

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



**Bc. Pavla Urbánková**

Molekulární variabilita a rozšíření druhového komplexu  
*Frustulia rhomboides* (Bacillariophyceae)

Molecular diversity and distribution of species complex  
*Frustulia rhomboides* (Bacillariophyceae)

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Jana Veselá

Praha 2011

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 6.5.2011

.....  
Pavla Urbánková

### **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem členům algologického pracoviště PřF UK 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 a za to, že nikdy nespí.

## **Abstrakt**

Použití molekulárních metod k přezkoumání taxonomicky problematických druhů rozsivek upozornilo na nedostatečnost morfologického druhového konceptu. Vymezení druhů pouze na základě křemičité schránky často vedlo k příliš širokému pojetí druhů a nutně i k chybným závěrům ohledně jejich ekologie a biogeografie. To, že bylo mnoho druhů rozsivek v minulosti považováno za kosmopolitní generalisty, vedlo k vytvoření teorie, že jejich šíření není limitováno geografickou vzdáleností. Zejména v poslední době však roste počet studií, které ukazují, že šíření rozsivek podléhá podobným pravidlům jako šíření makroorganizmů.

Předkládaná diplomová práce se věnuje problematice diverzity a rozšíření druhového komplexu *Frustulia rhomboides* sensu lato v Evropě a na Novém Zélandě. Výsledky práce ukázali, že: (1) objevená molekulární variabilita v tomto komplexu nese jasný ekologický a biogeografický signál, ale nekoreluje s morfologií. Toto zjištění je dalším důkazem, že je nezbytně nutné přehodnotit tradiční druhový koncept. (2) Značně nevyrovnaný poměr celkové diverzity druhů rodu *Frustulia* nalezených na ekologicky podobných lokalitách v Evropě a na Novém Zélandě potvrzuje, že i šíření rozsivek je omezené a že je tedy nutné se zabývat i jejich biogeografií.

## **Abstract**

Recent use of molecular methods to revisit taxonomically problematic diatom species revealed severe limitations of morphological species concept. Characterization of diatom species which was based solely on the morphology of their frustules often generated too broad species boundaries which inevitably lead to wrong conclusions about their ecology and distribution. Widespread opinion that many diatom species are cosmopolitan generalists resulted in a theory that dispersal of diatoms is not limited by geographical distance. However, a number of recent studies showed that dispersal of diatoms is governed by the same rules which matter for macroorganisms.

Proposed master thesis addresses the topic of diversity and dispersal in diatom species complex *Frustulia rhomboides* sensu lato in Europe and New Zealand. Results suggest that:

- (1) although revealed molecular variability in this complex shows clear ecological and biogeographical signal, it is not correlated in morphology. This is another support to general need for adoption of different species concept in diatoms.
- (2) A considerably uneven ratio in species diversity of genus *Frustulia* found in ecological similar habitats in Europe and New Zealand supports the idea that diatom dispersal is limited and stressed the need for studies dealing with biogeography.

1. Úvod .....	7
1.1 Druhový koncept .....	7
1.2 Molekulární markery používané u rozsivek na mezidruhové úrovni .....	9
1.3 Biogeografie a ekologie .....	11
1.4 <i>Frustulia rhomboides</i> (Ehrenberg) De Toni sensu lato .....	13
2. Materiál a metody .....	15
2.1 Kultury .....	15
Studované lokality .....	15
Izolace a kultivace kmenů .....	15
2.2 Analýza DNA .....	16
PCR a sekvenace .....	16
Single-cell PCR .....	16
Zpracování a alignment sekvencí .....	16
Fylogenetické analýzy .....	17
2.3 Analýza morfologie .....	18
Světelná mikroskopie a statistické zhodnocení tradičních morfometrických dat.....	18
Skenovací elektronová mikroskopie.....	18
3. Výsledky .....	20
3.1 Molekulární variabilita D1/D2 LSU .....	20
3.2 Morfologie a identifikace druhů .....	23
3.3 Rozšíření a ekologie .....	26
4. Diskuze .....	29
4.1 Molekulární variabilita D1/D2 LSU .....	29
4.2 Morfologická variabilita druhového komplexu <i>Frustulia rhomboides</i> sensu lato ....	30
4.3 Rozšíření a ekologie druhového komplexu <i>Frustulia rhomboides</i> sensu lato.....	33
4.4. Taxonomické poznámky k izolovaným novozélandským druhům .....	35
4.4.1 <i>Frustulia aotearoa</i> Beier & Lange-Bertalot .....	35
4.4.2 <i>Frustulia gondwana</i> Beier & Lange-Bertalot .....	36
4.4.3 <i>F. cf. magaliesmontana</i> Cholnoky .....	37
4.4.4 <i>Frustulia maoriana</i> Beier & Lange-Bertalot.....	38
4.4.5 <i>F. spA</i> .....	40
4.5 Diverzita a rozšíření rodu <i>Frustulia</i> .....	41
5. Závěr .....	42
6. Literatura .....	43

# 1. Úvod

## 1.1 Druhový koncept rozsivek

Současný taxonomický systém rozsivek je z historických důvodů založen pouze na morfologii křemičitých schránek pozorovatelné ve světelném mikroskopu. Již od objevení rozsivek na počátku 18. století měřili biologové rozměry valvy a hustotu strií a slovně charakterizovali kvalitativní znaky jako je celkový tvar schránek a vzor striace. Nové druhy pak byly stejně jako dnes popisovány na základě objevené nespojitosti v nalezené variabilitě. Vzhledem k neznalosti mechanismů, které tuto variabilitu generují, však docházelo k častým chybám (Mann 1999, Mann 2010).

Darwinova teorie (1859) znamenala značný posun v chápání druhů; zatímco předdarwinovské druhy byly jasně oddělené a neměnné, teorie o původu druhů zcela zpochybnila jejich výsadní postavení v taxonomické hierarchii. Pozorovaná variabilita byla v jejím kontextu chápána jako výsledek graduálního vývoje jednotlivých linií a v taxonomii rozsivek se odrazila zejména v širokém pojetí druhů, které dnes odpovídají spíše rodům, a v popisu variet, které jsou dnes často povyšovány na druhovou úroveň (Mann 2010).

Přesnější vymezení druhů umožnilo až detailní popsání životního cyklu rozsivek, který je zodpovědný za velkou část jejich morfologické variability, v roce 1932 (Geitler). Specifický životní cyklus rozsivek je spojen se kontinuálním zmenšováním velikosti schránek během jednotlivých mitotických dělení; při dosažení minimální velikosti pak u většiny druhů nutně následuje sexuální rozmnožování, které umožňuje opětovné zvětšení buňky. Geitler (1932) popsal obecná pravidla, kterými se řídí zmenšování všech druhů: (1) šířka buněk se mění mnohem méně než délka a to jak absolutně, tak i v poměru ku délce a (2) celkový tvar buňky se zjednodušuje. Studium monoklonálních kultur rozsivek, které používal jako první v historii diatomologie, navíc přispěl i k pochopení fenotypové plasticity rozsivek (Geitler 1932).

Vzhledem ke skutečnosti, že je sexuální rozmnožování esenciální součástí životního cyklu většiny rozsivek, znamenala značný posun v jejich druhovém konceptu i Mayerova evoluční syntéza, která propojila taxonomii s populační genetikou a postulovala, že druhy jsou reprodukčně izolované skupiny reálně nebo potenciálně se křížících populací (Mayr 1942). Variabilita druhů tedy vzniká adaptací a genovým driftem, které jsou umožněny omezením genového toku mezi populacemi. Morfologická variabilita je tedy v kontextu Mayerova konceptu druhů pouze vodítkem pro odhalení reprodukční izolace. Snahy

o pochopení vztahu reprodukční izolace s morfologickou a molekulární variabilitou u rozsivek reflektuje rostoucí počet studií, které využívají křížících experimentů (např. Benkhe et al. 2004, Mann & Chepurinov 2005, Amato et al. 2007, Casteleyn et al. 2008, Vanormelingen et al. 2008a, Pouličková et al. 2010). Problémem Mayerova konceptu je ale fakt, že na základě reprodukční izolace lze oddělit pouze sympatricky a synchronicky se vyskytující populace. Pro omezení genového toku mezi geograficky nebo časově oddělenými populacemi však není reprodukční bariéra nutná a křížení alopatrických populací rozsivek (Vanormelingen et al. 2007) by tedy dávalo smysl pouze v případě platnosti teorie o ubikvitním rozšíření protist (Finlay & Clarke 1999, Finlay 2002).

Od svého prvního použití v roce 1988 jsou nedílnou součástí studia druhového diverzity rozsivek i molekulární metody (Medlin 1988), které umožňují relativně rychle a v dnešní době i levně získat velké množství nezávislých a jednoznačně určených znaků pro stanovení diverzity druhů (shrnuto v Mann & Evans 2007, Alverson 2008) Zejména v posledních letech přispěli tyto metody k objevení značné kryptické diverzity rozsivek (např. Benkhe et al. 2004, Beszteri et al. 2005, Sarno et al. 2005, Amato et al. 2007, Vanormelingen et al. 2008). Nicméně ani vymezení druhů na základě molekulárních metod není tak přímočaré, jak se na počátku zdálo. Zejména analýzy založené na několika málo nebo dokonce pouze jediném molekulárním markeru mohou vést k chybným závěrům (Amato et al. 2007) a problematická je i skutečnost, že neexistuje univerzální hranice pro odlišení mezi- a vnitrodruhové variability (Alverson 2008).

Řešením se zdá být druhový koncept založený na chápání druhů jako samostatně se vyvíjejících metapopulačních linií; za metapopulační linie jsou přitom považovány subpopulace propojené v prostoru a čase šířením a křížením (de Queiroz 2007). Druhově specifické znaky, jako je morfologická odlišitelnost, ekologická specializace, reprodukční bariéry či reciproční monofylie molekulárních markerů, tyto linie získávají v odlišnou dobu a v různém pořadí. Všechny tyto vlastnosti však mají na rozdíl od ostatních druhových konceptů z hlediska vymezení druhu stejnou rozhodovací váhu. Stejně jako vyšší úrovně taxonomické hierarchie jsou i druhy vědeckými hypotézami v souladu s Popperovou logikou vědeckého bádání (de Queiroz 2007).

Vzhledem k odhadované diverzitě rozsivek však nelze testovat každý druh a je tedy třeba pokusit se pochopit mechanismy, které jsou zodpovědné za diverzitu objevovanou v druhově specifických znacích. V praxi to spočívá zejména v důkladném studiu modelových druhů a druhových komplexů z odlišných biologických pohledů a přístup de Queiroze je v podstatě totožný s tím, co Mann (1999) označuje Waltonian species concept a jiní jako



polyfázický nebo holistický přístup ke studiu druhů (Johansen & Cassamata 2005). Propojení evidence získané studiem morfologie, fyziologie, cytologie, reprodukčních bariér, molekulárních markerů, specifických parazitů, ekologie a/nebo biogeografie u modelových druhů přispěje k pochopení jejich significance z hlediska vymezení druhů a umožní extrapolaci na ostatní recentní i potencionálně i fosilní druhy.

## **1.2 Molekulární markery používané ke studiu druhové diverzity rozsivek**

Nejčastěji sekvenovaným markerem při studiu druhové diverzity rozsivek je jaderná ribozomální DNA (rDNA). Důvodů je několik: (1) amplifikace je usnadněna větším počtem kopií rDNA v genomu; (2) přítomnost konzervovaných oblastí umožňuje použití univerzálních primerů; (3) možnost vytvořit sekundární strukturu usnadňuje alignment sekvencí (Benkhe et al. 2004, Amato et al. 2007, Pouličková et al. 2010); (4) biparentální dědičnost rDNA související s lokalizací lokusů v jaderném genomu umožňuje detekovat hybridizaci (Casteleyn et al. 2009); (5) stále rostoucí počet dostupných sekvencí umožňuje provádět rozsáhlé srovnávací analýzy a (6) jednotlivé oblasti rDNA poskytují informaci o fylogenetických vztazích na různých taxonomických úrovních. Zatímco malá ribozomální podjednotka (SSU neboli 18S) rDNA umožňuje řešit vztahy v rámci celé třídy (Alverson et al. 2006, Sorhannus 2007), hypervariabilní oblast D1/D2 velké ribozomální podjednotky (LSU neboli 28S) a mezerníkové oblasti spolu s podjednotkou 5.8S (ITS1-5.8S-ITS2) jsou s výhodou používány pro odlišení kryptických a pseudokryptických druhů (Lundholm et al. 2003, Benkhe et al. 2004, Lundholm et al. 2006, Amato et al. 2007, Vanormelingen et al. 2007, 2008a, Kaczmarska et al. 2009). U ITS1 a ITS2 však může velká rychlost evoluce značně komplikovat nebo dokonce úplně znemožnit vytvoření alignmentu i u blízce příbuzných druhů (Benkhe et al. 2004). Zejména díky možnosti využít existující univerzální primery jsou oblasti rDNA často navrhovány jako potencionální DNA-barcode pro rozsivky (start kodon na 5' konci 5.8S rDNA až po konzervovaný motiv na 5' konci ITS2 helixu III - Moniz & Kaczmarska 2009) nebo dokonce pro všechna protista (D1/D5 LSU - Wylezich et al. 2010).

Nicméně skutečnost, že se rDNA nachází v genomu řádově ve stovkách až tisících kopií, sebou přináší také řadu problémů. Teoreticky by za určitý čas mělo působením synchronní evoluce dojít k homogenizaci paralogních cistronů; ve skutečnosti však může být rDNA zatížena značným vnitrogenomovým polymorfismem. S velkým počtem kopií genu pro

rDNA je navíc spojena i relativně vyšší pravděpodobnost výskytu pseudogenů (Alverson 2008). Zejména studie na cévnatých rostlinách ukázaly, jak oba výše zmíněné fenomény mohou komplikovat správné vymezení druhů a vést k chybným závěrům ohledně jejich fylogeneze (Álvarez & Wendel 2003). U rozsivek byl polymorfismus nalezen ve všech úsecích rDNA (SSU - Alverson & Kolnick 2005; D1/D3 LSU - Beszteri et al. 2005b; ITS - Benkhe et al. 2004, Vanormelingen et al. 2007); fakt, že existuje jediný záznam o existenci anomální ITS sekvence, která by potenciálně mohla být považována za pseudogen (Beszteri et al. 2005b), je pravděpodobně pouze důsledkem celkově nižšího počtu studií věnujících se rozsivkám. Například v genomech více prostudovaných cévnatých rostlin je přítomnost rDNA pseudogenů relativně častá (Álvarez & Wendel 2003). Přestože výše uvedené problémy pravděpodobně nejsou natolik závažné, aby bylo nutné od používání rDNA ve fylogenetických analýzách zcela upustit, je důležité přistupovat k výsledkům fylogenetických analýz založených na rDNA dostatečně kriticky a to zejména v případech jedno-genových analýz (Feliner & Rossello 2007).

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 potom oblast kódující proteinovou velkou podjednotku enzymu RUBISCO (rbcL). Oproti rDNA mají několik výhod: (1) jsou obsaženy v genomu pouze v jedné kopii a (2) jejich alignment je snadný, protože jsou obě tyto oblasti kódující (Alverson 2008). Použití plastidových markerů navíc minimalizuje možnost amplifikace DNA z případné kontaminace houbami, která je v kulturách rozsivek poměrně běžná (Evans et al. 2007).

Cox1 se zdá být vhodným markerem pro řešení otázek napříč taxonomickou hierarchií rozsivek. Fylogenetická analýza genu pro cox1 z 9 rozsivkových druhů (Ehara et al. 2000) se shoduje s výsledky studií založených na sekvencích SSU rDNA (Kooistra & Medlin 1996) a ve srovnávací analýze s plastidovým rbcL a jadernými markery SSU a ITS rDNA byl cox1 nejvhodnější pro řešení fylogeneze blízké příbuzných druhů rodu *Sellaphora*. Vzhledem k těmto vlastnostem je cox1 dalším z kandidátů na rozsivkový DNA-barcode (Evans et al. 2007); jeho značnou nevýhodou je však skutečnost, že oproti barcodům navrženým v rDNA neexistují pro cox1 univerzální primery (Moniz & Kaczmarzka 2009).

Stejně jako cox1, je i rbcL zatím využíváno při studiu diverzity rozsivek spíše okrajově (Edgar & Theriot 2004, Amato et al. 2007). Vzhledem k tomu, že se vyvíjí relativně pomalu je vhodnější především pro fylogeneze na vyšších taxonomických úrovních (Mann &

Evans 2007). Nevýhodou mitochondriálních a plastidových markerů je fakt, že způsob dědičnosti organel je u rozsivek téměř neznámý (Evans et al. 2007).

