

Tabulka 1 (převzato z Mallet 2005)

Druhový koncept	Stručná definice	Literatura
Biologický	Taxony reprodukčně izolované od ostatních druhů.	Poulton 1904 Mayr 1970
Darwinův morfológický	„Variety“, mezi kterými nejsou žádné, nebo je jen málo morfológických přechodů.	Darwin 1859
Diagnostický (fylogenetický)	Druh je „dále nedělitelná (základní) skupina organismů, mezi kterými je základní vztah předek-potomek, odlišitelná od ostatních podobných skupin“.	Cracraft 1989
Ekologický	„Linie, která obývá adaptivní zónu minimálně odlišnou od každé další linie...“	Van Valen 1976
Evoluční	Samostatně se vyvíjející linie „s jednotnou evoluční rolí a tendencemi“.	Simpson 1951
Fenetický	Skupiny jedinců vymezené na základě morfológických znaků prostřednictvím vícerozměrných statistických analýz.	Sokal & Crovello 1970
Genealogický	Druhy jsou striktně monofyletické skupiny organismů.	Baum & Shaw 1995
Genotypický	Sympatrické druhy jsou skupiny genotypů oddělené nerealizovanými genotypy, které by ležely mezi nimi.	Mallet 1995, 2001
Kladistický	Druhy jsou nevětvené úseky fylogenetických linií.	Hennig 1968 Ridey 2004
Kohezní	Taxon charakterizovaný fenotypickou kohezí (vzniká působením genetických nebo demografických kohezních mechanismů).	Templeton 1998
Populační	Reálnou evoluční jednotkou nejsou druhy, ale populace, protože genový tok je většinou slabý. Morfológická a genetická jednotnost druhu vzniká díky stabilizující selekce, která působí v každé populaci zvlášť.	Ehrlich & Raven 1969
Rozpoznávací	Druhy mají specifický mechanismus, kterým rozpoznávají sexuální partnery.	Paterson 1985
Univerzální	Druh je samostatně se vyvíjející linie.	De Queiroz 1998

2.2 Druhový koncept u rozsivek - „Waltonian species concept“

V současné době je již zcela evidentní, že tradiční vymezení druhů pouze na základě morfologie, významně podhodnocuje skutečnou diverzitu. Kryptické a pseudokryptické druhy tedy existují i u rozsivek a dalších protistních tříd, stejně jako u rostlin a živočichů. Přestože je nelze odlišit na základě morfologie, nebo je to velmi obtížné, mohou se lišit ve vlastnostech, které nejsou na první pohled patrné (Amato et al. 2007).

Holistický přístup ke studiu druhů je i u rozsivek stále běžnější a studie většinou propojují údaje o morfologické variabilitě, fyziologii, ekologii a zejména reprodukční izolaci (Lundholm et al. 2003; Mann et al. 2004; Lundholm et al. 2006; Amato et al. 2007; Vanormelingen 2007, 2008a a další). Mezi hlavní modelové systémy penátních rozsivek patří sladkovodní bentický druhový komplex *Sellaphora pupula* (Behnke et al. 2004; Mann et al. 2004; Evans et al. 2008; atd.), mořské planktonní druhy rodu *Pseudo-nitzschia* (Hasle 2002; Evans et al. 2004; Evans & Hayes 2004; Amato et al. 2007; Casteleyn et al. 2008, 2009) a druhový komplex *Eunotia bilunaris*, bazální linie penátních rozsivek s raphe (Mann et al. 2003; Mann & Chepurinov 2005; Vanormelingen et al. 2007, 2008a).

Specifické aspekty biologie rozsivek a jejich důsledky pro vymezení druhů v praxi:

a) Morfologie

Komplikovaná struktura křemičité schránky rozsivek, nazývaná frustula, poskytuje mnoho znaků, které byly v minulosti použity k vytvoření rozsáhlého taxonomického systému. Druhy byly určovány za pomoci světelného mikroskopu a byla sbírána tradiční morfometrická data, jako je délka, šířka a hustota strií. Zatímco celkový tvar, uspořádání strií, počet a tvar chloroplastů a další znaky viditelné ve světelném mikroskopu byly po vizuálním zhodnocení popsány kvalitativně.

Možnosti studia morfologie se značně rozšířily s objevem transmisní a skenovací elektronové mikroskopie. Možnost studovat morfologii schránky ve větším detailu vedla k mnoha taxonomickým změnám nejenom na úrovni druhů, ale i na vyšších taxonomických úrovních. Výsledkem je, že systém rozsivek je někdy nejednoznačný (Round et al. 1990; Van de Vijver et al. 2002).

Problémem je i fakt, že tradiční přístupy ke studiu rozsivek jsou často zatíženy značnou subjektivitou. Možným řešením tohoto problému se zdá být využití vícerozměrných statistických analýz a metod geometrické morfometriky. Oba tyto přístupy umožňují objektivnější vyhodnocování dat. Jejich objektivita přitom spočívá zejména v jejich opakovatelnosti. Užívání těchto metod podporuje i skutečnost, že morfologická variabilita

mezi blízkými příbuznými druhy rozsivek je spíše kvantitativní než kvalitativní. Spíše než v přítomnosti či absenci určitého znaku, spočívá v míře jeho projevu (Mann 1999).

Celkový tvar valvy, který byl vždy popisován pouze kvalitativně je možné prostřednictvím metod geometrické morfometriky matematicky popsat. To umožňuje odhalit skrytou diverzitu i u rozsivek s velmi jednoduchou morfologií jako je *Asterionella* (Pappas 2001), *Tabellaria* (Theriot & Ladewski 1986) či *Meridion* (Rhode 2001). Navíc se tyto metody zdají být využitelné i při automatizovaném určování druhů (Mann et al. 2004).

Pomocí metod geometrické morfometriky byla objevena variabilita v druhovém komplexu *Cymbella cistula* (Pappas & Stoermer 2003) či *Cyclotella meneghiniana/scaldensis*. Odlišné morfotypy komplexu *Cyclotella meneghiniana/scaldensis* se lišily v ekologii a fyziologii (Beszteri et al. 2005a) a byly podpořena i molekulární analýzou (Beszteri et al. 2005b)

Výsledky mnoha studií naznačují, že morfologická variabilita uvnitř druhových komplexů je spíše nespojitá než spojitá, jak se předpokládalo dříve (Mann et al. 2004; Vanormelingen et al. 2007). Velmi jemné odlišnosti v morfologii jsou často spojeny se značnými rozdíly v sekvencích neutrálních molekulárních markerů (Lundholm et al. 2003; Benkhe et al. 2004; Baszteri et al. 2005; Lundholm et al. 2006; Evans et al. 2007), oddělením ekologických nik (Créach et al. 2006; Potapova & Hamilton 2007) a reprodukční izolací (Mann & Chepurinov 2005; Amato et al. 2007; Vanormelingen 2008a). Nicméně je třeba zdůraznit, že část pozorované morfologické nespojitosti nejspíš vzniká v důsledku standardizované kultivace, která může minimalizovat fenotypickou variabilitu a nespojitost vlastností nalezená při laboratorních experimentech nemusí být statisticky průkazná v přírodních vzorcích (Vanormelingen et al. 2008a).

Většina studií tedy nasvědčuje, že nově objevovaná diverzita je pouze semikryptická. Potenciálně kryptické se zdají být pouze některé druhy centrických planktonních rozsivek, například druh *Skeletonema* (Ellegaard et al. 2008).

b) Polymorfismus a fenotypická plasticita

Při studiu variability morfologie musí být brána v úvahu možná fenotypická plasticita a polymorfismus. Nejlepším způsobem studia fenotypické plasticity jsou experimenty prováděné na klonálních kulturách. Ačkoliv jsou studie zabývající se vlivem prostředí na morfologii protistních organismů poměrně časté, zejména u penátních rozsivek je jejich počet překvapivě malý.

O něco více zájmu bylo v minulosti věnováno tomuto tématu u centrických rozsivek. Morfologie frustuly byla ovlivněna teplotou, salinitou, intenzitou světla, množstvím fosforu a

dusíku. Fenotyp byl většinou plastický jen omezeně a jeho změny byly postupné (shrnuje v Mann 1999). Nicméně klony druhu *Thalassiosira* sp. vykazovaly v závislosti na teplotě morfologii dvou odlišných druhů. Při nízkých teplotách (3°C) měly valvy ultrastrukturu typickou pro druh *T. rotula*, zatímco vyšší teploty (17°C) indukovaly morfologii *T. gravida*. Při středních teplotách (10°C) vykazovala morfologie přechodové znaky (Syvertsen 1977). Podobných příkladů však není popsáno mnoho a většina z nich se týká planktonních druhů. Uvážíme-li fakt, že planktonní druhy jsou vystaveny mnohem extrémnějším podmínkám než druhy bentické, větší plasticita jejich fenotypu není až tak překvapivá. Extrémnost podmínek se přitom týká především velkých změn v dostupnosti živin a světelných podmínek během roku (Mann 1999).

Mnoho rozsivkových druhů bylo během 20. století pěstováno *in vitro*. Lze tedy očekávat, že pokud by k výrazným změnám v morfologii docházelo běžně, jistě by to pozornosti vědců neuniklo. I ze studia modelových systémů v přírodních vzorcích a kulturách se zdá, že vlastnosti jako je celkový tvar, velikost, hustota a vzor strií, mají silné genetické založení.

Mizuno (1987) demonstroval stabilitu těchto vlastností u druhu *Cocconeis scutellum* při různých teplotách (5-22°C) a délce dne. Ani *Pseudo-nitzschia calliantha* pěstovaná při různých teplotách (2-25°C) a salinitách nevykazovala žádné změny ve vlastnostech jako je hustota strií, fibulí či poroidů, ani ve struktuře hymenů, které poroidy překrývají (Lundholm et al. 1997).

