

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



**Bc. Petra Mušálková**

**Stomatocysty chrysofyt – dynamika encystace a excystace – bentická  
odpočívající stádia chrysofyt**

*Chrysophyte stomatocysts – encystation and excystation dynamics – bentic resting stages of  
chrysophytes*

Diplomová práce

Školitelka: doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

Praha, 2021

## **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. 8. 2021

Petra Mušálková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Yvonne Němcové za její trpělivost a podněcování k tomu, klást si v mém výzkumu další a další otázky. Také bych ráda poděkovala Janě Kulichové a Dorce Čertnerové za rady a za jejich nakažlivé nadšení pro vědu a algologii. Mé díky patří i ostatním kolegům a kamarádům na algologickém oddělení za přátelské prostředí. V poslední řadě chci poděkovat Janě Mušálkové, Petru Mušálkovi a Tomáši Malému za velkou podporu během psaní této diplomové práce.

## Abstrakt

Odpočívající rezistentní stádium hraje v životním cyklu fytoplanktonních mikroorganismů několik významných rolí, především při ochraně před nepříznivými podmínkami a při šíření na nové lokality. Zlativky tvoří početné populace pouze krátkou část roku, a proto je pro ně tvorba odpočívajícího stádia důležitá pro obnovení vegetativní populace následující rok. Chrysofytní odpočívající stádia se nazývají stomatocysty, jsou křemičité a mají unikátní druhově specifickou morfologii. Mohou vznikat jak pohlavním, tak nepohlavním rozmnožováním. Jedná se o málo prozkoumanou oblast. Většina popsanych stomatocyst není přiřazená k popsáným druhům a mnoho se neví o spouštěcích encystace a excystace. Usuzuje se, že zde působí kombinace faktorů vnějších (teplota, světlo, živiny) i vnitřních (stáří buněk a jejich koncentrace). Podrobněji zkoumána byla zatím pouze pohlavní encystace u *Dinobryon cyindricum* a *Synura petersenii*. Má diplomová práce je založena na laboratorních experimentech s *Ochromonas tuberculata*, *Synura uvella* a s dvěma kmeny *Synura petersenii*. Zjišťovala jsem, zda mají vnější podmínky, teplota a nedostatek dusíku nebo fosforu, vliv na nepohlavní encystaci a zda je možné pomocí modifikace vnějších podmínek navodit excystaci. Odpověď na stimuly encystace byly kmenově specifické, podpořit encystaci se podařilo pouze u jednoho kmenu *Synura petersenii*. Ke zvýšené produkci cyst došlo v teplotě optimální pro růst vegetativních buněk. Stejný kmen odpověděl zvýšenou produkcí cyst na deficit fosforu. Opakovaně se mi podařilo excystovat zacystovanou kulturu *Synura uvella*. Excystace byla způsobena přenesením cyst ze tmy do světleného režimu 16 : 8 (světlo:tma). Živiny ani teplota na excystaci vliv neměly.

**Klíčová slova:** Stomatocysty, Chrysophyceae, Synurales, encystace, excystace, dormance, nepohlavní encystace, vnější faktory, *Ochromonas tuberculata*, *Synura petersenii*, *Synura uvella*

## **Abstract**

The resting resistant stage has several important roles for phytoplankton microorganisms. It protects them from hostile conditions, allows them to spread to new locations and is often part of their life cycle. Chrysophytes form large populations for only a short part of the year, and therefore the formation of a resting stage is key for them to re-establish a vegetative population the following year. Chrysophyte resting stages are called stomatocysts, which are silicified and have a unique species-specific morphology. They can be formed after both sexual and asexual reproduction. This is an understudied area. Most described stomatocysts are not assigned to species and much is not known about the triggers of encystation and excystation. It is thought that a combination of external (temperature, light, nutrients) and internal (cell age and cell concentration) factors are involved. So far, only sexual encystation in *Dinobryon cylindricum* and *Synura petersenii* has been studied in detail. My diploma thesis is based on laboratory experiments with *Ochromonas tuberculata*, *Synura uvella* and two strains of *Synura petersenii*. The aim of the study was to investigate whether external conditions such as temperature and lack of nitrogen or phosphorus have the effect on asexual encystation and whether it is possible to induce excystation by external conditions manipulation. The response to encystation stimuli was strain-specific, promoting encystation in only one strain of *Synura petersenii*. Increased cyst production occurred at a temperature optimal for vegetative cell growth. The same strain responded with increased cyst production to phosphorus deficiency. I repeatedly succeeded in excysting an encysted culture of *Synura uvella*. The excystation was caused by transferring the cysts from darkness to a 16 : 8 (light:dark) light regime. Nutrients and temperature had no effect on excystation.

**Key words:** Stomatocysts, Chrysophyceae, Synurales, encystation, excystation, dormancy, asexual encystation, external factors, *Ochromonas tuberculata*, *Synura petersenii*, *Synura uvella*

# Obsah

1	Úvod.....	8
1.1	Odpočívající stádia fotosyntetizujících mikroorganismů.....	8
1.2	Charakteristika a klasifikace chrysofyt.....	12
1.3	Ekologie chrysofyt.....	15
1.4	Chrysofytní stomatocysty.....	18
1.5	Životní cyklus chrysofyt.....	21
1.6	Vznik stomatocysty.....	23
1.7	Indukce encystace a excystace a faktory, které je mohou ovlivnit.....	25
1.8	Dosavadní výzkum chrysofytní encystace a excystace, cíle diplomové práce.....	28
2	Materiál a metody.....	30
2.1	Použité kultury a kultivace.....	30
2.2	Mikroskopování a popis cyst.....	31
2.3	Stanovení počtu buněk a cyst.....	34
2.4	Počítání růstové rychlosti a procentní zastoupení cyst.....	34
2.5	Experimenty.....	35
2.5.1	Zjišťování optimální teploty – pilotní experiment.....	36
2.5.2	Encystační experimenty.....	36
2.5.3	Excystační experiment na kultuře <i>Synura uvella</i> .....	38
3	Výsledky.....	40
3.1	Charakteristika chrysofytních kmenů.....	40
3.2	Vliv teploty na produkci cyst.....	50
3.3	Vliv nedostatku dusíku a fosforu na produkci cyst.....	54
3.4	Excystační experiment.....	57
4	Diskuze.....	60
4.1	Popis cyst chrysofytních kmenů a jejich optimální růstová teplota.....	60

4.2	Vliv vnějších podmínek na encystaci .....	61
4.3	Uchování zacystované kultury a navození excystace .....	63
4.4	Úskalí metodiky.....	64
4.5	Výzkum odpočívajících stádií a jejich přínos.....	65
4.6	Výzkum klidových stádií v rámci řasových skupin.....	66
5	Závěr.....	67
6	Seznam literatury.....	68
7	Příloha .....	85

# 1 Úvod

Po celou dobu existence života na Zemi se organismy musely naučit chránit se před nepříznivými podmínkami prostředí, jelikož to je neustále měnící se ve všech nejrůznějších kvalitách. Jednou z možností, kterou organismus má, je únik v prostoru – disperze, dále únik v čase, kam řadíme dormanci a diapauzu. Fakultativně pohlavní organismy mají třetí možnost, a to přepnutí z nepohlavního rozmnožování na pohlavní. Tyto strategie jsou spolu mnohdy propojené a navzájem se korelují (Vitalis et al., 2013; Gerber & Kokko, 2018). To, co je spojuje, je formování odolného stádia a ta lze je najít napříč všemi říšemi. Odolné odpočívající stádium se tedy během evoluce stalo pevnou součástí životních cyklů mnoha organismů.

## 1.1 Odpočívající stádia fotosyntetizujících mikroorganismů

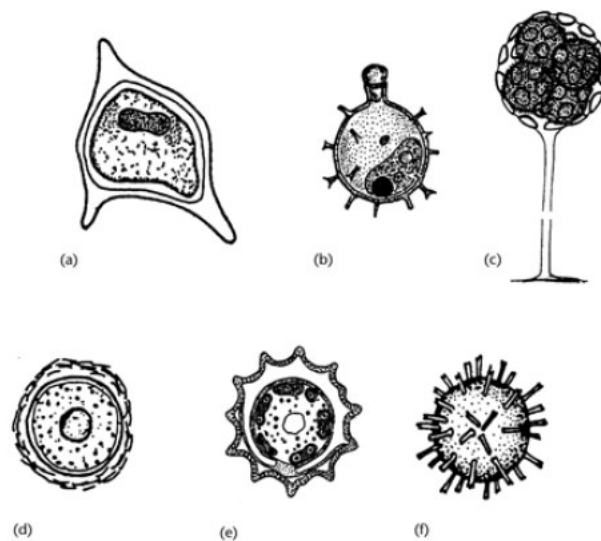
Druhy schopné tvořit odpočívající rezistentní stádia najdeme ve všech superskupinách protist (Cavalier-Smith, 2002) a včetně mikrořas (Fritsch, 1948; Fryxell, 1983). Jedná se především o sladkovodní a půdní řasy, v mořích jsou to pak druhy způsobující vodní květy, tzv. harmful algae blooms (HABs; Sellner et al., 2003). S vysokou pravděpodobností měl tuto schopnost i předek eukaryot, který tak překonával období nedostatku živin (Cavalier-Smith, 1987). Odolná stádia tvoří i prokaryota včetně fotosyntetizujících sinic.

Cysty či spory chrání mikroorganismy v době, kdy se hodnoty podmínek prostředí, jako jsou světlo, teplota, koncentrace živin, pH, salinita či tlak, dostanou mimo hranici tolerance (Davis et al., 1980, Anderson et al., 1985). Některé řasy a sinice tvoří odolná stádia v konečném stádiu vodního květu a při přemnožení populace, kdy hrozí hromadná úmrtí v důsledku patogenní nákazy či nedostatku živin (McQuoid & Hobson, 1995), některé zase proto, aby se vyhnuly predačnímu tlaku (Rengefors et al., 1998), tím že vytvoří cysty v době, kdy je ve vodním sloupci namnožený zooplankton. Mohou být výsledkem pohlavního a nepohlavního rozmnožování. Pokud jsou cysty tvořeny po pohlavním rozmnožování, jsou zdrojem genetické variability a podporují diverzifikaci populace (McQuoid & Hobson, 1995; Rengefors et al., 1998; Rengefors et al., 1996). Po utvoření klesají do sedimentu, kde tvoří „semennou banku“ čili zdroj po obnovení populace, jakmile budou opět vhodné podmínky (Reynolds, 1984). Kromě obnovy populace mohou odolná stádia sloužit i ke geografickému šíření. Díky odolnosti stěny tak mohou být přenášeny větrem (Maguire, 1963), hmyzem (Stewart & Schlichting, 1966), na peří ptáků i v trávicím ústrojí (Tesson et al., 2018), nebo



jsou vlivem člověka transportovány v balastní vodě dopravních lodí (Hallegraeff & Bolch, 1992).

Odpočívající stádium se vyznačuje tvorbou rezistentní stěny, diferenciací cytoplazmy a sníženým metabolismem (Cavalier-Smith, 2002). Existují i specializované cysty, kupříkladu hypnozygoty, zygospory, sporocysty, parthenospory, gametocysty. Cysty jsou nejčastěji kulatého či oválného tvaru, mohou mít ornamentovaný povrch (obr. 1) a jako takové jsou bezbarvé. Barevnost dodává pouze zhuštěný obsah, potom se jeví jako hnědé nebo šedé, u řas zelené díky chloroplastu. Vnější stěna bývá chitinová, křemičitá, vápenitá, celulózni, se slizovým obalem nebo bez něj (Preisig et al., 1994). Během vzniku dochází k absorpci či ztrátě pohybového aparátu. Také dochází k dehydrataci protoplastu, díky čemuž dochází k zastavení metabolických procesů buňky. Ostatní organely včetně jádra zůstávají nebo dojde k jejich zhuštění a dojde rovněž k zastavení transkripce (Gutiérrez et al., 1990; Gutiérrez et al., 1998, Corliss, 2001).



Obr. 1: Cysty protist, a – cysta obrněnky *Ceratium* (SAR) v théce vegetativního stádia, b – křemičitá cysta zlativky *Ochromonas* (SAR), c – cysta helizoidní amoeby *Clathrulina* (SAR), d – cysta heliozoidní amoeby *Actinophrys* (SAR), e – zygospora zelené řasy *Volvox* (Archaeplastida), f – cysta krásivky *Cosmarium* (Archaeplastida);(Croliss, 2001).

Mezi fototrofními protisty se nejintenzivněji zkoumají odpočívající stádia obrněnek, a to z důvodu tvorby četných vodních květů a nebezpečí s nimi spojenými. Vodní květy poškozují ekosystém a způsobují ekonomické ztráty, především v turismu a rybolovu. Vyčerpáním kyslíku masivním vodním květem dochází k udušení ryb a dalších živočichů, či k otravě

toxiny (platí i pro člověka). Toxické rody jsou například *Alexandrium*, *Gonyaulax*, *Gymnodinium catenatum* a *Pyrodinium bahamense*. Vodní květy tvořené obrněnkami se nazývají Red tides, jsou to vodní květy s červeným zbarvením. Tvoří se především v pobřežních zónách, v jezerech a fjordech, v místech s rozsáhlou lidskou činností (Hallegraeff, 1993; Nehring, 1993). Načasování a lokalizace vodního květu přímo souvisí s encystací a excystací, jelikož obrněnky se ve vegetativním stádiu nacházejí pouze krátkou dobu a většinu roku tráví zacystované v sedimentu (Steidinger, 1975; Anderson & Morel, 1979; Anderson et al., 1983). Ovšem otrava hrozí i poté, co zmizí z vodního sloupce. Zjistilo se, že cysty obrněnek obsahují až desetkrát více toxinů než vegetativní stádium (Dale et al., 1978; Oshima et al., 1982). Obrněnky tvoří dva druhy odolných stádií. Odpočívající cystu a dočasnou cystu. Ke konci vodního květu dochází k pohlavnímu rozmnožení, splynutím gamet vzniká planozygota, a ta se následně přemění na odpočívající cystu. Ta v sedimentu prodělává dormanci a neexcystuje ani v případě, že nastanou příznivé podmínky (Anderson, 1980). Po dormanci, která může trvat několik dní až několik měsíců, nastává období klidu neboli sekundární dormance. To zajišťuje, aby obrněnky neexcystovaly v nepříznivých podmínkách (Fischer et al., 2018). Cysty v tomto období excystují v závislosti na teplotě, dostupném kyslíku, živinách a světle (Anderson, 1980; Anderson et al., 1987; Bravo & Anderson, 1994; Rengefors & Anderson, 1998; Kremp & Anderson, 2000). Některé mořské druhy řídí excystaci vnitřně, podle cirkadianálního rytmu (Matrai et al., 2005). Stěna odpočívající cysty má několik vrstev, je ze sporopoleninu a dinosporinu (Nehring, 1993; Matsuoka & Fukuyo, 2000). Cysty jsou kulaté, elipsoidní či polygonální a mohou mít ostny. Druhým typem je dočasná cysta, ta neprodělává dormanci, její tvorba a excystace je reakcí na podmínky v okolí a netvoří se při pohlavním rozmnožování (Olli, 2004). Dočasná cysta je obrněnka s odhozeným bičíkem a přechází do kulatějšího tvaru (Nehring, 1993). Vegetativní buňka se z cysty dostává otvorem (archoepyl). Přibližně 24 % sladkovodních a 15–20 % mořských druhů obrněnek tvoří cysty. Během 70. a 80. let došlo k rozšiřování toxických druhů díky lodní dopravě (Anderson, 1989; Hallegraeff & Bolch, 1991; Hallegraeff, 1993), což je hlavním důvodem intenzivního studia životního cyklu s odpočívajícími stádii obrněnek.

Rozsivky tvoří podobně jako obrněnky také dva typy odolných stádií, odpočívající spory a odpočívající buňky. Odpočívající buňka je morfologií podobná vegetativní buňce, zachovává si frustulu, ovšem má zkondenzovaný protoplast, oválný plastid, a tudíž i sníženou metabolickou aktivitu (Sicko-Goad et al., 1989). Odpočívající spora tvoří silnější frustulu a má kulatější tvar v porovnání s vegetativní buňkou. Na povrchu je hladká bez dalších struktur

nebo si ponechává strukturu vegetativní buňky (Hargraves, 1976; Sicko-Goad et al., 1989; Kaczmarzka, 2013). Odpočívající stádia jsou křemičitá a vznikají mitózou a výsledkem je pak jedna, dvě či čtyři odpočívající spory. Podle průběhu cytokineze lze rozdělit spory na exogenní, endogenní a semiendogenní. Liší se tím, zda opouští mateřskou frustulu, zůstává uvnitř, nebo si ponechá jednu valvu (Syvertsen, 1979). Vzácně vzniká ještě tzv. zimní stádium, které vytvářejí antarktické rozsivky v reakci na dlouhodobý pokles osvitů a teploty. Toto bylo pozorováno u druhu *Eucampia antarctica* (Fryxell & Prasad, 1990) a pravděpodobně u druhu *Rhizosolenia* (Armand & Zielinski, 2001). Předpokládá se, že rozsivky tvoří odpočívající spory při dlouhodobém vymizení z vodního sloupce, zatímco ke krátkodobému úniku využívají odpočívající buňky (Ishizaka et al., 1987), což podporuje i morfologie těchto stádií – odpočívající buňka neprochází tak náročnou přestavbou. Encystace a excystace je jako u výše zmíněných obrněnek závislá na několika abiotických faktorech. Obecně lze tvrdit, že encystace u mořských centrických rozsivek je iniciována nedostatkem dusíku (Hargraves & French, 1975; Garrison, 1981; Pitcher, 1986; Kuwata et al., 1993), u sladkovodních rozsivek bývá spouštěčem pokles osvitů a vysychání (Round et al., 1990), u antarktických rozsivek pak dlouhodobý pokles osvitů (Hoban et al., 1980). Ovšem rozsivky mohou tvořit odolná stádia i za příznivých podmínek (von Bodungen, 1986), pravděpodobně tedy s vnitřní iniciací. Spory uložené v mořském sedimentu se zapojují do koloběhu křemíku. Rozsivkové frustuly i spory jsou významným indikátorem minulých environmentálních podmínek v paleolimnologii.

Další významnější skupinou encystujících fotosyntetizujících protistů je třída Raphidophyceae, a to především sladkovodní zástupce *Gonyostomum semen* a mořští zástupci rodu *Chatonella*, kteří tvoří toxické vodní květy. *Gonyostomum semen* se často vyskytuje v severních a temperátních jezerech. Od 80. let byly v severských zemích pozorovány intenzivní vodní květy, které znemožnily používání jezer k rekreaci, jelikož buňky *Gonyostomum* při kontaktu vypouští sliz, který způsobuje svědění kůže a další alergické reakce (Cronberg et al., 1988; Lepistö et al., 1994). *Gonyostomum* je schopno tvořit cysty pohlavně a nepohlavně, podobně jako je tomu u chrysofyt. Na podzim nastává pohlavní rozmnožování. Po splynutí gamet vzniklá zygota encystuje a nastává dormance. Tato pohlavně vzniklá cysta se zakulacuje a má dvojistou stěnu a hnědočervenou skvrnu. Excystuje obvykle jedna buňka, výjimečně dvě. Nepohlavní cysty byly v kultuře vyvolány stresovými podmínkami, tmou a nedostatkem dusíku a fosforu. Mají kulatý tvar a na rozdíl od pohlavně vzniklých cyst nemají dvojistou

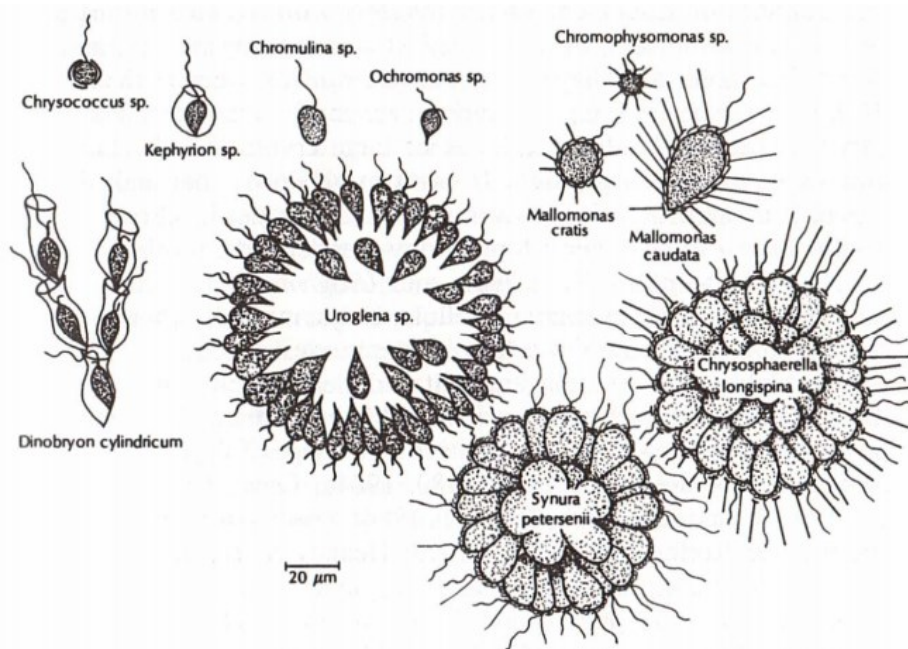
stěnu a červenou skvrnu. Excystuje jakmile se podmínky opět zlepší. Po excystaci nezanechává prázdnou stěnu (Cronberg, 2005; Figueroa & Rengefors, 2006).

Fotosyntetizující prokaryotickou skupinou, která je intenzivně zkoumána z hlediska produkce vodních květů a toxinů, jsou sinice. Za poslední desítky let se díky oteplování, eutrofizaci a lodní dopravě zvýšil výskyt sinicových vodních květů (Kahru et al., 1994, Sellner et al., 2003). Odolné stádium sinic se nazývá akineta. Akinety jsou větší a mají tlustší stěnu než vegetativní buňky a mají navíc extracelulární obal. Obsahují hodně zásobních látek, mají vyšší hustotu než voda a klesají na dno. Květy tvořící rody, které mají schopnost specializace buněk na akinety, jsou *Nodularia*, *Dolichospermum* a *Aphanizomenon* (Komarek & Anagnostidis, 1989). Přeměna na akinetu probíhá velmi rychle v reakci na fyziologický stres, konkrétní faktory jsou druhově specifické (Moore et al., 2003; Sarma et al., 2004), frekvence tvorby se zvyšuje tím, jak vodní květ stárne (Myers et al., 2011). Studie ukázala, že akinety potřebují určitý čas k maturaci (Karrlson, 1999). Pravděpodobně potřebují dosáhnout určité míry vnitřní energie nebo živin. Poté se vyklíčení odehrává opět za příznivé teploty, dostatku živin (Kaplan-Levy et al., 2010). V laboratorních podmínkách klíčí po 24 hodinách za dostatku fosforu za nízké i vysoké intenzity světla, nikoliv však za tmy (Huber, 1985; van Dok & Hart, 1997).

## 1.2 Charakteristika a klasifikace chrysofyt

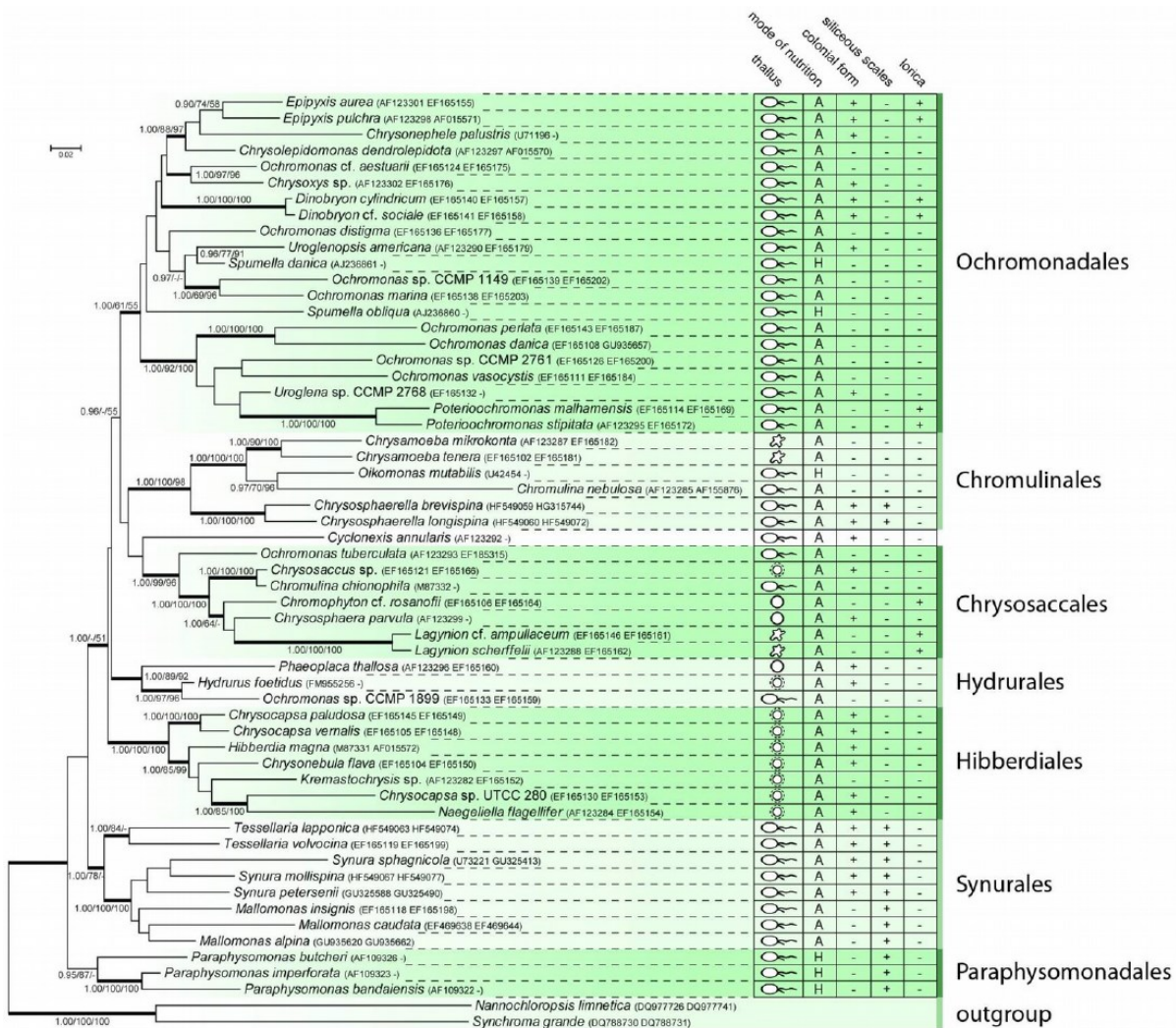
Ačkoliv první zlativky pozoroval již Otto Friedrich Müller během svého života (1730–1784), třída Chrysophyceae byla náležitě popsána a charakterizována Davidem Hibberdem (1976) s využitím elektronové mikroskopie. Dnes se řadí do skupiny Stramenopiles (Patterson 1989) patřící do superskupiny SAR (Burki et al., 2007; Adl et al., 2012). Jedná se převážně o sladkovodní bičíkovce, ale nalezneme zde i amoeboidní, palmeloidní a kokální formu. Žijí samostatně nebo v kolonii. Buňky zástupců jsou holé či chráněné křemičitými šupinami nebo chitinózní lorikou či stěnou vázovitého, šroubovitého či oválného tvaru, nebo lorikou složenou z překrývajících se šupin (obr. 2) (Kristiansen, 1972; Franke & Herth, 1973; Sandgren, 1988). Charakteristické znaky jsou dva heterokontní bičíky, jeden hladký, jeden pokrytý tripartitními mastigonematy. Mají plastid vzniklý seriální endosymbiózou, který obsahuje chlorofyl *a* a *c* (Andersen and Mulkey, 1983) a u některých i stigma. Zlatohnědou barvu fotosyntetizujícím zlativkám dává fukoxantin, který tvoří 93 % karotenoidů (Withers et

al., 1981) a 75 % z celkového obsahu pigmentů v buňce (Wynne & Bold, 1985). Patří sem i heterotrofní bezbarvé druhy. Zásobní látkou ve vakuole je chrysolaminaran.



Obr. 2: Morfologická diverzita chrysofyt (Sandgren, 1988).

Na základě několika biochemických a morfologických odlišností byla v minulosti z třídy Chrysophyceae vyčleněna třída Synurophyceae (Andersen, 1987). Hlavní argumenty jsou absence chlorofylu  $c_2$ , jelikož Chrysophyceae mají  $c_1$  i  $c_2$  (Andersen and Mulkey, 1983), paralelní uspořádání bazálních tělísek bičíku ve srovnání s bazálními tělísky, která svírají úhel  $90^\circ$  u Chrysophyceae (Andersen, 1991), absence stigmatu a přítomnost křemičitých šupin (Andersen & Preisig, 2002; Preisig & Andersen, 2002). V dnešní době je třída Synurophyceae považována za nedílnou součást Chrysophyceae, což podporují fylogenetická data (Cavalier-Smith & Chao, 2006; Takishita et al., 2009; Del Campo & Massana, 2011; Scoble Cavalier-Smith, 2014). Usuzuje se, že ke ztrátě chlorofylu  $c_2$  a zjednodušení bičíkového aparátu došlo sekundárně. Aktuální fylogenetický strom založený na Bayesovské analýze SSU rDNA + rbcL sekvencí s charakteristikami jednotlivých řádů uvádím na obrázku 3 (Kristiansen & Škaloud, 2017).



Obr. 3: Fylogenetický strom třídy Chrysophyceae. (Převzato z Kristiansen & Škaloud, 2017)

Zlativky produkují křemičité struktury – stomatocysty, a kromě toho zástupci řádů Synurales a Paraphysomonadales ještě šupiny (Cavalier-Smith & Chao, 2006). Jemná struktura šupin, případně štětiny slouží jako determinační znak. Všechny křemičité struktury vznikají endogenně v silikodepozitních váčcích (SDV). Šupiny jsou poté transportovány k povrchu buňky, uvolňují se splýváním SDV s plazmatickou membránou a tvoří na povrchu schránku. Tyto křemičité mikrofosilie se dobře uchovávají v sedimentu, odolávají vysychání a slouží jako indikátor krátkých i dlouhodobých změn prostředí v paleoekologii a paleolimnologii (Adam & Mahood, 1981; Carney & Sandgren, 1983; Smol, 1988, 1995).