### 1.3 Biogeografie rozsivek

Vzhledem k paradigmatické teorii o ubikvitním rozšíření protist, nebyla biogeografii rozsivek v minulosti věnována příliš velká pozornost. Tuto teorii shrnul Beijerinck v roce 1913 jako: „...všechno je všude, limitující je pouze prostředí“. Podle této hypotézy malá velikost protistních organismů umožňuje šíření, které není omezeno ani ovlivněno geografickými bariérami a jejich výskyt proto reflektuje pouze vlastnosti prostředí. Díky obrovské velikosti protistních populací je navíc toto šíření tak časté, že téměř nedochází k alopatrické speciaci ani k lokálním extinkcím a poměr jejich globální a lokální druhové diverzity je tedy nutně mnohem nižší než u makroorganismů (Finlay & Clarke 1999, Finlay 2002).

K názoru, že má většina rozsivek kosmopolitní rozšíření a široké ekologické valence, přispělo vedle příliš širokého vymezení druhů, především používání evropských klíčů pro určování diverzity v mimoevropských oblastech (Kociolek & Spaulding 2000) Důležitou roli sehrálo i množství pseudokryptických a kryptických druhů a podcenění druhové diverzity neprozkoumaných geografických oblastí, které vedlo k podhodnocení globální druhové diverzity (Foissner 2006).

Argumenty proti teorii ubikvitního rozšíření mikroorganismů shrnul na příkladech z několik protistních tříd včetně rozsivek Foissner (2006) a navrhnul alternativní model pro popis biogeografie protistních organismů. Foissnerův model umírněného endemismu předpokládá, že pravidla pro šíření mikroorganismů a makroorganismů nejsou kvalitativně odlišná a že rozdíly v rozšíření protist jsou pouze kvantitativní. Za širší geografické rozšíření protist může vedle malé velikosti i skutečnost, že jsou fylogeneticky starší a měli tedy více času na šíření (Foissner 2006). Foissner tedy nevyklučuje kosmopolitní rozšíření některých druhů; jeho hlavním argumentem proti jeho generalizaci je však množství druhů s nezaměnitelnou morfologií, které mají omezené rozšíření i přesto, že se na lokalitách mohou vyskytovat ve vysokých abundancích (např. Vyverman et al. 1998, Sabbe et al. 2001, Kilroy et al. 2003, Vanhoutte et al. 2004, Beier & Lange-Bertalot 2007). Rostoucí počet studií zabývajících se diverzitou v dříve neprozkoumaných oblastech vedl k objevení mnoha nových

druhů i rodů s omezeným rozšířením a odhalil i nečekaně velkou míru endemismu ( Moser et al. 1999, van der Vijver et al. 2002, Flower 2006, Vyverman et al. 2010).

Omezené šíření rozsivek dokazují i molekulární studie. Rostoucí počet studií, které se zabývají kryptickou diverzitou rozsivek ukázal, že morfotypy s kosmopolitním rozšířením jsou ve skutečnosti skupiny velmi nebo dokonce zcela podobných druhů (Benkhe et al. 2004, Beszteri et al. 2005b, Sarno et al. 2005, Amato et al. 2007, Ellegaard et al. 2008, Vanormelingen et al. 2008a) Rozšíření jednotlivých sesterských druhů se přitom může dramaticky lišit. a vedle kosmopolitně rozšířených byly nalezeny i genotypy s geograficky omezeným výskytem (Casteleyn et al 2008, Kooistra 2008). Medlin (2000) navíc upozornila na to, že kosmopolitně rozšířené druhy musí mít společný genový pool. To však značně kontrastuje s výsledky populačně-genetických studií, které ukazují, že i populace na relativně malém geografickém měřítku jsou více fragmentované než se v minulosti předpokládalo (Ryner et al 2000, Evans et al. 2004, 2009, Casteleyn et al. 2009,).

Problematický je i fakt, že zejména u sladkovodních rozsivek nebyl doposud určen mechanismus šíření. Tradičně navrhovanými vektory pro přenos rozsivek mezi nepropojenými sladkovodními tělesy jsou vzdušné proudy a ze zvířat především vodní ptáci (Round et al. 1990); nicméně ani jeden z těchto vektorů nebyl zatím jednoznačně prokázán. Šíření těmito vektory však pravděpodobně komplikuje skutečnost, že většina druhů rozsivek netoleruje vysychání a pravděpodobně není schopna tvořit dormantní stadia (Kociolek & Spaulding 2000). To, že je jediným prokázaným vektorem šíření sladkovodních rozsivek v současnosti člověk naznačuje že šíření druhů bylo v minulosti neomezené (Vanormelingen et al. 2008b). Počet příkladů antropogenně introdukovaných druhů jsou vzhledem k rostoucí globalizaci stále častější (např. Harper 1994, Flöder & Kilroy 2009, Kilroy et al. 2009, Kaštovský et al. 2010).

Stále větší počet recentních studií tedy ukazuje, že biogeografie rozsivkových druhů podléhá obdobným zákonitostem jako biogeografie makroorganismů a že jejich rozšíření nelze vysvětlit pouze pomocí fyzikálně-chemických parametrů prostředí. Velkou část druhové diverzity v lotických habitatech proto vysvětluje geografická vzdálenost (Potapova & Chrales 2002, Heino & Soininen 2006, Heino et al. 2010) a v lentických habitatech především míra geografické izolovanosti od podobných habitatů a lokální hustota vodních systémů, která reflektuje jejich propojenost (Vyverman et al. 2007). Historické procesy spojené s omezeným šířením tedy hrají roli i v biogeografii rozsivek a to zejména s rostoucí geografickou vzdáleností. Na jižní polokouli umožňuje odlišná diverzita rozsivkových druhů odlišit 3 provincie, které navíc velmi dobře korelují i s hranicemi rozšíření bezobratlých živočichů a

cévnatých rostlin a je tedy evidentní, že pro jejich šíření musí platit stejná pravidla (Vyverman et al. 2010).

#### 1.4 *Frustulia rhomboides* (Ehrenberg) De Toni sensu lato

Druhy rodu *Frustulia* jsou jednou z hlavních dominant přirozeně kyselých oligotrofních habitatů na severní i jižní polokouli (Gaiser & Johansen 2000, Siver & Baskette 2004, Beier 2005). Oproti jižní polokouli, která je dnes považována za centrum diverzity tohoto rodu, je však jejich morfologická diverzita na evropských přirozeně kyselých lokalitách výrazně nižší. Pro svůj typický kopinatý až kosočtverečně-kopinatý tvar byly evropské druhy tohoto rodu pojmenovány *Frustulia rhomboides* (Ehrenberg) De Toni. Na základě velikosti a jemných rozdílů v celkovém tvaru jedinců v přírodních populacích byly však později odlišeny ještě dvě variety: *F. rhomboides* var. *crassinervia* (Brébisson) De Toni a *F. rhomboides* var. *saxonica* (Rabenhorst) De Toni. Metzeltin & Lange-Bertalot však v roce 1996 zjistili, že Ehrenbergův lectotyp pro druh *F. rhomboides* ve skutečnosti patří do rodu *Navicula* a druhové jméno „*rhomboides*“ bylo proto prohlášeno za neplatné (Lange-Bertalot & Jahn 2000). Variety „*saxonica*“ a „*crassinervia*“ byly povýšeny na druhy *F. saxonica* (Rabenhorst) De Toni a *F. crassinervia* (Brébisson) De Toni a původní druh *F. rhomboides* sensu stricto byl přejmenován na *F. krammeri* Lange-Bertalot & Metzeltin (Metzeltin & Lange-Bertalot 1996, Lange-Bertalot & Jahn 2000).

Vzhledem k překrývajícím se rozsahům velikostí a pouze jemným tvarovým odlišnostem je vizuální určení těchto druhů značně problematické. To, že tyto druhy nelze na základě morfologie jednoznačně odlišit potvrdili Siver & Baskette (2004), kteří porovnávali jejich přírodní populace pomocí mnohorozměrné statistické analýzy několika tradičních morfometrických charakteristik. Nejasnosti ve vymezení těchto druhů reflektuje i značně nekonzistentní fotodokumentace v taxonomických publikacích (např. Lange-Bertalot & Metzeltin 1996, Lange-Bertalot 2001, Rumrich et al. 2000).

Rozšíření rodu *Frustulia* je velmi dobrým příkladem toho, že i u rozsivek má smysl zabývat se biogeografií. Hlavní část druhové diverzity tohoto rodu odhalili až floristické studie z jižní polokoule (Metzeltin & Lange-Bertalot 1998, Moser et al. 1999, Rumrich et al. 2000, Wydrzycka & Lange-Bertalot 2001, Metzeltin & Lange-Bertalot 2002, Beier & Lange-Bertalot 2007). Většina druhů rodu *Frustulia* má omezené rozšíření nebo jsou dokonce

endemické a za kosmopolitní je dnes považováno jen několik málo druhů. Mezi potenciálně kosmopolitní druhy patří i *F. saxonica* a *F. crassinervia* (Lange-Bertalot 2001).

Právě kvůli problematické morfologické variabilitě a potenciálnímu kosmopolitnímu rozšíření byl komplex druhů *F. rhomboides* sensu lato vybrán jako modelový systém pro studium molekulární diverzity a rozšíření rozsivek v předkládané diplomové práci.

## 2. Materiál a metody

### 2.1 Kultury

**Studované lokality.** Přírodní vzorky pro izolaci pokusných kmenů byly odebrány v průběhu 3 let (od října 2007 do srpna 2010) z lokalit v Evropě a na Novém Zélandě. Celkem 79 vzorků pocházelo z 68 lokalit; vždy po jednom vzorku bylo odebráno z 15 lokalit na Jižním ostrově Nového Zélandu, ostatní vzorky pochází z lokalit v 7 evropských zemích: Česká Republika (CZ) - 32 vzorků/ 23 lokalit; Irsko (IE) – 16/13; Francie (FR) – 7/6; Azorské ostrovy (PT) – 2/2; Slovensko (SK) – 2/2; Slovinsko (SI) - 2/2; Nizozemí (NL) – 1/1; Švédsko (SE) – 1/1 (Přílohy Tabulka A). Vzorky byly odebírány jako směs epipelických a epifytických společenstev z oligotrofních přirozeně kyselých habitatů. Při každém odběru byly na lokalitě měřeny aktuální hodnoty pH a konduktivity pomocí přístroje Combo HI 98129, Hanna a WTW 340i.

Podle GPS souřadnic lokalit byla na meteorologickém serveru <http://www.wunderground.com/> nalezena vždy nejbližší stanice s celoročním záznamem průměrných denních teplot. Z teplot upravených podle rozdílu nadmořských výšek stanice a lokality (0,65°C/100m) byly spočítány klimatické charakteristiky pro jednotlivé lokality: nejnižší průměrná denní teplota (Tmin), nejvyšší průměrná denní teplota (Tmax), amplituda průměrných denních teplot (Tmax - Tmin) a počet dní s průměrnou teplotou pod bodem mrazu (T < 0°C). Podrobná tabulka lokalit a seznam použitých meteorologických stanic je uveden v příloze dokumentu (Příloha Tabulka B).

**Izolace a kultivace kmenů.** Monoklonální kultury byly izolovány pod světelným mikroskopem pomocí skleněné pipety vytažené v kapiláru. Izolovaná buňka byla vždy několikrát přenesena do kapky sterilního média, aby se zamezilo případné kontaminaci (Edgar & Theriot 2004). Vedle buněk s morfologií *F. rhomboides* s.l. - dnes *F. crassinervia*, *F. krammeri* a *F. saxonica* - byly izolovány i některé další sympatricky se vyskytující druhy rodu *Frustulia*.

Kmeny byly nejdříve pěstovány v tkáňových kultivačních destičkách; rostoucí kolonie byly přeneseny do 50 mm petriho misek, kde dále rostli po několik týdnů. Ve všech případech bylo pro kultivaci použito oligotrofní médium OGM (<http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media>) s MES pufrům pro stabilizaci kyselého pH; pH media pro kmeny z odlišných lokalit bylo vždy upraveno podle hodnot naměřených na příslušné lokalitě. Dostatečné množství křemíku pro růst kmenů bylo zajištěno přidáním Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> v objemovém poměru 1:250. Celá

kultivace probíhala při teplotě 18°C a 24 hodinovém osvětlení bílou zářivkou o intenzitě 5-15  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

## 2.2 Analýza DNA

**PCR a sekvenace.** Narostlé kolonie byly sebrány ze dna Petriho misky sterilní pipetou a rozdrceny v 1,5ml eppendorfce pomocí skleněných kuliček. Vzniklá buněčná drť byla zředěna v poměru 1:9 vodou MilliQ a až do PCR (polymerázová řetězová reakce) skladována při teplotě -20 °C. Aby se předešlo ztrátám spojeným s izolací DNA, byla pro amplifikaci použita metoda „single cell“ PCR (např. Duff et al. 2008) s tím rozdílem, že místo jediné buňky byla do reakční směsi přidána zředěná buněčná drť. Pro amplifikaci hypervariabilní oblasti D1/D2 LSU rDNA byly použity specifické primery; forward: LSU-80DF (5' AGTAAGGGCGACTGAA 3') nebo LSU-DF1 (5' AGTAAGGGCGACTGAAG 3'), reverse: LSU-740DR (5' ACCCTATTCAGGCATAGTT 3') nebo LSU-710DR (5' AGCCTCCACCAGAGTTTCCCCTGGC 3'). Primery byly navrženy na začátku studie podle parciálních sekvencí získaných amplifikací univerzálními primery D1R a D2C (Yeung et al. 1996). K amplifikaci DNA byla použita polymeráza AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied biosystems) a následující cyklus - počáteční denaturace: 10 min při 94 °C; 35 opakování cyklu: 1 min při 94 °C, 1 min při 54 °C a 1 min při 72 °C; závěrečná elongace: 10 min při 72 °C. PCR produkty byly přečištěny pomocí kitu Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit (Genomed) nebo Qia Mini Elute Gel Extraction Kit (Quiagen Inc.). Sekvenaci provedla firma Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

**Single-cell PCR.** Sekvence druhu *F. aotearoa* Beier & Lange-Bertalot (NZ\_Ao1), který se nepodařilo kultivovat, byla získána metodou single-cell PCR (Duff et al. 2008). Izolovaná buňka byla několikrát přenesena do kapky sterilní MilliQ vody; v poslední kapce byla schránka mechanicky narušena sterilní skleněnou jehlou a přenesena do 0,2 ml eppendorfky s 10  $\mu\text{l}$  MilliQ vody, která byla až do PCR skladována při teplotě -20 °C. Pro PCR a sekvenaci byl použit stejný protokol jako u ostatních vzorků. Před rozdrcením byla každá schránka vyfotografována.

**Zpracování a alignment sekvencí.** V programu SeqAssem (SequentiX) byly po vizuálním zhodnocení vybrány kvalitní úseky sekvencí. Nejednoznačně určené báze s překrývajícími se peaky byly hodnoceny na základě 2 kritérií: (1) šumu v pozadí okolních peaků a (2) relativní velikosti peaků (v případě minimálního šumu do 1/3) (např. Beszteri et al. 2005b). Pozice, kde byla přítomnost obou bází velmi pravděpodobná, byly označeny příslušným kódem pro dvojznačnou bázi (G/A - R, A/T - W, C/T - Y, A/C - M, G/T - K, G/C



- S). V programu MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007) byly nalezeny identické sekvence a pomocí algoritmu ClustalW byl vytvořen alignment 39 unikátních sekvencí. Alignment byl manuálně upraven na základě sekundární struktury vytvořené v programu 4SALE (Seibel et al. 2006, 2008) podle dříve publikovaných sekundárních struktur (Sato et al. 2008, Pouličková et al. 2010). Vzhledem k tomu, že indely v helixu C1 neumožnily homologizaci bází v koncovém loopu, byla oblast loopu z alignmentu odstraněna. Výsledný alignment měl délku 533 bp.

**Fylogenetické analýzy.** Fylogenetické analýzy byly počítány prostřednictvím serveru CIPRES ([http://www.phylo.org/sub\\_sections/portal/](http://www.phylo.org/sub_sections/portal/)). Nezakořeněný fylogenetický strom byl nalezen metodou Bayesovy inference (BI) v programu Mr.Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Statistická podpora jednotlivých větví byla navíc nezávisle spočítána metodou maximum likelihood (ML) v programu Garli 1.0 (Zwickel et al. 2006). Na základě testu Akaike information criterion (AIC) a Hierarchical likelihood ratio test (hLRTs) byl pro obě metody vybrán substituční model HKY (Hasegawa, Kishino & Yano 1985) s gamma korekcí substituční rychlosti na různých nukleotidových pozicích (Yang 1993) a s proporcí invariabilních pozic (HKY+G+I). Výběr substitučního modelu byl proveden v programu PAUP/Mr.Modeltest 2.3 (Nylander 2004). BI strom byl nalezen pomocí Markov Chain Monte Carlo metody (MCMC); k hledání byly použity 2 paralelní MCMC, každý s třemi horkými a jedním studeným řetězcem. Analýza běžela po 3 miliony generací a každou stou generaci byly zaznamenány stromy spolu s příslušnými parametry. Bootstrapové podpory větví byly spočítány na základě 100 opakování heuristické analýzy ML s automatickým ukončením po 100000 generacích bez signifikantního zlepšení topologie stromu (nastavení příkazu genthreshfortopoterm=100 000). Bootstrapové podpory a posteriorní pravděpodobnosti byly interpretovány jako: slabé (< 50% pro ML; < 0,5 pro BI); střední (50-79 %, 0,54-0,94) a vysoké (> 79%, >0,94) (Škaloud & Peksa 2001). Vzhledem k tomu, že sekvence obsahovaly poměrně velké množství dvojznačných bází, které ani jeden z programů použitých pro fylogenezi nerozeznává, byly v programu R (R Development Core Team 2008) spočítány p-distance se zohledněním dvojznačných bází, tj. proporce odlišných bází (shoda bází (např. C C, Y Y) +1; shoda s dvojznačnou bází (C Y-C/T) + 0,5; částečná shoda dvojznačných bází (Y-C/T W-A/T) +0,25) a na jejich základě byl metodou neighbor-joining (NJ) zkonstruován fylogenetický strom.

