

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



**Bc. Petr Knotek**

**Vzor jako funkční znak,  
případová studie na zlativkách rodu *Mallomonas***

Pattern as a functional trait, case study on *Mallomonas* chrysophytes

Diplomová práce

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

Konzultant: doc. RNDr. Pavel Škaloud, Ph.D.

Praha 2022

### **Prohlášení:**

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

V Praze dne 22. 4. 2022

Podpis:

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěl poděkovat své školitelce Yvonne Němcové za její neocenitelnou pomoc, dobře mířené rady a přístup, při kterém jsem měl dostatek volnosti pro vlastní nápady. Dále Pavlu Škaloudovi, který dokázal rozehnat i ty nejdotěrnější chmury a vyřešit i ty nejzapeklitější problémy. Bohužel již ne jmenovitě, ale stejnou měrou bych rád poděkoval i všem mým zbylým kamarádům z algologického oddělení PřFUK, s kterými jsem mohl sdílet všechno dobré i zlé a kteří mi vždy byly ochotní nabídnout pomocnou ruku, zlepšit náladu nebo si dát společně kávu. V neposlední řadě bych rád poděkoval mé rodině, která mě bezvýhradně podporovala ve všech mých činnostech i přes to, že ve většině případů ani nevěděla o čem mluvím. Obzvláště pak svým rodičům a mé přítelkyni Aničce, bez kterých bych to takhle daleko určitě nedotáhl.

## Abstrakt

Vzory, které lze obdivovat na povrchu mnoha živých tvorů, se mimo nám dobře známý makroskopický svět vyskytují také u mnoha mikroskopických organismů. Nicméně jejich význam a funkce jsou na rozdíl od těch makroskopických prozatím jen velmi málo probádány. U rozsivek (Bacillariophyceae) a kokolitek (Haptophyceae) již vzniklo několik hypotéz zabývajících se funkcí jejich vzorovaných schránek. Jedna z hypotéz uvažuje o schránce jako o fotonické entitě, která by mohla odrážet UV záření pryč od buňky. Další se věnují spíše jejím mechanickým vlastnostem, které se řadí mezi ty nejpůsobivější v rámci biologických struktur. Schránku na svém povrchu mají také křemičité chrysomonády (Synurales, Stramenopiles). Jejich buňka je pokryta šupinami (o velikosti kolem 4  $\mu\text{m}$ ), které jsou velmi pravidelně uspořádány a na povrchu tvoří křemičitou schránku. Vzor na šupinách je přitom druhově specifický a během evoluce docházelo k jeho postupné modifikaci.

Tato práce si klade za cíl posoudit, zda lze vzorování křemičitých šupin u řádu Synurales považovat za funkční znak, či zda se jedná o důsledek působení neutrální evoluce. Za účelem testování možných fotonických vlastností vzorovaných struktur, byla provedena dvojice růstových experimentů, při kterých byly experimentální kultury vystaveny UVA a UVB záření. Současně byl sestrojen model křemičité šupiny druhu *Mallomonas striata* var. *striata* v programu RFEM 5, u kterého byl pomocí metody konečných prvků (FEM) posuzován vliv žebrované sekundární struktury na celkové mechanické vlastnosti šupiny.

Experimentálně bylo zjištěno, že při ochraně buňky proti UVA záření může hrát roli míra pravidelnosti vzorování, což by mohlo blízce souviset s principy, na kterých fungují fotonické krystaly. Proti nebezpečnějšímu krátkovlnnému UVB záření se ukázaly jako nejodolnější druhy, které mají na svém povrchu výrazně silicifikované, tlustostěnné šupiny. Analýza FEM přisoudila žebrované struktury v oblasti štítu jen nepodstatný vliv na mechanickou pevnost šupiny. V tomto ohledu hrály důležitou roli sekundární struktury V-žebro a přilehlé posteriorní trámce. Žebrovaná sekundární struktura spíše nepřispívala k celkové pevnosti šupiny, ale sloužila k vyztužení oblasti štítu. Soustava žeber pravděpodobně zajišťuje mírně vypouklý tvar štítu, který se podobá optické čočce. Šupina by tak mohla tvořit fotonickou strukturu.

**Klíčová slova:** deformace, funkční znaky, *Mallomonas*, metoda konečných prvků, srovnávací napětí, struktura křemičitých šupin, ultrafialové záření, UVA, UVB, zlativky



# Abstract

The patterns that can be admired on the surface of many living creatures are also found in many microscopic organisms outside of the macroscopic world we are familiar with. However, their significance and function are yet little understood compared to those of the macroscopic world. In diatoms (Bacillariophyceae) and coccoliths (Haptophyceae), several hypotheses have already been developed concerning the function of their patterned shells. One hypothesis considers the shell as a photonic entity that could reflect UV radiation away from the cell. Others focus more on its mechanical properties, which are among the most impressive within biological structures. Silica-scaled chrysophytes (Synurales, Stramenopiles) also possess a complex shell (or scale-case). Cells are covered with scales (about 4  $\mu\text{m}$  in size) that are very regularly arranged and form a siliceous scale-case on the surface. The pattern on the scales is species-specific and has undergone gradual modification during evolution.

This work aims to assess whether the patterning of siliceous scales in the order Synurales can be considered a functional trait or it is a result of neutral evolution. To test the possible photonic properties of the patterned structures, a pair of growth experiments were performed. The experimental cultures were exposed to UVA and UVB radiation. Simultaneously, a model of the siliceous scale of *Mallomonas striata* var. *striata* was constructed in RFEM 5. This was used to assess the effect of the ribbed secondary structure on the overall mechanical properties of the scale using the finite element method (FEM).

It has been found that the degree of pattern regularity may play a role in protecting the cell against UVA radiation, which could be closely related to the principles underlying photonic crystals. In contrast, against the more dangerous short-wave UVB radiation, species that have highly silicified, thick-walled scales on their surface have been shown to be the most resistant. FEM analysis attributed only a minor influence on mechanical strength to the ribbed structure in the shield region. On the contrary, the secondary structures of the V-rib and the adjacent posterior struts proved to be the most important in this respect. However, rather than contributing to the overall strength of the scale, the ribbed secondary structure is used to reinforce the shield region. This supports its shape resembling an optical lens and could thus also provide its eventual photonic properties.

**Key words:** Chrysophyceae, deformation, equivalent stress, finite element method, function traits, *Mallomonas*, structure of silica scales, ultraviolet radiation, UVA, UVB

# Obsah

1 Úvod.....	9
1.1 Vzorované nanostruktury.....	9
1.1.1 Vzor v živé přírodě a mikrosvětě.....	9
1.1.2 Principy vzniku vzorovaných nanostruktur.....	10
1.2 Adaptivní vlastnosti vzorovaných nanostruktur.....	12
1.2.1 Vlastnosti ovlivňující interakci s vnějším prostředím.....	12
1.2.2 Mechanické vlastnosti.....	13
1.2.3 Fotonické vlastnosti.....	14
1.3 Vliv UV záření na fytoplankton.....	15
1.3.1 Složení slunečního záření ve vodním sloupci.....	16
1.3.2 Poškození buněk UV zářením a možné způsoby obrany.....	16
1.4 Nanostruktury u bičíkovců řádu Synurales.....	18
1.4.1 Charakteristika a klasifikace řádu Synurales.....	18
1.4.2 Unikátní morfologie křemičité schránky.....	19
1.4.3 Možné adaptivní vlastnosti křemičitých šupin.....	21
1.5 Cíle práce.....	22
2 Metodika.....	23
2.1 Experimentální organismy a jejich kultivace.....	23
2.1.1 Experimentální organismy.....	23
2.1.2 Kultivace experimentálních organismů.....	23
2.2 Světelná a elektronová mikroskopie.....	25
2.2.1 Světelná mikroskopie (LM).....	25
2.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	25
2.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	25
2.3 Analýza metodou konečných prvků.....	26
2.3.1 Strukturální charakterizace modelu.....	26

2.3.2 Modelovací software.....	27
2.3.3 Zatěžovací stav.....	28
2.4 Aparatura pro experimenty s UV zářením.....	29
2.5 Pilotní růstové experimenty.....	30
2.6 Růstové experimenty.....	31
2.6.1 Typy ošetření.....	31
2.6.2 Přípravy experimentů.....	32
2.6.3 Průběh experimentů.....	33
2.7 Fylogenetická analýza.....	33
2.8 Analýza dat.....	34
2.8.1 Výpočet plochy pod křivkou.....	34
2.8.2 Měření maximálního kvantového výtěžku.....	35
2.8.3 Statistická analýza dat.....	35
3 Výsledky.....	36
3.1 Morfologická charakterizace.....	36
3.2 Analýza metodou konečných prvků.....	43
3.2.1 Srovnávací napětí.....	43
3.2.2 Deformace.....	45
3.3 Fylogenetická analýza.....	46
3.4 Růstové experimenty.....	47
3.4.1 Růstový experiment s UVA zářením.....	47
3.4.2 Růstový experiment s UVB zářením.....	49
4 Diskuse.....	52
4.1 Analýza metodou konečných prvků.....	52
4.1.1 Mechanické vlastnosti křemičitých šupin.....	52
4.1.2 Vliv vzorovaných struktur na mechanické vlastnosti křemičitých šupin.....	54
4.2 Růstové experimenty s UV zářením.....	55

4.2.1 Porovnání přírodních a experimentálních podmínek.....	55
4.2.2 Odolnost vůči UV záření u rodu <i>Mallomonas</i> .....	56
4.2.3 Vliv křemičitých šupin na odolnost vůči UV záření.....	59
4.2.4 Vliv typu vzorování na odolnost vůči UV záření.....	60
5 Závěr.....	62
6 Zdroje.....	63
7 Přílohy.....	75

## Seznam zkratk

Zkratka	Anglicky	Česky
AUC	area under logistic growth curve	plocha pod logistickou křivkou růstu
F <sub>0</sub>	minimal fluorescence yield	minimální výtěžek fluorescence
FEM	finite element method	metoda konečných prvků
MES	2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid	2-[N-morfolino]ethansulfonová kys.
PAR	photosynthetically active radiation	fotosynteticky aktivní záření
QY <sub>max</sub>	maximum quantum yield	maximální kvantový výtěžek
SEM	scanning electron microscopy	skenovací elektronová mikroskopie
TEM	transmission electron microscopy	transmisní elektronová mikroskopie
TES	tris EDTA SDS buffer	tris EDTA SDS pufr
UV	ultraviolet	ultrafialové

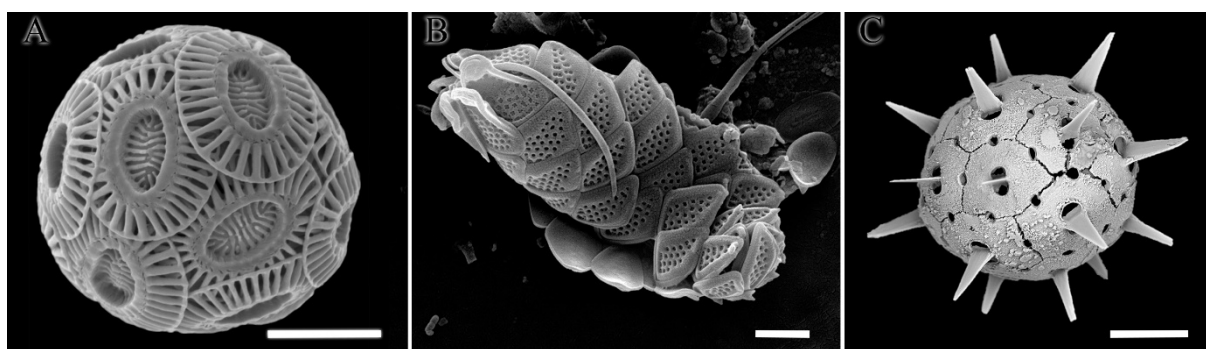
# 1 Úvod

## 1.1 Vzorované nanostruktury

### 1.1.1 Vzor v živé přírodě a mikrosvětě

Živá příroda nabývá nesčetného množství forem, jejichž estetika a komplikovanost právoplatně přitahují naši pozornost. Jedním z prvků, který často přispívá ke komplexnosti formy živých organismů je vzor (Stevens 1974). Ten je tvořen viditelnými zákonitostmi, které vycházejí z několika primitivních motivů a dokonce již mohou být v mnoha případech matematicky modelovány (Camazine 2003).

Vzory se ovšem nevyskytují pouze v makroskopickém světě. Nalezneme je i na povrchu mnoha mikroskopických organismů, kteří využívají řízenou krystalizaci k tvorbě různorodých schránek (Berman et al. 1993; Demadis 2018). Jako materiál pro tvorbu těchto struktur se nejčastěji uplatňuje oxid křemičitý ( $\text{SiO}_2$ ), uhličitan vápenatý ( $\text{CaCO}_3$ ) či celestin ( $\text{SrSO}_4$ ) (Raven & Giordano 2009) (obr. 1.1). Přestože tuto skrytou tvarovou rozmanitost mikrosvěta obdivoval již Ernest Haeckel ve svém knize *Kunstformen der Natur* (Haeckel 1904), nejsou dodnes plně objasněny možné adaptivní vlastnosti či principy stojící za vznikem těchto vzorovaných mikrostruktur.



**Obrázek 1.1:** Snímky pořízené pomocí SEM, zachycující mikroskopické schránky vytvořené řízenou krystalizací různých materiálů. Měřítko 2  $\mu\text{m}$ : **A** – Kokolitosféra druhu *Gephyrocapsa huxleyi* tvořená uhličitanem vápenatým (upraveno podle Young et al. n.d.); **B** – Křemičitá schránka druhu *Mallomonas pumilio* var. *pumilio* (Upraveno podle Němcová n.d.); **C** – Schránka mřížovce rodu *Diporapsis* z celestinu (Upraveno podle Leblanc et al. 2022)

### 1.1.2 Principy vzniku vzorovaných nanostruktur

Principy vzniku vzorovaných struktur lze rozdělit hned do několika úrovní. První z nich je rovina matematická určující základní vzorce a rovnice (Devlin 1996). Z těchto zákonitostí následně vychází úroveň fyzikální a chemická, jež popisuje modely reakcí a interakcí složek systému, které stojí na počátku tvorby struktur. Poslední je úroveň biologická, kde dochází ke změnám v závislosti na evolučních procesech.

Prvním, kdo se snažil upozornit na matematické a fyzikální vztahy vymezující formu či vzor struktur u živých organismů byl skotský zoolog D'Arcy Wentworth Thompson. Ve své knize *O růstu a formě* (1917) ukázal, že přinejmenším v biologii a často i v neživém světě není tvorba vzorů statická věc, ale vychází z růstu. Prokázal také, že mnohé ze zdánlivě složitých vzorů jdou vyjádřit jednoduchou rovnicí. Dnes již existuje velké množství rovnic a modelů popisující principy a podmínky utváření vzorů (Golovin & Nepomnyashchy 2006).

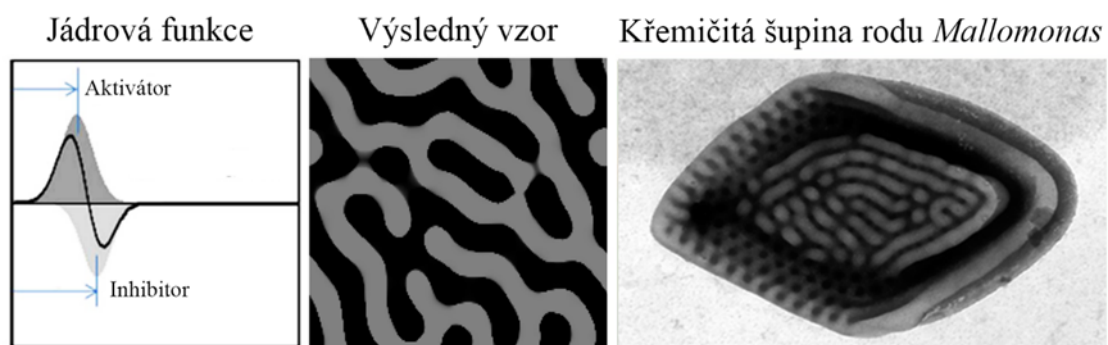
Jedním z nejzásadnějších je reakčně-difúzní model prezentovaný Alanem Turingem (1952), který ukazuje, jak se mohou autonomně utvářet prostorové vzory v organismu. Ve své práci popisuje systém, ve kterém vzájemné působení dvou difúzních látek (aktivátoru a inhibitoru) utváří periodicky se opakující vzory skvrn a pruhů (Castets et al. 1990; Ouyang & Swinney 1991), přičemž nedávno byl tento princip pozorován i na atomárním měřítku (Fuseya et al. 2021). Jedna z alternativních úprav tohoto modelu využívá při výpočtu jádrových funkcí (kernel-function) namísto původních parciálně diferenciálních rovnic (Kondo 2017). Jedná se o KT model (kernel-based Turing model), který je díky úpravě výpočtu schopný generovat všechny standardní varianty 2D vzorů (bodové, pruhované a síťované), ale stejně tak i některé složité vzory, které je obtížné generovat ostatními matematickými modely (Kondo 2017) (obr 1.2).

Na biologické úrovni, již začíná být podstatný rozdíl mezi vzory vyskytujícími se na povrchu mikroskopických a makroskopických organismů. U makroskopických zástupců je vzor často vnímán jako prostředek k maskování, pohlavnímu výběru, symbiózám či různým druhům signalizace včetně mimikry, tudíž jeho konečný vzhled zákonitě podléhá selekci (Darwin 1902; Wickler & Martin 1968; Arnal et al. 2006). Naopak u mikroorganismů již Darwin považoval jejich vysokou morfologickou variabilitu za ukazatel relativní nedotčenosti přirozeným výběrem (Darwin 1902). Oproti větším a komplexnějším makroorganismům role náhody v evolučních procesech u mikroorganismů narůstá i díky výrazně menšímu počtu vývojových kroků, kterými si musí organismus během vývoje projít (Bonner 2013). Je to dáno tím, že komplexní organismy musejí během svého vývoje podstoupit řadu postupných

kroků, při kterých každá nepříznivá mutace může celý proces skrze vnitřní selekci ukončit (Whyte 1965). Naproti tomu u mikroorganismů, kteří při svém vývoji projdou minimem vývojových kroků, je mnohem pravděpodobnější, že se náhodná mutace projeví na konečném fenotypu jedince (Bonner 2013).

Z těchto skutečností lze vyvodit, že morfologická evoluce vzorovaných struktur v mikroskopickém měřítku je řízena především neutrálními procesy, a že konvergentní morfologie vznikají náhodou, důsledkem omezeného morfologického prostoru, který je ohraničen fyzikálními principy působícími v mikrosvětě (Bonner 2013). Nabízím se alternativním vysvětlením vzniku konvergenčních morfologií je přirozený výběr působící za podobného selekčního tlaku. Tento koncept morfologické evoluce je v mnoha aspektech analogický s evolucí molekulární, kde nulová hypotéza počítá s neutrální mutací a odchylky od této nulové hypotézy mohou být interpretovány jako důkaz pozitivního výběru (Lahr et al. 2014). Problémem je, že formální způsob, jak testovat nulovou morfologickou hypotézu prozatím neexistuje. Jedním z možných řešení by mohlo být využití počítačové simulace genetických a morfologických interakcí a následného modelování virtuálních morfologií (Lehman & Stanley 2011).

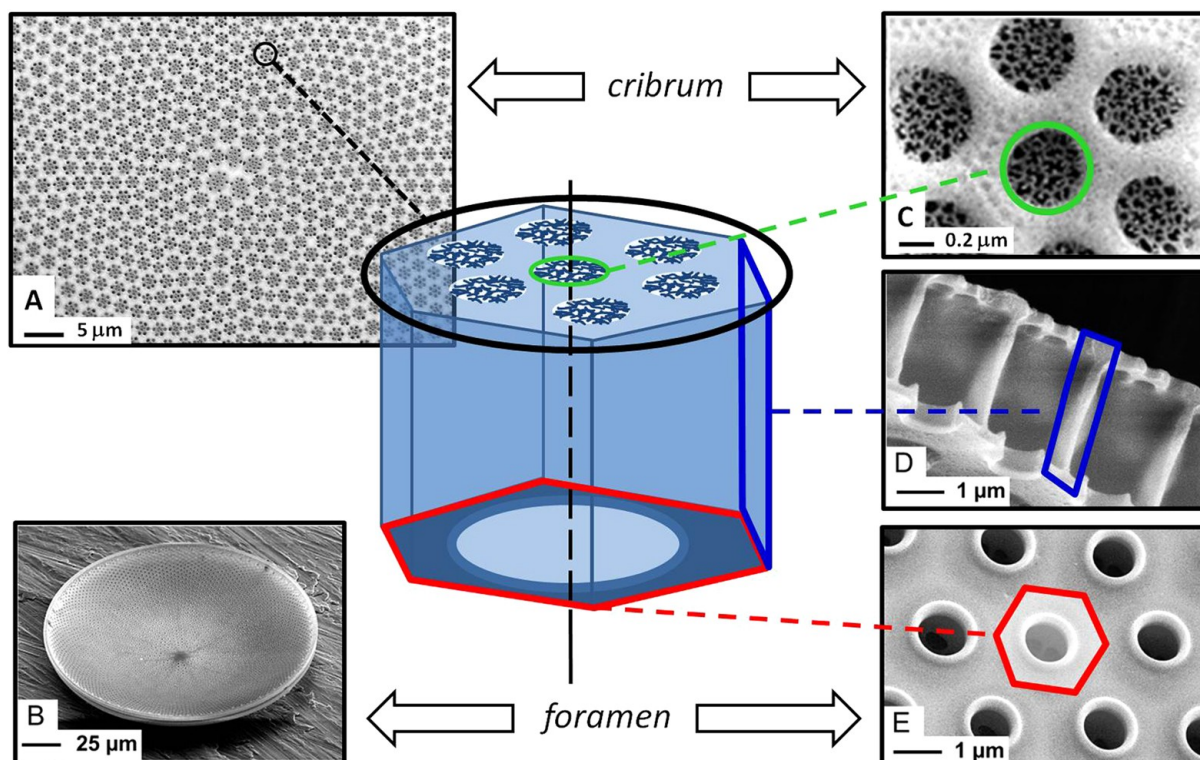
Nicméně i přes silný vliv neutrálních procesů se zdá, že alespoň některé příklady morfologických konvergenzí v mikrosvětě jsou způsobeny selekcí, zvláště když k nim dochází mezi vzdáleně příbuznými liniemi žijícími v podobných prostředích (Lahr et al. 2014). U struktur s komplexní morfologií již byla zjištěna řada adaptivních funkcí, a lze se tedy domnívat, že jsou pod vlivem selekce. Nejprostudovanější mikroskopickou strukturou je nepochybně křemičitá frustula rozsivek, která v poslední době přitahuje zájem vědců nejen pro své možné nanoinženýrské či medicínské využití (Losic et al. 2009; Wang et al. 2021).