Zástupci třídy Chrysophyceae lze charakterizovat různými způsoby výživy. Nalezneme zde jak autotrofy (*Synura*), tak heterotrofy (*Paraphysomonas*, *Spumella*). Velká část zástupců je

schopna mixotrofie, tedy přepínáním mezi způsoby výživy podle podmínek (podle teploty, intenzity světla a dostupnosti rozpuštěného organického uhlíku). Významnými mixotrofními rody jsou *Dinobryon*, *Chrysamoeba*, *Ochromonas* a *Uroglena* (Bird & Kalff, 1987; Sanders & Porter, 1988; Sandgren, 1988; Olrik, 1998; Holen, 2010)

Lokalitu s bohatým výskytem chrysofyt lze rozeznat podle zápachu, který byl popsán jako rybina či zápach oleje z tresčích jater, nebo také okurkový a melounový odér. Zapáchající vodní květy tvoří rody *Dinobryon*, *Synura* a *Uroglena* (Lackey, 1950; Taft, 1965) a je způsoben vylučováním ketonů a aldehydů (Collins, 1972).

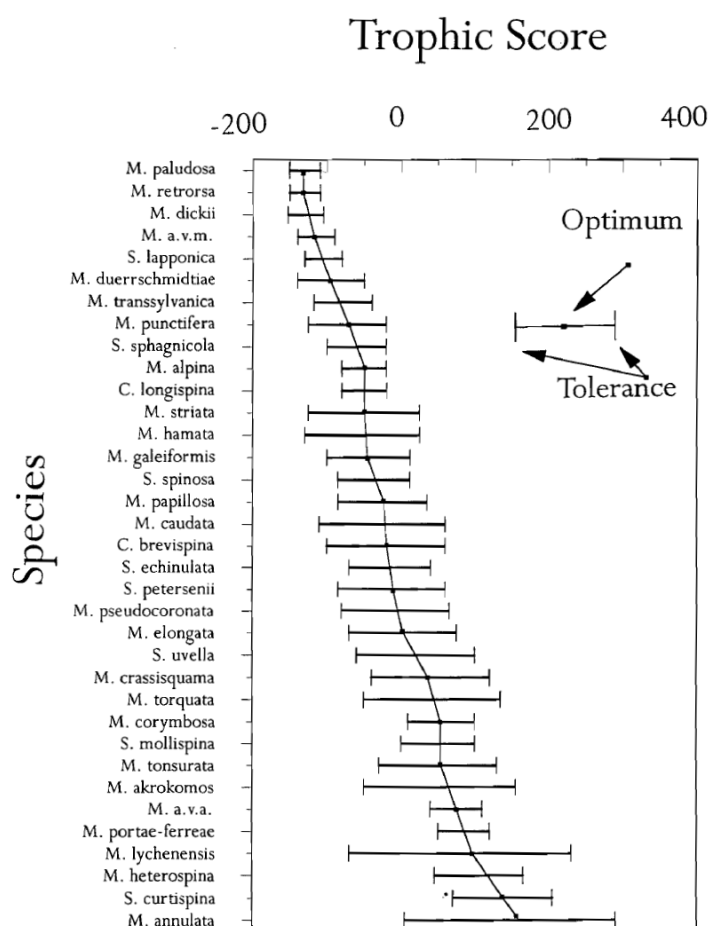
### 1.3 Ekologie chrysofyt

Výzkum šupinatých chrysofyt pomocí TEM začal v rozvinutých zemích Evropy, Severní Ameriky a v Japonsku, odtud tedy pocházejí první záznamy jejich výskytu. Následně byly prozkoumávány další oblasti (obr. 4) a bylo zmapováno rozšíření druhů v některých tropických (Cronberg, 1989) a arktických oblastech (Kristiansen, 2000). Ve větších abundancích se vyskytují v oligotrofních jezerech (Sandgren, 1988).

1950	Northern and Western Europe
1960	Japan, Southeastern Europe and Alaska
1970	North America, Russia and Africa
1980	Tropics and Southern Hemisphere
1990	Central Asia, Far East and Arctic Regions

Obr. 4: Historie výzkumu šupinatých chrysofyt v TEM (Kristiansen, 2000).

Nejčastěji je nalezneme v menších, stojatých sladkovodních tělesech. Druhy rodu *Paraphysomonas* se vyskytují v mořích i ve sladkých vodách, pro rod *Hydrurus* je typickou lokalitou horský potok a studené prameny řek, v nižších polohách tvoří jen krátkodobé populace při tání ledu (Cronberg & Kristiansen, 1980; Kristiansen, 1981; Eloranta, 1989; Klaveness, 2019). Dominují v jezerech s nízkou až střední úživností, nízkou alkalinitou a nízkou konduktivitou, v nízkých až středních hodnotách rozpuštěných huminových látek (Cronberg & Kristiansen, 1980; Sandgren, 1988; Siver & Hamer, 1989; Siver, 1995). Výjimkou jsou nedávno popsané malomonády v moři, *M. cuspis* a *M. marina* (Jeong et al., 2019). Křemičité struktury chrysofyt se využívají v paleoekologii jako indikátor trofického statutu vod, protože se tyto organismy vyskytují v širokém gradientu živin (obr. 5) (Kristiansen, 1986; Siver, 1995).



Obr. 5: Optimum a tolerance 35 taxonů šupinatých chrysomonád vůči trofickým podmínkám. Hodnoty trofického skóre korelují s kategorií vodního tělesa (-204 až -112 oligotrofní, 108 až 293 eutrofní). *Mallomonas* – M., *Synura* – S., *Chrysophaerella* – C. (Siver & Marsicano, 1996).

V temperátních oblastech je hojný výskyt chrysofyt ve vodním sloupci typicky zjara a na podzim, zbytek roku přečkávají v sedimentu ve formě stomatocyst (Sandgren, 1983). Zlativkové populace byly ovšem v přírodě pozorovány na jaře (Kristiansen, 1975, 1988; Siver & Chock, 1986), v létě (Eloranta, 1986), na podzim (Siver & Hamer, 1989; Siver, 1995), i v zimě (Durr Schmidt, 1980; Siver & Hamer, 1989; Siver, 1995). Celoroční výskyt pozoroval Kristiansen (1986) a Siver (1991). Populační studie Agbeti & Smol (1995) uvádí tři skupiny chrysofyt podle toho, kdy v sezóně tvoří hojnou vegetativní populaci. Taxony, které se vyskytovaly pod ledem a zjara (*Dinobryon* spp. a *Synura spinosa*), taxony preferující spíš teplou vodu, mající maximum na konci léta (*Uroglena americana* a *Ochromonas* spp.), a v poslední řadě taxon, který se vyskytuje v malém počtu po celý rok (*Mallomonas* spp.). Sandgren (1988) stanovil tři faktory udávající vzor střídání planktonních chrysofyt. Je to trofický status jezera, roční cyklus míchání vody v jezeře a morfologie spolu s velikostí zlativkového taxonu. Nanoplanktonní chrysomonády se vyskytují v jezerech celoročně a jsou



regulovány v obdobích se zvýšeným herbivorním tlakem zooplanktonu v eutrofních jezerech. Význam velkých či koloniálních zlativek ve společenství fytoplanktonu klesá se vzrůstající trofíí jezer. V dimiktických jezerech jsou velké zlativky přítomné ve vodním sloupci během míchání, ale dominantní jsou pouze na začátku nebo na konci stratifikace. V monomiktických jezerech mohou vytvořit vodní květy kdykoliv během sezóny nezávisle na míchání, zde je jejich výskyt regulován herbivorním tlakem. Míchání má význam pro sezónní výskyt chrysofyt pouze, pokud je korelován s herbivorním tlakem zooplanktonu a kompeticí s dalšími dominujícími řasami (Sandgren, 1988). Ostatní faktory, jako je průměrná sezónní teplota, pH, chemismus a barva vody mají vliv spíše na geografický výskyt druhů (Kristiansen, 1986, Sandgren, 1988). Ovšem v nedávné době bylo zjištěno, že na geografické rozšíření sladkovodních mikroorganismů má značný vliv klima. Na větší geografické škále převládá vliv klimatu nad vlivem lokálních environmentálních parametrů. V geografickém rozšíření mikroorganismů lze pozorovat kontinentální i regionální vzorec výskytu (Leira & Sabater, 2005; Martiny et al., 2006; Astorga et al., 2012; Pajunen et al., 2016), částečný vliv má i historický vývoj (ledovcové pokrytí);(Boenigk et al., 2018).

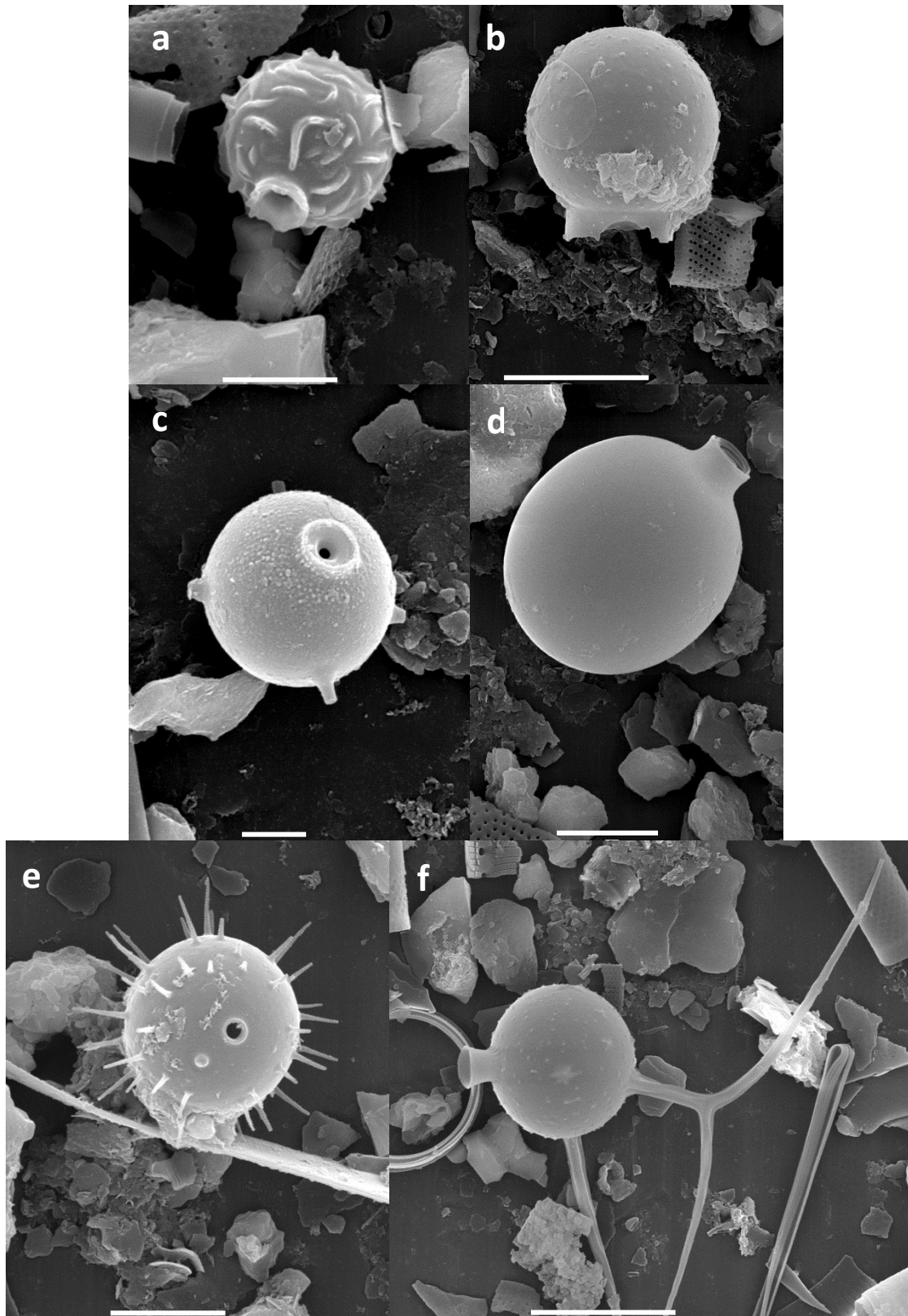
Obecně se usuzuje, že chrysofyta preferují nízké teploty a nízkou intenzitu osvětlení. Teplotní tolerance zlativek je široká, druhově i kmenově specifická (Seaburg & Parker, 1983). Optimální růst vykazují ve 20 °C, podobně jako většina planktonních řas s výjimkou sinic a vysokou teplotu tolerujících zelených řas (Goldman & Carpenter, 1974; Cloern, 1977; Mechling & Kilham, 1982). Sandgren (1988) zkoumal korelace teploty a růstu u několika kmenů *Dinobryon*, u dvou kmenů *Synura petersenii*, *Mallomonas caudata* a *M. cratis*. V teplotách od 10 do 20 °C růst s teplotou vykazoval lineární vztah. V 5 °C nerostly žádné kmeny. To je ovšem v rozporu s pozorováním populací zlativek pod ledem. Pravděpodobně v tom hraje roli světlo. S vyšší intenzitou osvětlení mohou pravděpodobně tolerovat i nižší teploty (Healey, 1983). Některé kmeny vykazovaly stres při růstu v teplotě nad 20 °C. Data z chrysofytních databází ukazují významnost chrysofyt v jezerech s průměrnou roční teplotou vody mezi 10 a 20 °C, ve vyšších teplotách jejich počty klesají. Sandgren (1986) pozoroval růst *Dinobryon cylindricum* v laboratorních a přírodních podmínkách. V přírodě zaznamenal vyšší růst v nízkých teplotách a zpomalený růst v teplotách nad 12 °C. Ovšem v laboratorních podmínkách vykazoval maximální růst v 15 °C při konstantním světle. Na základě tohoto pozorování usuzuje, že teplota ovlivňuje dynamiku populace chrysofyt pouze společně s intenzitou osvětlení nebo s přítomností zooplanktonu (Sandgren, 1986). Tolerance nízkého

osvětlení se nijak neliší od jiných řas (Healey, 1983; Sandgren, 1988). Spodní hranice růstu v laboratoři pro druhy rodu *Dinobryon* je při osvětlení  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Wirth et al., 2019).

Zlativky mají různou toleranci k pH. Obecně zlativky preferují vody s mírně kyselým a neutrálním pH (Sandgren, 1988; Siver & Hamer, 1989; Siver, 1995). PH má vliv na dostupnost živin a rozpuštěného anorganického uhlíku ve formě dostupné pro řasy (Moss, 1973) a také kontroluje toxicitu kovů (Peterson et al., 1984). Rozpětí pH, ve kterém byl zaznamenán výskyt zlativek, je 4,5–8,5 (Moss, 1973; Kristiansen, 1975; Smol et al., 1984; Reynolds, 1986). Ve vyšším pH se nevyskytují, i v případě, kdy v eutrofním jezeře stoupne během léta pH nad 8,5. Nedokáží totiž využít hydrogenuhličitán jako zdroj anorganického uhlíku a jsou odkázány na příjem rozpuštěného  $\text{CO}_2$  difuzí. Formy anorganického uhlíku jsou závislé právě na pH (Saxby-Rouen et al., 1998; Bhatti & Colman, 2008). Naopak ve velmi nízkém pH mohou být některé živiny v nedostupné formě a zvyšuje se toxicita kovů (Peterson et al., 1984). S tím souvisí limitace živinami, jakožto jeden z faktorů regulující populační dynamiku fytoplanktonu. Chrysofyta jsou více limitovaná fosforem než dusíkem, v tomto se opět neliší od ostatních řas (Schindler, 1977). Upřednostňují vysoký poměr N : P (Reynolds, 1984), cca 30–60 molárního poměru. V případě, že je fosforu v prostředí nedostatek, dokáží chrysofyta s fosforem dobře hospodařit a pokračovat v růstu, při přebytku ho vylučují. Jejich růst lze podpořit přidáním fosforu, ovšem jen krátkodobě. Při dlouhodobé vyšší koncentraci fosforu se jejich růst zpomaluje. Hlavní faktory, které ovlivňují dynamiku chrysofytních populací, jsou pravděpodobně pH, koncentrace rozpuštěného  $\text{CO}_2$  a přítomnost zooplanktonu (Sandgren, 1988).

#### 1.4 Chrysofytní stomatocysty

Odpočívající stádium zlativek se nazývá stomatocysta, občas se lze také v literatuře setkat s názvem statorospora. Jedná se kulatou či oválnou, bezbarvou křemičitou cystu s jedním otvorem – pórem. Povrch stomatocyst může být hladký či ornamentovaný mnoha různými prvky, pravidelně či nepravidelně. Ornamentace může vypadat jako rýhy, prohlubně, sítě, ostny, bradavice. Okolí póru se může zdvihát do límečku různých tvarů (obr. 6) (Cronberg, 1980; Sandgren & Carney, 1983). Ornamentace, pozice a tvar límečku jsou druhově specifické (Hibberd, 1977; Cronberg, 1980). Stomatocysta je velmi flexibilní odolné



Obr. 6: Stomatocysty chrysofyt z přírodního vzorku z Liberecka, neidentifikované; a, d, e – měřítko 5 $\mu$ m; b, f – měřítko 10  $\mu$ m; c – měřítko 2  $\mu$ m (vlastní fotografie ze skenovacího el. mikroskopu).

stádium a má několik rozmnožovacích funkcí. Slouží jako zygospóra a vzniká po splynutí dvou gamet nebo autogamií, v takovém případě obsahuje cista dvě jádra, která splývají a následně se meioticky dělí až po excystaci (Sandgren & Flanagin, 1986). Také slouží jako nepohlavně se rozmnožující propagule a vzniklá cista má pouze jedno jádro. Doposud se neví, jestli všechny druhy umí vytvořit cysty všemi způsoby. Velkou roli zde hraje jak druhová variabilita v zahájení procesu encystace, tak environmentální podmínky (Sandgren, 1981). Minimálně u *Dinobryon cylindricum* byly pozorovány jednojaderné i dvoujaderné stomatocysty (Sandgren, 1980, 1981). Morfologie pohlavně i nepohlavně vzniklých cyst je stejná. Skuja (1950) zaznamenal, že pohlavně vzniklé cysty *Dinobryon borgei* jsou větší než cysty vzniklé nepohlavně. Průměr cyst se pohybuje mezi 2,5 až 35  $\mu\text{m}$  (Adam & Mahood, 1981; Sandgren, 1991; Preisig, 1994). Stomatocysty obsahují mnoho zásobních látek ve formě uhlohydrátů a lipidů (Hibberd, 1976; Sandgren, 1980). Podobně jako akinety a hypnosporý odolávají stomatocysty vyschnutí a dokáží být životaschopné i několik desítek let (Fritsch, 1935).

Stomatocystu poprvé popsal Ehrenberg v roce 1854 a její tvorba byla poprvé popsána Cienkowskim u druhu *Chromulina nebulosa* v roce 1870 (Cienkowski, 1870). Větší pozornosti se stomatocystám dostalo až mezi lety 1930 a 1950. Díky skenovací elektronové mikroskopii a Nomarského optice mohou být cysty detailně zkoumány a použity jako ekologické indikátory pro moderní i paleoekologické studie. Rozmnožování chrysofyt bylo intenzivně zkoumáno v 80. a 90. letech minulého století (Sandgren, 1981, 1983, 1986; Cronberg, 1986; Sandgren & Flanagin, 1986; Sandgren, 1988, 1991).

Jen část cyst lze jednoznačně definovat na základě morfologie (především ornamentace povrchu a tvar límečku). Většina druhů chrysofyt má cysty hladké bez dalších znaků, a je obtížné je od sebe rozlišit. Dokonce i vzdálené druhy mohou mít velmi podobnou či dokonce stejnou cystu, a naopak v rámci jednoho rodu lze najít velmi odlišné stomatocysty. Vzhled zralých cyst je dán geneticky (Sandgren, 1983; Cronberg, 1986; Findenig et al., 2010). Ovšem v přírodních vzorcích se nacházejí i cysty v různých stádiích vzniku, zároveň je ve směsném vzorku více druhů chrysofyt. Jen velmi vzácně lze v přírodě zachytit encystující nebo excystující buňku. Proto bylo doposud přiřazeno ke konkrétnímu druhu pouze 5 % popsáných stomatocyst (Smol, 1988). Z těchto důvodů byl skupinou Interantional Statospore Working Group vytvořen umělý systém klasifikace stomatocyst. Stomatocysty jsou v něm rozděleny podle očíslovaných morfotypů – kategorií se stejnými morfologickými parametry (Cronberg

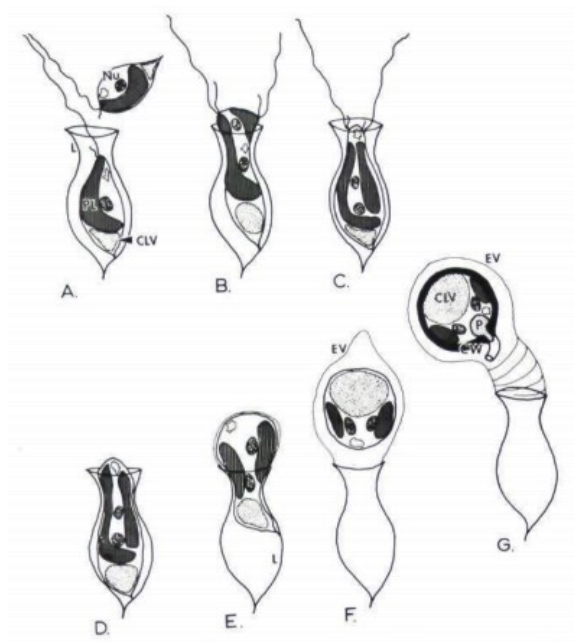
& Sandgren, 1986). Na základě tohoto doporučení bylo popsáno přibližně 600 stomatocyst (Preisig, 1994; Duff et al., 1995; Wilkinson et al., 2002).

Stomatocysty jsou vhodným indikátorem ekologických podmínek hned z několika důvodů. Jejich počet a relativní frekvence v čase se mění. Stomatocysty tvoří všechny druhy zlativek, zatímco šupiny tvoří pouze cca 20 % druhů. Konkrétní typy stomatocyst lze najít pouze ve specifických habitatech, jako jsou horská jezera, podmáčené louky, efemérní tůňky či na rašeliništi (Adam & Mahood, 1981). Díky sezónnímu výskytu zlativek se cysty ukládají v sedimentu ve vrstvách a ve velkém počtu, a lze tak dobře oddělit jednotlivá období, na rozdíl od šupin, které se usazují průběžně v malých množstvích. Spolu se schránkami rozsivek se stomatocysty používají jako indikátory trofického statutu jezer (Smol, 1985), vysoký poměr abundance frustul ku stomatocystám značí období, kdy byla voda obohacena živinami (Smol, 1985). Stomatocyst a frustuly rozsivek se používají také k odhadu acidity vody (Battarbee, 1984). Zde jsou výhodné stomatocysty. Některá chrysofyta se vyskytují v nižším pH, než je 5,5, což je spodní hranice výskytu rozsivek (Charles, 1982). Pro pozorování ve světelném i skenovacím elektronovém mikroskopu se vzorky se stomatocystami zbavují organického obsahu. Lze na ně použít stejné preparační metody jako na rozsivky (Adam & Mahood, 1979). Kvantitu i kvalitu stomatocyst lze využít jako nástroj pro sledování klimatických změn, jejichž projevy jsou studovány v polárních oblastech. Počet a druhy stomatocyst slouží jako měřítko ledového pokryvu jezer. Sněhová a ledová pokrývka mění fyzikální vlastnosti jezer, především míru a kvalitu světla dostupného pro fytoplankton (Smol, 1988). Většina těchto studií zaměřených na rekonstrukci klimatu (Smol & Cumming, 2000; Betts-Piper et al., 2004; Kamenik & Schmidt, 2005) zkoumala stomatocysty z holocénních sedimentů, ale stomatocysty jsou známé už z křídy (Tappan, 1980).

### 1.5 Životní cyklus chrysofyt

Životní cyklus včetně encystace se podrobně zkoumal pouze u dvou druhů, *Dinobryon cylindricum* (Sandgren, 1981, 1983, 1986, 1988, 1991) a *Synura petersenii* (Sandgren & Flanagan, 1986). Vegetativní buňky jsou haploidní. Množí se mitoticky a u některých druhů je známé pohlavní rozmnožování (Sandgren, 1981, 1988). Při pohlavním rozmnožování splývají dvě kompatibilní vegetativní buňky. Slouží jako samčí a samičí gamety a používá se pro ně označení „+“ a „-“ a morfologicky se neliší. Takové pohlavní rozmnožování je označováno jako izogamie. Samičí buňka vypouští průběžně do okolí gametogenní hormon erogen

(Sandgren, 1981). Samčí buňka je volně pohyblivá, uvolní se z kolonie, případně vylézá z loriky, a putuje k samičí gametě. Splývají a vzniká dvoujaderná, čtyřbičíkatá planozygota, která encystuje (Sandgren, 1981). Výsledkem je diploidní cista, která je označována také jako hypnozygota (Sandgren & Flanagin, 1986; Sandgren, 1991). Na obrázku 7 je popsán průběh pohlavního rozmnožování druhu *Dinobryon cylindricum* (Sandgren, 1981). Chrysofyta jsou schopna také autogamie, kdy vzniká dvoujaderná stomatocysta v rámci klonální populace (Sheath et al., 1975; Sandgren & Flanagin, 1986).



Obr. 7: Proces pohlavního rozmnožování *Dinobryon cylindricum*. A – setkání samčí a samičí gamety, B – plazmogamie, C – dvoujaderná planozygota, D – ztráta bičíků, započnutí encystace, E – přesouvání planozygoty ven z loriky a sekrece váčku, ve kterém vzniká cista, F – vznikající cista, ukládání zásobních látek do vakuoly, G – maturovaná cista se zapečetěným pórem (Sandgren, 1981).

Bylo pozorováno, že v kolonii *Dinobryon divergens* ne všechny buňky tvoří stomatocysty a lze najít různá vývojová stádia cyst. Přestože jsou buňky v keříčkovité kolonii *Dinobryon* diferenciovány, na bázi jsou vždy nejstarší buňky, stomatocysty jsou produkovány náhodně jakoukoliv buňkou v kolonii. Nelze tedy definovat směr, jakým by v kolonii docházelo k encystaci (Sheath et al., 1975). U druhu *Synura petersenii* vytvořená cista zůstane přichycená ke kolonii, jejíž součástí byla samičí buňka, nebo je soliterní. Byly pozorovány kolonie až s osmi cystami, tudíž jako samičí gameta může sloužit více buněk v kolonii (Sandgren & Flanagin, 1986).

Unikátní fenomén v životním cyklu byl zaznamenán u druhů *Spumella*, kde hraje během encystace velkou roli kanibalismus, což nebylo pozorováno u žádné jiné zlativky či jiné fagotrofní řasy. Vegetativní buňka fagotrofuje ostatní vegetativní buňky a vytvoří cystu jako konečné stádium v životním cyklu. Kanibalismus se zdá být esenciální pro encystaci. U

*Spumella* nebylo pozorováno pohlavní rozmnožování, cysta má vždy jedno jádro. Po excystaci vegetativní buňka podstoupí 15 až 16 buněčných dělení než opět zacystuje (Yubuki et al., 2008).

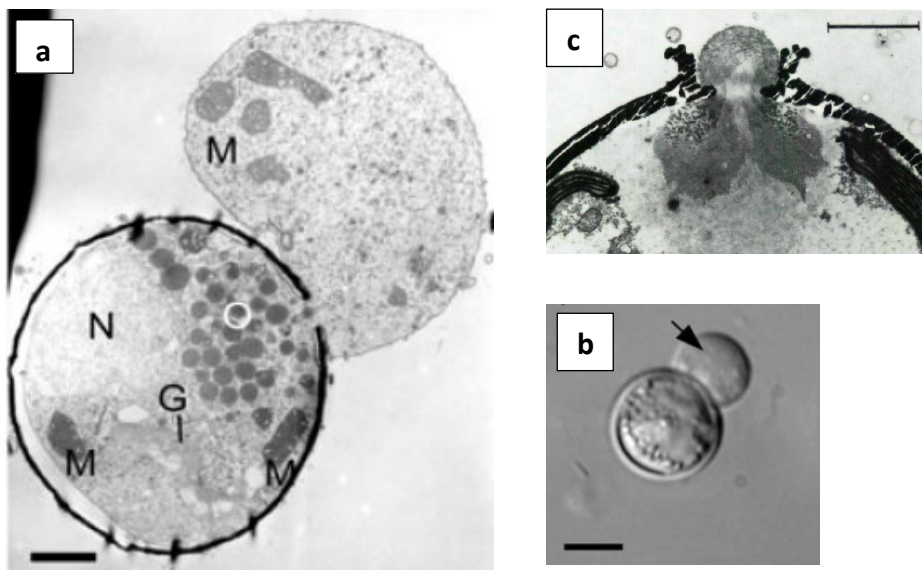
Doba nutná pro vytvoření cysty se u chrysofyt pohybuje od několika minut po půlku dne. Průměrně 6–8 hodin je potřeba na vytvoření plně morfologicky vyvinuté cysty (Sandgren & Flanagin, 1986; Sandgren, 1988). Po encystaci prodělává buňka dormanci následovanou excystací. Při excystaci vzniká jedna, dvě nebo čtyři iniciační vegetativní buňky v závislosti na tom, o jaký druh se jedná (Sandgren, 1988). Conrad (1926) pozoroval u *Chromulina pascheri* všechny varianty. *Dinobryon divergens* vytváří klíčící komůrku, do které přeleze protoplast z cysty a rozdělí se na čtyři dceřiné buňky (Sheath et al., 1975). Excystace samostatné buňky byla pozorována u *Chromulina freiburgensis* (Doflein, 1923).

Pohlavní a nepohlavní encystace má odlišný vliv na populační dynamiku, jelikož při pohlavní rozmnožování se od vegetativní populace odeberou dvě potenciálně dál dělicí se buňky, zatímco při nepohlavní encystaci populace ztratí pouze jednu (Sandgren, 1988).