### 2.3 Analýza morfologie

**Světelná mikroskopie a statistické zhodnocení tradičních morfometrických dat.** Materiál pro analýzu morfologie byl odebrán z exponenciálně rostoucích kultur. Pro světelnou mikroskopii byly schránky vyžihány nad plamenem kahanu (Battarbee et al. 2001) a zality syntetickou pryskyřicí Naphrax (Brunel Microscopes). Kmeny pro stanovení tradičních morfometrických charakteristik ve světelném mikroskopu byly vybrány tak, aby byla zachycena sympatrická i allopatrická variabilita morfologie u jednotlivých cladů komplexu *F. rhomboides* s.l. (Příloha Tabulka C). Pro ostatní druhy rodu *Frustulia* z Nového Zélandu (kromě druhu *F. aotearoa*, který se nepodařilo kultivovat) byly vzhledem k nižšímu počtu izolátů vybrány vždy 3 kmeny. Trvalé preparáty vybraných kmenů byly fotografovány s Nomarského kontrastem přístrojem Olympus Z5060 na mikroskopu Olympus BX15. U každého fotografovaného kmene bylo pomocí programu Image J 1.43u (Abrsmoff et al. 2004) proměřeno vždy jedenáct buněk; měřena byla délka a šířka valvy a byl počítán jejich vzájemný poměr. Pro získání těchto morfometrických charakteristik u druhu *F. aotearoa* byly použity snímky 27 buněk izolovaných pro single-cell PCR. Univariační analýza měřených veličin a párové porovnání cladů komplexu *F. rhomboides* s.l. bylo provedeno v programu PAST 2.08 (Hammer 2001). Vzhledem k nenormálnímu rozložení dat byl použit neparametrický Mann-Whitneyův test s Bonferroniho korekcí.

**Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).** Ke srovnání ultrastruktur valvy v SEM byl vybráno celkem 10 kmenů: (1) jeden kmen od každého cladu komplexu *F. rhomboides* s.l., (2) jeden kmen od každého z novozélandských druhů a (3) velikostně odlišný kmen z cladu III, tak aby bylo možné porovnat případné změny ultrastruktury spojené se zmenšováním buněk. Materiál pro SEM byl zbaven organického materiálu reakcí peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ) s dichromanem draselným ( $K_2Cr_2O_7$ ) (Krammer & Lange-Bertalot 1986) a nanesen na aluminiové bločky o průměru 10 mm. Po vysušení na elektrické plotýnce byly bločky pokoveny 20 nm vrstvou Au-Pd (95% Au, 5% Pd) a pozorovány ve skenovacím elektronovém mikroskopu JOEL JSM-6380LV. Protože byly ultrastrukturní znaky zkoumány převážně na jediném kmeni pro clade/druh, nebyly zahrnuty do morfometrické analýzy a byly použity pouze pro verifikaci správné identifikace druhů. Na snímcích ze SEM byla spočítána hustota strií a areol v centrální části valvy (počet strií /areol v 10  $\mu m$ ) a byly vizuálně zhodnoceny ultrastrukturní znaky na vnitřní a vnější straně valvy, tj. struktura na distálních koncích raphe na vnitřní straně (tzv. heliktoglossa) a typ zakončení na distálním a proximálním konci raphe na straně vnější. Fotografie byly porovnány se SEM fotografiemi

v dostupné určovací literatuře a publikovaných člancích (Lange-Bertalot 2001, Beier & Lange-Bertalot 2007, Siver & Baskette 2004 a Kilroy 2007)

Pozn.: Moje diplomová práce je součástí projektu na kterém spolupracuji se svou školitelkou Janou Veselou, která se podílela na izolaci, kultivaci a sekvenaci získaných kmenů (celkem 477 kmenů). Mým přínosem je vedle kmenů z Nového Zélandu (99 kmenů) i velká část izolátů z České Republiky a Azorských ostrovů (94 kmenů). Přestože jsou pro úplnost uvedena všechna sesbíraná data, hlavní důraz je kladen na druhový komplex *F. rhomboides* s.l. a na srovnání diverzity druhů rodu *Frustulia*, které se sympatricky vyskytují v typově podobných habitatech v České Republice a na Novém Zélandě. Z hlediska morfologie a rozšíření tedy nediskutuji vzácnější druhy, které Jana Veselá izolovala (1) z efemérních habitatů (*F. erifuga* Lange-Bertalot & Krammer), které nebyly na Novém Zélandě odebrány; (2) na lokalitách mimo území ČR (*F. sp B*).

### 3. Výsledky

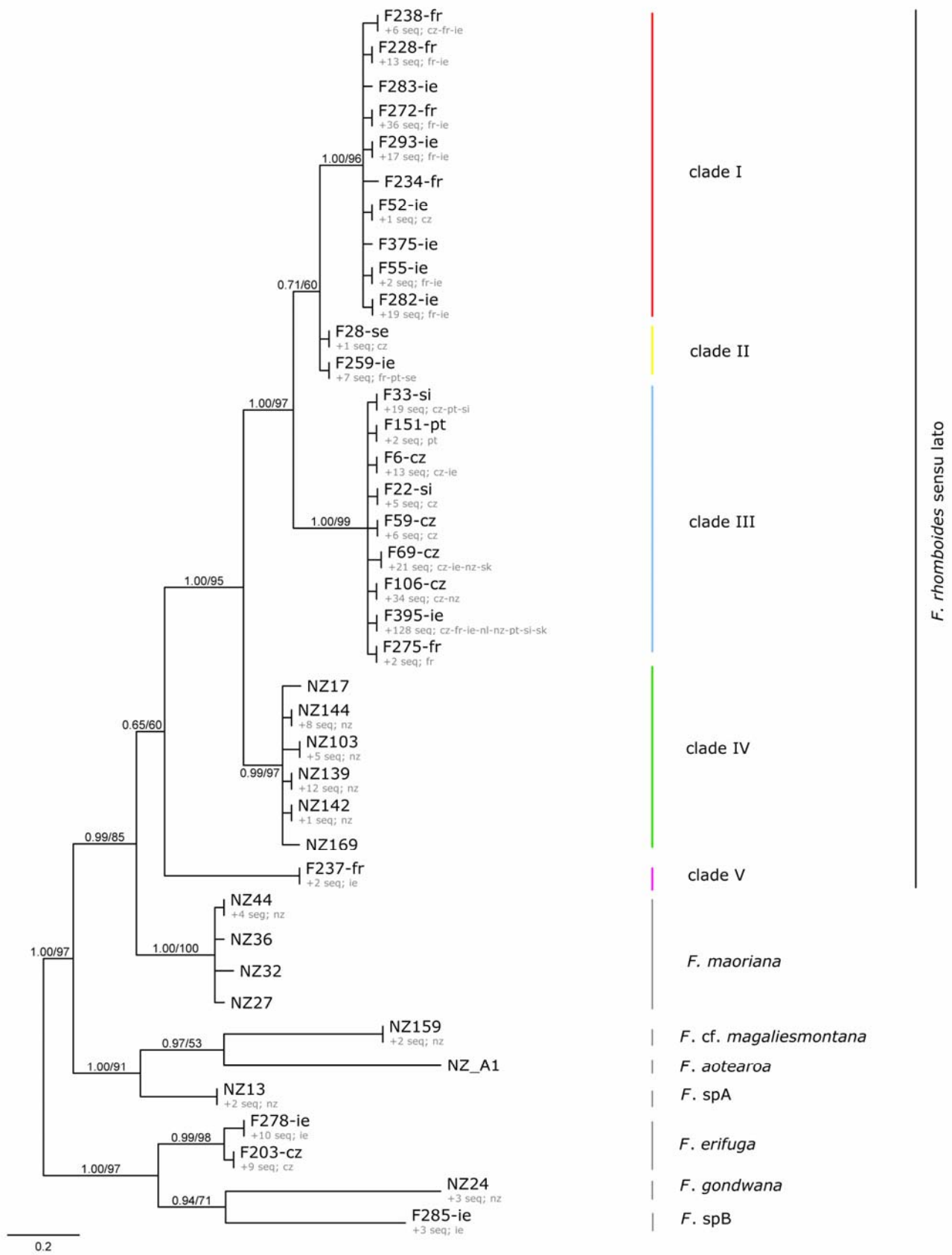
#### 3.1 Molekulární variabilita

Ze 477 izolovaných monoklonálních kultur se podařilo získat 443 sekvencí. Fylogenetická analýza hypervariabilních domén D1/D2 LSU rDNA založená na 533bp alignmentu 39 unikátních sekvencí rozdělila kmeny morfologií *F. rhomboides* s.l. do 5 samostatných linií - clade I až V (Obr. 1 a 2). Clady I, III a IV byly podpořeny vysokou hodnotou bootstrapu i posteriorní pravděpodobnosti. Clade II, kam spadá 10 kmenů zastoupených unikátními sekvencemi F28-se a F259-ie, nebyl metodami BI a ML jasně oddělen. Hodnoty p-distance, které udávají genetickou vzdálenost sekvencí a zohledňují i vnitrogenomový polymorfismus, byly pro sekvence v rámci cladu II <0,001, naproti tomu vzdálenosti od sekvencí cladu I byly v rozmezí hodnot 0,009-0,014 a od sekvencí cladů III a IV 0,017 - 0,022 (Tabulka 1); na stromě zkonstruovaném metodou NJ byl proto oddělen i clade II. Umístění cladu V na bázi komplexu *F. rhomboides* mělo pouze střední statistickou podporu v BI a ML analýze (0,65 BI/ 60% ML) a nebylo potvrzeno metodou NJ, která určila jako sesterskou linii cladů I-IV druh *F. maoriana* Beier & Lange-Bertalot. V BI a ML analýze byl druh *F. maoriana* sesterský ke cladům I-V (0,98 BI/ 85% ML).

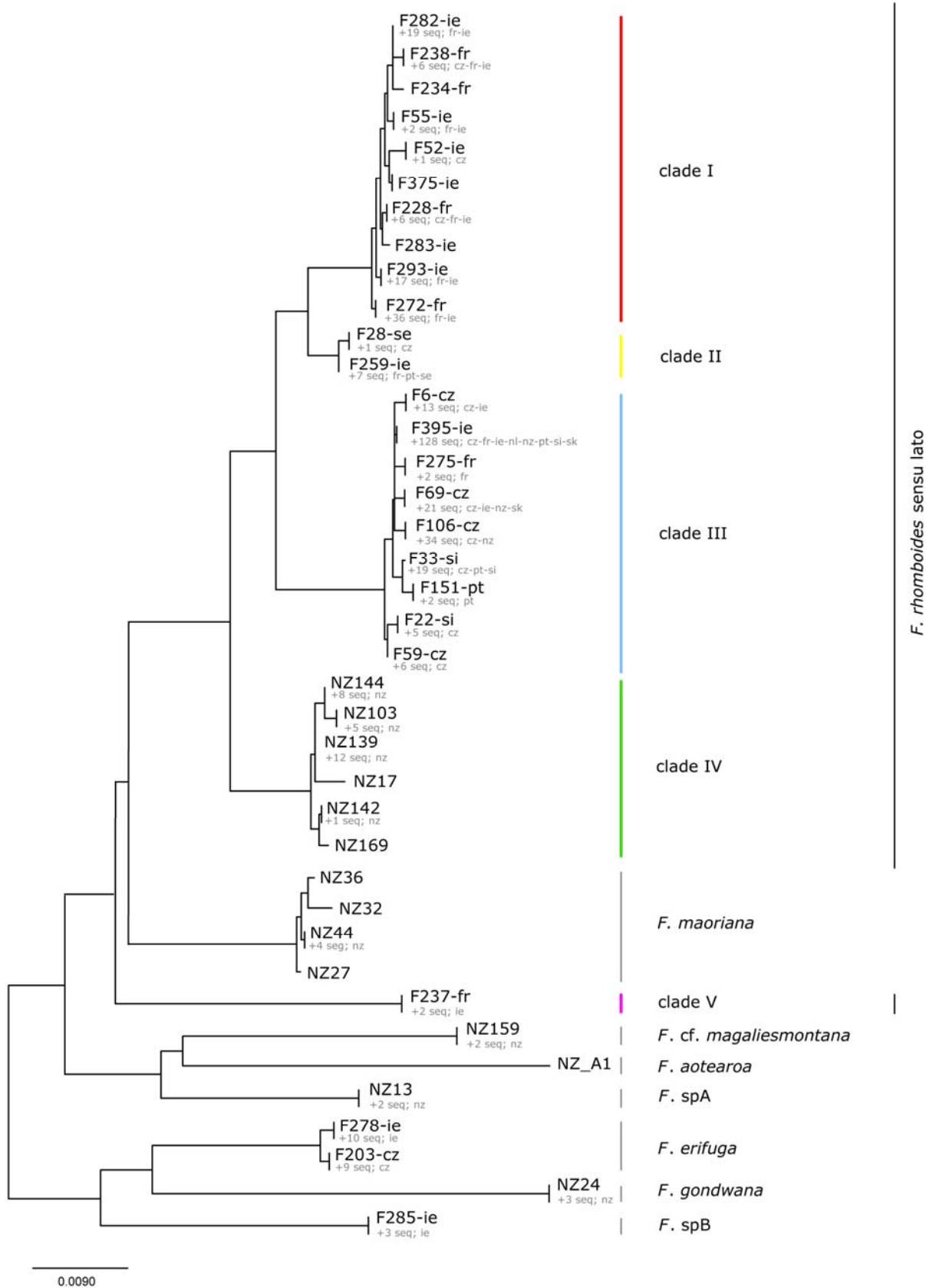
Ostatní druhy tvořily na BI/ML i NJ stromě 2 oddělené linie: *F. cf. magaliesmontana* Cholnoky + *F. aotearoa* Beier & Lange-Bertalot + *F. spA* (1,00 BI/ 91% ML), *F. erifuga* Lange-Bertalot & Krammer + *F. gondwana* Beier & Lange-Bertalot + *F. spB* (1,00 BI/ 97% ML); pozice druhů v rámci druhé linie se však v jednotlivých analýzách lišily. Obě tyto linie a komplex *F. rhomboides* s.l. spolu s druhem *F. maoriana* byly navíc charakterizovány specifickým indelem v loopu C1, kvůli kterému byla oblast loopu z alignmentu sekvencí odstraněna (Příloha Obr.A).

Tabulka 1. Genetická vzdálenost unikátních sekvencí cladů I-V komplexu *F. rhomboides* s.l. a *F. maoriana* se zohledněním vnitrogenomového polymorfismu(p-distance)

	clade I	clade II	clade III	clade IV	clade V	<i>F. maoriana</i>
clade I	<0,004	0,009-0,014	0,020-0,026	0,023-0,029	0,055-0,058	0,039-0,044
clade II		<0,001	0,018-0,022	0,017-0,021	0,051-0,052	0,034-0,038
clade III			<0,004	0,023-0,029	0,053-0,056	0,044-0,049
clade IV				<0,005	0,045-0,048	0,037-0,042
clade V					0,000	0,043-0,048
<i>F. maoriana</i>						<0,004



**Obr.1** Fylogenetický strom nalezený metodou BI . Statistická podpora větví byla navíc spočítána i metodou ML a na jednotlivých větvích je uvedena v pořadí BI/ML.