V případě, že kultivace není možná, je třeba se spokojit s důkladným studiem přírodních populací. Velkou výhodou je pak skutečnost, že každá polovina schránky vzniká v jiné fázi životního cyklu a tedy i za odlišných podmínek prostředí. Objevení jedinců s odlišnou morfologií horní a spodní valvy, kteří se označují jako Janusovy buňky, může velmi pomoci při studiu fenotypické plasticity a polymorfismu (Round et al. 1990).

Polymorfismus způsobený změnou ontogeneze valvy, která vede k odlišným hustotám strií, prokázali McBride a Edgar (1998) u druhu *Gomphonema angustatum*. Objev Janusovy buňky kombinující obě morfologie vyloučil možnost, že se jedná o dva druhy. Nalezení Janusových buněk vedlo k objevu polymorfismu i u penátních druhů *Phaeodactylum* nebo *Mastogloia*, kde byly nalezeny 2-3 odlišné morfologie. Význam těchto případů polymorfismu však není jasný. Naproti tomu funkce polymorfismu je známa u některých druhů centrických rozsivek. U rodu *Aulacoseira* slouží buňky s dlouhými oddělovacími zuby na valvě k regulaci velikosti kolonií (shrnuje v Mann 1999).

Bentley (1958) ukázal, že v závislosti na biotických podmínkách prostředí se může měnit i vzhled kolonií. *Skeletonema costatum* tvoří v přírodě dlouhé vláknité kolonie. V axenických

kulturách podobné kolonie nevznikají a převažují zde jednotlivé buňky nebo vzácněji dvojice a trojice buněk.

c) Životní cyklus rozsivek a změny morfologie s ním spojené

Problémem, který komplikuje studium morfologie rozsivek je mimo jiné i jejich životní cyklus. Vegetativní část tohoto cyklu je typická zmenšováním průměrné velikosti buněk v populaci. Původní velikost populace je obnovena auxosporulací. Ta je u heterotalických druhů, což je pravděpodobně většina penátních rozsivek, spojena se sexuálním rozmnožováním. Vzniklá zygota se označuje jako auxospora. Uvnitř auxospory, která expandovala do původní velikosti, vzniká iniciální buňka. Mitotickým rozdělením iniciální buňky začíná nový vegetativní cyklus (Round et al. 1990).

Zmenšování je velmi často spojeno se změnami morfologie schránky. U penátních rozsivek přitom dochází k postupné změně celkového tvaru i vzoru na valvě. Všeobecně platí, že menší buňky jsou více eliptické a vzor na jejich valvě se zjednodušuje. Zjednodušenou morfologií mohou mít i iniciální buňky. Buňky se zjednodušenou morfologií mohou někdy zcela postrádat znaky charakteristické pro vegetativní buňky (Mann et al. 2005).

Mechanismy, které řídí změny morfologie, jsou téměř neznámé. Nicméně skutečnost, že se valvy během vegetativního cyklu mění vždy stejným způsobem, by mohla nasvědčovat tomu, že je tento mechanismus relativně jednoduchý (Mann 1999). Přestože je většina morfologických změn u rozsivek postupná, jsou známé i příklady rychlých změn morfologie a velikosti. O významu těchto změn ani jejich mechanismu se však také mnoho neví. Příkladem rychlé změny je vznik morfologie typické pro vegetativní buňky druhu *Neidium ampliatum* ze zjednodušené iniciální buňky (Mann & Chepurnov 2005). Skokové zmenšení velikosti buňky bylo popsáno u mnoha druhů. Jeho funkcí by mohlo být zkrácení vegetativní části životního cyklu v nepříznivých podmínkách. To potvrzuje i skutečnost, že k němu mnohem častěji dochází v kulturách ve stacionární růstové fázi a ve stárnoucích kulturách (Mann et al. 2003). Mann et al. (2003) ukázal možnost využití tohoto fenoménu při křížících pokusech u druhu *Eunotia bilunaris*.

K sexuálnímu rozmnožování u rozsivek dochází, až když velikost buňky poklesne pod určitou, druhově specifickou, hodnotu a pokud jsou k tomu vhodné podmínky. I podmínky jsou druhově specifické a patří sem například délka dne, intenzita světla, salinita nebo teplota. U heterotalických druhů, je nutná i přítomnost vhodného sexuálního partnera (Round et al. 1990).

Celkem běžným jevem u penátních rozsivek je i morfoloická odlišnost klidových stadií. Edlund a Stoermer (1997) popsali u rodu *Pinullaria* valvu klidové spory, která měla ve srovnání s vegetativní buňkou třetinovou hustotu strií. Ve fosilních sedimentech, tak může být správné přiřazení vegetativních buněk a klidových spor velmi obtížné nebo dokonce nemožné (Edlund & Stoermer 1997).

Ačkoliv se některé znaky během vegetativní části životního cyklu mění (celkový tvar valvy, uspořádání strií, umístění sterna, anulu nebo raphe), jiné jsou překvapivě konstantní (tvar areol a jejich překrytí) a to i u deformovaných buněk, které často vznikají ve stárnoucích kulturách (Mann 1999).

d) Sexuální reprodukce a auxosporulace

I když je sexuální rozmnožování obligátní součástí životního cyklu většiny rozsivek, přímý důkaz o sexuální reprodukci a auxosporulaci u většiny druhů stále chybí. Tato velmi omezená data naznačují, že: (i) většina druhů penátních rozsivek je heterotalická (pohlaví jsou oddělená), případná homotalie je často pouze fakultativní, (ii) heterotalie je u penátních rozsivek původní stav (Mann & Chepurnov 2003). Z výsledků křížících pokusů se navíc zdá, že heterotalie nemusí být vždy pouze bipolární, jako je tomu u některých druhů rodu *Sellaphora* a *Eunotia* (Mann et al. 2003; Benkhe et al. 2004; Mann et al. 2005). U druhu *Achnanthes longipes* byly na základě párování klonů při křížících pokusech a schopnosti auxosporulace v monoklonální kultuře rozlišeny 4 typy sexuálního chování (Chepurnov & Mann 1997, 1999, 2000).

Vedle heterotalických a homotalických druhů byly popsány i druhy, které se zdají být zcela asexuální. U asexuálního rozmnožování jde analogicky k jiným třídám rozlišit automixii a apomixii. Ze studie Vanormelingen et al. (2008a) se navíc zdá, že u některých převážně asexuálních klonů druhu *Eunotia bilunaris* s.l. by mohlo fakultativně docházet i k sexuální reprodukci. Přejít od heterotalie k homotalii nebo úplná ztráta sexuálního rozmnožování je evidentně jednodušší než opačný proces a může k němu docházet poměrně často (Mann et al. 2003). Není tedy překvapivé, že všechny typy sexuálního chování lze nalézt v rámci jednoho druhového komplexu, tedy mezi blízkými příbuznými druhy (Mann et al. 2004; Vanormelingen et al. 2008a).

Odlišnosti v průběhu sexuální reprodukce a auxosporulace jsou charakteristické pro jednotlivé druhy i pro vyšší taxonomické jednotky (Mann et al. 2003, 2005; Pouličková & Mann 2006). Fakt, že je sexuální rozmnožování v životním cyklu penátních rozsivek obligátní, umožňuje použití Mayerova biologického konceptu druhů, který chápe druhy jako reprodukčně

izolované skupiny organismů. Studium reprodukční izolace prostřednictvím křížících experimentů umožňuje odlišit mezidruhovou a vnitrodruhovou variabilitu v morfologii a v neutrálních molekulárních markerech (Behnke et al. 2004; Amato et al. 2007; Vanormelingen et al. 2007, 2008a).

Reprodukční bariéry lze rozdělit na pre- a postzygotické, podle toho, v jaké fázi sexuálního rozmnožování působí. Nejčastějším důvodem neúspěšného mezidruhového křížení při laboratorních pokusech je prezygotická reprodukční bariéra, přesněji neschopnost rozpoznat buňku druhého druhu jako vhodného sexuálního partnera. Méně časté jsou případy, kdy dochází k párování buněk, vzniku gamet nebo k hybridizaci. Zde se mohou uplatňovat postzygotické reprodukční bariéry, jako je neživotaschopnost nebo sterilita hybridů (Vanormelingen et al. 2008a).

Hybridizace mezi blízkými příbuznými druhy byla opakovaně prokázána v laboratorních experimentech (Benkhe et al. 2004; Casteleyn et al. 2008; Vanormelingen et al. 2008a). Není však příliš jasné, jak často dochází k hybridizaci za normálních podmínek. Přestože blízké příbuzné démy (definice dému viz. Mann 1999) *Sellaphora pupula* „pseudocapitate“ a „rectangular“ se při laboratorních pokusech kříží, velká odlišnost sekvencí ITS naznačuje, že genový tok mezi nimi je velmi nebo dokonce zcela omezený. Je tedy možné, že mají oddělené ekologické niky a za normálních podmínek se nesetkávají, nebo že je zde postzygotická reprodukční bariéra, například v podobě sterility F1 generace hybridů, kterou nebylo možné objevit kvůli designu pokusu (Benkhe et al. 2004).

Studii týkajících se hybridizace v přirozených podmínkách je zatím velmi málo (Casteleyn et al. 2009; D'Alerio et al. 2009). Casteleyn et al. (2009) našli hybridy *Pseudo-nitzschia pungens* var. *pungens* a var. *cingulata* v severovýchodním Pacifiku, kde se vyskytují obě variety. Pomocí sekvencí ITS a rbcL bylo možné odlišit F1 generaci hybridů a hybridy vzniklé jejich zpětným křížením s rodičovskými genotypy. V tomto případě vykazovali hybridy v F1 generaci morfologické znaky obou linií. Jsou však známy případy, kdy se hybridy podobají jedné z rodičovských linií (Casteleyn et al. 2009).