**Obrázek 1.2:** Simulace vzniku vzoru na křemičité šupině rodu *Mallomonas* pomocí kernel-Turingova modelu, využívající k výpočtu jádrové funkce popisující působení aktivátoru a inhibitoru. Upraveno podle (Kondo 2017); Fotografie křemičité šupiny druhu *M. labyrinthina* převzata od Tučková (nepublikováno)

## 1.2 Adaptivní vlastnosti vzorovaných nanostruktur

Jeden z prozatím nejprostudovanějších mikroskopických vzorů se nachází na buněčné mineralizované stěně rozsivek – frustule. Tato schránka tvořená převážně oxidem křemičitým je rozdělená do dvou polovin (valv), které spojují pásy (girdle bands). Všechny tyto součásti frustuly mají na svém povrchu vzorovanou nanostrukturu tvořenou póry více řádů (Sumper 2002) (obr. 1.3). Tento druhově specifický komplexní vzor dodává frustule její charakteristické vlastnosti (Pappas 2005).



**Obrázek 1.3:** Obecné schéma valvy rozsivky druhu *Coscinodiscus centralis* a odpovídající fotografie ze SEM: **A** – Valva z pohledu směrem od cribrum; **B** – Valva z pohledu směrem od foramenu; **C** – Cribrum v detailu; **D** – Boční pohled na stěnu areol; **E** – Foramen. Převzato od Romann et al. (2015).

### 1.2.1 Vlastnosti ovlivňující interakci s vnějším prostředím

Povrch frustuly vytváří rozhraní, na kterém dochází k interakcím s okolním prostředím, přičemž hierarchicky organizované póry v rámci stěny frustuly tuto plochu mnohonásobně zvětšují (Davis et al. 2013; Wang et al. 2021). Zvětšují tím i plochu, na které může docházet k extracelulárním fyziologickým reakcím jako například k přeměně hydrogenuhličitanu ( $\text{HCO}_3^-$ ) na oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ), jež zajišťuje karboxylační aktivitu enzymu RuBisCO i při nízkých koncentracích  $\text{CO}_2$  (Nimer et al. 1999). Tuto jinak pomalou reakci katalyzuje extracelulární karboanhydráza, avšak její formy s vysokou katalytickou rychlostí vyžadují pH



pufř, který poskytuje či přijímá proton účastníci se reakce mezi  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{CO}_2$  (Tripp & Ferry 2000). U rozsivek je tímto pufřem polymerizovaný oxid křemičitý vyskytující se ve vysokých koncentracích na povrchu frustuly (Milligan & Morel 2002). Vzorovaná struktura tvořená hierarchicky organizovanými póry tedy u rozsivek skřze účinnější pufřování karboanhydrázy zvyšuje karboxylační aktivitu enzymu RuBisCO a tím i účinnost fotosyntézy.

Komplexní povrchová morfologie frustuly zahrnující vzor tvořený póry, také funguje jako třídící struktura určující, které částice se dostanou k plazmatické membráně a jejím receptorům (Hale & Mitchell 2001). Pravidelná geometrie rozmístění pórů také zabraňuje jejich ucpávání nadměrnými částicemi a až řádově zpomaluje pohyb částic proudících v bezprostřední blízkosti povrchu frustuly (Hale & Mitchell 2001).

### 1.2.2 Mechanické vlastnosti

Mnoho morfologických struktur vyskytujících se v mikrosvětě slouží jako obrana proti predátorům (Smetacek 2001). Frustula bezesporu patří mezi struktury na jejichž evoluci měl predáční tlak výrazný vliv (Hamm et al. 2003; Lu et al. 2015). Jedna z nejdůležitějších vlastností schránky na obranu proti predaci je bezesporu její mechanická odolnost (Smetacek 2001). Při zjišťování mechanických vlastností frustuly použil Hamm et al. (2003) kalibrované skleněné kapiláry, kterými vyvíjel tlak na schránky živých rozsivek. Tento experiment prokázal, že frustuly jsou schopné vydržet tlak až  $7 \text{ N/mm}^2$ , což v přepočtu odpovídá  $700 \text{ t/m}^2$ .

Další možností, jak lze studovat mechanické vlastnosti mikroskopických struktur, je využití mikroskopie atomárních sil. Prostřednictvím této metody lze zobrazovat trojrozměrné struktury s nanometrovou přesností a pomocí tzv. nanointendace, kdy je hrot o velikosti několika nanometrů vtlačován do povrchu objektu, lze také měřit vlastnosti materiálu na různých místech struktury (Subhash et al. 2005). Tyto informace o tvaru a vlastnostech materiálu lze dále použít jako vstupní údaje pro tvorbu virtuálního modelu, na kterém lze detailněji testovat průběhy napětí či deformace metodou konečných prvků (FEM) (Topal et al. 2020). Simulace průběhu napětí u frustul ukázala, že jejich mechanickou odolnost výrazně zvyšuje vzor, ve kterém se střídají perforované (strie) a kompaktní oblasti (žebra). Žebra totiž při vyvíjení tlaku na povrch frustuly absorbují značnou část napětí z náchylnějších oblastí mezi nimi (Hamm et al. 2003; Topal et al. 2020). Tímto zabraňují deformaci struktury, která by následně vedla až ke zlomu. Společně s mechanickými vlastnostmi křemíku, propůjčují tyto vlastnosti frustule extrémní pevnost, která výrazně převyšuje ostatní známé přírodní struktury (Hamm et al. 2003; Aitken et al. 2016).

### 1.2.3 Fotonické vlastnosti

U některých druhů rozsivek byla zaznamenána působivá účinnost fotosyntézy a zároveň značná tolerance vůči vystavení škodlivému UV záření. Nedávno bylo zjištěno, že těchto vlastností dosahují i díky periodicky uspořádaným pórům na povrchu frustuly, jejichž geometrie nápadně připomíná geometrii fotonických krystalů (Fuhrmann et al. 2004). Fotonické krystaly jsou periodické struktury schopné polarizace, které zabraňují vniknutí elektromagnetických vln v určitém spektrálním pásu (photonic band gap) (Vaz et al. 2020). I díky této vlastnosti tak rozsivky dokážou ovlivňovat, jaké spektrum světla pronikne do buňky a zvyšovat tak svou fitness (De Tommasi 2016).

Pro zlepšení fotosyntetické účinnosti, rozsivky využívají pravidelného rozmístění a superpozice všech pórů na valvě, které dohromady fungují jako mikročočka. De Stefano et al. (2007) ve své studii ukázali, že valva rozsivky druhu *Coscinodiscus wailesii* je schopna koncentrovat paprsek červeného světla o průměru 100  $\mu\text{m}$  na bod o průměru 10  $\mu\text{m}$  ve vzdálenosti přibližně 100  $\mu\text{m}$  od povrchu valvy. Tento princip koncentrování fotosynteticky aktivního záření do blízkosti plastidu byl později ověřen i u dalších zástupců rozsivek (De Tommasi 2016; Ferrara et al. 2014; De Tommasi et al. 2021). Geometrie rozmístění pórů na valvě také umožňuje, že červené světlo (633nm) je skrze valvu přenášeno až s 250-350x větší účinností než světlo modré (472nm) a zelené (543nm) (Noyes et al. 2008). Lze přitom vyvozovat, že důvodem je absorpční maximum chlorofylu *a* nacházející se v podobné vlnové délce (642nm) (Kirk 1994).

Fotonické a difrakční vlastnosti frustuly ovšem nemusí sloužit jen ke zvýšení účinnosti fotosyntézy, ale také k ochraně před škodlivým UV zářením. Je známo, že UV záření, především v oblasti UVC (100–280nm) a UVB (280–315nm), narušuje buněčné pochody u řas (podrobněji kapitola 1.3). Při sérii experimentů na izolované valvě centrické rozsivky rodu *Coscinodiscus* identifikovali autoři tři hlavní mechanismy, kterými může frustula přispívat k ochraně před UV zářením. Jde o difrakci, fotoluminiscenci a absorpci (De Tommasi et al. 2018), přičemž absorpce a fotoluminiscence je podmíněná chemickým složením frustuly. Absorpce je způsobena především interakcí mezi fotony a elektrony vazeb Si-O, zatímco zdrojem fotoluminiscence jsou zejména různé povrchové narušení krystalické mřížky (Kitamura & Laurent 2007; Qin et al. 2008). Pomocí fotoluminiscence se část pohlčeného UV záření navíc dokáže přeměnit na záření o větší vlnové délce, tedy na fotosynteticky aktivní modré světlo, které se svou vlnovou délkou blíží k jednomu z maxim chlorofylu *a* (De Tommasi et al. 2018). Difrakce oproti předchozím mechanismům není ovlivněna chemickým

složením frustuly, ale zmíněnou geometrií pórů nebo jinak řečeno vzorem na povrchu frustuly. Rozměry těchto struktur se totiž blíží svou velikostí vlnovým délkám ovlivněného záření. Periodická struktura tvořená hierarchicky uspořádanými póry (obr.1.3.), také dokáže účinně odstiňovat část UV záření na stejném principu, který byl popsán u fotonických krystalů (Fuhrmann et al. 2004; De Tommasi et al. 2018; 2021).

Frustula rozsivek názorně demonstruje, že vzorované struktury na povrchu mikroorganismů nemusí být pouze důsledek pochodů neutrální evoluce, ale mohou také nabývat adaptivních funkcí. Díky těmto nově objeveným vlastnostem nacházejí tyto nanostruktury uplatnění nejen v nanotechnologiích a architektuře, ale třeba i v medicíně (Losic et al. 2009; Kooistra & Pohl 2015; Wang et al. 2021).

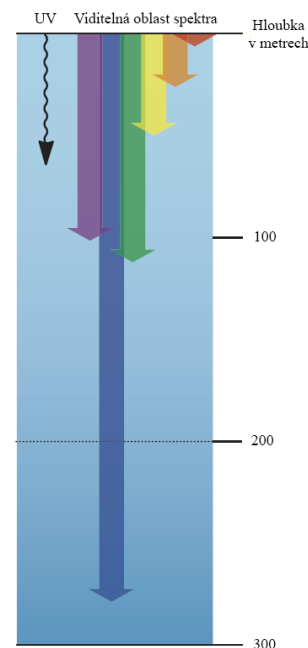
Efektivita této ochrany před UV zářením by také mohla vysvětlovat, proč některé druhy rozsivek využívají jen omezeně jiné mechanismy obrany, např. produkci fotoprotektivních látek (podrobněji kapitola 1.3). (Davidson et al. 1994). Odhaduje se, že koncentrace fotoprotektivních látek v buňkách antarktických rozsivek je o 2 až 5 řádů nižší, než v buňkách rodu *Phaeocystis* (Haptista), který je také součástí antarktického planktonu (Davidson et al. 1994). Lze se tedy domnívat, že obranná funkce těchto látek byla u rozsivek částečně nahrazena fotonickými a absorpčními vlastnostmi frustuly (Ellegaard et al. 2016a).

### 1.3 Vliv UV záření na fytoplankton

Pro živé organismy je UV záření obecně škodlivé, i když část UVA záření může být i fotosynteticky aktivní (Xu & Gao 2010). Všeobecně platí, že čím kratší je jeho vlnová délka, tím je škodlivější. Krátkovlnné UV záření přitom proniká i do ekologicky významných hloubek v mnoha sladkovodních a mořských ekosystémech (Smith et al. 1992). Přibývá také důkazů, že úbytek ozonové vrstvy mění poměr záření dopadajícího na zemský povrch, přičemž nejvíce narůstá zastoupení krátkovlnného záření (<315nm) (Häder et al. 1995).

### 1.3.1 Složení slunečního záření ve vodním sloupci

Sluneční záření je před vstupem do zemské atmosféry z velké části tvořeno krátkovlnným zářením <280 nm (UVC), které je z naprosté většiny pohlceno v atmosféře reakcí s plynným kyslíkem a není proto z ekologického hlediska důležité. Většina UVB záření (280–315 nm) je zase odstíněna atmosférickým ozonem, avšak v poslední době se jeho zastoupení ve stratosféře konstantně snižuje (Häder et al. 1995; Herman et al. 1999). Záření delších vlnových délek jako UVA (315–400 nm) a viditelné fotosynteticky aktivní záření (PAR, 400–700 nm) nejsou ozónem v atmosféře nijak ovlivněna, nicméně jejich intenzitu může značně snížit oblačnost. Při dopadu na zemský povrch je tedy světelné spektrum pouze ze 3% složeno z UV záření, 44% je tvořeno PAR a zbylých 53% tvoří infračervené záření (Herman et al. 1999).



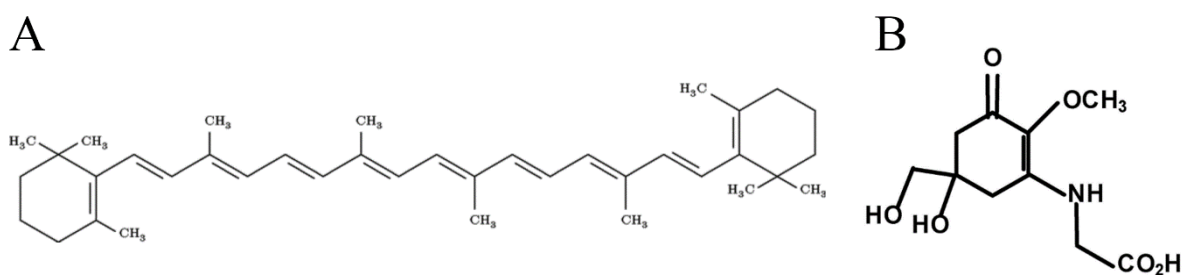
**Obrázek 1.4: Absorbce světelného záření ve volném oceánu v závislosti na jeho vlnové délce.**  
Převzato od Johnsen a Sosik (2004)

Složení světelného spektra pronikajícího pod vodní hladinu se od toho na povrchu značně odlišuje. Světlo dopadající na vodní hladinu je totiž polarizováno a jednotlivé spektrální složky jsou rozdílně absorbovány (pohlcovány) v závislosti na hloubce (obr 1.4.). To způsobuje, že ačkoliv na povrchu jsou z celkové intenzity slunečního záření pouze 3 % tvořeny UV zářením, již několik metrů pod hladinou je jím tvořena téměř polovina z celkové světelné intenzity (Johnsen a Sosik 2004). Část světla procházejícího vodním sloupcem je tvořena i velmi nebezpečným UVB zářením, přičemž toto záření může v oceánech proniknout až do hloubky 60-70 m (Smith et al. 1992).

### 1.3.2 Poškození buněk UV zářením a možné způsoby obrany

Krátkovlnné záření je důležitý ekologický stresový faktor, který ovlivňuje růst, přežití a distribuci fytoplanktonu. U buněk způsobuje především léze na dvoušroubovici DNA, které vedou k tvorbě pyrimidinových dimerů, které inhibují transkripci RNA a replikaci DNA molekul (Karentz et al. 1991; Smith et al. 1992; Beardall & Raven 2004). Tyto strukturální změny v genetickém kódu mají za následek jeho chybné čtení nebo replikaci a vyvolávají vznik mutací, případně buněčnou smrt (Karentz et al. 1991). Jeho další účinky zahrnují inhibici buněčného dělení a fotosyntézy, utlumení metabolismu a syntézy bílkovin či ztrátu fotoorientace a motility (Karentz et al. 1991; Jeffrey et al. 1999).

Vzhledem k tomu, že většina UV záření není fotosynteticky aktivní, patří mezi hlavní obranné strategie ho buď tolerovat nebo se mu vyhnout (Holzinger & Lütz 2006). Vyhýbání se škodlivému UV záření přemístěním do hlubších vrstev vodního sloupce bylo pozorováno u obrněnky rodu *Gymnodinium*, ale převážně tuto strategii využívají různá klidová stadia planktonních organismů (Tirlapur et al. 1993). Pro fotoautotrofy je z důvodu nedostatku fotosynteticky aktivního záření ve větších hloubkách tato strategie dlouhodobě nevhodná (Häder 1997). Většina zástupců fytoplanktonu tedy volí spíše strategii zvýšené tolerance k UV záření, kterou zajišťují obranné molekulární mechanismy či fotonické vlastnosti jejich schránek (podrobněji kapitola 1.2.3). Mezi obranné molekulární mechanismy lze zařadit opravy DNA fotolyázou nebo syntézu fotoprotektivních látek. Mezi fotoprotektivní pigmenty se řadí zejména karotenoidy syntetizované v plastidu. Jde o lipofilní látky, jejichž struktura je tvořena 40 uhlíky (obr 1.5A). Dělí se na primární, které jsou trvalou součástí fotosyntetického aparátu a sekundární, které se vyskytují mimo fotosyntetický aparát v lipidových kapénkách, přičemž jejich koncentrace v buňce výrazně vzrůstá po vystavení stresovým podmínkám (Zachleder et al. 2016). Zatímco karotenoidy slouží především k zachycení záření o větších vlnových délkách, k obraně proti UV záření využívají buňky spíše syntézu aminokyselin podobných mycosporinu. Jejich významné absorpční vlastnosti jsou založené na cyklohexanonovém nebo cyklohexeniminovém konjugovaném uspořádání (obr.1.5B) a účinně díky nim absorbují záření v rozmezí vlnových délek 268-362 nm (Smith et al. 1992; Wada et al. 2015)



**Obrázek 1.5: Chemická struktura fotoprotektivních látek syntetizovaných fytoplanktonem: A – Chemická struktura beta-karotenu; B – Chemická struktura mycosporin glycinu; Upraveno podle Athukorala et al. (2016)**

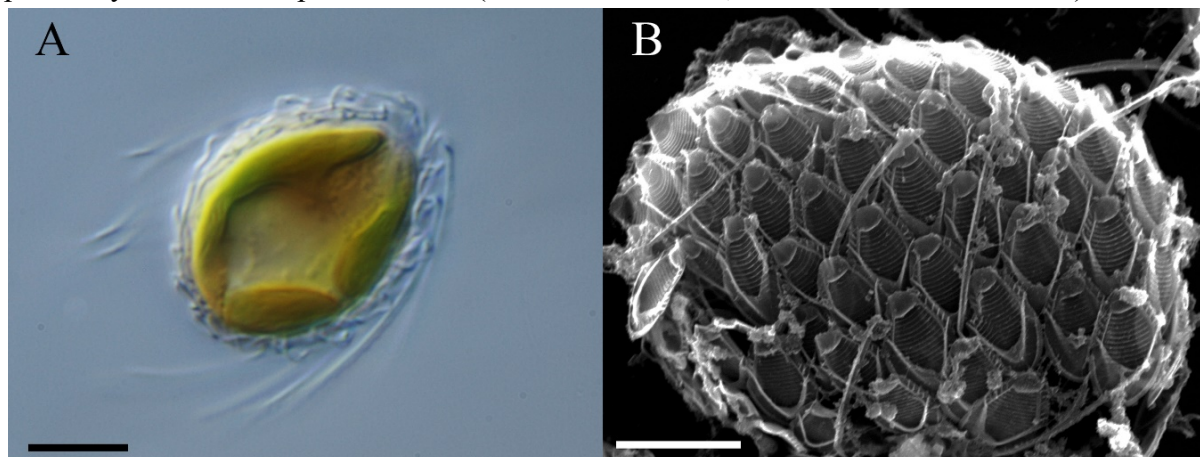
Podobně jako u rozsivek, lze i u bičíkovců z řádu Synurales předpokládat, že významnou roli při ochraně proti UV by mohla hrát křemičitá schránka na úkor produkce fotoprotektivních látek. Schránka, tvořená křemičitými šupinami, je jednou z nejsložitějších a nejvariabilnějších morfologických struktur v mikrosvětě. O tom, jaké výhody přináší křemičitá schránka svým nositelům, se však ví jen velmi málo (Peter A. Siver 1991).

## 1.4 Nanostruktury u bičíkovců řádu Synurales

### 1.4.1 Charakteristika a klasifikace řádu Synurales

Zástupci řádu Synurales jsou jednobuněční či koloniální bičíkovci patřící do třídy Chrysophyceae. Řád zahrnuje především rody: *Synura*, *Mallomonas* a *Neotessela*, přičemž dohromady je na základě morfologie křemičitých šupin popsáno přes 250 druhů. Zástupci řádu Synurales jsou převážně autotrofní organismy s dvěma heterokontními bičíky mající chloroplast obsahující chlorofyl *a* a *c*. Specifická je pro ně endogenní tvorba silicifikované stomatocysty (Kristiansen & Škaloud 2017). Hlavním morfologickým znakem je schránka tvořená křemičitými, druhově specifickými, šupinami (obr. 1.6). U některých zástupců rodu *Mallomonas* jsou na šupiny často připojeny křemičité ostny (E. Takahashi 1973).

Naprostá většina zástupců byla popsána ze sladkovodního planktonu, ale existují i dva nedávno popsané mořské druhy (Jeong et al. 2019). Většinu diverzity řádu lze najít na humózních, oligotrofních lokalitách s neutrálním nebo mírně kyselým pH (Siver & Marsicano 1996). Jelikož většina druhů má poměrně úzkou ekologickou valenci, mohou také sloužit jako indikátory změn trofických podmínek (Smol 1984; Siver & Hamer 1990). I proto jejich křemičité struktury společně s pylovými zrny našli uplatnění při analýzách sedimentů v geologii a limnologii (Munch 1980; Siver & Marsicano 1996). V oblastech mírného pásu se mnoho druhů v planktonu vyskytuje hlavně na jaře, těsně po ústupu ledu. Většina z nich je přitom svým výskytem omezena na studenou vodu, takže je lze nalézt ve vodních plochách pouze v jarních a podzimních měsících (Kristiansen & Škaloud 2017). I přes to, že většinou netvoří dominantu planktonu, může několik málo druhů rodu *Synura* vytvořit vodní květ, který je díky vylučování ketonů a aldehydů nepříjemně cítit po rybině, čímž mohou působit problémy v nádržích s pitnou vodou (Watson et al. 2001; Watson & Satchwill 2003).