## 1.6 Vznik stomatocysty

Strukturální změny, kterými buňka při encystaci prochází, a způsob, jakým ukládá křemík, nám detailně odhalila až elektronová mikroskopie. Na začátku se buňka zakulatí, ztratí bičík a ustane v pohybu. Pokud se buňka nachází v lorice, posune se k jejímu ústí (Sheath et al., 1975). V časném stádiu tvorby cysty je velmi aktivní Golgiho aparát. Odškrube se z něj množství váčků, které se sloučí a vytvoří velký SDV váček (SDV = silica deposition vesicle). V tomto váčku dochází k ukládání křemíku a k formování cysty a je analogický k SDV váčku, který mají rozsivky (Reimann, 1964; Crawford & Schmid, 1986). SDV váček je zprvu plochý, poté se začne rozšiřovat od posteriorní k anteriorní části buňky a obklopuje tak cytoplazmu s organelami. Postupně se rozšíří a pod povrchem buňky vytvoří prostor uzavřený dvěma membránami, mezi kterými se začne ukládat křemík. Nejdříve se vytvoří tenká, hladká primární stěna cysty, která je přerušena pouze pórem. Tento proces je rychlý, může trvat 15 až 60 minut. Pór může být vytvořen i později tím, že se rozpustí primární stěna a vznikne kruhový otvor. Druhá fáze silifikace představuje tloustnutí primární stěny a vznik ornamentace a límečku. Ostny nebo jiný typ ornamentace vznikají po tom, co je zformována celá cysta, avšak ještě před tím, než dosáhne své konečné tloušťky. Tato fáze je již pomalejší, trvá 12–24 hodin. Lze tedy říci, že celý proces vzniku cysty zabere přibližně 24 hodin.

Cytoplazma, která zůstala vně cysty, obsahuje mitochondrie, ribozomy, diskobolocyty, váčky a kontraktilní vakuoly. Po dobu encystace jsou stále aktivní. Všechny ostatní orgány zůstávají uvnitř cysty. Cytoplasmu uvnitř cysty obklopuje vnitřní silicalemma (membrána SDV váčku), která bude po excystaci plnit funkci cytoplazmatické membrány buňky. Vnější a vnitřní cytoplazma je během formování cysty v kontaktu v místě póru do doby, než se vytvoří polysacharidová zátka (obr. 8). Množství materiálu, které tvoří zátku se různí, základem je pektin a různé množství křemíku. Jakmile se přeruší kontakt, vnější cytoplazma je odvržena. Světločivná skvrna, bazální tělíska a rhizoplast zaniká (Doflein, 1923; Bourrelly, 1963; Sheath et al., 1975; Hibberd, 1977; Sandgren, 1983, 1989).



Obr. 8: A – Procesu encystace *Spumella*, snímek z TEM měřítko 1  $\mu\text{m}$  (Yubuki et al. 2008), b – encystace *Spumella*, snímek ze světelného mikroskopu, měřítko 10  $\mu\text{m}$  (Yubuki et al. 2008), c – TEM snímek póru se zátkou cysty *Ochromonas tuberculata*, měřítko 1  $\mu\text{m}$  (Hibberd, 1977).

Sandgren (1989) studoval způsob ukládání křemíku u osmi chrysofytních druhů. Na základě svého pozorování rozlišil tři modely silifikace v první fázi tvorby cysty: nepravidelnou granulaci, lineární mikrokrytalitaci a jemnozrnné přirůstání bez zjevné krystalizace. Třetí způsob silifikace uvádí jako nejčastější. V první fázi tvorby cysty rozlišil růst stěny jako prstovité přirůstání nebo vytváření nepravidelných plochých úseku. V druhé fázi tvorby cysty pozoroval tloušťnutí stěny přibýváním rozpuštěného křemíku z vody nebo média kolem buňky. Ostny a límečky vznikly spojením několika krystalů křemíku nebo progresivním jemnozrnným přirůstáním. Pozoroval ostny jak duté tak plné.



Cysty jsou zpravidla větší než buňky (Findenig et al., 2010), během formování stomatocysty dochází k zvětšení cytoplazmy. Stomatocysty vzniklé pohlavním procesem jsou větší než cysty vzniklé nepohlavně. Pokud je povrch chrysofytní řasy hladký, vstřebá se periplast kompletně, pokud obsahuje šupiny, tak jimi a periplastem zůstává cysta po nějakou dobu obalená. Stupeň ornamentace je ovlivněn podmínkami prostředí, které na buňku během encystace působí, což ztěžuje determinaci stomatocysty. Sandgren (1983) zkoumal, jaké parametry cysty jsou ovlivněny vnějšími vlivy u druhu *Dinobryon cylindricum*. Hustota a morfologie ostnů, které plně vyvinutá stomatocysta *D. cylindricum* má, je dána genotypem. Ovšem jejich délka a délka límečku je ovlivněna teplotou během encystace, se vzrůstající teplotou dochází ke zkracování. Průměr cysty je korelován s průměrem límečku, tyto hodnoty jsou v rámci populace konzistentní. Buňka je schopna produkovat plně vyvinutou cystu pravděpodobně jen v rozmezí optimální teploty. Buňky vystavené stresu během encystace tvoří cystu s redukovanou ornamentací a límečkem, případně ornamentace a límeček mohou úplně chybět. Důsledkem fyziologického stresu pravděpodobně buňka nemá dostatek energie pro dokončení cysty (Sandgren, 1983).

Při excystaci se zátka rozpustí a obsah se rozdělí na několik buněk, které uniknou pórem. U zlativky *Dinobryon divergens* se nejprve vytvoří celulózní komůrka (obr. 9) přichycená k póru, kam migruje rozdělený obsah cysty, a až poté se dostávají čtyři dceřiné buňky úplně ven. Jedná se o unikátní jev a možným důvodem je získání živin více propustnou stěnou komůrky (Sheath et al., 1975).



Obr. 9: Celulózní komůrka spojená s cystou *Dinobryon divergens* (Sheath et al., 1975).

### 1.7 Indukce encystace a excystace a faktory, které je mohou ovlivnit

Planktonní rozsivky, obrněnky a chlorofytní řasy se pohlavně rozmnožují v reakci na fyziologický stres způsobený rychlou změnou enviromentálních podmínek (Sandgren, 1991). Reagují tedy na exogenní faktory, mezi které můžeme zařadit změnu intenzity a délky osvětlení a fotoperiody, změny teploty, nedostatek živin, změny salinity a pH (Ellis &

Machlis, 1968; von Stosch, 1973; Cain & Trainor, 1976; Drebes, 1977; Davis et al., 1980). Fyziologický stres způsobuje zastavení růstu populace, na něž řasy odpovídají sexem a encystací, aby přečkaly nepříznivé období ve formě odolného stádia. Je potřeba zdůraznit, že samotná přítomnost faktorů nezpůsobuje encystaci. Encystace je indukována jejich náhlou změnou a rozsahem té změny. Klíčem k porozumění pohlavnímu rozmnožování tedy musí být zjištění optimálních podmínek pro vegetativní růst, případně jejich minimální a maximální hodnoty (Cain & Trainor, 1976).

Doposud se polemizuje nad spouštěči chrysofytní encystace a nad tím, jak velký význam doopravdy mají. Zdá se, že zde hrají roli jak endogenní tak exogenní faktory. Předěšlé studie vzaly v úvahu teplotu (Sheath et al., 1975; Cronberg, 1980, 1989; Sandgren 1986; Sandgren & Flanagin, 1986; Agbeti & Smol, 1995; Findenig et al., 2010), omezení živin (Sandgren, 1981, 1988; Agbeti & Smol, 1995), hustotu populace vegetativních buněk (Sandgren, 1986, 1988; Sandgren & Flanagin, 1986), případně stáří kultury (Findenig et al., 2010). Aby proběhlo pohlavní rozmnožování, je zapotřebí přítomnosti dvou koexistujících pohlavně odlišných klonů (Sandgren, 1981). Experimenty s *Dinobryon cylindricum* (Sandgren 1981, 1986, 1988) a *Synura petersenii* (Sandgren & Flanagin, 1986) ukázaly, že je u nich pohlavní rozmnožování závislé na hustotě populace dvou kompatibilních klonů. Je zapotřebí dosáhnout určitého mezního počtu buněk (u *Dinobryon* 200 buněk na 1 ml), pod touto hranicí k pohlavnímu rozmnožování nedochází. Pohlavní encystace u tohoto druhu je tedy řízena endogenně. Není vyvolávána vnějšími podmínkami. Cronberg (1989) sice usuzuje, že encystace může být spuštěna teplotou, ale pravděpodobně se jedná spíše o nepřímý vliv skrze populační dynamiku, která s teplotou souvisí (Sandgren, 1986). Zdá se tedy, že pohlavní rozmnožování zlativek není únik před nepříznivými podmínkami prostředí. Nejedná se o reakci na stres, ale naopak se vyskytuje během aktivního růstu populace. Pokud toto aplikujeme v paleoekologii, znamená to, že uložené stomatocysty indikují optimální podmínky pro chrysofyta v konkrétním čase (Sandgren, 1991).

*Dinobryon cylidricum* se ukázal jako dobrý modelový organismus, jelikož je schopen tvořit stomatocysty pohlavní, autogamickou i nepohlavní cestou (Sandgren, 1981, 1986). V Sandgrenově studii (1981) každý typ produkce stomatocyst odpovídal různě na deficient živin (dusíku, fosforu, vitamínu, vzácných kovů nebo mikroprvků). Nedostatek fosforu inhiboval nepohlavní encystaci a pohlavní encystaci málo kompatibilních klonů, zatímco nedostatek dusíku ji podpořil. Dobře kompatibilní klony nebyly ovlivněny žádným nedostatkem živin. Ani v jednom případě nefigurovaly tyto podmínky jako spouštěč, pouze

ovlivnily frekvenci encystace. Podle těchto zjištění lze usuzovat, že se různě kompatibilní klony liší ve fyziologických aspektech. Ne všechny klony byly schopné všech typů encystace. Klony, schopné nepohlavního vzniku cyst, je tvoří v malém množství průběžně. Mohou tak sloužit jako „semenná banka“ v nových nebo efemérních lokalitách. Slabě kompatibilní klony procházející pohlavním rozmnožováním postupují stejnou strategií jako ostatní planktonní řasy a reagují na environmentální podmínky, zatímco silně kompatibilní klony naplno využívají svůj genetický potenciál a s vysokou frekvencí rekombinují a cystují, dokud jsou podmínky ideální, což se hodí ve stabilním prostředí se silnou kompeticí (Sandgren, 1981). Findenig et al. (2010) se v rámci své taxonomické studie na *Spumella* a jí podobných chrysofyt z půdy a drobných vodních těles pokoušeli o encystaci nepohlavní cestou, tedy klonální kultury. Encystace nebyla závislá ani světle ani na teplotě. Docházelo k ní pouze u týden starých kultur. Yubuki sledoval encystaci *Spumella* dokonce po třech dnech (Yubuki et al., 2008). Toto opět poukazuje na hypotézu nepohlavní encystace v nově vzniklých habitatech či efemérních vodních tělesech. Nepohlavní encystace byla v přírodě v malém množství pozorována u některých klonů *Dinobryon*, *Mallomonas*, *Synura* a *Uvella* (Sandgren, 1981, 1989). Občas se velmi rychle vytvoří na mikroskopickém skličku v odpověď na zvýšenou teplotu a omezení v pohybu. Nicméně většina klonů nepohlavní cysty v kulturách vůbec netvoří. Možná, že v ideálních podmínkách tuto schopnost ztrácejí, nebo nebyl odhalen ten správný stresový spouštěč. U *Dinobryon* a *Uroglena* se podařilo encystaci stimulovat nutričním stresem (Sandgre, 1991). Z těchto minoritních experimentů a pozorování Sandgren (1991) usuzuje, že pohlavní rozmnožování s encystací je v přírodě mnohem častější než nepohlavní encystace, která se vyskytuje spíše v uměle vytvořených vodních tělesech nebo efemérních lokalitách. Variabilita typů encystace i vlivů na její indukci se zdá být větší než u ostatních planktonních organismů. Jedná se na první pohled o velmi flexibilní způsob, jak se vypořádat s krátkým sezónním výskytem vegetativní populace.

Encystace byla podrobněji zkoumána, ale na téma životaschopnosti a excystace existuje jen několik málo studií. Sandgren (1988) zkoumal životaschopnost cyst *D. cylindricum* pocházejících z laboratorní kultury a zaznamenal lineární pokles v počtu životaschopných cyst během 400 dní. Cronberg (1982) zkoumala sediment jezera Trumman a usuzuje, že stomatocysty jsou schopné zůstat životaschopné desítky let za anoxických podmínek. Ze Sandgrenova excystačního experimentu pohlavně vzniklých cyst (1988) vyšlo najevo, že teplota ani živiny neindukovaly excystaci. Světlo ji sice navodilo, ale malé množství excystovalo i ve tmě, z čehož opět lze vyvodit, že se jedná o proces řízený endogenně.

## 1.8 Dosavadní výzkum chrysofytní encystace a excystace, cíle diplomové práce

O spouštěcích a kontrole encystace a excystace toho dosud víme jen velmi málo. Životní cyklus chrysofyt a dynamika přechodu z vegetativního stádia do odpočívajícího byly intenzivně studovány v 80. a 90. letech minulého století. Podrobně zkoumaná byla pouze encystace vzniklá pohlavní cestou (Sandgren, 1981, 1991; Sandgren & Flanagan, 1986), ale dynamika nepohlavní encystace a spouštěče nikdy nebyly hlavním předmětem experimentu, který by ji detailně prozkoumal. Vždy se jednalo pouze o podružná zjištění v rámci taxonomických a jiných studií. To samé platí o excystaci a životaschopnosti stomatocyst. O nich víme ještě méně. Nad spouštěči encystace a excystace se stále vznášejí mnoho otazníků. Jsou tyto procesy řízeny vnitřními nebo vnějšími faktory, či jejich kombinací? Odpovědi na tyto otázky se pak mohou lišit mezi jednotlivými druhy, možná klony nebo v souvislosti s habitatem. Dormance a její nezbytnost je zmíněna pouze velmi okrajově (Sandgren, 1980, 1986).

Předmětem mé diplomové práce je nepohlavní encystace čili encystace ve zlativkových kulturách, které vznikly z jediné buňky. Snažila jsem se zjistit, zda je encystace ovlivněna exogenními faktory. V druhé části jsem se pokusila excystovat klonální kulturu. Při navrhování experimentů jsem čerpala z několika málo studií, které se zabývaly vyvoláním encystace nebo zvýšením její frekvence u chrysofyt. Přednostně to byl C. D. Sandgren, kterému vděčíme za velkou část poznatků týkajících se stomatocyst, jejich tvorby, struktury a také rozmnožování chrysofyt. Autoři studií většinou vyzkoušeli různé kombinace podmínek, především různých teplot, od bodu mrazu média po 30 °C, a různých světelných režimů (Findenig et al., 2010). Sandgren zkoumal vliv světleného režimu 16 : 8 hodinám světla a tmy (Sandgren 1981, 1983, 1986; Sandgren & Flanagan, 1986) při teplotách 16 ° – 20 °C (Sandgren 1981), 15 °C (Sandgren 1983; Sandgren & Flanagan, 1986) a 10, 15 a 20 °C (Sandgren 1986). Testoval také nutriční stres, kdy médium ochudil o fosfor, dusík či vitamíny a mikroprvky. Holen et al. (2014) se pokoušeli navodit encystaci u zástupců rodu *Chrysolepidomonas*, *Chrysosaccus*, *Dermatochrysis*, *Synura* a *Ochromonas* podobně jako Sandgren, přenesením z konstantního světla do světelného režimu 16 : 8 hodinám při teplotě 21 °C.

Životaschopnost chrysofytních cyst v laboratorních podmínkách byla zmíněna v jediné studii, a to Sandgrena (1986), kde testoval přežití sexuálně vzniklých stomatocyst *Dinobryon cylindricum* ve tmě, při 4 a 15 °C v podmínkách za přítomnosti kyslíku. V této studii se pak

pokusil i o excystaci v různých teplotách (5, 10, 15, 20 °C) a v médiu s živinami a bez živin. Další studií, zabývající se excystací, je práce Yubuki et al. (2008). Ve svém výzkumu životního cyklu *Spumella* umístili stomatocysty do teplot 15, 18, 20, 22 a 24 °C.

Nejdůležitějším faktorem se zdá být teplota, jelikož přímo koreluje s rychlostí růstu populace. Druhým nejdůležitějším faktorem, který může navodit stres je deficit živin. Fotoperioda zde má dle mého názoru simulační roli přirozených podmínek. Moje otázky, které se pokusím v následujících kapitolách zodpovědět, zní:

- 1 Může teplota ovlivnit nepohlavní encystaci v laboratorních podmínkách?
- 2 Může mít deficit živin vliv na nepohlavní encystaci v laboratorních podmínkách?
- 3 Lze uchovat životaschopnou zacystovanou kulturu a lze ji pomocí vnějších faktorů donutit k excystaci?

## 2 Materiál a metody

### 2.1 Použité kultury a kultivace

Pro experimenty jsem použila chrysofytní klonální kultury, u kterých byla pozorována občasná tvorba cyst v laboratorních podmínkách. Konkrétně se jednalo o jeden kmen *Ochromonas tuberculata* a dva kmeny *Synura petersenii*. Dále jsem experimentovala s kmenem *Synura uvella*, jež se v laboratorních podmínkách kompletně zacystoval. Bližší informace k původu těchto kmenů jsou uvedeny v tabulce 1. Druhy rodu *Synura* určil Pavel Škaloud na základě ITS sekvencí.

Druh	Lokalita	Teplota (°C)	pH	Konduktivita	Datum	Izoloval/a	Souřadnice
O. tuberculata	CZ, kanál Břehyňsko	24	3,6	150	7.07.2006	Yvonne Němcová	50.576127- 14.692632
S. petersenii E12	FR SWE, jezero	12	6,9	603	12.03.2017	P. a M. Škaloudovi	47.08301, -1.63046
S. petersenii F25	Krankesjön USA, Willett	-	7,8	355	27.03.2017	Dorka Čertnerová	55.6919408, 13.4927928
S. uvella	Pond	22	7,6	437	21.05.2017	Martin Pusztai	42.18627, -71.24067

Tab. 1: Fyzikálně chemické parametry a poloha lokalit, ze kterých byly izolovány experimentální izoláty.

Kultivace i experimenty byly prováděny v médiu WC (Guillard & Lorenzen, 1972), jehož složení udávám v tabulce 2–4. Složky se doplňují do jednoho litru destilovanou vodou a sterilizují se pomocí autoklávu. Vitamíny se doplňují až po sterilizaci, aby nedošlo k denaturaci. Změřené pH média je 7,5.

Sloučenina	Zásobní roztok	Množství na 1 litr
pufř TES	-	0,115 g
NaNO <sub>3</sub>	4,25 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3,7 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3,68 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,435 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
NaHCO <sub>3</sub>	3,15 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2,12 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
stopové prvky	-	1 ml
vitamíny	-	1 ml

Tab. 2: Složky WC média (Guillard & Lorenzen, 1972).

Sloučenina	Zásobní roztok	Množství na 1 litr
Na <sub>2</sub> EDTA (Titriplex III)	-	4,36 g
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	3,15 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	10 g/l dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22 g/l dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10 g/l dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180 g/l dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6 g/l dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-	1,3 g

Tab. 3: Složení stopových prvků WC média (Guillard & Lorenzen, 1972).

Sloučenina	Zásobní roztok	Množství na 1 litr	Finální koncentrace v hotovém médiu
thiamin · HCl (vitamin B1)	-	100 mg	2,96 x 10 <sup>-7</sup> M
biotin (vitamin H)	0.2 g/l dest. H <sub>2</sub> O	2,5 ml	2,05 x 10 <sup>-9</sup> M (0,20mg/l)
vitamin B12 (cyanocobalamin)	0.5 g/l dest. H <sub>2</sub> O	1 ml	3,69 x 10 <sup>-10</sup> M (0,50mg/l)

Tab. 4: Složení vitaminového roztoku (Guillard & Lorenzen, 1972).

Kmeny byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách o objemu 50 ml (obr. 10) a uchovávány v lednici při 17 °C s osvětlením 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.



Obr. 10: Ukázka uchovávání kultur. Vlevo zacystovaná kultura a vpravo dvě narostlé, aktivně se dělicí zlativkové kultury, stáří přibližně dva měsíce (vlastní fotografie).

## 2.2 Mikroskopování a popis cyst

Chrysofytní kultury jsem pozorovala jak ve světelném, tak ve skenovacím elektronovém mikroskopu. Fotografie byly pořízeny na světelném mikroskopu Olympus BX51 s fotoaparátem Canon EOS 700D a na mikroskopu Leica DM 2000 LED se zabudovaným fotoaparátem Leica ICC50 W za použití Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu.

Pro skenovací elektronovou mikroskopii jsem zhotovila preparáty, na kterých budou dobře viditelné především křemičité stomatocysty, případně šupiny synur. Vypálením peroxidem vodíku a kyselinou chlorovodíkovou jsem ze vzorků odstranila organické složky následujícím postupem (Cabala & Piatek, 2004; Piatek, 2007): malý objem každé kultury jsem umístila do skleněné zkumavky (nanejvýše  $\frac{1}{4}$  objemu zkumavky) a přidala cca 4 ml 10% kyseliny chlorovodíkové v digestoři. Ponechala jsem vzorky stát 24 hodin. Poté jsem nechala zkumavky ve vodní lázni 15 minut povařit. Po vychladnutí jsem obsah promyla destilovanou vodou a to tak, že jsem obsah zcentrifugovala a odpipetovala jsem supernatant. Promytí jsem třikrát zopakovala. Do zkumavek jsem přidala přibližně 4 ml 30% peroxidu vodíku a opět nechala stát 24 hodin. Po uběhnutém čase jsem vzorky opět povařila, tentokrát 30 minut a znovu stejným způsobem promyla destilovanou vodou. Většinu kapaliny jsem odstranila. Nechala jsem jen takové množství, aby se dal vzorek nabrat do pipety. Promíchala jsem obsah ve zkumavkách, napipetovala větší kapku na čtvereček alobalu a přes noc nechala vyschnout. Takto připravené preparáty (obr. 11) jsou již vhodné k pokovení.



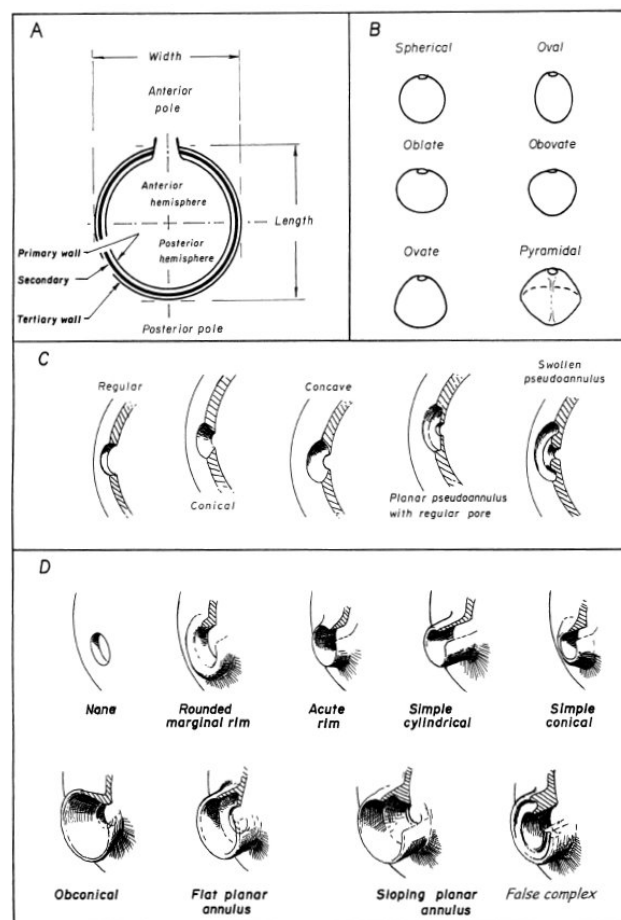
Obr.11: Vzorky kultur připravené pro SEM před pokovením (vlastní fotografie).

Při přípravě preparátu *Synura uvella* jsem pozměnila metodiku. Zacystovaná kultura se skládala ze shluků slizu. Ultrazvukem se mi podařilo rozdělit je na menší shluky, ale nepodařilo se mi izolovat ze slizu jednotlivé stomatocysty. Použila jsem techniku, která se používá při zhotovování rozsivkových preparátů na očištění schránek za použití peroxidu vodíku a manganistanu draselného a alternativní kombinaci peroxidu vodíku a dichromanu draselného (Werff, 1955). Vzorek kultury jsem napipetovala do zkumavek, zalila 30% peroxidem vodíku a nechala hodinu sytit. Poté jsem obsah zkumavky přelila do větší kádinky a přisypala špetku dichromanu nebo manganistanu, což způsobí bouřlivou oxidaci a změnu zbarvení (po manganistanu vzorek zčernal, po dichromanu zoranžověl). Po vychladnutí kádinky jsem přelila vzorek do zkumavky, zcentrifugovala, co největší množství kapaliny odpipetovala a dolila destilovanou vodou. Takto jsem promývala vzorek tak dlouho, dokud



nebyl obsah opět průhledný. Po posledním odpipetování kapaliny jsem, stejně jako u první metody, promíchala pipetou zcentrifugovaný vzorek, nakapala větší kapky na čtverečky alobalu a nechala zaschnout. Fotografie stomatocyst byly pořízeny na skenovací elektronovém mikroskopu JEOL 6380 LV v Laboratoři elektronové mikroskopie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (Viničná 7, Praha 2).

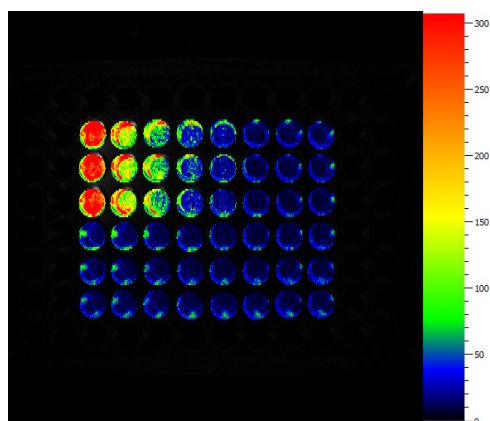
Stomatocysty jsem měřila pomocí programu ImageJ z fotografií ze skenovacího elektronového mikroskopu. Počet cyst použitých pro popis morfologie se pohyboval od 12 do 19 stomatocyst, pouze u *Synura uvella*, kde bylo obtížné získat očištěné stomatocysty, jsem změřila pouze sedm cyst. Počet cyst u každého měřeného morfologického znaku je uveden v závorce. Jako podklad pro českou terminologii jsem použila terminologii (obr. 12) v atlasech: Atlas of Chrysophycean Cysts (Duff et al., 1995), Atlas of Chrysophycean Cysts Volume II (Wilkinson et al., 2002) a cysty byly popsány podle International Statospore Working Group (ISWG) směrnic (Cronberg & Sandgren, 1986).



Obr. 12: Terminologie morfologických vlastností cyst používaná k jejich popisu (Wilkinson et al., 2002), oddíl A – tělo cysty, oddíl B – tvar cysty, oddíl C – morfologie póru, oddíl D – morfologie límečku.

## 2.3 Stanovení počtu buněk a cyst

Počítala jsem buňky a cysty přímo na invertovaném světleném mikroskopu Leica Dmi1. V případě synur se tato technika stala výzvou, jelikož synury tvoří různě velké trojrozměrné kolonie a z důvodu udržení orientace ve vzorku a kvůli pohybu kolonií nebylo možné proostrit kolonii tak, aby šlo spočítat horní i spodní vrstvu a buňky na obvodu. U kolonií s počtem buněk větším než osm jsem počítala buňky na viditelné straně kolonie, vynásobila dvěma a získala tak přibližný počet buněk v kolonii. V případě kolonií s počtem buněk přibližně 60 a jsem počet pouze odhadla. Dalším použitým způsobem určení počtu buněk (nikoliv cyst), bylo nepřímé, za využití koncentrační řady. Z pěti koncentrací kultury jsem vytvořila kalibrační křivku. Kalibrační křivka začínala na 350  $\mu$ l objemu kultury, v dalším kroku jsem odebrala vždy polovinu z kultury a nahradila ji médiem. Změřila jsem fluorescenci na PAM fluorometru (FluorCam 800MF, Photon Systems Instruments) (obr. 5) a spočítala počet buněk na 1 ml objemu pro každou koncentraci za použití Bürkerovy komůrky (obr. 13). Počítala jsem ve sloupcích, při malém množství buněk jsem spočítala celou Bürkerovu komůrku. Abych předešla započítání buněk ležících na hranách čtverců dvakrát, buňky ležící na levé a spodní hraně jsem nezapočítala. Ke spočítání vegetativních buněk jsem používala obě metody, počet cyst bylo možné zjistit pouze manuálně na invertovaném světelném mikroskopu.



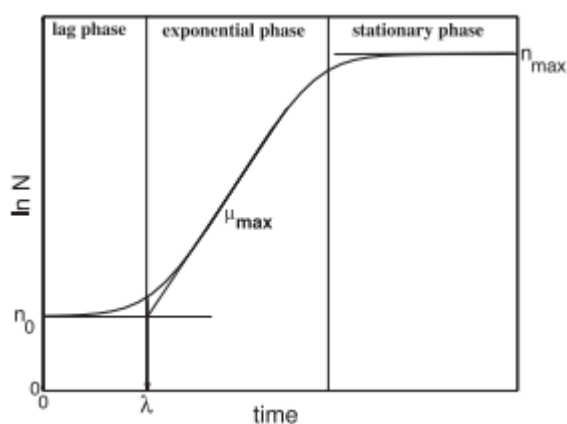
Obr. 13: Příklad vizuálního znázornění naměřené fluorescence koncentrační řady kultury *Ochromonas tuberculata* na PAM fluorometru (fotografie byla pořízena pomocí programu FluorCam7).

## 2.4 Počítání růstové rychlosti a procentní zastoupení cyst

Pro vypočítání růstové rychlosti jednotlivých chrysofytních kmenů jsem použila naměřené hodnoty fluorescence z pilotního pokusu. Použila jsem následující rovnici:

$$\text{Growth rate}(\mu) = \frac{\ln(\text{count2}) - \ln(\text{count1})}{\text{time2} - \text{time1}},$$

kteřou jsem pro svá data modifikovala. Abundanci buněk jsem vyjádřila fluorescencí, nikoliv jejich počtem. Z hodnot fluorescence jsem sestavila růstovou křivku každého opakování (příloha I.) Lag fáze trvala dva dny, počítala jsem tedy růstovou rychlost od třetího dne. Stationární fáze po dobu pokusu kmeny nedosáhly (obr. 14). Vztah počtu buněk a počtu nově vytvořených cyst vyjadřuji jako procentuální produkci cyst. Pro výpočet jsem použila vzorec převzatý ze studie Sandgren & Flanagin (1986): produkce cyst % =  $100 \cdot \frac{c}{(n+c)}$ , kde „c“ je počet cyst a „n“ počet vegetativních buněk.