Pochopení hybridizace a jejího významu v populacích rozsivek je ve srovnání s rostlinami či hmyzem stále na velmi primitivní úrovni (Vanormelingen et al. 2008a).

e) Fyziologie

Prostřednictvím morfologie se manifestuje jen zanedbatelná část celého genomu. Dalším způsobem jeho projevu jsou fyziologické vlastnosti organismů. Pseudokryptické druhy se mohou lišit svou růstovou rychlostí v různé teplotě a salinitě, metabolismem dusíku, požadavky na množství křemíku a vitaminů, citlivostí ke znečištění, apod. (Mann 1999). Zatímco ekologická funkce morfologické variability nemusí být vždy zcela evidentní, rozdíly ve fyziologických vlastnostech s ekologií často úzce souvisí.

Studie srovnávající růstovou rychlost druhů v závislosti na měnících se podmínkách prostředí jsou u protistních organismů poměrně běžné a mohou pomoci při řešení otázek kryptické diverzity či biogeografie (Boenigk et al. 2006; Weisse & Stadler 2006). Výsledky laboratorního experimentu, který měřil růstovou rychlost dvou ribotypů druhu *Navicula phyllepta* v závislosti na měnící se salinitě korelovaly s jejich distribucí a abundancí na zkoumané lokalitě (Créach et al. 2006).

Podobných studií u rozsivek však není mnoho a znalosti fyziologických nároků jednotlivých druhů jsou tak spíše vedlejším produktem studií, které druhy kultivují za účelem sekvenace nebo křížení. Růstová rychlost druhů z komplexu *Sellaphora pupula* se lišila v závislosti na teplotě, světelné periodě a intenzitě. Dva z šesti druhů se nepodařilo nakultivovat vůbec (Mann et al. 2004).

Druhy se mohou lišit i ve schopnosti produkovat toxické látky a různé sekundární metabolity. Rod *Pseudo-nitzschia* je v centru vědeckého zájmu právě z tohoto důvodu (Hasle 2002; Lundholm et al. 2003; Evans & Hayes 2004, Evans et al. 2004; Lundholm et al. 2006; Amato et al. 2008). Druhy rodu *Pseudo-nitzschia* jsou významnou složkou vodních květů při pobřežích i ve volném oceánu na celém světě a některé z jejich druhů jsou známé jako producenti domoikové kyseliny. Otrava způsobená tímto neurotoxinem může být smrtelná i pro člověka. Proto je výskyt druhů, které byly popsány jako potencionální producenti domoikové kyseliny, monitorován v pobřežních vodách mnoha zemí a v komerčních aquakulturách. Problémem je, že toxické a netoxické druhy rodu *Pseudo-nitzschia* jsou často pseudokryptické a jejich odlišení na základě morfologie je velmi obtížné nebo téměř nemožné. Druhově specifické molekulární sondy navržené pro rychlé odlišení některých druhů rodu *Pseudo-nitzschia* mají několik nedostatků: (i) nejsou schopné postihnout veškerou genetickou diverzitu příslušných druhů; (ii) molekulární sondy, které byly navržené na klonech izolovaných z omezené geografické oblasti, nejsou v jiných oblastech dostatečně specifické (Evans et al. 2004).

Aby bylo možné bezpečně rozpoznat toxické druhy, je nutné vyřešit jejich taxonomii. Až pak bude možné řešit i otázky týkající se biogeografie a populační dynamiky. Prioritou je tedy stanovení genetické variability na úrovni jednotlivých druhů (Evans et al. 2004). Slibnou metodou pro studium genetické variability na úrovni druhů a populací se zdá být použití mikrosatelitových markerů (Evans & Hayes 2004; Evans et al. 2004).

Nicméně ne všechny rozdíly v produkci domoikové kyseliny je možné vysvětlit pomocí genetické variability jednotlivých klonů. Dřívější studie ukázaly, že míru produkce kyseliny mohou ovlivňovat bakterie a že toxicita klonů s časem klesá. Neznalost faktorů ovlivňujících produkci kyseliny domoikové brání spolehlivému propojení genetických a fyziologických dat (Evans 2004).

f) Ekologie

Všeobecně uznávaný předpoklad, že příbuzné druhy žijící sympatricky musí mít nutně oddělené ekologické niky a stále častěji potvrzovaná skutečnost, že druhy rozsivek jsou spíše pseudokryptické než kryptické, nasvědčuje tomu, že morfotypy rozsivek by mohly korelovat s ekotypy. Přestože zatím není mnoho dokladů o oddělení ekologických nik u pseudokryptických druhů rozsivek, některé studie zabývající se foraminifery tuto teorii potvrzují. Například distribuce ribotypů planktonního druhu *Orbulina universa*, které se liší i morfologií schránky, koreluje s hydrografickými provinciemi a s povrchovou primární produkcí oceánu (de Vargas et al. 1999).

Prostorové oddělení nik popsal Geitler již v roce 1948 u variet *Cocconeis placentula* var. *euglypta* a var. *klinoraphis*. Varieta *klinoraphis* se vyskytovala pouze na listech vodních mechů, zatímco varieta *euglypta* byla nalezena i na vláknité řase rodu *Cladophora* (Mann 1999).

Časové oddělení ekologických nik bylo opakovaně popsáno u mořských planktonních druhů. V Neapolském zálivu byly před začátkem jarního vodního květu nalezeny tři odlišné ribotypy druhu *Pseudo-nitzschia delicatissima* s.l. Jarnímu vodnímu květu však dominoval pouze jeden z nich (Orsini et al. 2004). V Narragansett Bay tvořily podzimní a jarní vodní květ geneticky odlišné populace druhu *Skeletonema costatum* (Gallagher 1980). Koexistence blízce příbuzných druhů je v těchto případech pravděpodobně umožněna tím, že odlišné druhy dominují planktonu v odlišnou dobu, zatímco po zbytek roku udržují jen malou velikost populace. Tyto cykly přitom nemusí být pouze roční, ale mohou trvat i několik let (Amato et al. 2007).

Potapova a Hamilton (2005) odlišili pomocí geometrické morfometriky šest morfotypů v druhovém komplexu *Achnantheidium minutissimum* s.l., které se navíc signifikantně lišily ve své ekologii. Posuzovány byly vlastnosti týkající se chemismu vody: pH, konduktivita, obsah fosforu a dusíku.

Abundance a distribuce dvou ribotypů druhu *Navicula phyllepta* s.l. v zálivu Westerschelde koreluje s gradientem salinity. ITS typ I dominuje místům s brakickou vodou a dosahuje maximální velikosti populace vždy na koci jara. ITS typ II je obecně méně početný a preferuje vyšší salinitu. Větší rozvoj populace byl zaznamenán pouze na jaře v rok, kdy byla studie zahájena. Odlišné růstové rychlosti v gradientu salinity byly potvrzeny i v laboratoři (Créach et al. 2006).

Některé studie nasvědčují tomu, že i variabilita v ultrastruktuře může mít ekologický význam. Například póry tvořící strie, které jsou překryté jemně perforovanými membránami, hymeny, slouží jako transportní kanály mezi vnějším prostředím a buněčnou cytoplasmou. Prostřednictvím těchto kanálů může buňka kontrolovat difuzi a příjem částic a molekul z okolního prostředí. Zároveň však mohou být místem vstupu parazitů a potenciálně i virů (shrnutí v Mann 1999).

Vysoká hostitelská specifita je u parazitů běžným jevem. Druhově specifické interakce hostitel-parazit mohou skrze koevoluci významně ovlivňovat vlastnosti druhů a skrze frekvenčně závislou selekci umožnit koexistenci podobných druhů na jedné lokalitě (Mann 1999). I parazité rozsivek jsou vysoce druhově specifictí. Rozdílná citlivost druhů k napadení chytridiiemi a oomycety byla ukázána například v druhovém komplexu *Sellaphora pupula*. Tato skutečnost může být s výhodou použita k odlišení semikryptických druhů (Mann 1999).

g) Molekulární variabilita

Využití metod molekulární biologie při studiu systematiky druhů vedlo k odhalení nečekané kryptické diverzity a dnes jsou jednou z hlavních metod využívaných při vymezení druhů u rozsivek.

Jaderná ribozomální DNA (rDNA), je jednou z nejčastěji sekvenovaných oblastí. Důvodů je několik: (i) amplifikace prostřednictvím polymerázové řetězové reakce (PCR – polymerase chain reaction), je usnadněna větším počtem kopií rDNA v genomu a možností použít univerzální primery; (ii) alignment sekvencí je usnadněn přítomností konzervovaných oblastí a možností vytvořit sekundární strukturu; (iii) hypervariabilní oblasti rDNA poskytují velké množství znaků využitelných při rekonstrukci fylogeneze; (iv) stále rostoucí počet dostupných sekvencí umožňuje provádět rozsáhlé srovnávací analýzy; (v) jednotlivé oblasti rDNA

poskytují informaci o fylogenetických vztazích na různých taxonomických úrovních (Alverson 2008). Malou ribozomální podjednotku (SSU neboli 18S) rDNA lze využít například při rekonstrukci fylogeneze celé třídy rozsivek (Alverson et al. 2006). Naproti tomu D1-D2 oblast velké ribozomální podjednotky (LSU neboli 28S) a mezerníkové oblasti (ITS1 a ITS2) se vyvíjejí velmi rychle a mohou být užitečné při řešení fylogeneze na úrovni druhů nebo dokonce populací (Lundholm et al. 2003; Benkhe et al. 2004; Lundholm et al. 2006; Amato et al. 2007; Vanormelingen et al. 2007, 2008a). Velká rychlost evoluce však může značně komplikovat nebo dokonce úplně znemožnit vytvoření alignmentu i u blízce příbuzných druhů (Benkhe et al. 2004; Lundholm et al. 2006).

Další nevýhody rDNA jsou spojené především se značným polymorfismem v jednotlivých kopiích obsažených v genomu (Alverson 2008). Například variabilita sekvencí ITS v genomu rozsivek se pohybuje od hodnot menších jedné (Casteleyn et al. 2008), ale může přesáhnout 7% (Benkhe et al. 2004). Álvarez a Wendel (2003) shrnuli nevýhody použití ITS ve fylogenetických analýzách rostlin. Přestože se zdá, že ne všechny popsané komplikace jsou aktuální i u rozsivek, je třeba hodnotit analýzy založené na rDNA a především ITS dostatečně kriticky (Alverson 2008).