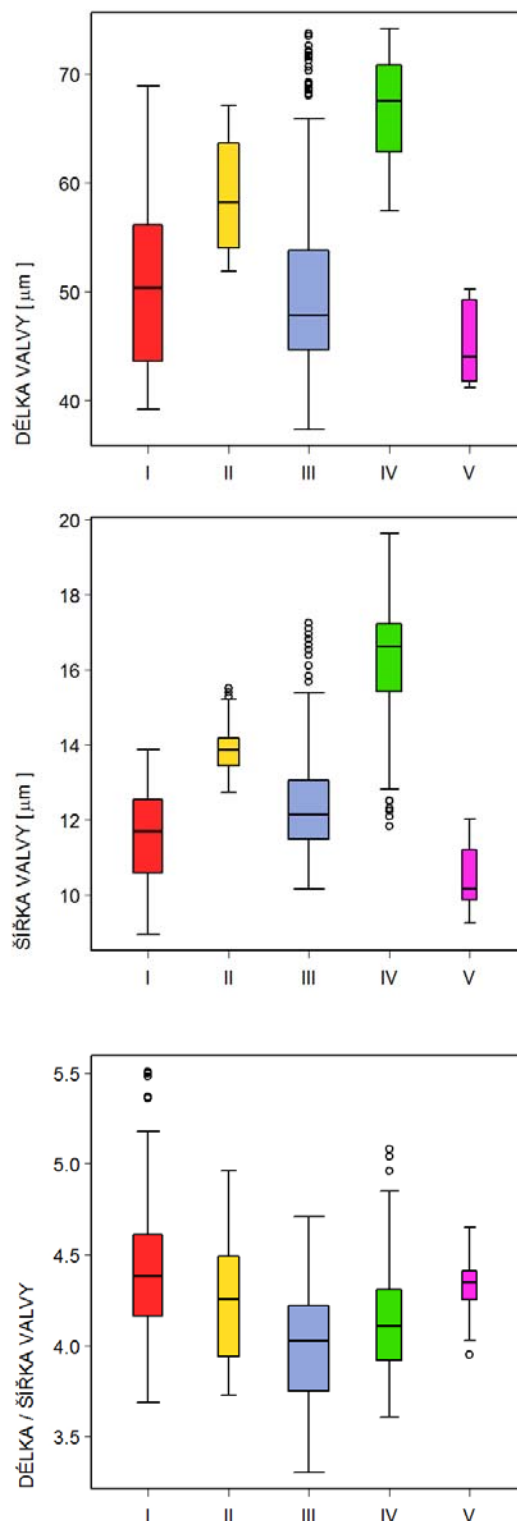
**Obr.2** Fylogenetický strom zkonstruovaný metodou NJ na základě genetické vzdálenosti p-distance

### 3.2 Morfologie a identifikace druhů

Vizuálním porovnáním kvalitativních znaků, jako je celkový tvar a ultrastrukturní znaky na valvě - tvar heliktoglossy (tj. ztlustlina na vnitřní straně valvy umístěná na distálním konci raphe) a typ distálního a proximálního zakončení raphe na vnější straně valvy - nebylo možné clady komplexu *F. rhomboides* s.l. jednoznačně odlišit a tím pádem ani přiřadit k tradičním druhům v recentních diatmologických publikacích (Obr.4 a 5).

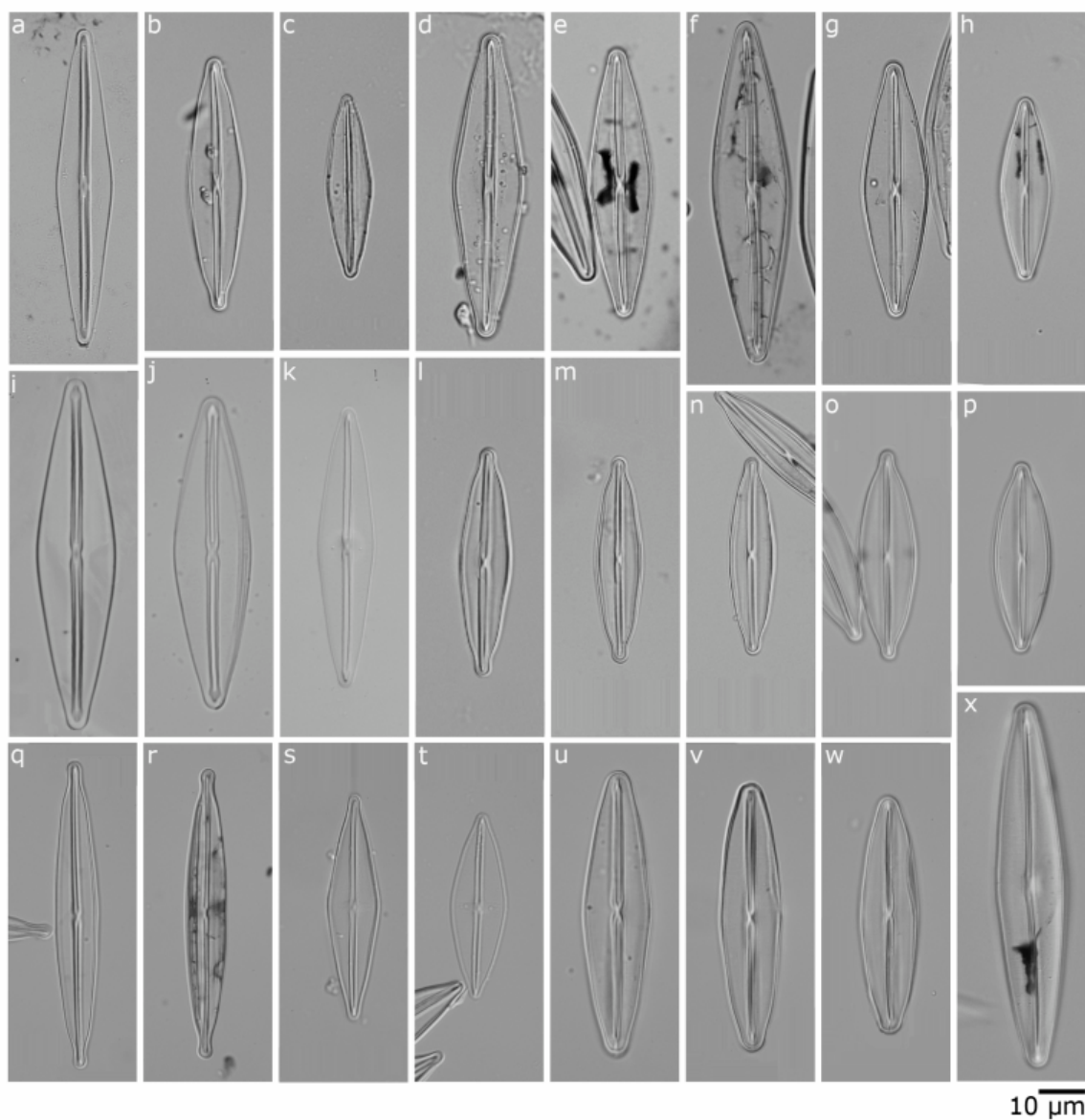
Mann-Whitneyův neparametrický test ukázal signifikantní rozdíly ve velikostech buněk kmenů spadajících do cladů I-V komplexu *F. rhomboides*. Zatímco párová porovnání šířky valvy byla signifikantní ( $p < 0,001$ ) pro všechny testované kombinace, délka neumožnila odlišit clade I a III ( $p > 0,05$ ). Signifikantní rozdíly v poměru délky a šířky valvy byly nalezeny u porovnání cladů I až III ( $p < 0,001$ , pro I a II  $p < 0,05$ ); clade IV a V nebylo možné odlišit od cladu II a v případě cladu V ani od cladu I. Přestože se velikosti jednotlivých cladů signifikantně lišily, vzájemně se překrývající rozpětí naměřených hodnot neumožňují clady na základě velikosti jednoznačně odlišit (Tabulka 2, Obr.3).

Další izolované druhy rodu *Frustulia*, které se vyskytují sympatricky s komplexem *F. rhomboides* s.l. na lokalitách Nového Zélandu (NZ), byly určeny jako *F. aotearoa* Beier & Lange-Bertalot, *F. gondwana* Beier & Lange-Bertalot a *F. maoriana* Beier & Lange-Bertalot,



**Obr.3** Srovnání velikosti buněk vybraných kmenů reprezentujících clady I-V komplexu *F. rhomboides* s.l. (šířka obdélníku odpovídá počtu měřených kmenů)

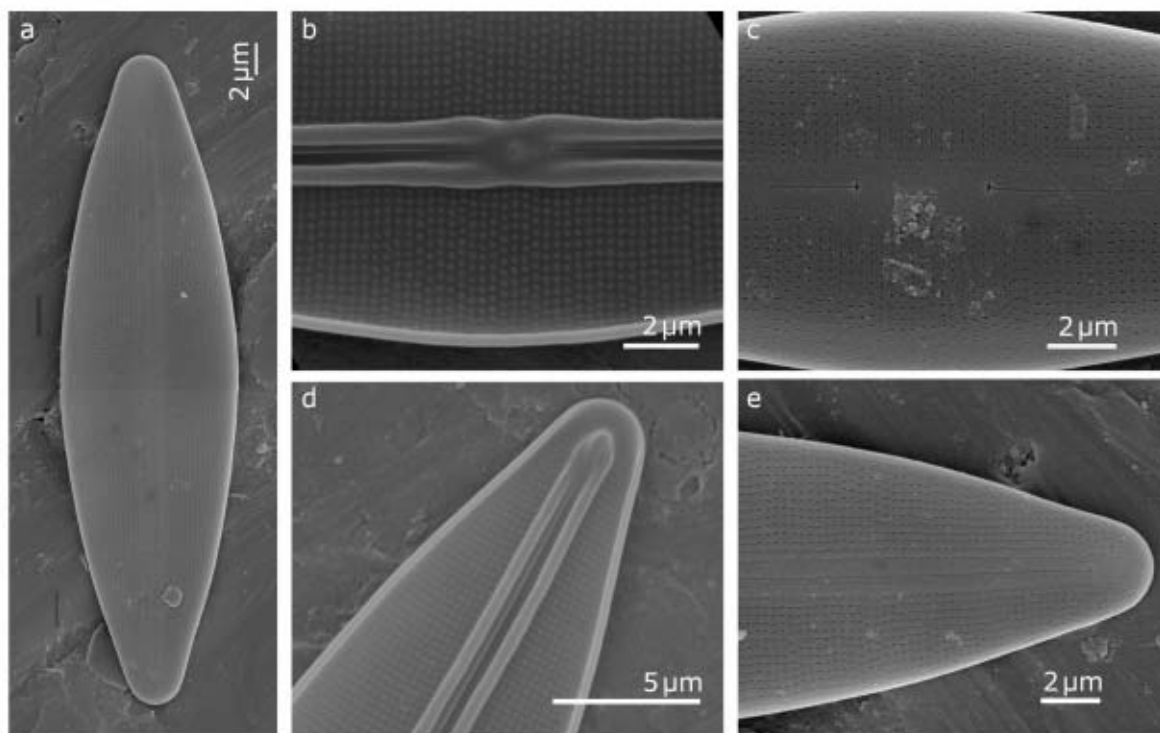
*F. cf. magaliesmontana* Cholnoky. Poslední izolovaný druh zatím nebyl formálně popsán a byl proto označen *F. spA*. (Obr.4 ).



**Obr.4** Morfologie druhů rodu *Frustulia* (LM).

a-n) *F. rhomboides* s.l.: a-c) clade I, d-e) clade II, f-h) clade III, i-k) clade IV, l-n) clade V;  
o-p) *F. maoriana*; q-r) *F. cf. magaliesmontana*; s-t) *F. spA*; u-w) *F. gondwana*; x) *F. erifuga*.





**Obr.5** *Frustulia rhomboides* sensu lato (SEM). a) vnější pohled na celou valvu; b) detail centrálního nodu; c) proximální zakončení raphe na vnější straně valvy; d) detail heliktoglossy; e) zakončení raphe na distálním koci valvy

**Tabulka 2** Morfometrické charakteristiky cladů I-V komplexu *F. rhomboides* s.l. a porovnání s tradičními morfologicky vymezenými druhy *F. crassinervia*, *F. krammeri* a *F. saxonica*. (min-max; průměr (směrodatná odchylka), T – zakončení tvaru T)

	délka valvy (µm)	šířka valvy (µm)	délka/šířka valvy	hustota strií (/10µm)	hustota areol (/10µm)	zakončení raphe	ref.
<i>F. rhomboides</i> sensu lato							
<b>clade I</b>	39,1 - 68,9	8,9 - 13,9	3,7 - 5,5	32	32	T	
	51,4 (8,0)	11,6 (1,2)	4,4 (0,4)				
<b>clade II</b>	51,5 - 67,2	12,4 - 15,5	3,7 - 5,0	32	35	T	
	59,0 (5,4)	13,9 (0,7)	4,2 (0,3)				
<b>clade III</b>	37,3 - 73,8	10,2 - 17,3	3,3 - 4,7	32 - 34	30 - 34	T	
	50,1 (8,2)	12,5 (1,6)	4,0 (0,3)				
<b>clade IV</b>	57,4 - 74,2	11,8 - 19,7	3,6 - 5,1	30	32	T	
	66,5 (5,1)	16,1 (1,9)	4,2 (0,3)				
<b>clade V</b>	41,2 - 50,2	9,2 - 12,0	4,0 - 4,7	34	32	T	
	45,0 (3,3)	10,4 (0,8)	4,3 (0,1)				
<i>F. crassinervia</i>	30 - 55	8 - 12,5	-	30 - 35	30 - 35	T	[1]
<i>F. crassinervia</i>	23 - 50	6 - 11	-	35 - 60	34 - 50	T	[2]
<i>F. krammeri</i>	96 - 135	18 - 24	-	26 - 27	26 - 27	-	[1]
<i>F. krammeri</i>	64 - 131	13 - 22	-	28 - 32	26 - 35	T	[2]
<i>F. saxonica</i>	28 - 105	10 - 18	-	28 - 31	29 - 32	T	[1]
Morfortyp I	60 - 105	15 - 19	-	-	-		
Morfortyp II	35 - 80	10,5 - 14	-	-	-		
<i>F. saxonica</i>	35 - 75	9,1 - 18,2	-	28 - 50	28 - 38	T	[2]
<i>F. saxonica</i>	58,2 - 96,2	14,8 - 20,6	-	28 - 38	30 - 31	T	[3]

[1] Lange-Bertalot (2001)

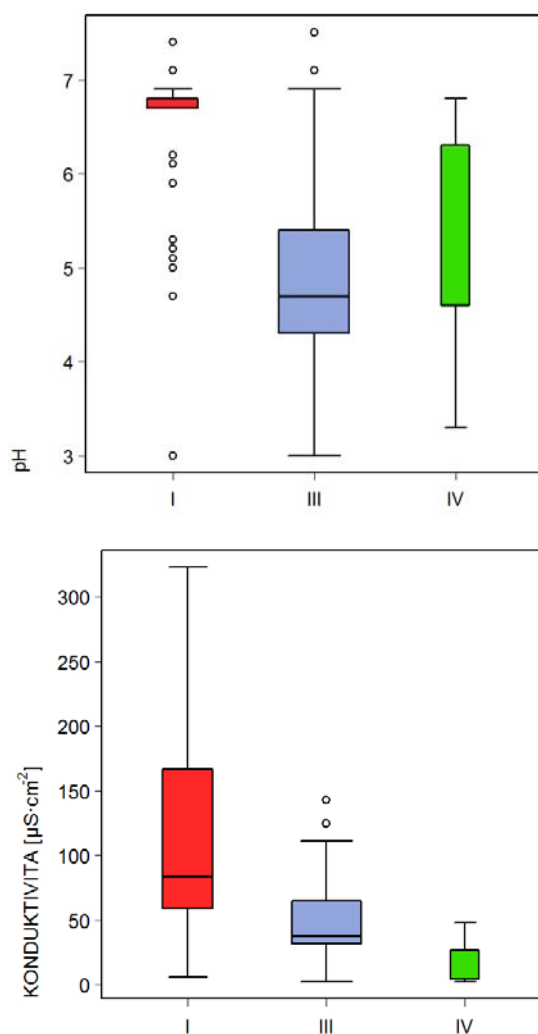
[2] Siver & Baskette (2004)

[3] Kliroy (2007)

