

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Dominika Dbalá

Variabilita a plasticita kalcitových struktur ve třídě Coccolithophyceae (Haptophyta)

Variability and plasticity of calcite structures in a class Coccolithophyceae (Haptophyta)

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jiří Neustupa, Ph.D.

Praha, 2022

Poděkování:

Za skvělý přístup děkuji svému školiteli, profesoru Jiřímu Neustupovi, který mě s velkou ochotou provedl mou bakalářskou prací.

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 přeložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

.....

Abstrakt

Coccolithophyceae je skupina protist patřící do linie Haptophyta. Jedná se o skupinu řas, která se vyskytuje ve všech světových oceánech, avšak preferuje na živiny bohatou, chladnou vodu. Coccolithophyceae jsou mikroskopické organismy, které často tvoří kolonie či symbiotické vztahy. Většina se živí fototrofně, ale existují i heterotrofní druhy. Jejich hlavní pleziomorfií je bičíku podobný útvar - haptonema a kalcifikované schránky - kokosféry. Haptonema je tzv. třetí bičík, slouží však především k příjmu potravy. Kokosféry mohou mít Coccolithophyceae různých tvarů a velikostí. Jedná se o schránky z CaCO_3 , složené z jednotlivých desek - kokolitů. Kokolity existují ve třech morfortypech - heterokokolity, holokokolity, nannolity. Morfortypy kokolitů se odvíjejí od fáze životního cyklu, který je u kokolitek haplo-diplontní. Coccolithophyceae se podílejí na jednom z největších ukládání CaCO_3 do hlubších vrstev oceánu a podílejí se tak s dalšími procesy (produkce DMS, fotosyntéza) na regulaci planetárního klimatu. Právě různé vlivy prostředí jako je například pH, koncentrace CO_2 , koncentrace prvků či míra rozpouštění jsou zřejmě určujícími faktory morfologie kokolitů a jejich změn. Snižující se oceánické pH způsobuje neschopnost kokolitek mineralizovat nové kokolity a následně je správně sestavit do kokosféry. Podobným způsobem reagují kokolity i na zvýšenou koncentraci CO_2 , na zvýšenou míru rozpouštění i například na vyšší koncentraci mědi. Všechny tyto jevy jsou zcela či částečně ovlivněny antropogenní činností.

Klíčová slova:

Kalcifikace, kokolity, uhličitán vápenatý, *Gephyrocapsa*, uhlík, acidifikace

Abstract

Coccolithophyceae is a group of protists belonging to Haptophyta. It is a lineage found in most of the world's oceans, however it prefers cold water with high nutrition concentration. Coccolithophyceae are microscopic algae often forming colonies or symbiotic relationships. Most of this group is phototrophic but heterotrophic species can also be found. Their most important plesiomorphy is haptonema - a flagellar-like structure and their calcified shells - coccospheres. Haptonema is a so called third flagella that mostly serves a feeding purpose. Coccospheres are composed of individual CaCO_3 plates - coccoliths. Coccoliths can be observed in three morphotypes - heterococcoliths, holococcoliths and nannoliths. Morphology of coccoliths depend on a haplo-diplontic life cycle of Coccolithophyceae, which participate in deposition of CaCO_3 deep into the ocean water column. Alongside with other processes (DMS production, photosynthesis) they help regulate the planetary climate. It is the different environmental factors like pH, CO_2 concentration, concentration of different elements or dissolution rate that are likely the most determining in coccolith morphology and its'

changes. Decreasing of oceanic pH causes inability of coccolithophyceae to mineralize new coccoliths and assemble them into a coccosphere. Coccolithophyceae react in a similar manner to increased CO₂ concentration, increased level of dissolution or for example to increased concentration of copper. All of these phenomena are completely or partially affected by anthropogenic activity.

Key words:

Calcification, coccoliths, calcium carbonate, *Gephyrocapsa*, carbon, acidification

Obsah

1. Úvod	1
2. Charakteristika linie Haptophyta	1
2. 1. Základní vlastnosti linie.....	1
2. 2. Taxonomická definice.....	2
2. 3. Evoluční historie	3
2. 4. Dnešní diverzita	3
2. 5. Ekologie a rozšíření	4
3. Charakteristika, přehled a evoluce třídy Coccolithophyceae	5
3. 1. Základní vlastnosti třídy	5
3. 2. Popis kokolitů.....	6
3. 3. Životní cyklus	8
3. 4. Diverzita, ekologie a rozšíření	8
4. Kalcifikace a globální ekologický význam kokolitek	9
4. 1. Principy a mechanismy kalcifikace	9
4. 2. Role kokolitek v globálním cyklu uhlíku	10
4. 3. Ovlivnění kalcifikace recentní acidifikací oceánu.....	12
5. Dynamika a význam plasticity kokolitů a její recentní výzkum	13
6. Závěr	22
7. Seznam použité literatury	24

1. Úvod

Ve své bakalářské práci se budu věnovat linii Haptophyta a dále především třídě Coccolithophyceae. Práce bude zaměřena především na kokolity - desky tvořící schránky kokolitek, které jsou určující součástí jejich morfologie. V první kapitole se budu věnovat celé linii Haptophyta, jejímu stručnému popisu, ekologii a diverzitě. Druhá kapitola již bude soustředěna pouze na třídu Coccolithophyceae. V této kapitole opět stručně shrnu důležité informace o třídě. Dále se budu věnovat morfologii kokolitů a životnímu cyklu kokolitek. V neposlední řadě se pokusím shrnout aktuální diverzitu třídy. Následovat bude kapitola zaměřená především na kalcifikaci a na vliv kokolitek na cyklus uhlíku. Zmíním také velmi důležitý fenomén recentní doby a to acidifikaci oceánů, a jaký vliv má na kalcifikaci. V poslední kapitole se budu věnovat nejdůležitějším recentním studiím, které se týkají plasticity a variability morfologie kokosfér a jaké činitele mají na změny v morfologii vliv.

2. Charakteristika linie Haptophyta

2. 1. Základní vlastnosti linie

Haptophyta jsou linií převážně fototrofních planktonních řas, resp. protistních mikroorganismů. Jedná se o jednobuněčné dvojbičíkovce žijící v oceánech a vzácněji i ve sladkých vodách (Edwardsen & Medlin, 2007). Někteří zástupci se mohou žít i heterotrofně (*Papposphaera*, *Trigonaspis*) či fagotrofně (*Chrysochromulina*, *Coccolithus*), ale jsou nám známy i případy symbiotických druhů (*Phaeocystis*). Až na některé heterotrofní zástupce mají Haptophyta plastidy, které pocházejí z červené řasy (Edwardsen & Medlin, 2007; Eikrem et al., 2016; Tsuji & Yoshida, 2017). Stupeň endosymbiózy však není zcela známý, proto se u haptophyt používá spíše termín komplexní endosymbióza. Většina zástupců obsahuje především chlorofyl a+c a je podle současných odhadů zdrojem 30-50% veškeré biomasy chlorofylu v oceánech (Tsuji & Yoshida., 2017). Haptophyta dosahují velikosti 2,0–75,0 μm (Eikrem et al., 2016). Kromě dvojbičíkatých planktonních forem se můžeme setkat také se stádií palmeloidními, koloniálními, vláknitými a bentickými. (Edwardsen & Medlin, 2007)

Buňky mají v určité fázi života vždy dva stejné či rozdílné bičíky, které se mohou či nemusí pohybovat nezávisle na sobě (Edwardsen & Medlin, 2007). Známe ale také dva mořské druhy rodu *Chrysochromulina*, které mají bičíky čtyři (Nicholls, 2003). Bičíky nemají žádné vnější struktury jako jsou mastigonemata, jež se vyskytují např. u stramenopilních taxonů. Jeden z nejdůležitějších znaků pro rozpoznání této linie je jejich „třetí bičík“, který se nazývá haptonema (Eikrem et al., 2016). Jedná se však o strukturu s velmi odlišnou mikrotubulární strukturou než mají zbylé dva bičíky (Svobodová, 2016). Bičíky mají pohybovou funkci, haptonema je využíváno spíše k příjmu potravy, či uchycení v substrátu. Původ slova nacházíme v řeckém pojmu *hapsis*, dotek (Eikrem et al., 2016). U některých druhů může docházet k sekundární ztrátě haptonematu (Eikrem et al., 2016). Spolu s bazálním tělískem bičíků, tvoří bazální tělísko haptonematu modifikovaný flagelární aparát (Edwardsen & Medlin, 2007). Bičíky mohou být spojeny s určitými autofluorescenčními látkami. Kromě některých

sladkovodních zástupců třídy Pavlovophyceae se u haptophyt nevyskytuje stigma (Eikrem et al., 2016). Buňka je obalena cytoplazmatickou membránou, pod ní se nachází periferní endoplazmatické retikulum, které dále obklopuje i plastidy a pyrenoid. Rhodoplasty jsou v buňce v typických případech jeden až dva, jsou obklopeny čtyřmi membránami, kdy vnější je pravděpodobně kontinuální s jaderným obalem a pyrenoidem (Edvardsen & Medlin, 2007; Eikrem et al., 2016; Tsuji & Yoshida, 2017). Lamely plastidů jsou ze tří tylakoidů. Plastidy obsahují velké množství karotenoidů, konkrétně zejména 19'-hexanoyloxyfucoxantin, který je pro Haptophyta specifickým chemickým markerem a je příčinou převažujícího žlutohnědého vzhledu plastidů. Mitochondrie obsahují tubulární krysty (Tsuji & Yoshida, 2017). Hlavním úložným metabolitem haptophyt je ve vodě rozpustný 1-3 polyglukan chrysolaminaran (Eikrem et al., 2016)

Haptophyta mají relativně krátký životní cyklus, který se u velké části druhů skládá ze dvou fází: haploidní a diploidní. Haploidní fáze cyklu ale může u některých linií zcela chybět (Young et al., 2014). Tyto fáze byly u různých taxonů dříve považovány za odlišné druhy (Jordan, 2009). Podle životních fází cyklu, rozlišujeme také samotné desky, které mají Haptophyta na svém povrchu. Všechna Haptophyta mají totiž na svém buněčném těle organické, nemineralizované desky, které jsou (spolu s haptonematem) nejvíce plesiomorfními znaky této linie. Tyto organické desky jsou tvořeny především celulózou (Tsuji & Yoshida, 2017). Kalcifikované desky, kokolity, mají ovšem pouze zástupci třídy Coccolithophyceae. Jak u nemineralizovaných desek, tak u kokolitů lze rozlišit morfologický typ odvozený od konkrétní fáze životního cyklu. Heterokokolity mají složité uspořádání a vyskytují se u diploidního stádia. Holokokolity jsou typické pro haploidní fázi a mají většinou jednoduchý klencový tvar. Známe také nanolity, které se od předešlých morfotypů liší svou strukturou (Balch, 2018). Několik kokolitů tvoří kokosféru, kterou můžeme pozorovat taktéž v různých morfotypech. Pokud je v kokosféře více vrstev kokolitů stejného typu, říkáme ji monomorfni (*Gephyrocapsa Huxleyi*). Dále existují druhy, které mají dvouvrstevnou kokosféru s různými typy desek (*Syracosphaera*) či jednu vrstvu se dvěma typy kokolitů (Eikrem et al., 2016).

2. 2. Taxonomická definice

Haptophyta se v nejobecnějším pojetí řadí mezi Eukaryota. V rámci eukaryot se tato linie dříve řadila mezi Chrysophyta. V roce 1962 je Christensen popsal jako novou samostatnou třídu Haptophyceae, patřící mezi Chromophyta, a to na základě objevení výše popsaného unikátního útvaru, haptonematu (Nicholls, 2003). Hibberd pro ně dále v roce 1976 navrhl vlastní oddělení, Prymnesiophyceae (Hibberd, 1976). Obecně přijímaným názvem skupiny však zůstala Haptophyta, která v roce 1993 Cavalier-Smith formálně rozdělil na dvě třídy. Tyto dvě třídy se ještě do nedávna nazývaly Prymnesiophyceae a Pavlovophyceae (Edvardsen & Medlin, 2007). Dnes se Haptophyta v moderních klasifikacích neřadí do žádného vyššího celku a jsou tedy samostatnou říší i kmenem (Svobodová, 2016). Pro Prymnesiophyceae se dnes většinou používá název Coccolithophyceae a druhou třídou zůstávají Pavlovophyceae (Guiry & Guiry, 2022).