Alternativou k jaderné rDNA jsou mitochondriální a plastidové molekulární markery. Z mitochondriálního genomu se nejčastěji využívá oblast kódující proteinovou podjednotku cytochrom oxidasy (*cox1*), z plastidového genomu oblast kódující proteinovou velkou podjednotku enzymu RUBISCO (*rbcL*). Oproti rDNA mají několik výhod: (i) jsou obsaženy v genomu pouze v jedné kopii; (ii) alignment je snadný, protože obě oblasti jsou kódující. Použití plastidových markerů navíc minimalizuje možnost amplifikace DNA z případné kontaminace houbami, která je poměrně běžná (Evans et al. 2007).

Ehara et al. (2000) izolovali sekvence *cox1* pro množství druhů. Výsledná fylogenetická analýza se shoduje s výsledky studie založené na sekvencích SSU rDNA (Alverson & Theriot 2005). Evans et al. (2007) srovnávali schopnost *rbcL*, *cox1* a ITS vyřešit mezidruhové a vnitrodruhové vztahy rodu *Sellaphora*. Nejlépe z této studie vyšel právě *cox1*, protože je více variabilní než *rbcL* a vytvoření alignmentu je jednodušší než v případě ITS.

Reakcí na evidentní nedostatečnost morfologie při určování druhů je vytvoření databází, které obsahují „typové“ sekvence druhů, tzv. DNA barcoding. Sekvence *cox1* je dnes běžně používána v DNA barcodingu živočichů nebo rhodophyt a je hlavním kandidátem na tuto funkci i u rozsivek (Saunders 2005; Hajibabaei et al. 2006; Evans et al. 2007; Evans & Mann 2009).

Nevýhodou mitochondriálních a plastidových markerů je fakt, že způsob dědičnosti organel je u rozsivek téměř neznámý. Mann (1996) studoval dědičnost chloroplastů u penátních rozsivek. K segregaci rodičovských chloroplastů podle něj dochází až při dělení iniciální buňky. Dědičnost plastidů u druhu *Pseudo-nitzschia pungens* je biparentální a segregace plastidů v F1 generaci je náhodná. Buňky mohou obsahovat dva plastidy od stejného rodiče nebo po jednom plastidu od každého z nich (Ghiron et al. 2008). Dědičnosti mitochondrií zatím nebyla u rozsivek studována. Nicméně u většiny živočichů, rostlin (mimo nahosemenných) a dokonce řas převažuje maternální dědičnost (Evans et al. 2007).

Samotná variabilita v sekvencích DNA nemá téměř žádný biologický význam, proto je pro vymezení biologického druhu důležité propojení s daty o reprodukční izolaci.

Amato et al. (2007) porovnávali schopnost některých neutrálních molekulárních markerů vymežit biologické druhy v komplexech *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* a *P. delicatissima*. Jediný marker, který rozdělil testované klony stejně jako reprodukční experimenty, byly sekvence ITS 2, mezerníková oblast oddělující ribozomální podjednotku 5.8S a 28S. Toto rozdělení bylo podpořeno přítomností rozdílů v ultrastruktuře valvy, které byly objeveny ve skenovacím elektronovém mikroskopu (Amato et al. 2007).

Evidence o schopnosti ITS2 rozlišit reprodukčně izolované druhy přitom není první. Přestože mezerníkové oblasti ITS1 a ITS2 nejsou součástí plně funkčních ribozomů, jejich sekundární struktura je klíčová pro jejich sestavení. Části sekvencí, které tvoří šroubovice, jsou funkčně omezené a může v nich docházet pouze k takovým změnám bází, které neovlivní výslednou sekundární strukturu. Tyto změny se označují CBC a HCBC, -/hemi compensatory base changes. Korelace mezi přítomností CBC nebo HCBC v ITS2 a reprodukční izolací byla prokázána u Volvocales (Chlorophyta) (Coleman 2000). Nicméně absence CBC a HCBC v ITS2 reprodukční kompatibilitu nezaručuje. U druhu *Paramecium aurelia* byly objeveny reprodukčně izolované skupiny s identickou sekvencí ITS2 (Coleman 2005). Colemanové hypotéza byla několikrát testována i u rozsivek. U reprodukčně izolovaných ribotypů *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* s.l. a *P. delicatissima* s.l., které obsahovaly CBC, nedocházelo ani k párování. U skupiny odlišených pouze přítomností HCBC dospěl proces sexuálního rozmnožování až do stadia vytvoření zygoty (Amato et al. 2007). Benkhe et al. (2004) prokázali korelaci CBC a reprodukční izolace u některých demů komplexu *Sellaphora pupula*. Přítomnost několika HCBC neovlivnila sexuální reprodukci mezi odlišnými ribotypy druhu *Pseudo-nitzschia multistriata* (D'Alelio et al. 2009). Teorii potvrdila i studie Casteleyn et al. (2009). Odlišné ribotypy druhu *Pseudo-nitzschia pungens*, které se lišily i morfologicky, se mezi sebou volně křížily, pokud neobsahovaly CBC nebo HCBC.

Vanormelingen et al. (2008a) porovnali své výsledky z hybridizace pseudokryptických druhů *Eunotia bilunaris* a předešlé studie s podobnou tematikou. Došli k podobnému závěru jako Coleman et al. (1994) u třídy Volvocaceae, kteří stanovili hranici 10% jako nejvyšší možnou míru variability sekvencí ITS u dvou klonů schopných hybridizace.

2.3 Biogeografie – Teorie ubikvitního rozšíření

O biogeografii rozsivek a dalších protistních tříd se začalo mluvit teprve nedávno. Do té doby byla často uznávána teorie o ubikvitním rozšíření mikroorganismů, kterou Beijerinck (1913), shrnul jako: „...všechno je všude, limitující je pouze prostředí“. Podle této hypotézy malá velikost protistních organismů a schopnost vytvářet odolná dormantní stadia umožňuje šíření, které není omezeno ani ovlivněno geografickými bariérami. Díky obrovské velikosti jejich populací je toto šíření tak časté, že téměř nedochází k alopatrické speciaci ani k lokální extinkci. Většina druhů má proto kosmopolitní rozšíření a druhová diverzita jednotlivých lokalit reflektuje pouze vlastnosti prostředí (Finlay & Clarke 1999). Finlay a Fenchel (2004) porovnali rozšíření druhů na základě jejich velikosti a stanovili, že organismy menší než 1mm mají kosmopolitní rozšíření.

Ke vzniku této hypotézy a studií, které ji podporovaly (pro rod *Paraphysomonas* - Finlay & Clarke 1999; rozsivky - Finlay 2002, další příklady Finlay & Fenchel 2004), přispělo několik faktorů: (i) nejasný druhový koncept mnoha protistních taxonů založený na morfologii viditelné ve světelném mikroskopu většinou vedl k příliš širokému pojetí druhů, které v lepším případě odpovídají vyšším taxonomickým jednotkám a jsou komplexy blízce příbuzných druhů (Mann 1999, Kristiansen 2000), (ii) matoucí data vzniklá v důsledku používání evropských klíčů k určování vzorků bez ohledu na místo jejich původu (Beier & Lange-Bertalot 2007; Vanormelingen et al. 2008b), (iii) vysoký poměr lokální a globální diverzity vzniklý v důsledku značného podcenění celkové diverzity u většiny protistních tříd (Foissner 2006; Bass et al. 2008; Epstein & López-García 2008).

Nicméně studie, které tuto teorii vyvrací, začínají zejména v poslední době převažovat.

Hlavní argumenty je v podstatě možné rozdělit do 4 skupin:

a) Morfotypy s omezeným rozšířením

Jedním z argumentů proti teorii ubikvitního rozšíření je skutečnost, že protistní druhy vymezené na základě morfologie jsou obecně mnohem starší než morfologicky vymezené druhy makroorganismů a odpovídají spíš jejich vyšším taxonomickým jednotkám. Podle

Foissnera (2006) by velké stáří umožnilo protistním organismům nahromadit srovnatelnou nebo dokonce větší diverzitu než mají makroorganismy, i kdyby v důsledku snazší disperze probíhala alopatrická speciace mikroorganismů v menší míře.

Nelze také ignorovat množství endemických druhů s nezaměnitelnou morfologií, které jsou popsány z mnoha tříd protistních organismů (shrnutí v Foissner 2006, rozsivky – Kilroy et al. 2007; Vanormelingen et al. 2008b; chrysomonády – Kristiansen 2000; krásivky – Coesel 2000) a fakt, že makroskopické houby, mechy a vyšší rostliny, které se rozšiřují větrem, lze jen stěží považovat za kosmopolitně rozšířené a ani se nezdá, že se k tomuto stavu blíží. Jejich spory či pyl však mají velikosti i počty srovnatelné s protistními organismy a často jsou k šíření na dlouhé vzdálenosti i přizpůsobeny (Foissner 2006).

Objev elektronové mikroskopie, který umožnil studium morfologie ve větším detailu, vedl u některých tříd k objevu původně skryté diverzity. Chrysomonády s křemičitými šupinami dnes mají taxonomii založenou výhradně na studiu šupin v elektronovém mikroskopu. Po revizi morfologie druhů bylo možné u této skupiny nalézt všechny stupně rozšíření, od kosmopolitních druhů až po druhy endemické (Kristiansen 2000)

b) Genotypy s omezeným rozšířením

Analýza molekulární variability některých dalších protistních druhů jasně ukázaly, že tradiční morfologický koncept není schopný postihnout skutečnou druhovou diverzitu. Druhy vymezené na základě morfologie se dnes často rozpadají na komplexy semikryptických druhů a z jejich původně kosmopolitního rozšíření se často vynořuje biogeografie srovnatelná s makroorganismy (cerkomonády - Bass et al. 2008; rozsivky - Vanormelingen et al. 2008b; ciliáti – Weisse et al. 2008; Finlay et al. 2006; Fungi – Taylor et al. 2006).