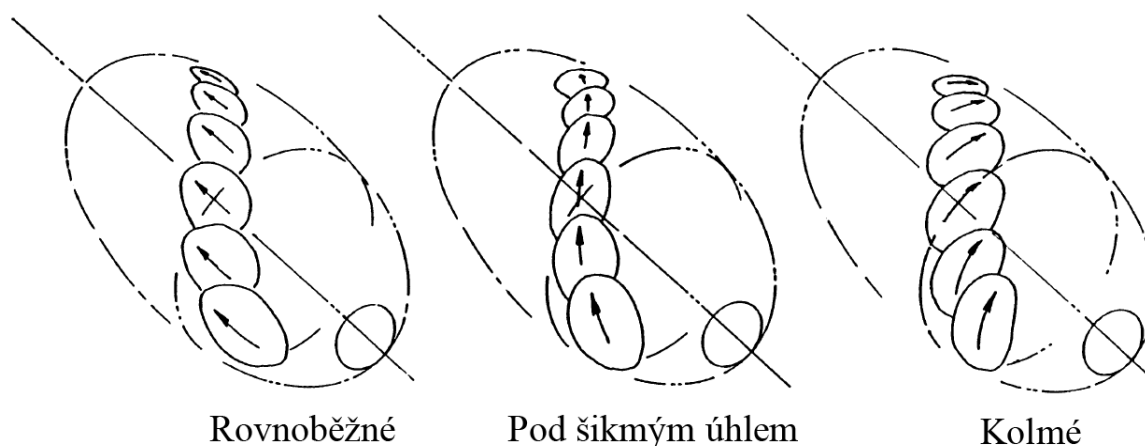


**Obrázek 1.6: Morfologie buněk rodu *Mallomonas*: A – *M. intermedia*, fotografie ze světelného mikroskopu. Měřítko 10 µm.; B – *M. striata* var. *serrata* fotografie ze SEM. Měřítko 5 µm.**

### 1.4.2 Unikátní morfologie křemičité schránky

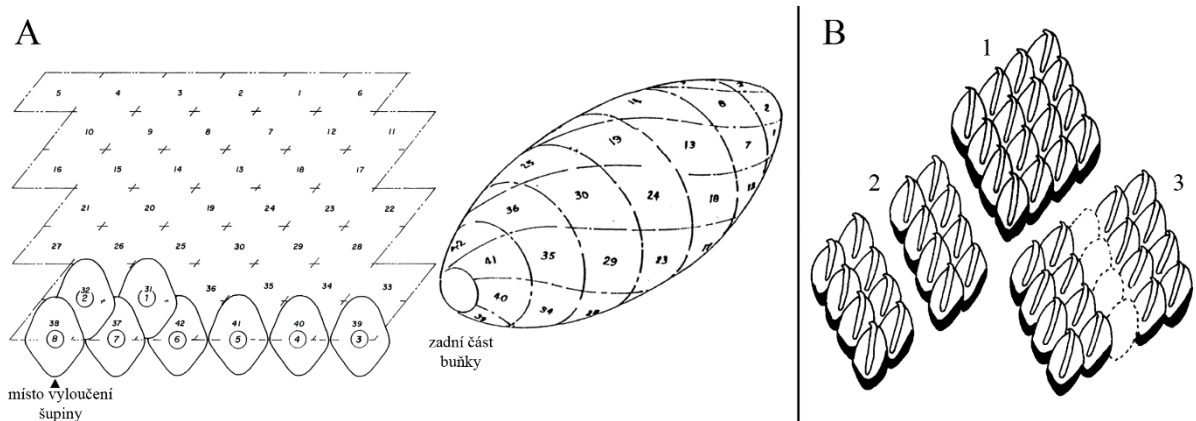
Křemičitá schránka je jednou z nejkompexnějších struktur, jež lze v mikrosvětě nalézt. Skládá se z jednotlivých šupin, které jsou na povrchu buňky uspořádány podle velmi přesného plánu do spirálovitých řad v různém úhlu na osu buňky (obr. 1.7). Na distální konec šupiny je u některých zástupců rodu *Mallomonas* upevněn pomocí kloubového spojení křemičitý ostn, který může měnit své postavení vůči ose buňky. Pokud buňka plave má ostny přitisklé ve směru pohybu, zatímco v klidovém stavu má ostny naježené a jejich úhel vůči hlavní ose buňky se blíží 90° (Peter A. Siver 1991).

Vznik šupin a ostnů se odehrává uvnitř buňky a je asociován s komplexem, který dohromady tvoří Golgiho aparát, jádro a chloroplast (Andersen 1987). Samotná tvorba se vždy odehrává na vnějším povrchu jednoho z chloroplastů uvnitř silikon deponitního váčku, který má pravděpodobně původ v Golgiho aparátu (Wujek & Kristiansen 1978; Leadbeater 1990). Silikon deponitní váček je při tvorbě šupiny tlačěn na vnější povrch chloroplastového endoplasmatického retikula, čímž se formuje do základního tvaru šupiny či ostnu (Mignot & Brugerolle 1982). Po tomto procesu následuje deponice oxidu křemičitého za vzniku konečné šupiny či ostnu (Wujek & Kristiansen 1978; Mignot & Brugerolle 1982; Leadbeater 1990). Bylo zdokumentováno, že tvarování šupiny se pravděpodobně účastní i mikrotubuly a aktinová filamenta (Mignot & Brugerolle 1982; Leadbeater 1990; Andersen 1987). Avšak tyto mechanismy objasňují pouze utváření hlavních struktur šupiny jako například bazální desky, V-žebra či dómu. Princip tvorby nanostruktur není prozatím zdaleka objasněn, ale lze se domnívat, že v něm hrají roli difúzní procesy popsané Turingem (Kondo 2017). Následně jsou šupiny a ostny vyloučeny na povrch a seskládány do podoby schránky.



**Obrázek 1.7:** Spirálovitá řada šupin na povrchu buňky a možné orientace os šupin vůči hlavní ose buňky. Upraveno podle Siver (1991).

Prozatím byly navrženy dva mechanismy, kterými se mohou šupiny na povrchu buňky uspořádat do podoby schránky (obr. 1.8). Mechanismus navržený pro rod *Mallomonas* Siverem a Glewem (1990) předpokládá, že šupiny jsou vyloučeny z buňky v její zadní části, přičemž vylučování a dozrávání následující šupiny je koncipován jako nepřetržitý proces. Šupiny jsou vyloučeny vždy v pevné poloze a za stejné orientace, čímž začnou na povrchu vytvářet spirálovitou řadu, z které jsou po jejím dokončení vytlačovány do další řady nově vyloučenými šupinami. Součástí mechanismu je také využití adhezivního materiálu zajišťujícího pevnost celé struktury (Lavau & Wetherbee 1994; Leadbeater 1990; Němcová 2014). Oproti tomu v dříve navrženém mechanismu pro rod *Synura* se Leadbeater (1986) domnívá, že se kdekoliv na povrchu buňky může vyloučit kompletní řada šupin a součástí mechanismu je i odlepování a následné opětovné přilepení šupin do schránky. Tuto hypotézu částečně podporuje i studie zabývající se tvorbou nové schránky při dělení buněk u *M. adamas* (Lavau & Wetherbee 1994). Lavau & Wetherbee pomocí časosběrných snímků a různých metod elektronové mikroskopie ukázali, že šupiny jsou před vložením do schránky v cytoplasmě přesně umístěny a orientovány. Avšak na rozdíl od mechanismu navrženého Leadbeaterem jsou šupiny vkládány po jedné. Lze sice díky podobnému uspořádání šupin ve schránce u všech druhů rodu *Synura* a *Mallomonas* předpokládat, že existuje univerzální mechanismus pro tvorbu jejich schránek, ale jeho princip zatím není zcela znám (Siver & Glew, 1990).



**Obrázek 1.8: Vizualizace dvou navržených mechanismů sestavování schránky na povrchu buněk:** **A** – Mechanismus navržený Siverem a Glewem (1990) fungující na principu mechanického pásu, kdy jsou všechny šupiny vyloučeny v zadní části buňky a následně začleněny do spirálních řad.; **B** – Mechanismus navržený Leadbeaterem (1990), kdy nové řady vznikají rozlepením stávající schránky a vložením nových šupin.; Upraveno podle Siver & Glew (1990) a Leadbeater (1990)



Šupiny u všech druhů řádu Synurales mají tendenci k bilaterální souměrnosti, avšak té ubývá směrem ke koncovým pólům buňky. Šupiny se skládají z bazální desky a sekundárních struktur. U šupin rodu *Mallomonas* patří mezi nejvýraznější sekundární struktury dóm a V-žebro. Dóm slouží jako kloub pro připevnění ostnu, zatímco V-žebro společně s přehnutým okrajem pravděpodobně zabezpečuje uspořádání šupin ve schránce (Siver & Glew 1990) (obr. 2.1A). Štít šupiny představuje oblast, která nikdy není překryta sousedními šupinami, a je tedy v přímém kontaktu s vnějším prostředím buňky. Oblast štítu je také morfologicky nejvariabilnější a vyskytuje se na ní převážná část druhově specifických vzorů.

### 1.4.3 Možné adaptivní vlastnosti křemičitých šupin

Možné adaptivní vlastnosti křemičitých šupin jsou i přes mnohé spekulace prozatím neznámé. Doposud jedinou výjimkou je studie Sandgren & Walton (1995), která se zabývala jejich potenciální obranou funkcí. V experimentu využili možnost kultivace nahých buněk bez křemičitých struktur v médiu s nedostatkem křemíku (Sandgren & Barlow 1989). Ukázalo se, že šupiny, a především ostny zvětšující efektivní průměr buňky, skutečně účinně brání buňku před predací ze strany malých druhů perlooček.

Avšak obraná funkce nemusí být zdaleka jediná, kterou mohou křemičité šupiny zastávat. Na toto téma existuje mnoho spekulací, které ovšem zatím nebyly ověřeny. V řadě z nich se autoři domnívají, že funkce šupin by mohla spočívat také v ovlivňování záření, které prochází do buňky. Šupiny k tomu mají hned několik předpokladů. Je jím vypouklý tvar bazální desky podobající se tvaru optické čočky či pravidelné rozmístění struktur na povrchu šupiny připomínající geometrii fotonických krystalů (Hörning et al. 2020; Řezáčová et al. 2006). Lze se tedy domnívat, že křemičité šupiny společně se vzorovanými strukturami na jejich povrchu nejsou zcela bez adaptivních vlastností, ale disponují podobnými vlastnostmi jako obdobné struktury na povrchu rozsivek či haptofyt (Losic et al. 2009; Monteiro et al. 2016).

## 1.5 Cíle práce

Přestože jsou již známy mnohé adaptivní vlastnosti nanostruktur na povrchu některých mikroorganismů (především rozsivek), většina morfologické diverzity mikrosvěta zatím nebyla za tímto účelem studována. Cílem této práce je blíže prozkoumat možné adaptivní vlastnosti vzorovaných nanostruktur na křemičitých šupinách rodu *Mallomonas*.

Práce se zabývá testováním dvou možných adaptivních vlastností, které může vzorovaná funkce zastávat. První z nich je vyztužení šupiny a tím zvýšení její mechanické odolnosti. Tento aspekt byl studován na virtuálně zhotoveném modelu šupiny druhu *Mallomonas striata* var. *striata* za použití metody konečných prvků. Pro testování možného vlivu vzoru na odolnost vůči UV záření bylo vybráno 20 druhů rodu *Mallomonas*, které byly rozděleny do 4 skupin podle vzorování nanostruktury na štítu šupiny a jednu skupinu tvořili druhy s výrazně tlustšími šupinami. Každý druh byl zastoupen dvěma kmeny, u kterých byla zjišťována odolnost vůči UVA a UVB záření.

Kladu si tyto otázky:

- Má žebrování na štítu šupiny vliv na její celkovou pevnost?
- Jak ovlivní mechanické vlastnosti šupiny změna počtu či směru žeber na jejím štítu?
- Je odolnost vůči UV záření ovlivněna typem vzorování na štítu šupiny?
- Jsou druhy s výrazně tlustšími šupinami odolnější vůči UV záření?

## 2 Metodika

### 2.1 Experimentální organismy a jejich kultivace

#### 2.1.1 Experimentální organismy

Celkem bylo pro potřeby experimentu vybráno 20 druhů rodu *Mallomonas*, jejichž kultury byly izolovány a zakoupeny pro účely grantu GAČR 20-22346S, hlavní řešitel Pavel Škaloud. Druhy byly vybrány a rozděleny do 4 skupin v závislosti na vzorování křemičitých šupin. Jednalo se o druhy se šupinami (1) bez vzorování (hladké), (2) se vzorem tvořeným nepravidelnými hexagonálními strukturami (síťované), (3) s pravidelně se opakujícími příčnými žebry (žebra) a (4) pravidelně rozmístěnými papilami (papily). Pátou skupinu (5) tvořily druhy s výrazně silnějšími šupinami, obsahujícími výrazně více  $\text{SiO}_4$  (tlustostěnné). Každý z vybraných druhů byl při růstových experimentech zastoupen dvěma kmeny (tab. 2.1).

#### 2.1.2 Kultivace experimentálních organismů

Kultury byly udržovány v tekutém WC médiu (Guillard & Lorenzen 1972) s přidaným půdním dekoktem a dvojnásobnou koncentrací  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (56.84 g/L). Pro většinu kultur byl do média přidán pufr TES (“TES Buffer” 2017), který nastavil pH média na hodnotu 7,5. Dvě kultury (CZ115B a CZ115D) byly kultivovány v médiu s přidáním pufru MES (“MES Buffer” 2015) udržující pH média na hodnotě 6,65. Kultivace probíhala v 25 ml erlenmeyerových baňkách v režimu kontinuálního osvětlení  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a teplotě  $11^\circ\text{C}$ . Kultury byly přeočkovávány individuálně v závislosti na rychlosti růstu tak, aby byly udržovány v exponenciální fázi růstu. Stav kultur byl průběžně kontrolován, v případě zjištění kontaminace byly kultury přečištěny metodou izolace jedné buňky skleněnou kapilárou.

Kmen	Druh	Typ vzorování
CZ25J	<i>Mallomonas caudata</i> Iwanoff 1899 (obr.3.2A)	hladké
CZ92A	<i>Mallomonas caudata</i> Iwanoff 1899	hladké
CZ26E	<i>Mallomonas elongata</i> Reverdin 1919 (obr.3.2B)	hladké
CZ24B	<i>Mallomonas elongata</i> Reverdin 1919	hladké
CZ35M	<i>Mallomonas areolata</i> Nygaard 1950	hladké
CZ35O	<i>Mallomonas areolata</i> Nygaard 1950 (obr.3.2C)	hladké
CZ34M	<i>Mallomonas intermedia</i> Kisselev 1931 (obr.3.2D)	hladké
CZ35C	<i>Mallomonas intermedia</i> Kisselev 1931	hladké
CZ04A	<i>Mallomonas crassisquama</i> (Asmund) Fott 1962 (obr.3.3A)	síťované
CZ07M	<i>Mallomonas crassisquama</i> (Asmund) Fott 1962	síťované
CZ85G	<i>Mallomonas munda</i> (Asmund, Cronberg & Dürschmidt) Němcová 2013 (obr.3.3B)	síťované
CZ38H	<i>Mallomonas munda</i> (Asmund, Cronberg & Dürschmidt) Němcová 2013	síťované
CZ115B	<i>Mallomonas eoa</i> E.Takahashi 1969	síťované
CZ115D	<i>Mallomonas eoa</i> E.Takahashi 1969 (obr.3.3C)	síťované
D02A	<i>Mallomonas favosa</i> K.H.Nicholls 1984	síťované
D03C	<i>Mallomonas favosa</i> K.H.Nicholls 1984 (obr.3.3D)	síťované
CZ38K	<i>Mallomonas adamas</i> K.Harris & D.E.Bradley 1960 (obr.3.4A)	tlustostěnné
CZ38P	<i>Mallomonas adamas</i> K.Harris & D.E.Bradley 1960	tlustostěnné
CZ29D	<i>Mallomonas lelymene</i> K.Harris & D.E.Bradley 1960	tlustostěnné
IT02A	<i>Mallomonas lelymene</i> K.Harris & D.E.Bradley 1960 (obr.3.4B)	tlustostěnné
CCMP 1782	<i>Mallomonas splendens</i> (G.S.West) Playfair 1913	tlustostěnné
AU07B	<i>Mallomonas splendens</i> (G.S.West) Playfair 1913 (obr.3.4C)	tlustostěnné
CZ04D	<i>Mallomonas striata</i> var. <i>serrata</i> K.Harris & D.E.Bradley 1960 (obr.3.5A)	žebra
CZ33H	<i>Mallomonas striata</i> var. <i>serrata</i> K.Harris & D.E.Bradley 1960	žebra
CZ104D	<i>Mallomonas actinoloma</i> var. <i>maramuresensis</i> L.Péterfi & Momeu 1976	žebra
CZ105B	<i>Mallomonas actinoloma</i> var. <i>maramuresensis</i> L.Péterfi & Momeu 1976 (obr.3.5B)	žebra
CZ08K	<i>Mallomonas doignonii</i> Bourrelly 1951 (obr.3.5C)	žebra
CZ08N	<i>Mallomonas doignonii</i> Bourrelly 1951	žebra
CZ35K	<i>Mallomonas flora</i> K.Harris & D.E.Bradley 1960	žebra
CZ53C	<i>Mallomonas flora</i> K.Harris & D.E.Bradley 1960 (obr.3.5D)	žebra
CZ33J	<i>Mallomonas schwemmlei</i> Glenk 1956 (obr.3.5E)	žebra
CZ33F	<i>Mallomonas schwemmlei</i> Glenk 1956	žebra
CZ03F	<i>Mallomonas papillosa</i> K.Harris & D.E.Bradley 1960 (obr.3.6A)	papily
Jeon 12120	<i>Mallomonas papillosa</i> K.Harris & D.E.Bradley 1960	papily
CZ38X	<i>Mallomonas rasilis</i> Dürschmidt 1983 (obr.3.6B)	papily
D01D	<i>Mallomonas rasilis</i> Dürschmidt 1983	papily
CZ34K	<i>Mallomonas annulata</i> (D.E.Bradley) K.Harris 1967 (obr.3.6C)	papily
CZ23C	<i>Mallomonas annulata</i> (D.E.Bradley) K.Harris 1967	papily
CCMP479	<i>Mallomonas kalinae</i> Řezáčova 2006 (obr.3.6D)	papily
CZ41B	<i>Mallomonas kalinae</i> Řezáčova 2006	papily

Tabulka 2.1: Seznam experimentálních kmenů rodu *Mallomonas* rozdělených do pěti skupin v závislosti na tloušťce či typu vzorování křemičitých šupin. Stejná barva je pro jednotlivé skupiny použita ve všech následujících tabulkách a grafech.

## 2.2 Světelná a elektronová mikroskopie

### 2.2.1 Světelná mikroskopie (LM)

Pro přípravu preparátů byly použity čerstvě přeočkované experimentální kultury v exponenciální fázi růstu, ze kterých byla odebrána vždy oblast uprostřed vodního sloupce obsahující aktivně se pohybující bičíkovce v dobré kondici. Buňky byly pozorovány při zvětšení 800x až 2000x. Zacházení se vzorkem vždy probíhalo urychleně, jelikož zvýšení teploty mělo negativní dopad na tvar a vitalitu buněk. Pro světelnou mikroskopii byl použit mikroskop Olympus BX51 s diferenciálním interferenčním kontrastem a mikrofotografie byly pořízeny digitálním fotoaparátem Olympus Z5060. Pro tvorbu lineárního modelu vztahu velikosti buněk a odolnosti vůči UV záření, bylo vyfoceno vždy pět buněk stejného kmene.

### 2.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Vzorky byly odebrány výhradně z vodního sloupce experimentálních kultur, aby lépe reflektovaly stupeň silicifikace a celkový stav šupin na živých buňkách. Následně byly nakapány na měděné síťky pokryté formvarovou blankou a ponechány v uzavřené petriho misce. Po zaschnutí vzorku byla každá ze sítěk promytá ve čtyřech kapkách destilované vody, vždy po dobu 2-3 minut. Promyté a vyschlé síťky byly pozorovány v transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Veleta a s akvizičním softwarem Olympus Soft Imaging Solution GmbH. Pro následné účely analýzy dat bylo vždy vyfoceno 5 šupin pro daný kmen.