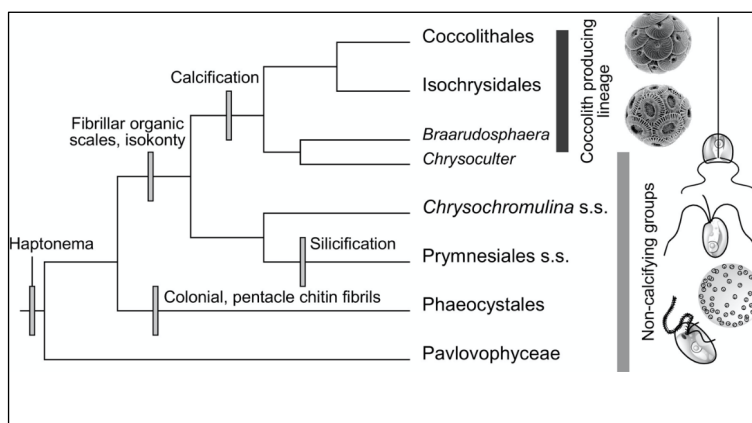
2. 3. Evoluční historie

Haptophyta velmi pravděpodobně vznikla v dlouhém období regenerace globálního ekosystému po permio-triaském vymírání na rozhraní prvo- a druhohor. První vápnité nanofosílie se ve fosilním záznamu objevují v sedimentech svrchního triasu (cca 220 mil. let) (Svobodová, 2016). Dochované fosílie jsou složeny především z heterokokolitů, které jsou odolné vůči rozpadu, a případně také nanolitů. Všechny tyto nálezy dosahují pouze velmi malých velikostí. Na rozhraní triasu a jury evidentně došlo v rámci skupiny k velkému vymírání, po němž se ve fosiliích dochoval pouze jeden přeživší druh. Během pozdní jury a křídly se diverzita a velikost buněk postupně dostává na nejvyšší úroveň. Právě v tomto období dochází ke vzniku rozsáhlých depozitů vápence sedimentací kokolitů (Nicholls, 2003). K velké regresi vývoje však dochází na rozmezí mezi křídou a paleogénem, kdy druhohory abruptně ukončil pád tzv. chicxulubského asteroidu, jehož vlivem vymřelo snad až 76% veškerých živých organismů, a mezi nimi zejména více než 90% kalcifikujícího mořského planktonu (Navarro et al., 2020). Z haptophyt existujících v posledním období druhohor přežilo pouze 9 až 10 druhů. Kenozoikum (třetihory) je pak obdobím pomalého nárůstu diverzity. Rozhraní paleocénu a eocénu (PETM) bylo ve znamení relativně krátkého globálního teplotního maxima. Vysoké teploty souvisely mj. s vysokou koncentrací atmosférického CO₂, v důsledku toho došlo ke snížení mořského pH a tudíž negativnímu ovlivnění schopnosti kalcifikujících kokolitek. K ochlazení planety dochází na hranici eocénu a oligocénu a to mělo za důsledek opětovné snižování diverzity. Toto chladné období trvá v principu dodnes. Nízké teploty znamenaly pro haptophyta a především Coccolithophyceae zmenšování buněčné velikosti, ale také zmenšování kokolitů jako takových. Ve fosilním záznamu neogénu poprvé pozorujeme široce rozšířené moderní druhy jako je *Gephyrocapsa Huxleyi*, která je tedy oproti druhům mesozoika extrémně malá (Eikrem et al., 2016, Svobodová, 2016; Eikrem et al., 2016).

2. 4. Dnešní diverzita

Pro dnešní diverzitu haptophyt platí, že je postavena v první řadě na studiu morfologie kokolitů, a nástrojem takového výzkumu je zejména elektronová mikroskopie. Dalším druhově specifickým fenotypovým znakem mohou být také poměry a složení pigmentů v plastidech (Edwardsen & Medlin, 2007). Dnes jsou rozlišovány dvě třídy - Pavlovophyceae a Coccolithophyceae. Fylogenetické rozdělení linie na dvě třídy je velmi silně podpořeno až 6% rozdíly v sekvenci 18S *rDNA* zástupců obou linií (Geisen et al., 2004). Sekvenovány byly také různé geny z jádra a chloroplastů, jejichž sekvence tuto klasifikaci podporují. Pro další rozlišení v rámci tříd je dále používán molekulární marker *tufA*, zejména pro posouzení fenotypových variací morfologicky rozdílných druhů (Geisen et al., 2004). V nedávné době byla na základě molekulárních studií navržena třetí třída, která však prozatím nebyla přijata (E.M. Bendif et al., 2011). Momentálně je známo přibližně 80 rodů a 300 druhů, které dohromady tvoří až 10% veškeré biomasy fytoplanktonu na planetě (Edwardsen & Medlin, 2007).

Do třídy Pavlovophyceae je řazen pouze jeden řád Pavlovales, u kterého pozorujeme redukované haptonema a různě dlouhé bičíky. U Pavlovales rozpoznáváme 13 druhů (Bendif et al., 2011). Dnes uznávanými rody jsou *Diacronema*, *Pavlova*, *Exanthemachrysis* a *Rebecca* (Jordan et al., 2004).



Obr. 1. Fylogenetický strom haptophyt zobrazující hlavní skupiny (Tsuji & Yoshida, 2017)

Druhou třídou jsou

Coccolithophyceae, které se dělí na čtyři velké a další menší řády (viz. kapitola 3.4. Diverzita a rozšíření). Isochrydiales je řád s redukovaným až zcela chybějícím haptonematem a přibližně stejnými bičíky. Patří sem například *Isochrysis*, *Ruttnera* či modelová a široce rozšířená *Gephyrocapsa huxleyi*. Většina zástupců dalšího řádu Coccolithales má velmi typický haplo-diploidní životní cyklus a haptonema je zde už většinou plně vyvinuté. Řadíme sem rody jako *Braarudosphaera*, *Chrysotila*, *Coccolithus* a *Syracosphaera*. Třetím řádem jsou Prymnesiales s typicky výrazným, dlouhým haptonematem, kamž řadíme například *Chrysochromulinu* nebo *Prymnesium*. Posledním velkým řádem jsou Phaeocystales, kteří mají haptonema krátká a často tvoří koloniální stádia. Nejdůležitějším zástupcem Phaeocystales je symbiotický *Phaeocystis* (Eikrem et al., 2016; Guiry & Guiry, 2022).

2. 5. Ekologie a rozšíření

Dvě základní třídy haptophyt - Pavlovophyceae a Coccolithophyceae - se kromě buněčné stavby odlišují také ekologicky. Nekalcifikující Pavlovophyceae, jejichž buňky tedy nejsou obklopeny vápnitými kokolity, žijí především v litorálu euryhalinních brakických a vzácněji také sladkých vod (Eikrem et al., 2016). Mohou být důležitými syntetizátory dlouhých řetězců poly-nenasycených mastných kyselin jako je kyselina dokosahexaenová (DHA) a eikosapentaenová (EPA). A některé druhy, zejména například *Pavlova lutheri* jsou člověkem využívány jako složka krmení ryb, korýšů a mekkýšů v aquakulturách (Bendif et al., 2011).

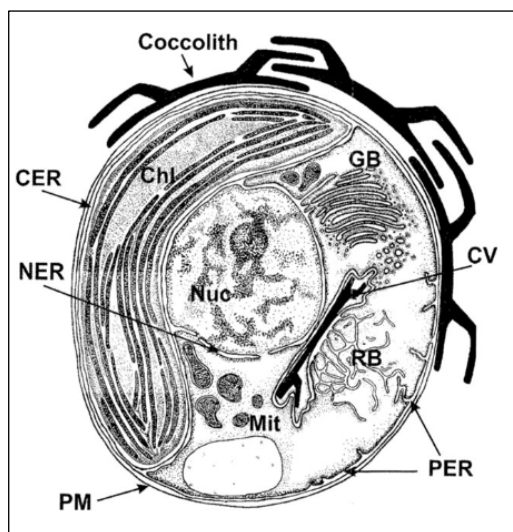
Coccolithophyceae jsou oproti tomu ekologicky mnohem diverzifikovanější (Balch, 2018). Obecně se vyskytují prakticky ve všech oblastech světového oceánu, ovšem převážně kromě rovníkových oblastí. Obecně tedy preferují chladnější, hodně úživné vody v oblastech tzv. *upwellings*. Zejména v těchto oblastech mají tendence tvořit tzv. *white tides* (bílý mléčný zákal), tedy obrovské shluky populací viditelné až na tisíce kilometrů (Balch, 2018). Euryhalinní brakické druhy nalezneme i v této třídě, například *Prymnesium parvum*, které často tvoří toxické vodní květy. Může růst ale i na zrcích písku, či se pohybovat v jezírcích a povodích řek se zvýšenou salinitou. Vlákňitá a palmeloidní stádia zástupců rodu jako je *Ruttnera* či *Chrysotila* se dokáží zdržovat v nárazových

oblastech mořských útesů. *Ochrosphaera* a *Hymenomonas* se většinou drží při březích či v estuárech řek. Známe i takové druhy Coccolithophyceae, které tráví svůj životní cyklus ve sladké vodě, je jich ale pouze kolem 15 druhů. Známým příkladem sladkovodního způsobu života je především *Hymenomonas roseola* a někteří zástupci rodů *Prymnesium* a *Chrysochromulina*. V Novém Mexiku byl ve slaném jezírku objeven *Pleurochrysis carterae* var. *Dentata*. Zajímavé bylo, že vodní plocha nebyla v žádné blízkosti pobřeží oceánu (Nicholls, 2003). Zástupci Prymnesiales mohou být také explicitně psychrofilní a žít pod ledem. Za nejzajímavější ekologickou skupinu kokolitek můžeme považovat výše zmíněné symbiotické druhy. Nejdůležitějším zástupcem symbiontů z této linie je zcela neopominutelně *Phaeocystis*, který je symbiontem zooplanktonu nebo *Braadurosphaera* a *Prymnesium* s dusík fixujícími sinicemi. Tato symbióza se ukázala být mutualistickým vztahem, kdy *Prymnesium* získává fixovaný dusík výměnou za fixovaný uhlík pro UCYN-A (dusík-fixující cyanobakterie), které chybí fotosystém II, enzym RuBiSCo i citrátový cyklus (Thompson et al., 2012). Objevena byla také Haptophyta žijící v symbióze s foraminifery a radiolárii (Eikrem et al., 2016).

3. Charakteristika, přehled a evoluce třídy Coccolithophyceae

3. 1. Základní vlastnosti třídy

Třída Coccolithophyceae je jednou z nejdůležitějších protistních skupin díky svému významu pro globální cyklus uhlíku skrze kalcifikaci (Thierstein & Young, 2004) a síry v rámci cyklu dimethylsulfidu (DMS) (Malin, 2004). Dále se kokolityky podílejí až na 10% z celkové primární fotosyntetické produkce. Vzhledem k tomu, že k těmto procesům dochází v jediné buňce, je pravděpodobné, že vnitrobuněčné dráhy iontů a metabolitů jsou u Coccolithophyceae složitější než u jiných fotosyntetizujících protist. Míra fixace anorganického uhlíku ve formě vápence je u kokolitek stejná nebo vyšší než fixace uhlíku skrze fotosyntézu a to jak v přírodě, tak v kulturách (Brownlee & Taylor, 2004). Toky produktů kalcifikace buňkou se ukázaly



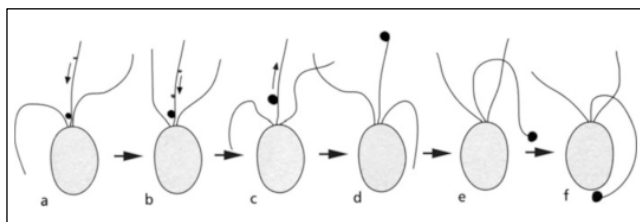
Obr. 2. Schéma stavby buňky (Brownlee & Taylor, 2004)

být velmi zásadní součástí celkové transportní strategie buňky. I během fotosyntézy ale kokolityky syntetizují velké množství látek jako jsou například alkenony, β -glukany, dimethylsulfoniopropionát, kyselé polysacharidy či mannitol (Daniels et al, 2016; Groisillier, 2013). Produkce a akumulace těchto látek je druhově specifická. Kyselé polysacharidy jsou s velkou pravděpodobností spjaty se vznikem kokolitů a proto je najdeme pouze u kalcifikujících druhů. Naopak alkenony syntetizuje pouze pět druhů, bez závislosti na kalcifikaci (Daniels et al, 2016). S polymerací karbohydrátů při vzniku

kokolitů souvisí zřejmě i specificky uspořádaná centrální část golgiho aparátu (Edwardsen & Medlin, 2007).

Kokolitky se od sebe druhově liší taktéž tvarem buňky. *Dicrateria*, *Coccolithus* nebo *Gephyrocapsa* jsou víceméně kulaté - sférické. Podlouhlé buňky mají druhy jako *Prymnesium*, *Haptolina*, *Chrysocampanula* a sedlovitě prohnutá je většina z rodu *Chrysochromulina*. Coccolithophyceae mají dva víceméně stejně dlouhé bičíky, až na druh *Chrysochromulina quadrikonta*, která má bičíky čtyři (Eikrem et al., 2016). Axonema bičíků se skládá z typického počtu mikrotubulů - 9+2 (Eikrem et al., 2016).

Haptonema mohou mít kokolitky velmi dlouhé (až 100 μ m v poměru k buňkám dlouhým pouze 8 μ m) či sotva detekovatelné (1-2 μ m). Haptonema může existovat ale i ve zcela redukované formě, jako malý zbytkový výrůstek mezi flagelami (*Dicrateria rotundata*, *Gephyrocapsa huxleyi*) (Eikrem et al., 2016). Jak již bylo zmíněno, haptonema má především krmící a upevňovací funkci. K příjmu kořisti dochází v rámci spolupráce haptonematu a bičíků tak, že se pohybem flagel potrava lepí na haptonema. Haptonema následovně částičky posouvá na svůj konec a ohybem předává k přední části buňky, kde jsou fagocytovány do potravní vakuoly (Eikrem et al., 2016). K uchycení v substrátu dochází u dlouhých haptonemat jejich různými částmi. Krátká haptonemata se uchycují pouze na svém konci (Edwardsen & Medlin, 2007).



obr. 3. Schéma příjmu potravy u *Haptolina hirta* (Eikrem et al., 2016)

3. 2. Popis kokolitů

Kokolity byly pojmenovány Thomasem Henrym Huxleym podle spojení řeckých slov *kokkos* (zrnko) a *lithos* (kámen) (Tsuji & Yoshida, 2017). Kokolity byly poprvé pozorovány Christianem Gottfriedem Ehrenbergem, který je však považoval za struktury abiotického původu. V roce 1860 byla Georgem Charlesem Wallichem poprvé popsána celá kokosféra a byl jím také navržen její organický původ. Kokolity byly obecně přijaty jako organické struktury až rok poté v publikaci Henryho Cliftona Sorbyho (Tsuji & Yoshida, 2017). Výzkum morfologie kokolitů začal významně vzrůstat po roce 1960 s objevením elektronové mikroskopie (Thierstein & Young, 2004).