Obr. 14: Růstová křivka mikroorganismů v kultuře přeočkovaných do nových podmínek při konstantní teplotě (Swinnen et al., 2004).

## 2.5 Experimenty

Všechny experimenty jsem prováděla v mikrotitračních destičkách s 96 jamkami a plochým dnem, do kterých jsem v řadách rozočkovala vzorky, přičemž jsem vynechala dvě krajní řady a dva krajní sloupce, do kterých jsem nakapala destilovanou vodu pro snížení odparu ze vzorků. Dno jamek jsem zvenčí rozdělila tenkou lihovou fixou křížem na čtyři oddíly pro lepší orientaci ve vzorku při počítání buněk a cyst v invertovaném světelném mikroskopu. Tloušťka dna jamek byla dostatečná na to, aby umožnila viditelné rozdělení oblasti a zároveň nedošlo k zastínění buněk černou barvou.

Experimenty probíhaly v lednici s termostatem, v níž jsou umístěny komůrky s nastavitelnou teplotou (obr. 15) a ve skříňce, kde jsou umístěny další stejné komůrky (obr. 16). Díky tomu jsem mohla využít rozpětí teplot od 5 do 30 °C. Lednice a skříňka byly osvětleny zářivkami Osram Fluora L 18 W/77. Komůrky byly ozářeny 20 – 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (ozáření jsem měřila přístrojem ULM – 500 značky WALZ) s režimem 16 : 8 hodinám světla a tmy, který zajišťovaly mechanické spínací hodiny.



Obr. 15: Lednice s komůrkami s nastavitelnými teplotami (vlastní fotografie).

Obr. 16: Skříňka s komůrkami s nastavitelnými teplotami (vlastní fotografie).

### 2.5.1 Zjišťování optimální teploty – pilotní experiment

Kmeny *Ochromonas tuberculata* a dva kmeny *Synura petersenii* jsem rozočkovala do sedmi mikrotitračních destiček vždy po osmi opakováních (obr. 7. Jedno opakování obsahovalo 50  $\mu$ l narostlé kultury a 200  $\mu$ l média. Každou destičku jsou umístila do prostoru s nastavitelnou teplotou (lednice a skříňka viz výše) a světleným režimem 16 : 8 hodinám světla a tmy. Zvolila jsem sedm teplotních skupin: 5, 8, 11, 14, 17, 20 a 23 °C. Po osm dní jsem jednou denně destičky vyjmula a změřila fluorescenci na PAM fluorometru. Rozdílnou rychlost růstu jsem testovala dvouvýběrovým testem Mann-Whitney s Bonferroniho korekcí s hladinou významnosti 0,05. Pro grafické znázornění a testování jsem použila statistický program PAST.

### 2.5.2 Encystační experimenty

Při sestavování experimentálního designu jsem vycházela ze studií (Sandgren 1981, 1983, 1986; Sandgren & Flanagan, 1986; Findenig et al., 2010). Navrhla jsem dva pokusy, jejichž účelem bylo vyvolání asexuální encystace či zvýšení frekvence tvorby cyst různými abiotickými faktory.

#### 2.5.2.1 Testování vlivu teploty na produkci cyst

Tímto pokusem jsem zjišťovala, jestli má teplota vliv na produkci cyst. Použila jsem kmen *Ochromonas tuberculata* a oba kmeny *Synura petersenii*. Do mikrotitrační destiček jsem

napipetovala 30 µl narostlé kultury a 250 µl média ve třech opakováních. Destičky jsem na deset dní po jedné umístila do sedmi teplotních skupin: 5, 9, 13, 17, 21, 25 a 29 °C, opět ve světelném režimu 16 : 8 hodinám světla a tmy. Před začátkem pokusu (den 0) a pátý a desátý den pokusu jsem spočítala živé buňky, živé cysty a prázdné cysty pomocí výše zmíněných technik.

### 2.5.2.2 Testování vlivu nedostatku dusíku a fosforu na produkci cyst

Design experimentu vycházel ze studie Sandgren (1981), ve které zkoumal vliv nutričního stresu na encystaci *Dynobryon cylindricum*. Pro experiment jsem upravila složení WC média (Guillard & Lorenzen, 1972). Použila jsem WC médium bez změny složení (složení viz tab. 2) jako kontrolu, pro testování nedostatku dusíku jsem vyloučila všechny sloučeniny obsahující dusík a pro testování nedostatku fosforu jsem vyloučila všechny sloučeniny obsahující fosfor. Složení modifikovaných médií udávám v tabulce 5 a 6. Použila jsem stejné kmeny zlativek jako při testování vlivu teploty.

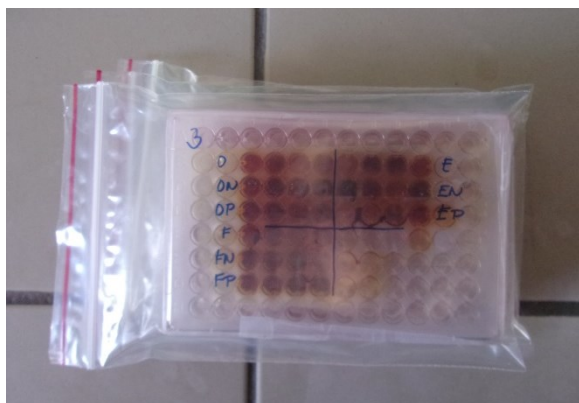
Sloučenina	Zásobní roztok	Množství na 1litr
pufr TES	-	0,115g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3,7 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3,68 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,435 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
NaHCO <sub>3</sub>	3,15 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2,12 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
stopové prvky	-	1 ml
vitaminy	-	1 ml

Tab. 5: Složení upraveného WC média bez dusíku.

Sloučenina	Zásobní roztok	Množství na 1litr
pufr TES	-	0,115g
NaNO <sub>3</sub>	4,25 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3,7 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3,68 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
NaHCO <sub>3</sub>	3,15 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2,12 g/100 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 ml
stopové prvky	-	1 ml
vitaminy	-	1 ml

Tab. 6: Složení upraveného WC média bez fosforu.

Do devíti zkumavek jsem odebrala přibližně 2 ml vzorku z vrchní části kultur (od každého kmenu tři zkumavky), tak aby neobsahovaly žádné sedimentované cysty. Vzorky jsem zcentrifugovala a pipetou odebrala supernatant, tak vzniklo malé množství zahuštěných vzorků. Do každé zkumavky jsem přidala buď 5 ml WC médium bez úpravy nebo WC médium bez dusíku, nebo WC médium bez fosforu. Vzorky jsem rozočkovala po 250  $\mu$ l do tří destiček, každou variantu ve čtyřech opakováních. Pokus probíhal opět v lednici s komůrkami s nastavitelnou teplotou, kterou jsem nastavila na 17 °C, jedná se tedy o teplotu shodnou s teplotou, v níž jsem kmény kultivovala. Světelný režim byl nastavený na 16 hodin světla, 8 hodin tmy. Pokus trval sedm dní. V nultý den pokusu a každý druhý den jsem změřila fluorescenci. Vždy po dvou dnech jsem jednu celou destičku zafixovala (obr. 17) Lugolovým roztokem (jednou kapkou do každé jamky) a následně jsem spočítala počet buněk a cyst výše zmíněnými technikami.



Obr. 17: Mikrotitrační destička z pokusu testování vlivu nedostatku dusíku a fosforu, zafixovaná Lugolovým roztokem (vlastní fotografie).

### 2.5.3 Excystační experiment na kultuře *Synura uvella*

Kulturu *Synura uvella* jsem obdržela kompletně zacystovanou. Pro udržení životaschopnosti kultury jsem zvolila metodiku Sandgrena (1986). Kulturu jsem uchovávala v 17 °C a ve tmě v Erlenmeyerových baňkách zabalených do alobalu.

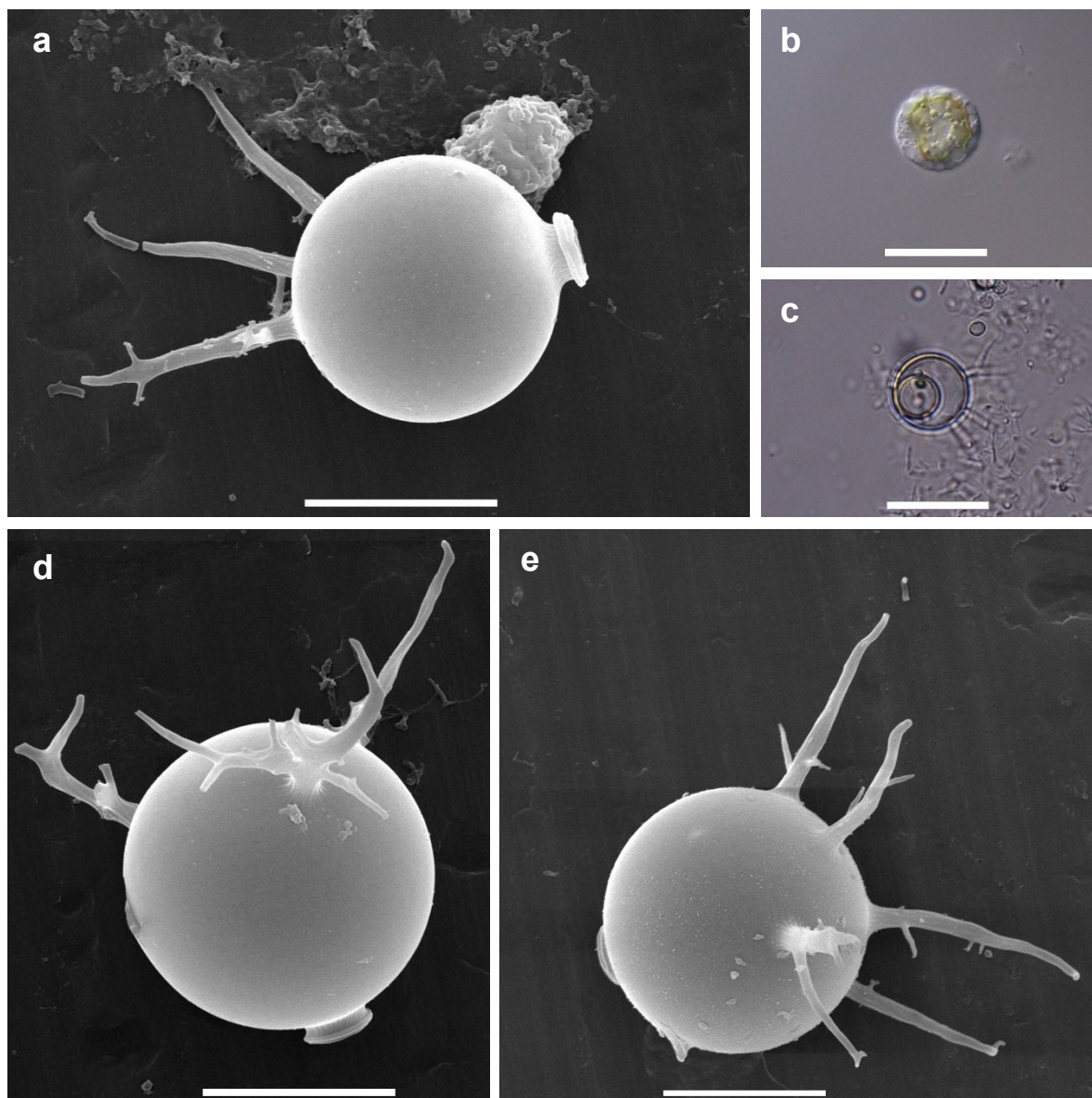
Pokus byl navržen podobně jako teplotní encystační experiment a vycházel ze sedmidenního experimentu C. Sandgrena (1986). Pokus probíhal v lednici a skřínce s komůrkami s nastavitelnou teplotou, ve světelném režimu 16 : 8 hodinám světla a tmy. Teplotní skupiny byly 11, 14, 17, 20, 23 a 26 °C. Pilotním pokusem jsem stanovila objem kultury v jednotlivých opakováních a dobu trvání pokusu. Výsledný návrh experimentu vypadal takto: vzorek kultury jsem napipetovala do sterilní zkumavky, kterou jsem několik minut držela v ultrazvuku, jehož účinkem se slizové shluky cyst rozpadly na menší části. V dalším kroku jsem odebrala ze zkumavky kapku na sterilní podložní sklíčko a skleněnou kapilárou

vychytávala cysty, přemístila je do mikrotitračních destiček s 96 jamkami. Na každé destičce jsem měla deset opakování po 2–30 cystách v čerstvém médiu a 10 opakování ve starém médiu, které jsem odebrala společně s cystami, naředěném destilovanou vodou. Destičky jsem po jedné umístila do boxů v lednici a skřínce s termostatem na začátku temné fáze režimu osvětlení. Experimentální teploty byly 11, 14, 17, 20, 23 a 26 °C. Průběh experimentu jsem pozorovala na invertovaném světelném mikroskopu Leica Dmi1. První a druhý den jsem pozorovala třikrát během světelné fáze po čtyřech hodinách, další dny jsem pozorovala destičky jednou denně uprostřed světelné fáze režimu osvětlení. Úspěšnost pokusu vyjadřuje procento opakování, ve kterých došlo k excystaci alespoň u jedné cysty. Opakování bylo deset, čili nárůstky byly možné po 10 %. Počet cyst v jednom opakování se pohyboval mezi dvěma a třiceti cystami.

### 3 Výsledky

#### 3.1 Charakteristika chrysofytních kmenů

*Ochromonas tuberculata* (obr. 18) izolovaný z Břežyňského kanálu v České republice.



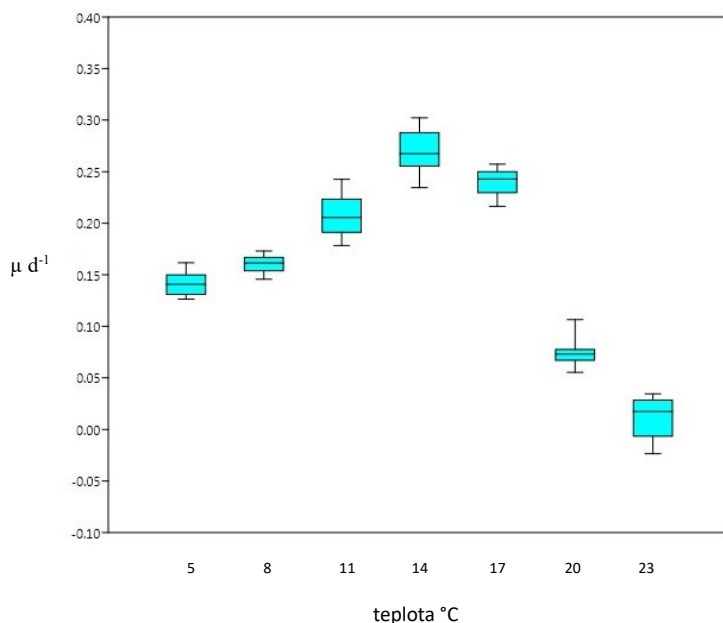
Obr. 18: *Ochromonas tuberculata*; b – vegetativní buňka (měřítko 20  $\mu\text{m}$ ); c – cysta ve světleném mikroskopu (měřítko 20  $\mu\text{m}$ ); a, d, e – cysty ze SEM (měřítko 10  $\mu\text{m}$ ).

Popis cysty na základě pozorování v SEM (obr.18a, 18d, 18e): Cysta je kulovitá s průměrem 13,9–16,3  $\mu\text{m}$  ( $n = 13$ ), pór je obklopen límečkem. Ten je u báze kónický a u vrcholu naopak obkónický, v tom místě přechází v zaoblený okraj, který je širší než zbytek límečku. Báze límečku je rýhovaná. Okraj je ve směru obvodu zvrásněný, z postranního pohledu působí



dojmem někdy i dvou vrstev. Délka celého límečku je 0,9–1,6  $\mu\text{m}$  ( $n = 6$ ), z toho délka okraje límečku dosahuje 0,2–0,7  $\mu\text{m}$  ( $n = 8$ ). Průměr límečku je 2–3  $\mu\text{m}$  ( $n = 8$ ) a průměr okraje límečku se pohybuje mezi čísly 3,5–4  $\mu\text{m}$  ( $n = 11$ ). Šířka okraje z pohledu shora činí 0,6–0,8  $\mu\text{m}$  ( $n = 2$ ). Cysta má hladký povrch. V posteriorní hemisféře z cysty vystupují ostny v počtu 2–6 ( $n = 13$ ). Ostny jsou cylindrické (mají tupou špičku) a mají nepravidelný až červovitý tvar. U báze jsou rýhované, podobně jako na přechodu límečku a těla cysty, a rýhování přechází v provazovitou strukturu po celé délce ostnu. Ostny se často nepravidelně větví i mnohonásobně, některé postranní větve jsou pouze krátké výrůstky s tupým zakončením. Nejčastěji jsem pozorovala 1–2 postranní ostny na jednom hlavním ostnu. Délka ostnů se pohybuje od 15  $\mu\text{m}$  do 0,7  $\mu\text{m}$  krátkého výrůstku ( $n = 13$ ), podle maturace cysty. Průměr ostnu je 0,2–1,6  $\mu\text{m}$  ( $n = 13$ ) měřeno jak u báze, tak u špičky. Vedlejší ostny byly dlouhé 0,2–8  $\mu\text{m}$  ( $n = 7$ ) s průměrem 0,1–1,2  $\mu\text{m}$  ( $n = 9$ ). Pór se nepodařilo na elektronovém mikroskopu zachytit.

Výsledné růstové rychlosti naznačují, že kultura *O. tuberculata* prospívá ve středních teplotách, nejlépe ve 14 °C. Vyloženě nepříznivá je pro růst vysoká teplota 20 °C, a teplota 23 °C vykazovala dokonce záporné hodnoty (obr. 19). Mann-Whitneyho test (tab. 7) potvrdil, že růst ve středních teplotách 11, 14 a 17 °C se významně liší od rychlosti růstu v nižších teplotách 5 a 8 °C. Teplotní skupiny 20 a 23 °C se významně liší od všech ostatních teplotních skupin. Tabulka 8 uvádí výsledky párového testu bez korekce, zde se významně liší růst ve všech teplotních skupinách.



Obr. 19: Růstová rychlost *Ochromonas tuberculata* v jednotlivých teplotních skupinách.

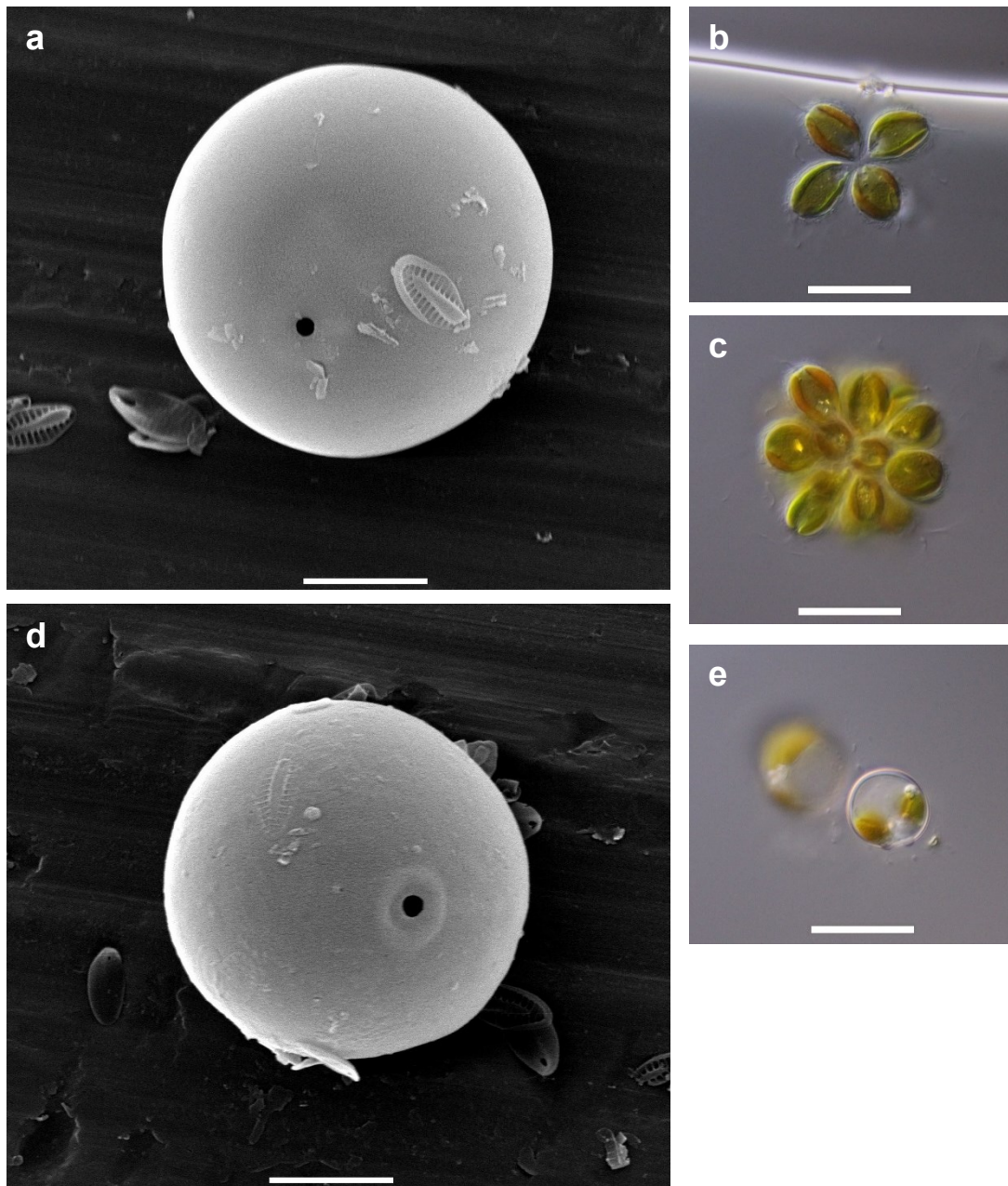
	5 °C	8 °C	11 °C	14 °C	17 °C	20 °C	23 °C
5 °C		0,1131	0,01972	0,01972	0,01972	0,01972	0,01972
8 °C	0,1131		0,01972	0,01972	0,01972	0,01972	0,01972
11 °C	0,01972	0,01972		0,02855	0,1555	0,01972	0,01972
14 °C	0,01972	0,01972	0,02855		0,2117	0,01972	0,01972
17 °C	0,01972	0,01972	0,1555	0,2117		0,01972	0,01972
20 °C	0,01972	0,01972	0,01972	0,01972	0,01972		0,01972
23 °C	0,01972	0,01972	0,01972	0,01972	0,01972	0,01972	

Tab. 7: Výsledky Mann-Whitneyho testu, kterým jsem otestovala rozdílnost růstových rychlostí kultury *Ochromonas tuberculata* v různých teplotních skupinách. P-hodnoty párových testů s Bonferroniho korekcí.

	5 °C	8 °C	11 °C	14 °C	17 °C	20 °C	23 °C
5 °C		0,005385	0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,0009391
8 °C	0,005385		0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,0009391
11 °C	0,0009391	0,0009391		0,001359	0,007406	0,0009391	0,0009391
14 °C	0,0009391	0,0009391	0,001359		0,01008	0,0009391	0,0009391
17 °C	0,0009391	0,0009391	0,007406	0,01008		0,0009391	0,0009391
20 °C	0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,0009391		0,0009391
23 °C	0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,0009391	

Tab. 8: P-hodnoty Mann-Whitneyho testu bez korekce.

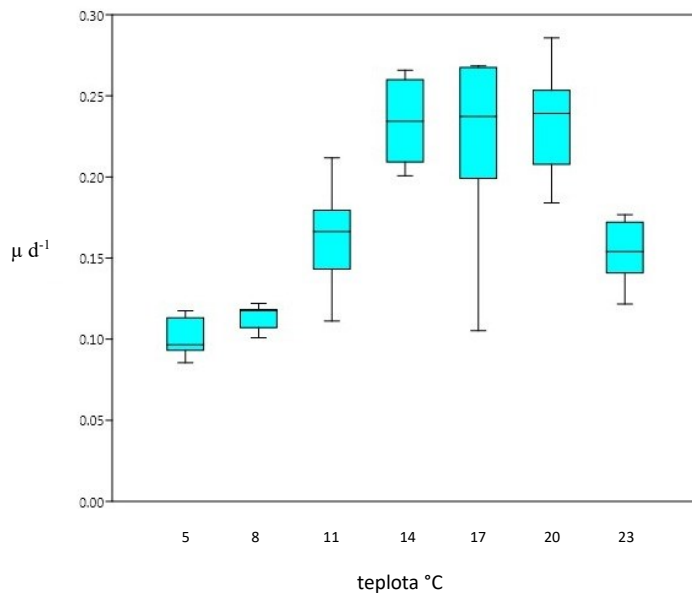
*Synura petersenii* E12 (obr. 20) izolovaná ve Francii, v malém vodním tělese jihozápadně od města Nantes.



Obr. 20: *Synura petersenii* E12; b, c – kolonie bičíkovců (měřítko 20  $\mu\text{m}$ ), e – cysta ve světelném mikroskopu (měřítko 20  $\mu\text{m}$ ), a, d – cysta v SEM (měřítko 5  $\mu\text{m}$ ).

Popis cysty na základě pozorování v SEM (obr. 20a, 20d): Cysta je kulovitá s průměrem 13,5–16,5  $\mu\text{m}$  (n = 12). Konkávní pór je bez límečku, s průměrem 0,5–0,9  $\mu\text{m}$  (n = 9). Povrch cysty je hladký.

Kultura *Synura petersenii* E12 vykazovala vyšší růstovou rychlost v teplotách 14, 17 a 20 °C, o něco nižší v 11 a 23 °C. Nejnižší růst probíhal v nízkých teplotách 5 a 8 °C (obr. 21). Nicméně toto tvrzení nepodpořil Mann-Whitneyho test (tab. 9). Odlehlé hodnoty v teplotě 11, 17 a 20 °C způsobily vysoké p-hodnoty, a tedy signifikantně se od sebe liší pouze růst v teplotě 5 °C od růstu v teplotách vyšší než 11 °C, včetně této teploty a skupina teplot 14 a 20 °C od ostatních. Mann-Whitneyho test bez korekce (tab. 10) p-hodnotami odpovídá více grafu (obr. 21) a zanedbává odlehlé hodnoty.



Obr. 21: Růstová rychlost *Synura petersenii* E12 v jednotlivých teplotních skupinách.

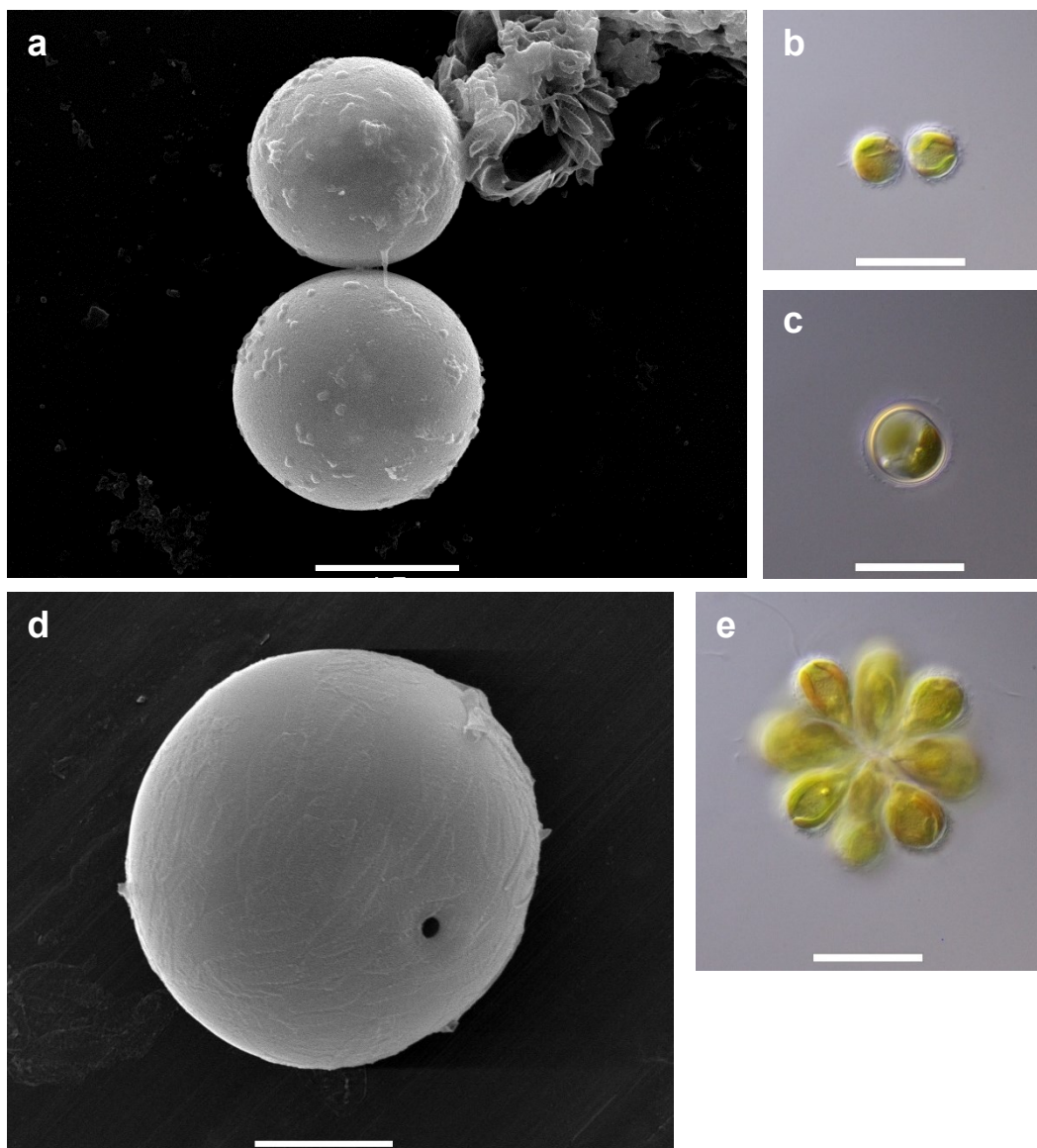
	5 °C	8 °C	11 °C	14 °C	17 °C	20 °C	23 °C
5 °C		0,2853	0,0409	0,01972	0,0409	0,01972	0,01972
8 °C	0,2853		0,1131	0,01972	0,2117	0,01972	0,02855
11 °C	0,0409	0,1131		0,0409	0,3807	0,0409	1
14 °C	0,01972	0,01972	0,0409		1	1	0,01972
17 °C	0,0409	0,2117	0,3807	1		1	0,2853
20 °C	0,01972	0,01972	0,0409	1	1		0,01972
23 °C	0,01972	0,02855	1	0,01972	0,2853	0,01972	

Tab. 9: Výsledky Mann-Whitneyho testu, kterým jsem otestovala rozdílnost růstových rychlostí kultury *Synura petersenii* E12 v různých teplotních skupinách. Uvedené p-hodnoty jsou s Bonferroniho korekcí.