Aby bylo možné se zabývat biogeografií, je nutné stanovit hranice druhů na základě studia molekulární variability a u skupin, kde je to možné, i pomocí studia reprodukční izolace. Prioritou je především revize druhů, které byly v minulosti považovány za kosmopolitní generalisty, tj. druhy s širokou ekologickou tolerancí (Pouličková & Mann 2006).

Studie, které se zabývají reprodukční izolací a molekulární variabilitou na úrovni sympatrických populací rozsivek, jsem shrnula v části 2.2, která se týká druhového konceptu. V poslední době přibývají i studie zabývající se variabilitou alopatrických populací rozsivek (Mann 1999; Benkhe et al. 2004; Casteleyn et al. 2007; Vanormelingen et al. 2007) a ostatních protistních tříd (Finlay et al. 2006; Šlapeta et al. 2007; Weisse et al. 2008; Bass et al. 2009).

Casteleyn et al. (2007) rozlišili na základě sekvencí ITS tři ribotypy s odlišnou distribucí u druhu *Pseudo-nitzschia pungens*. Jeden ribotyp byl subtropický, dva další se vyskytovaly v temperátních oblastech. Zatímco jeden z temperátních ribotypů byl nalezen pouze v severovýchodním Pacifiku, ten druhý se zdá být kosmopolitní a byl izolován ze severní i jižní polokoule. Klony tohoto ribotypu se navíc úspěšně kříží bez ohledu na svůj geografický původ. Volně se křížící alopatrické populace byly nalezeny i ve sladkovodních habitatech, které jsou všeobecně více izolované. Skotské klony z druhového komplexu *Sellaphora pupula* se volně křížily s klony izolovanými na Ukrajině (Mann 1999) a v USA (Benkhe et al. 2004). Reprodukční kompatibilita klonů z USA a Skotska navíc korelovala i s molekulární analýzou oblasti ITS. Stejně tak i klony *Eunotia bilunaris* izolované ze dvou lokalit na Novém Zélandě a jedné lokality v Tasmánii, které byly vzdálené 450 – 2000 km, se volně křížily, i přesto, že zde byly nalezeny signifikantní rozdíly v sekvenci ITS, které naznačují lokální diferenciaci populací. Vzniklá F1 generace byla životaschopná a fertilní (Vanormelingen et al. 2007).

c) Geografické vs. ekologické faktory rozšíření, neutrální teorie rozšíření

Pro pochopení biogeografie mikroorganismů je důležité oddělit vliv geografických a ekologických faktorů. Potapova a Charles (2002) studovali vliv těchto faktorů na složení rozsivkových bentických společenstev vodních toků na území USA. Ekologické parametry vysvětlily největší část celkové variability na celém území i lokálně. Relativní poměr variability vysvětlené prostorovými parametry a parametry prostředí klesal s geografickým rozsahem dat, která byla použita. Při použití dat z celého území Spojených států byl tento poměr téměř poloviční (Potapova & Charles 2002). Malý vliv geografických faktorů na rozšíření druhů v lokálním měřítku ukázali i Heino a Soininen (2006). Diverzitu rozsivek v rozsáhlé studii týkající se jezer mnohem lépe vysvětlovaly geografické parametry, jako je propojení jednotlivých jezer a izolovanost celé oblasti, než parametry prostředí (Vyverman et al. 2007). Zdá se tedy, že lokální i globální diverzita rozsivek, a pravděpodobně i dalších protist, závisí na historických procesech, jako je kolonizace, extinkce a migrace (Vyverman et al. 2007).

Rozdíly týkající se početnosti různých druhů (hojné vs. vzácné), jejich prostorového rozšíření nebo druhového bohatství na lokální a globální úrovni jsou v přírodě evidentní a nalezení všeobecně platných zákonitostí, které by tyto rozdíly umožnily vysvětlit je jedním z hlavních cílů ekologie a biogeografie. Klasické přístupy většinou rozvíjejí ekologický druhový koncept, podle kterého je koexistence více druhů umožněna jen pokud mají oddělené ekologické niky (Hutchinson 1957; Tilman 1996). Zcela opačný pohled na biodiverzitu a

biogeografii přinesla Hubbellova neutrální teorie (2001). Tato teorie předpokládá, že druhy z jedné trofické úrovně, tedy ty, které navzájem kompetují o zdroje, obsazují uvolněné ekologické niky zcela náhodně a vzorec biodiverzity a biogeografie, který lze v přírodě pozorovat, je tedy výsledkem náhodných procesů. Přestože tento model velmi zjednodušuje a zcela zanedbává ekologické rozdíly mezi druhy, v některých případech je schopný vysvětlit velkou část druhové variability a rozšíření druhů (Hubbell 2001). Přínosem modelu je i to, že může být použit jako nulová hypotéza při řešení otázek, které se týkají biodiverzity a biogeografie (Hubbell 2006).

d) Potenciální vektory

Skutečnost, že je šíření mikroorganismů pasivní, nutně vyžaduje určení možných vektorů, které se na něm podílejí. Tyto vektory lze rozdělit do 4 skupin: (i) vodní proudy, (ii) vítr, (iii) zvířata a (iv) člověk (Kristiansen 1996). Šíření mikroorganismů prostřednictvím vodních proudů mezi propojenými habitaty je evidentní. Například u chrysomád bylo dokázáno, že vítr a ze zvířat, především ptáci, mohou přenášet dormantní cysty i na velké vzdálenosti (Kristiansen 2000). Zatímco data potvrzující tyto dva mechanismy disperze u rozsivek nejsou zcela přesvědčivá, šíření způsobené člověkem bylo opakovaně potvrzeno v mnoha studiích (shrnutí Vanormelingen et al. 2008b). Tyto důkazy o introdukci exotických druhů mimo jiné naznačují, že šíření prostřednictvím přirozených vektorů, jako je vítr, voda a zvířata, je omezené (Vanormelingen et al. 2008b). Skutečnost, že některé z kosmopolitních druhů nejsou schopné vytvářet odolná dormantní stadia podporuje hypotézu, že protistní druhy mohou být kosmopolitně rozšířené, protože jsou velmi staré a na šíření měli dostatek času (Foissner 2006).

Schopnost efektivního šíření v relativně malém časoprostorovém úseku ukázala studie Evans et al. (2005). V průběhu dvou let našli jen minimální rozdíly mezi populacemi druhu *Pseudo-nitzschia pungens* ze severovýchodního Atlantiku, které byly navzájem 100 km vzdálené. Živé buňky *P. pungens* byly objeveny v balastní vodě lodí a je tedy velmi pravděpodobné, že je kosmopolitní rozšíření tohoto druhu zapříčiněno člověkem (Casteleyn et al. 2007). Podobných případů, kdy byla vektorem právě balastní voda, již bylo zaznamenáno několik (shrnutí Vanormelingen et al. 2008b). Příkladem introdukovaného druhu je i *Asterionella formosa*, která se v paleolimnologickém záznamu Nového Zélandu objevila až v roce 1880. V tomto případě byly asi vektorem lososí jikry, které byly do jezer na Novém Zélandě vysazeny někdy v druhé polovině 19. století (Harper 1994). Velkým problémem je recentní rozšíření invazivního druhu *Didymosphenia geminata* (Kilroy et al. 2007). Umělé

šíření člověkem bylo zaznamenáno i u ostatních protistních tříd. U druhů *Heterosigma akashiwo* a *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae), je variabilita mezi alopatickými populacemi minimální, což nasvědčuje jejich recentnímu rozšíření, které bylo nejspíš také způsobeno člověkem (Conell 2000; Kooistra et al. 2001).

Pro popis biogeografie mikroorganismů se tedy spíše hodí formulace: „...menší organismy většinou mají širší nebo dokonce kosmopolitní rozšíření, jejich šíření je efektivnější a pravděpodobnost alopatické speciace a lokální i globální extinkce je u nich nižší než u větších organismů.“ (Fenchel 1993). Mnoho studií tedy nasvědčuje tomu, že mechanismy, které řídí biogeografii makro- a mikroorganismů jsou stejné. Co se však může lišit, je míra, jakou tyto mechanismy působí.

2.4. Závěr

Rozvoji diatomologie a širšímu využití rozsivek v aplikovaných vědních oborech brání příliš široké pojetí druhů založené pouze na morfologii. Aby bylo možné vytvořit celosvětově platný taxonomický systém, je nutné pochopit procesy ovlivňující biodiverzitu a biogeografii, zejména založení a udržování druhově specifických vlastností a mechanismy speciace a disperse. Velmi přínosné je v tomto ohledu studium sympatických a alopatických populací z odlišných biologických pohledů. Propojení dat o morfologii, fyziologii, ekologii a molekulární variabilitě se studiem reprodukční izolace umožňuje odhalení a popis skryté druhové diverzity. Skutečnost, že existence diverzity na odlišných biologických úrovních je evidentní, naznačuje, že druhy lze považovat za reálné biologické jednotky.

3. PRAKTICKÁ ČÁST – Molekulární variabilita druhu *Frustulia saxonica* s.l.

3.1. Úvod

Druhy rodu *Frustulia* jsou stejně jako mnoho dalších druhů rozsivek popsány na základě morfologie. Mnoho studií dokazuje, že morfologické pojetí druhů je velmi často příliš široké a neodpovídá druhům biologickým. Přestože druhy vymezené morfologicky mohou být kosmopolitní, ribotypy a ekotypy jsou často geograficky omezené.

Za pomoci elektronové mikroskopie bylo v posledních deseti letech popsáno mnoho nových druhů rodu *Frustulia*. Důkladněji byly morfologicky revidovány i dříve popsané druhy. Na základě těchto studií se zdá, že jen několik druhů tohoto rodu lze považovat za kosmopolitní (Siver & Baskette 2004, Beier & Lange-Bertalot 2007). Většina z nově popsaných druhů pochází z jižní polokoule a mají buď omezené rozšíření, nebo jsou dokonce endemické. Beier a Lange-Bertalot (2007) důkladně prozkoumali morfologii druhů rodu *Frustulia* z Nového Zélandu. Jen tři z osmi zkoumaných druhů byly identické s holotropickými druhy. Při revizi tohoto rodu na ostrovech Pacifiku a na Nové Kaledonii byly kosmopolitní jen tři druhy ze 17 zkoumaných (Moser 1999).