Nejčastěji jsou vnější desky tvořeny CaCO_3 , existují ale také desky křemičité (např. u *Prymnesium parvum*, *Hyolithus neolepsis*). Křemičité desky jsou produkovány tzv. *silica-deposition* vesikuly a tento proces je od tvorby kalcifikovaných desek velmi rozdílný (Tsuji & Yoshida, 2017). V této části své práce se budu dále věnovat především vápenatým kokolitům. Coccolithophyceae mohou mít tři typy kokolitů - heterokokolity, holokokolity a nanolity - jejichž rozdíly se právě v této kapitole pokusím podrobně popsat.

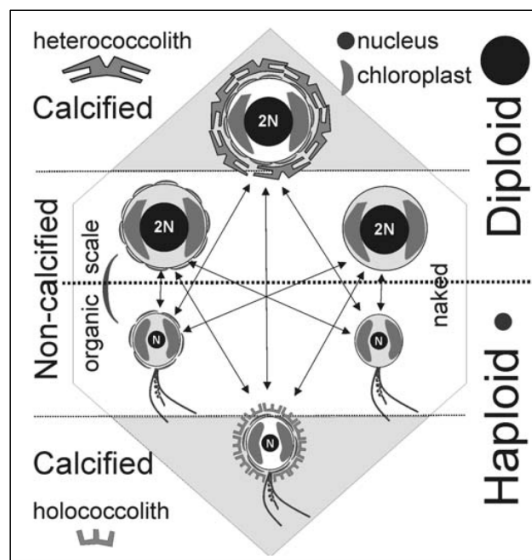
Heterokokolity jsou vytvářeny diploidním stádiem kokolitek. Heterokokolity do sebe většinou vzájemně zapadají, k čemuž jim slouží morfologické a funkční rozlišení destičky na proximální a distální štítky. Některé druhy toto rozlišení nemají a proto do sebe jejich heterokokolity nezapadají, ale překrývají se (Tsuji & Yoshida, 2017). Bylo pozorováno poměrně velké množství morfotypů heterokokolitů, jako jsou plakolity, canelolity, cribrility, lopadolity, helikolity či papolity (Eikrem et al., 2016). Heterokokolity vznikají intracelulárně v tzv. *coccolith-forming* váčku (dále jako kokolitový váček), který je odvozen od Golgiho aparátu a je v těsném spojení s jaderným obalem (Eikrem et al., 2016; Tsuji & Yoshida, 2017). Vznik heterokokolitu začíná tvorbou malého celulózního templátu uvnitř kokolitového váčku, kolem kterého se dále ukládají krystaly. Takto vzniklý, hotový heterokokolit je vytlačen na povrch buňky v blízkosti flagelárního aparátu. Tento proces je regulován specifickým polysacharidem CAP (coccolith-associated polysaccharide). Jedná se o komplex vysoce rozpustných kyselých polysacharidů. CAP má společně s mikrotubuly a aktinovými filamenti významný vliv na finální tvar kokolitu (Eikrem et al., 2016; Tsuji & Yoshida, 2017). Po pozorování jiných druhů se dokázalo, že existují i jiné mechanismy kalcifikace nových desek. *Chrysotila* má například specializované útvary coccolitozomy, *Algirosphaera robusta* má kokolity formované působením periferního endoplazmatického retikula. U pohyblivého stádia druhu *Gephyrocapsa huxleyi* naopak ke kalcifikaci vůbec nedochází, i když je zde kokolitový váček plně přítomen (Eikrem et al., 2016).

Holokokolity jsou desky haploidního stádia a jsou to jednodušší klencové útvary. Holokokolity do sebe nezapadají a mají všechny stejnou velikost. Stejně jako heterokokolity, existují holokokolity v různých morfologických typech jako jsou například: krystalolity, kalyptrolity či zygolity (Eikrem et al., 2016; Jordan, 2009). Holokokolity je velmi obtížné získat u kultivovaných populací a v TEM byly proto pozorovány pouze u tří druhů. Ani u jednoho druhu však nebyl pozorován žádný plně vyvinutý holokokolit uvnitř buňky. Z tohoto důvodu je možné se domnívat, že holokokolity vznikají mimo buněčnou membránu. Jak heterokokolity tak holokokolity jsou v konečném stavu podloženy organickou deskou. Holokokolity by ale mohly vznikat až po exocytóze samotné desky. Regulace vzniku holokokolitu vně buňky by mohla být zajištěna speciální hyalinní obálkou, která na kokosféře byla pozorována. Pokud by ale přece jen holokokolity vznikaly uvnitř buňky, pravděpodobně by tomu tak bylo těsně pod plazmatickou membránou a jednalo by se o proces tak rychlý, že se v TEM zatím nepodařilo ho pozorovat (Eikrem et al., 2016).

Jako nanolity jsou označovány všechny kokolity morfologicky odlišné od heterokokolitů a holokokolitů. Je možné, že zástupci nesoucí nanokokolity tvoří skupinu, která by nemusela být součástí haptophyt (De Vargas, 2004).

3. 3. Životní cyklus

Coccolithophyceae mají haplo-diplontní životní cyklus, který je dále druhově specifický (Young et al., 2003). Noelaerhabdaceae, Hymenomonadaceae a Pleurochrysidaceae mají v diploidní fázi heterokokolity, v haploidní fázi jsou však nekalcifikující. Calcidiscaceae, Coccolithaceae, Helicosphaeraceae, Syracosphaeraceae, Rhabdosphaeraceae a Papposphaeraceae tvoří v diploidní fázi heterokokolity, v haploidní holokokolity. Ceratolithaceae a Alisphaeraceae mají rodozměnu nejvíce atypickou, s heterokokolity v diploidní fázi cyklu a s nanolity v haploidní fázi cyklu (Young et al., 2003). Právě převaha jednotlivých fází cyklu je určující pro ekologii kokolitek (Šupraha et al., 2016).



Obr. 4. Schéma životního cyklu kokolitek (De Vargas, 2004)

3. 4. Diverzita, ekologie a rozšíření

Schopnost kokolitek střídat ve svém životním cyklu haploidní a diploidní stádium je zřejmě zásadní pro charakteristiku jejich ekologických nik (De Vries et al., 2020). Do nedávna byla v rámci ekologie kokolitek studována především fáze diploidní a haploidní fáze byla ve velké míře přehlížena. Dnes však víme, že obě fáze mají zcela odlišnou ekologii, sezonalitu a tudíž jsou schopny obsadit různé niky. Diploidní heterokokolity obecně preferují spíše na živiny bohaté, turbulentní vody a jsou abundantní hlavně v zimních měsících. Haploidi preferují vody chudší, více stratifikované a jsou častější v létě (De Vries et al., 2020; Balch, 2018). Coccolithophyceae jsou přímo ovlivňovány environmentálními činiteli jako je teplota, salinita, pH, sluneční záření, koncentrace uhlíku a živin. Uhličitan vápenatý, který kokolity zabudovávají do svých schránek je značně citlivý na nízké pH, proto byl pozorován pokles v biomase schránek právě v kyselém prostředí (Hermoso & Minoletti, 2018).

Třída Coccolithophyceae se dělí na velké množství řádů. Coccolithales, Braarudosphaerales, Discoasterales, Isochrysidales, Phaeocystales, Prymnesiales, Syracosphaerales a Zygodiscales jsou řády největší. Arkhangelskiales, Eiffellithales, Podorhabdals, Stephanolithiales a Watznaueriales jsou spíše skupinami o malém počtu zástupců (Guiry & Guiry, 2022). Phaeocystales, Prymnesiales,

Isochrysidales, a Coccolithales jsou řády, které jsou obecně uznávané a je k nim k dispozici největší množství dat. Rod *Phaeocystis* jsou koloniální kokolity, jejichž buňky jsou typicky vyzbrojeny speciálními chitonovými mikrofibrilami, které jsou funkčně podobné trichocystám. Funkce těchto trichocyst není známá, ale mohla by souviset s toxickými vodními květy, které *Phaeocystis* tvoří (Tsuji & Yoshida, 2017). Další toxické druhy patří mezi Prymnesiales. *Reticulofenestra sessilis* z řádu Isochrysidales byla pozorována výlučně v blízkosti *Thallossiosira*, centrické rozsivky, se kterou je pravděpodobně v úzké symbiotické interakci (Tsuji & Yoshida, 2017).

4. Kalcifikace a globální ekologický význam kokolitek

4. 1. Principy a mechanismy kalcifikace

Kalcifikace je proces, při kterém dochází k syntéze uhličitanu vápenatého (CaCO₃) z rozpuštěných látek ve vodě.



Obr. 5. Chemická rovnice kalcifikace (Tyrrell & Young, 2009)

Anorganický uhlík je v oceánech zastoupen

ve třech hlavních složkách: hydrogenuhličitanové ionty (HCO₃⁻), uhličitanové ionty (CO₃²⁻) a rozpuštěný oxid uhličitý (CO₂) (Tyrrell & Young, 2009). Ke kalcifikaci může docházet i samovolně anorganicky, při vysoké koncentraci volných iontů CO₃²⁻ ve vodě. Taková kalcifikace ovšem může nastat pouze v podmínkách extrémně zvýšeného pH a je v přírodních biotopech málo četná a globálně zřejmě nepříliš významná (Balch, 2018). Mnohem větší globální význam má biokalcifikace, tedy syntéza uhličitanu vápenatého živými organismy. Takovýmto způsobem kalcifikují mořské organismy jako jsou dírkonošci (foraminifera), měkkýši (mollusca), korýši (crustacea), ostnokožci (echinodermata), koráli (anthozoa) a v největší míře právě kokolity. Ke kalcifikaci dochází nejvíce v hloubce okolo 100 metrů (Balch, 2018). Chemicky se jedná o reakci vápenatých a hydrogenuhličitanových iontů, ze kterých vzniká uhličitan vápenatý, voda a oxid uhličitý. Z obecného hlediska je proces syntézy uhličitanu vápenatého většinou úzce spojen s fotosyntézou a naopak inhibován vysokou koncentrací živin. Potvrzeny byly především prvky jako je fosfor, zinek, dusík a hořčík (Tyrrell & Young, 2009).

Proč však kokolity kalcifikují zůstává nezodpovězeno. Původní studie naznačovaly především ochrannou funkci kokosféry, avšak od té se v poslední době spíše upouští. Bylo prokázáno, že ke grazingu (okusování) dochází ve stejné míře u kalcifikovaných i nekalcifikovaných kokolitek. Studovány byla i střeva korýšů, predátorů kokolitek, a nebyla prokázána žádná větší překážka spojená s trávením kalcitových struktur (Brownlee & Taylor, 2004). Nebyla potvrzena ani role při snaze zabránit virovým nákazám, i když se k této hypotéze momentálně přiklání nejvíce vědců. Je možné, že kokosféry mají oproti schránkám tvořeným především organickým uhlíkem výhodu v prostředí, kde je uhlík či světlo limitujícím faktorem. Tento návrh však odporuje faktu, že bloomy vznikají typicky za vysoké intenzity slunečního záření. Je pravděpodobné, že kokolity svou váhou přispívají také ke

snadnějšímu pohybu buněk hlouběji ve vodním sloupci do prostředí bohatšího na živiny (Brownlee & Taylor, 2004). Ukazuje se zároveň vysoké afinita k fosfátům. *Gephyrocapsa huxleyi* vytváří bloomy často v místech chudých na fosfáty. Aktivita alkalických fosfatáz na povrchu membrán, které napomáhají transportu fosfátů do buňky, a kalcifikace jsou zřejmě procesy stimulované právě nedostatkem živin. Existuje tedy potenciál, že jsou tyto dva procesy funkčně propojeny (Brownlee & Taylor, 2004). Jako další adaptivní důvod ke kalcifikaci se zdá být schopnost fotosyntetizovat i za vysokého ozáření. Kokolity by mohly být ochranou tam, kde jiné řasy už fotosyntetizovat nedokážou. Tuto hypotézu však vyvrací fakt, že i nekalcifikovaná *Gephyrocapsa* je schopna fotosyntézy za silného slunečního záření (Brownlee & Taylor, 2004)