	5 °C	8 °C	11 °C	14 °C	17 °C	20 °C	23 °C
5 °C		0,01359	0,001948	0,0009391	0,001948	0,0009391	0,0009391
8 °C	0,01359		0,005385	0,0009391	0,01008	0,0009391	0,001359
11 °C	0,001948	0,005385		0,001948	0,01813	0,001948	0,372
14 °C	0,0009391	0,0009391	0,001948		0,7132	0,9581	0,0009391
17 °C	0,001948	0,01008	0,01813	0,7132		0,9581	0,01359
20 °C	0,0009391	0,0009391	0,001948	0,9581	0,9581		0,0009391
23 °C	0,0009391	0,001359	0,372	0,0009391	0,01359	0,0009391	

Tab. 10: P-hodnoty týchž párových testů bez korekce.

*Synura petersenii* F25 (obr. 22) izolovaná z jezera Krankesjön ve Švédsku.

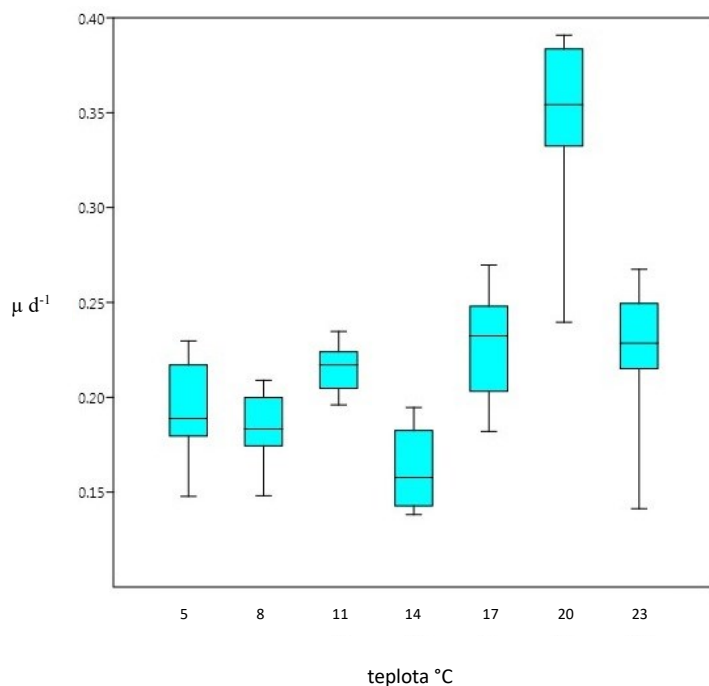


Obr. 22: *Synura petersenii* F25; b, e – kolonie bičíkovců (měřítko 20  $\mu\text{m}$ ), c – cysta ve světelném mikroskopu (měřítko 20  $\mu\text{m}$ ), a, d – cysta v SEM (a – měřítko 10  $\mu\text{m}$ , d – měřítko 5  $\mu\text{m}$ ).

Popis cysty na základě pozorování v SEM (obr. 22a, 22d): Cysta je kulovitá s průměrem 14,9–19,5  $\mu\text{m}$  ( $n = 19$ ). Pór je konkávní bez límečku a má průměr 0,6–1,5  $\mu\text{m}$  ( $n = 4$ ). Cysta má hladký povrch bez ornamentace. Tloušťka stěny cysty je 0,17–0,5  $\mu\text{m}$  ( $n = 2$ , prasklé cysty).

Druhá kultura *Synura petersenii* F25 oproti předešlé kultuře výrazně preferovala k růstu teplotu 20 °C. Rozdíly rychlosti růstu v ostatních teplotách se mezi sebou nijak významně nelišily (obr. 23) Výsledky Mann-Whitneyho testu (tab. 11) potvrdily signifikantní rozdíl

rychlosti růstu ve 20 °C, nicméně nižší odlehlé hodnoty se překrývají s hodnotami pro teploty 17 a 23 °C a p-hodnoty, které vyšly 0,05799, jen těsně nepodporují rozdílnost růstových rychlostí v těchto vyšších teplotách. P-hodnoty párového testu bez korekce (tab. 12) také podporují signifikantní rozdílnost teplotní skupiny 20 °C od ostatních.



Obr. 23: Růstová rychlost *Synura petersenii* F25 v jednotlivých teplotních skupinách.

	5 °C	8 °C	11 °C	14 °C	17 °C	20 °C	23 °C
5 °C			1	1	0,5029	0,2853	0,01972
8 °C		1		0,0814	1	0,2117	0,01972
11 °C		1	0,0814		0,01972	1	0,01972
14 °C		0,5029	1	0,01972		0,0409	0,01972
17 °C		0,2853	0,2117	1	0,0409		0,05799
20 °C		0,01972	0,01972	0,01972	0,01972	0,05799	
23 °C		0,8519	0,2853	1	0,1555	1	0,05799

Tab. 11: Výsledky Mann-Whitneyho testu, kterým jsem otestovala rozdílnost růstových rychlostí kultury *Synura petersenii* F25 v různých teplotních skupinách. Uvedeny jsou p-hodnoty s Bonferroniho korekcí.

	5 °C	8 °C	11 °C	14 °C	17 °C	20 °C	23 °C
5 °C		0,6365	0,08312	0,02395	0,01359	0,0009391	0,04057
8 °C	0,6365		0,003876	0,06608	0,01008	0,0009391	0,01359
11 °C	0,08312	0,003876		0,0009391	0,2271	0,0009391	0,1036
14 °C	0,02395	0,06608	0,0009391		0,001948	0,0009391	0,007406
17 °C	0,01359	0,01008	0,2271	0,001948		0,002762	0,9581
20 °C	0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,0009391	0,002762		0,002762
23 °C	0,04057	0,01359	0,1036	0,007406	0,9581	0,002762	

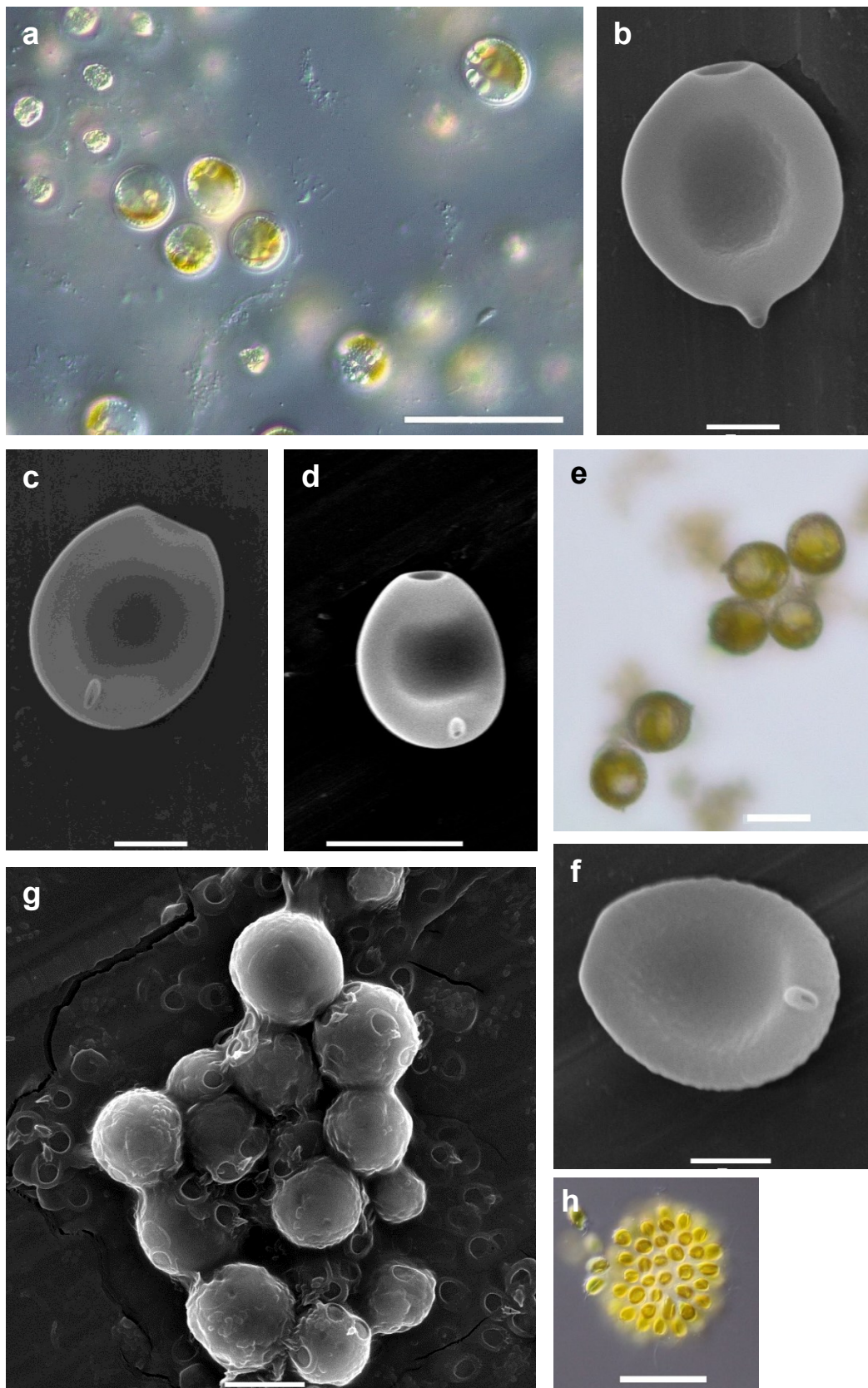
Tab. 12: P-hodnoty týchž párových testů bez korekce.

*Synura uvella* (obr. 24) izolovaná z Willett Pond v USA.

Popis cysty na základě pozorování v SEM (obr. 24b, 24c, 24d, 24e, 24f): Cysta má oválný až vejčitý tvar. V rovině póru je cysta plochá. Délka cysty je 5,9–7,1  $\mu\text{m}$  ( $n = 7$ ). Průměr cysty v nejširším místě (v polovině nebo více v posteriorní oblasti) se pohybuje od 4,8–6,1  $\mu\text{m}$  ( $n = 8$ ), šířka u póru je 1,5–1,9  $\mu\text{m}$  ( $n = 6$ ). Pór je kónický s průměrem 0,8–1,3  $\mu\text{m}$  ( $n = 3$ ), měřený vnější okraj póru. Cysta má hladký povrch. Vedle posteriorního pólu cysty se nachází jeden oblý až kónický výrůstek s protáhlou bází a s malým otvorem po straně, který je buď protáhlý nebo kulatý. Délka báze tohoto výrůstku je 0,1–0,9  $\mu\text{m}$  ( $n = 5$ ).

Vzhledem k tomu, že jsem pracovala se zacystovanou kulturou, nezjišťovala jsem optimální růstovou rychlost.





Obr. 24: *Synura uvella*; h – kolonie bičíkovců (měřítko 50  $\mu\text{m}$ ); a – cysty pod světelným mikroskopem (měřítko 50  $\mu\text{m}$ ); e – cysty pod světelným mikroskopem, vyschlý preparát (měřítko 20  $\mu\text{m}$ ); b, c, d, f – cysty na SEM (b, c, f – měřítko 2  $\mu\text{m}$ , d – měřítko 5  $\mu\text{m}$ ); g – cysty obalené slizem na SEM (měřítko 10  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2 Vliv teploty na produkci cyst

Ze tří chrysofytních kmenů, které jsem použila v tomto experimentu, odpověděl na testované podmínky tvorbou cyst pouze kmen *Synura petersenii* F25. Ostatní kmeny během pokusu neutvořily žádnou cystu, nebo pouze jednu či dvě. Získaná data z experimentu uvádím v příloze IIa. pro kmen *Ochromonas tuberculata* a IIb. pro kulturu *Synura petersenii* E12.

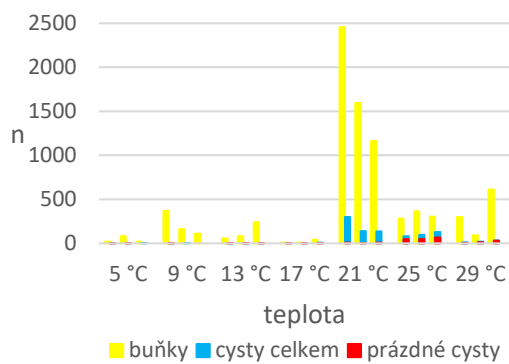
V průběhu pokusu často docházelo u *Synura petersenii* F25 ke snížení počtu vegetativních buněk (tab. 13) V teplotních skupinách 5, 9 a 25 °C v druhé polovině pokusu klesal počet buněk, v teplotách 13 a 17 °C klesal počet buněk v průběhu celého experimentu. V teplotě 29 °C počet buněk buď rostl, nebo klesal jen v první části pokusu. Pouze v teplotě 21 °C ve dvou ze tří opakování rostl počet buněk během celého pokusu. V této teplotě a v teplotě 25 °C jsem zaznamenala vyšší přírůstky buněk. Zvýšenou produkci cyst jsem pozorovala ve vyšších teplotách, tedy 21, 25 a 29 °C.

Teplota(°C)	dny	n1	živé cysty1	prázdné cysty1	n2	živé cysty2	prázdné cysty2	n3	živé cysty3	prázdné cysty3
5	0	81	0	0	147	0	0	99	0	0
	5	147	1	1	116	0	0	148	1	0
	10	17	2	1	79	1	2	20	1	0
9	0	274	0	0	223	0	0	188	0	0
	5	345	1	1	311	2	0	275	0	0
	10	369	1	1	160	2	0	109	0	0
13	0	357	0	0	631	0	0	1067	0	0
	5	188	2	0	341	0	0	349	6	0
	10	54	1	1	79	4	1	242	5	1
17	0	215	0	0	328	0	0	553	0	0
	5	79	4	0	64	3	0	229	0	2
	10	9	3	1	8	0	3	41	5	2
21	0	310	0	0	512	0	0	351	0	0
	5	533	214	5	1500	115	4	1500	86	8
	10	2456	291	7	1595	132	6	1159	128	8
25	0	326	0	0	475	0	0	558	0	0
	5	1053	39	43	1569	39	42	1065	31	63
	10	282	34	47	365	48	47	302	64	65
29	0	212	0	0	108	0	0	301	0	0
	5	236	0	1	53	1	18	185	9	27
	10	299	5	6	93	4	13	611	6	29

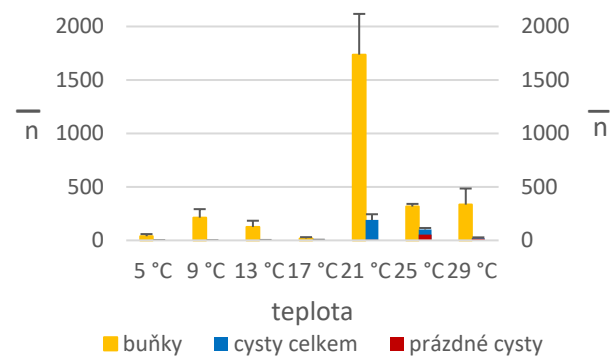
Tab. 13: Data z encystačního teplotního experimentu pro kmen *Synura petersenii* F25 v sedmi teplotních skupinách. Hodnoty n1–n3 označují počet buněk ve třech opakováních.

Obrázky 25a, b zachycují počty vegetativních buněk a cyst na konci pokusu, obrázky 25c a 25d průměry z opakování. Lze tvrdit, že v teplotě 21 °C došlo k největšímu růstu počtu buněk a zároveň se v této teplotě během pokusu vzniklo nejvíce životaschopných cyst. Pomineme-li další roli cyst v životním cyklu, největší množství cyst produkoval tento kmen v teplotě 21 a 25 °C.

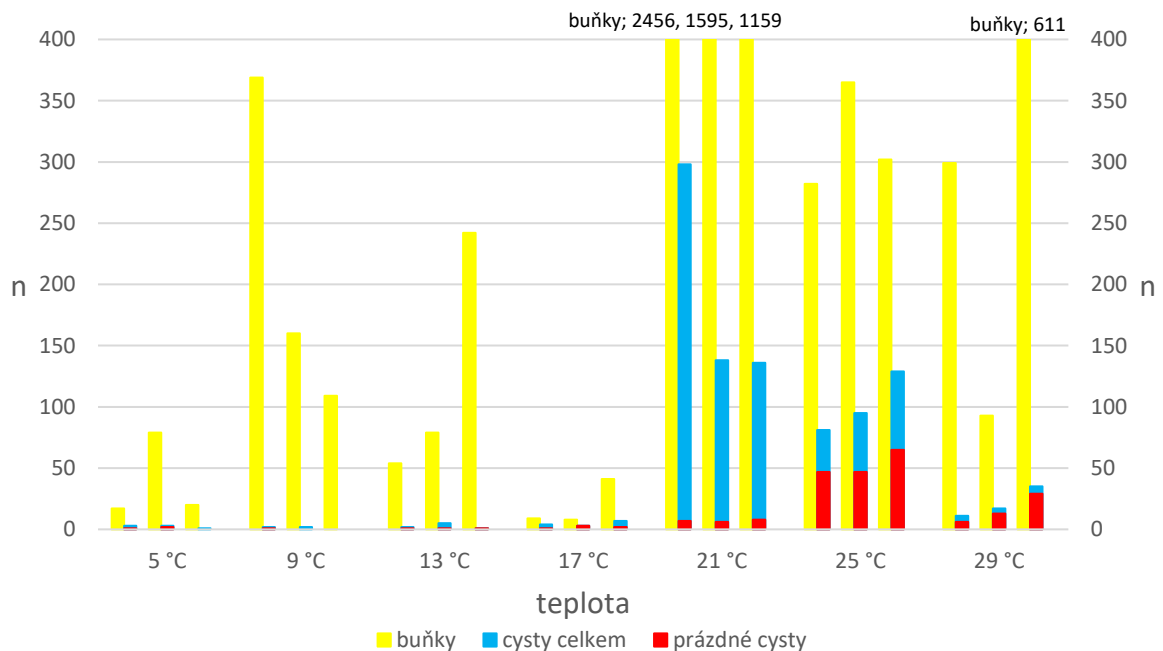
25a



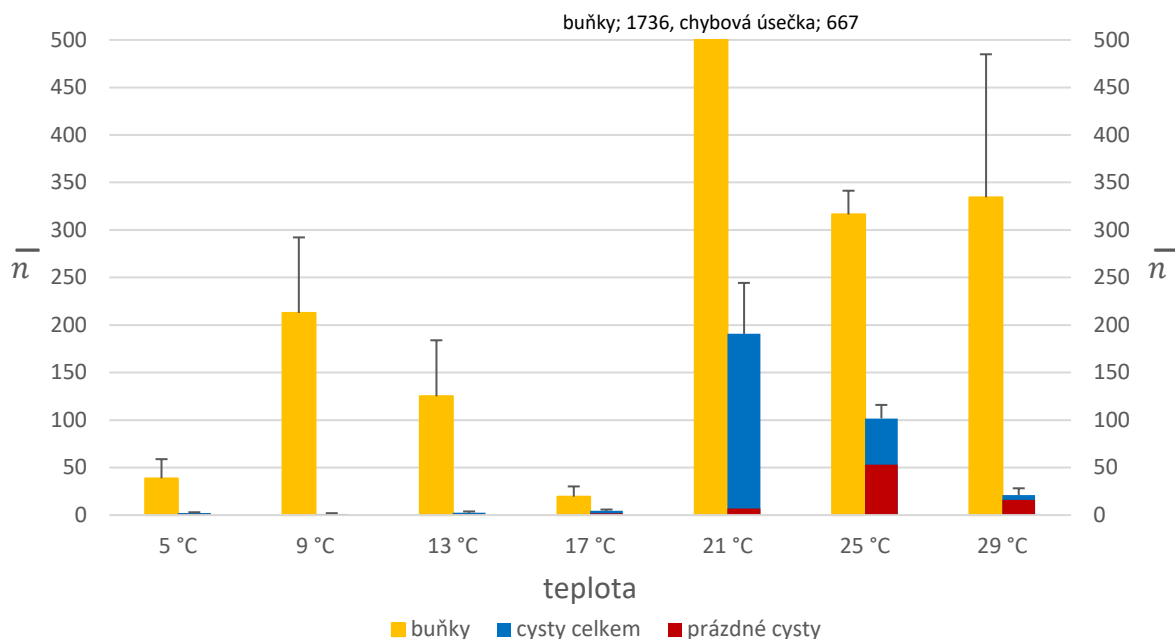
25c



25b



25d



Obr. 25: Výsledky encystačního teplotního experimentu s kmenem *Synura petersenii* F25 desátý tj. poslední den pokusu, n značí počet (buněk i cyst),  $\bar{n}$  značí průměrný počet. 25a – graf se všemi opakováními, 25b – zvětšený graf se zaměřením na počty cyst, 25c – průměr počtu buněk a cyst, chybová úsečka zobrazuje střední chybu odhadu, 25d – zvětšený graf s průměry se zaměřením na počty cyst, chybová úsečka zobrazuje střední chybu odhadu.

Ovšem z grafu lze vyčíst pouze vývoj samotných cyst, jelikož jejich počet byl na začátku pokusu 0, kdežto počet vegetativních buněk byl různý. Pro hodnotnější porovnání uvádím v tabulce 14 růstovou rychlost pro každou teplotu a produkci cyst v procentech. Nejvyšší produkce cyst koreluje s největším poklesem růstové rychlosti, tj. v teplotě 17 a 25° v druhé části pokusu. Nicméně vysoká hodnota produkce je důsledkem úhynu buněk (viz tab. 13), nikoliv častější přeměna buňky na cystu. Nejvyšší rychlost růstu po celou dobu pokusu byla ve 21 °C, kde je i vyšší produkce. Podle obou hodnot rychlostí růstu a produkce cyst lze usuzovat, že vyšší produkce cyst se odehrává ve vyšších teplotách, kde je i rychlejší růst, tedy v teplotních skupinách 21, 25 a 29°. Tento a pilotní pokus, ve kterém jsem zjistila, že optimální teplota pro růst pro tento kmen byla teplotní skupina 20°, naznačuje, že encystace z tohoto kmene probíhá v ideálních podmínkách, nikoliv za teplotního stresu. Nicméně párový test (tab. 15) nepodpořil rozdíly v produkci cyst mezi jednotlivými teplotními skupinami kvůli nízkému počtu opakování. Podporu dat má Mann-Whitneyho test pouze bez korekce (tab. 16).

teplota (°C)	růstová rychlost 0.–5. den	růstová rychlost 5. –10. den	produkce cyst (%) 5. den	produkce cyst (%) 10. den
5	0,05	–0,30	0,67	7,81
9	0,06	–0,10	0,41	0,59
13	–0,16	–0,21	0,91	3,98
17	–0,23	–0,40	3,39	24,21
21	0,20	0,09	14,12	9,76
25	0,20	–0,27	6,75	24,3
29	–0,07	0,13	14,37	8,14

Tab. 14: Růstové rychlosti a procentuální produkce cyst *Synura petersenii* F25 spočítané v různých fázích encystačního teplotního pokusu. Každá hodnota je průměr ze tří opakování.

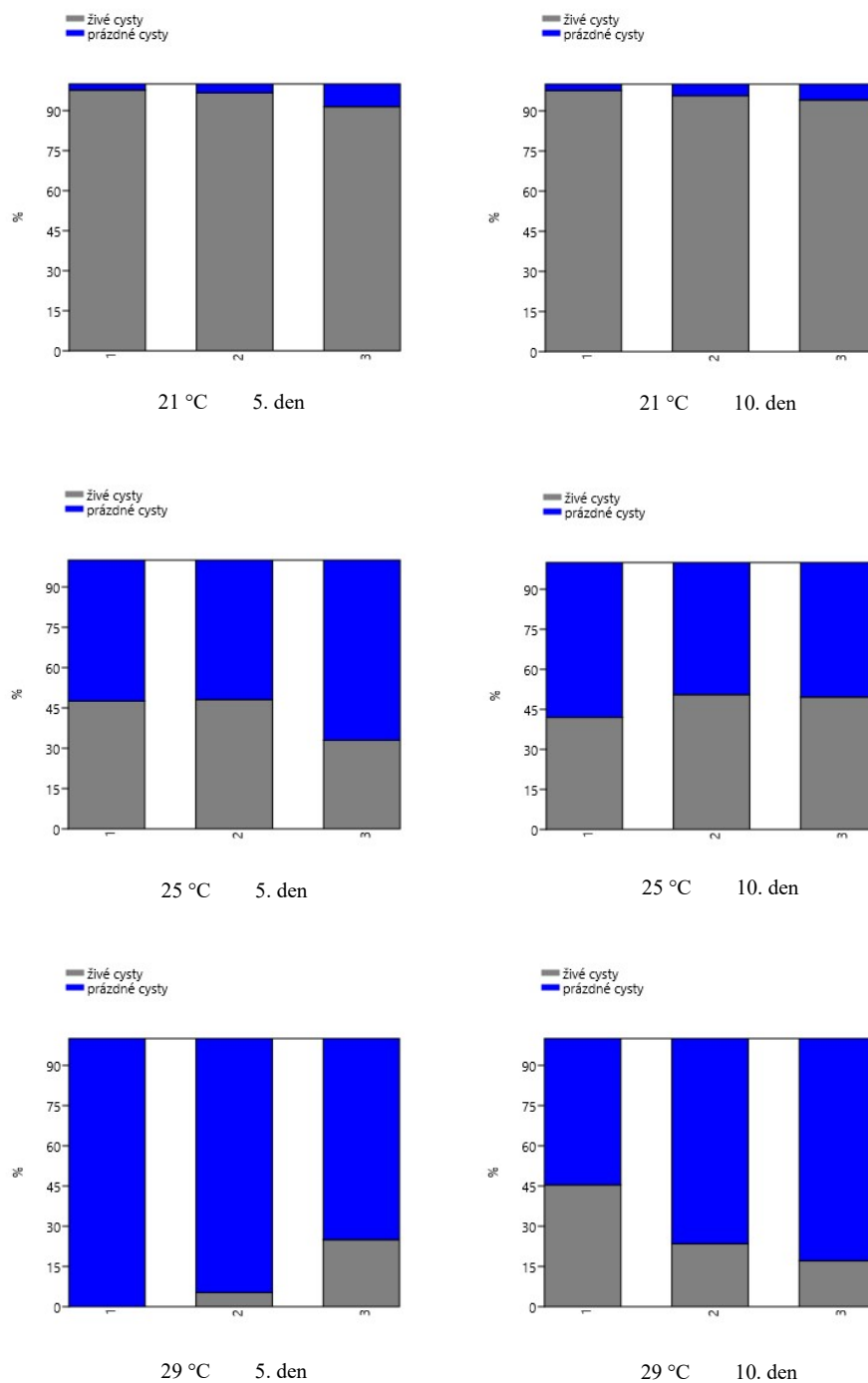
	5 °C	9 °C	13 °C	17 °C	21 °C	25 °C	29 °C
5 °C			1	1	1	0,9519	0,4251
9 °C		1		1	0,1707	0,105	0,105
13 °C		1	1		1	0,173	0,173
17 °C		1	0,1707	1		1	1
21 °C		0,9519	0,105	0,173	1		1
25 °C		0,4251	0,105	0,173	1	1	
29 °C		1	0,6373	1	1	1	1

Tab. 15: Výsledné p-hodnoty Mann-Whitneyho testu s Bonferroniho korekcí, jímž jsem testovala rozdíly produkce cyst *Synura petersenii* F25 v teplotních skupinách.

	5 °C	9 °C	13 °C	17 °C	21 °C	25 °C	29 °C
5 °C		0,06367	0,8726	0,1282	0,04533	0,02024	0,1735
9 °C	0,06367		0,06367	0,008127	0,004998	0,004998	0,03035
13 °C	0,8726	0,06367		0,927	0,008239	0,008239	0,1282
17 °C	0,1282	0,008127	0,927		0,8102	0,5752	0,8102
21 °C	0,04533	0,004998	0,008239	0,8102		0,8102	0,6889
25 °C	0,02024	0,004998	0,008239	0,5752	0,8102		0,3785
29 °C	0,1735	0,03035	0,1282	0,8102	0,6889	0,3785	

Tab. 16: Týž párový test produkce cyst bez Bonferroniho korekce.

V teplotách s vyšší produkcí cyst je příhodno se podívat na procento živých a prázdných cyst, což nám umožní lépe porozumět účelu samotných cyst i podmínkám, za jakých stomatocysty vydrží životaschopné. Z grafů na obrázku 26 je patrná korelace rostoucí teploty a změna poměrů mezi živými a prázdnými cystami během pokusu. Teplota 21 °C se opět ukazuje jako ideální, a s narůstající teplotou se zvětšuje procento prázdných cyst.



Obr. 26: Poměr prázdných a živých cyst *Synura petersenii* F25 ve vybraných teplotních skupinách. Hodnoty jsou uvedené pro všechna tři opakování v pátém a desátém dnu encystačního teplotního pokusu.