### 3.3 Rozšíření a ekologie

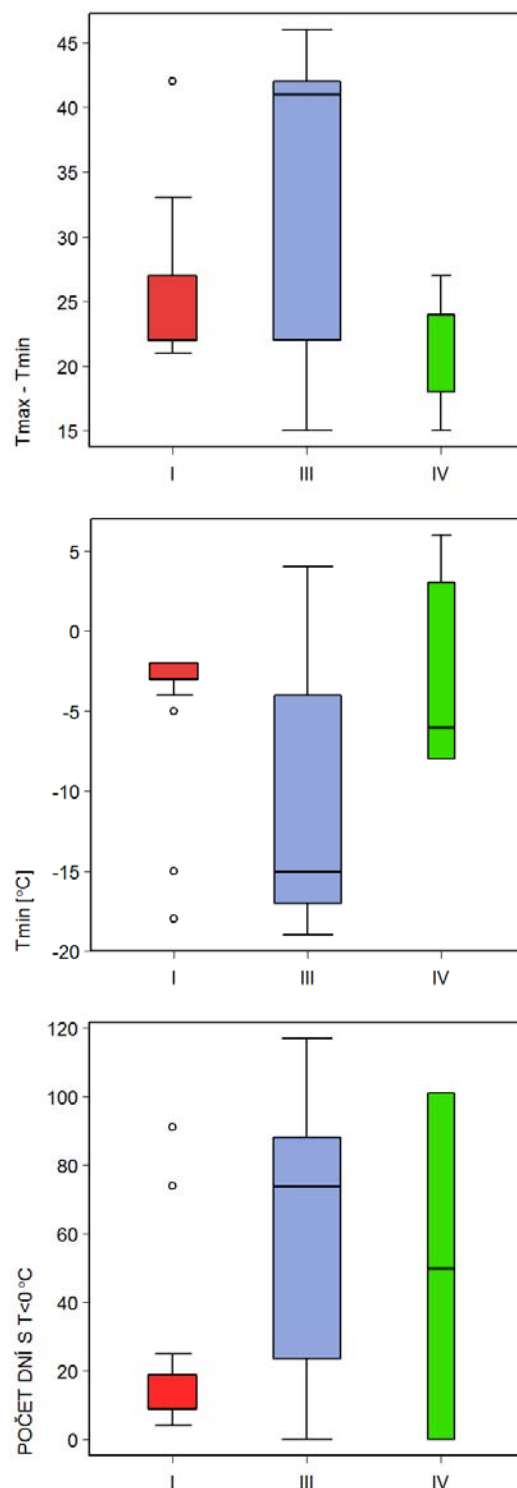
Velký počet izolátů pro clade I, III a IV z druhového komplexu *F. rhomboides* s.l. umožnil porovnat jejich ekologii a rozšíření v oblastech, kde bylo odebráno nejvíce vzorků (tj. CZ – 31 vzorků, IE - 15, FR – 15, NZ – 15). Frekvence jednotlivých cladů v těchto 4 oblastech, byly značně nevyrovnané. V České republice patřilo 137 kmenů ke cladu III zatímco clade I, byl izolován pouze dvakrát. Naproti tomu v Irsku a Francii výrazně převažoval clade I (IE: clade I – 73 kmenů/ clade II – 24, FR : clade I – 36/ clade III - 6). Na Novém Zélandě byly nalezeny clady III a IV a jejich abundance na lokalitách byly srovnatelné (clade III - 38 kmenů, clade IV – 34). Jediným cladem z komplexu *F. rhomboides* s.l., který byl nalezen na severní i jižní polokouli je tedy clade III. Omezené rozšíření mají i ostatní izolované druhy rodu *Frustulia*. Tři z pěti druhů izolovaných na Novém Zélandu jsou v současnosti považovány za novozélandské endemity a zbylé dva druhy jsou rozšířeny jen na jižní polokouli. ( Obr.8, Příloha – TabulkaA)

Statistické testování vlivu pH, konduktivity a klimatických charakteristik na rozšíření cladů druhového komplexu *F. rhomboides* s.l. nebylo primárním cílem studie, stávající sampling je proto poměrně nevyvážený a neumožnil by získat robustní výsledky. Nicméně i pouhá univariační analýza měřených parametrů prostředí ukázala rozdíly v ekologii cladu I oproti cladům III a IV. Clade I dominoval v oblastech s celkově vyšším pH a konduktivitou, jmenovitě v Irsku a ve Francii, které jsou typické i oceánickým podnebím charakteristickým celkově nižšími výkyvy průměrných ročních teplot, které pouze



**Obr.6** Fyzikálně-chemické parametry lokalit preferovaných clady I, III a IV komplexu *F. rhomboides* s.l. (šířka obdélníku odpovídá počtu kmenů v cladu)

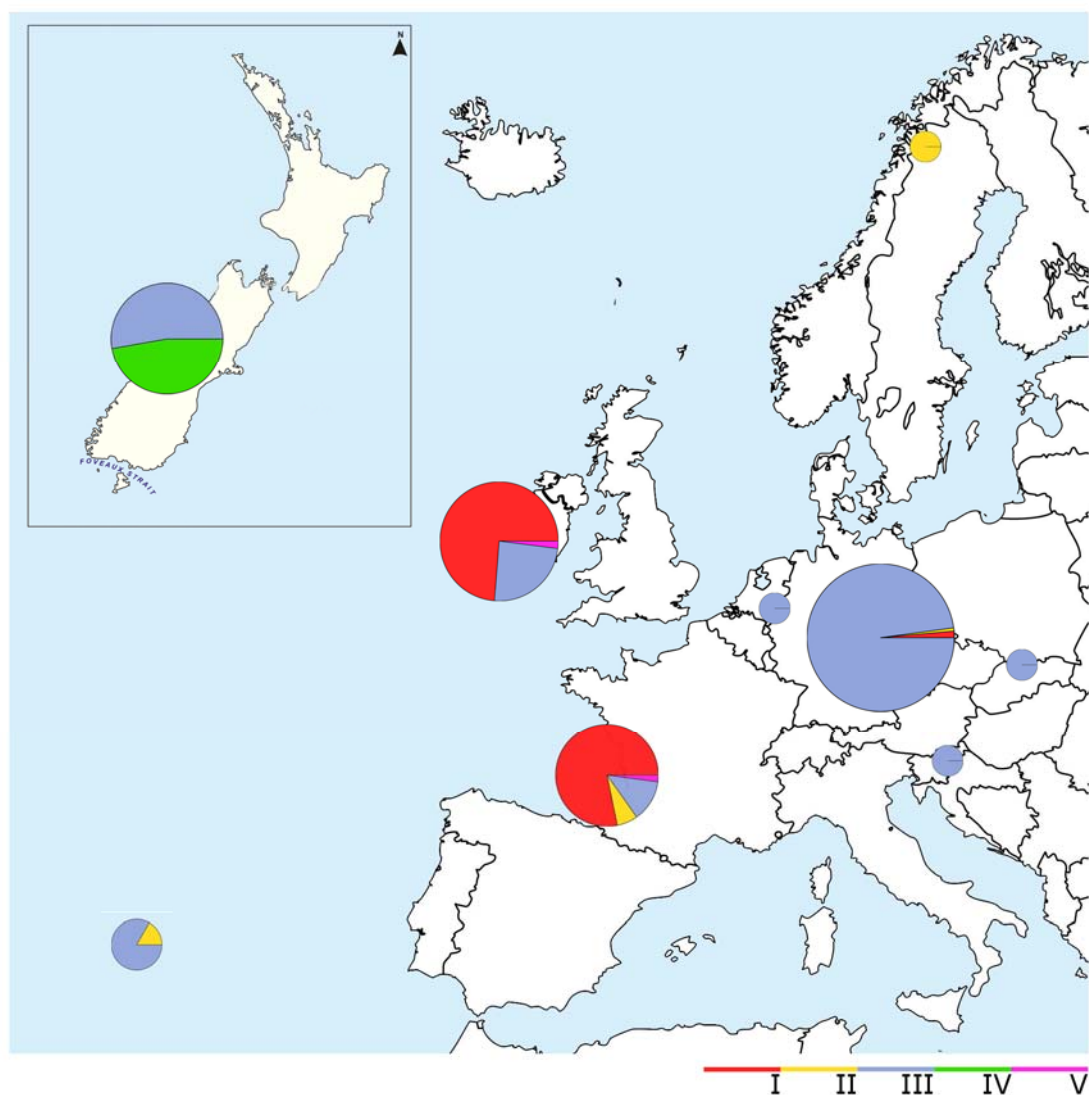
výjimečně klesají pod bod mrazu. Průměrná hodnota pH a konduktivity pro irské a francouzské lokality byla: Irsko - pH 6,2; konduktivita  $68 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; Francie - pH 5,9; konduktivita  $211 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Oproti tomu průměrné pH v České republice a na Novém Zélandě bylo pouze 4,4 a 5,2 a průměrná konduktivita  $38 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$  a  $27 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$ , v uvedeném pořadí. (Obr. 7, Příloha- TabulkaB) Lokality v České republice, kde zcela převážil clade III, se od ostatních evropských oblastí odlišují i charakterem klimatu. Kontinentální podnebí střední Evropy je typické velkými výkyvy průměrných ročních teplot, které jsou pod bodem mrazu v průměru 89dní v roce a běžně klesají na hodnoty kolem  $-16 \text{ }^\circ\text{C}$ . Teploty v ostatních studovaných oblastech jsou vzhledem k blízkosti oceánu mírnější, průměrné minimální teploty v Irsku a ve Francii dosahují hodnot  $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Na Novém Zélandě, kde byl nalezen clade III a IV, je na relativně malé vzdálenosti velký výškový gradient (7 až 1194 m.n.m.); minimální teploty se proto mohou pohybovat od  $4$  do  $-8^\circ\text{C}$  a na vysoko položených lokalitách mohou být pod bodem mrazu i více než 100 dní v roce, stejně jako v České republice. Oblast Nového Zélandu a České republiky má navíc i velmi podobné hodnoty pH a konduktivity. (Tabulka\_lokalit) Výsledky pro srovnání pH, konduktivity, minimální průměrné denní teploty ( $T_{\text{min}}$ ), amplitudy průměrných denních teplot ( $T_{\text{max}} - T_{\text{min}}$ ) a počtu dní s průměrnou teplotou pod



**Obr.7** Klimatické podmínky lokalit preferovaných clady I, III a IV komplexu *F. rhomboides* s.l. (šířka obdélníku odpovídá počtu kmenů v cladu)

bodem mrazu jsou znázorněny krabicovými diagramy na Obr.7.

Vzhledem k nízkému počtu kmenů nebylo hodnoceno rozšíření a ekologie cladu II a V - deset kmenů patřících ke cladu II bylo nalezeno na lokalitách na Azorských ostrovech (4 kmeny), v České republice (1), Francii (3) a ve Švédsku (2); do cladu V spadají tři kmeny z Irska a Francie. (Příloha – TabulkaA)



**Obr.8** Zastoupení cladů druhového komplexu *F. rhomboides* s.l. ve studovaných oblastech (velikost koláčových grafů vyjadřuje celkový počet kmenů izolovaných v určité oblasti)

## 4. Diskuze

### 4.1 Molekulární variabilita D1/D2 LSU

Na základě variability sekvencí oblasti D1/D2 LSU byly kmeny s morfologií *F. rhomboides* s.l. rozděleny do 5 linií. Clade I, III a IV byly navíc podpořeny vysokou hodnotou bootstrapu i posteriorní pravděpodobnosti. To, že byl clade II ve fylogenetickém stromě parafyletický, je pouze artefakt způsobený vnitrogenomovým polymorfismem. Vzhledem k velkému počtu polymorfních pozic a minimu sekvencí bez vnitrogenomového polymorfismu nebylo možné odvodit jednotlivé varianty oblasti D1/D2 LSU (Bezsteri et al. 2005b) a byl proto v alignmentu kódován dvojnásobnými bázemi. Více jak polovina parsimonně informativních pozic pro vymezení cladu II a jeho pozice vzhledem k sesterským cladům I a III, která má ve fylogenetickém stromě pouze střední statistickou podporu (0,71 BI/ 60% ML), obsahovala dvojnásobné báze (14 z 25 parsimonně informativních pozic v sekvencích cladů I až III). Oba programy použité k výpočtu fylogeneze zachází s dvojnásobnými bázemi stejně jako s pozicemi, kde data zcela chybí a dochází tedy nutně ke ztrátě části informace. Pro srovnání variability sekvencí byly proto vypočítány i hodnoty p-distance, které udávají proporcii odlišných pozic v alignmentu dvou sekvencí a prostřednictvím vážení shod s dvojnásobnými bázemi umožňují zohlednit i vnitrogenomový polymorfismus. Nevýhodou této míry genetické vzdálenosti, je skutečnost, že nebere v úvahu vícenásobné substituce a zejména u velmi odlišných sekvencí proto výrazně podhodnocuje jejich skutečnou genetickou vzdálenost (Strimmer & Haeseler 2003). Pro velmi podobné sekvence však může být relativně přesnou aproximací; jako kritická je uváděna hodnota p-distance = 0,01 (Strimmer & Haeseler 2003). I přes to, že se některé vzdálenosti v matici p-distancí blíží této hranici, topologie stromu odvozená metodou NJ byla víceméně kongruentní s výsledky Baysovské inference a metody maximum-likelihood. Odlišnosti byly nalezeny pouze v topologii větví, které získaly v BI/ML střední statistickou podporu. Zohlednění vnitrogenomového polymorfismu vedlo (1) k jasnému oddělení clade II jako sesterské linie ke cladu I, (2) ke změně topologie na bázi komplexu *F. rhomboides* s.l., kde algoritmus NJ určil jako sesterskou linii cladů I-IV novozélandský druh *F. maoriana* a (3) k odlišné pozici druhů v rámci linie *F. gondwana* + *F. erifuga* + *F. spB*, kde NJ algoritmus určil jako sesterské druhy *F. erifuga* a *F. gondwana*. Jejich příbuznost navíc podporuje i fakt, že jsou si oba druhy velmi podobné celkovým tvarem schránky (Obr.4 u-w vs. Obr.4 x).

Vzhledem k nejisté pozici linií na bázi komplexu *F. rhomboides* s.l. nelze v tuto chvíli s jistotou říct zda je komplex monofyletický. Pozice linií v rámci komplexu i na jeho bázi se může dále měnit přidáním sekvencí dalších oblastí DNA a pravděpodobně i s větším samplingem druhů s velmi podobnou morfologií, které jsou známé ze severní i jižní polokoule (Lange-Bertalot 2001). V současné době je proto sekvenována oblast malé ribozomální podjednotky SSU rDNA a jsou izolovány kmeny z dalších geografických oblastí. I přes to, je však zcela evidentní že vnitrogenomový polymorfismus neovlivnil rozdělení kmenů komplexu *F. rhomboides* s.l. do jednotlivých cladů a tedy ani analýzu jejich morfologie, ekologie a rozšíření.

#### **4.2 Morfologická variabilita druhového komplexu *Frustulia rhomboides* sensu lato**

Přiřazení jednotlivých cladů k morfologicky vymezeným druhům, které byly v minulosti popsány jako variety druhu *F. rhomboides* (Ehrenberg) De Toni vyskytující se na oligotrofních přirozeně kyselých lokalitách - jmenovitě *F. rhomboides* var. *crassinervia* (Brébisson) De Toni, který byl povýšen na druh *F. crassinervia* (Brébisson) Lange-Bertalot & Krammer, *F. rhomboides* var. *saxonica* (Rabenhorst) De Toni, který byl povýšen na druh *F. saxonica* Rabenhorst a *F. rhomboides* (Ehrenberg) De Toni, který byl nahrazen synonymem *F. krammeri* Lange-Bertalot & Metzeltin – nebylo vzhledem k překryvu v celokovém tvaru a velikosti možné. To, že se morfologie tradičně vymezených druhů *F. crassinervia*, *F. krammeri* a *F. saxonica* překrývají, ukázali již dříve i Siver & Baskette (2004) pomocí mnohorozměrné statistické analýzy několika tradičních morfometrických charakteristik na přírodních populacích ze Severní Ameriky.

Nejmenší z těchto druhů, *F. crassinervia*, je diatomology od celkově většího druhu *F. saxonica* tradičně rozeznáván především (1) větší mírou subkapitálního zúžení, (2) více či méně zřetelnou triundulací okraje schránky a (3) kopinatým až kopinatě-eliptickým tvarem oproti široce-kopinatému či kosočtverečně-kopinatému tvaru druhu *F. saxonica* (Lange-Bertalot 2001). Tento popis zcela splňují kmeny spadající do cladu V, které navíc druhu *F. crassinervia* odpovídají i rozsahem velikostí. Problémem je však skutečnost, že stejně velké buňky s morfotypem *F. crassinervia* lze nalézt i u cladů I a III. Siver & Baskette (2004) sice rozeznávají u těchto druhů odlišný typ heliktoglossy, nicméně shodně s výsledky SEM analýzy cladů I-V našli i oni u některých schránek s morfotypem *F. saxonica* širší a kratší heliktoglossu protaženou za splynutí apikálních žeber charakteristickou pro druh

*F. crassinervia*. Ostatní buňky cladů I-IV měli heliktoglossu popsanou u druhu *F. saxonica*, která je relativně užší a více protažená za splynutím žeber (Siver & Baskette 2004). Fakt, že byly oba typy nalezeny u velikostně odlišných zástupců cladu III by mohl nasvědčovat tomu, že se i tato struktura během životního cyklu rozsivek může měnit proporčně s velikostí buňky, a je tedy otázkou, jestli lze kvantitativní rozdíly v jejím vyjádření považovat za taxonomicky relevantní.