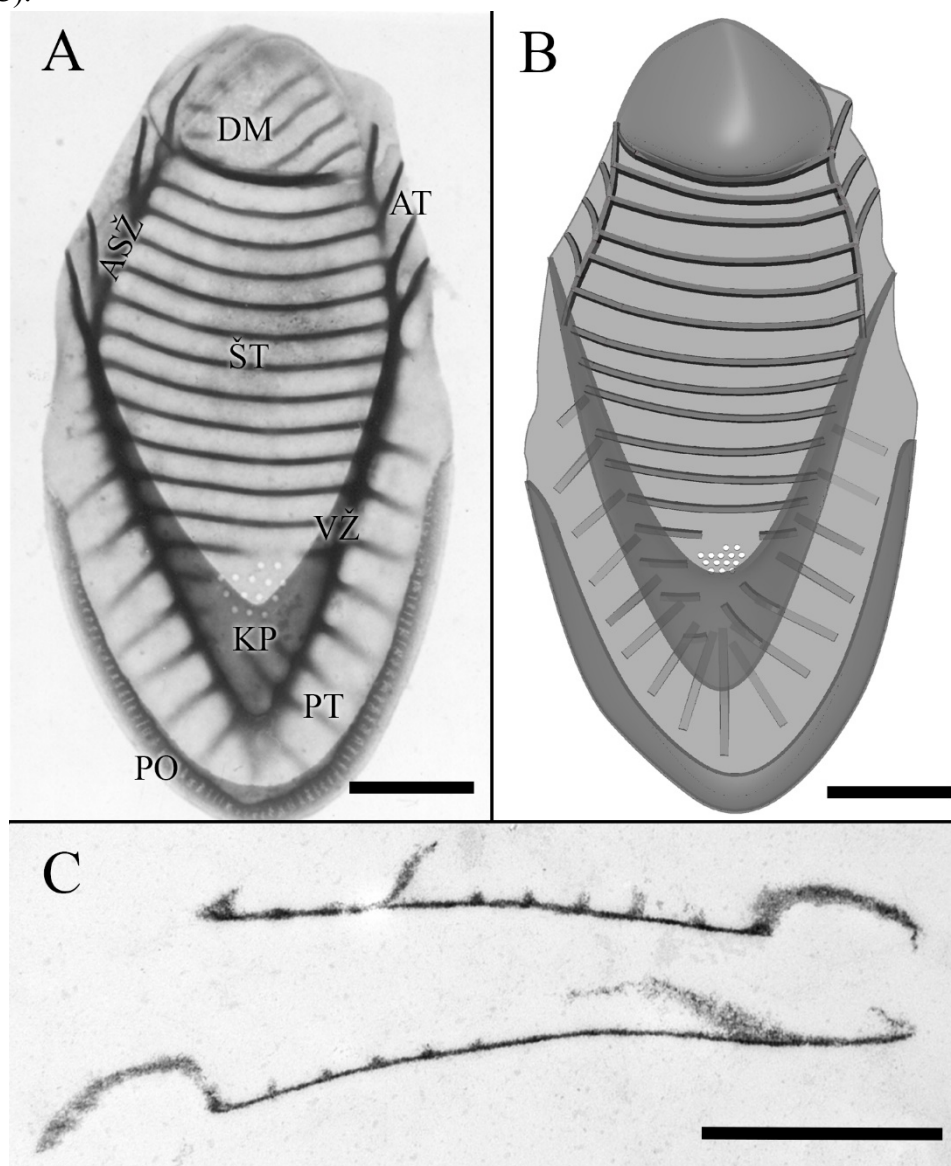
### 2.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) byly připraveny dvě varianty vzorků. První varianta zahrnovala postupnou fixaci buněk, při které byly buňky nejprve přes noc při 5 °C ponechány v 2% roztoku glutaraldehydu. Následně byly vzorky třikrát promyty fosfátovým pufrům (0,05 M). V druhé variantě buňky nebyly nijak fixovány. Vzorky obou variant byly nakapány na kulatá sklíčka pokrytá čtyřmi vrstvami zaschlého poly-L lysinu (Sigma-Aldrich s.r.o.). Po uplynutí přibližně jedné hodiny byla pomocí filtračního papíru odsáta přebytečná tekutina a sklíčka promyta na kapkách redestilované vody na parafilmu. Následovalo odvodnění vzorků v acetonové řadě, při které byly ponechávány vždy po dobu 10 minut v acetonu o koncentraci 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 99 % a nakonec dvakrát ve 100 % acetonu odvodněném prostřednictvím nalsitových kuliček (Chemické závody Bratislava). Odvodněné vzorky byly vysušeny pomocí kritického bodu, pokoveny Pt/Pd po dobu 30 s (40mA) a pozorovány ve skenovacím elektronovém mikroskopu SEM JEOL 6380 LV.

## 2.3 Analýza metodou konečných prvků

### 2.3.1 Strukturální charakterizace modelu

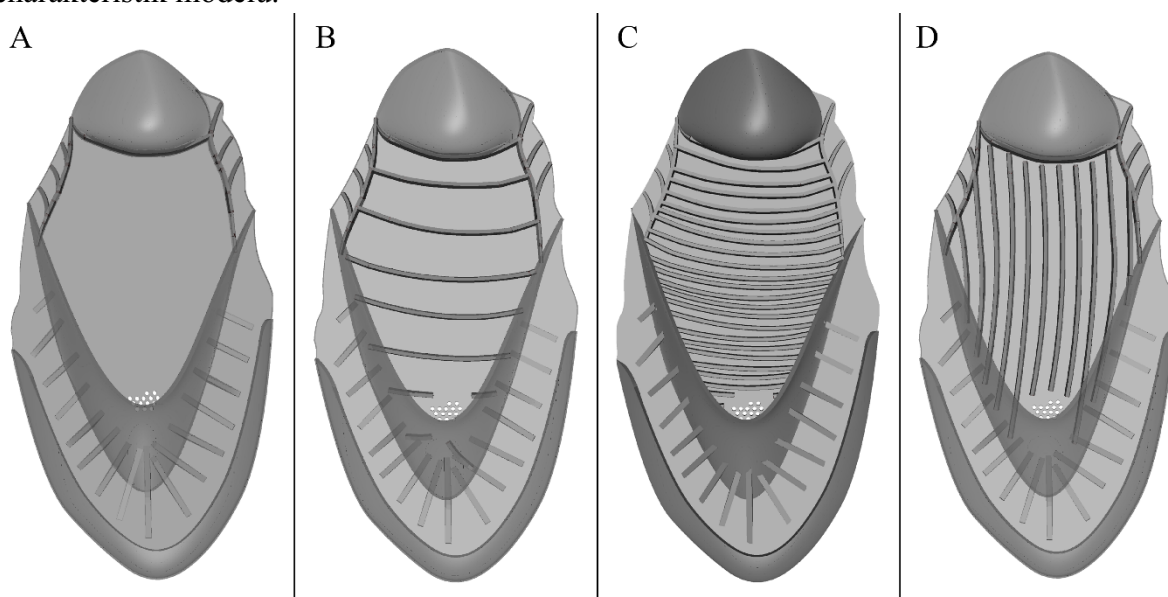
Pro testování hypotézy, zda mají sekundární struktury na štítu šupiny dopad na její celkovou pevnost, byl zvolen vzor periodicky se opakujících žeber. Předlohou modelu pro stanovení rovinných rozměrů se stala fotografie šupiny druhu *Mallomonas striata* var. *striata*, publikovaná v článku Neustupa a Němcová (2007) (obr.2.1A). Tloušťka bazální desky šupiny (40 nm) byla odečtena z řezů šupinami provedených Němcovou (2022, nepublikováno) (obr. 2.1C).



**Obrázek 2.1: Předlohy modelu a zjednodušený model:** A – Šupina mallomonády druhu *Mallomonas striata* var. *striata* pozorovaná v TEM (Neustupa a Němcová 2007) s popisem morfologických prvků: ASŽ – anteriorní submarginální žebro, AT – anteriorní trámce, DM – dóm, KP – kápě, PO – přehnutý okraj, PT – posteriorní trámce, ŠT – štít, VŽ – V-žebro. České názvosloví převzato od Němcová (2000). Měřítko 1  $\mu\text{m}$ ; B – Zjednodušený model šupiny malomonády druhu *Mallomonas striata* var. *striata*. Měřítko 1  $\mu\text{m}$ ; C – Řez šupinou malomonády druhu *Mallomonas striata* var. *serrata* (kmen CZ33H) pořízený Němcovou (2022, nepublikováno). Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .

Pro účely statických výpočtů bylo nutné model šupiny zvětšit oproti originálu v měřítku 1 000 000:1 a v ojedinělých případech i nepatrně zjednodušit její tvar či nezahrnout některé ze struktur (obr.2.1B). Jde především o bazální desku, která je u modelu tvořena rovinnou plochou, zatímco u reálné šupiny je pravděpodobně mírně vypouklá (Hörning et al. 2020). Z důvodu komplexního tvaru dómu nebyly také začleněny struktury nacházející se na jeho povrchu. Charakteristiky materiálu byly převzaty od Topal et al. (2020), kteří k jejich získání využili metody nanoindentace při mikroskopii atomárních sil na frustule rozsivky rodu *Didymosphenia geminata*.

Dále byly sestrojeny čtyři upravené modely, na kterých bylo možné otestovat, zda má na celkovou pevnost šupiny vliv počet či směrování žeber na štítu. Jedná se o varianty modelu, kde štítová žebra zcela chybí (obr. 2.2A), jsou v polovičním počtu (obr. 2.2B), v dvojnásobném počtu (obr. 2.2C) či kolmo oproti původnímu směru žeber (obr. 2.2D). Při tvorbě modelů byl kladen důraz na to, aby nebyla upravována žádná z dalších charakteristik modelu.



**Obrázek 2.2: Varianty modelu sestojené za účelem testování vlivu štítových žeber na celkovou pevnost šupiny: A – Model bez štítových žeber; B – Model s polovičním počtem štítových žeber; C – Model s dvojnásobkem štítových žeber; D – Model se štítovými žebry pootočenými o 90° oproti původnímu směru.**

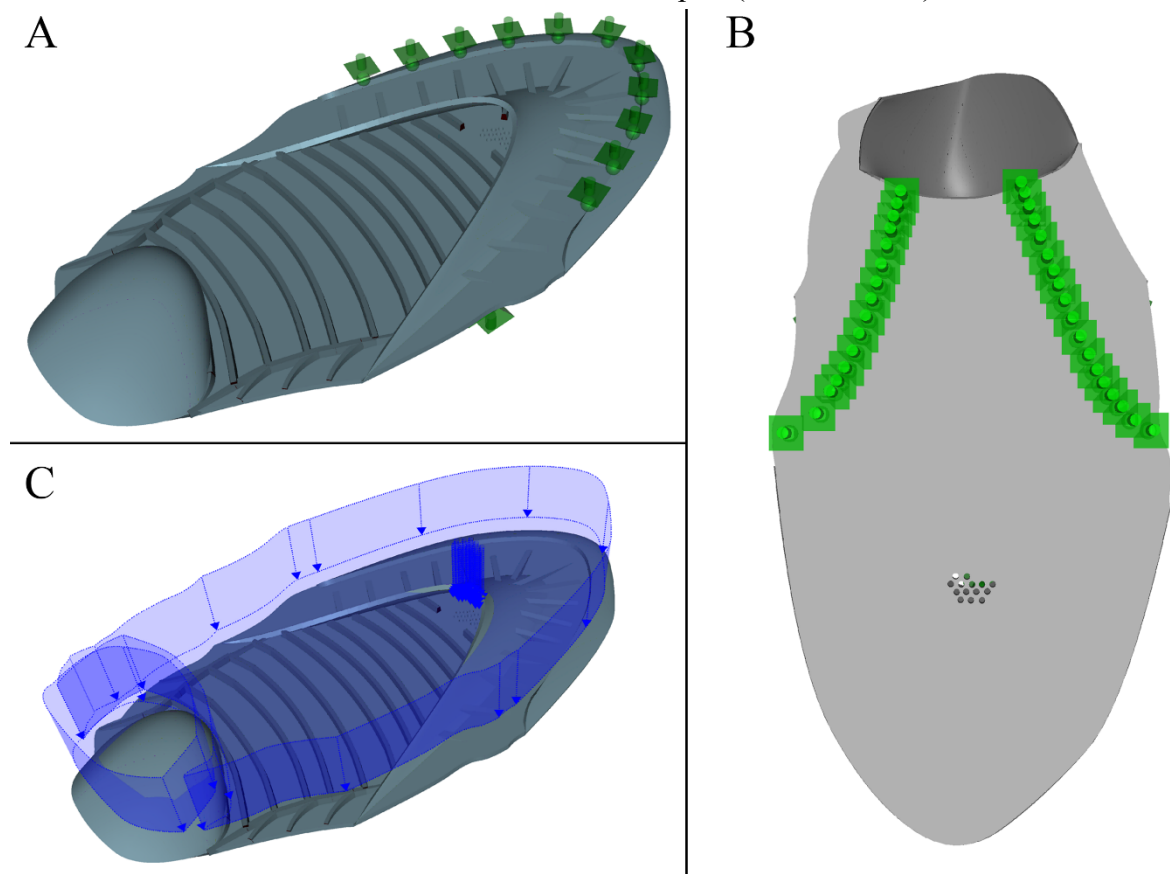
### 2.3.2 Modelovací software

Křemičitá šupina byla modelována a testována pomocí metody konečných prvků v softwaru RFEM 5 verze 5.27.01 od společnosti Dlubal. Jde o software zaměřený čistě na stavební konstrukce, čemuž je přizpůsobené nejen grafické rozhraní, ale i databáze konečných prvků, které jsou k dispozici. Pro model šupiny byly použity konečné prvky ploch a prutů.

Pruty jakožto prvky schopné přenášet všechny vnitřní síly byly vyhodnoceny jako nejvhodnější k modelaci štítových žeber.

### 2.3.3 Zatěžovací stav

Modely jsou vždy podepřeny třemi lokálními liniovými podporami, které simulují přirozené usazení a upevnění šupiny do schránky buňky. Tento typ podpory byl zvolen jako nejvíce odpovídající realitě v závislosti na pozorování uspořádání šupin u buněk ve vzorcích v SEM (obr. 1.6B). Jedna z liniových podpor se nachází na horní hraně přehnutého okraje. Simuluje tím uchycení pomocí extracelulární polymerové substance (EPS) na dvě sousední šupiny dosedající shora svou spodní plochou basální desky (obr. 2.3A). Další dvě liniové podpory jsou umístěné zespod basální desky a simulují tak dosedání šupiny na přehnuté okraje šupin pod ní (obr. 2.3B). Z důvodu značného zvětšení modelu není v zatěžovacím stavu zahrnuto zatížení vlastní vahou, ale jen konstantní kolmé zatížení o velikosti  $0.5 \text{ N/mm}^2$  na každou z ploch (obr. 2.3C). K vyhodnocení mechanických charakteristik modelů byl zvolen parametr celkové deformace a von Misesova srovnávacího napětí (Lu et al. 2015).



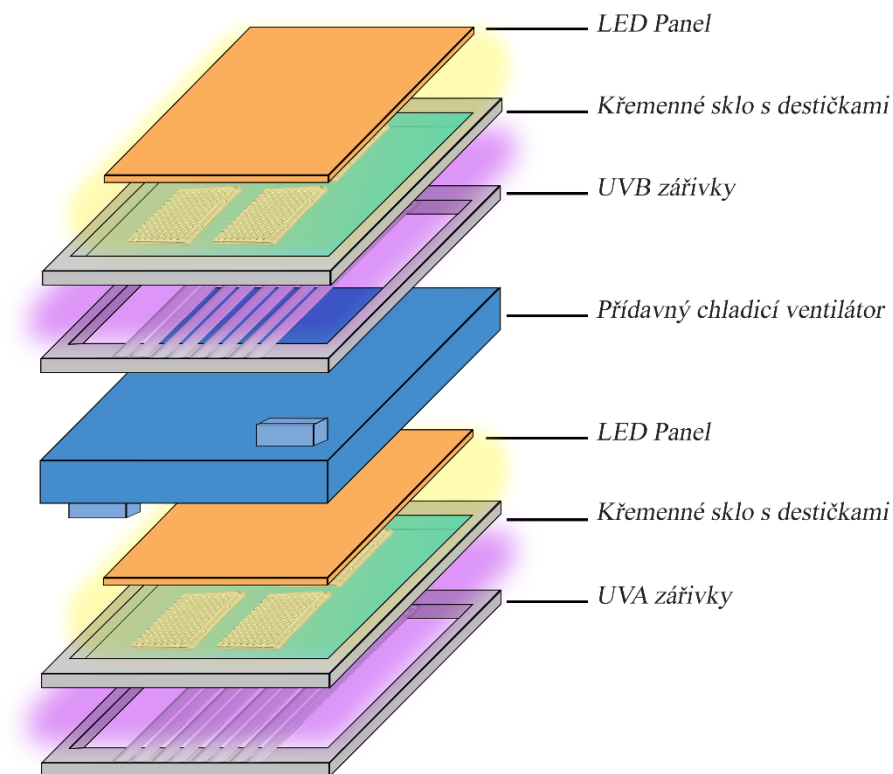
**Obrázek 2.3: Zatěžovací stav modelu: A** – Lokální liniová podpora lokalizovaná na horní hraně V-žebra; **B** – Lokální liniové podpory lokalizované na spodní straně basální desky; **C** – Vizuální zobrazení plošného zatížení o velikosti  $0,5 \text{ N/mm}^2$ .



## 2.4 Aparatura pro experimenty s UV zářením

Experimenty zahrnující osvit UV zářením probíhaly v kultivační lednici, která byla z důvodu přílišného zahřívání UV zářivek vybavena výkonnější chladicí jednotkou. Dále byly pro účely experimentů vyrobeny dvě sady experimentálních přihrádek (obr. 2.4). Osvit UVA zářením zajišťovaly 4 zářivky Philips BL PL-L 36 W/10 4P s naměřeným spektrálním maximem ve vlnové délce 380 nm a intenzitou v UVA oblasti 113,6 W/m<sup>2</sup>. Pro 4 osazené UVB zářivky Philips PL-L 36 W/01/4P bylo naměřeno maximum ve vlnové délce 311 nm s intenzitou v UVB oblasti 74,2 W/m<sup>2</sup>. Zářivky byly společně s nutnou elektrotechnikou vsazeny do zkonstruovaných přihrádek.

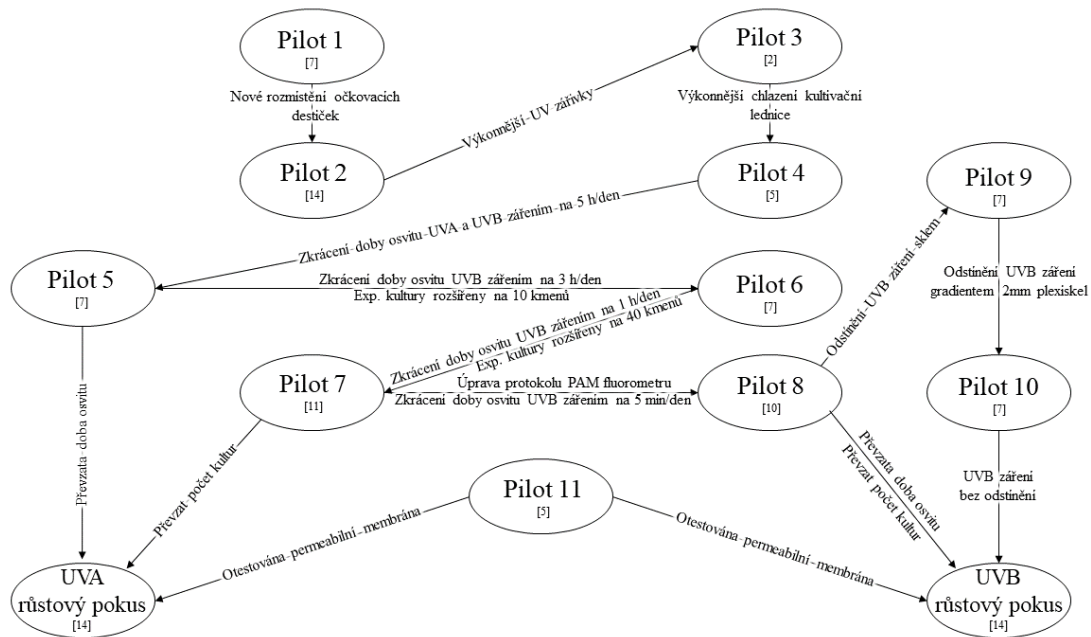
Nad sadami zářivek se ve shodné vzdálenosti nacházela přihrádka osazená křemenným sklem typu JGS2 o tloušťce 2 mm (UVC Servis, Praha). Tento materiál propouští 97% intenzity UVA a UVB záření. Na tato skla byly během experimentů umístěny kultivační destičky s experimentálními kulturami. Soustavu polic doplňoval vždy LED panel s osvitem 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, zajišťující dostatek fotosynteticky aktivního světla. Mezi sadami experimentálních přihrádek byl usazen přídatný ventilátor napojený na chladicí jednotku. Ventilátor zajišťoval dostatečnou cirkulaci studeného vzduchu a udržoval teplotu uvnitř kultivační lednice v rozmezí 11–16°C i při dlouhodobě rozsvícených UV zářivkách. K měření intenzity UV záření byla použita digitální optická konzole ThorLabs PM100D s fotodiodovým výkonnostním senzorem S120VC a filtry FGUV11 s propustností ve spektru od 275 do 375nm a 10BPF70-400 s propustí ve spektru od 330 do 470nm.



**Obrázek 2.4:** Aparatura použitá pro experimenty s UV zářením.

## 2.5 Pilotní růstové experimenty

Pro stanovení optimálních podmínek pro růstové experimenty bylo nutné provést řadu pilotních experimentů (pilotů), přičemž doba trvání se různila v závislosti na síle vlivu sledovaného faktoru (obr. 2.5). V pořadí první až čtvrtý pilot byl proveden za účelem zhotovení vhodné kultivační aparatury, která by zajišťovala osvit kultur vysokou intenzitou UV záření při teplotách v rozmezí 11 až 16 °C. Kritickým se ukázalo stanovení intenzity a délky osvitů UV zářením tak, aby byla snížena růstová rychlost většiny kultur, ale nedošlo k jejich úplnému odumření. Nastavením intenzity a délky osvitů se zabýval 5. až 10. pilot. Dále byl testován počet zařazených experimentálních kultur a zdokonalována nastavení protokolu pro PAM fluorometr. V důsledku kolísání teploty uvnitř kultivační lednice kondenzovaly kapky na víčku kultivačních destiček. Tyto kapky jednak snižovaly citlivost měření na PAM fluorometru, ale také zvyšovaly riziko kontaminace mezi jednotlivými komůrkami. Poslední pilot se zabýval tím, zda je daný problém možné vyřešit přelepením komůrek permeabilní membránou (Breathe-Easy®, Diversified Biotech) a jaký bude její vliv na růst kultur a citlivost měření PAM fluorometrem.

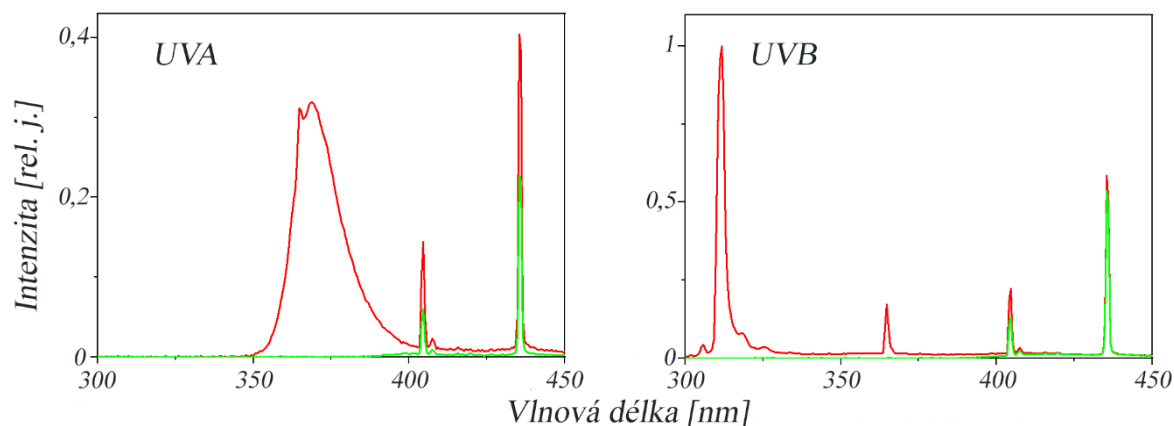


**Obrázek 2.5:** Schéma znázorňující postupnou modifikaci parametrů metodiky v rámci pilotních experimentů (pilot) a jejich dobu trvání [dny].