### 3.3 Vliv nedostatku dusíku a fosforu na produkci cyst

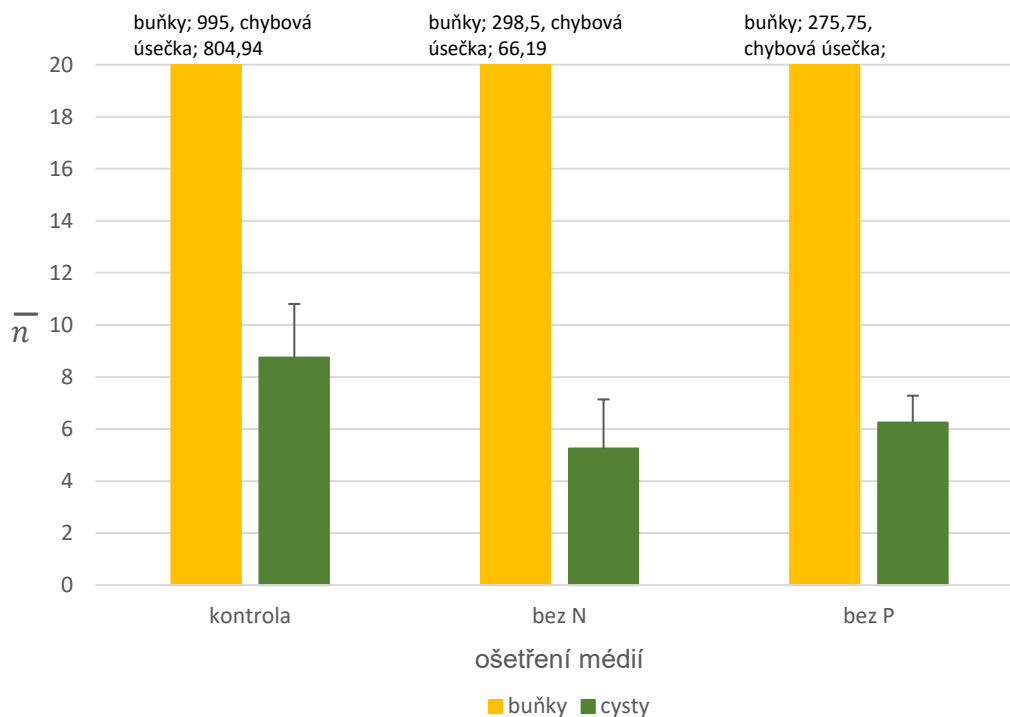
Testovala jsem vliv nedostatku dusíku a fosforu na tvorbu stomatocyst na třech chrysofytních kmenech. Kmen *Ochromonas tuberculata* po celou dobu pokusu ne vytvořil žádnou cystu. Kmen *Synura petersenii* E12 tvořil cysty, ale pouze zlomek množství oproti vegetativním

buňkám. Počty buněk se pohybovaly mezi 10 a 16 tisíci, zatímco počet cyst kolísal mezi 0 a 10. Kmen *Synura petersenii* F25 odpověděl na testované podmínky následujícím způsobem.

Během pokusu nevznikla žádná prázdná cysta, všechny byly životaschopné (uvádím pouze jako cysty). Obrázek 27 zachycuje stav po konci pokusu, grafy se vztahují k poslední odebrané destičce, která v podmínkách setrvala po celou dobu pokusu. Počty vzniklých stomatocyst se příliš neliší mezi jednotlivými médii. Nejvíce cyst vzniklo v kontrolním médiu a nejméně v médiu bez dusíku.



27d



Obr. 27: Výsledky encystačního experimentu s živinami na kmeni *Synura petersenii* F25 šestý den, poslední den pokusu. Kontrola s médiem beze změny, bez N označuje médium bez dusíku, bez P médium bez fosforu, n značí počet (buněk i cyst),  $\bar{n}$  značí průměrný počet. 27a – graf se všemi opakováními, 27b – zvětšený graf se zaměřením na počty cyst, 27c – průměr počtu buněk a cyst, chybová úsečka zobrazuje střední chybu odhadu, 27d – zvětšený graf s průměry se zaměřením na počty cyst, chybová úsečka zobrazuje střední chybu odhadu.

Nejvýmluvnější výsledky jsou opět růstové rychlosti a procentuální produkce stomatocyst v jednotlivých typech médií (tab. 17). V prvních dvou dnech nastává pokles růstu, podobně jako u přechozích teplotních experimentů. Po zbytek pokusu je růst velmi pomalý, i přesto lze říci, že v kontrolním médiu byl růst nejvyšší, zatímco v médiu bez fosforu nejnižší, ovšem rozdíl není výrazný. Celková produkce cyst byla nejvyšší v médiu bez fosforu (průměr 8,95 %), produkce v médiu bez dusíku a v kontrolním se příliš nelišila (průměrné hodnoty byly 3,34 a 3,91 %). Mann-Whitneyho test (tab. 18) podpořil signifikantní rozdíl produkce cyst v médiu bez fosforu, bez korekce i s Bonferroniho korekcí. Signifikantní rozdíl v rychlostech růstu párový test nepodpořil, opět to mohlo být způsobeno nízkým počtem opakování.



	médium	růstová rychlost	produkce cyst (%)
2. den	kontrolní	-0,081	3,99
	bez N	-0,079	3,53
	bez P	-0,076	10,19
4. den	kontrolní	0,092	4,24
	bez N	0,078	4,96
	bez P	0,063	13,89
6. den	kontrolní	0,074	3,50
	bez N	0,062	1,54
	bez P	0,048	2,78

Tab. 17: Růstové rychlosti a procentuální produkce cyst *Synura petersenii* F25 spočítané během testování různých médií. Každá hodnota je průměr ze čtyř opakování.

18a	kontrola	bez dusíku	bez fosforu
kontrola		0,1939	0,03038
bez dusíku	0,1939		0,1124
bez fosforu	0,03038	0,1124	

18b	kontrola	bez dusíku	bez fosforu
kontrola		0,5818	0,09115
bez dusíku	0,5818		0,3371
bez fosforu	0,09115	0,3371	

18c	kontrola	bez dusíku	bez fosforu
kontrola		0,5833	0,05305
bez dusíku	0,5833		0,01657
bez fosforu	0,05305	0,01657	

18d	kontrola	bez dusíku	bez fosforu
kontrola		1	0,1591
bez dusíku	1		0,04972
bez fosforu	0,1591	0,04972	

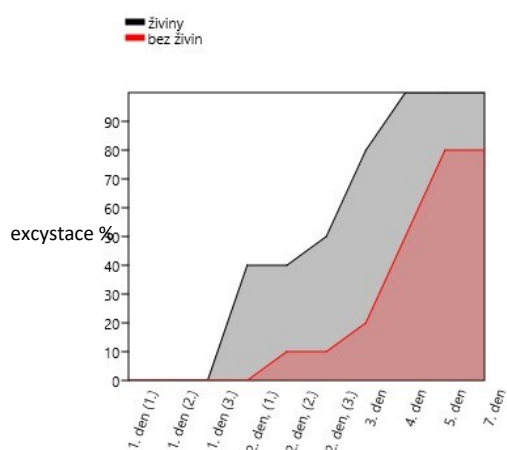
Tab. 18: Výsledky párových testů *Synura petersenii* F25 v různých typech médií. Tabulky 19a a 19b udávají výsledky srovnávání rychlosti růstu. Tabulky 19c a 19d udávají výsledky srovnávání produkce cyst. Tabulky 19b a 19d obsahují p-hodnoty s Bonferroniho korekcí.

### 3.4 Excystační experiment

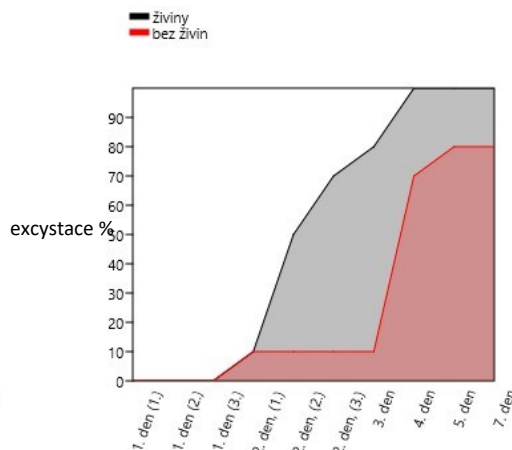
V tomto pokusu jsem použila jediný chrysofytní kmen, kompletně zacystovanou klonální kulturu *Synura uvella*. Excystaci jsem se snažila navodit pomocí různých teplot a doba pokusu byla sedm dní.

Po přesunu cyst ze tmy (17 °C) do nových experimentálních podmínek jsem první vegetativní buňky našla již 24 hodin od začátku první světelné fáze režimu osvětlení (16 : 8). Ve všech případech se jednalo o jednu buňku, či kolonii dvou nebo čtyř buněk, byly patrné šupiny i pohyblivý bičík, ale samotné buňky se nepohybovaly. Buňky jsem našla kromě teplotní skupiny 20 °C na všech destičkách s čerstvým médiem a ve třech teplotách se starým médiem

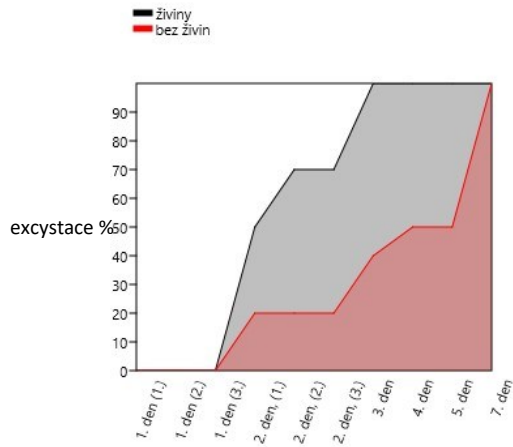
naředěným destilovanou vodou. Největší procento opakování s vegetativními buňkami bylo v 17 °C, a to jak v čerstvém médiu, tak ve starém médiu s destilovanou vodou, a 23 °C v čerstvém médiu (obr. 28). Po dalších 24 hodinách excystovalo v 17 °C v čerstvém médiu 100 % opakování (tj. vegetativní buňky se objevily ve všech deseti komůrkách). Ve dvou následujících dnech dosáhly 100 % excystace i zbylé teplotní skupiny. Za dobu experimentu (7 dnů) nedosáhla 100 % excystace teplotní skupina 26 °C v čerstvém médiu a teplotní skupiny 11 a 14° ve starém médiu s destilovanou vodou. Všechny zmíněné skupiny dosáhly 80 % excystace. Čtvrtý den pokusu se již objevily pohybující se kolonie. V podmínkách bez živin cysty excystovaly, buňky však byly velmi malé a kulaté, měly patrný bičík a netvořily kolonie. Počet opakování, kde došlo k excystaci rostl pomaleji. V průběhu pokusu se začala objevovat palmelová stádia, která byla na konci pokusu ve všech teplotních skupinách a značně zkomplikovala vyhodnocení experimentu. Nutno dodat, že excystace byla úspěšná i v předchozích dvou pilotních pokusech, které provázely stejné podmínky, pouze jsem změny kontrolovala až po dvou či pěti dnech. Tudíž se mi opakovaně dařilo navodit excystaci a získat tak kulturu bičíkovců.



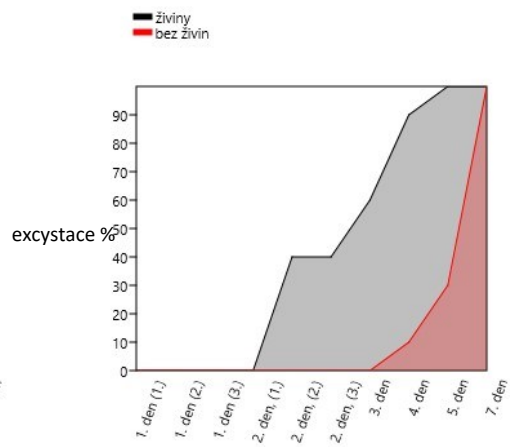
11 °C



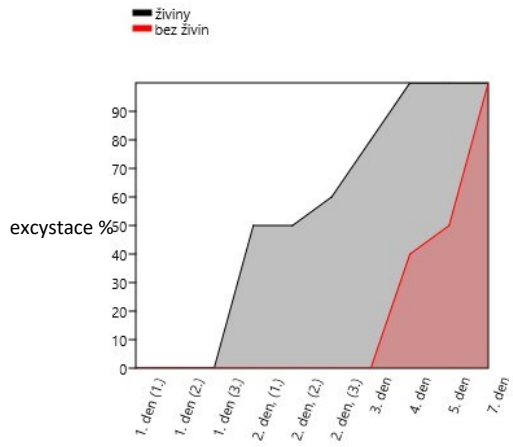
14 °C



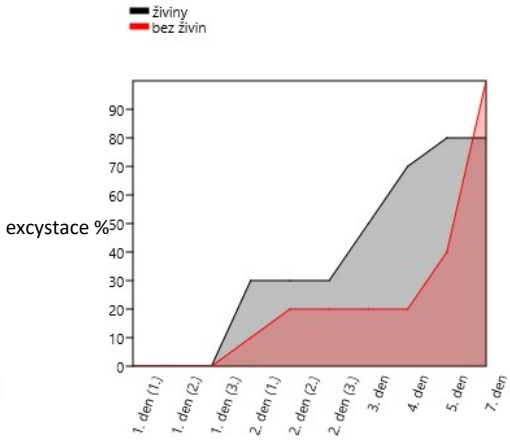
17 °C



20 °C



23 °C



26 °C

Obr. 28: Průběh excystace *Synura uvella* v různých teplotních skupinách, živiny = čerstvé médium, bez živin = staré médium naředěné destilovanou vodou, každých 10 % odpovídá jedné komůrce, ve které došlo k excystaci.

## 4 Diskuze

### 4.1 Popis cyst chrysofytních kmenů a jejich optimální růstová teplota

Podarilo se mi nafotit na elektronovém mikroskopu a popsat cysty všech čtyř kmenů. Popis stomatocysty *Ochromonas tuberculata* se shoduje s originálním popisem poskytnutým Davidem Hibberdem (1977) jak morfologií, tak naměřenými parametry. Stomatocysty mých dvou kmenů *Synura petersenii* odpovídají morfotypu stomatocysta 42 v Atlas of Chrysophycean Cysts (Duff et al., 1995). Cysty kmenu *S. petersenii* F25 byly mírně větší (průměr cysty 14–19  $\mu\text{m}$ , průměr póru 0,6–1,5  $\mu\text{m}$ ) než cysty kmenu E12 (průměr 13–16  $\mu\text{m}$ , průměr póru 0,5–0,9  $\mu\text{m}$ ). Průměr cyst kmenu E12 je identický s průměrem cyst *S. petersenii* použitých ve studii Sandgren & Flanagan, 1986. Stomatocysty *Synura uvella* je možné porovnat pouze s popisem ze světelného mikroskopu (Bourrelly, 1957). Tvarem stomatocysty mého kmenu odpovídají, ovšem neodpovídají velikostí. Také o solitérním výrůstku se Bourrelly (1957) nezmiňuje. Délka stomatocyst podle Bourrellyho se pohybuje v rozmezí 18–22  $\mu\text{m}$ , šířka u báze je 12–15  $\mu\text{m}$  a u vrcholu 10  $\mu\text{m}$ . Podle měření mých snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu je délka 5,9–7,1  $\mu\text{m}$ , šířka u báze je 4,8–6,1  $\mu\text{m}$  a u vrcholu 1,5–1,9  $\mu\text{m}$ . Ovšem měřítko z elektronového mikroskopu nekorespondovalo s měřítkem na fotce ze světelného mikroskopu. Na fotografiích ze světelného mikroskopu jsou stomatocysty více kulaté a jejich průměr je 15,5–21  $\mu\text{m}$  ( $n = 11$ ), a tato velikost již odpovídá popisu Bourrellyho (1957). Usuzuji, že tato nepřesnost je dána komplikacemi s přípravou preparátu. Pravděpodobně se mi podařilo ze slizu dostat jen ty nejmenší cysty.

Optimální teplotu pro růst vegetativních buněk *Ochromonas tuberculata* a dvou kmenů *Synura petersenii* v laboratorních podmínkách jsem zjišťovala měřením růstové rychlosti v sedmi teplotních skupinách od 5 do 23 °C při světelném režimu 16 : 8 hodinám světla a tmy, a ozářením 20–40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . *Ochromonas tuberculata* prospíval ve středních teplotách, tedy 11, 14 a 17 °C. Nejvyšší hodnoty růstové rychlosti byly zaznamenány při 14 °C. Tyto teploty jsou nižší než optimální teplota pro růst *Ochromonas* sp. ze studie Liu et al. (2019), která byla 24 °C (testovány byly teploty 8, 16 a 24 °C). Pravděpodobně se jedná o chladnomilnější klon. Usuzuji, že zde hraje roli i stáří izolátu, který pochází z roku 2006 a již mohl za roky kultivace přivyknout kultivační teplotě, která je 17 °C. *Synura petersenii* kmen E12 měla nejvyšší hodnoty růstové rychlosti v teplotách 14, 17 a 20 °C, ovšem mnoho odlehlých hodnot po Bonferroniho korekci ponechává s nejvyšší růstovou rychlostí pouze teploty 14 a 20 °C. *Synura petersenii* kmen F25 preferoval pouze 20 °C, spodní odlehlé hodnoty se ovšem překrývaly s nejbližšími teplotními skupinami 17 a 23 °C. Tyto teploty

korespondují s teplotami optimálního růstu *S. petersenii* testovaných v laboratorních podmínkách, které byly 15 °C, růst synura vykazovala v rozmezí 9–27 °C (Kim et al., 2008) a 20–25 °C, schopna růstu byla v teplotách 10–25 °C (Saxby-Rouen et al., 1997).

#### 4.2 Vliv vnějších podmínek na encystaci

V této diplomové práci jsem testovala vliv teploty a nedostatku fosforu a dusíku na produkci nepohlavně vzniklých stomatocyst. Teplotu jsem testovala v sedmi teplotních skupinách v rozmezí od 5 do 29 °C, při světelném režimu 16 : 8 hodinám světla a tmy, a ozářením 20–40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Ze tří testovaných kmenů se mi podařilo indukovat encystaci v dostatečné míře pouze u *Synura petersenii*, kmen F25. Zvýšenou produkci cyst jsem zaznamenala ve vyšších teplotách, 21 a 25 °C, nicméně pro prokázání rozdílné produkce cyst ve vyšších teplotách, bylo zapotřebí více opakování. Pokud by jí test podpořil, znamenalo by to, že ke zvýšené produkci u tohoto kmenu dochází v teplotě s maximálním růstem, což překvapivě odpovídá průběhu pohlavní encystace chrysofyt, která je závislá na populační hustotě, a je tedy nepřímo ovlivněna teplotou, která má vliv na růst populace (Sandgren, 1981, 1986; Sandgren & Flanagan, 1986). Teplotní stres tedy ani u jednoho z kmenů nezpůsobil zvýšenou produkci cyst. Nejvyšší procentuální produkce cyst *S. petersenii* F25, která byla dána mírou encystace, nikoliv větším úmrtím vegetativních buněk, bylo 14,1 %. Zjistila jsem také, že v teplotách, kde se tvoří cysty (21–29 °C), se se zvyšující teplotou zvyšuje počet prázdných cyst. Optimální je zde opět teplota 21 °C, kdy většina cyst zůstala životaschopných. Ovšem nemohu s jistotou říci, jestli u prázdných cyst došlo k excystaci či k odumření buňky během procesu encystace. Podobný efekt zvýšené teploty na množství prázdných cyst zaznamenal Sandgren (1986) u pohlavně vzniklých cyst *Dinobryon cylindricum* v laboratorních podmínkách, kde předpokládá, že cysty nedokončily maturaci. Podle Sandgrena (1986) tedy vliv teploty nekončí u dynamiky vegetativní populace a jako spouštěč encystace, ale teplota ovlivňuje i zlativky během tohoto procesu.

Vliv nedostatku dusíku a fosforu na produkci cyst jsem testovala ve WC médiu bez  $\text{NaNO}_3$  a ve WC médiu bez  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , v 17 °C, při světelném režimu 16 : 8 hodinám světla a tmy, a ozářením 20–40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . *Ochromonas tuberculata* nevytvořil žádnou cystu. *Synura petersenii* E12 produkovala velké množství vegetativních buněk, v řádech deseti tisíců b/ml, v poměru ku počtu cyst. S použitou metodikou bych nebyla schopná správně vyhodnotit výsledky pokusu. Mírně vyšší produkci cyst jsem zaznamenala v médiu bez dusíku, ovšem

maximální počet cyst byl 10. Kmen *Synura petersenii* F25 produkoval více cyst na médiu bez fosforu. Nejvyšší produkce cyst byla podobná jako u teplotního experimentu ve 21 °C, 13,9 %. Produkce cyst v kontrolním médiu a v médiu bez dusíku byla podobná. Růstová rychlost byla mírně vyšší v kontrolním médiu. Při porovnání deficitních médií, byla růstová rychlost mírně vyšší v médiu bez dusíku než v médiu bez fosforu, nicméně test rozdílnost neprokázal. Během pokusu jsem nenalezla žádnou prázdnou cystu. Důvodem mohla být stálá teplota, ve které byly kultury před experimentem i během něj.

Encystace zlativek nepohlavní cestou nebyla dosud příliš prostudována, bylo publikováno jen několik prací, se kterými mohu své výsledky porovnat. Encystace v přírodních podmínkách byla pozorována při zvyšující se teplotě (Sheath, et al., 1975; Agbeti & Smol, 1995), podobně jako v mém případě u *Synura petersenii* F25, ovšem v přírodních podmínkách za vyšší teploty docházelo ke klesání počtu vegetativních buněk. Také nevíme, jestli v přírodě šlo o pohlavní či nepohlavní encystaci. U mého pokusu toto odpovídá encystaci v teplotě 25 a 29 °C, ovšem největší produkce cyst byla v teplotě optimální pro růst, což je 21 °C. Agbeti & Smol (1995) zaznamenali vyšší frekvenci encystace také během limitace dusíkem, společně se zvýšenou teplotou. Usuzují tedy, že encystace v přírodních podmínkách je výsledkem kombinace více faktorů. Pokusy o nepohlavní encystaci v laboratorních podmínkách prováděl Hollen (2014), kdy podrobil *Chrysolepidomonas*, *Chrysosaccus*, *Dermatochrysis*, *Synura* a *Ochromonas* přechodu ze stálého osvětlení do režimu 16 : 8 hodinám světla a tmy při intenzitě světla 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a teplotě 21 °C. Srovnatelná teplota byla použita v experimentu encystace *S. petersenii* F25 v této práci. Hollen (2014) zmiňuje pouze, že k encystaci došlo, ovšem již nerozvádí, které stimuly ji indukovaly. Findenig et al. (2010) se pokoušeli o encystaci 90 kmenů různých druhů rodu *Spumella* a jí podobných bičíkovců v různých světelných režimech a teplotách (od bodu mrazu média po 30 °C). Encystovalo pouze šest kmenů a to těch, které pocházely z půdních lokalit či dočasných vodních těles a pouze při stáří jednoho týdne kultury. Proces encystace byl nezávislý na světelných či teplotních podmínkách. Toto pozorování navozuje otázku, zda je schopnost nepohlavní encystace dána typem habitatu či nastává při kolonizaci nové lokality, kdy není dostatek odlišně pohlavně laděných jedinců, mezi kterými by došlo k pohlavnímu rozmnožování. Toto by mohlo vysvětlit odlišnou produkci cyst dvou testovaných kmenů *Synura petersenii* (E12 a F25) na experimentální podmínky (E12 pochází z malé tůňky blízko osídlené oblasti ve Francii, F25 pochází z poměrně velkého jezera ve Švédsku). Můj pokus s nutričním deficitem vycházel ze Sandgrenovy studie (1981) na *Dinobryon cylindricum*. Nedostatek dusíku stimuloval

nepohlavní encystaci, zatímco nedostatek fosforu encystaci inhiboval. *Synura petersenii* F25 v mém případě odpovídala zvýšenou produkcí cyst na deficit fosforu. Dle těchto poznatků soudím, že nepohlavní encystace je druhově specifická a pravděpodobně i kmenově specifická. Předpokládám, že roli zde hrají ekofyziologické rozdíly mezi kmeny, které se odráží v reakci na změnu podmínek prostředí, v tomto případě teploty a dostupnosti živin. Tento můj závěr podporuje zjištění, že různé kmeny *D. cylindricum* reagovaly odlišně na teplotně stimulovanou pohlavní encystaci (Sandgren, 1986). Během experimentů v této studii se mi nepodařilo encystovat *Ochomonas tuberculata* a v signifikantní míře ani *Synura petersenii* E12. Pravděpodobně pro ně existuje jiný stimulující faktor encystace, jako například změna pH, deficit CO<sub>2</sub>, populační hustota či vyschnutí kultury. Lze také předpokládat, že kultura *Ochomonas tuberculata* za roky růstu v laboratorních podmínkách mohla postupně snížit schopnost encystace.

#### 4.3 Uchování zacystované kultury a navození excystace

Na začátku práce jsem obdržela plně zacystovanou kulturu *Synura uvella*. V režimu 17 °C a tmě jsem byla schopna uchovat zacystovanou kulturu až dva roky, po dvou letech i tato začala světlat, tedy ubývalo životaschopných cyst. Sandgren (1986) uchoval životaschopné cysty *Dinobryon cylindricum* jeden rok ve 4 °C a ve tmě. Uvádí také, že cysty byly v dormanci 2–3 měsíce před excystací. Tuto dobu dormance protáhl na 12 měsíců uchováním cyst při 15 °C, čehož jsem dosáhla taktéž. Ve výsledku byly stomatocysty schopné přežít rok do další sezóny. Nicméně doba dormance nebyla předmětem mého zkoumání. V přírodních podmínkách jsou v sedimentu za anoxických podmínek stomatocysty schopné přežít i desítky let (Cronberg, 1982).

Excystační experiment spočíval v přenesení cyst ze tmy do světelného režimu 16 : 8 hodinám světla a tmy a do šesti teplotních hladin (od 11 do 26 °C). Současně jsem testovala, jestli má vliv na excystaci přísun živin z čerstvého média. Opakovaně se mi podařilo buňky excystovat a získat vegetativní kulturu *Synura uvella*. K excystaci došlo ve všech teplotních hladinách a v médiu s živinami i ve starém médiu naředěném destilovanou vodou. Zásadní se zdá být tedy přechod ze tmy na světlo. Toto chování napovídá, že v přírodě je klíčové pro excystaci míchání vody v jezerech na jaře, v případě dimiktických jezer i na podzim, kdy se voda ze spodních vrstev dostává nahoru a tím s sebou vynese i cysty uložené na dně. Staré naředěné médium pak ovlivnilo růst populace po excystaci, většina vegetativních buněk utvořila palmelové stádium. Moje zjištění, že živiny ani teplota nemají vliv na excystaci podporuje studie Sandgren (1988). Cysty *D. cylindricum* excystovaly na světle, ale malé množství

excystovalo i ve tmě. Na základě těchto poznatků učinil závěr, že je excystace řízena endogenně a stomatocysty mohou excystovat kdykoliv. Souhlasím se Sandgrenem (1986), že teplota a světlo při dormanci a světlo při excystaci hrají významnou roli a pravděpodobně nevyžadují další vnější spouštěče. Úspěch populace proto, dle všeho, závisí na podmínkách ve vodním sloupci vhodných pro namnožení vegetativních buněk, spíše než na podmínkách na povrchu sedimentu (Sandgren, 1988). Souhlasně s těmito výsledky, nebyla v mém experimentu excystace závislá na obsahu živin v médiu. K vývoji vegetativních buněk došlo v čerstvém médiu s živinami i v naředěném starém médiu. Dle mého názoru měla pro excystaci také význam doba, kterou cysty strávily ve tmě. Usuzuji tak na základě mého pozorování životaschopnosti stomatocyst. Část kultury, která během uchovávání byla ponechaná na světle, neexcystovala a stomatocysty prodělávaly dormanci.

#### 4.4 Úskalí metodiky

Práce na tématu této diplomové práce s sebou přineslo výzvu v podobě zvládnutí metodiky. V první řadě neexistuje žádná univerzální metoda pro vyvolání encystace a excystace. Všem experimentům předcházelo několik pilotních pokusů, na jejichž základě jsem upravovala počet opakování, interval měření a metodu počítání. Uvědomuji si, že na to, aby měly výsledky lepší statistickou podporu, by bylo potřeba více opakování u encystačních experimentů. Vzhledem k počítání velkého množství komůrek s rychle rostoucími koloniálními bičíkovci, by to bylo velmi časově náročné a pro jednoho člověka nemožné. Věřím, že při použití větších objemů a v týmu by bylo možné získat průkaznější výsledky. Excystační experiment poukázal na to, jak jsou důležité podmínky, ve kterých je kultura udržovaná před samotným experimentem. Největším úskalím byl očekávaně sliz obalující cysty, který zkomplikoval přípravu i vyhodnocení excystačního experimentu. Cysty z něj skleněnou kapilárou téměř nebylo možno vyizolovat. Na základě mého zjištění, že excystace probíhá již 24 hodin od vystavení světlu, byla nutná rychlá inokulace cyst. Pravděpodobně jsem zde měla snížit počet teplotních skupin, nicméně jsem chtěla dodržet podobné rozpětí teplot jako v encystačních experimentech. Sliz neobsahoval pouze živé cysty, obsahoval zbytky mrtvých starých kolonií a neidentifikovatelné částice, kde nebylo možné přesně rozlišit jejich počet. Nenašla jsem v destičkách ani prázdné cysty, abych na základě jejich počtu mohla vyhodnotit excystaci. Pravděpodobně je zakrývaly excystované buňky. První vegetativní buňky velmi často připomínaly samotné cysty, protože byly velmi malé, kulaté, a ještě bez bičíku. Protože většinu metodiky jsem čerpala ze Sandgrenovy práce z let 1980–1990, chtěla jsem výstupy encystačních experimentů kvantifikovat o něco moderněji. Olli et



al. (2004) zavedl pojmy encyzační pravděpodobnost (encystment probability – pravděpodobnost, že vegetativní buňka encyduje) a encyzační míra (encystment rate – rozdíl mezi počtem vegetativních buněk daným dělením buněk a daným encyzací). Ovšem výpočet nebylo možné použít, protože v něm bylo počítáno se ztrátou vegetativních buněk pouze ve prospěch cyst. V mých experimentech docházelo k úhynům vegetativních buněk. Tudíž jsem použila procentuální produkci cyst, která má tu nevýhodu, že zhodnotí pouze okamžitý počet buněk a cyst. I přes tyto metodické nedostatky považuji tuto práci za úspěšnou a téma jako takové má z mého pohledu velký potenciál. Faktorů, jejichž vliv na encyzaaci by bylo možno zkoumat, je několik. Od testování vysoké hustoty populace a vyčerpání živin, nedostatku CO<sub>2</sub>, změny pH, vysoušení po kultivování se zooplanktonem či jinou skupinou řas (sloužící jako kompetitor o zdroje). I přesto, že jsem zvolila teplotu a konkrétní světelný režim, nevyčerpala jsem zdaleka jejich možné kombinace a přechody. Zajímavé by bylo také zjistit, zda vzniklé cysty mají jedno či dvě jádra (čili zda se jedná o vegetativní cystu či autogamii), a to pomocí fluorescenčního barvení DAPI, což jsem měla původně v úmyslu, ovšem mohlo by to být téma další práce.