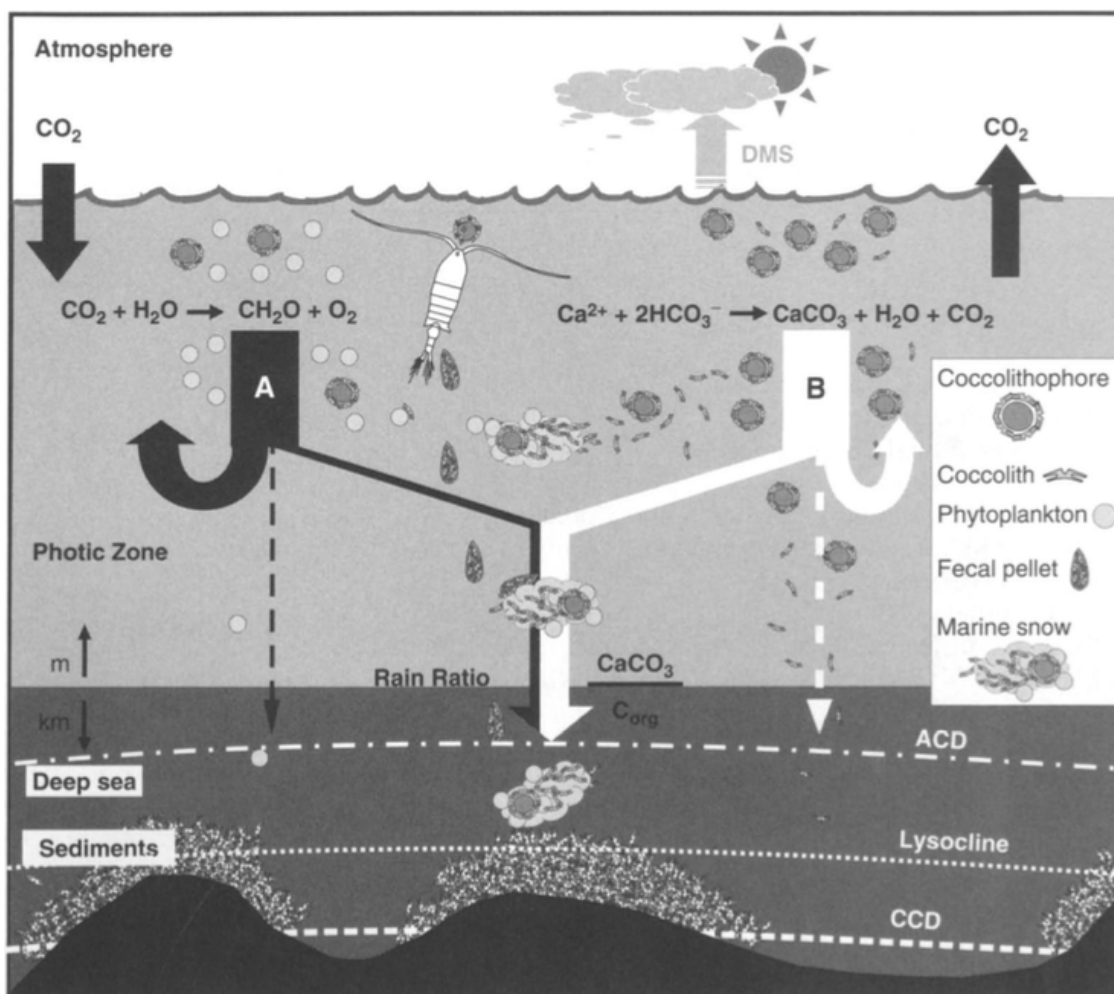
Mezi kalcifikací a fotosyntézou pravděpodobně ale existuje jiná spojitost. Pro kokolity je zdrojem kalcifikace hydrogenuhličitanový iont (HCO_3^-), který dává vzniku uhlíkatému vápenatému. Při této reakci dochází k uvolnění vodíku, který lze využít k produkci CO_2 . Tento oxid uhličitý jsou kokolity schopny využít k fotosyntéze i pokud ho zrovna v okolí není dostatek. Tento vztah však není zcela potvrzen, jelikož většina studií stále ukazuje, že kokolity přijímají CO_2 především ze svého okolí (Brownlee & Taylor, 2004).

4. 2. Role kokolitek v globálním cyklu uhlíku

Uhlík je na naší planetě uložen především ve čtyřech hlavních rezervoárech: atmosféra, litosféra, biosféra a hydrosféra (Bates, 2019). Litosféra je poměrně inertní systém, kde k výměně uhlíku s ostatními rezervoáry dochází velmi pomalu. V litosféře se uhlík vyskytuje především jako uhlíkatý vápenatý a dále v organických sloučeninách jako je zemní plyn, ropa nebo uhlí. Do oceánu (hydrosféry) se uhlík dostává kromě z litosféry hlavně z atmosféry ve formě oxidu uhličitého. Dále se do oceánu dostává díky zvětrávání z kontinentů (Robert, 2008). Jak již bylo popsáno, uhlík se v oceánech vyskytuje hlavně ve formě uhlíkatů, hydrogenuhličitanů a rozpuštěného oxidu uhličitého. Recentním působením antropogenních vlivů se do oceánu dostává více a více oxidu uhličitého, čehož důsledkem je jeho acidifikace (viz. kapitola 4.3. Ovlivnění kalcifikace recentní acidifikací oceánu). Uhlík se z oceánu dále dostává zpět do atmosféry jako oxid uhličitý, dimethylsulfid, nebo je uložen do sedimentu (Bates, 2019)

Kokolity významně ovlivňují globální toky uhlíku třema způsoby. Kokolity jsou v první řadě podstatnými primárními producenty. Oxid uhličitý tedy spotřebovávají během fotosyntézy (Robert, 2008). Zadruhé přispívají k největšímu geologickému sinku uhlíku v oceánech ve formě CaCO_3 a tudíž ukládání organického materiálu do větších hloubek. A v neposlední řadě jsou zodpovědné za lokální tvorbu mraků v rámci produkce dimethylsulfidu (Walker et al., 2020). V následující části práce se budu věnovat posledním dvěma procesům.

Kalcitové kokolity po smrti buňky klesají na dno oceánu (Barker, 2013). CaCO_3 , který se na dně usazuje, lze oddělit dvěma hranicemi a to podle intenzity rozpouštění. Jedná se o proces rozpouštění CaCO_3 . Mezi pelagiálem a abysálem se nachází zóna široká několik stovek metrů, ve



Obr. 6. Role kokolitek v cyklu uhlíku (de Vargas et al., 2007)

keré koncentrace CaCO₃ dramaticky klesá z 95% téměř na nulu. Tato zóna se nazývá lyzoklina a její umístění se různí s každou lokalitou. Nad lyzoklinou by měla být koncentrace CaCO₃ stále větší než míra rozpouštění. Pod touto zónou se však nachází CCD (carbonate compensation depth), kde rychlost rozpouštění odpovídá nebo přesahuje koncentraci samotného CaCO₃ (Barker, 2013). CCD tedy odděluje na uhličitany bohatý kal od sedimentu téměř zcela bez uhličitánů (Berger, 1973). Proč však k rozpouštění dochází? Míra rozpouštění se zvyšuje se zvětšující se hloubkou jako reakce na vysoký tlak (Jin & Liu, 2018). V recentních studiích se však ukazuje, že k rozpouštění uhličitánů dochází i nad lyzoklinou, což se zdá být odpovědí na nasycenost nadložních vod CO₂ působením antropogenních vlivů a respirací mořských organismů (Naik, 2010). Rozpouštění CaCO₃ má však právě nad lyzoklinou na kokolítky velmi negativní dopad. Z práce týmu Jin a Liu bylo prokázáno, že se zvýšenou mírou rozpouštění vytvářejí kokolítky tenčí kokolity a nejsou schopny je správně sestavit do kokosfér (Jin & Liu, 2018).

Dimethylsulfid (DMS) je plyn, který je odvozen od buněčného prekurzoru dimethylsulfopropionátu (DMSP) (Malin, 2004). DMSP jako takový funguje v buňkách fytoplanktonu jako osmoprotektant, který buňku chrání před environmentálními stresy. Kromě ochrany před

zvýšenou salinitou či sníženou teplotou je zřejmě dimethylsulfopropionát i ochranou proti oxidativnímu stresu (Malin, 2004). Kokolítky a někteří dinoflageláti patrně akumulují DMSP ve svých buňkách více než jiné řasy. Kokolítky díky produkci DMS pomáhají regulovat klima planety. DMS v atmosféře vytváří sirné aerosoly - ty jsou tvořeny částicemi, které samotné odráží záření zpět ven z planety, zároveň však fungují jako kondenzační jádra mraků. Mraky mají účinné albedo, které dále napomáhá odráživosti záření a tudíž efektivnímu ochlazení planety (Malin, 2004).

V rámci ochrany planety před konstantním zvyšováním teploty je v neposlední řadě důležité zmínit charakteristické *bloomy*, v případě kokolitek tzv. *white tides*. *Bloom* neboli vodní květ je termín používaný obecně pro biomasu fytoplanktonu, která se za různých podmínek přemnožila. Jsou to útvary rozsáhlé až 250 tisíc km² (Severní Atlantik, 1991) a jsou nejčastěji pozorovány na satelitních snímcích (Tyrrell & Merico, 2004). *Bloomy* vytvářejí zejména rozsivky, dinoflageláti a kokolítky. Je také zásadní zmínit, že biomasa *bloomu* se často skládá z kombinace různých společenstev fytoplanktonu. *Gephyrocapsa huxleyi* je charakteristickým zástupcem Coccolithophyceae, který vytváří rozsáhlé *bloomy* a proto pro bližší popis tohoto fenoménu využijí právě ji. *Gephyrocapsa* produkuje *bloomy* velmi často po kolapsu rozsivkového vodního květu, kdy je voda ochuzena o silikáty (Tyrrell & Merico, 2004). Znakem, který rod *Gephyrocapsa* odlišuje od ostatních kokolitek je její schopnost nadprodukce kokolitů. *Gephyrocapsa* vytváří více kokolitů, než je v její kokosféře třeba a proto dochází k odlupování a následnému zbavování se kokolitů do prostředí *bloomu* - důvod bílé, kalné barvy vodního květu, který lze pozorovat na satelitních snímcích (Eikrem et al., 2016). Takový *bloom* ovlivňuje teplotu planety několika způsoby. Samotné kokolity, nahlučené v *bloomu* v obrovských koncentracích, odrážejí sluneční paprsky zpět ven z planety a tím zabraňují pronikání tepla do hlubších vrstev oceánu. V rámci fotosyntézy se zde účinně spotřebovává CO₂. Je pochopitelné, že dochází i ke zvýšené produkci DMS a CaCO₃ (Tyrrell & Merico, 2004).

4. 3. Ovlivnění kalcifikace recentní acidifikací oceánu

V důsledku zvýšených antropogenních emisí CO₂, které jsou absorbovány oceány, dochází ke snižování pH mořské vody (Jin et al., 2021). Od průmyslové revoluce bylo pH oceánů sníženo již o 0,1 jednotky a predikce do budoucnosti hovoří o dalších 0,3 jednotkách pH do konce roku 2100 (Bach, 2011). Acidifikace má negativní dopad na kalcifikaci a tudíž tvorbu kokosfér kokolitek. Znečištění oceánů CO₂ má dopad dále i na teplotu vody či na koncentraci živin, což dále přispívá k negativním účinkům na mořské organismy. Bylo prokázáno, že do určité míry jsou kokolítky schopny se na vyšší koncentrace CO₂ adaptovat, avšak zřejmě nikoli na takovou míru acidifikace, k jaké dochází v současné době (Langer, 2013).

Dopady acidifikace na kokolítky jsou závažným globálním problémem, jelikož záporně působí na přirozené toky uhlíku. Snížené pH způsobuje sníženou produkci kokolitů, a tedy méně ukládání uhlíku do hlubších horizontů oceanického vodního sloupce i sedimentu ve formě uhličitanů (Meier & Beaufort, 2013). Jakým způsobem je kalcifikace acidifikací ovlivňována na buněčné úrovni

zatím nebylo možné přesně popsat. Během recentních studií byl tento fenomén studován pouze na základě morfometrických měření kokosfér (viz. kapitola 5. Dynamika a význam plasticity kokolitů a její recentní výzkum). Tyto studie mimo jiné poukazují na rozsáhlou redukci biomasy kokolitů při nižším pH (Hermoso & Minoletti, 2018).

5. Dynamika a význam plasticity kokolitů a její recentní výzkum

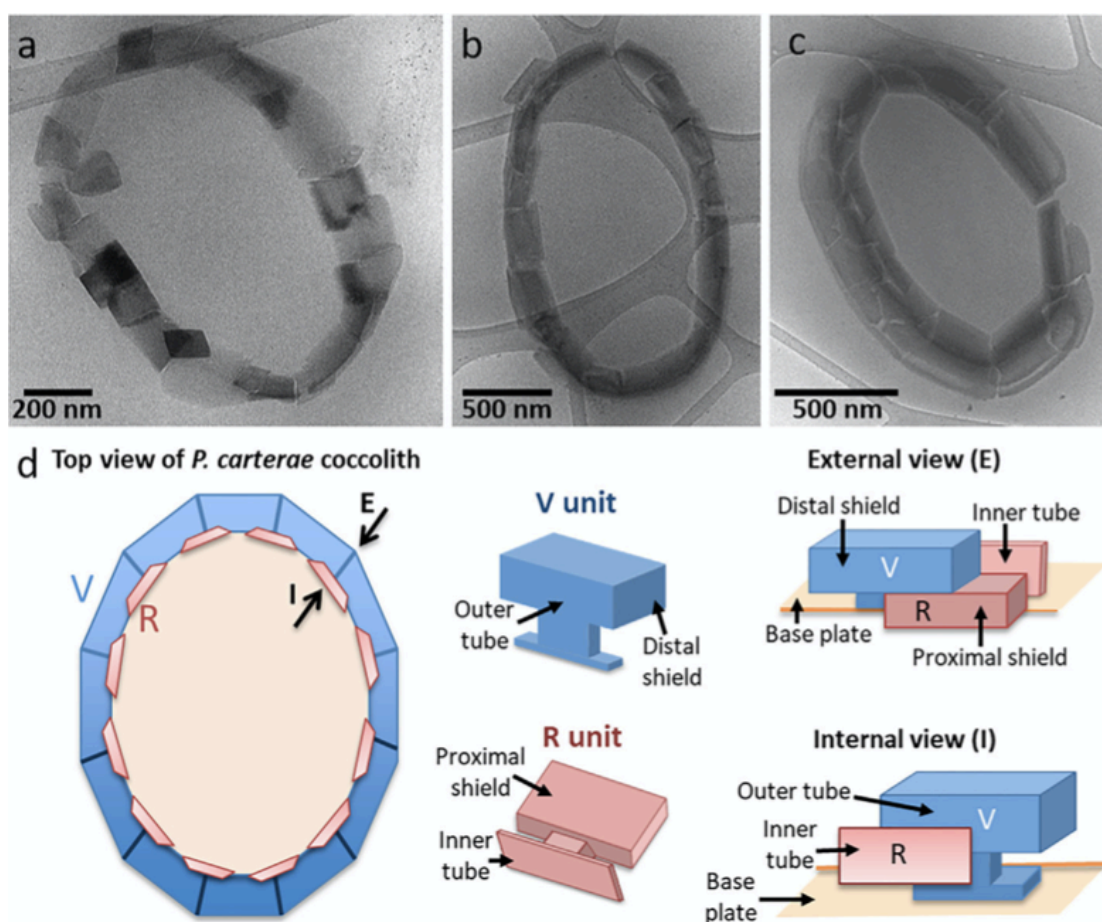
Proměnlivost tvaru, velikosti a rigidity kokolitů může mít rozmanitý původ. V posledních letech se na fenomén plasticity schránek kokolitek soustřeďuje větší množství studií, především proto, že mají tak významný vliv na dynamiku globálního ekosystému naší planety. V této kapitole se pokusím zpracovat ty nejdůležitější studie z posledních několika let.