## 2.6 Růstové experimenty

### 2.6.1 Typy ošetření

První z ošetření zahrnovalo osvit UVA zářením v režimu 5 hodin denně uprostřed světelné fáze s výjimkou prvního dne. Intenzita záření naměřená v kultivační destičce při použití filtru 10BPF70-400 se rovnala  $72,4 \text{ W/m}^2$ . V druhém ošetření byly destičky vystaveny záření v UVB oblasti vždy 5 minut denně, taktéž s výjimkou prvního dne. Intenzita UV záření uvnitř kultivační destičky, naměřená pomocí filtru FGUV11, se rovnala  $11,6 \text{ W/m}^2$  (obr. 2.6). Každé ošetření obsahovalo i totožně naočkované kontrolní destičky vystavené stejnému záření, přelepené ze spodní strany fólií zabraňující průchodu UV záření (Archivní ochranná fólie proti UV záření 20218, Ceiba s.r.o.).



**Obrázek 2.6: Chromatogram znázorňující intenzitu záření v závislosti na vlnové délce.** Na levém grafu byly hodnoty měřeny v destičkách ozářených UVA zářivkami, na pravém ozářené UVB zářivkami. Červeně jsou vyznačeny hodnoty naměřené v experimentálních destičkách, zeleně hodnoty naměřené v kontrolních destičkách, které byly ze spodní strany polepené ochrannou fólií.

### 2.6.2 Přípravy experimentů

V rámci příprav byly kultury v exponenciální fázi růstu nejprve naředěny tak, aby výsledná hladina minimální fluorescence chlorofylu *a* ( $F_0$ ) odpovídala hodnotě 100 (s tolerancí  $\pm 20$ ). Ředící poměr kultur byl vypočten ze čtyř zprůměrovaných hodnot získaných měření na PAM fluorometru a známého objemu v měřených komůrkách. Samotné ředění do 5 ml mikrozkušavek probíhalo v pěti etapách, aby nedošlo k přílišnému zahřátí kultur, a to vždy za použití temperovaného média, ve kterém byla daná kultura dlouhodobě udržována. Těsně před pipetováním do destiček byla každá z mikrozkušavek několikrát pootočena, aby se buňky v médiu vyskytovaly co možná nejvíce rovnoměrně. Následně byly naředěné kultury napipetovány do kultivačních destiček dle randomizačního schématu.

Každý z kmenů se v experimentu vyskytoval ve čtyřech opakováních pro každé ošetření, vždy ve dvojici sousedních komůrek nacházejících se na rozdílných destičkách. Každá z komůrek obsahovala 125  $\mu$ l naředěné kultury, přičemž okrajové řádky a sloupce byly naplněny stejným obsahem destilované vody. Pro experiment byly použity 96 komůrkové destičky (Eppendorf microplate 96/F RecoverMax®). Naočkované destičky byly přelepeny permeabilní fólií a víko zajištěno parafilmem. Celý proces přípravy experimentu se odehrával vždy v rozmezí jednoho dne.

### 2.6.3 Průběh experimentů

Destičky s experimentálními kmeny byly umístěny do upravené kultivační lednice, udržující teplotu v rozmezí 11-16 °C. Světelný režim byl nastaven na 14 hodin světla a 10 hodin tmy denně. Osvětlení PAR bylo nastaveno na 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Umístění destiček se měnilo každý den dle stanoveného schématu, který zajišťoval vystřídaní všech možných pozic pro každou z destiček.

Každý den byla u vzorků pravidelně po skončení světelné fáze měřena na PAM fluorometru (PSI FluorCam FC 800) fluorescence chlorofylu *a* ( $F_0$ ). Tento údaj sloužil k odhadu množství chlorofylu *a* v jednotlivých komůrkách a následnému odvození celkové biomasy ve vzorku (Seppälä & Balode 1997; Rice et al. 2012). Dále byl u vzorků měřen maximální kvantový výtěžek ( $QY_{\text{max}}$ ), který umožňoval přesný odhad fotosyntetické aktivity a tudíž i rychlejší zaznamenání změny stavu fyziologických funkcí (Seppälä & Balode 1997). Každá destička byla před jednotlivými měřeními umístěna na 10-15 minut do tmy. Pravidelné měření probíhalo do chvíle, kdy přibližně 90 % kontrolních kultur nedosáhlo stacionární fáze růstu. U obou experimentů tomu bylo po 14 dnech od začátku experimentu, přičemž první z kultur dosáhly stacionární fáze již po 8 dnech.

## 2.7 Fylogenetická analýza

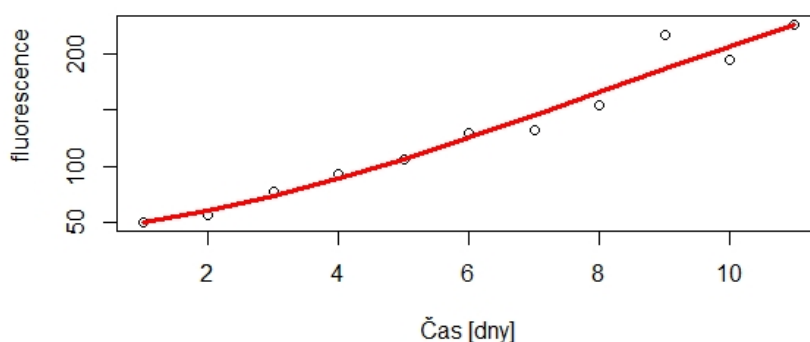
Použité ITS rDNA sekvence byly získány pro účely grantu GAČR 20-22346S, hlavní řešitel Pavel Škaloud (nepublikováno). Sekvence byly prohlíženy v programu MEGA7 (Kumar et al. 2016). Podobnost a identita sekvencí byla zkontrolována pomocí algoritmu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Původní alignment byl vytvořen pomocí online programu MAFFT ver. 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) s automatickým výběrem strategie. Před samotnou Bayesiánskou analýzou byly z alignmentu odstraněny obtížně alignovatelné oblasti.

Bayesiánská analýza dat proběhla v programu MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012) pomocí evolučního modelu GTR+  $\Gamma$  (General time reversible model s rozdělením gamma). Byly použity dva paralelní běhy Monte Carlo Markovových řetězců (MCMC), analýza u každého běhu trvala 3 miliony generací. Fylogenetický strom byl zaznamenáván každých sto generací, prvních 25 % stromů bylo odstraněno jako „burn-in“. Fylogenetický strom byl zobrazen v programu FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## 2.8 Analýza dat

### 2.8.1 Výpočet plochy pod křivkou

Naměřené hodnoty  $F_0$  každé z komůrek byly vyneseny do grafu a proloženy polynomiální křivkou třetího řádu (obr. 2.7). Pokud některý z bodů ovlivňoval tvar křivky neúměrně v porovnání vůči ostatním, byl shledán jako chyba v měření a jeho hodnota byla zaměněna za průměr sousedních hodnot. Z důvodu rozdílné růstové rychlosti kmenů, byla do analýzy zahrnuta pouze exponenciální fáze růstu. Jinými slovy bylo měření pro daný kmen ukončeno, jakmile vzorky kontrolního ošetření vstoupily do stacionární fáze růstu. Doba měření se tedy mezi kmeny mohla lišit.



**Obrázek 2.7:** Příklad polynomiální křivky proložené daty růstu kultury (fluorescence jako proxy hodnota růstové rychlosti).

Následně byla spočítána plocha pod vytvořenou křivkou (area under curve, AUC), jejíž výsledná hodnota odrážela nejen rychlost růstu, ale také celkovou velikost biomasy (Sprouffske & Wagner 2016). Jelikož se do výsledné hodnoty odráží i počáteční velikost biomasy, byly z experimentu vyřazeny komůrky, u kterých byla počáteční fluorescence ( $F_0$ ) znatelně odlišná od ostatních opakování. Důraz byl kladen na to, aby byla výsledně vyhodnocena alespoň dvě opakování z každého ošetření. Plocha pod křivkou byla následně použita pro vynesení procentuálního rozdílu mezi experimentálním a kontrolním ošetřením

v rámci kmene, spočítaného podle vzorce:  $rozdíl\ v\ AUC[\%] = \frac{AUC_{(kontrola)} - AUC_{(UV\ ošetření)}}{AUC_{(kontrola)}}$ .

## 2.8.2 Měření maximálního kvantového výtěžku

Obdobně jako minimální fluorescence, bylo měření maximálního kvantového výtěžku ( $QY_{\max}$ ) ukončeno ve chvíli, kdy se jeho hodnota u kontrolního ošetření snížila od předchozího měření o více jak polovinu. Z pravidla tomu bylo vždy tři dny před dovršením stacionární fáze růstu. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány v rámci komůrek. Tyto hodnoty pak byly použity pro výpočet rozdílů mezi kontrolním a experimentálním ošetřením shodných kmenů, spočítaného

podle vzorce:  $\text{rozdíl v } QY_{\max} [\%] = \frac{QY_{\max(\text{kontrola})} - QY_{\max(\text{UV ošetření})}}{QY_{\max(\text{kontrola})}}$ .

## 2.8.3 Statistická analýza dat

Hodnoty o rozměrech buněk, křemičitých šupin a vzorech charakteristických pro dané experimentální skupiny byly naměřeny za použití programu Image J verze Fiji (Schindelin et al. 2012). Hodnoty charakterizující typ vzorování u daného druhu byly získány zprůměrováním rozměrů naměřených vždy v deseti opakováních na 5 šupinách u každého z kmenů. Statistická analýza a vizualizace dat byla provedena za využití programu R verze 4.1.2 (R Core Team 2021). Pro správné zvolení parametrického či neparametrického typu testu byl nejprve proveden Shapiro-Wilkův test normality. Ukázalo se, že data splňují normální rozdělení a pro další analýzu byly vybrány parametrické testy. Konkrétně pro analýzu vztahu mezi rozdílným vzorováním a odolností vůči UV záření byla vybrána jednocestná ANOVA a pro analýzu vztahu mezi odolností vůči UV záření a velikostí buněk či šupin model lineární regrese. K tvorbě krabicových grafů (boxplotů) a vizualizaci signifikance byly použity balíčky ggplot2 a ggsignif (Wickham 2016; Ahlmann-Eltze 2021).

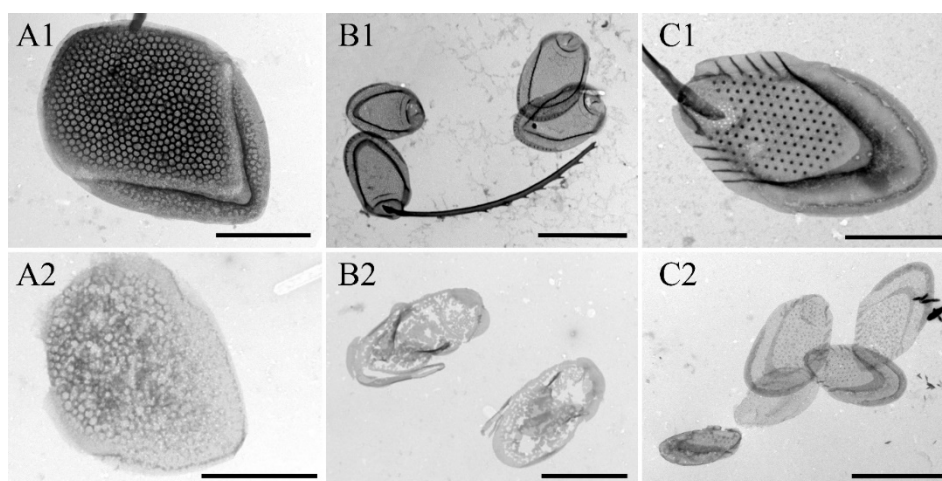
K testování hypotézy, zda má fylogenetická pozice experimentálních kmenů dopad na jejich odolnost vůči UV záření, byla aplikována metoda fylogenetických zobecněných nejmenších čtverců (PGLS – Phylogenetic Generalized Least Squares) za použití knihovny programu R „caper“ (Orme et al, 2013) a sestrojen fylogenetický strom na základě ITS rDNA sekvencí. Nejprve byly vytvořeny modely pro oba UV experimenty. V modelech byl prediktorem typ vzorování, přičemž jednu z hladin tvořil typ vzoru se signifikantně odlišnou odolností vůči UV záření a v druhé hladině byly zastoupeny všechny ostatní typy. Závislou proměnou tvořil v modelech vždy rozdíl AUC mezi ozářenými a kontrolními ošetřeními. Následně byl metodou maximální věrohodnosti (ML – Maximum Likelihood) u každého modelu získán škálovací parametr  $\lambda$  (Pagel, 1999), který na škále 0–1 vyjadřoval sílu fylogenetického signálu.

## 3 Výsledky

### 3.1 Morfologická charakterizace

Buňky experimentálních druhů mají nejčastěji oválný tvar, avšak druhy *Mallomonas munda* (obr. 3.3B1), *M. eoa* (obr. 3.3C1), *M. splendens* (obr. 3.4C1), *M. doignonii* (obr. 3.5C1) a *M. annulata* (obr. 3.6C1) jsou oproti ostatním zdatně užší a protáhlejší. Další výjimkou je kulovitá buňka druhu *M. adamas* (obr. 3.4A1) či typicky úzce obvejčitá buňka s protáhlým posteriorním koncem druhu *M. caudata* (obr. 3.2A1). Mezi největší experimentální druhy patří *M. caudata* (obr. 3.2A1) a *M. splendens* (obr. 3.4C1), jejichž buňky dosahují délky přes 40  $\mu\text{m}$ . Nejmenšími jsou naopak *M. munda* (obr. 3.3B1) a *M. kalinae* (obr. 3.6D1) s buňkami o velikosti 12–15  $\mu\text{m}$ .

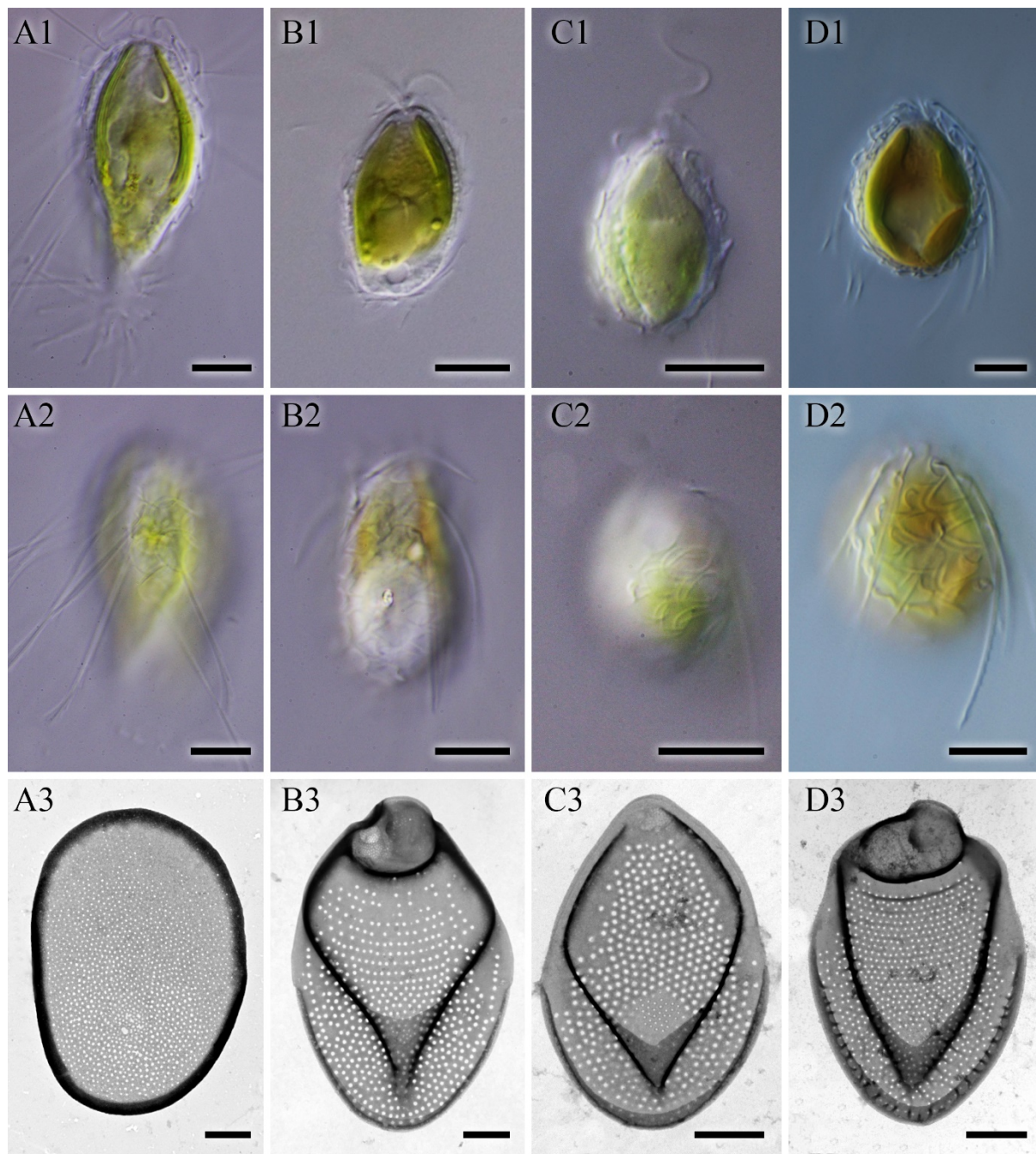
Převážná část druhů má na svém povrchu pravidelně rozmístěny křemičité ostny, výjimku tvoří druhy *M. doignonii* (obr. 3.5C2), *M. eoa* (obr. 3.3C2) a *M. splendens* (obr. 3.4C2) s ostny pouze na apikálních koncích buňky a druhy zcela bez ostnů *M. adamas* (obr. 3.4A2), *M. munda* (obr. 3.3B2) a *M. schwemmleri* (obr. 3.5E2). U většiny druhů bylo odhadnuto, že jejich schránka se skládá ze 60–100 šupin, avšak u *M. adamas* (obr. 3.4A2) a *M. kalinae* (obr. 3.6D2) byl jejich počet odhadnut pouze na 40 šupin. Délka šupin se nejčastěji pohybovala v rozmezí 3–5,5  $\mu\text{m}$ , přičemž extrémy u jednotlivých šupin byly naměřeny u druhu *M. annulata* (2,48  $\mu\text{m}$ ) (obr. 3.6C3) a *M. elongata* (7,13  $\mu\text{m}$ ) (obr. 3.2B3). Míra silicifikace šupin byla při kultivaci na dostatečné úrovni, avšak po ukončení experimentu byl zaznamenán rozdíl v míře silicifikace mezi kmeny v rámci druhu *M. splendens* (obr. 3.1A), *M. intermedia* (obr. 3.1B) a *M. papillosa* (obr. 3.1C)



**Obrázek 3.1:** Šupiny odebrané z kultur po ukončení experimentu vykazující rozdílnou míru silicifikace: A – Šupiny druhu *M. splendens*: A1) kmen AU07B, měřítko 2  $\mu\text{m}$  A2) kmen CCMP1782, měřítko 2  $\mu\text{m}$ ; B – Šupiny druhu *M. intermedia*: B1) kmen CZ35C, měřítko 5  $\mu\text{m}$ ; B2) kmen CZ34M, měřítko 2  $\mu\text{m}$ ; C – Šupiny druhu *M. papillosa* C1) kmen CZ03F, měřítko 1  $\mu\text{m}$ ; C2) kmen JEON12120, měřítko 2  $\mu\text{m}$ .

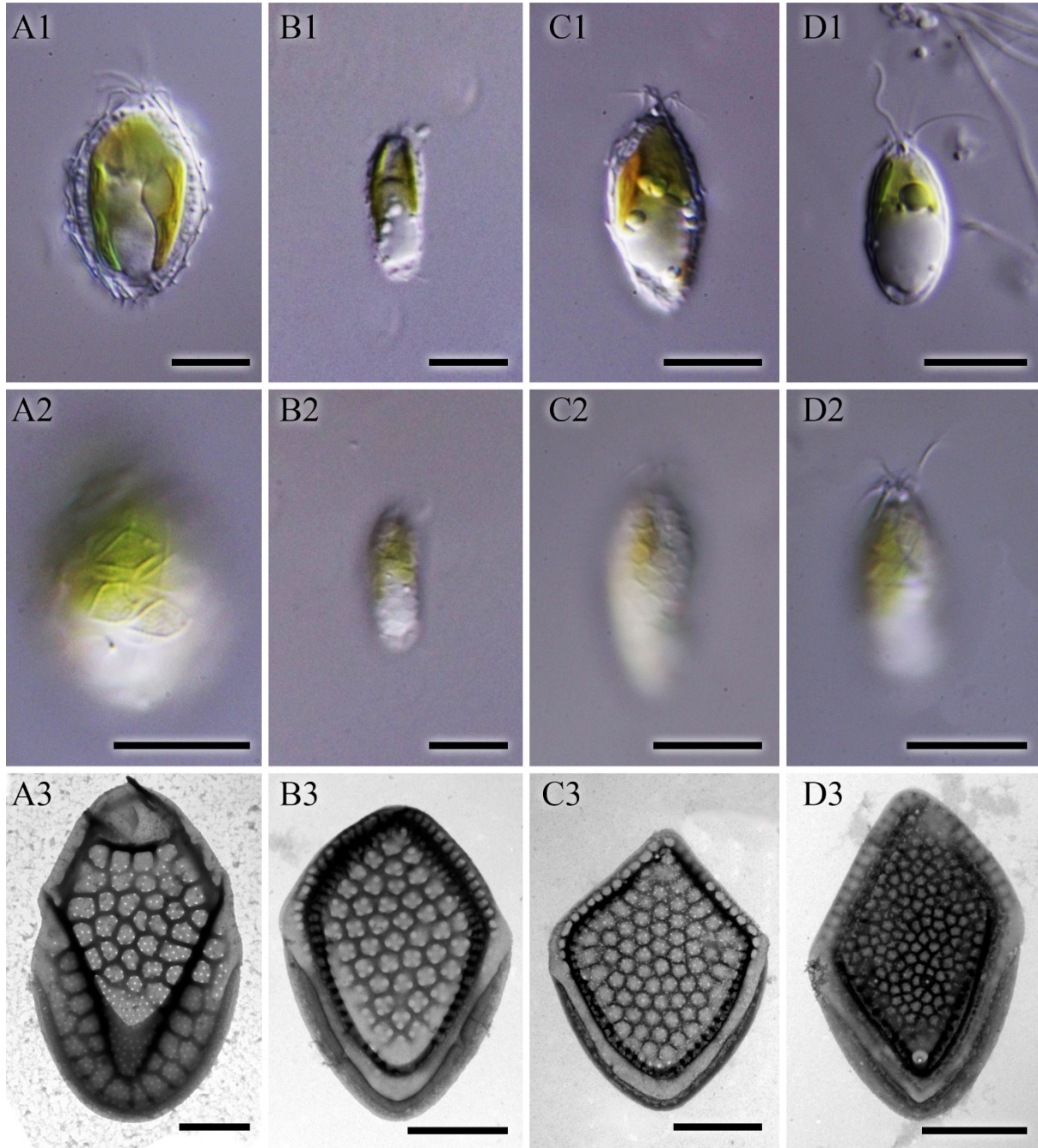


Šupiny bez výrazného vzorování (hladké), mají na bazální desce četné, pravidelně rozmístěné póry, které u *M. elongata* a *M. intermedia* tvoří v oblasti štítu příčné řady (obr. 3.2). Výrazně zjednodušenou morfologii nalezneme u šupin *M. caudata*, která oproti ostatním postrádá veškeré sekundární struktury vyjma přehnutého okraje.