Druh *F. krammeri* se rozsahem velikostí překrývá s horním koncem hodnot udávaných pro druh *F. saxonica* a to v různé míře dle publikace použité pro identifikaci (Tabulka.clades). Vymezení druhů *F. saxonica* a *F. krammeri* totiž zkomplikovalo zjištění, že typový materiál pro druh *F. saxonica* (Rabenhorst 1851, Exsicc. no. 42) není zcela homogenní. Lange-Bertalot & Metzeltin (1996) proto rozlišují dva morfotypy lišící se velikostí, „morfotyp I“ a „morfotyp II“, kterým však nepřiradili taxonomicky platnou kategorii. Velikosti kmenů izolovaných v Evropě, které spadají do cladů I a III, odpovídají rozsahem velikostí menšímu „morfotypu II“, který se pohybuje v rozmezí délek 35-76  $\mu\text{m}$  (clade I: 39,1-68,9  $\mu\text{m}$ ; clade III: 37,3-73,8  $\mu\text{m}$ ) a šířek 10,5-14  $\mu\text{m}$  (clade I: 8,9-13,9  $\mu\text{m}$ ) a který byl ostatními autory v publikacích tradičně určován jako *F. rhomboides* var. *saxonica* nebo *F. saxonica* (Lange-Bertalot & Jahn 2000, Siver & Baskette 2004). „Morfotyp I“, s délkou 65-105  $\mu\text{m}$  a šířkou 15-19  $\mu\text{m}$  je v mnoha publikacích určen jako druh *F. rhomboides* var. *rhomboides* (Lange-Bertalot & Jahn 2000), který byl nedávno přejmenován na *F. krammeri* (Metzeltin & Lange-Bertalot 1998). To, že by „morfotyp I“ mohl být konspecifický s druhem *F. krammeri*, naznačuje i studie autorů Siver & Baskette (2004), kteří pomocí ultrastruktury valvy a mnohorozměrné analýzy několika tradičních morfometrických charakteristik odlišili v přírodních vzorcích ze Severní Ameriky populace druhu *F. krammeri* s odpovídající velikostí (délka 64-131  $\mu\text{m}$ / šířka 13-22  $\mu\text{m}$ ) (Siver & Baskette 2004). Zatímco v Severní Americe je tento druh běžný, v Evropě je považován za relativně vzácný a byl v minulosti nalezen především v severní Evropě (Lange-Bertalot 2001). S morfologickým popisem druhu *F. krammeri* i s jeho omezeným a vzácným výskytem v Evropě se velmi dobře shoduje clade II. Malý počet kmenů v cladu II pravděpodobně neumožnil zachytit velkou část životního cyklu, který je u rozsivek spojen se zmenšováním buňky, a izolovaní jedinci tedy mohli být menšími zástupci druhu *F. krammeri* (clade II: délka 51,5-67,2  $\mu\text{m}$ / šířka 12,4-15,5  $\mu\text{m}$ ). Odlišení cladu II od velkých kmenů cladu I a III však neumožňuje celkový tvar buněk ani ultrastruktura valvy. To, že byla u kmene F28-se, který byl vybrán jako zástupce cladu II pro pozorování v SEM, nalezena heliktoglossa podobnější druhu *F. saxonica* by mohlo být vyjádřením stejného trendu, který byl pozorován u velikostně odlišných zástupců cladu III. Heliktoglossa, kterou Siver & Baskette (2004)

považují za typickou pro druh *F. krammeri*, totiž není zásadně odlišná od heliktoglossy druhu *F. saxonica* a liší se, stejně jako v případě této struktury u druhu *F. crassinervia*, pouze mírou protažení.

Ani kmeny cladu IV, který byl nalezen pouze na Novém Zélandě, nelze jednoznačně odlišit velikostí, tvarem či ultrastrukturou od cladů I-III a v publikacích z Nového Zélandu byly populace s podobnou velikostí označeny jako *F. saxonica* (Kilroy 2007) nebo *F. saxonica* „morfotyp I“ (Beier 2005).

Zdá se tedy, že variabilita morfologie kmenů v rámci celého komplexu je spíše spojitá než nespojitá jak by se dalo očekávat dle nalezené genetické variability a standardizované kultivaci kmenů (Vanormelingen 2008a). Vzhledem k velkému počtu analyzovaných kmenů není překvapivé, že téměř všechna párová porovnání velikostí a proporcí (poměr délky a šířky) pro kmeny cladů I-V byla signifikantní. Velké přesahy měřených morfometrických parametrů však ve skutečnosti neumožňují jednoznačně identifikovat příslušnost izolovaných kmenů k jednotlivým cladům na základě velikosti.

Výsledky srovnání morfologie a molekulární analýzy D1/D2 LSU nasvědčují tomu, že v komplexu *F. rhomboides* s.l. tradiční morfotypy nekorelují s molekulární variabilitou. Znaky, jako je subkapitální zúžení a triundulace okraje schránky či míra protažení heliktoglossy, které byly považovány za druhově specifické, pravděpodobně mohou vznikat i důsledkem zmenšování velikosti buňky v průběhu životního cyklu a/nebo vlivem prostředí (Kociolek & Stoermer 2010). Vizuelní zhodnocení neumožnilo identifikovat ani jiné tvarové či ultrastrukturní synapomorfie jednotlivých cladů, které by je umožnily odlišit. Vzhledem ke značné subjektivitě a nepřesnosti vizuelního hodnocení, však nelze s jistotou tvrdit, že je tvarová variabilita tohoto komplexu zcela spojitá. Pro vyřešení této otázky bude nutné použít některou z metod geometrické morfometrie, které po odstínění vlivu velikosti umožňují objektivní srovnání tvarové variability a jsou proto v rostoucí míře používány i ke studiu kryptické a pseudokryptické diverzity rozsivek (např. Mann et al. 2004, Poulíčková et al. 2010, Beszteri et al. 2005a ).



### 4.3 Rozšíření a ekologie druhového komplexu *Frustulia rhomboides* sensu lato

Nejednoznačný taxonomický přístup některých diatomologů a násilné pasování evropských jmen na rozsivky z jiných geografických oblastí (Mann 1999) vedly v minulosti k podcenění druhové diverzity rozsivek (Mann & Droop 1996) a k názoru, že šíření jednotlivých druhů není omezeno geografickou vzdáleností a že jejich výskyt reflektuje pouze jejich odlišné ekologické nároky (Beijerinck 1913). Rostoucí počet studií, které se zabývají kryptickou diverzitou rozsivek však ukazuje, že i sesterské druhy s prakticky neodlišitelnou morfologií mohou mít odlišné geografické rozšíření (Créach et al. 2006, Pouličková et al 2008) a tyto výsledky potvrdila i molekulární analýza druhového komplexu *F. rhomboides* s.l.

Za kosmopolitní jsou tradičně považovány i druhy *F. saxonica* a *F. crassinervia*, které se vyskytují na lokalitách bohatých na huminové kyseliny - především v přirozeně kyselých oligotrofních habitatech tradičně asociovaných s druhem *Sphagnum* sp. - sympatricky s dalšími acidofilními a acidobiontickými druhy rodu *Frustulia* (Lange-Bertalot 2001; Siver & Baskette 2004). V Evropě se sympatricky s druhy *F. saxonica* a *F. crassinervia* vyskytuje především druh *F. krammeri*. Oproti tomu diverzita acidofilních a acidobiontických druhů známých z jižní polokoule je několikrát vyšší a to i přesto, že jsou tyto oblasti mnohem méně prozkoumané (Beier & Lange-Bertalot 2005).

Vzhledem ke skutečnosti, že malý sampling může vést k chybným závěrům ohledně rozšíření a ekologie druhů (Dolan 2005), byly interpretovány především výsledky ze čtyř geografických oblastí, ze kterých byl odebrán velký počet vzorků. Clady I, III a IV se vyskytovaly na lokalitách ve vysokých abundancích; bylo tedy možné izolovat dostatečné množství kmenů a porovnat jejich frekvence ve studovaných geografických oblastech. Toto srovnání odhalilo dramaticky odlišná rozšíření a ekologie jednotlivých cladů. Odlišné rozšíření cladu I a III v Evropě velmi dobře koreluje s odlišnými fyzikálně-chemickými a klimatickými parametry prostředí a reflektuje tak odlišné ekologické nároky těchto cladů. Oproti tomu clady III a IV byly velmi často nalezeny na novozélandských lokalitách sympatricky a je tedy pravděpodobné, že mají podobné ekologické nároky. Clade IV byl stejně jako ostatní izolované druhy rodu *Frustulia* nalezen pouze na Novém Zélandě. V tuto chvíli lze tedy za kosmopolitně rozšířený považovat pouze clade III z komplexu *F. rhomboides* s.l., nicméně vzhledem k tomu, že na Novém Zélandě nebyly odebrány vzorky z lokality podobných habitatů v Irsku a ve Francii, nelze vyloučit, že se zde vyskytuje i clade I. Je však otázkou, zda je rozšíření cladu III přirozené. Antropogenní introdukce některých rozsivkových druhů byly na Novém Zélandě potvrzeny již v minulosti. Vedle

invazivního druhu *Dydimosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt, který se na Novém Zélandě objevil v roce 2004 (Kilroy et al. 2009), byla dokázána i introdukce rozsivky *Asterionella formosa* Hassall, která byla v sedimentárním záznamu novozélandských jezer objevena až po roce 1880, kdy začala evropská kolonizace Nového Zélandu (Harper 1994). Vzhledem k tomu, že jsou ekologické a klimatické podmínky na Jižním ostrově Nového Zélandu podobné jako podmínky v mírném pásu severní polokoule (Kilroy et al. 2008) a že je clade III na lokalitách často velmi abundantní nebo dokonce zcela dominuje, nelze jeho potencionální introdukci na Nový Zéland zcela vyloučit. Počet morfologicky vymezených druhů rozsivek, které jsou považovány za kosmopolitní – Kociolek & Spaulding (2000) uvádí 150-200 druhů - je mnohonásobně nižší než odhady celkové diverzity této třídy, která se v současnosti pohybují kolem 200 000 druhů (Mann & Droop 1996). Je možné, že kosmopolitní druhy jsou srovnatelné s plevelnými rostlinami, které se snadno adaptují a šíří a toto šíření je pravděpodobně zejména v poslední době značně usnadněno rostoucí globalizací (Vitoušek et al. 1997, Kaštovský et al. 2010). To, že by clade III mohl být jedním z „plevelných“ rozsivkových druhů naznačuje i jeho široká ekologická valence zejména vzhledem ke gradientu pH a teplot a také skutečnost, že byl na rozdíl od ostatních evropských cladů vysoce abundantní i v efemérních habitatech (Příloha TabulkaA). Nárostová společenstva skal a sezóně vysychajících tůní jsou vystavena extrémním změnám teplot a stresu, který s nimi souvisí, tedy vysycháním a vymrzáním. Tyto stresy není většina rozsivek schopna tolerovat; adaptovaným druhům však usnadňují šíření mezi fyzicky nepropojenými sladkovodními habitaty (Souffreau et al. 2010).

#### 4.4. Taxonomické poznámky k izolovaným novozélandským druhům

##### 4.4.1 *Frustulia aotearoa* Beier & Lange-Bertalot

(Obr.9, Tabulka 3)

MORFOLOGIE IZOLOVANÝCH KMENŮ: tvar buňky kopinatý až kosočtverečně-kopinatý s tupě zakulacenými konci. Délka 141,6-204,5  $\mu\text{m}$ , šířka 30,3-41,6  $\mu\text{m}$ . (Data ze SEM chybí, protože se druh nepodařilo kultivovat.)



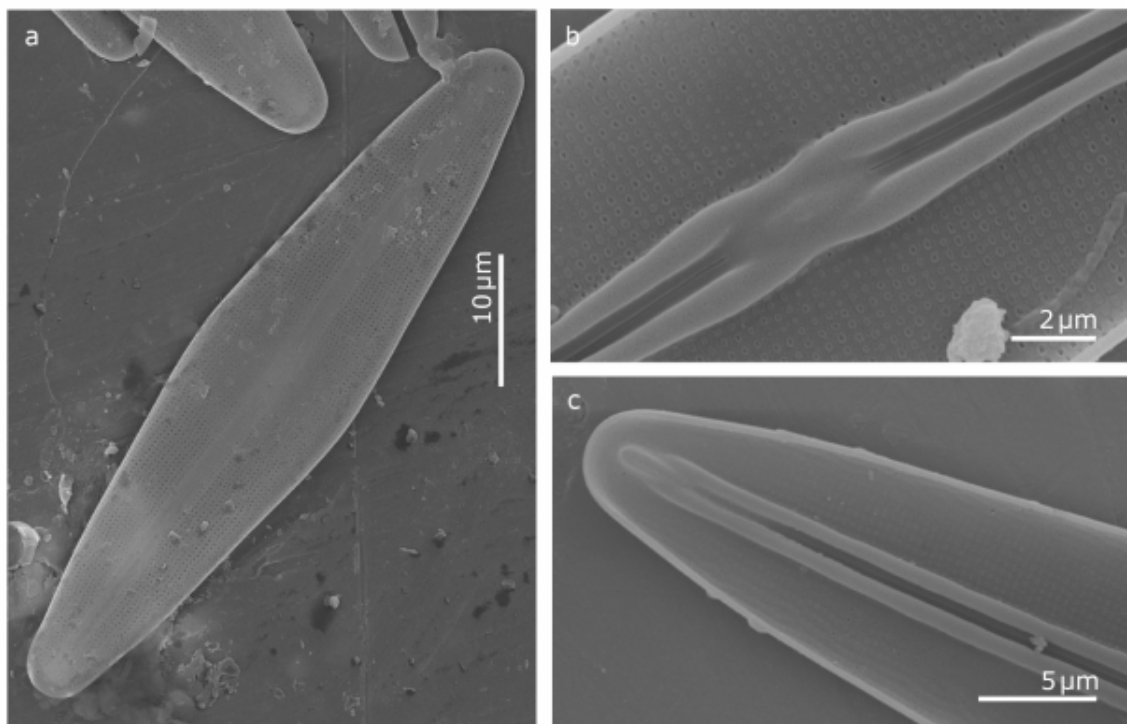
**Obr.9** *Frustulia aotearoa*. Buňky izolované pro metodu single-cell PCR; sekvence ve fylogenetickém analýze pochází z izolátu b.

EKOLOGIE A ROZŠÍŘENÍ: Druh *F. aotearoa* popsali Beier & Lange-Bertalot (2007) z oligotrofních kyselých lokalit na západním pobřeží Jižního ostrova (NZ), kde se vyskytuje v epipelonu a epifytonu na druzích *Sphagnum* sp. a *Juncus* sp. Přestože byly druhy s podobným tvarem a velikostí popsány již dříve, žádný nemá stejnou kombinaci morfologických znaků jako *F. aotearoa* a podle autorů, tedy nemohlo v minulosti dojít k jeho chybné identifikaci. Druh byl tedy zatím nalezen pouze na Novém Zélandě a je proto považován za endemický. (Beier & Lange-Bertalot 2007).

#### 4.4.2 *Frustulia gondwana* Beier & Lange-Bertalot

(Obr. 4 u-w, Obr.10, Tabulka 3)

MORFOLOGIE IZOLOVANÝCH KMENŮ: tvar buňky kopinatý až kosočtverečně-kopinatý s jemnou triundulací na okraji schránky a s nenápadně protaženými a široce klenutými konci. Striace patrná v LM. Délka 52,3-1,4  $\mu\text{m}$ , šířka 11,3-14,9  $\mu\text{m}$ , v SEM transapikálně 27 strií/ 10  $\mu\text{m}$ , apikálně 25 areol/ 10  $\mu\text{m}$ . Heliktoglossa úzce protažená za splnutí apikálních žeber. Z vnější strany má raphe na distálním i apikálním konci tvar T.



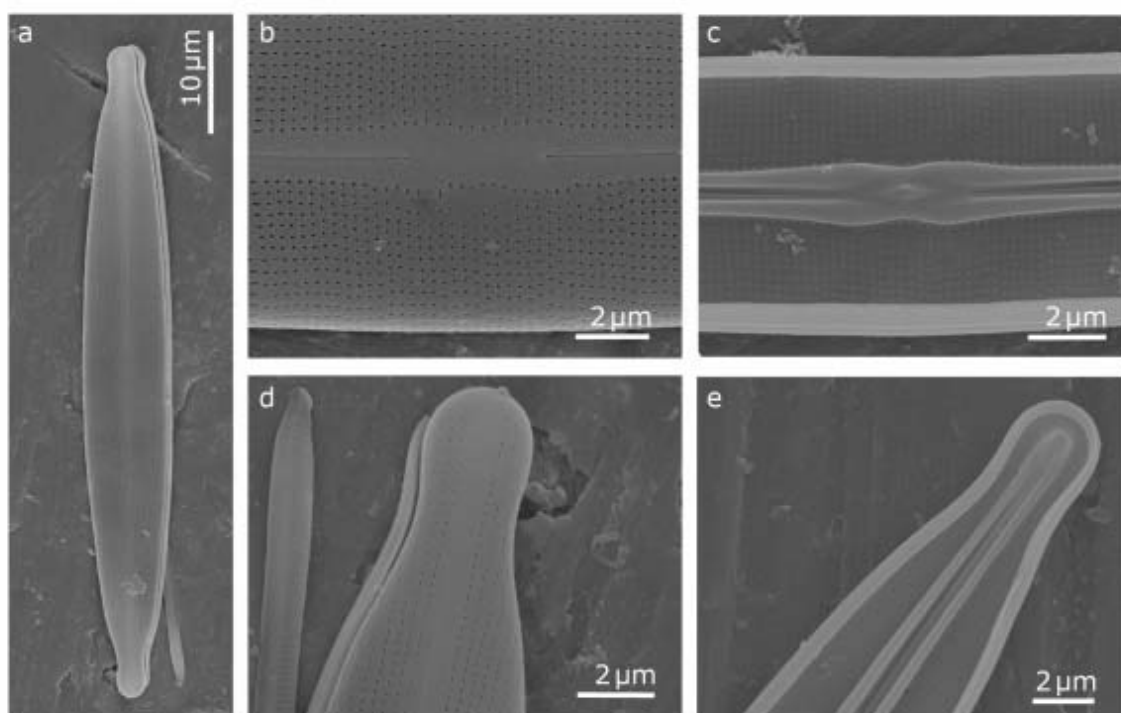
**Obr.10** *Frustulia gondwana* (SEM). a) vnější pohled na celou valvu; b) detail centrálního nodu; c) detail heliktoglossy.