V první studii bych chtěla poukázat na samotný mechanismus morfologického vývoje kokolitů. Počáteční stádium vznikajícího kokolitu tzv. *protokokolitový kroužek* a zároveň již plně vystavěné kokolity jsou obecně velmi dobře popsány. Nejasnosti existují hlavně mezi těmito dvěma fázemi. Walker et al. (2020) se ve svém experimentu snažili objasnit, co se děje mezi počátečním stádiem a stádiem dospělého kokolitu. V dřívějších studiích, které se tomuto tématu věnovaly však vědci používali relativně velmi drastické extrakční metody, buňky byly ošetřeny detergenty, což vedlo k jejich buněčné smrti, poté byly centrifugovány, dehydratovány a dále mikroskopovány (Walker et al., 2020). Takto byl ale experiment vystaven poměrně velké pravděpodobnosti artefaktů, které byly zapříčiněny právě způsobem ošetření buněk (Walker et al., 2020). Proto Walker a jeho tým postupovali zcela odlišně. Pozorovaným druhem byl *Pleurochrysis carterae*. Buňky byly inkubovány při 15°C v cyklu světlo-tma - 12:12 hodin a byly udržovány v mořské vodě upravené podle K/2 receptury (Walker et al., 2020). Pro prasknutí membrán byly buňky ošetřeny Tritonem X-100. Takto připravení jedinci byli okamžitě zmrazeny v kapalném ethanu. Díky takovému postupu mohly být buňky pozorovány v hydratovaném stavu, bez buněčné smrti (Walker et al., 2020). Buňky byly pozorovány v cryo-transmisním elektronovém mikroskopu a tomografu. Vzorky pozorované v elektronovém mikroskopu obsahovaly tři identifikovatelná stádia vývoje. První stádium bylo typické kroužkem složeným z nepravidelně velkých krystalů, měřících okolo 1.2 μm × 860 nm. Ve druhém stádiu měly krystaly již velikost okolo 1.8 μm × 1.2 μm a měly pravidelný obdélníkový tvar. Třetí pozorovaná fáze vývoje byla typická mechanickým propojením krystalů, které byly formované do specifických V a R celků. Velikostně se dospělé kokolity pohybovaly okolo 1.5 μm × 1 μm. Snímky dospělých fází kokolitů pomohly v pochopení jejich morfologie, tentokrát však v kontextu jejich postupných růstových změn. Samotný kokolit je tedy složen z V a R krystalů, které do sebe zapadají. R krystaly mají dvě části: vnitřní tubus a proximální destičku. V krystaly naopak tvoří vnější tubus a distální destičku. Vnitřní a vnější tubus společně dávají vzniku vnitřnímu okraji kokolitu. Distální a proximální destičky naopak tvoří vnější okraj kokolitu (Walker et al., 2020)

První sada snímků (Obr. 8) zobrazuje první stádium vývoje kokolitů. Černobílé obrázky a-c byly pořízeny v cryo-elektronovém tomografu (cryoET) a jedná se o různé řezy jedním kokolitem. Na

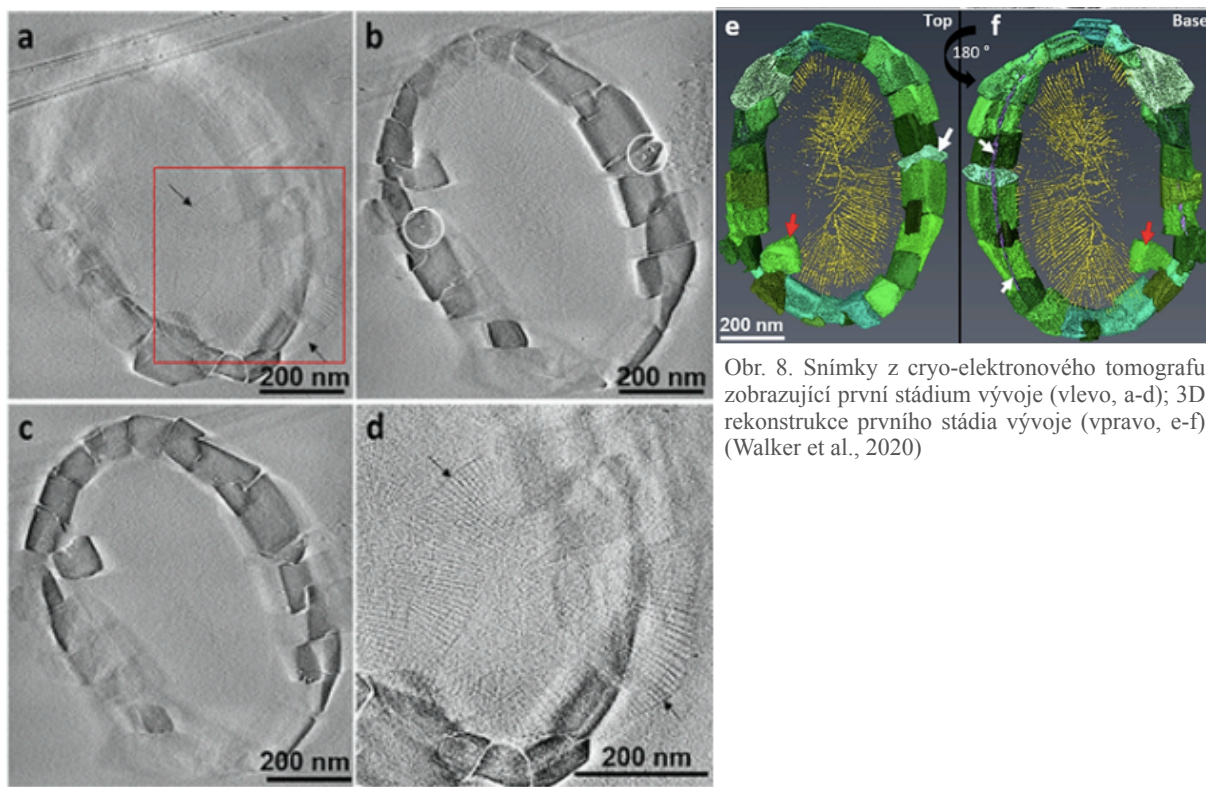
snímcích e-f je možné vidět řezy obarvené, tak aby byly odlišeny jednotlivé krystaly (zelená barva) a bazální deska (žlutá barva). Důležité je, že krystaly jsou v této fázi v kontaktu avšak nejsou mechanicky propojené pomocí V a R krystalů. Na snímcích z cryoET lze dále v některých krystalech rozeznat malé otvory označené bílými kruhy (Walker et al., 2020). Bazální deska (žlutá barva) je na snímcích vidět pouze částečně. Okraje bazální desky jsou označeny fialovou barvou a je tedy poznat, že ji krystaly přerůstají. Krystaly v této fázi růstu kokolitu ještě nemají typický pravidelný tvar ani rozlišení na R a V krystaly. Většina krystalů má klencový tvar. Bylo možné sledovat postupný vznik V a R krystalů, a to pozorováním nedokončené T struktury mezi dvěma V jednotky připomínajícími krystaly (Walker et al., 2020).

Další sada snímků (Obr. 9) popisuje kokolity v druhém stádiu vývoje. Na snímcích a-d můžeme pozorovat obarvené krystaly kokolitu a bazální desku (červená barva). Opět se jedná o více

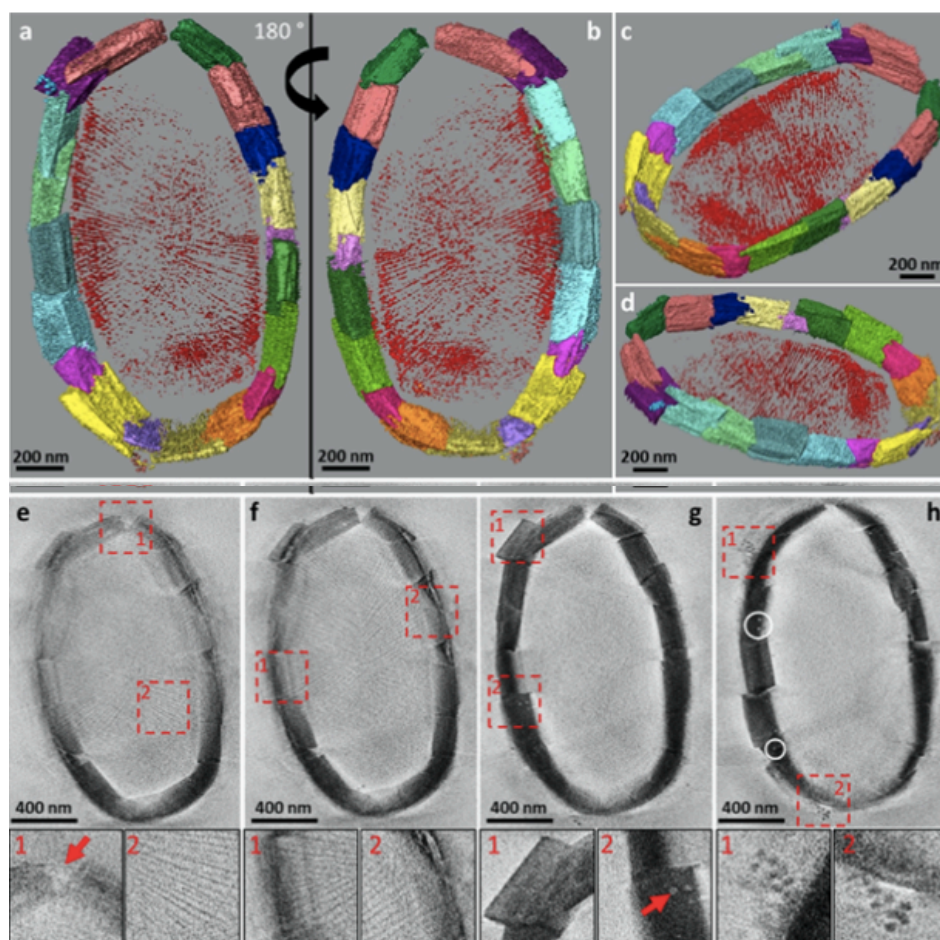


Obr. 7. Snímky z cryo-elektronového mikroskopu zobrazující kokolity v různých stádiích vývoje; první stádium (a), druhé stádium (b), třetí stádium (c), schéma kokolitu zobrazující rozdělení na V a R krystaly (d) (Walker et al., 2020)

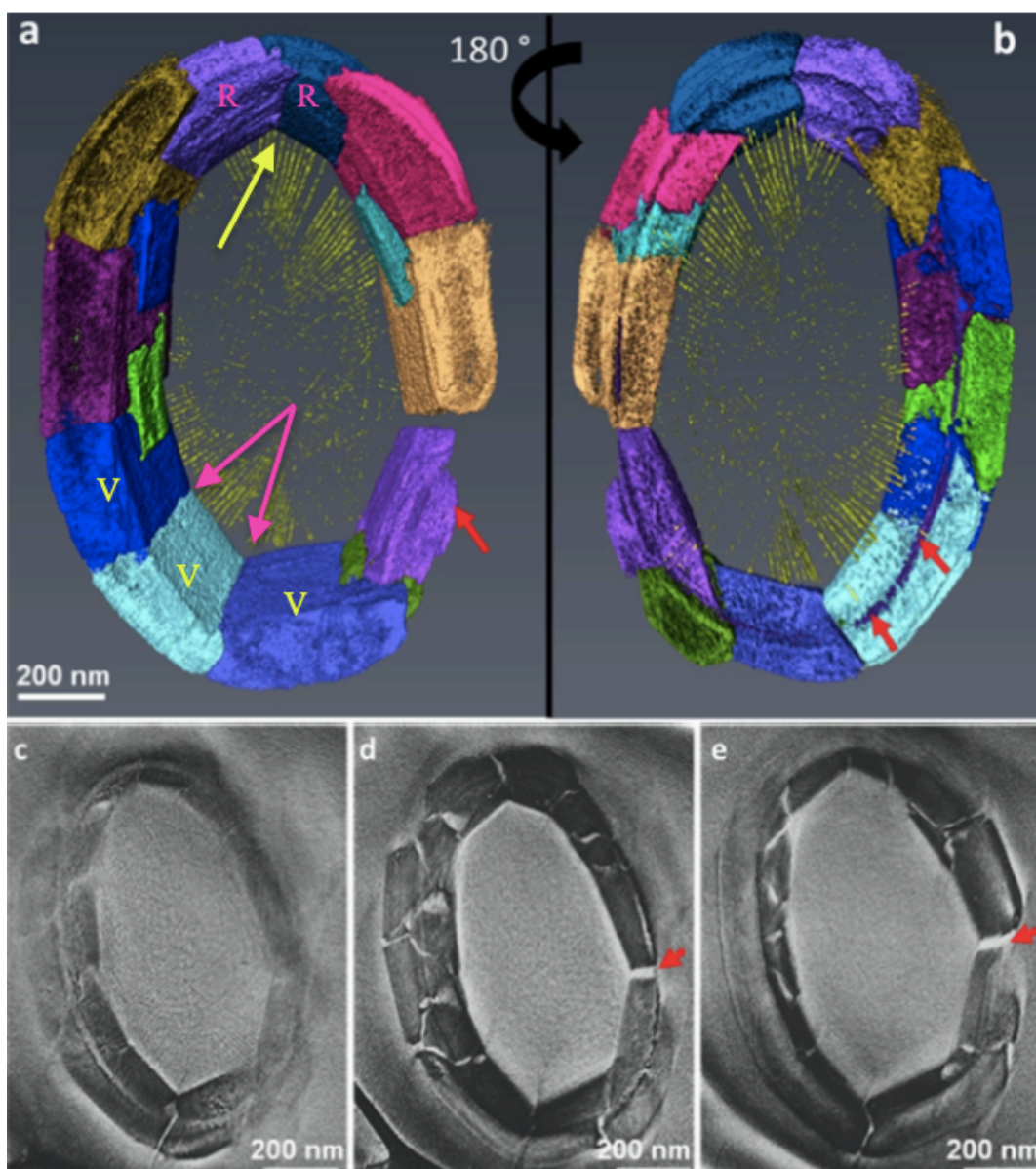
řezů stejného kokolitu. Krystaly v této fázi růstu již získávají obdélníkový tvar. I na těchto snímcích jsou některé krystaly perforované (bílé kruhy) (Walker et al., 2020). R a V struktury již začínají být částečně utvořeny. Rostoucí R struktura lze rozpoznat ve snímku g, kde je označena číslem 1. Dále