**Obrázek 3.2: Morfologická charakterizace druhů rodu *Mallomonas* bez vzorování na štítu šupin (hladké): A – *M. caudata*, kmen CZ25J; B – *M. elongata*, kmen CZ26E; C – *M. areolata* kmen CZ35O; D – *M. intermedia*, kmen CZ34M; 1 – Fotografie buněk pořízené ve světelném mikroskopu. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .; 2 – Fotografie buněk s rovinou zaostřenou na křemičitou schránkou pořízené ve světelném mikroskopu. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .; 3 – Fotografie šupin pořízené v transmisním elektronovém mikroskopu. Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .**

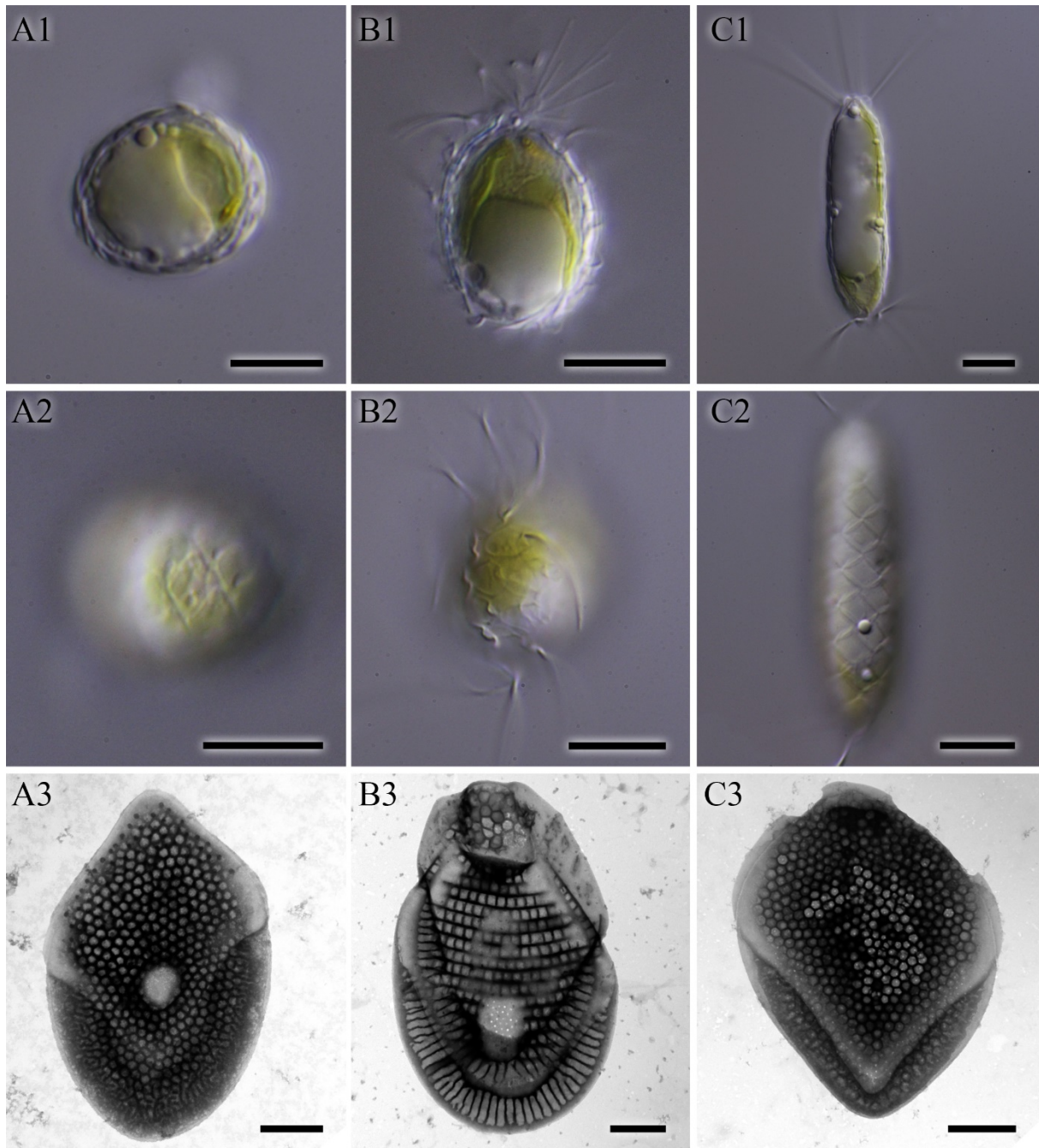
Další skupina zahrnuje druhy se šupinami, které mají v oblasti štítu nepravidelný síťovaný vzor vzdáleně připomínající motiv včelí plástve (síťované) (obr. 3.3). Plochy ohraničené tímto vzorem obsahují póry skrze bazální desku, čímž se nápadně podobají struktuře hierarchicky organizovaných pórů ve stěně frustuly rozsivek (obr. 1.3).



**Obrázek 3.3:** Morfologická charakterizace druhů rodu *Mallomonas* se síťovaným vzorováním na šupinách (síťované): **A** – *M. crassisquama*, kmen CZ04A; **B** – *M. munda*, kmen CZ85G; **C** – *M. eoa* kmen CZ115D; **D** – *M. favosa*, kmen D03C; **1** – Fotografie buněk pořízené ve světelném mikroskopu. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .; **2** – Fotografie buněk s rovinou zaostřenou na křemičitou schránkou pořízené ve světelném mikroskopu. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .; **3** – Fotografie šupin pořízené v transmisním elektronovém mikroskopu. Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .

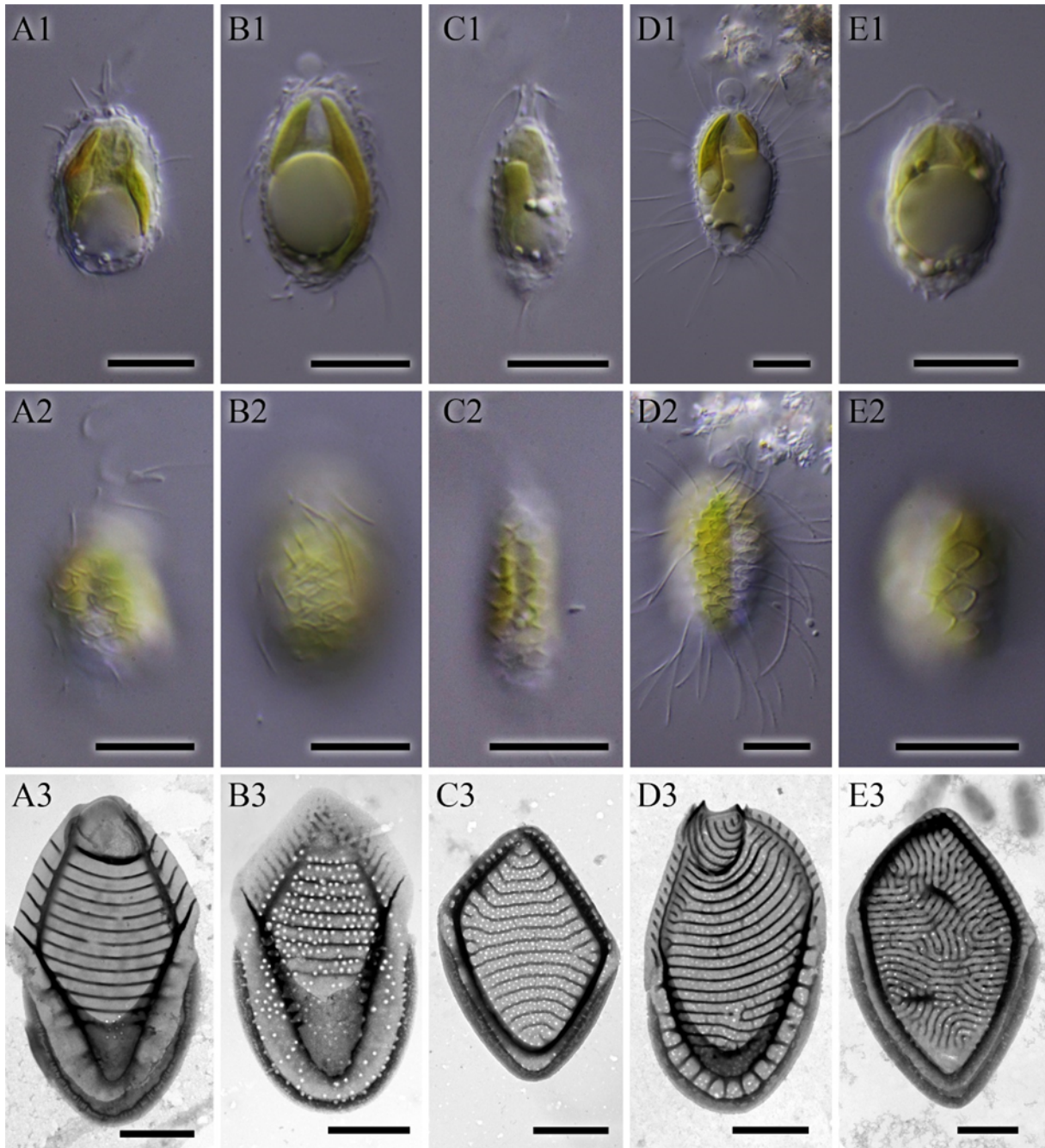


Jedna z experimentálních skupin nebyla vyčleněna na základě typu vzorování, ale pro své silně silicifikované šupiny (tlustostěnné) (obr 3.4). U druhů *M. adamas* a *M. splendens* má tato výrazně silicifikovaná struktura jemně síťované vzorování a u druhu *M. lelymene* vzor delších příčných a kratších podélných žeber.



**Obrázek 3.4: Morfologická charakterizace druhů rodu *Mallomonas* s výrazně silicifikovanými šupinami (tlustostěnné): A – *M. adamas*, kmen CZ38K; B – *M. lelymene*, kmen IT02A; C – *M. splendens* kmen AU07B; 1 – Fotografie buněk pořízené ve světelném mikroskopu. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .; 2 – Fotografie buněk s rovinou zaostřenou na křemičitou schránkou pořízené ve světelném mikroskopu. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .; 3 – Fotografie šupin pořízené ve transmisním elektronovém mikroskopu. Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .**

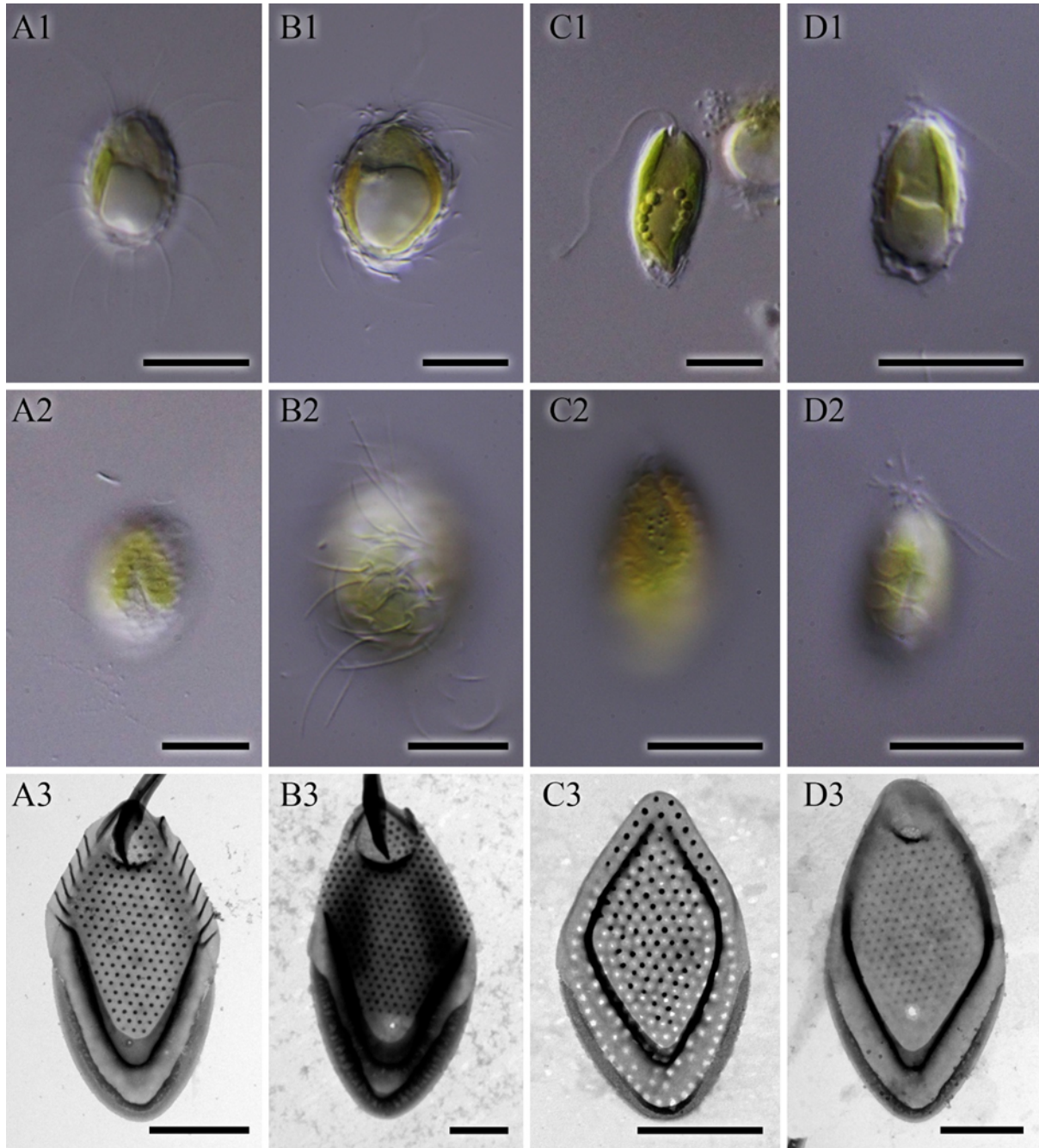
Dalším typem vzorování jsou struktury tvořené zpravidla příčně uspořádanými rovnoběžnými žebry (žebra) (obr. 3.5). Součástí vzorování jsou často i nepravidelně uspořádané póry, avšak u *M. striata* var. *serrata* je nalezneme pouze v oblasti pod kápí. Svým vzorováním se v této skupině nejvíce odlišuje šupina druhu *M. schwemmlei* (obr. 3.4E3), u které se střídá motiv podélného a příčného žebrování.



**Obrázek 3.5: Morfologická charakterizace druhů rodu *Mallomonas* s žebrovaným vzorováním na šupinách (žebra): A – *M. striata* var. *serrata*, kmen CZ04D; B – *M. actinoloma* var. *maramurensis*, kmen CZ105B; C – *M. doignonii*, kmen CZ08K; D – *M. flora*, kmen CZ53C; E – *M. schwemmlei*, kmen CZ33J; 1 – Fotografie buněk pořízené ve světelném mikroskopu. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .; 2 – Fotografie buněk s rovinou zaostřenou na křemičitou schránkou pořízené ve světelném mikroskopu. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .; 3 – Fotografie šupin pořízené ve transmisním elektronovém mikroskopu. Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .**



Poslední skupinu tvoří druhy se šupinami, které mají na svém povrchu vystouplé papily (papily) (obr. 3.6). Papily se vždy nachází v oblasti štítu a tvoří mezi sebou pravidelné rozestupy. V bazální desce se obvykle nachází pouze jediný pór v oblasti kápě, avšak u *M. annulata* (obr. 3.6D3) jsou póry nepravidelně rozmístěny po celé ploše bazální desky.



**Obrázek 3.6:** Morfologická charakterizace druhů rodu *Mallomonas* se vzorem na šupinách tvořeným papilami (papily): **A** – *M. papillosa*, kmen CZ03F; **B** – *M. rasilis*, kmen CZ38X; **C** – *M. annulata*, kmen CZ34K; **D** – *M. kalinae*, kmen CCMP479; **1** – Fotografie buněk pořízené ve světelném mikroskopu. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .; **2** – Fotografie buněk s rovinou zaostřenou na křemičitou schránkou pořízené ve světelném mikroskopu. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .; **3** – Fotografie šupin pořízené ve transmisním elektronovém mikroskopu. Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .

Naměřené rozměry charakterizující vzor na štítu křemičitých šupin se mezi jednotlivými druhy v rámci experimentálních skupin často výrazně odlišují (tabulka 3.1). Jako nejméně variabilní se v rámci skupiny ukázaly počet papil na 1  $\mu\text{m}^2$  (SD = 5,2), vzdálenost mezi papilami (SD = 14,6) a vzdálenost mezi žebry (SD = 15,2). Největší variabilita byla naopak zaznamenána u velikosti otvorů u síťovaného vzorování (SD = 87,6). Hodnoty o tloušťce šupin u druhů *Mallomonas adamas* a *M. splendens* byly převzaty od Lavau & Wetherbee (1994) a Ludwig et al. (1996). Tloušťka šupin u druhu *M. lelymene* není bohužel z důvodu absence příčného řezu známá, ale z elektronové denzity na snímcích z transmisního elektronového mikroskopu lze odvodit, že její průřez je tenčí než u šupin druhu *M. splendens* (Vigna 1990).

Typ vzorování	Druh	Počet pórů na 1 $\mu\text{m}^2$	Průměr pórů [nm]
Hladké	<i>Mallomonas caudata</i>	62,8	54,3
	<i>Mallomonas elongata</i>	24,6	81,6
	<i>Mallomonas areolata</i>	71,2	56,6
	<i>Mallomonas intermedia</i>	67,6	31,5
		<b>Velikost otvorů v síťování [nm]</b>	
Síťované	<i>Mallomonas crassisquama</i>	337,2	
	<i>Mallomonas munda</i>	197,6	
	<i>Mallomonas eoa</i>	158,8	
	<i>Mallomonas favosa</i>	99	
		<b>Tloušťka křemičitých šupin [nm]</b>	
Tlustostěnné	<i>Mallomonas adamas</i>	600	
	<i>Mallomonas lelymene</i>	>450	
	<i>Mallomonas splendens</i>	450	
		<b>Vzdálenost mezi žebry [nm]</b>	
Žebra	<i>Mallomonas striata</i> var. <i>serrata</i>	180,2	
	<i>Mallomonas actinoloma</i> var. <i>maramurensis</i>	183,5	
	<i>Mallomonas doignonii</i>	156,1	
	<i>Mallomonas flora</i>	148,1	
	<i>Mallomonas schwemmlei</i>	127,8	
		<b>Počet papil na 1 <math>\mu\text{m}^2</math></b>	<b>Vzdálenost mezi papilami [nm]</b>
Papily	<i>Mallomonas papillosa</i>	96,2	116,2
	<i>Mallomonas rasilis</i>	58,6	160,1
	<i>Mallomonas annulata</i>	62,8	121,6
	<i>Mallomonas kalinae</i>	71,2	139,4

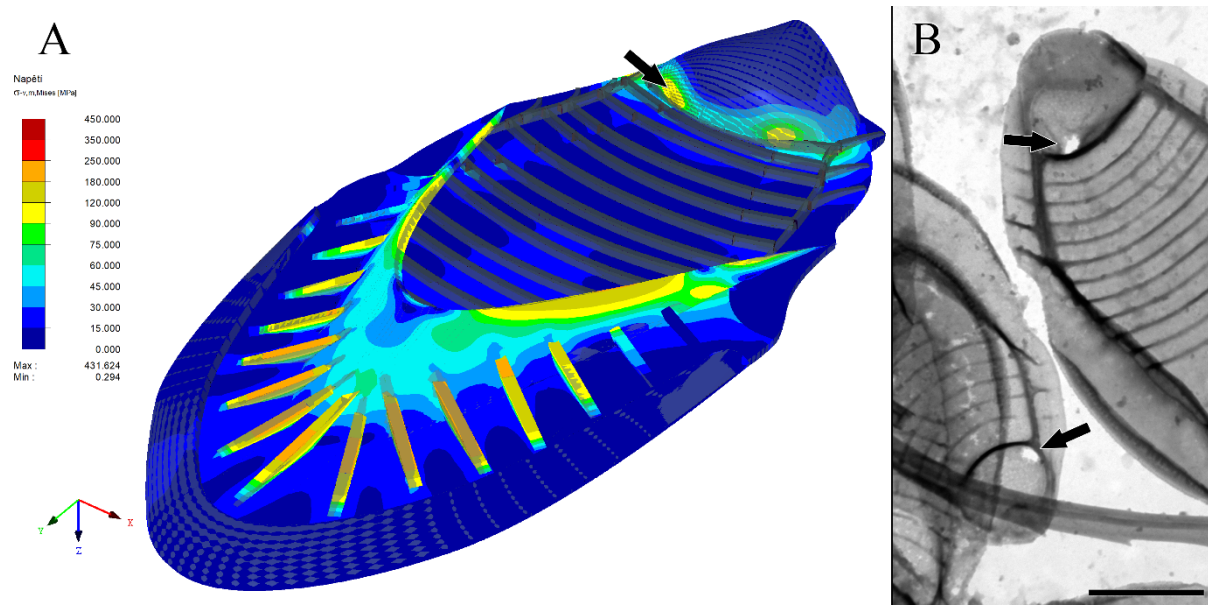
**Tabulka 3.1: Zprůměrované hodnoty (10 šupin na druh) charakterizující jednotlivé typy vzorování na křemičitých šupinách u jednotlivých experimentálních druhů; Hodnoty tloušťky šupin pro druhy *Mallomonas adamas* a *M. splendens* převzaty od Lavau & Wetherbee (1994) a Ludwig et al. (1996), tloušťka šupiny druhu *M. lelymene* odvozena ze snímků šupin pořízených v TEM.**