EKOLOGIE A ROZŠÍŘENÍ: Druh *F. gondwana* byla popsána z kyselých minerotrofních mokřadů na západním pobřeží Jižního ostrova (NZ)(Beier & Lange-Bertalot 2007), kde se vyskytoval ve vysokých abundancích. V ombrotrofních lokalitách, které Beier & Lange-Bertalot (2007) na západním pobřeží také studovali, byl tento druh vzácný. Druh *F. gondwana* byl kromě Nového Zélandu v minulosti nalezen i na Nové Kaledonii (Moser et al. 1995), v Chile (Rumrich et al. 2000) a na Costa Rice (Wydryzcka & Lange-Bertalot 2001), kde byl však chybně identifikován jako *F. rhomboides* a *F. cf. saxonica* (Beier & Lange-Bertalot 2007).

#### 4.4.3. *F. cf. magaliesmontana* Cholnoky

(Obr.4 q-r, Obr.11, Tabulka 3)

MORFOLOGIE IZOLOVANÝCH KMENŮ: tvar buňky úzce kopinatý s klenutými stranami a protaženými konci, které mohou být mírně zaškrbené tak, že dávají vzniknout úzce-kulovitému hlavičkovitému zakončení. Délka 62,6-67,2  $\mu\text{m}$ / šířka 8,3-9,9  $\mu\text{m}$ , v SEM transapikálně 38 strií/ 10  $\mu\text{m}$ , apikálně 37 areol/ 10  $\mu\text{m}$  (počítáno v centrální části valvy). Striace v centrální části paralelní a směrem ke koncům valvy konvergentní. Heliktoglossa začleněná do oblouku, který tvoří splynutí apikálních žebber. Raphe s drobným pórem na apikálním i distálním konci.



**Obr.11** *Frustulia cf. magaliesmontana* (SEM). a) vnější pohled na celou valvu; b) proximální zakončení raphe na vnější straně valvy; c) detail centrálního nodu; d) zakončení raphe na distálním konci valvy; e) detail heliktoglossy.

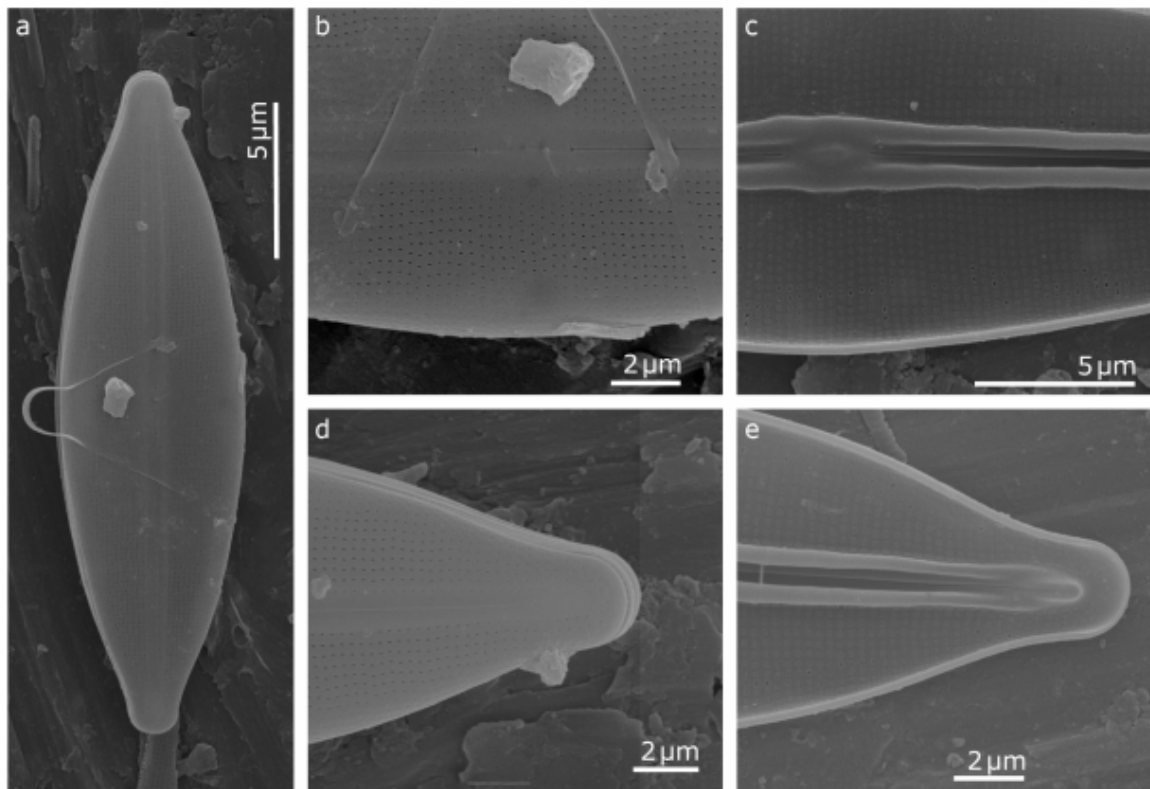
EKOLOGIE A ROZŠÍŘENÍ: K druhu *F. cf. magaliesmontana* patří tři izoláty s identickou sekvencí zastoupené ve fylogenetickém stromě kmenem NZ159. I když jsou tyto kmeny o něco větší než populace popsané z lokalit na Jižním ostrově Nového Zélandu v dřívějších publikacích (Beier & Lange-Bertalot 2007: délka 47-51  $\mu\text{m}$ / šířka 7-9  $\mu\text{m}$ , Kilroy 2007: 51-62  $\mu\text{m}$ / 7,9-8,7  $\mu\text{m}$ ), celkový tvar buněk a ultrastruktura valvy nasvědčují tomu, že se jedná o stejný druh (Tabulka 3). Podobné populace byly kromě Nového Zélandu několikrát nalezeny i v Austrálii, v Jižní Americe, na Nové Guinei a v Jihoafrické republice, odkud pochází i

typový druh *F. magaliesmontana*. Vzhledem k rozdílům v hustotě a tvaru striace, však není zcela jisté, zda jsou popsané populace konspecifické (podrobné srovnání v Beier & Lange-Bertalot 2004). Podobný druh *F. pseudomagaliesmontana* Camburn & Charles, který byl doposud nalezen pouze v Severní Americe, se od populací z jižní polokoule liší velikostí (27 - 44  $\mu\text{m}$ / 5 - 6,5  $\mu\text{m}$ ) a striktně paralelní striací (Beier & Lange-Bertalot 2007, a Kilroy 2007). Přestože není zcela jisté, zda jsou populace popsané jako *F. magaliesmontana* nebo *F. cf. magaliesmontana* konspecifické, je evidentní, že tento morfotyp na severní polokouli chybí.

#### 4.4.4. *Frustulia maoriana* Beier & Lange-Bertalot

(Obr.4 o-p, Obr.11, Tabulka 3)

MORFOLOGIE IZOLOVANÝCH KMENŮ: tvar buňky široce eliptický a u větších buněk elipticko-kopinatý s krátce protaženými úzkými konci. Striace často patrná i v LM. Délka 36-53  $\mu\text{m}$ , šířka 12,5 - 14  $\mu\text{m}$ , v SEM transapikálně 27 - 29 strií/ 10  $\mu\text{m}$  a apikálně 28 - 30 areol/ 10  $\mu\text{m}$ . Heliktoglossa protažená za splynutí žeber. Heliktoglossa úzce protažená za splynutí apikálních žeber. Z vnější strany má raphe na distálním i apikálním konci tvaru T.



**Obr.12** *Frustulia maoriana* (SEM). a) vnější pohled na celou valvu; b) proximální zakončení raphe na vnější straně valvy; c) detail centrálního nodu; d) zakončení raphe na distálním konci valvy; e) detail heliktoglossy.

EKOLOGIE A ROZŠÍŘENÍ: Druh *F. maoriana* byl popsána relativně nedávno z lokalit Jižního ostrova (NZ), kde je abundantní na oligo- a mesotrofních lokalitách v nízkých nadmořských výškách na západním pobřeží. I přesto, že má *F. maoriana* podobnou morfologii jako kmeny přibližně stejné velikosti, které spadají do druhového komplexu *F. rhomboides* s.l., lze jej s velkou jistotou rozeznat podle hrubší striace, která je patrná i ve světelném mikroskopu, a široce eliptického tvaru bez triundulace typické pro tradičně vymezenou varietu *crassinervia* (Beier & Lange-Bertalot 2007). Druh je sice zatím považován za novozélandského endemita, nicméně vzhledem k podobnosti druhu *F. maoriana* a komplexu *F. rhomboides* s.l. je možné, že byl tento druh v jiných oblastech v minulosti pouze špatně identifikován jako jeden z těchto druhů (Beier & Lange-Bertalot 2007).

**Tabulka 3.** Morfometrické charakteristiky izolovaných druhů ve srovnání s publikovanými daty. (min-max; průměr (směrodatná odchylka), T – zakončení tvaru T, pór – zakončení pórem)

	délka valvy (µm)	šířka valvy (µm)	délka/šířka valvy	hustota strií (/10µm)	hustota areol (/10µm)	zakončení raphe	ref.
<i>F. aotearoa</i> <sup>a</sup>	141,6 - 204,5	30,3 - 41,6	4,2 - 4,9	-	-	-	
	157,3 (13,1)	34,8 (2,1)	4,5 (0,2)				
<i>F. aotearoa</i>	110 - 210	25 - 38	-	22 - 24	25 - 26	T	[3]
<i>F. gondwana</i>	52,3 - 61,4	11,3 - 14,9	3,8 - 4,9	27	25	T	
	57,1 (2,7)	13,3 (0,8)	4,3 (0,2)				
<i>F. gondwana</i>	48 - 57	11,5-16	-	25 - 27	25 - 27	T	[3]
<i>F. cf. magaliesmontana</i>	62,6 - 67,2	8,3 - 9,9	6,4 - 7,8	38	37	pór	
	65,3 (1,6)	9,2 (0,4)	7,1 (0,4)				
<i>F. cf. magaliesmontana</i>	51 - 62	7,9 - 8,7	-	39 - 40	37 - 38		[4]
<i>F. cf. magaliesmontana</i>	47 - 51	7-9	-	32 - 35	37 - 39	pór	[2]
<i>F. pseudomagaliesmontana</i>	27 - 44	5-6,5	-	40 - 48	36 - 56	pór	[1]
<i>F. maoriana</i>	39,1 - 49,1	11,3 - 13,8	2,9 - 3,8	30	30	T	
	42,3 (2,4)	12,6 (1,6)	3,4 (0,2)				
<i>F. maoriana</i>	36 - 53	12,5 - 14	-	27 - 29	28 - 30	T	[2]
<i>F. spA</i>	37,3 - 59	10,5 - 12,3	3,2 - 5,4	36	30	pór	
	48,6 (7,5)	11,2 (0,5)	4,4 (0,8)				
<i>F. spA</i>	47,5 - 77	9,3 - 11,6	-	34	-	pór	[4]
<i>F. pseudomdosia</i>	37 - 45	10 - 12	-	26 - 28	-	-	[3]

[1] Siver & Baskette (2004)

[2] Beier & Lange-Bertalot (2007)

[3] Flower (2005)

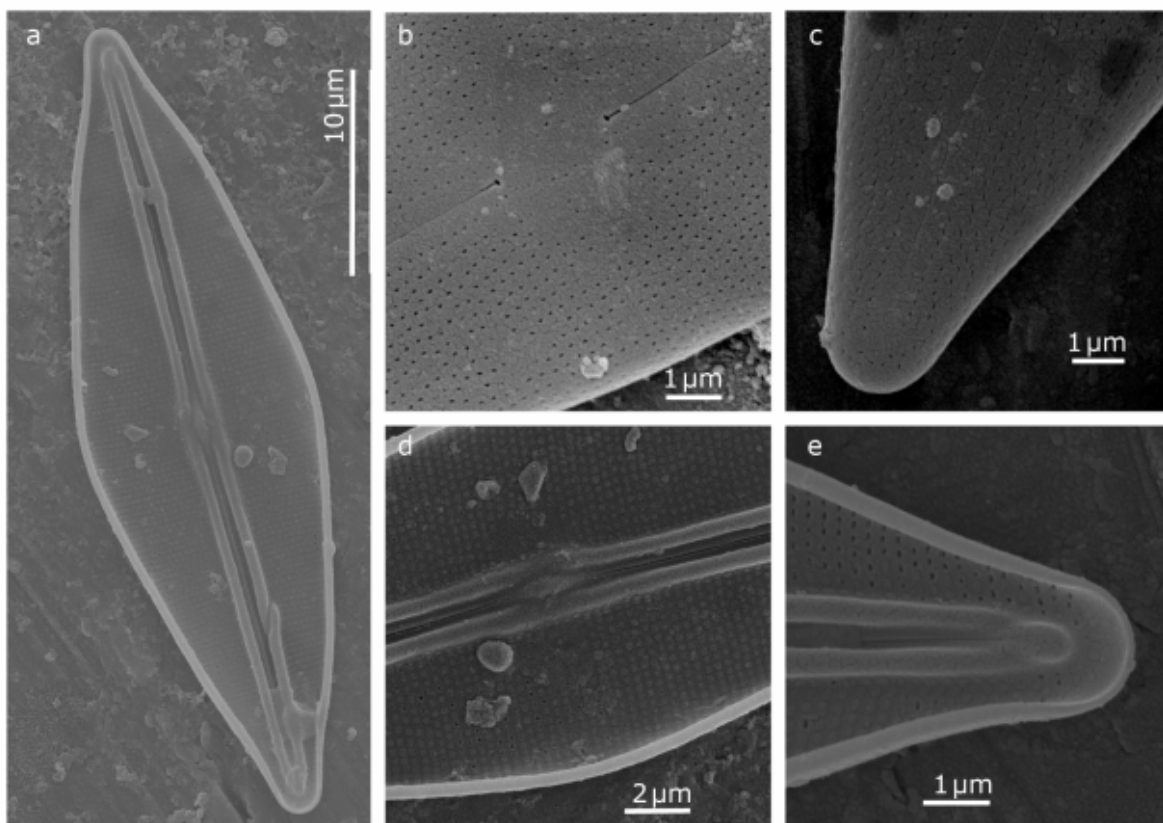
[4] Kliroy (2007)

změřeno na buňkách izolovaných pro single-cell PCR<sup>2</sup>

#### 4.4.5 *F. spA*

(Obr.4 s-t, Obr.12, Tabulka 3)

MORFOLOGIE IZOLOVANÝCH KMENŮ: tvar buňky kopinatý až kosočtverečně-kopinatý s úzkými mírně protaženými konci. V LM patrné triundulované vchlípení bočních stěn a středové hyalinní pole. Délka 37,3–59  $\mu\text{m}$ , šířka 10,5-12,3  $\mu\text{m}$ , v SEM transapikálně 27 strií/ 10  $\mu\text{m}$ , a apikálně 25 areol/ 10  $\mu\text{m}$ . Jednoduchá řada areol protínající hyalinní pole kopíruje apikální žebra. Heliktoglossa relativně širší a pouze krátce protažená za splynutí apikálních žeber. Z vnější strany je raphe na distálním i apikálním konci zakončené jednoduchým pórem.



**Obr.12** *Frustulia* spA (SEM). a) vnitřní pohled na celou valvu; b) proximální zakončení raphe na vnější straně valvy; c) zakončení raphe na distálním konci valvy; d) detail centrálního nodu; e) detail heliktoglossy.