Obr. 8. Snímky z cryo-elektronového tomografu zobrazující první stádium vývoje (vlevo, a-d); 3D rekonstrukce prvního stádia vývoje (vpravo, e-f) (Walker et al., 2020)



Obr. 9. 3D rekonstrukce druhého stádia vývoje (nahore, a-d); snímky z cryo-elektronového tomografu zobrazující druhé stádium vývoje (dole, e-f) (Walker et al., 2020)



Obr. 10. 3D rekonstrukce třetího stádia vývoje (nahore, a-b); snímky z cryo-elektronového tomografu zobrazující třetí stádium vývoje (dole, c-e)

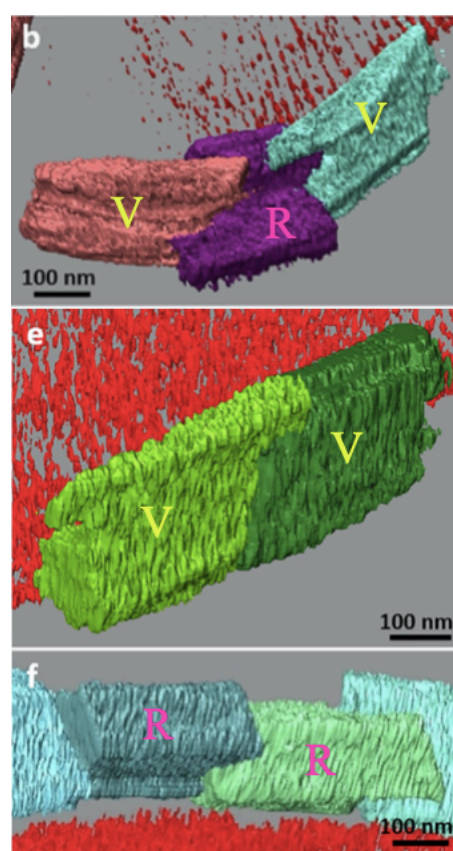
můžeme na snímku h pozorovat shluk malých částic označený číslem 1 a 2. Vědci nejprve předpokládali, že jedná o tzv. *coccolithosomes*, malé váčky transportující Ca^{2+} a CAP do kokolitového váčku, k jejichž odstranění by však muselo dojít při použití Tritonu X-100 (Walker et al., 2020). Jednalo se tedy zřejmě o součásti krystalů, které s velkými krystaly splývaly. Morfologie krystalů v této fázi růstu se ještě stále zcela neblížila jejich podobě v dospělé fázi kokolitu. V krystaly měly v tomto stádiu spíše trojúhelníkový tvar, distální štítky byly utvořeny jen u některých (Walker et al., 2020). Šířka všech V krystalů na bázi byla stejná, okolo 150 nm. V horní části však byly V krystaly různě široké. R krystaly již měli poměrně dobře vyvinutý vnitřní tubus, proximální destička byla přítomna pouze u jednoho R krystalu. U pozorovaného kokolitu se podařilo popsat také již zaklesnuté

V a R krystaly. Kokolity ale obsahoval zároveň spojení dvou V krystalů a dvou R krystalů, což zapříčinilo diskontinuitu ve spojení krystalů do samotného kokolitu (Walker et al., 2020).

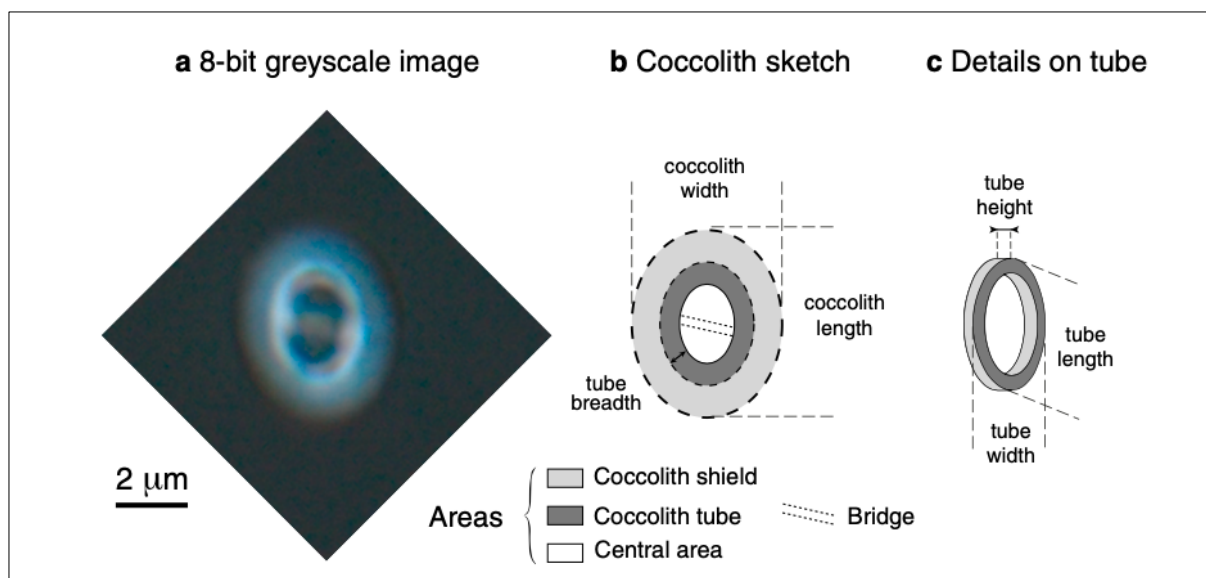
Třetí sada snímků (Obr. 10) zobrazuje kokolity v dospělém vývojovém stádiu. Opět zde lze pozorovat různé řezy stejným kokolitem. Jeden kokolity (a, červená šipka) se jeví být neúplný, jedná se zřejmě o chybu v přípravě preparátu, či o jeden nedospělý krystal. Bazální deska je zde opět vyobrazena mezi jednotlivými krystaly žlutou barvou. V krystaly byly v této fázi již plně vyvinuty, s přítomným vnějším tubusem i distálním štítkem. Stejně tak R krystaly měli vnitřní tubus a proximální štítek zcela vyvinutý. I u dospělého kokolitu vědci pozorovali spojení několika V krystalů (a, růžové šipky). Stejně tak se zde nacházelo spojení dvou R krystalů (a, žlutá šipka).

Důležitým klíčovým faktorem morfologie kokolitu je také to, jakým směrem jednotlivé krystaly v rámci kokolitů rostou. V krystaly zřejmě na počátku rostou především vertikálně, což dává vzniku vnějšímu tubusu. Laterální růst V i R krystalů je potlačený vlivem přítomnosti sousedních krystalů. R krystaly naopak rostou především ke středu směrem k bazální desce, takto vzniká vnitřní tubus R krystalu. Laterální růst V krystalu začíná až ve chvíli, kdy přeroste sousední R krystal. V tomto momentě vzniká distální štítek V krystalu. Proximální štítek R krystalu začne vznikat až po vytvoření vnitřního tubusu. R krystal tedy začne mineralizovat na druhou stranu, kde vznikající proximální destička obklopí zadní část V krystalu (Walker et al., 2020). Způsob, kterým jednotlivé krystaly rostou však není samoučelný. Každý krok v tomto procesu ovlivňuje ten další, což je zapříčiněno kompeticí V a R krystalů o prostor. Pokud by nevznikala proximální destička R krystalu, rostl by V krystal spíše do šířky a distální destička by nemohla vznikat. V krystaly zároveň všechny rostou stejnou rychlostí tak, aby se navzájem nepřerůstaly. Časové oddělení růstu krystalů je zřejmě dáno nerovností v distribuci Ca^{2+} and CO_3^{2-} mezi jednotlivými krystaly. Některým krystalům je tedy v určitý čas pravděpodobně dodáváno více Ca^{2+} and CO_3^{2-} a tudíž mohou růst rychleji než jiné. Cesty těchto iontů do míst mineralizace však nejsou prozatím objasněny. Obecně se ale předpokládá, že největší roli hrají právě coccolithosomy (Walker et al., 2020).

V dalších experimentech se vědci zaměřovali především na to, jak je morfologie kokolitů ovlivňována různými podmínkami prostředí. V prvním experimentu se Hermoso a Minoletti věnovali účinku pH mořské vody na morfologii schránek a rychlost dělení kokolity *Gephyrocapsa oceanica*. Zatímco se dříve vědci domnívali, že jsou kokolity schopny kalcifikovat za poměrně širokého spektra



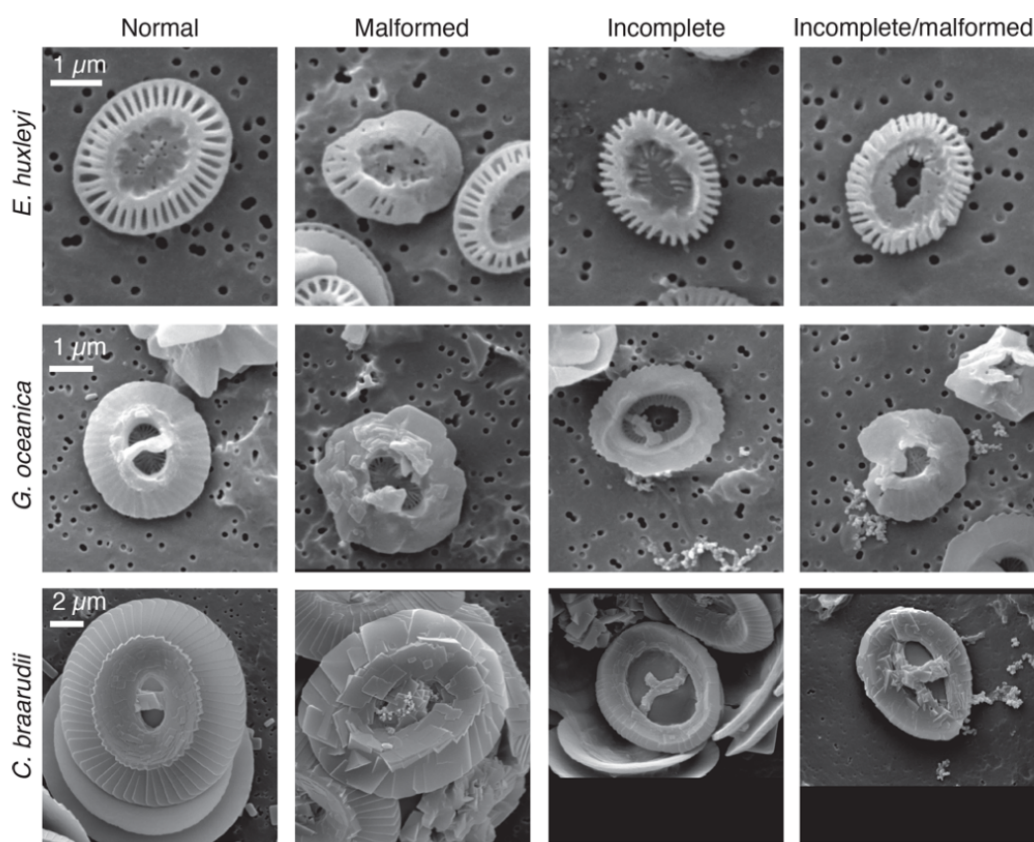
Obr. 11. 3D rekonstrukce spojení V a R krystalu (b); 3D rekonstrukce spojení dvou V krystalů (e); 3D rekonstrukce spojení dvou R krystalů (f) (Walker et al., 2020)



Obr. 12. Mikroskopická fotografie kokolitu (a), schéma kokolitu a středního tubusu (b,c) (Hermoso & Minoletti, 2018)

pH, dnes víme, že tomu tak není. Změny jsou pozorovatelné především na základě ultrastruktury schránek (Hermoso & Minoletti, 2018). Pro měření byla použita kultivovaná *Gephyrocapsa oceanica*. Jako médium byla použita mořská voda s chemickými úpravami podle K/2 receptury. Teplota byla udržována na 15°, osvětlení 150 μmol fotonů na $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, které bylo nastaveno na 14 hodin, 10 hodin byla kultura vystavena tmě. Stupnice pH se pohybovala v rozmezí mezi 7,4 a 9,0. (Hermoso & Minoletti, 2018). Ze vzorku byly vytvořeny preparáty, které byly pozorovány ve světelném mikroskopu pomocí polarizovaného světla. Vědci poté změřili rychlost dělení, změny ve velikosti, tloušťce a biomase kokolitů. Všechny parametry se chovaly v rámci změn pH velmi podobně. Optimum pro buněčné dělení bylo mezi 8,2 a 8,4 pH. Povrchová velikost kokolitů se měnila z 18 na 14 μm při snížení pH z 8,6 na 7,4 a zároveň při zvýšení pH na 9,0. Velké rozdíly bylo možné pozorovat také v tloušťce kokolitů. Při stejném rozmezí pH se kokolity ztenčily až o 25%. Biomasa se masivně snižovala zároveň při nejnižším i při nejvyšším stupni pH. Chování schránek tedy odpovídalo všem předpokladům. Klíčovým poznatkem této studie však bylo poznání, že na pH nejcitlivější částí kokolitu se ukázala být oblast středního tubusu. Ten je největší při pH 8,6 a zmenšuje se až o 70% při snížení na pH 7,4. K určitému zmenšení tubusu však dochází i při zvýšení pH na 9,0. Z toho tedy vyplývá, že největší redukce biomasy při acidifikaci je koncentrována právě v oblasti středního tubusu kokolitů (Hermoso & Minoletti, 2018). Za tímto jevem stojí zajímavý proces. Ukázalo se, že na finální parametry středního tubusu nemá vliv protokokolitový kroužek, který je při syntéze kokolitu pokládán na bazální desku, ale je to právě bazální deska. Protokokolitový kroužek zřejmě není citlivý na změny okolního pH. Tubus roste radiálně v rovině bazální desky, což potvrzuje fakt, že se tubus během acidifikace zužuje, ale do výšky zůstává stejný. Ostatní části kokolitu během snižování pH nevykazují výrazné změny, což dále potvrzuje, že na acidifikaci citlivá oblast je především střední tubus kokolitu (Hermoso & Minoletti, 2018).