Jedním z druhů rodu *Frustulia*, které jsou stále považovány za kosmopolitní, je druh *Frustulia saxonica* Rabenhorst (Obr. 1 v příloze): v literatuře také pod jménem *F. rhomboides* var. *saxonica* (Rabenhorst) De Toni; *Navicula rhomboides*; *Frustulia rhomboides* var. *rhomboides*; výskyt: přirozeně kyselé lokality (pH optimum 4,9-5,2), oligotrofní biotopy, vyšší množství huminových kyselin, rašeliniště a vrchoviště, nízké množství elektrolytů, smáčené pískovcové skály, často subaericky nebo aeroterestricky (Veselá 2007).

Druh *Frustulia saxonica*, často dominuje bentickým společenstvům rozsivek i v poměrně odlišných biotopech severní i jižní polokoule (Beier 2005; Geiser & Johansen 2000). Vzhledem k tomu, že se mnoho morfologicky vymezených druhů, které byly považovány za kosmopolitně rozšířené generalisty, rozpadlo na komplex příbuzných druhů, je pravděpodobné, že i *Frustulia saxonica* je komplexem druhů.

Ve své diplomové práci se chci zabývat biogeografií a molekulární diverzitou tohoto druhu v temperátních oblastech severní a jižní polokoule. Vzorky z jižní polokoule chci izolovat na studijní stáži na Novém Zélandě, který je považován za centrum biodiverzity druhu *Frustulia*.

Jedním z cílů mé práce je tedy stanovení molekulární variability sympatrických a alopatických populací tohoto druhu v Evropě. Předběžné výsledky jsou shrnuty v této části. Odhalení potenciální kryptické diverzity je klíčové pro formulaci hypotéz a otázek, které se týkají biogeografie.

Pro porovnání variability populací byly vybrány rychle se vyvíjející oblasti rDNA, oblast ITS1-5.8S-ITS2 (dále ITS) a doména D1-D2 malé ribozomální podjednotky (dále LSU), které se osvědčili při studiu fylogeneze na úrovni druhů i populací (Lundholm et al. 2003; Benkhe et al. 2004; Lundholm et al. 2006; Amato et al. 2007; Vanormelingen et al. 2007, 2008a).

3.2 Materiál a metody

Lokality a sběr vzorků. Vzorky pochází z lokalit, které jsou zkoumány naší algologickou skupinou. Lokality na území ČR (cz) jsou Swamp, Borkovická blata, Babín, Radostín a Jizerské hory. (viz Obr 2. v příloze) Vzorky z lokalit mimo ČR pochází ze Švédského Abiska (swe) ze Slovinska (slo) (viz. Obr.3 v příloze)

Vzorky jsou odebírány jako směs epipelických a epifytických společenstev.

Izolace a kultivace klonů. Monoklonální kultury byly izolovány pod světelným mikroskopem pomocí skleněné pipety vytažené v kapiláru. Buňka byla několikrát přenesena do kapky živného média, aby se omezilo nebezpečí případné kontaminace. Nakonec byla buňka přenesena do plastové kultivační destičky s živným médiem.

Narostlé populace byly přemístěny do Erlenmeyerovy baňky (50ml) s živným médiem, kde dále rostly po několik týdnů.

Ve všech případech bylo použito oligotrofní médium OGM (<http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media>). Pro udržení kyselého pH byl do média přidán pufr MES. Dostatečné množství křemíku pro růst populací bylo zajištěno přidáním Na_2SiO_3 v objemovém poměru 1:250. Kmeny byly kultivovány při teplotě 18°C a osvětlení $6,17 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$.

Kmeny spolu s detaily o jejich sběru jsou uvedeny v tabulce 2 v příloze.

PCR a sekvenace. Narostlé populace byly skleněnou pipetou přeneseny do zkumavek a pomocí ultrazvuku (cca 1 min) byl narušen sliz, kterým jsou buňky obklopené. Schránky byly mechanicky rozrušeny skleněnými kuličkami. Použila jsem metodu „single cell“ extrakce DNA (Duff et al. 2008), aby nedošlo ke ztrátám DNA, ke kterým dochází při extrakci DNA běžnými kity. Buněčná drť byla naředěna 1x, 10x, 20x a 100x a skladována při teplotě -20°C . Protože bylo ze začátku nutné optimalizovat všechny metody, jsou jednotlivé sekvence amplifikovány ze vzorků o různé koncentraci a s odlišnými kombinacemi primerů. Pro oblast ITS byly použity dvojice: (1) ITS-D1, ITS 4 (White et al. 1990); (2) ITS5-D, LSU-DR1; (3) 1617F (Friedl, nepublikovaná data), LSU-DR1; (4) ITS-D1, LSU-DR1. Pro hypervariabilní doménu D1-D2 LSU byly použity dvojice: (1) D1R (Yeung et al. 1996), D2C (Yeung et al. 1996); (2) LSU-80DF, LSU-740DR; (3) LSU-80DF, LSU-710DR. Primery, u kterých není udáno jméno autora, byly navrženy v naší laboratoři a jsou specifické pro rozsivky. Tyto

primery zatím nebyly publikovány. Použitý cyklus pro amplifikaci ITS byl následující: 35 cyklů 1 min 94°C, 1 min 51°C, 1 min 72°C. Reakce byla zahájena 3 min denurací při 94°C a končila 10 min při 72°C. Pro amplifikaci LSU byl použit cyklus z Yeung et al. (1996).

Úspěšnost amplifikace byla vyhodnocena elektroforézou na 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem. PCR produkty, které obsahovaly amplifikovanou DNA, byly přečištěny pomocí kitu Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit, Genomed. Sekvenaci přečištěného PCR produktu provedla firma Macrogen inc.

Klonování. Některé PCR produkty z amplifikace oblasti ITS byly zaklonovány do bakterií, aby bylo možné stanovit míru případné vnitroklonální variability, která je v této oblasti častá. Při klonování byl použit vektor pJET1.2 podle protokolu k metodě „Sticky-End“ klonovacího kitu CloneJET PCR Cloning Kit, Fermentas. Plasmidová DNA byla znovu amplifikována kombinací primerů, které byly použity pro amplifikaci zaklonovaného PCR produktu. Vyhodnocení úspěšnosti amplifikace, přečištění PCR produktů a sekvenování bylo stejné jako u produktů z přímé amplifikace.

Úprava sekvencí a alignment. Sekvence byly manuálně upraveny v programu SeqAssem a potom zarovnány pomocí algoritmu ClustalW v programu MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007).

3.3 Výsledky

Seznam analyzovaných kmenů je uveden v tabulce č.2 v příloze. Z kmenů F7(cz), F8(cz), F15(cz) a F16(cz) se univerzálními ani specifickými primery nepodařilo cílové oblasti amplifikovat. Z ostatních kmenů se podařilo získat sekvence z jedné nebo z obou cílových oblastí. Vzhledem k problémům s amplifikací lze očekávat variabilitu sekvencí v oblastech, které jsou u ostatních penátních rozsivek více konzervované.

Variabilita ITS. Testované kmeny, u kterých se podařilo získat sekvenci ITS, lze rozdělit do 4 skupin. ITS typ I mají kmeny F20(slo), F21(slo), F22(slo), F23(cz) a F24(cz), typ II kmen F26(swe), typ III kmeny F11(cz), F13(cz) a F14(cz) a typ IV mají kmeny F2(cz) a F17(cz). U ostatních kmenů se ITS oblasti nepodařilo amplifikovat.

Sekvence uvnitř skupin a sekvence získané klonováním byly téměř nebo zcela identické. Naproti tomu rozdíly mezi skupinami byly tak velké, že nebylo možné vytvořit jejich smysluplný alignment ani za případného využití sekundární struktury ITS1 nebo ITS2. U děmů z druhového komplexu *Sellaphora pupula* byly velké odlišnosti v sekvenci ITS, které znemožnili vytvoření smysluplného alignmentu spojeny s prezygotickou reprodukční izolací (Benkhe et al. 2004) a je tedy možné, že je tomu tak i v tomto případě.

Částečný alignment bylo možné udělat u kmenů, které měly ITS typu III a IV a lze tedy předpokládat, že budou fylogeneticky více příbuzné. Sekvence ITS kmene F26(swe), typ II, byla velmi krátká a podobala se ITS typu I. Byla však zařazena do samostatné skupiny kvůli změnám bází v oblasti, která byla u kmenů s ITS typu I konzervovaná. Oprávněnost vytvoření samostatné skupiny byla následně potvrzena i odlišnou sekvencí LSU.

Variabilita LSU. Při sekvenaci byly nalezeny 2 typy LSU, které se navzájem lišily několika substitučními změnami (Obr.4 v příloze). Jednu skupinu tvořily kmeny s ITS typu I společně s kmeny F1(cz), F5(cz), F6(cz), F10(cz), F27(slo), F29(cz) a F30(cz). Druhou skupinu tvořily kmeny F25(cz), F28(swe) a kmen F26(swe), který měl ITS typu II.

Sympatrická a alopatriká diverzita. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo získat sekvenci LSU kmenů s ITS typu III a IV je možné odlišit 3 nebo 4 genodémy. V rámci lokality bylo nalezeno více typů ITS. Stejně typy ITS byly nalezeny u kmenů izolovaných z geograficky velmi vzdálených lokalit.