## 3.2 Analýza metodou konečných prvků

### 3.2.1 Srovnávací napětí

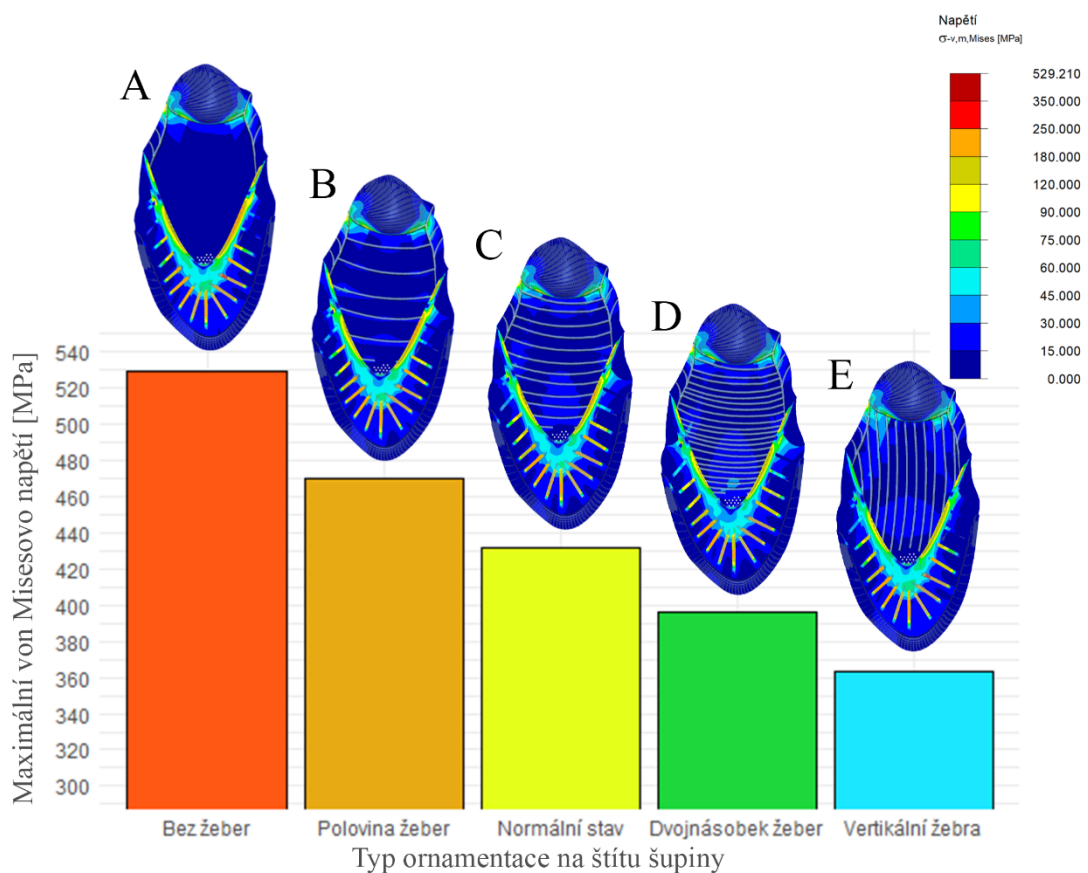
Analýza metodou konečných prvků ukázala, že po zatížení modelu šupiny *Mallomonas striata* var. *striata* se nejvíce napětí přeneslo na strukturu V-žebra a do oblastí poblíž dosedání dómu na bazální desku (obr. 3.7A). Napětí absorbované strukturou V-žebra bylo téměř rovnoměrně rozloženo po celé jeho ploše, výjimku tvořily pásy na bočních horních hranách, kde bylo napětí neúměrně vyšší. Společně s V-žebrem byla značná část napětí přenesena i na přilehlé posteriorní trámce. Velikost napětí absorbovaná jednotlivými trámcí přitom úměrně závisela na jejich poloze na šupině. Trámce na posteriorním ohybu V-žebra byly vystaveny mnohem vyššímu napětí, než trámce nacházející se blíže jeho obou koncům.

Další centra zvýšeného napětí se nacházela na spodní části dómu v místech upevnění na bazální desku. Napětí se v této oblasti koncentrovalo do dvou míst, která se nacházela vždy přibližně v poloviční vzdálenosti mezi koncem anteriorního submarginálního žebra a pomyslnou osou souměrnosti šupiny. V těchto místech lze přitom pozorovat porušení materiálu i u reálných šupin (obr. 3.7B). Mírně zvýšené napětí bylo vyvíjeno i na bazální desku, a to převážně v příčném pásu poblíž upevnění dómu a ve středové oblasti, v místech dosedání posteriorních trámců a ve středové oblasti štítu nad póry v oblasti kápě.



**Obrázek 3.7: Srovnávací napětí na modelu šupiny a jeho možné následky u reálné šupiny: A – Model šupiny druhu *M. striata* var. *striata* se znázorněným von Misesovým srovnávacím napětím a vyznačená oblast jednoho z jeho zvýšených center u spodní části dómu; B – Fotografie šupin *Mallomonas striata* var. *serrata* pořízená v transmisním elektronovém mikroskopu se znázorněným poškozením na analogických místech; Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .**

Pro zjištění, jaký vliv na rozložení napětí po struktuře šupiny má počet či orientace žeber, byly použity varianty modelu s upraveným štítovým vzorováním (obr 2.2). Maximální napětí se mezi variantami modelu zřetelně lišilo (obr. 3.8). Nejvyšší hodnota (529 MPa) byla naměřena u modelu, který byl zbaven veškerých štítových žeber (obr. 3.8A). Už přidání poloviny běžného počtu štítových žeber snížilo jeho maximální hodnotu na 470 MPa (obr. 3.8B). Maximální napětí při následném přidávání žeber nadále klesalo na hodnotu 432 MPa u šupiny s běžným počtem žeber (obr.3.8C) a dále na 396 MPa u šupiny s dvojnásobným počtem žeber oproti normálnímu stavu (obr.3.8D). Nejnižší z hodnot (363 MPa) byla naměřena u šupiny s běžným počtem žeber, která byla pootočená o 90° (obr. 3.8D). Rozdíly mezi variantami modelu lze pozorovat i v distribuci napětí na štítu šupiny. U modelu bez žeber se na štítu nachází zvýšené napětí pouze v blízkém okolí upevnění dómu na bazální desku (obr. 3.8A). Avšak s přibývajícím počtem žeber se toto napětí postupně přesouvá více do středu štítu, čímž klesají jeho maximální hodnoty (obr. 3.8B–D). Obdobně ovlivnil zvyšující se počet žeber i postupné přesouvání napětí od namáhaného V-žebera na plochu bazální desky.

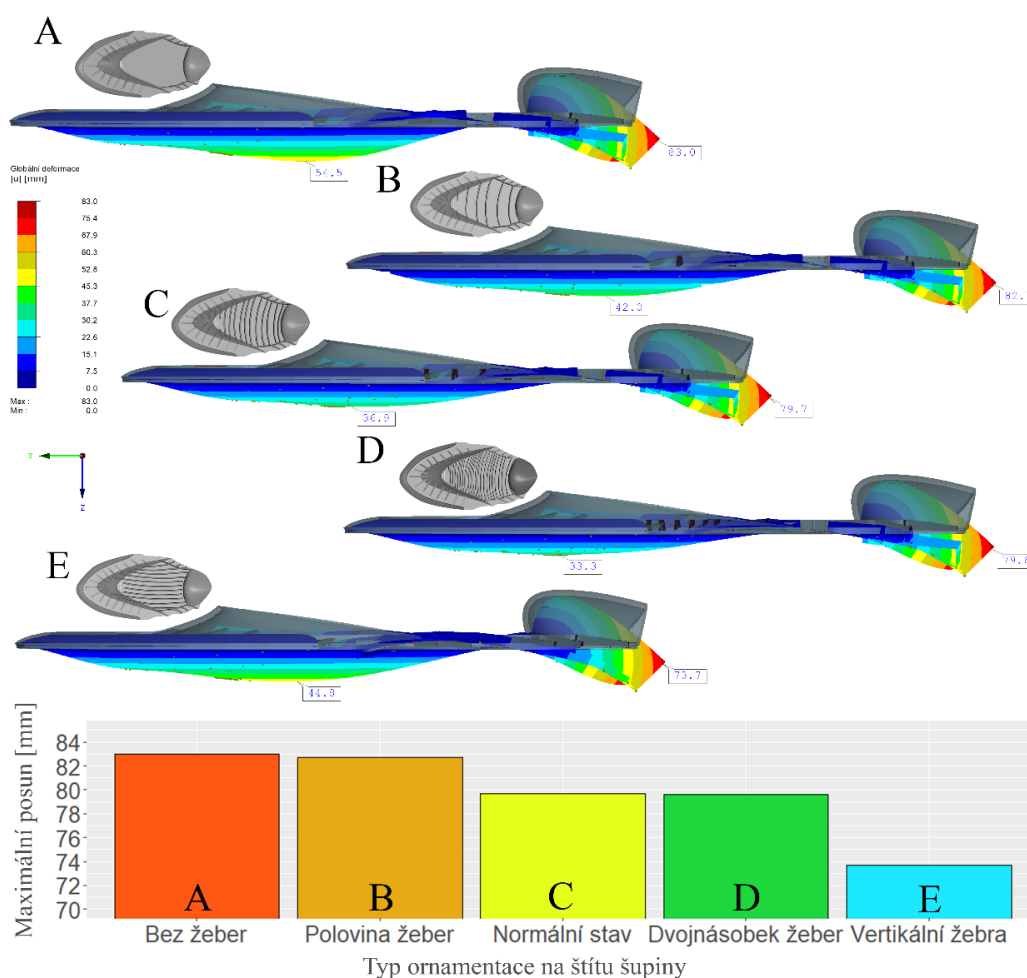


**Obrázek 3.8** Vliv různého počtu žeber a jejich orientace na hodnoty maximálního von Misesova srovnávacího napětí: **A** – Model bez štítových žeber; **B** – Model s polovičním počtem štítových žeber; **C** – Model s běžným počtem štítových žeber; **D** – Model s dvojnásobným počtem štítových žeber; **E** – Model s běžným počtem štítových žeber s jejich pozmeněnou orientací o 90°



### 3.2.2 Deformace

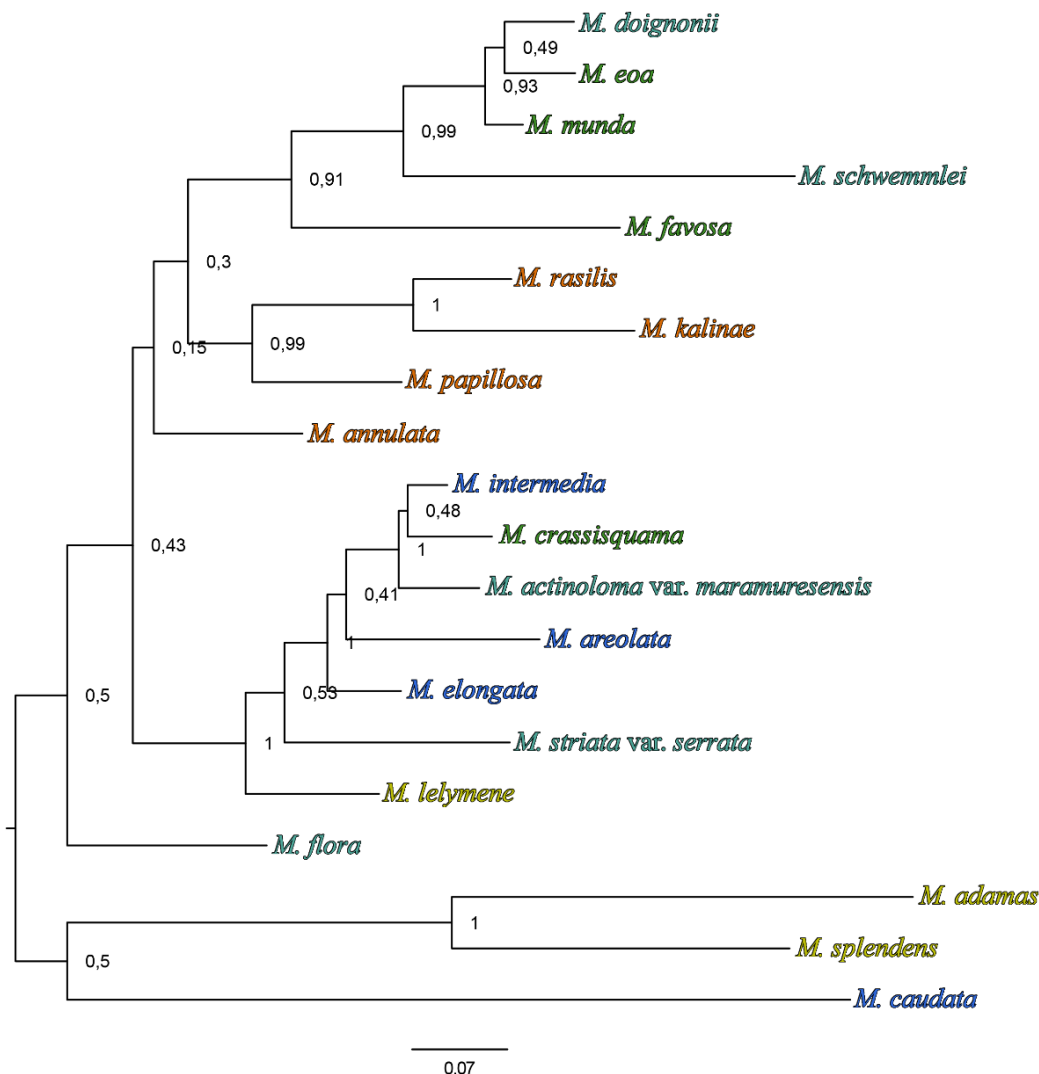
S napětím úzce souvisí deformace vyvolané zatížením. U všech variant modelu došlo k největšímu posunu v oblasti apikálního konce dómu (obr. 3.9). Největší posun (83 mm) byl naměřen u šupiny bez štítových žebër (obr. 3.9A), což ovšem v závislosti na rozměry šupiny (4,51m x 2,28m) není výrazná deformace. V sestupném pořadí následoval model s polovičním počtem žebër (82,7 mm) (obr. 3.9B), s běžným počtem žebër (79,7 mm) (obr. 3.9C), s dvojnásobným počtem žebër (79,6 mm) (obr. 3.9D) a s žebry pootočenými o 90° (73,7 mm) (obr. 3.9E). Druhá oblast s výraznou deformací se nacházela ve středu štítu. Velikost posunu se v této oblasti s narůstajícím počtem žebër postupně snižovala a společně s tím se bod maximálního posunu pozvolna posouval k posteriorní části štítu. Výjimkou v tomto trendu je model s vertikálními žebry (obr. 3.9E), u kterého je posun v oblasti štítu druhý největší (44,8 mm) a převyšuje tak hodnotu u modelu s pouze polovičním počtem žebër (42 mm) (obr. 3.9B).



**Obrázek 3.9** Vliv různého počtu žebër a jejich orientace na hodnoty maximálního posunu struktur: **A** – Model bez štítových žebër; **B** – Model s polovičním počtem štítových žebër; **C** – Model s běžným počtem štítových žebër; **D** – Model s dvojnásobným počtem štítových žebër; **E** – Model s běžným počtem štítových žebër s pozmeněnou orientací o 90°

### 3.3 Fylogenetická analýza

Fylogenetická pozice experimentálních druhů rekonstruovaná molekulární analýzou založenou na ITS rDNA markeru, odpovídá již publikovaným fylogenezím (Siver et al. 2015). Druhy ze sekcí *Mallomonas* (*M. intermedia*, *M. crassisquama*, *M. actinoloma* var. *marumuresensis*, *M. areolata* a *M. elongata*), *Pseudocoronatae* (*M. lelymene*) a *Striatae* (*M. striata* var. *serrata*) tvořily statisticky signifikantně podpořenou linii. Další linie sestávala z druhů patřících do sekce *Papillosae* (*M. kalinae*, *M. rasilis* a *M. papillosa*). Další statisticky podpořená linie obsahovala druhy patřící do sekcí *Eoae*, *Pumiliae*, *Torquatae* a *Mangoferae* (*M. eoa*, *M. doignonii*, *M. munda*, *M. schwemmlei* a *M. favosa*). Poslední podpořenou linii tvoří dvojice druhů ze sekce *Quadratae* (*M. splendens* a *M. adamas*). Žádná z experimentálních skupin vyčleněná na základě typu vzorování šupin není monofyletická (obr. 3.10). Jedině druhy s papilnatým vzorováním tvoří parafiletickou skupinu.



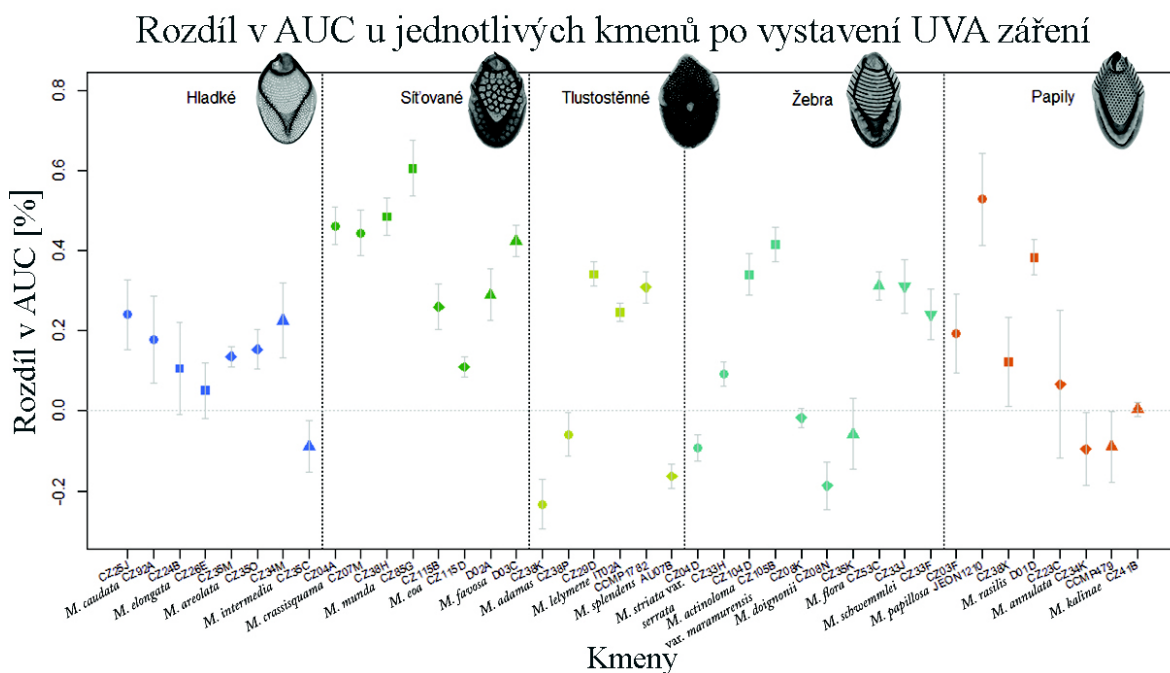
**Obrázek 3.10** Fylogenetické vztahy experimentálních druhů zkonstruované na základě ITS rDNA markeru. Zda druh patří do experimentální skupiny hladké, síťované, tlustostěnné, žebra či papily je na fylogenetickém stromě barevně odlišeno.

## 3.4 Růstové experimenty

### 3.4.1 Růstový experiment s UVA zářením

Opakované vystavení UVA záření o intenzitě 72,4 W/m<sup>2</sup> (5 hodin denně po dobu 14 dní), způsobilo u většiny experimentálních kmenů zpomalení růstové rychlosti, které se projevilo zmenšením plochy pod růstovou křivkou (AUC) (obr. 3.10). Výjimkou bylo 10 kmenů, u kterých použité UVA záření stimulovalo růstovou rychlost. Jednalo se o kmene CZ35C (*M. intermedia*), CZ38K (*M. adamas*), CZ38P (*M. adamas*), AU07B (*M. splendens*), CZ04D (*M. striata* var. *serrata*), CZ08N (*M. doignonii*), CZ08K (*M. doignonii*), CZ35K (*M. flora*), CZ34K (*M. annulata*) a CCMP479 (*M. kalinae*). Průměrný pokles v AUC mezi osvětlenými a kontrolními ošetřeními činil 17 %. Největší pokles růstové rychlosti byl zaznamenán u kmene CZ85G (*M. munda*), jehož AUC byla po dlouhodobém vystavení UVA záření menší o 61 %. Naopak u kmene CZ38K (*M. adamas*) způsobilo dlouhodobé ozáření zvětšení AUC o 23 %. U druhů *M. intermedia*, *M. splendens*, *M. flora* a *M. papillosa* byla zaznamenána značná odlišnost v reakci na UVA záření mezi dvěma experimentálními kmene.