Další studie odpovídá na otázku, zda je možné morfologii kokosfér využít k odhadování podmínek prostředí v minulosti. V tomto pokusu byly čtyři rozdílné druhy Coccolithophyceae vystaveny stejným několika podmínkám. *Gephyrocapsa huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica*, *Coccolithus pelagicus* var. *braarudii* a *Pleurochrysis carterae* byly zvoleny z důvodu rozdílné evoluce. Vystaveny byly různé intenzitě světla, koncentracím živin, teplotě a samozřejmě vlivu CO₂ a pH. Předpoklady týmu Giulie Faucher byly, že pokud budou zástupci tak evolučně vzdálených druhů reagovat na nějaký ze stresorů stejně, lze předpokládat, že to byla odpověď druhů i v minulosti (Faucher et al, 2020). Experimenty byly provedeny až po vyměnění 7 až 10 generací každého z druhů v kultuře. Všechny kultury byly třikrát denně otočeny, aby došlo k promíchání a zamezení sedimentaci. Výsledné hodnoty

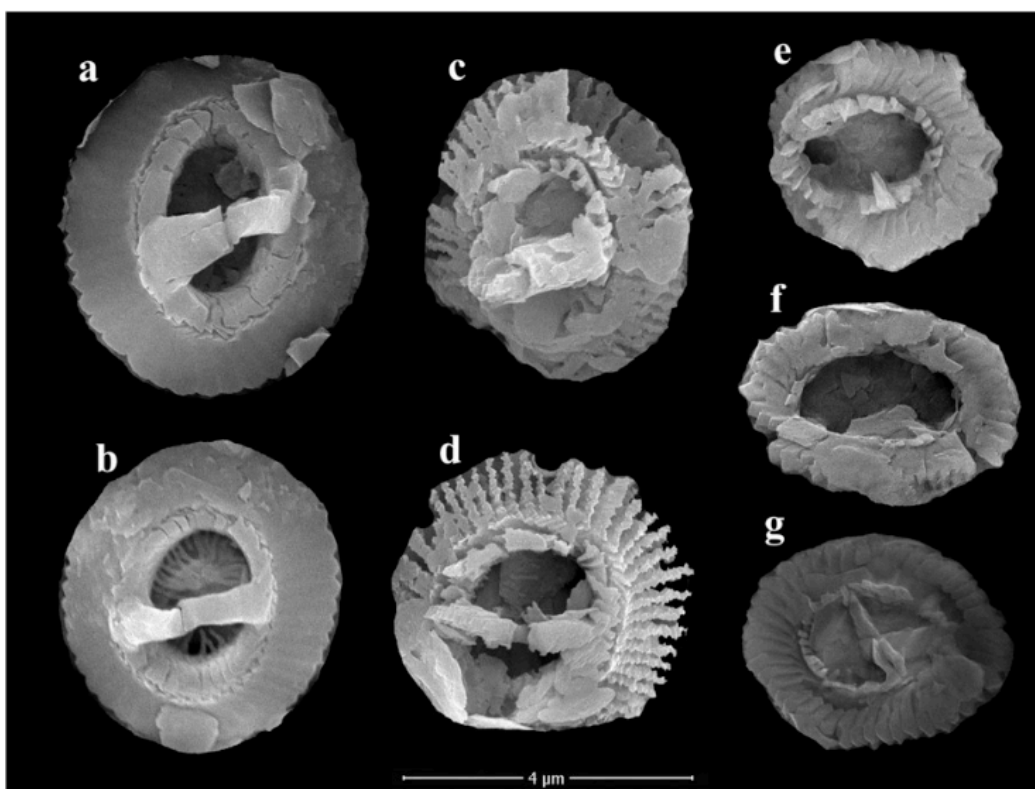


Obr. 13. Příklady změn v morfologii kokolitů (Faucher et al, 2020)

světelného experimentu ukázaly, že intenzita světla zřejmě nemá na studované kokolity stejně velký vliv. Kokolity druhu *Gephyrocapsa Huxleyi* byly méně oválné při ozáření 400 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$, až při hodnotách okolo 500 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$ začala *Gephyrocapsa* tvořit malformované kokolity. Také *Pleurochrysis carterae* vykazoval tvorbu méně eliptických kokolitů, tentokrát však při 350 $\mu\text{mol fotonech na m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *Gephyrocapsa oceanica* vytvářela malformované schránky při hodnotách okolo 200 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Faucher et al, 2020). Při pozorování reakce na limitaci živinami se ukázalo, že kokosféry druhů *Gephyrocapsa huxleyi* a *Coccolithus pelagicus* var. *braarudii* dosahují větších rozměrů při limitaci P (fosfor). Naopak *Gephyrocapsa oceanica* a *Pleurochrysis carterae* tvořily větší kokosféry při limitaci N (dusík). Velikost buňky se u druhu *Gephyrocapsa huxleyi* s

koncentrací živin neměnila. U druhů *Gephyrocapsa oceanica* a *Coccolithus pelagicus* var. *braarudii* se buňky zvětšovaly při limitaci P. Naopak *Pleurochrysis carterae* se zvětšoval při limitaci N. Oba druhy rodu *Gephyrocapsa* tvořily větší, malformovanější kokolity s více distálními štítky při limitaci P. Střední tubus kokolitu byl však s touto limitací tenčí. *Coccolithus pelagicus* var. *braarudii* měl kokolity méně oválné v prostředí limitovaném P, naopak *Pleurochrysis carterae* tvořil méně oválné kokolity při limitaci N (Faucher et al, 2020). Kokosféra i kokolity byly u druhu *Gephyrocapsa huxleyi* menší při vyšší teplotě okolo 22,5°C. *Gephyrocapsa oceanica* tvořila menší kokosféry, ale kokolity nevykazovaly žádné změny. *Pleurochrysis carterae* tvořil při 22,5 °C méně eliptické kokolity. *Coccolithus pelagicus* var. *braarudii* v této teplotě nebyl schopný přežít (Faucher et al, 2020). Z těchto předešlých pokusů tedy vyplývá, že z nich nelze vyvodit podmínky v minulosti, jelikož každý druh na stresor reagoval odlišně. Mimoto je nutné zahrnout i možnost, že ta či ona reakce mohla být způsobena například i vztahy v potravním řetězci. Jinými slovy, že jedinec s větší kokosférou spíše odolal grazingu a tudíž přenesl tento fenotyp do dalších generací. Navíc schopnost zkoumaných druhů odolávat stresorům podobným způsobem může být také způsobeno konvergentní evolucí (Faucher et al, 2020). Jediná podmínka, která v experimentu však ukázala jistou shodu v odpovědi všech druhů, byla změna v koncentraci CO₂ a pH. Tyto stresory nezpůsobily pouze změny ve velikosti, ale především silné malformace schránek. U takové změny lze předpokládat, že se nejedná o způsob, jak uniknout žracímu tlaku (*grazing*) a tudíž ji lze vnímat jako fyziologickou změnu indukovanou nevhodnými podmínkami prostředí. Fosilní záznamy z období se zvýšeným CO₂ a sníženým pH (např.: PETM) jsou navíc často charakteristické vysokými abundancemi malformovaných schránek. Pro přesnost je však nutné zahrnout i fakt, že experiment trval pouze 7-10 generací. Pokud bychom chtěli ověřit reálnou odpověď na změny podmínek prostředí, museli bychom čekat nejméně desítky let. Nicméně experiment ukázal, že při rekonstrukci podmínek prostředí v minulosti na základě změn ve struktuře kokolitů je zřejmě možné rekonstruovat pouze dynamiku koncentrací CO₂ (Faucher et al, 2020).

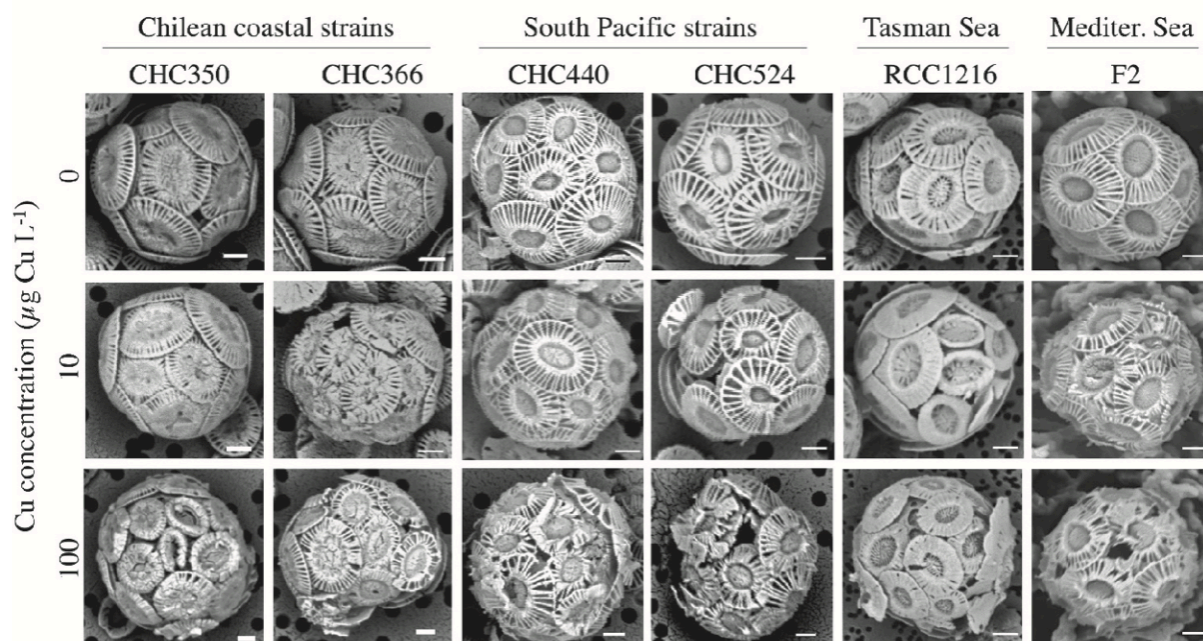
Další studie se věnovala vlivu rozpouštění na morfologii schránek druhu *Gephyrocapsa* spp. Tomuto experimentu budu věnovat pouze malou část své práce, vzhledem k tomu, že je založený na podobném principu jako předešlé studie. Protože však rozpouštění hraje v cyklu uhlíku důležitou roli, je nutné tuto studii zmínit. Vzorky byly odebrány ze sedimentu ve Východočínském moři a obsahovaly především druh *Gephyrocapsa* spp. (Jin & Liu, 2018). Po odběru byly vzorky rozříděny do pěti skupin podle charakteru sedimentu, ve kterém byly nalezeny (obsah organické hmoty, koncentrace CaCO₃, velikost zrněk). Kokolity byly dále pozorovány v polarizačním mikroskopu. Posléze byly při zvětšení 1250x vyfotografovány a převedeny do černobílého formátu v Matlabu. Změřeno bylo celkem 1205 kokolitů. Délka kokolitů se u každého pohybovala v rozmezí od 3,16 μm do 5,94 μm, s průměrnou hodnotou 4,19 μm. Tloušťka dosahovala hodnot od 0,045 μm do 0,525 μm, s průměrem 0,249 μm. Průměrně kokolity vážily 7,6 pg. Nejmenších velikostí kokolity dosahovaly v oblasti bahnitého pásu ve Východočínském moři, kde dochází k největší míře rozpouštění vlivem degradace organického materiálu (Jin & Liu, 2018). Experiment se věnoval i míře schopnosti sestavit



Obr. 14. Vliv rozpouštění na morfologii kokolitů; plně vytvořené kokolity (a-b); částečně rozpuštěné kokolity (c-d); zcela rozložené kokolity vlivem rozpouštění (e-g) (Jin & Liu, 2018)

kokolity správně do kokosféry v oblastech vysokého rozpouštění. *Gephyrocapsa spp.* byla více abundantní i v oblasti dlouhodobé hypoxie, s vyšší mírou rozpouštění. *Gephyrocapsa huxleyi* se však ukázala být jen velmi málo odolná rozpouštění, jelikož se v těchto oblastech ve vodním sloupci vyskytovala jen minimálně. Jako kontrola byl proveden další experiment, který vystavoval kokolity navíc i nízkému pH. Ukázalo se, že acidifikace a míra rozpouštění mají na schopnost kokolitek správně tvořit kokolity a sestavovat je do kokosfér, velmi podobný vliv. Morfologické měření ukázalo, že *Gephyrocapsa spp.* by díky své relativně vysoké schopnosti odolávat rozpouštění mohla být využita pro rekonstrukci podmínek v průběhu Pleistocénu (Jin & Liu, 2018).