4.3 Závěr

Druh *Frustulia saxonica*, který je vymezen na základě morfologie, je tedy s největší pravděpodobností komplexem druhů. Na základě sekvencí LSU a ITS je zatím možné odlišit 3-4 genodémy. Jejich vzájemné fylogenetické vztahy však nelze stanovit kvůli velké odlišnosti sekvencí ITS. Vzhledem k tomu, že se některé z kmenů nepodařilo amplifikovat pomocí použitých primerů, může být diverzita tohoto druhového komplexu ještě větší. Navíc lze očekávat, že izolace dalších kmenů ze stávajících i z nových lokalit také odhalí nové genodémy. Vzhledem k velmi omezenému počtu vzorků, které byly analyzovány, zatím není možné rozšíření jednotlivých genodémů objektivně zhodnotit.

V současné době se snažím amplifikovat oblast malé ribozomální podjednotky (SSU), která se vyvíjí pomaleji a je proto více konzervovaná i u vyšších taxonomických jednotek jako jsou rody (Alverson et al. 2006). Získané sekvence by měly umožnit fylogenetickou analýzu tohoto druhového komplexu a stanovení jeho fylogenetické pozic v rámci penátních rozsivek. Průběžně izoluji další kmeny, které budou do molekulární analýzy zařazeny, až se podaří optimalizovat metodu amplifikace.

4. PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem členům algologického pracoviště PřF UK za poskytnutí vzorků pro izolaci analyzovaných kmenů a za vytvoření příjemného a inspirujícího prostředí. Za všestrannou pomoc a podporu při studiu děkuji celé své rodině. Především však děkuji Janě Veselé za vedení celé práce, za cenné připomínky k obsahu mé bakalářské práce a za korekci celého textu.

5. LITERATURA

- Alverson A.J., Cannone J.J., Gutell R.R., Theriot E.C. (2006): The evolution of elongate shape in diatoms, *Journal of Phycology* 42: 655 - 668
- Alverson A.J. (2008): Systematics and the Diatom Species, *Protist* 159: 339 – 353
- Amato A, Kooistra W.H.C.F., Ghyron J.H.L., Mann D.G., Pröschold T., Montresor M. (2007): Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms, *Protist* 158:193 -207
- Bass D., Richards T.A., Matthai L., Marsh V., Cavalier-Smith T. (2008): DNA evidence for global dispersal and probable endemism of protozoa, *BMC Evolutionary Biology* 7: 162
- Behnke A., Friedl T., Chepurnov V.A., Mann D.G. (2004): Reproductive compatibility and rDNA analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta), *Journal of Phycology* 40: 193 – 208
- Beier T. (2005): Diatom diversity and habitat heterogeneity in lowland wetlands in south-western New Zealand, Beier T., Lange-Bertalot H. (2007): A synopsis of cosmopolitan, rare and new Frustulia species (Bacillariophyceae) from ombrotrophic peat bogs and minerotrophic swamps in New Zealand, *Nova Hedwigia* 85: 73 - 91
- Beijerinck M.W. (1913): De infusies en de ontdekking der bacteriën, *Jaarboek van de Koninklijke Akademie v. Wetenschappen, Müller, Amsterdam*
- Bentley J.A. (1958): Role of plant hormones in algal metabolism and ecology, *Nature* 181: 1499 - 1502
- Beszteri B., Ács E., Medlin L. (2005a): Conventional and geometric morphometric studies of valve ultrastructural variation in two closely related *Cyclotella* species (Bacillariophyta), *European Journal of Phycology* 40: 89 – 103
- Beszteri B., Ács E., Medlin L. (2005b): Ribosomal DNA sequence variation among sympatric strains of the *Cyclotella meneghiniana* complex (Bacillariophyceae) reveals cryptic diversity, *Protist* 156: 317 – 333
- Boenigk J., Pfandl K., Garstecki T., Harms H., Novarino G., Chatzinotas A. (2006): Evidence for geographic isolation and signs of endemism within a protistan morphospecies, *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5159 – 5164
- Bruder K., Medlin L.K. (2007): Molecular assessment of phylogenetic relationship in selected species/genera in the naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*, *Nova Hedwigia* 85: 331 – 352
- Casteleyn G., Chepurnov V.A., Leliaert F., Mann D.G., Bates S.S., Lundholm N., Rhodes L., Sabbe K., Vyverman W. (2008): *Pseudo-nitzschia pungens*(Bacillariophyceae):A cosmopolitan diatom species?, *Harmful Algae* 7: 241 – 257

- Casteleyn G., Adams N.G., Vanormelingen P., Debeer A., Sabbe K., Vyverman W. (2009): Natural hybrids in the marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): genetic and morphological evidence, *Protist* 160: 343 - 354
- Chepurnov V.A., Mann D.G. (1997): Variation in the sexual behaviour of natural clones of *Achnanthes longipes*. *European Journal of Phycology* 32: 147–154
- Chepurnov V.A., Mann D.G. (1999): Variation in the sexual behaviour of *Achnanthes longipes* (Bacillariophyta). II. Inbred monoecious lineages, *European Journal of Phycology* 34: 1–11
- Chepurnov V.A., Mann D.G. (2000): Variation in the sexual behaviour of *Achnanthes longipes* (Bacillariophyta). III. Progeny of crosses between monoecious and unisexual clones, *European Journal of Phycology* 35: 213–223
- Coesel P.F.M. (2000): Diversification of *Euastrum monocyllum* group of desmids (Chlorophyta, Desmidiaceae), *Systematics and Geography of Plants* 70: 263 - 273
- Coleman A.W., Suarez A., Goff L.J. (1994): Molecular delineation of species and syngens in Volvocacean green algae (Chlorophyta), *Journal of Phycology* 30: 80—90
- Coleman A.W. (2000): The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence, *Protist* 151: 1 - 9
- Coleman A.W. (2005): *Paramecium aurelia* revisited, *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 68 – 77
- Conell L.B. (2000): Nuclear ITS region of the alga *Heterosigma akashiwo* (Chromophyta: Rhaphidophyceae) is identical in isolates from Atlantic and Pacific basin, *Marine Biology* 136: 953 - 960
- Créach V., Ernst A., Sabbe K., Vanellander B., Vyverman W., Stal L.J. (2006): Using quantitative PCR to determine the distribution of a semicryptic benthic diatom, *Navicula phyllepta* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* 42: 1142 – 1154
- D’Aleilo D., Amato A., Kooistra W.H.C.F, Procaccini G., Casotti R., Montresor M. (2009): Internal transcribed spacer polymorphism in *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in the Gulf of Naples: Recent divergence or intraspecific hybridization?, *Protist* 160: 9 – 20
- de Queiroz K. (2007): Species concepts and species delimitation, *Systematic Biology* 56: 879 - 886
- de Vargas C., Norris R., Zaninetti L., Pawlowski J. (1999): Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces, *PNAS* 96: 2864 - 2868
- Duff J.R., Ball H., Lavrentyev P.J. (2008): Application of combined morphological–molecular approaches to the identification of planktonic protists from environmental samples, *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55: 306–312.
- Edlund M.B., Stoermer E.F. (1997): Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories, *Journal of Phycology* 33: 897 – 918
- Ehara M., Inagaki Y., Watanabe K.I., Ohama T. (2000): Phylogenetic analysis of diatom *coxI* genes and implication of a fluctuating GC content on mitochondrial genetic code evolution, *Current Genetics* 37: 29 – 33
- Ellegaard M., Godhe A., Härnström K., McQuoid M. (2008): The species concept in a marine diatom: LSU rDNA-based phylogenetic differentiation in *Skeletonema marinoi* / *dohrnii* (Bacillariophyceae) is not reflected in morphology, *Phycologia* 47: 156 – 167

- Epstein S., Lopéz-García P. (2008): „Missing“ protist: a molecular prospective, *Biodiversity and Conservation* 17: 261 - 276
- Evans K.M., Bates S.S., Medlin L.K., Hayes P.K. (2004): Microsatellite marker development and genetic variation in the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* 40: 911 – 920
- Evans K.M., Hayes P.K. (2004): Microsatellite markers for cosmopolitan marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens*, *Molecular Ecology Notes* 4: 125 – 126
- Evans K.M., Wortley A.H., Mann D.G. (2007): An assessment of potential diatom „barcode“ genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta), *Protist* 158: 349 – 364
- Evans K.M., Wortley A.H., Simpson G.E., Chepurinov V.A., Mann D.G. (2008): A molecular approach to explore diversity within the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta), *Journal of Phycology* 44: 215 – 231
- Evans K.M., Mann D.G. (2009): A proposed protocol for nomenclaturally effective DNA barcoding of microalgae, *Phycologia* 48: 70 – 74
- Fenchel T. (1993): There are more small than large species?, *Oikos* 68: 375-378
- Finlay B.J., Clarke K.J. (1999): Ubiquitous dispersal of microbial species, *Nature* 400: 828
- Finlay B.J., Monaghan E.B., Maberly S.C. (2002): Hypothesis: The rate and scale of dispersal of freshwater diatom species is a function of their global abundance, *Protist* 153: 261 – 273
- Finlay B.J., Fenchel T. (2004): Cosmopolitan metapopulations of free-living microbial eukaryotes, *Protist* 155: 237 - 244
- Finlay B.J., Esteban G.F., Brown S., Fenchel T., Hoef-Emden K. (2006) Multiple cosmopolitan ecotypes within microbial eukaryote morphospecies, *Protist* 157: 377 - 390
- Foissner W. (2006): Biogeography and dispersal of micro-organisms: A review emphasizing protists, *Acta Protozoologica* 45: 111 - 136
- Gallagher J.C. (1980): Population-genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay, *Journal of Phycology* 16: 464 - 474
- Gaiser E.E., Johansen J.R. (2000): Freshwater diatoms from Carolina Bays and other isolated wetlands on the atlantic costal plain of South Carolina, U.S.A., with descriptions of seven taxa new to science, *Diatom Research* 15: 75 - 130
- Ghiron J.H.L., Amato A., Montresor M., Kooistra W.H.C.F. (2008): Plastid inheritance in the planktonic raphid pennate diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae), *Protist* 159: 91 - 98
- Hajibabaei M., Janzen D.H., Burns J.M., Hallachs W., Hebert P.D.N. (2006): DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera, *PNAS* 103: 968 - 971
- Harper M.A. (1994): Did Europeans introduce *Asterionella formosa* Hassall to New Zealand?, In: Kociolek J.P. (ed) *Proceedings of the 11th International Diatom Symposium 1990*, California Academy of Sciences, San Francisco
- Hasle G.R. (2002): Are most of domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites?, *Harmful Algae* 1: 137 – 146