EKOLOGIE A ROZŠÍŘENÍ: Druh *F. spA* byl poprvé zdokumentován na novozélandské lokalitě Baeley Spur (Kilroy 2007); formální popis druhu však stále chybí. Jednotlivé kmeny byly nalezeny na třech oligotrofních lokalitách nacházejících se, stejně jako Baeley Spur, ve vyšších nadmořských polohách. Tento druh je charakteristický zejména hyalinním polem v centrální části valvy, které bylo zatím popsáno pouze u druhů z jižní polokoule (Rumrich et. al 2000, Van der Vijver et al. 2002, Flower 2005). Velikostí a tvarem hyalinního pole se novozélandské populace nejvíce podobají druhu *F. pseudoundosa* Flower. Populace, které



Flower (2005) popsal na Falklandských ostrovech, však mají hrubší striaci (26-28 strií/10 µm), zvlněný okraj valvy a výraznější subkapitální zúžení. Druh *F. spA* lze tedy považovat za novozélandského endemita.

#### 4.5 Diverzita a rozšíření rodu *Frustulia*

Srovnání celkové diverzity sympatricky se vyskytujících druhů rodu *Frustulia* v Evropě a na Novém Zélandě jasně ukázalo že kosmopolitní rozšíření nelze generalizovat jen na základě malé velikosti a vysokých abundancí jedinců v populacích (Finlay a Clarke 1999, Finlay 2002). Vzhledem k tomu, že jsou klimatické podmínky na Novém Zélandě velmi podobné mírnému pásu severní polokoule (Kilroy 2008) a že se velikost druhů rodu *Frustulia* dramaticky neliší je nutné hledat vysvětlení jinde. Rostoucí počet studií, které se zabývají biogeografií rozsivek nasvědčuje tomu že vedle chemicko-fyzikálních faktorů ovlivňuje výskyt jednotlivých druhů i jejich šíření v čase a prostoru, případné lokální extinkce a v současnosti i introdukce způsobené člověkem (Harper 1994, Vyverman et al. 2007, Flöder & Kilroy 2009, Vyverman et al. 2010). Tyto faktory pravděpodobně hrály důležitou roli i v případě rodu *Frustulia*.

Druhovú diverzitu tohoto rodu je na Novém Zélandě evidentně mnohonásobně vyšší než v Evropě (Beier & Lange-Bertalot 2007) a koreluje s celkově vyšší diverzitou rozsivek v celé australské oblasti (Vyverman et al. 1998, Sabbe et al. 2001, Kilroy et al. 2003, Vanhoutte et al. 2004). Mnoho dalších zcela odlišných druhů tohoto rodu s podobnými ekologickými nároky však bylo navíc nalezeno i v Jižní Americe a na Nové Kaledonii (Metzeltin & Lange-Bertalot 1998, Wydrzycka & Lange-Bertalot 1998, Moser 1999). Pouze na Novém Zélandě bylo sympatricky s kosmopolitními druhy *F. saxonica*, *F. crassinervia* a *F. pangeopsis* nalezeno šest dalších druhů rodu *Frustulia*. Zatímco některé z těchto druhů mají na jižní polokouli pravděpodobně širší výskyt, tři jsou zatím považovány za novozélandské endemity (Beier & Lange-Bertalot 2007, Kilroy 2007).

Vzhledem k unikátní morfologii všech izolovaných druhů a relativně velkým abundancím ve kterých se na lokalitách Nového Zélandu vyskytují (Beier & Lange-Bertalot 2007) je nepravděpodobné, že by na mnohem důkladněji prostudované severní polokouli unikly pozornosti diatomologů (Foissner 2006). Tyto a další druhy a rody s unikátní morfologií vyskytující se především na jižní polokouli jsou proto jedním z hlavních argumentů proti teorii o ubikvitním rozšíření rozsivkových druhů. (pro rozsivky shrnuto

Vanormelingenem et al. 2008b). Skutečnost že biogeografické provincie s charakteristickou řasovou diverzitou na jižní polokouli korelují s hranicemi rozšíření bezobratlých živočichů a vyšších rostlin naznačuje že pro jejich šíření v čase i prostoru platí stejná pravidla (Vyverman et al. 2010).

## 5. Závěr

Molekulární analýza hypervariabilní oblasti D1/D1 LSU rozdělila kmeny s morfologií *Frustulia rhomoides* sensu lato do pěti samostatných linií. Tradiční morfometrická analýza velikostí a vizuální zhodnocení tvaru a ultrastrukturních znaků však ukázaly, že morfologické znaky považované za druhově specifické pro tradičně vymezené druhy *F. saxonica*, *F. crassinervia* a *F. krammeri* nekorelují s objevenou molekulární variabilitou a vzhledem k tomu, že nebyly nalezeny ani jiné morfologické synapomorfie nelze v tuto chvíli clady komplexu *F. rhomboides* s.l. jednoznačně odlišit. Hypotézu, že lze clady považovat za druhy však vedle molekulární analýzy potvrzují i jejich odlišné ekologické nároky a rozšíření.

Srovnání celkové diverzity sympatricky se vyskytujících druhů rodu *Frustulia* v Evropě a na Novém Zélandě potvrdilo že kosmopolitní rozšíření nelze generalizovat jen na základě malé velikosti a vysokých abundancí jedinců v populacích, tak jak to předpokládá ubikvitní hypotéza. Rozšíření a odlišná diverzita tohoto rodu na severní a jižní polokouli je tedy pravděpodobně výsledkem stejných procesů, které ovlivňují populace makroorganismů. Za kosmopolitně rozšířený lze v tuto chvíli považovat pouze clade III druhového komplexu *F. rhomboides* s.l. Je však otázkou jakou roli sehrála při šíření tohoto a dalších kosmopolitních druhů lidská civilizace.

## 6. Literatúra

- Abramoff M, Magelhaes P, Ram S (2004): Image processing with Image. *J. Biophotonics International* 11: 36-42
- Álvarez I., Wendel J.F. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417–4347
- Alverson AJ, Kolnick L (2005): Intragenomic nucleotide polymorphism among small subunit (18S) rDNA paralogs in the diatom genus *Skeletonema* (Bacillariophyta), *Journal of Phycology* 41:1248-1257
- 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., Ghiron J.H.L., Mann D.G., Pröschold T., Montresor M. (2007): Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms, *Protist* 158:193-207
- 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, PhD Thesis.
- 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
- 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
- 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
- Dolan J. R. (2005): An introduction to biogeography of aquatic microbes, *Aquatic Microbial Ecology* 41: 30-48.
- Créach V., Ernst A, Sabbe K., Vanelslander 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
- Darwin C. (1859): *On the origin of species by means of natural selection*. London, J. Murray.

- de Queiroz K. (2007): Species concepts and species delimitation, *Systematic Biology* 56: 879 - 886
- 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.
- Edgar S.M., Theriot E.C. (2004): Phylogeny of *Aulacoseira* (Bacillariophyta) based on molecules and morphology, *Journal of Phycology* 40: 772–788
- 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
- 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., 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
- Feliner GN, Rossello JA (2007): Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species level evolutionary studies in plants, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 911-919
- 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
- Floder S., Kilroy C. (2009): *Didymosphenia geminata* (Protista, Bacillariophyceae) invasion, resistance of native periphyton communities, and implications for dispersal and management, *Biodiversity and Conservation* 18: 3809-3824
- Flower R.J. (2005): A taxonomic and ecological study of diatoms from freshwater habitats in the Falkland Islands, South Atlantic. *Diatom Research* 20:23–96
- Foissner W. (2006): Biogeography and dispersal of micro-organisms: A review emphasizing protists, *Acta Protozoologica* 45: 111 - 136
- 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
- Geitler L.(1932): Der Formwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen). *Archiv für Protistenkunde* 78: 1-226

- Hammer Ø., Harper D. A. T. & Ryan P. D. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontol. Electronica* 4:1–9.
- Harper M.A. (1994): Did Europeans introduce *Asterionella formosa* Hassall to New Zealand?, In: Kociolek J.P. (ed) Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Diatom Symposium 1990, California Academy of Sciences, San Francisco
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985): Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA, *Journal of Molecular Evolution* 22: 160–174
- 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
- Heino J., Bini L.M., Karjalainen S.M., Mykra H., Soininen J., Vieira L.C.G., Diniz-Filho J.A.F. (2010): Geographical patterns of micro-organismal community structure: are diatoms ubiquitously distributed across boreal streams? *Oikos* 119: 129-137
- Huelsenbeck J. P. & Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Johansen, J.R., Casamatta D.A. (2005): Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Algological Studies* 116:71-93
- Kaczmarek I., Ehrman J.M., Moniz M.B.J., Davidovich N (2009): Phenotypic and genetic structure of interbreeding populations of the diatom *Tabularia fasciculata* (Bacillariophyta). *Phycologia* 48: 391–403
- Kaštovský J., Hauer T., Mareš J., Krautová M., Besta T., Komárek J., Desortová B., Hetesa J., Hindáková A., Houk V., Janeček E., Kopp R., Marvan P., Pumann P., Skácelová O., Zapomělová E. (2010): A review of the alien and expansive species of freshwater cyanobacteria and algae in the Czech Republic. *Biological Invasions* 12: 3599-3625
- Kilroy C., Sabbe K., Bergey E.A. et al (2003): New species of *Fragilariforma* (Bacillariophyceae) from New Zealand and Australia. *New Zealand Journal Of Botany* 41: 535–554
- Kilroy C.B.(2007) Diatom communities in New Zealand subalpine mire pools: distribution, ecology and taxonomy of endemic and cosmopolitan taxa. PhD thesis
- Kilroy C., Biggs B.J.F., Vyverman W., Broady P.A. (2008). Spatial and temporal variability in mire pool limnology, *Fundamental and Applied Limnology* 171: 185-197
- Kilroy C., Larned S.T., and Biggs B.J.F. (2009): The non-indigenous diatom *Didymosphenia geminata* alters benthic communities in New Zealand rivers. *Freshwater Biology* 54: 1990-2002
- Kociolek JP, Spaulding SA (2000): Freshwater diatom biogeography, *Nova Hedwigia* 71:223–241
- Kooistra W.H.C.F., Medlin L.K. (1996): Evolution of the diatoms (Bacillariophyta) IV. A reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 391–407
- 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
- Krammer K., Lange-Bertalot H. (1986): Bacillariophyceae, 1. Teil: Naviculaceae. In Ettl H., Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D. (eds.) *Siisswasserflora von Mitteleuropa, Band 2*. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.

- Lange-Bertalot H. Metzeltin D. (1996): Oligotrophie-Indikatoren, 800 Taxa repräsentativ für drei diverse Seentypen, kalkreich - oligodystroph-schwach gepuffertes Weichwasser. *Iconographia. Diatomologica* 2: 1-390
- Lange-Bertalot H, Jahn R. (2000): On the identity of *Navicula (Frustulia) rhomboides* and *Frustulia saxonica* (Bacillariophyceae), *Systematics and Biogeography* 70: 255 – 261
- Lange-Bertalot H. (2001): Diatoms of Europe Vol. 2. *Navicula* sensu stricto, 10 genera separated from *Navicula* sensu lato, *Frustulia*: 1-526. - A.R.G. Gantner, Ruggell, Liechtenstein.
- 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
- Mann D.G., Droop S.J.M.(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., McDonald S.M., Bayer M.M., Droop S.J.M., Chepurinov 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
- Mann D.G. (2010): Discovering diatom species: is a long history of disagreements about species-level taxonomy now at an end? *Plant Ecology and Evolution* 143: 251-264
- Mayr E. (1942): *Systematics and the origin of species*. New York, Columbia University Press.
- Medlin L.K., Elwood H.J., Stickel S., and Sogin M.L. (1988): The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71: 491–499
- Medlin L.K. (2007): If everything is everywhere, do they share a common gene pool? *Gene* 406: 180-183
- Metzeltin D., Lange-Bertalot H, (1998): Tropical diatoms of South America. I. About 700 predominantly rarely known or new taxa representative of the neotropical flora - *Iconographia. Diatomologica* 5: 1-695
- Metzeltin D., Lange-Bertalot H. (2002): Diatoms from the „island continent” Madagascar - *Iconographia. Diatomologica* 11: 1-286
- Moniz M.B.J., Kaczmarek I. (2009): Barcoding of Diatoms: Nuclear Encoded ITS Revisited. *Protist* 161: 7-34
- Moser G.A. (1999): Die Diatomeen von Neukaledonien. *Systematik, Geobotanik, Ökologie. Ein Fazit – Bibliotheca Diatomologica* 43: 1-205
- Nylander J. A. A. 2004. MrModeltest v2. <http://www.abc.se/~nylander> (last accessed 12 March 2011)
- Potapova M, Charles D.F. (2002): Benthic diatoms in USA rivers: distribution along spatial and environmental gradients, *Journal of Phycology* 29: 167 - 187

- Pouličková A., Špačková J., Kelly M.G., Duchoslav M., Mann D.G. (2008): Ecological variation within *Sellaphora species* complexes (Bacillariophyceae) – specialists or generalists? *Hydrobiologia* 614: 373–386.
- Pouličková A., Veselá J., Neustupa J., Škaloud P. (2010): Pseudocryptic Diversity versus Cosmopolitanism in Diatoms: a Case Study on *Naviculla cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and Morphologically Similar Taxa. *Protist* 161: 353-368
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. (1990): The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera, Cambridge Press, Cambridge
- Rumrich U.; Lange-Bertalot H.; Rumrich M. (2000). Diatomeen der Anden (diatoms of the Andes from Venezuela to Patagonia / Tierra del Fuego). A.R.G. Ganter Verlag K.G.
- Rynearson T.A., Armbrust E.V. (2000): DNA fingerprinting reveals extensive genetic diversity in a field population of the centric diatom *Ditylum brightwelli*. *Limnology and Oceanography* 45:1329-1340
- Sabbe K, Vanhoutte K, Lowe RL et al: (2001): Six new *Actinella* (Bacillariophyta) species from Papua New Guinea, Australia and New Zealand: further evidence for widespread diatom endemism in the Austral-asian region. *European Journal of Phycology* 36:321–340
- Sarno D., Kooistra W.H.C.F., Medlin L.K., Percopo I. and Zingone A. (2005): Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *Journal of Phycology* 41: 151-176
- Sato S., Kooistra W.H.C.F. Watanabe T., Matsumoto S., Medlin L.K.(2008): A new araphid diatom genus *Psammoneis* gen. nov. (Plagiogrammaceae, Bacillariophyta) with three new species based on SSU and LSU rDNA sequence data and morphology. *Phycologia* 47: 510–528
- Seibel P. N., Müller T., Dandekar T., Schultz J. & Wolf M. 2006. 4SALE – a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinformatics* 7:498
- Seibel P. N., Müller T., Dandekar T. & Wolf M. 2008. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. *BMC Res. Notes* 1:91.
- 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
- Souffreau C. Vanormelingen P. Verleyne E. Sabbe K. Vyverman W. (2010): Tolerance of benthic diatoms from temperate aquatic and terrestrial habitats to experimental desiccation and temperature stress. *Phycologia* 49: 309-324.
- Sorhannus U. (2007): A nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNA timescale for diatom evolution. *Marine Micropaleontology* 65: 1-12
- Strimmer K., von Haeseler A.(2003) .Genetic distances and nucleotide substitution models. *The Phylogeny Handbook*: 111-140
- Swofford D. L. 2001. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Škaloud P., Peksa O. (2010): Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54:36–46

- 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
- 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.
- Vanhoutte K, Verleyen E, Vyverman W et al (2004) The freshwater diatom genus *Kobayasiella* (Bacillariophyta) in Tasmania, Australia. *Australian Systematic Botany* 17:483–496
- 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
- Vitousek P.M., D'Antonio C.M., Loope L.L., Rejmánek M., Westbrooks R. (1997): Introduced Species: A Significant Component of Human-Caused Global Change. *New Zealand Journal of Ecology* 21,1-16.
- Vyverman W., Sabbe K., Mann D.G. et al (1998) *Eunophora* gen. nov. (Bacillariophyta) from Tasmania and New Zealand: description and comparison with *Eunotia* and amphoroid diatoms. *Journal of Phycology* 3: 95-111
- Vyverman W., Verleyen E., Sabbe K., Vanhoutte K., Sterken M., Hodgson D.A., Mann D.G., Juggins S., De Vijver B.V., Jones V., Flower R., Roberts D., Chepurnov V.A., Kilroy C., Vnormelingen P., De Wever A.(2007): Historical processes constrain patterns in global diatom diversity. *Ecology* 88:1924-1931
- Vyverman W., Verleyen E., Wilmotte A., Hodgson D.A., Willems A., Peeters K., Van de Vijver B., De Wever A., Leliaert F., Sabbe K. (2010): Evidence for widespread endemism among Antarctic micro-organisms. *Polar Science* 4:103-113
- Wydryzacka U., Lange-Bertalot H. (2001): Las Diatomeas (Bacillariophyceae) acidófilas del río Agrio y sitios vinculados con su cuenca, volcán Poás, Costa Rica. - *Brenesia* 55-56: 1-68
- Wylezich C., Nies G., Mylnikov A.P., Tautz D., Arndt H. (2010): An Evaluation of the Use of the LSU rRNA D1-D5 Domain for DNA-based Taxonomy of Eukaryotic Protists. *Protist* 161: 342-352
- Yang Z. (1993): Maximum likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites. *Molecular Biology and Evolution* 10: 1396-1401
- Zwickl D. J. (2006). Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.