#### 4.5 Výzkum odpočívajících stádií a jejich přínos

Jedním z důvodů, proč jsou stomatocysty předmětem zájmu biologů, je jejich morfologie, která je unikátní mezi odpočívajícími stádii. Stomatocysty mají obrovskou morfologickou diverzitu. Pochopení dynamiky encyzaace a excyzaace je podmíněno znalostí ekologických vlastností jednotlivých druhů chrysofyt, což komplikuje fakt, že u většiny cyst dosud není známa jejich biologická identita. Dle mých výsledků a předešlých studií jsou stimuly encyzaace druhově, možná i kmenově specifické. To vše komplikuje výzkum dynamiky tohoto odpočívajícího stádia. Oba procesy byly zkoumány na konci minulého století. Za posledních 20 let je většina studií zaměřena pouze na sběr cyst a jejich popis. Popis stomatocyst ale nestačí. Kromě spouštěčů nebyl například zkoumán proces karyogamie a meiozy, které doprovázejí excyzaaci. Nyní se nacházíme v době, kdy jsou molekulární metody na vzestupu, díky barkódování je odhalována skrytá diverzita v řasových skupinách a málokdo přistupuje k pracným a časově náročným experimentům, pro které neexistuje metodika. I přesto má význam se tímto tématem zabývat. Zlativky sice nevyklučují toxiny jako mořské obrněnky, ale některé druhy zlativek tvoří vodní květy a vylučují rybinový zápach, který může znehodnotit pitnou vodu na přehradách. Velké uplatnění vidím také v řasových sbírkách, které navrhoval již Corliss & Esser (1974). Pokud by byl znám spouštěč encyzaace a

excystace, stačilo by kulturu s řasami nechat zacystovat a nebylo by zapotřebí ji pravidelně přeočkovávat. Ušetřilo by se tím jak médium tak použitý materiál, a především čas lidí, kteří pravidelně udržují řasové sbírky.

#### 4.6 Výzkum klidových stádií v rámci řasových skupin

V současnosti jsou intenzivně studována klidová stádia mořských toxických druhů obrněnek a rozsivek, tvořících rozsáhlé vodní květy v pobřežních oblastech. Encystace totiž ve finálním stádiu květu zajišťuje zdroj vegetativních buněk v další sezóně a lze díky tomu předpovědět budoucí vývoj populace. Ve sladkých vodách jsou přednostně před zlativkami studována odpočívající stádia *Gonyostomum semen* a sinic, které svými vodními květy znemožňují využívání jezer k rekreaci. Nejbližší k porovnání s mými závěry o chrysofytní encystaci mají z ekologického hlediska sladkovodní obrněnky a *G. semen*. Encystace u obrněnek byla v laboratorních podmínkách většinou stimulována médiem s nedostatkem dusíku nebo s nedostatkem fosforu (Pfiester, 1975, 1976, 1977; Sako et al., 1984). Podobně byla zaznamenána encystace *Ceratium hirudinella* při nedostatku dusíku, fosforu a amoniaku (Heaney & Talling, 1980). Mírný vliv povrchové teploty vody byl zaznamenán při encystaci dvou druhů rodu *Peridinium* (Rengefors et al., 1998; Rengefors & Meyer, 1998). Excystace byla navozena u sladkovodních obrněnek přenesením na světlo a do vyšší teploty (von Stosch, 1973). Rengefors et al. (1998) vyzdvihli význam dormance a vnitřních biologických hodin společně s teplotou, jako důležitých faktorů pro excystace. K excystaci je nezbytný kyslík, ovšem světlo vyžadují jen některé druhy (Bravo & Anderson, 1994; Anderson et al., 1987; Rengefors & Anderson, 1998). Nepohlavní encystace *Gonyostomum semen* byla stimulována tmou nebo přenesením do média bez dusíku nebo bez fosforu. Podobně i pohlavní encystace, která byla pozorována ve starém médiu a v médiu bez dusíku nebo fosforu. Uchování životaschopných cyst probíhalo lépe v 16 °C oproti 4 °C. K excystaci došlo v teplotách mezi 20 a 25 °C po proběhlé dormanci (Figueroa & Rengefors, 2006). Zatímco u obrněnek a *G. semen* je pohlavní i nepohlavní encystace navozená stresovými podmínkami prostředí, u zlativek, jak se zdá, to neplatí. Pohlavní encystace je odvozena od abundance vegetativních buněk (Sandgren, 1981, 1991; Sandgren & Flanagan, 1986) a jak se zdá, ani nepohlavní encystace není odpovědí na stres. Toto je pravděpodobně nejzásadnější rozdíl mezi dynamikou odpočívajících stádií u sladkovodních řas.

## 5 Závěr

Vliv enviromentálních faktorů na nepohlavní encystaci zlativek je pravděpodobně druhově specifický. Navodit produkci stomatocyst se mi ze tří testovaných kmenů (*Synura petersenii* E12, *Synura petersenii* F25, *Ochromonas tuberculata*) podařilo v dostatečné míře pouze u *S. petersenii* F25.

Mezi produkcemi cyst v různých teplotách nebyl signifikantní rozdíl. Pro podpoření hypotézy, že ve vyšších teplotách došlo častěji k encystaci, je potřeba pokus zopakovat s více opakováními.

Signifikantně vyšší byla produkce stomatocyst v médiu bez fosforu. Médium bez dusíku nijak encystaci neovlivnilo.

Podařilo se mi nalézt způsob uchování kultury s životaschopnými cystami *Synura uvella*. Pomocí vnějších podmínek se mi opakovaně podařilo navodit excystaci a získat populaci bičíkovců. Živiny ani teplota neměly na excystaci vliv. Hlavním stimulem bylo přenesení kultury ze tmy na světlo po prodělané dormanci.

## 6 Seznam literatury

- Adam, D. P., & Mahood, A. D. (1979). A preliminary annotated bibliography on siliceous algal cysts and scales. No. 79-1215). US Geological Survey.
- Adam, D. P., & Mahood, A. D. (1981). Chrysophyte cysts as potential environmental indicators. *Geological Society of America Bulletin*, 92(11), 839-844.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Heiss, A. et al. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of eukaryotic microbiology*, 59(5), 429-514.
- Agbeti, M. D., & Smol, J. P. (1995). Chrysophyte population and encystment patterns in two Canadian lakes 1. *Journal of Phycology*, 31(1), 70-78.
- Andersen, R. A. (1987). Synurophyceae classis nov., a new class of algae. *American journal of botany*, 74(3), 337-353.
- Andersen, R. A. (1991). The cytoskeleton of chromophyte algae. In *The Cytoskeleton of Flagellate and Ciliate Protists* (pp. 143-159). Springer, Vienna.
- Andersen, R. A., & Mulkey, T. J. (1983). The occurrence of chlorophylls c1 and c2 in the Chrysophyceae 1. *Journal of phycology*, 19(3), 289-294.
- Andersen, R. A., & Preisig, H. (2002). Synurophyceae. An illustrated guide to the protozoa, 2, 759-775.
- Andersen, R. A., Van de Peer, Y., Potter, D., Sexton, J. P., Kawachi, M., & LaJeunesse, T. (1999). Phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the Chrysophyceae. *Protist*, 150(1), 71-84.
- Anderson, D. M. (1980). Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes 1. *Journal of Phycology*, 16(2), 166-172.
- Anderson, D. M. (1989). Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. *Red Tides.*, 11-16.
- Anderson, D. M., Chisholm, S. T., & Watras, C. J. (1983). Importance of life cycle events in the population dynamics of *Gonyaulax tamarensis*. *Marine Biology*, 76(2), 179-189.

- Anderson, D. M., Coats, D. W., & Tyler, M. A. (1985). Encystment of the dinoflagellate *Gyrodinium uncatenum*: temperature and nutrient effects 1. *Journal of Phycology*, 21(2), 200-206.
- Anderson, D. M., & Morel, F. M. (1979). The seeding of two red tide blooms by the germination of benthic *Gonyaulax tamarensis* hypnocysts. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 8(3), 279-293.
- Anderson, D. M., Taylor, C. D., & Armbrust, E. V. (1987). The effects of darkness and anaerobiosis on dinoflagellate cyst germination 1, 2. *Limnology and Oceanography*, 32(2), 340-351.
- Armand, L. K., & Zielinski, U. (2001). Diatom species of the genus *Rhizosolenia* from Southern Ocean sediments: distribution and taxonomic notes. *Diatom Research*, 16(2), 259-294.
- Astorga, A., Oksanen, J., Luoto, M., Soininen, J., Virtanen, R., & Muotka, T. (2012). Distance decay of similarity in freshwater communities: do macro-and microorganisms follow the same rules? *Global Ecology and Biogeography*, 21(3), 365-375.
- Battarbee, R. W. (1984). Diatom analysis and the acidification of lakes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 305(1124), 451-477.
- Betts-Piper, A. M., Zeeb, B. A., & Smol, J. P. (2004). Distribution and autecology of chrysophyte cysts from high Arctic Svalbard lakes: preliminary evidence of recent environmental change. *Journal of Paleolimnology*, 31(4), 467-481.
- Bhatti, S., & Colman, B. (2008). Inorganic carbon acquisition in some synurophyte algae. *Physiologia plantarum*, 133(1), 33-40.
- Bird, D. F., & Kalff, J. (1987). Algal phagotrophy: regulating factors and importance relative to photosynthesis in *Dinobryon* (Chrysophyceae) 1. *Limnology and Oceanography*, 32(2), 277-284.
- Boenigk, J., Wodniok, S., Bock, C., Beisser, D., Hempel, C., Grossmann, L., ... & Jensen, M. (2018). Geographic distance and mountain ranges structure freshwater protist communities on a European scale. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2, e21519.
- Bold, H. C., & Wynne, M. J. (1985). *Introduction to the Algae: Structure and Reproduction*, 2nd Edition. Prentice-Hall, Inc, Toronto, 445(5), 12.

- Bourrelly, P. (1957). Recherches sur les Chrysophycées. Rev. Algol. Mem. Hors-Ser., 1, 1-412.
- Bourrelly, P. (1963). Loricae and cysts in the Chrysophyceae. Annals of the New York Academy of Sciences, 108(2), 421-429.
- Bravo, I., & Anderson, D. M. (1994). The effects of temperature, growth medium and darkness on excystment and growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from northwest Spain. Journal of Plankton Research, 16(5), 513-525.
- Buchanan, R. E. (1918). Life phases in a bacterial culture. The Journal of Infectious Diseases, 23 (2), 109-125.
- Burki, F., Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M., Skjæveland, Å., Nikolaev, S. I., Jakobsen, K. S., & Pawlowski, J. (2007). Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. PloS one, 2(8), e790.
- Cabala, J., Piatek, M. (2004, June). Chrysophycean stomatocysts from the Staw Toporowy Nizni lake (Tatra National Park, Poland). Annales de limnologie-international Journal of limnology, 40 (2), 149-165).
- Cain, J. R., & Trainor, F. B. (1976). Regulation of gametogenesis in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) 1. Journal of phycology, 12(4), 383-390.
- Carney, H. J., & Sandgren, C. D. (1983). Chrysophycean cysts: indicators of eutrophication in the recent sediments of Frains Lake, Michigan, USA. Hydrobiologia, 101(3), 195-202.
- Cavalier-Smith, T. (1987). The origin of eukaryote and archaeobacterial cells. Annals of the New York Academy of Sciences, 503(1), 17-54.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 52(2), 297-354.
- Cavalier-Smith, T., & Chao, E. E. (2006). Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). Journal of molecular evolution, 62(4), 388-420.
- Charles, D. F. (1982). Studies of Adirondack Mountain (NY) lakes: Limnological characteristics and sediment diatom-water chemistry relationships. United States.

- Cienkowski, L. V. (1870). Ueber Palmellaceen und einige Flagellaten. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 7, 421-438.
- Cloern, J. E. (1977). Effects of light intensity and temperature on *Cryptomonas ovata* (Cryptophyceae) growth and nutrient uptake rates 1. *Journal of Phycology*, 13(4), 389-395.
- Collins, R. P., & RP, C. (1972). An analysis of the free amino acids in *Synura petersenii*. *Phyton; Argent.*, 29. 1-2. 89-94
- Conrad, W. (1926). Recherches sur les Flagellates de nos eaux saumâtres. *Arch. Protistenk.*, 55, 167-231.
- Corliss, J. O. (2001). Protozoan cysts and spores. e LS.
- Corliss, J. O., & Esser, S. C. (1974). Comments on the role of the cyst in the life cycle and survival of free-living protozoa. *Transactions of the American Microscopical Society*, 578-593.
- Corliss, J. O., & Lom, J. (1985). An annotated glossary of protozoological terms. In *An illustrated guide to the protozoa* (576-602). Society of Protozoologists Lawrence, Kansas.
- Crawford, R. M., & Schmid, A. M. (1986). Ultrastructure of silica deposition in diatoms. *Biom mineralization in lower plants and animals*, 30, 291-314.
- Cronberg, G. (1980). Cyst development in different species of *Mallomonas* (Chrysophyceae) studied by scanning electron microscopy. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 56, 421-434,
- Cronberg, G. (1982). Changes in the phytoplankton of Lake Trummen induced by restoration. In *Lakes and Water Management* (185-193). Springer, Dordrecht.
- Cronberg, G. (1986). Chrysophycean cysts and scales in lake sediments: a review. In *Chrysophytes: Aspects and problems. International chrysophyte symposium. 1* (281-315).
- Cronberg, G. (1989). Stomatocysts of *Mallomonas hamata* and *M. heterospina* (Mallomonadaceae, Synurophyceae) from South Swedish lakes. *Nordic journal of botany*, 8(6), 683-692.
- Cronberg, G. (2005). The life cycle of *Gonyostomum semen* (Raphidophyceae). *Phycologia*, 44(3), 285-293.

- Cronberg, G., Lindmark, G., & Björk, S. (1988). Mass development of the flagellate *Gonyostomum semen* (Raphidophyta) in Swedish forest lakes-an effect of acidification?. *Hydrobiologia*, 161(1), 217-236.
- Cronberg, G., & Kristiansen, J. (1980). Synuraceae and other Chrysophyceae from central Smaland, Sweden. *Botaniska Notiser*, 133(4), 595-618.
- Cronberg, G., & Sandgren, C. D. (1986). A proposal for the development of standardized nomenclature and terminology for chrysophycean statospores. *Chrysophytes: aspects and problems*, 317-328.
- Dale, B., Yentsch, C. M., & Hurst, J. W. (1978). Toxicity in resting cysts of the red-tide dinoflagellate *Gonyaulax excavata* from deeper water coastal sediments. *Science*, 201(4362), 1223-1225.
- Davis, C. O., Hollibaugh, J. T., Seibert, D. L., Thomas, W. H., & Harrison, P. J. (1980). Formation of resting spores by *Leptocylindrus danicus* (Bacillariophyceae) in a controlled experimental ecosystem 1. *Journal of Phycology*, 16(2), 296-302.
- del Campo, J., & Massana, R. (2011). Emerging diversity within chrysophytes, choanoflagellates and bicosoecids based on molecular surveys. *Protist*, 162(3), 435-448.
- Doflein, F. (1923). Untersuchungen über Chrysomonadinen. III. Arten von *Chromulina* und *Ochromonas* aus dem badischen Schwarzwald und ihre Cystenbildung. *Arch. Protistenk*, 46, 267-327.
- Drebes, G. (1977). Sexuality. in "The Biology of Diatoms", ed. By D. Werner.
- Duff, K., Zeeb, B. A., & Smol, J. P. (1995). Atlas of chrysophycean cysts. Springer, Dordrecht.
- Durrschmidt, M. (1980). Some Ecological Observations on Environmental Parameters, Planktonic Seasonal Succession and Biomass in Rio Cruces (Prov. Valdivia), South Chile. *Archiv für Hydrobiologie*, 88(3).
- Ehrenberg, C. G. (1854). *Mikrogeologie: Das Erden und Felsen schaffende Wirken des unsichtbar kleinen selbständigen Lebens auf der Erde* (Vol. 1). L. Voss.
- Ellis, R. J., & Machlis, L. (1968). Control of sexuality in *Golenkinia*. *American Journal of Botany*, 55(5), 600-610.



- Eloranta, P. (1986). Phytoplankton structure in different lake types in central Finland. *Ecography*, 9(3), 214-224.
- Eloranta, P. (1989). Scaled chrysophytes (Chrysophyceae and Synurophyceae) from national park lakes in southern and central Finland. *Nordic journal of botany*, 8(6), 671-681.
- Figuerola, R. I., & Rengefors, K. (2006). Life cycle and sexuality of the freshwater raphidophyte *Gonyostomum semen* (Raphidophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 42(4), 859-871.
- Findenig, B. M., Chatzinotas, A., & Boenigk, J. (2010). Taxonomic and ecological characterization of stomatocysts of spumella-like flagellates (Chrysophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 46(5), 868-881.
- Fischer, A. D., Brosnahan, M. L., & Anderson, D. M. (2018). Quantitative response of *Alexandrium catenella* cyst dormancy to cold exposure. *Protist*, 169(5), 645-661.
- Franke, W. W., & Herth, W. (1973). Cell and lorica fine structure of the chrysomonad alga, *Dinobryon sertularia* Ehr.(Chrysophyceae). *Archiv für Mikrobiologie*, 91(4), 323-344.
- Fritsch, F. E. (1935). The structure and reproduction of the algae volume I, Introduction, Chlorophyceae, Xanthophyceae, chrysophyceae, Bacillariophyceae, Cryptophyceae, Dinophyceae, Chloromonadineae, euglenineae, Colourless flagellata: Volume II, Foreword, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae. Cambridge University Press.
- Fritsch, F. E. (1948). Contributions to our knowledge of British algae. *Hydrobiologia*, 1(1), 115-125.
- Fryxell, G. A. (1983). Survival strategies of the algae. Cambridge University Press Archive.
- Fryxell, G. A., & Prasad, A. K. S. K. (1990). *Eucampia antarctica* var. *recta* (Mangin) stat. nov.(Biddulphiaceae, Bacillariophyceae): life stages at the Weddell Sea ice edge. *Phycologia*, 29(1), 27-38.
- Garrison, D. L. (1981). Monterey Bay phytoplankton. II. Resting spore cycles in coastal diatom populations. *Journal of Plankton Research*, 3(1), 137-156.
- Gerber, N., & Kokko, H. (2018). Abandoning the ship using sex, dispersal or dormancy: multiple escape routes from challenging conditions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1757), 20170424.

- Goldman, J. C., & Carpenter, E. J. (1974). A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth 1. *Limnology and Oceanography*, 19(5), 756-766.
- Guillard, R. R., Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide c 1, 2. *Journal of Phycology*, 8(1), 10-14.
- Gutiérrez, J. C., Martin-González, A., & Callejas, S. (1998). Nuclear changes, macronuclear chromatin reorganization and DNA modifications during ciliate encystment. *European Journal of Protistology*, 34(2), 97-103.
- Gutiérrez, J. C., Martin-Gonzalez, A., & Matsusaka, T. (1990). Towards a generalized model of encystment (cryptobiosis) in ciliates: a review and a hypothesis. *BioSystems*, 24(1), 17-24.
- Hallegraeff, G. M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32(2), 79-99.
- Hallegraeff, G. M., & Bolch, C. J. (1991). Transport of toxic dinoflagellate cysts via ships' ballast water. *Marine pollution bulletin*, 22(1), 27-30.
- Hallegraeff, G. M., & Bolch, C. J. (1992). Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *Journal of plankton research*, 14(8), 1067-1084.
- Hargraves, P. E. (1976). Studies on marine plankton diatoms. II. Resting spore morphology 1. *Journal of Phycology*, 12(1), 118-128.
- Hargraves, P. E., & French, S. (1975). Survival characteristics of marine diatom resting spores. In *Journal of Phycology*. Vol. 11, (6-6). 810 East 10th St, Lawrence, Ks 66044: Phycological Soc Amer Inc.
- Healey, F. P. (1983). Effect of temperature and light intensity on the growth rate of *Synura sphagnicola*. *Journal of plankton research*, 5(5), 767-774.
- Heaney, S. I., & Talling, J. F. (1980). *Ceratium hirundinella* – ecology of a complex, mobile, and successful plant. Annual Report, Freshwater Biological Association, Ambleside. 27-40
- Hibberd, D. J. (1976). The ultrastructure and taxonomy of the Chrysophyceae and Prymnesiophyceae (Haptophyceae): a survey with some new observations on the ultrastructure of the Chrysophyceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 72(2), 55-80.

- Hibberd, D. J. (1977). Ultrastructure of cyst formation in *Ochromonas tuberculata* (Chrysophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 13(4), 309-320.
- Hoban, M. A., Fryxell, G. A., & Buck, K. R. (1980). Biddulphioid diatoms: resting spores in antarctic *Eucampia* and *Odontella* 1. *Journal of Phycology*, 16(4), 591-602.
- Holen, D. A. (2010). Mixotrophy in two species of *Ochromonas* (Chrysophyceae). *Nova Hedwegia Beiheft*, 136, 153-165.
- Holen, D. A. (2014). Chrysophyte stomatocyst production in laboratory culture and descriptions of seven cyst morphotypes. *Phycologia*, 53(5), 426-432.
- Huber, A. L. (1985). Factors affecting the germination of akinetes of *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae). *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 73-78.
- Ishizaka, J., Kaichi, M., & Takahashi, M. (1987). Resting spore formation of *Leptocylindrus danicus* (Bacillariophyceae) during short time-scale upwelling and its significance as predicted by a simple model. *Ecological research*, 2(3), 229-242.
- Jeong, M., Kim, J. I., Jo, B. Y., Kim, H. S., Siver, P. A., & Shin, W. (2019). Surviving the marine environment: two new species of *Mallomonas* (Synurophyceae). *Phycologia*, 58(3), 276-286.
- Kaczmarek, I., Poulíčková, A., Sato, S., Edlund, M. B., Idei, M., Watanabe, T., & Mann, D. G. (2013). Proposals for a terminology for diatom sexual reproduction, auxospores and resting stages. *Diatom Research*, 28(3), 263-294.
- Kahru, M., Horstmann, U., & Rud, O. (1994). Satellite detection of increased cyanobacteria blooms in the Baltic Sea: natural fluctuation or ecosystem change?. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 23, 469-472.
- Kamenik, C., & Schmidt, R. (2005). Chrysophyte resting stages: a tool for reconstructing winter/spring climate from Alpine lake sediments. *Boreas*, 34(4), 477-489.
- Kaplan-Levy R.N., Hadas O., Summers M.L., Rucker J., Sukenik A. (2010) Akinetes: Dormant Cells of Cyanobacteria. In: Lubzens E., Cerda J., Clark M. (eds) *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*. Topics in Current Genetics, vol 21. Springer, Berlin, Heidelberg

- Karlsson, I. (1999). On the germination of the akinete-forming cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata*, in Lake Erken, Sweden. *Algological Studies*, 94, 175-180.
- Kim, J., Hee Shin, M., Ok Lee, K., & Lak Kim, H. (2008). Effect of environmental conditions on the growth of *Synura petersenii* (Synurophyceae) in vitro and two eutrophic water bodies in Korea. *Nova Hedwigia*, 529-544.
- Klaveness, D. (2019). *Hydrurus foetidus* (Chrysophyceae): an update and request for observations. *Algae*, 34(1), 1-5.
- Komarek, J., & Anagnostidis, K. (1989). Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 - Nostocales. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Monographische Beiträge*, 82(3), 247-345.
- Kremp, A., & Anderson, D. M. (2000). Factors regulating germination of resting cysts of the spring bloom dinoflagellate *Scrippsiella hangoei* from the northern Baltic Sea. *Journal of Plankton Research*, 22(7), 1311-1327.
- Kristiansen, J. (1972). Studies on the lorica structure in Chrysophyceae. *Svensk bot Tidskr.* 184-190.
- Kristiansen, J. (1975). On the occurrence of the species of *Synura* (Chrysophyceae). *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 19(4), 2709-2715.
- Kristiansen, J. (1981). Distribution problems in the Synuraceae (Chrysophyceae). *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 21(3), 1444-1448.
- Kristiansen, J. R. (1986). Silica-scale bearing chrysophytes as environmental indicators. *British phycological journal*, 21(4), 425-436.
- Kristiansen, J. (1988). Seasonal occurrence of silica-scaled chrysophytes under eutrophic conditions. *Hydrobiologia*, 161(1), 171-184.
- Kristiansen, J. (2000). Cosmopolitan chrysophytes. *Systematics and geography of plants*, 291-300.
- Kristiansen, J., & Škaloud, P. C. (2017). Handbook of the Protists. Archibald, J., Simpson, A., Slamovits, C., Eds, 331-366.

- Kuwata, A., Hama, T., & Takahashi, M. (1993). Ecophysiological characterization of two life forms, resting spores and resting cells, of a marine planktonic diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, formed under nutrient depletion. *Marine Ecology Progress Series*, 245-255.
- Lackey, J. B. (1967). Aquatic biology and the water works engineer. *Biology of Water Pollution: A Collection of Selected Papers on Stream Pollution, Waste Water, and Water Treatment*, 81, 236-244.
- Leira, M., & Sabater, S. (2005). Diatom assemblages distribution in Catalan rivers, NE Spain, in relation to chemical and physiographical factors. *Water research*, 39(1), 73-82.
- Lepistö, L., Antikainen, S., & Kivinen, J. (1994). The occurrence of *Gonyostomum semen* (Ehr.) Diesing in Finnish lakes. *Hydrobiologia*, 273(1), 1-8.
- Liu, T., Yu, J., Su, M., Jia, Z., Wang, C., Zhang, Y., ... & Yang, M. (2019). Production and fate of fishy odorants produced by two freshwater chrysophyte species under different temperature and light conditions. *Water research*, 157, 529-534.
- Maguire, B. (1963). The passive dispersal of small aquatic organisms and their colonization of isolated bodies of water. *Ecological Monographs*, 33(2), 161-185
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., ... & Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 102-112.
- Matrai, P., Thompson, B., & Keller, M. (2005). Circannual excystment of resting cysts of *Alexandrium* spp. from eastern Gulf of Maine populations. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 52(19-21), 2560-2568.
- Matsuoka, K., & Fukuyo, Y. A. S. U. W. O. (2000). Technical guide for modern dinoflagellate cyst study. WESTPAC-HAB, Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan.
- McQuoid, M. R., & Hobson, L. A. (1995). Importance of resting stages in diatom seasonal succession 1. *Journal of phycology*, 31(1), 44-50.
- Mechling, J. A., & Kilham, S. S. (1982). Temperature effects on silicon limited growth of the lake Michigan diatom *Stephanodiscus minutus* (Bacillariophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 18(2), 199-205.

- Moore, D., O'donohue, M., Shaw, G., & Critchley, C. (2003). Potential triggers for akinete differentiation in an Australian strain of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (AWT 205/1). *Hydrobiologia*, 506(1), 175-180.
- Moss, B. (1973). The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: an experimental study: II. The role of pH and the carbon dioxide-bicarbonate system. *The Journal of Ecology*, 157-177.
- Myers, J. H., Beardall, J., Allinson, G., Salzman, S., Robertson, S., & Gunthorpe, L. (2011). Potential triggers of akinete differentiation in *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae) isolated from Australia. *Hydrobiologia*, 671(1), 165-180.
- Nehring, S. (1993). Mechanisms for recurrent nuisance algal blooms in coastal zones: resting cyst formation as life-strategy of dinoflagellates. *Lang.* 454-467.
- Olli, K. (2004). Temporary cyst formation of *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae) in natural populations. *Marine Biology*, 145(1), 1-8.
- Olli, K., Neubert, M. G., & Anderson, D. M. (2004). Encystment probability and encystment rate: new terms to quantitatively describe formation of resting cysts in planktonic microbial populations. *Marine Ecology Progress Series*, 273, 43-48.
- Olrik, K. (1998). Ecology of mixotrophic flagellates with special reference to Chrysophyceae in Danish lakes. In *Phytoplankton and Trophic Gradients* (329-338). Springer, Dordrecht.
- Oshima, Y., Singh, H.T., Fukuyo, Y. & Yasumoto, T. (1982). Identification and toxicity of the resting cysts of *Protogonyaulax* found in Ofunato Bay. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48(9), 1303-1305
- Pajunen, V., Luoto, M., & Soininen, J. (2016). Climate is an important driver for stream diatom distributions. *Global Ecology and Biogeography*, 25(2), 198-206.
- Patterson, D. J. (1989). Stramenopiles: chromophytes from a protistan perspective. *The chromophyte algae: problems and perspectives*, 357-379.
- Peterson, H. G., Healey, F. P., & Wagemann, R. (1984). Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(6), 974-979.
- Pfiester, L. A. (1975). Sexual reproduction of *Peridinium cinctum* f. *ovoplanum* (Dinophyceae) 1, 2. *Journal of phycology*, 11(3), 259-265.

- Pfiester, L. A. (1976). Sexual reproduction of *Peridinium willei* (Dinophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 12(2), 234-238.
- Pfiester, L. A. (1977). Sexual reproduction of *Peridinium gatunense* (Dinophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 13(1), 92-95.
- Piatek, J. (2007). Chrysophyte stomatocysts from sediments in a man-made water reservoir in central Poland. *Annales Botanici Fennici*, 44(3), 186-193.
- Pitcher, G. C. (1986). Sedimentary flux and the formation of resting spores of selected *Chaetoceros* species at two sites in the southern Benguela system. *South African Journal of Marine Science*, 4(1), 231-244.
- Preisig, H. R. (1994). Siliceous structures and silicification in flagellated protists. In *The protistan cell surface* (29-42). Springer, Vienna.
- Preisig, H. R., & Andersen, R. A. (2002). Chrysophyceae. An illustrated guide to the protozoa, 2, 693-730.
- Preisig, H. R., Anderson, O. R., Corliss, J. O., Moestrup, Ø., Powell, M. J., Roberson, R. W., & Wetherbee, R. (1994). Terminology and nomenclature of protist cell surface structures. In *The Protistan Cell Surface* (1-28). Springer, Vienna.
- Reimann, B. E. F. (1964). Deposition of silica inside a diatom cell. *Experimental cell research*, 34(3), 605-608.
- Rengefors, K., & Anderson, D. M. (1998). Environmental and endogenous regulation of cyst germination in two freshwater dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 34(4), 568-577.
- Rengefors, K., Anderson, D. M., & Pettersson, K. (1996). Phosphorus uptake by resting cysts of the marine dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea*. *Journal of Plankton Research*, 18(9), 1753-1765.
- Rengefors, K., Karlsson, I., & Hansson, L. A. (1998). Algal cyst dormancy: a temporal escape from herbivory. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1403), 1353-1358.
- Rengefors, K., & Meyer, B. (1998). *Peridinium euryceps* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae), a cryophilic dinoflagellate from Lake Erken, Sweden. *Phycologia*, 37(4), 284-291.