- Heino J., Soininen J. (2006): Regional occupancy in unicellular eukaryotes: a relation of niche breadth, habitat availability or size-related dispersal capacity?, *Freshwater biology* 51: 672 - 685
- Hendry A.P., Vamossi S.M., Latham S.J., Heilbut J.C., Day T. (2000): Questioning species realities, *Conservation Genomics* 1: 67 – 76
- Hubbell, S.P. (2001): *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography*, Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Hubbell S.P. (2005): Neutral theory in community ecology and the hypothesis of functional equivalence, *Functional Ecology* 19: 166 - 172
- Hutchinson, G.E. (1959): Homage to Santa Rosalia, or why are there so many kinds of animals? *The American Naturalist* 93: 145–159
- Johansen, J.R., Casamatta D.A. (2005): Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Algological Studies* 116:71-93
- Kilroy C.B., Biggs J.F., Vyverman W. (2007): Rules for macroorganisms applied to microorganisms: patterns of endemism in benthic freshwater diatoms, *Oikos* 116: 550 - 564
- Kooistra W.H.C.F., de Boer M.K., Vrieling E.G. (2001): Variation along ITS markers across strains of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) suggest hybridization events and recent expansion, *Journal of Sea Research* 46: 213 - 222
- Kristiansen J. (1996): Dispersal of freshwater algae - a review, *Hydrobiologia* 336:151–157
- Kristiansen J. (2000): Cosmopolitan chrysophytes, *Systematic and Geography of Plants* 70: 291 - 300
- Lange-Bertalot H, Jahn R. (2001): On the identity of *Navicula (Frustulia) rhomboides* and *Frustulia saxonica* (Bacillariophyceae), *Systematics and Biogeography* 70: 255 – 261
- Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R. & Moestrup, Ø. (1997): Studies of the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 2. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters, *Phycologia* 36: 381–8
- Lundholm N., Moestrup R., Hasle G.R., Hoef-Emden K. (2003): A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): What is *P. pseudodelicatissima*?, *Journal of Phycology* 39: 797 – 813
- Lundholm N., Moestrup R., Kotaki Y., Hoef-Emden K., Scholin C., Miller P. (2006): Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) illustrated by rDNA probes, morphological data and phylogenetic analyses, *Journal of Phycology* 42: 464 – 481
- Mallet J. (2006): Species concepts v Evolutionary Genetics: Concepts and Case Studies (eds. Fox, C.W. & Wolf, J.B.), Oxford University Press, Oxford, 367-373
- Mann D.G. (1996): Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms, *Hydrobiologia* 336: 19 - 32
- Mann D.G. (1999): The species concept in diatoms, *Phycologia* 38: 437 – 495
- Mann D.G., Chepurnov V.A., Idei M. (2003): Mating system, sexual reproduction and auxosporulation in the anomalous raphid diatom *Eunotia* (Bacillariophyta), *Journal of Phycology* 39: 1067 – 1084
- Mann D.G., McDonald S.M., Bayer M.M., Droop S.J.M., Chepurnov V.A., Loke R.E., Ciobanu A., Hans Du Buf J.M. (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., Chepurinov V.A. (2005): Auxosporulation, mating system, and reproductive isolation in *Neidium* (Bacillariophyta), *Phycology* 44: 335 – 350
- Mann D.G., Evans K.M. (2007): Molecular genetics and the neglected art of diatomics. In: *Unraveling the algae – the past, present and future of algal systematics* (ed J. Brodie & J. Lewis), str. 231-265. CRC Press, Boca Raton, Florida
- McBride S.A., Edgar R.K. (1998): Janus cell unveiled: frustural morphometric variability in *Gomphonema angustatum*, *Diatom Research* 13: 293 - 310
- Mizuno M. (1987): Morphological variation of the attached diatom *Cocconeis scutellum* var. *scutellum* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* 23: 591 – 597
- Moser G.A. (1999): Die Diatomeen von Neukaledonien. Systematik, Geobotanik, Ökologie. Ein Fazit – *Bibliotheca Diatomologica* 43: 1-205
- Orsini L., Procaccini G., Sarno D., Montresor M. (2004): Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudonitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples, *Marine Ecology Progress Series* 271: 87 - 98
- Pappas J.L., Fowler G.W., Stoermer E.F. (2001): Calculating shape descriptors from Fourier analysis of *Asterionella* (Heterokontophyta, Bacillariophyceae), *Phycologia* 40: 440 – 456
- Pappas J.L., Stoermer E.F. (2003): Legendre shape descriptors and shape group determination of specimens in the *Cymbella cistula* species complex, *Phycologia* 42: 90 - 97
- Pappas J.L. (2005): Theoretical morphospace and its relation to freshwater gomphonemoid-cymbelloid diatom (Bacillariophyta) lineages, *Journal of Biological Systems* 13: 385 – 398
- Potapova M, Charles D.F. (2002): Benthic diatoms in USA rivers: distribution along spatial and environmental gradients, *Journal of Phycology* 29: 167 - 187
- Potapova M., Hamilton P.B. (2007): Morphological and ecological variation within *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex, *Journal of Phycology* 43: 561 – 575
- Pouličková A., Mann D.G. (2006): Sexual reproduction in *Navicula cryptocephala* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* 42: 872 – 886
- Rhode K.M., Pappas J.L., Stoermer E.F. (2001): Quantitative analysis of shape variation in the type populations of *Meridion* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* 37: 175 – 183
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. (1990): *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*, Cambridge Press, Cambridge
- Saunders G.W. (2005): Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications, *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1879 – 1888
- Siver P.A., Baskette G. (2004): A morphological examination of *Frustulia* (Bacillariophyceae) from the Ocala National Forest, Florida, USA, *Canadian Journal of Botany* 82: 620 -644
- Syvrtsen E.E. (1977): *Thalassiosira rotula* and *T. rotula*: ecology and morphology, *Nova Hedwigia* 54: 99 - 112
- Šlapeta J., Lopéz-García P., Moreira D. (2007): Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes, *Molecular biology and Evolution* 23: 23 - 29
- Tamura K., Dudley J, Nei M., Kumara S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596 - 1599

- Taylor J.W., Turner E., Townsend J.P., Dettman J.R., Jacobs D. (2006): Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi, *Philosophical Transaction of the Royal Society B* 361: 1947 – 1963
- Theriot E., Ladewski T.B. (1986): Morphometric analysis of shape of specimens from the neotype of *Tabellaria flocculosa* (Bacillariophyceae), *American Journal of Botany* 73: 224 - 229
- Tilman, D., Kareiva P. (1997): *Spatial Ecology*, Princeton University Press, Princeton, NJ
- Van de Vijver B., Frenot Y., Beyens L. (2002): Freshwater Diatoms from Ile de la Possession (Crozet Archipelago, Subantarctica), *Bibliotheca Diatomologica* 46: 1-412. J. Cramer, Berlin-Stuttgart.
- Vanormelingen P., Chepurnov V.A., Mann D.G., Cousin S., Vyverman W. (2007): Congruence of morphological, reproductive and ITS data in some Australasian *Eunotia bilunaris* (Bacillariophyta), *European Journal of Phycology* 42: 61 – 79
- Vanormelingen P., Chepurnov V.A., Mann D.G., Sabbe K., Vyverman W. (2008a): Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyta), *Protist* 159: 73 – 90
- Vanormelingen P., Verleyen E., Vyverman W. (2008b): The diversity and distribution of diatoms: from cosmopolitanism to narrow endemism, *Biodiversity and Conservation* 17: 393 - 405
- Veselá J. (2007): *Ekologie a rozšíření sinic a řas malých vodních toků v NP České Švýcarsko*, diplomová práce
- Vyverman W., Verleyen E., Sabbe K., Vanhoutte K., Sterken M., et al. (2007): Historical processes constrain patterns in global diatom diversity, *Ecology* 88: 1924 - 1931
- Weisse T., Stadler P. (2006): Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution, *Limnology and Oceanography*. 51: 1708 – 1715
- Weisse T., Strüder-Kypke M.C., Berger H., Foissner W. (2008): Genetic, morphological, and ecological diversity of spatially separated clones of *Meseres corlissi* Petz & Foissner, 1992 (Ciliophora, Spirotrichea), *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55: 257 - 270
- Yeung P.K.K., Kong K.F., Wong F.T.W., Wong J.T.Y. (1996): Sequence Data for Two Large-Subunit rRNA Genes from an Asian Strain of *Alexandrium catenella*, *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4199–4201

Tabulka 2. Analyzované kmeny – barevné označení dle typu ITS

(I, II, III, IV, neamplifikované)

Označení klonu	Detaily sběru (lokalita, měsíc a rok)
F1	Swamp, říjen 07
F2	Babín, listopad 07
F5	Radostín, leden 08
F6	Radostín, leden 08
F7	Radostín, únor 08
F8	Radostín, únor 08
F10	Radostín, únor 08
F11	Radostín, únor 08
F13	Radostín, únor 08
F14	Radostín, únor 08
F15	Borkovická blata, březen 08
F16	Babín, březen 08
F17	Babín, březen 08
F20	Slovinsko - Pohorije, červen 08
F21	Slovinsko - Pohorije, červen 08
F22	Slovinsko - Pohorije, červen 08
F23	Jizerské hory, září 08
F24	Jizerské hory, září 08
F25	Jizerské hory, září 08
F26	Švédsko - Abisko, srpen 08
F27	Slovinsko - Pohorije, červen 08
F28	Švédsko - Abisko, srpen 08
F29	Jizerské hory, září 08
F30	Jizerské hory, září 08