V poslední studii se vědci zaměřili na odpověď *Gephyrocapsa Huxleyi* na různé koncentrace mědi (Cu) v různých prostředích a stádiích vývoje. V této studii byly předmětem zkoumání rychlost růstu, pohyblivost, vznik malformovaných schránek a variabilní fluorescence. Provedeny byly také jak průtokové cytometrické testy měřící procento živých buněk a akumulaci intracelulárního reaktivního kyslíku, tak měření aktivity askorbátperoxidázy a glutathionperoxidázy (Mella-Flores et al., 2018). Já se v této části však zaměřím především na vliv mědi na schopnost *Gephyrocapsy* tvořit správně sestavené kokosféry. Měď je za nízkých koncentrací velmi důležitým kofaktorem mnoha enzymů fytoplanktonu, za vysokých koncentrací je však měď velmi toxická. Toxicita mědi je způsobena její vysokou reaktivitou, která často vede k oxidativnímu stresu (Mella-Flores et al., 2018). V tomto experimentu bylo porovnáváno dvanáct kmenů *Gephyrocapsy Huxleyi* z růstných oblastí světového oceánu, deset kmenů bylo ve fázi diploidní a dva ve fázi haploidní. Kultury byly udržovány ve 14°C v



Obr. 15. Vliv Cu na tvorbu malformovaných schránek u druhu *Gephyrocapsa Huxleyi* (Mella-Flores et al., 2018)

mořská vodě s chemickými úpravami podle K/2. Fotoperioda byla 12 hodin světlo ku 12 hodinám ve tmě (Mella-Flores et al., 2018). Toxicita Cu pro dvanáct daných kmenů byla dále určena pomocí biotestů inhibice rychlosti růstu. Změny v morfologii kokolitů byly pozorovány v SEM a to pouze u vybraných diploidních kmenů. Kmeny byly vystaveny hodnotám 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu. Všechny kmeny vystavené hodnotě 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu vykazovaly velmi silné známky malformace, či zcela nesestavených kokosfér. U kmene F2 bylo pozorováno dokonce až 100% malformovaných schránek. Při vystavení buněk nižším hodnotám koncentrace mědi již byly některé kmeny schopny vlivu Cu odolávat a sestavovat kokosféry správně. U kmene RCC1216 bylo pozorováno dokonce méně než 15% malformovaných kokosfér. Při porovnání schopnosti kokolitogeneze a rychlosti růstu vědci zjistili, že mezi sebou vzájemně nekorelují a že *Gephyrocapsa Huxleyi* v případě Cu reaguje u obou těchto dvou jevů různým způsobem (Mella-Flores et al., 2018).

6. Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se pokusila shrnout všechny aktuální informace o linii Haptophyta a dále především o třídě Coccolithophyceae. Zaměřila jsem se hlavně na morfologii jejich schránek - kokosfér. Protože s morfologií kokosfér velmi úzce souvisí i životní cyklus Coccolithophyceae, zabývala jsem se jím také více do podrobnosti. Část mé práce jsem dále věnovala vlivu kokolitek na cyklus uhlíku na zemi, regulaci planetárního klimatu, kalcifikaci a její ovlivnění recentní acidifikací oceánu. Nejdůležitější částí mé práce je pátá kapitola, kde detailně popisuji recentní studie týkající se právě morfologie schránek Coccolithophyceae. Soustředila jsem se především na studie, ve kterých se vědci pokoušeli zjistit jaký vliv mají na kokolitogenezi - mineralizaci nových kokolitů - různé podmínky prostředí, jako je koncentrace CO_2 , pH či míra rozpouštění. Mým cílem bylo také výstižně

popsat samotný mechanismus kokolitogeneze od počátku mineralizace až po sestavování maturovaných kokolitů.

Coccolithophyceae je skupina velmi důležitých protist. Díky kalcifikovaným schránkám kokolitek se nám dostává podrobného záznamu o vzhledu Coccolithophyceae v minulosti, zároveň však mohou být zdrojem našich poznatků o podmínkách prostředí, a to především koncentraci CO₂ v daném období. Coccolithophyceae jsou jedni z nejvýznamnějších primárních producentů. Dále jsou kokolityky neopomenutelnými činiteli moderního ukládání uhlíku do hlubokých vrstev oceánu a produkce DMS do atmosféry a tudíž lokální tvorby mraků. V rámci nadprodukce kokolitů jsou také některé druhy schopny tvořit tzv. *white tides*, které dále pomáhají regulovat klima naší planety. V rámci recentní acidifikace oceánů, především působením člověka, však i kokolityky ztrácejí na svém potenciálu kalcifikovat a tudíž správně fungovat ve všech výše zmíněných aspektech.

7. Seznam použité literatury

- Bach, L. T., Riebesell, U., & Schulz, K. G. (2011). Distinguishing between the effects of ocean acidification and ocean carbonation in the coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 56(6), 2040–2050. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.6.2040>
- Balch, W. M. (2017). The Ecology, Biogeochemistry, and Optical Properties of Coccolithophores. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121916>
- Barker, S. (2013). Dissolution of Deep-Sea Carbonates. In *Encyclopedia of Quaternary Science: Second Edition* (pp. 859–870). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53643-3.00289-2>
- Bates, N. R. (2019). Ocean carbon cycle. In *Encyclopedia of Ocean Sciences* (pp. 418–428). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11598-2>
- Bendif, E. M., Probert, I., Hervé, A., Billard, C., Goux, D., Lelong, C., Cadoret, J. P., & Véron, B. (2011). Integrative Taxonomy of the Pavlovophyceae (Haptophyta): A Reassessment. *Protist*, 162(5), 738–761. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.05.001>
- Berger, W. (1973). SHORTER CONTRIBUTION Deep-sea carbonates: evidence for a coeolith lysocline (Vol. 20). Pergamon Press.
- Brownlee, C., & Taylor, A. (2004). Calcification in coccolithophores: A cellular perspective.
- Daniels, C. J., Poulton, A. J., Young, J. R., Esposito, M., Humphreys, M. P., Ribas-Ribas, M., Tynan, E., & Tyrrell, T. (2016). Species-specific calcite production reveals *Coccolithus pelagicus* as the key calcifier in the Arctic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 555, 29–47. <https://doi.org/10.3354/meps11820>
- Eikrem, W., Medlin, L. K., Henderiks, J., Rokitta, S., Rost, B., Probert, I., Throndsen, J., & Edvardsen, B. (2017). Haptophyta. In *Handbook of the Protists* (pp. 1–61). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_38-2
- Faucher, G., Riebesell, U., & Thomas Bach, L. (2020). Can morphological features of coccolithophores serve as a reliable proxy to reconstruct environmental conditions of the past? *Climate of the Past*, 16(3), 1007–1025. <https://doi.org/10.5194/cp-16-1007-2020>
- Geisen, M., Young, J. R., Probert, I., Sáez, A. G., Baumann, K.-H., Sprengel, C., Bollmann, J., Cros, L., de Vargas, C., & Medlin, L. K. (2004). Species level variation in coccolithophores.
- Groisillier, A., Shao, Z., Michel, G., Goullitquer, S., Bonin, P., Krahulec, S., Nidetzky, B., Duan, D., Boyen, C., & Tonon, T. (2014). Mannitol metabolism in brown algae involves a new phosphatase family. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 559–570. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert405>
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M (2022). AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>

- Hermoso, M., & Minoletti, F. (2018). Mass and Fine-Scale Morphological Changes Induced by Changing Seawater pH in the Coccolith *Gephyrocapsa oceanica*. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 123(9), 2761–2774. <https://doi.org/10.1029/2018JG004535>
- 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.
- Jin, P., Zhang, J., Wan, J., Overmans, S., Gao, G., Ye, M., Dai, X., Zhao, J., Xiao, M., & Xia, J. (2021). The Combined Effects of Ocean Acidification and Heavy Metals on Marine Organisms: A Meta-Analysis. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.801889>
- Jin, X., Liu, C., & Zhang, H. (2018). Coccolith morphological and assemblage responses to dissolution in the recent sediments of the East China Sea. *Marine Micropaleontology*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2018.09.001>
- Jordan, R. W. (2009). Coccolithophores Defining Statement Morphology Taxonomy Collection Methods Biogeography and Ecology Blooms Evolution Further Reading.
- Jordan, R. W., Cros, L., & Young, J. R. (2004). A Revised Classification Scheme for Living Haptophytes. In Source: *Micropaleontology* (Vol. 50). The Micropaleontology Project., Inc.
- Langer, G. (2013). Palaeontology: Plankton in a greenhouse world. In *Nature Geoscience* (Vol. 6, Issue 3, pp. 164–165). <https://doi.org/10.1038/ngeo1750>
- Malin, G., & Steinke, M. (2004). Dimethyl sulfide production: what is the contribution of the coccolithophores?
- Medlin, L., & Edvardsen, B. (2007). Molecular systematics of Haptophyta (pp. 183–196). <https://doi.org/10.1201/9780849379901.ch10>
- Meier, K. J. S., Beaufort, L., Heussner, S., & Ziveri, P. (2014). The role of ocean acidification in *Emiliania huxleyi* coccolith thinning in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences*, 11(10), 2857–2869. <https://doi.org/10.5194/bg-11-2857-2014>
- Mella-Flores, D., MacHon, J., Contreras-Porcía, L., Mesa-Campbell, S., & Dassow, P. von. (2018). Differential responses of *Emiliania huxleyi* (Haptophyta) strains to copper excess. *Cryptogamie, Algologie*, 39(4), 481–509. <https://doi.org/10.7872/crya/v39.iss4.2018.481>
- Naik, S. S., & Naidu, P. D. (2010). Evaluation of the CaCO₃ dissolution proxies in sediment cores from above the lysocline. *Quaternary International*, 213(1–2), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2008.11.009>
- Navarro, K. F., Urrutia-Fucugauchi, J., Villagran-Muniz, M., Sánchez-Aké, C., Pi-Puig, T., Pérez-Cruz, L., & Navarro-González, R. (2020). Emission spectra of a simulated Chicxulub impact-vapor plume at the Cretaceous–Paleogene boundary. *Icarus*, 346. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2020.113813>
- Nicholls, K. H. (2003). HAPTOPHYTE ALGAE. In *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-741550-5.50014-3>

- Robert, C. M. (2008). Chapter Eleven Biogenic Sediments. In *Developments in Marine Geology* (Vol. 3, pp. 365–413). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1572-5480\(08\)00211-X](https://doi.org/10.1016/S1572-5480(08)00211-X)
- Svobodová, A. (2016). Planktonní ekosystémy svrchní jury a křídý (vápnitý nanoplankton, kalpionely. Thierstein, H. R., Young, J. R. (2004). Coccolithophores. In *Coccolithophores*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-06278-4>
- Thompson, A. W., Foster, R. A., Krupke, A., Carter, B. J., Musat, N., Vaulot, D., Kuypers, M. M. M., & Zehr, J. P. (2012). Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science*, 337(6101), 1546–1550. <https://doi.org/10.1126/science.1222700>
- Tsuji, Y., & Yoshida, M. (2017). Biology of Haptophytes: Complicated Cellular Processes Driving the Global Carbon Cycle. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 84, pp. 219–261). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.07.002>
- Tyrrell, T., & Merico, A. (2004). *Emiliana huxleyi*: bloom observations and the conditions that induce them. http://www.soes.soton.ac.uk!staff/ttleh/v_1.htm.
- Tyrrell, T., Young, J.R. (2009). Coccolithophores. *Encyclopedia of Ocean Sciences*. Elsevier, pp. 606–614. <https://doi.org/10.1016/B978-012374473-9.00662-7>
- Walker, J. M., Marzec, B., Ozaki, N., Clare, D., & Nudelman, F. (2020). Morphological development of *Pleurochrysis carterae* coccoliths examined by cryo-electron tomography. *Journal of Structural Biology*, 210(1). <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107476>
- Young, J. R., Poulton, A. J., & Tyrrell, T. (2014). Morphology of *Emiliana huxleyi* coccoliths on the northwestern European shelf - Is there an influence of carbonate chemistry? *Biogeosciences*, 11(17), 4771–4782. <https://doi.org/10.5194/bg-11-4771-2014>
- Young, J., Geisen, M., Cros, L., Kleijne, A., Sprengel, C., Probert, I., & Østergaard, J. (2003). A guide to extant coccolithophore taxonomy. In *Journal of Nannoplankton Research Special Issue* (Vol. 1).
- de Vargas, C., Aubry, M., Probert, I., & Young, J. (2007). Origin and Evolution of Coccolithophores: From Coastal Hunters to Oceanic Farmers. In *Evolution of Primary Producers in the Sea*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370518-1.50013-8>
- de Vargas, C., & Probert, I. (2004). New keys to the Past: Current and future DNA studies in Coccolithophores.
- de Vries, J., Monteiro, F., Wheeler, G., Poulton, A., Godrijan, J., Cerino, F., Malinverno, E., Langer, G., & Brownlee, C. (2020). The haplo-diplontic life cycle expands niche space of coccolithophores. <https://doi.org/10.5194/bg-2020-194>
- Šupraha, L., Ljubešić, Z., Mihanović, H., & Henderiks, J. (2016). Coccolithophore life-cycle dynamics in a coastal Mediterranean ecosystem: Seasonality and species-specific patterns. *Journal of Plankton Research*, 38(5), 1178–1193. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbw061>