- Reynolds, C. S. (1984). Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. *Freshwater biology*, 14(2), 111-142.
- Reynolds, C. S. (1986). Algae as Ecological Indicators. 613-614.
- Round, F. E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). *Diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge University press.
- Sako Y., Ishida Y., Kadota H., & Hata Y. (1984). Sexual reproduction and cyst formation in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50(5), 743-750.
- Sanders, R. W., & Porter, K. G. (1988). Phagotrophic phytoflagellates. *Advances in microbial ecology*, 167-192.
- Sandgren, C. D., & CD, S. (1980). An ultrastructural investigation of resting cyst formation in *Dinobryon cylindricum* Imhof (Chrysophyceae, Chrysophycota). *Protistologica*. 16(2). 259-276.
- Sandgren, C. D. (1981). Characteristics of sexual and asexual resting cyst (statospore) formation in *Dinobryon cylindricum* Imhof (Chrysophyta) 1. *Journal of Phycology*, 17(2), 199-210.
- Sandgren, C. D. (1983). Morphological variability in populations of chrysophycean resting cysts. i. genetic (interclonal) and encystment temperature effects on morphology 1. *Journal of Phycology*, 19(1), 64-70.
- Sandgren, C. D. (1986). Effects of environmental temperature on the vegetative growth and sexual life history of *Dinobryon cylindricum* Imhof. In Kristiansen, J. & Andersen, R. A., (1986) *Chrysophytes: aspects and problems*. Cambridge; New York: Cambridge University Press.
- Sandgren, C. D. (1988). *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Sandgren, C. D. (1991). Chrysophyte reproduction and resting cysts: a paleolimnologist's primer. *Journal of Paleolimnology*, 5(1), 1-9.



- Sandgren, C. D., & Carney, H. J. (1983). Flora of fossil chrysophycean cysts from the recent sediments of Frains Lake, Michigan, USA. *Nova Hedwigia: Zeitschrift für Kryptogamenkunde*, 38, 129-163.
- Sandgren, C. D., & Flanagan, J. (1986). Heterothallic sexuality and density dependent encystment in the chrysophycean alga *Synura petersenii* Korsh. 1. *Journal of Phycology*, 22(2), 206-216.
- Sarma, T. A., Ahuja, G., & Khattar, J. I. S. (2004). Nutrient stress causes akinete differentiation in cyanobacterium *Anabaena torulosa* with concomitant increase in nitrogen reserve substances. *Folia microbiologica*, 49(5), 557-561.
- Saxby-Rouen, K. J., Leadbeater, B. S. C., & Reynolds, C. S. (1997). The growth response of *Synura petersenii* (Synurophyceae) to photon flux density, temperature, and pH. *Phycologia*, 36(3), 233-243.
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*, 195(4275), 260-262.
- Scoble, J. M., & Cavalier-Smith, T. (2014). Scale evolution in Paraphysomonadida (Chrysophyceae): sequence phylogeny and revised taxonomy of *Paraphysomonas*, new genus *Clathromonas*, and 25 new species. *European journal of protistology*, 50(5), 551-592.
- Seaburg, K. G., & Parker, B. C. (1983). Seasonal differences in the temperature ranges of growth of Virginia algae 1. *Journal of phycology*, 19(4), 380-386.
- Sellner, K. G., Doucette, G. J., & Kirkpatrick, G. J. (2003). Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 383-406.
- Sheath, R. G., Hellebust, J. A., & Sawa, T. (1975). The statospore of *Dinobryon divergens* imhof: formation and germination in a subarctic lake 1. *Journal of Phycology*, 11(2), 131-138.
- Sicko-Goad, L., Stoermer, E. F., & Kociolek, J. P. (1989). Diatom resting cell rejuvenation and formation: time course, species records and distribution. *Journal of Plankton Research*, 11(2), 375-389.
- Siver, P. A. (1995). The distribution of chrysophytes along environmental gradients: their use as biological indicators. *Chrysophyte algae*, 232-268.

- Siver, P. A., & Chock, J. S. (1986). Phytoplankton dynamics in a chrysophycean lake. In Kristiansen, J. & Andersen, R. A., (1986) Chrysophytes: aspects and problems. Cambridge; New York: Cambridge University Press.
- Siver, P. A., & Hamer, J. S. (1989). Multivariate statistical analysis of the factors controlling the distribution of scaled chrysophytes. *Limnology and oceanography*, 34(2), 368-381.
- Siver, P., & Marsicano, L. J. (1996). Inferring lake trophic status using scaled chrysophytes. *Nova Hedwigia Beiheft*, 114, 233-246.
- Skuja, H. (1950). Körperbau und Reproduktion bei Dinobryon borgei Lemm. *Svensk. bot. Tidskr.*, 44, 96-107.
- Smol, J. P. (1985). The ratio of diatom frustules to chrysophycean statospores: a useful paleolimnological index. *Hydrobiologia*, 123(3), 199-208.
- Smol, J. P. (1988). Chrysophycean microfossils in paleolimnological studies. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 62(1-4), 287-297.
- Smol, J. P. (1995). Application of chrysophytes to problems in paleoecology. *Chrysophyte algae: ecology, phylogeny and development*, 303-329.
- Smol, J. P., Charles, D. F., & Whitehead, D. R. (1984). Mallomonadacean (Chrysophyceae) assemblages and their relationships with limnological characteristics in 38 Adirondack (New York) lakes. *Canadian journal of botany*, 62(5), 911-923.
- Smol, J. P., & Cumming, B. F. (2000). Tracking long-term changes in climate using algal indicators in lake sediments. *Journal of Phycology*, 36(6), 986-1011.
- Steidinger K.A. (1975) Basic factors influencing red tides, (153-162). In V.R. LoCicero (Ed.) Proc. 1st Internl. Conf. Toxic Dinoflagellate Blooms. Mass. Sci. Found., Wakefield, MA.
- Stewart, K. W., & Schlichting Jr, H. E. (1966). Dispersal of algae and protozoa by selected aquatic insects. *The Journal of Ecology*, 551-562.
- Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J., Geeraerd, A. H., & Van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International journal of food microbiology*, 94(2), 137-159.

- Syvertsen, E. E. (1979). Resting spore formation in clonal cultures of *Thalassiosira antarctica* Comber, *T. nordenskiöldii* Cleve and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Nova Hedwigia*, BEIH. 64. 41-63.
- Taft, C. E. (1965). *Water and algae; world problems*. Educational Publishers, Inc. Chicago, IL.
- Takishita, K., Yamaguchi, H., Maruyama, T., & Inagaki, Y. (2009). A hypothesis for the evolution of nuclear-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in “chromalveolate” members. *PLoS One*, 4(3), e4737.
- Tappan, H. N. (1980). *The paleobiology of plant protists*. San Francisco. WH Freeman.
- Tesson, S. V., Weißbach, A., Kremp, A., Lindström, Å., & Rengefors, K. (2018). The potential for dispersal of microalgal resting cysts by migratory birds. *Journal of phycology*, 54(4), 518-528.
- van Dok, W., & Hart, B. T. (1997). Akinete germination in *Anabaena circinalis* (cyanophyta). *Journal of Phycology*, 33(1), 12-17.
- Vitalis, R., Rousset, F., Kobayashi, Y., Olivieri, I., & Gandon, S. (2013). The joint evolution of dispersal and dormancy in a metapopulation with local extinctions and kin competition. *Evolution*, 67(6), 1676-1691.
- von Bodungen, B. (1986). Phytoplankton growth and krill grazing during spring in the Bransfield Strait, Antarctica—implications from sediment trap collections. *Polar Biology*, 6(3), 153-160.
- von Stosch, H. V. (1973). Observations on vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, *Gymnodinium pseudopalustre* Schiller and *Woloszynskia apiculata* sp. nov. *British Phycological Journal*, 8(2), 105-134.
- Yubuki, N., Nakayama, T., & Inouye, I. (2008). A unique life cycle and perennation in a colorless chrysophyte *Spumella* sp. 1. *Journal of phycology*, 44(1), 164-172.
- Werff, A. van der (1955). A new method of concentrating and cleaning diatoms and other organisms. *Int. Ver. theor. angew. Limnol. Verh* 12, 276-277.
- Wilkinson, A. N., Zeeb, B. A., & Smol, J. P. (2002). *Atlas of chrysophycean cysts* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.

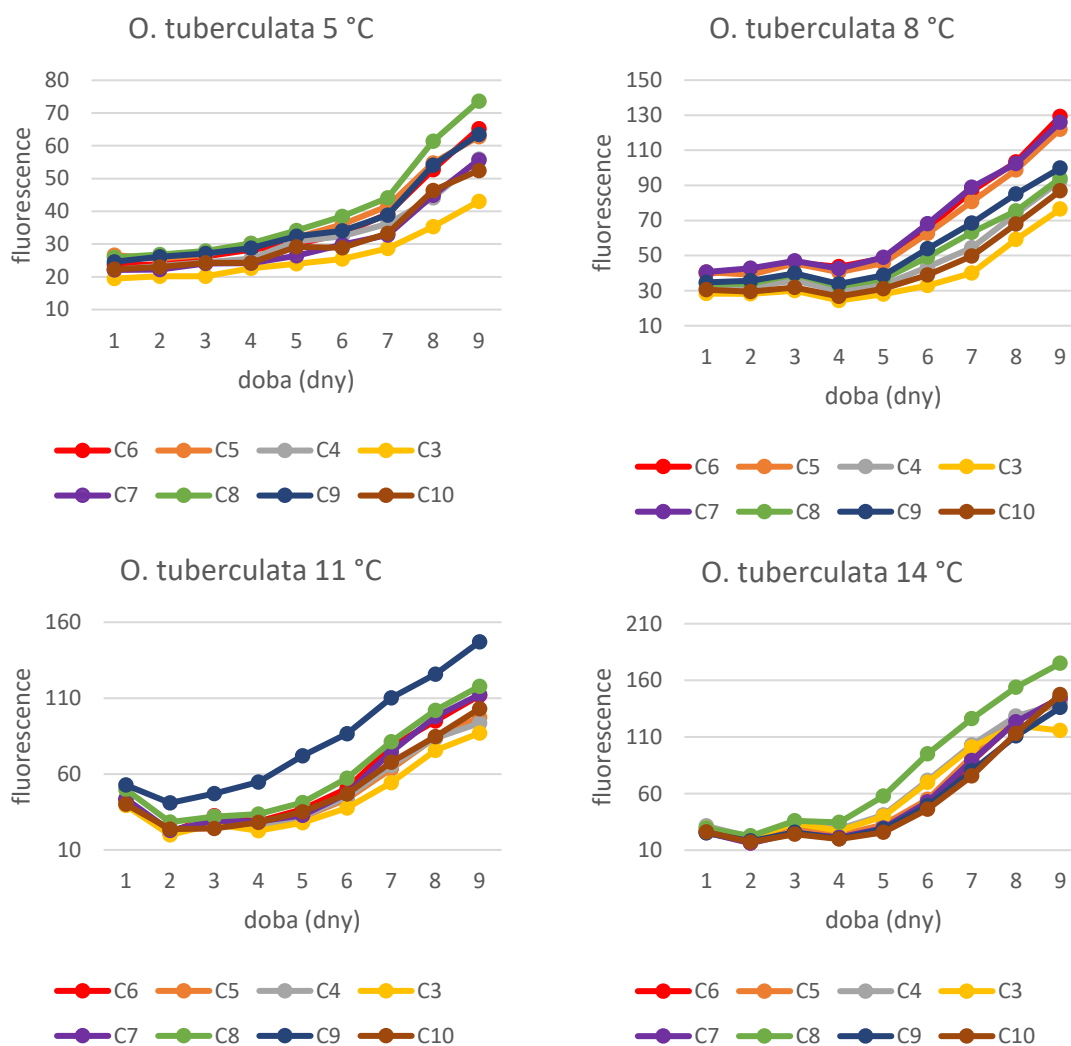
Wirth, C., Limberger, R., & Weisse, T. (2019). Temperature× light interaction and tolerance of high water temperature in the planktonic freshwater flagellates *Cryptomonas* (Cryptophyceae) and *Dinobryon* (Chrysophyceae). *Journal of phycology*, 55(2), 404-414.

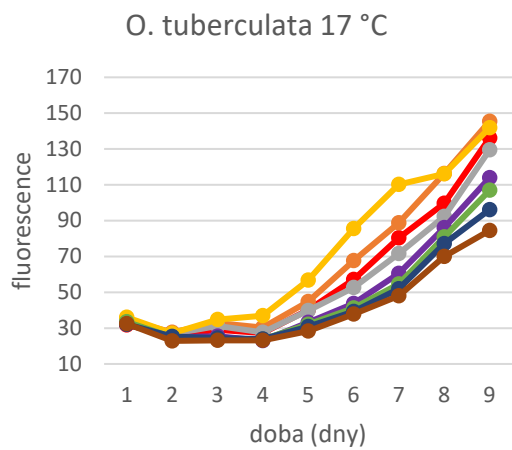
Withers, N. W., Fiksdahl, A., Tuttle, R. C., & Liaaen-Jensen, S. (1981). Carotenoids of the Chrysophyceae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 68(2), 345-349.

## 7 Příloha

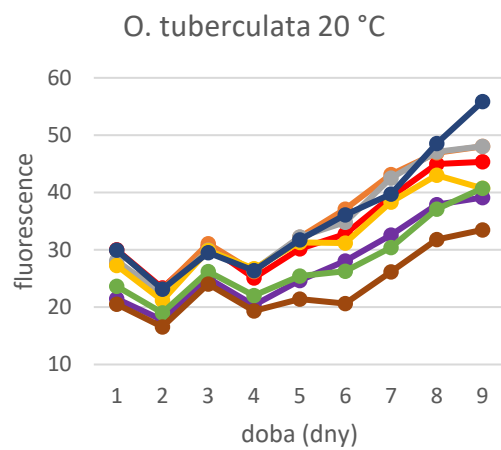
### Příloha I

Růstové křivky kultur *Ochromonas tuberculata* a dvou kmenů *Synura petersenii* v teplotních skupinách. V každém grafu jsou zaneseny naměřené hodnoty fluorescence jednotlivých opakování, komůrkách. C3–10 = komůrky s *Ochromonas tuberculata*, E3–10 = komůrky se *S. petersenii* E12, F3 –10 = komůrky se *S. petersenii* F25.

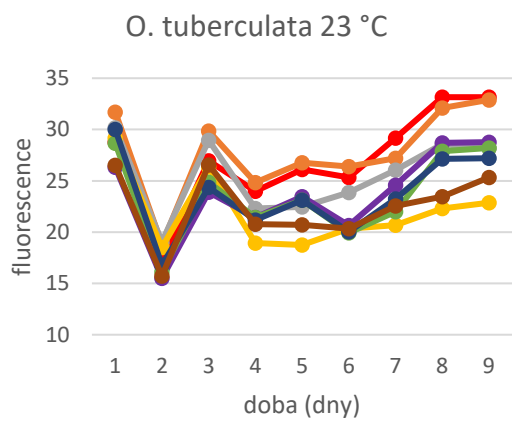




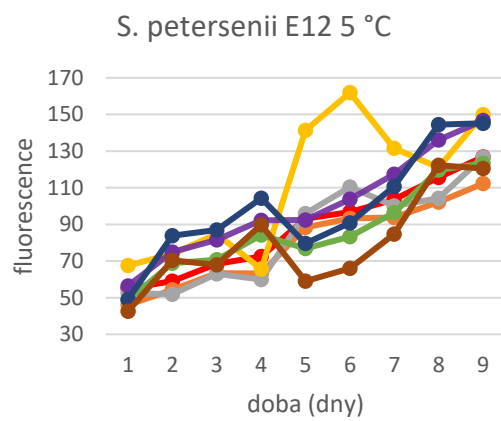
● C6 ● C5 ● C4 ● C3  
● C7 ● C8 ● C9 ● C10



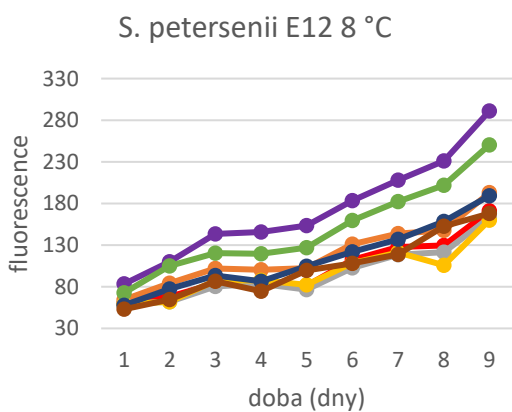
● C6 ● C5 ● C4 ● C3  
● C7 ● C8 ● C9 ● C10



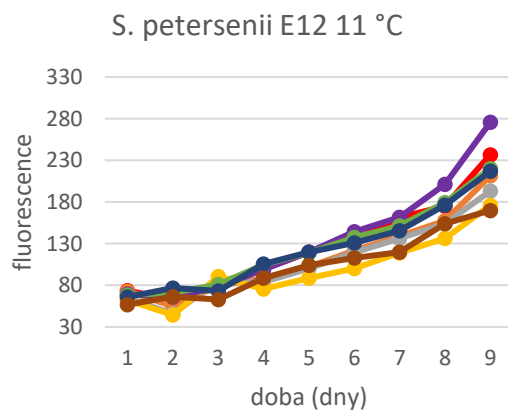
● C6 ● C5 ● C4 ● C3  
● C7 ● C8 ● C9 ● C10



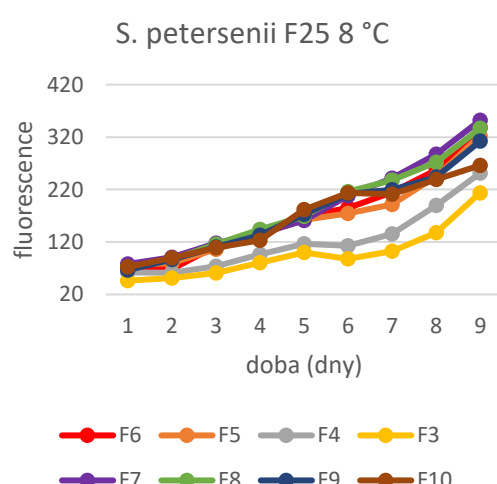
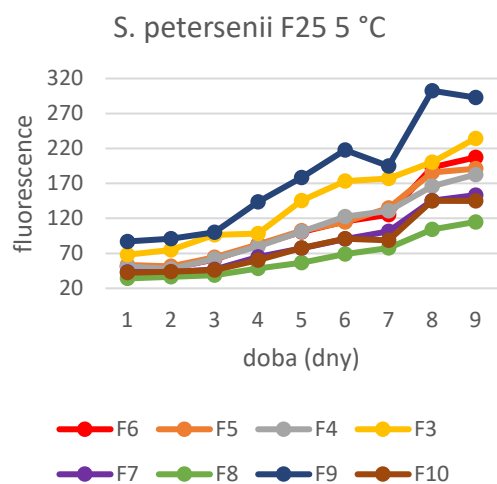
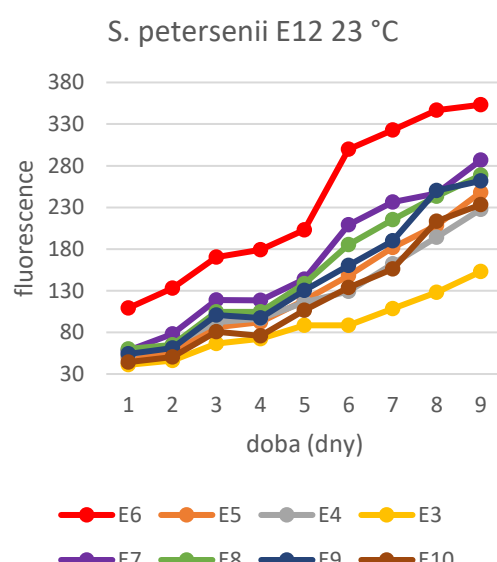
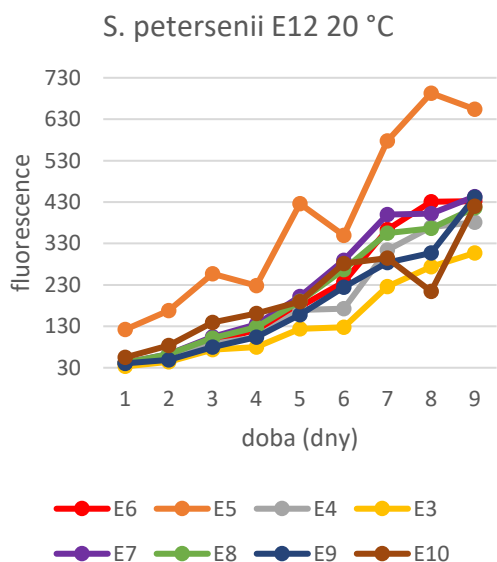
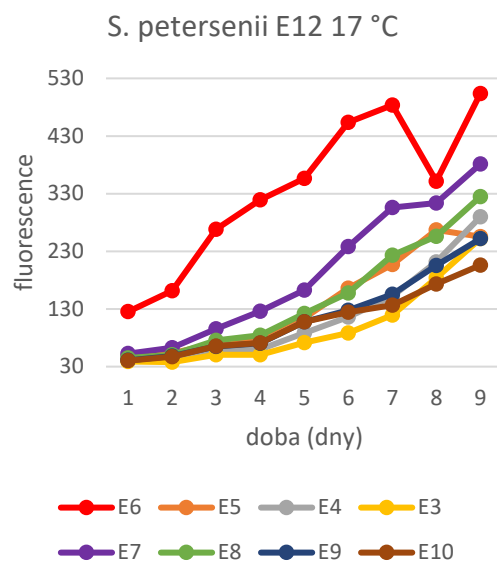
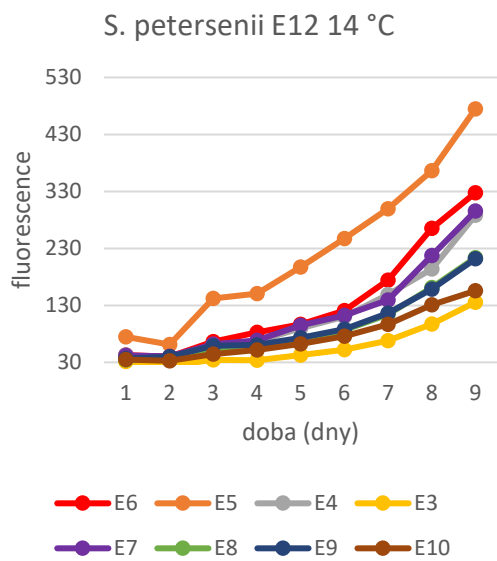
● E6 ● E5 ● E4 ● E3  
● E7 ● E8 ● E9 ● E10

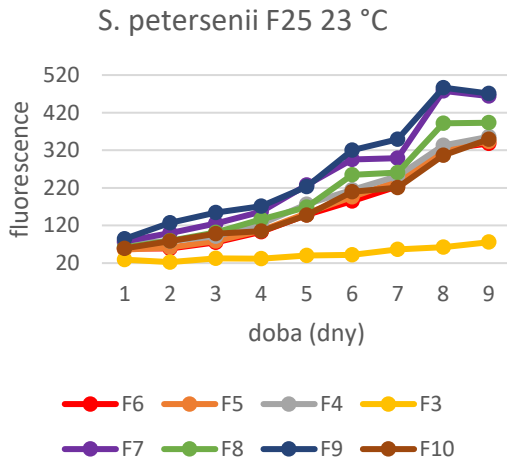
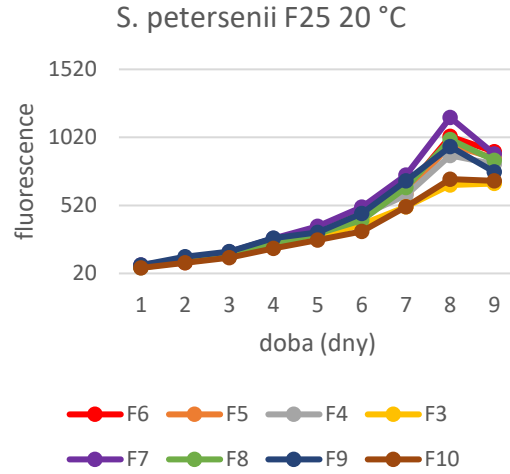
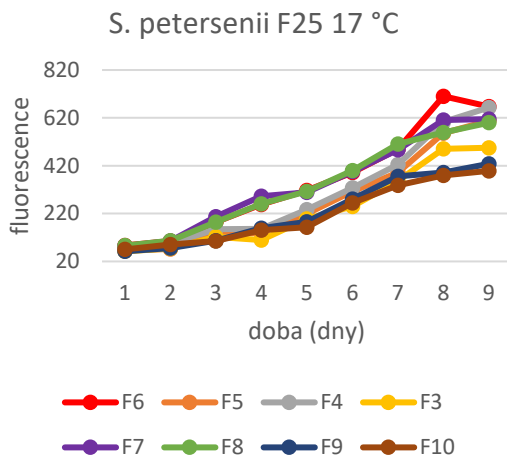
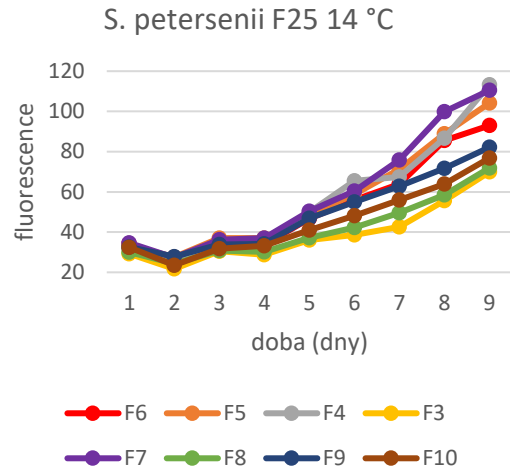
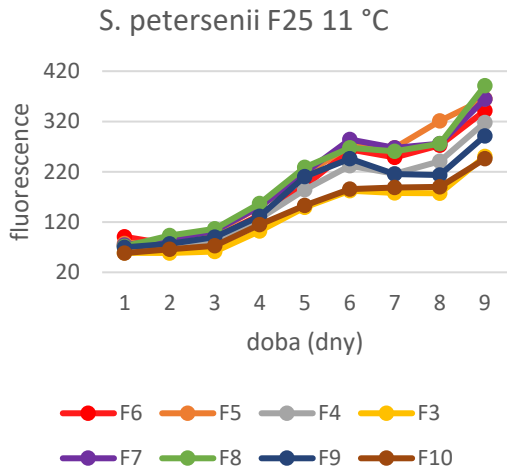


● E6 ● E5 ● E4 ● E3  
● E7 ● E8 ● E9 ● E10



● E6 ● E5 ● E4 ● E3  
● E7 ● E8 ● E9 ● E10







## Příloha II

Data pro kulturu *Ochomonas tuberculara* z experimentu testování vlivu teploty na produkci cyst, n1–n3 = počet buněk ve třech opakování.

teplota(°C)	dny	n1	živé cysty1	prázdné cysty1	n2	živé cysty2	prázdné cysty2	n3	živé cysty3	prázdné cysty3
5	0	22	0	0	33	0	0	41	0	0
	5	32	0	0	52	0	0	28	0	0
	10	19	0	1	28	0	1	23	0	0
9	0	46	0	0	29	0	0	31	0	0
	5	43	0	0	34	0	0	36	0	0
	10	31	0	0	17	0	0	20	0	0
13	0	30	0	0	29	0	0	12	0	0
	5	31	0	0	39	0	1	20	0	0
	10	15	0	1	18	0	1	9	0	0
17	0	51	0	0	27	0	0	24	0	0
	5	46	0	0	24	0	0	30	0	0
	10	48	0	1	16	0	0	36	0	0
21	0	100	0	1	13	0	0	125	0	0
	5	69	0	2	5	0	0	84	0	0
	10	121	0	2	6	1	0	143	0	0
25	0	46	0	0	48	0	0	101	0	0
	5	76	0	0	81	0	0	96	0	0
	10	74	0	0	66	0	0	85	0	0
29	0	29	0	1	17	0	0	17	0	0
	5	34	0	1	28	0	0	21	0	0
	10	13	0	1	11	0	0	14	0	0

## Příloha III

Data pro kulturu *Synura petersenii* E12 z experimentu testování vlivu teploty na produkci cyst, n1–n3 = počet buněk ve třech opakování.

teplota(°C)	dny	n1	živé cysty1	prázdné cysty1	n2	živé cysty2	prázdné cysty2	n3	živé cysty3	prázdné cysty3
5	0	18	0	0	113	0	0	156	0	0
	5	57	0	0	178	0	0	65	1	0
	10	2	0	0	0	0	0	8	0	2
9	0	33	0	0	35	0	0	33	0	0
	5	2	0	0	1	0	0	0	0	0
	10	258	0	0	201	0	2	99	0	0
13	0	56	0	0	108	1	0	34	0	0
	5	142	0	0	139	1	0	155	0	0
	10	53	0	0	0	1	0	12	0	0
17	0	58	0	0	130	0	0	68	0	0
	5	143	2	0	242	0	1	149	0	1
	10	16	0	2	56	0	1	28	0	1
21	0	46	0	0	46	0	0	91	0	0
	5	964	1	0	820	0	0	973	1	0

	10	4781	1	0	4359	0	0	2993	1	0
25	0	45	0	0	159	0	0	135	0	0
	5	606	0	0	1692	1	2	857	0	1
	10	1062	1	0	2558	2	2	1448	0	1
29	0	54	0	0	35	0	0	170	0	0
	5	451	0	0	446	0	0	996	0	0
	10	918	0	0	544	0	0	1947	0	1

#### Příloha IV

Data pro kulturu *Synura petersenii* F25 z experimentu testování vlivu nedostatku dusíku a fosforu na produkci cyst, n1–n4 = počet buněk, kontrola = WC médium bez modifikace, bez N = WC médium bez dusíku, bez P = WC médium bez fosforu.

měření	ošetření	n1	n2	n3	n4	cysty1	cysty2	cysty3	cysty4
1.	kontrola	75	172	126	159	5	4	5	6
2.	kontrola	113	137	210	258	4	6	16	6
3.	kontrola	198	136	237	3409	4	9	14	8
1.	bez N	66	134	381	149	4	6	1	6
2.	bez N	125	178	246	225	3	11	13	16
3.	bez N	462	153	242	337	10	1	4	6
1.	bez P	142	158	76	95	10	14	10	16
2.	bez P	261	225	64	114	21	24	30	8
3.	bez P	255	428	296	124	4	8	5	8