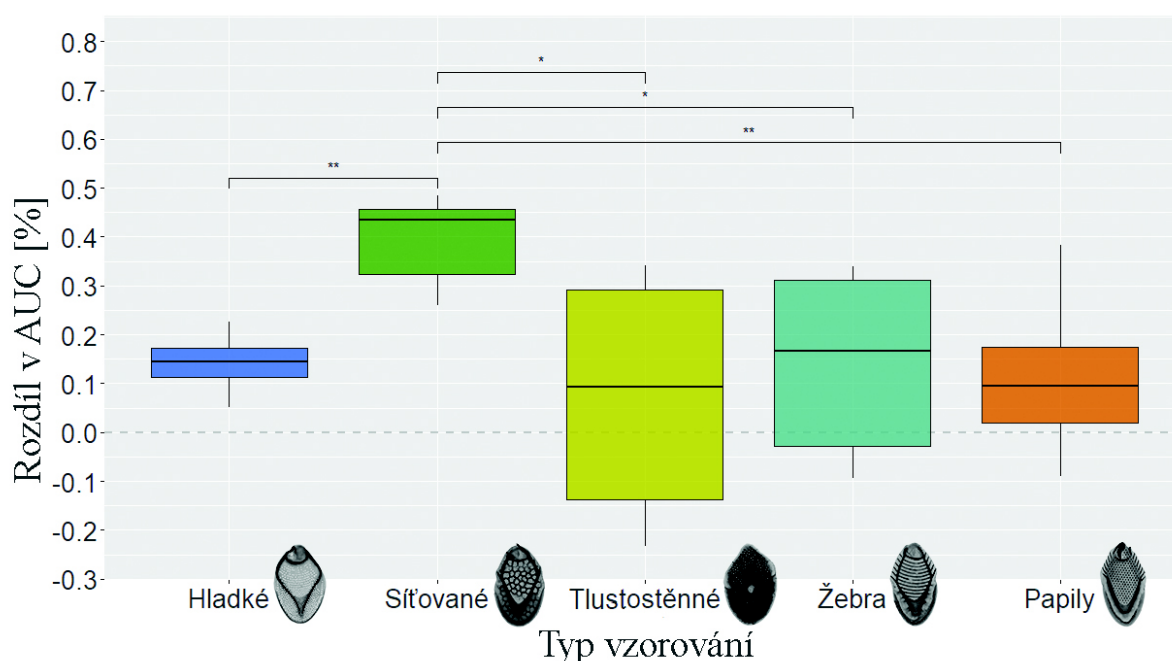
Síla závislosti mezi velikostí buněk a rozdílu v AUC byla velmi slabá ( $r = -0,11$ ). Obdobně slabá byla i závislost mezi velikostí šupin a rozdílu v AUC ( $r = -0,12$ ). Oba trendy sice směřují k tomu, že s větší velikostí jsou škodlivé účinky UVA záření nižší, ale síla těchto závislostí je mizivá a neprůkazná.



**Obrázek 3.11** Rozdíl v ploše pod růstovou křivkou (AUC) mezi UVA ozářenými a kontrolními ošetřeními u jednotlivých experimentálních kmenů; Symbol stejné barvy vždy zobrazuje kmene stejného druhu.

Nejvíce ovlivnilo UVA záření AUC u kmenů se síťovaným vzorováním (síťované). Tato skupina se signifikantně odlišovala od hladkého ( $p = 0,0022$ ), tlustostěnného ( $p = 0,026$ ), žebrovaného ( $p = 0,02$ ) i papilnatého ( $p = 0,0087$ ) typu vzorování. Mezi ostatními typy vzorování nebyla zjištěna signifikantní odlišnost, ale výrazně se odlišují mírou variability v rámci skupiny. Druhy s hladkým, síťovaným a papilnatým vzorem měli na UVA záření mnohem podobnější odpověď, než tlustostěnné a žebrované druhy u kterých byla míra variability v rámci skupiny nejvyšší. Na základě analýzy PGLS bylo zjištěno, že fylogenetická pozice síťovaných druhů nemá signifikantní vliv na jejich sníženou odolnost vůči UVA záření ( $p = 0,008125$ ).

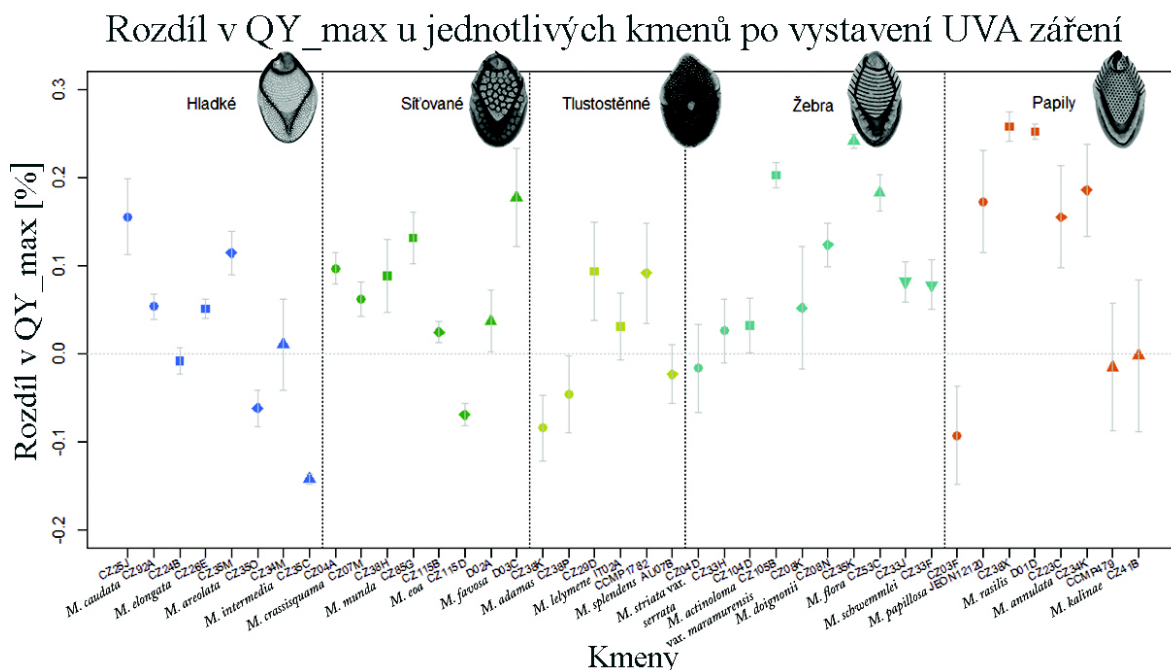
### Vliv typu vzorování na změnu AUC po vystavení UVA záření



**Obrázek 3.12** Vliv typu vzorování na rozdíl v ploše pod růstovou křivkou (AUC) mezi UVA ozářeními a kontrolními ošetřeními.

Dlouhodobé vystavení UVA záření vedlo u 27 kmenů také ke snížení maximálního kvantového výtěžku ( $QY_{max}$ ) (obr. 3.12). Oproti tomu téměř žádný rozdíl nebo jen mírný nárůst byl zaznamenán u 6 kmenů CZ24B (*M. elongata*), CZ34M (*M. intermedia*), CZ115B (*M. eoa*), CZ04D (*M. striata* var. *serrata*), CCMP479 (*M. kalinae*) a CZ41B (*M. kalinae*). U zbylých 7 kmenů CZ350 (*M. areolata*), CZ35C (*M. intermedia*), CZ115D (*M. eoa*), CZ38K (*M. adamas*), CZ38P (*M. adamas*), AU07B (*M. splendens*) a CZ03F (*M. papillosa*) byl u ozářených ošetření naměřen znatelný nárůst kvantového výtěžku. Průměrně se u ozářených ošetření snížil kvantový výtěžek pouze o 6 %. Jeden z extrémů byl naměřen u kmene CZ38X (*M. rasilis*), kdy kvantový výtěžek klesl o 26 %. Oproti tomu u kmene CZ35C

(*M. intermedia*) byl kvantový výtěžek během experimentu u ozářených ošetření o 14% vyšší. Podobně jako u AUC i v případě kvantového výtěžku byly naměřeny značně odlišné hodnoty i mezi kmeny stejného druhu. V případě kvantového výtěžku se od sebe nejmó výrazněji lišili hodnoty u kmenů druhu *M. intermedia*, *M. favosa*, *M. actinoloma* var. *maramuresensis* a *M. Papillosa*.

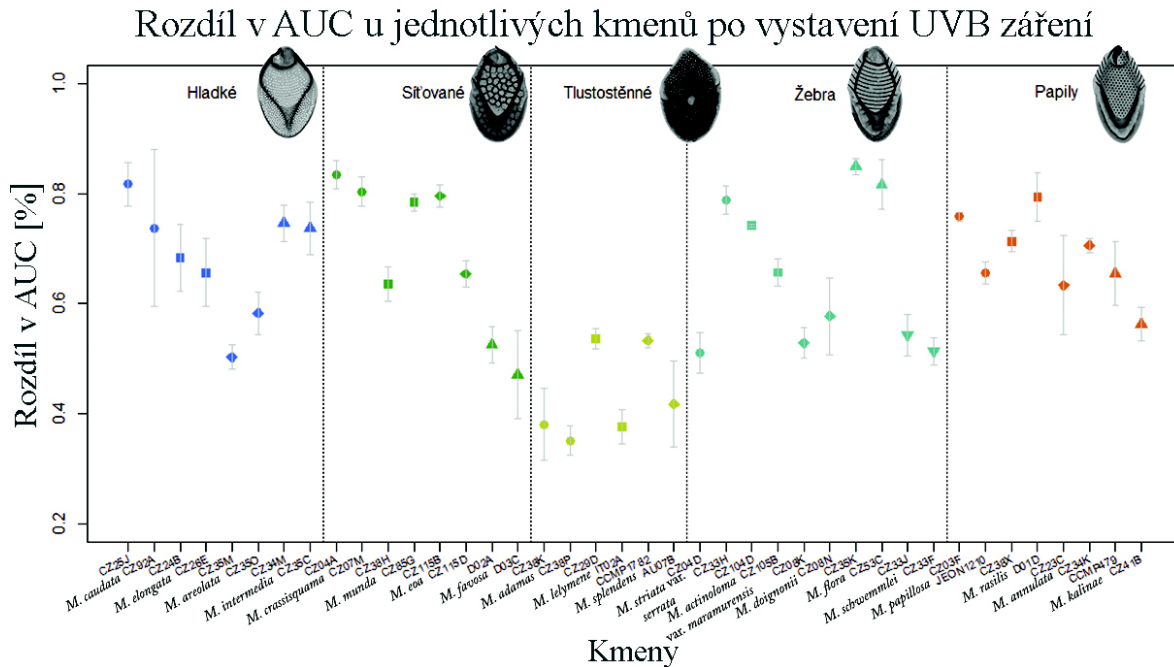


**Obrázek 3.13** Rozdíl v maximálním kvantovém výtěžku (QY<sub>max</sub>) mezi UVA ozářenými a kontrolními ošetřeními u jednotlivých experimentálních kmenů; Symbol stejné barvy vždy zobrazuje kmeny stejného druhu.

### 3.4.2 Růstový experiment s UVB zářením

Na rozdíl od UVA záření, způsobilo pravidelné ozařování UVB zářením o intenzitě 11,6 W/m<sup>2</sup> (5 minut denně po dobu 14 dní) snížení růstové rychlosti, které jsme vyjádřili jako zmenšení plochy pod růstovou křivkou (AUC) všem experimentálním kmenům (obr. 3.13). Mnohem větší byl i průměrný rozdíl v AUC mezi osvěceny a kontrolními ošetřeními, který činil 64 %. Největší rozdíl byl zaznamenán u kmene CZ35K (*M. flora*), jehož AUC byla po pravidelném vystavení UVB záření menší o 85 %. Opačným extrémem byl kmen CZ38P (*M. adamas*), u kterého byl naměřen pokles AUC jen o 35 %. Pouze u 5 kmenů D03C (*M. favosa*), CZ38K (*M. adamas*), CZ38P (*M. adamas*), IT02A (*M. lelymene*) a AU07B (*M. splendens*) byl rozdíl v AUC menší než 50 %. Rozdíly v AUC se u kmenů v rámci téhož druhu výrazněji lišily pouze u *M. striata* var. *serrata*.

Síla závislosti mezi velikostí buněk a rozdílu v AUC je velmi slabá ( $r = -0,11$ ). Obdobně slabá je závislost mezi velikostí šupin a rozdílu v AUC ( $r = -0,04$ ). Oba trendy sice stejně jako u dat získaných z růstového experimentu s UVA zářením ukazují, že s větší velikostí by měli být škodlivé účinky UVB záření nižší, ale síla těchto závislostí je opět neprůkazná.

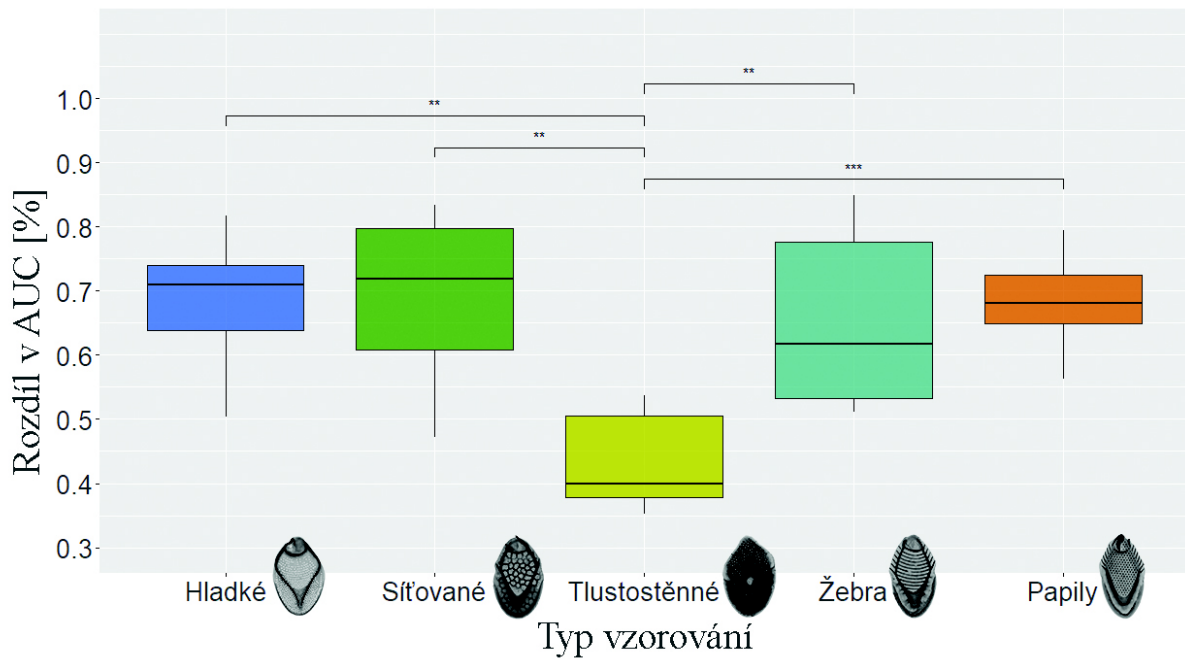


**Obrázek 3.14** Rozdíl v ploše pod růstovou křivkou (AUC) mezi UVB ozářeními a kontrolními ošetřeními u jednotlivých experimentálních kmenů; Symbol stejné barvy vždy zobrazuje kmeny stejného druhu.

Nejnižší rozdíl v AUC měli kmeny, jejichž šupiny jsou silně silicifikované (tlustostěnné) (obr. 3.14). Signifikantně se odlišovali od kmenů s hladkým ( $p = 0,0027$ ), síťovaným ( $p = 0,008$ ), žebrovaným ( $p = 0,0075$ ) i papilnatým ( $p = 0,00067$ ) vzorováním šupin. Vliv fylogenetické pozice na zvýšenou odolnost vůči UVB záření byl u tlustostěnných druhů vyvrácen s hraniční signifikancí ( $p = 0,04185$ ).

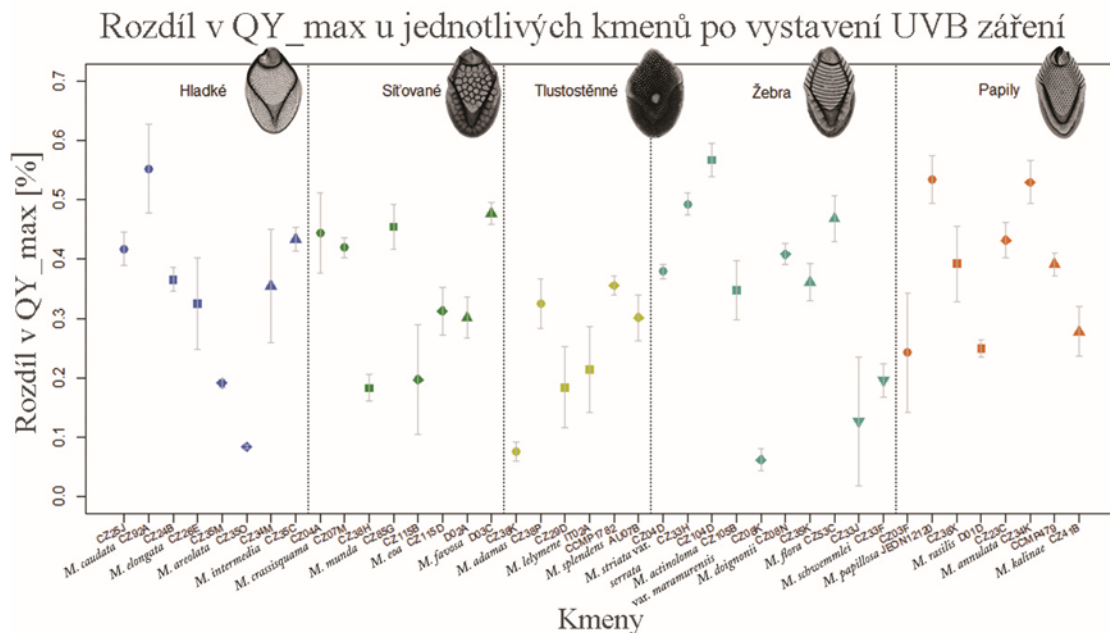


## Vliv typu vzorování na změnu AUC po vystavení UVB záření



**Obrázek 3.15** Vliv typu vzorování šupin na rozdíl v ploše pod křivkou (AUC) mezi kontrolními a UVB ozářenými ošetřeními.

Vystavení UVB záření o intenzitě  $11,6 \text{ W/m}^2$  (5 minut denně po dobu 14 dní) vedlo u všech experimentálních kmenů ke snížení  $QY_{\text{max}}$  (obr. 3.15). Průměrný rozdíl oproti kontrolním ošetřením byl 36 %. Největší rozdíl 57 % byl naměřen u kmene CZ104D (*M. actinoloma* var. *maramuresensis*) a nejmenší pouhých 6 % u kmene CZ08K (*M. doignonii*). Rozdíl mezi kmeny stejného druhu větší než 2 % byl naměřen u *M. munda*, *M. adamas*, *M. actinoloma* var. *maramuresensis*, *M. doignonii* a *M. Papillosa*.



**Obrázek 3.16** Rozdíl v maximálním kvantovém výtěžku ( $QY_{\text{max}}$ ) mezi UVB ozářenými a kontrolními ošetřeními u jednotlivých experimentálních kmenů; Symbol stejné barvy vždy zobrazuje kmeny stejného druhu.

## 4 Diskuse

Morfologie mikrostruktur vyskytujících se na povrchu mikroorganismů je převážně spojována s procesy neutrální evoluce, fyziologickými pochody nebo je dokonce úplně opomíjena (Nimer et al. 1999; Bonner 2013). V této práci se pokoušíme najít odpovědi na otázky, zda tyto vzorované nanostruktury na povrchu křemičitých šupin u rodu *Mallomonas* nemohou hrát roli v jejich mechanickém vyztužení či ochraně buněk proti škodlivému UV záření.

### 4.1 Analýza metodou konečných prvků

Přestože mikrostruktury na povrchu mikroorganismů svým vzhledem a stavbou často připomínají vysoce stabilní a sofistikované odlehčené konstrukce, bylo prozatím věnováno jejich potencionálním mechanickým vlastnostem jen velmi málo pozornosti. (Hamm 2005; Kooistra & Pohl 2015). Přitom na mechanickou odolnost schránek jsou často kladeny vysoké nároky, a to převážně ze strany predátorů (Michels et al 2012).

#### 4.1.1 Mechanické vlastnosti křemičitých šupin

Jedním ze způsobů, jak lze do problematiky mechanických vlastností mikrostruktur proniknout, je využití metody konečných prvků (FEM). Princip této analýzy spočívá v rozdělení studovaného objektu do konečného počtu částí (prvků), které společně tvoří komplexní systém o omezeném počtu stupňů volnosti (tzv. síť). Odezva systému na působící síly je následně popsána soustavou parciálních diferenciálních rovnic působících v propojených spojích mezi prvky. Z výsledků analýzy lze mimo jiné zjistit, jak je napětí rozmístěno v rámci objektu, či v jakých místech by došlo k deformaci. V naší práci jsme využily FEM analýzu pro zjištění mechanických vlastností křemičité šupiny druhu *Mallomonas striata* var. *striata* a k testování hypotézy, zda má žebrovaná sekundární struktura na štítu šupiny podstatný vliv na její celkovou pevnost. K tomuto účelu byl sestrojen a analyzován model v programu RFEM 5 verze 5.27.01.

Jako předloha pro tvorbu modelu křemičité šupiny byly použity snímky šupiny *Mallomonas striata* var. *striata* pořízené z dorzálního pohledu (obr. 2.1A), pozorované v transmisním elektronovém mikroskopu (TEM). Dále byl využit podélný řez šupinou pozorovaný na ultratenkém řezu rovněž v TEM (obr. 2.1C). Charakteristiky materiálu byly převzaty ze studie Topal et al. (2020), kde k jejich získání využili metody nanoindentace na frustule rozsivky rodu *Didymosphenia geminata*. Při tvorbě zátěžového stavu bylo nutné brát ohled na hlavní rozdíly mezi frustulou, která je sama o sobě kompletní schránkou a křemičitou šupinou, která tvoří pouze její část. U našeho modelu tedy nebylo vhodné využití globální plošné podpory,



kteřá je běžně využívána při FEM analýzách frustul, ale rozhodli jsme se pro zvolení podpor liniových (Hamm et al. 2003; Lu et al. 2015; Topal et al. 2020). Tyto liniové podpory byly umístěny tak, aby co nejlépe odpovídaly místům upevnění šupiny ve schránce (obr. 2.3), které jsme odvodili z pozorování na snímcích pořízených na skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM) (obr. 1.6B) (Takahashi & Jordan 2013). Následně jsme aplikovali konstantní zatížení o velikosti  $0,5 \text{ N/mm}^2$  působící v kolmém směru na celou plochu modelu. Z důvodu zvětšeného měřítka modelu bohužel nebylo možné odvodit jakému maximálnímu zatížení je křemičitá šupina schopna odolat, tak jak to ve svých studiích zjišťují například Hamm et al. (2003) nebo Topal et al. (2020). Nicméně i přes tento nedostatek je náš model vhodný k vizualizaci distribuce napětí a stanovení míst se zvýšenou mírou deformace.

Naše výsledky ukazují, že k největším deformacím obecně dochází na apikálním konci dómu (obr. 3.9). Náchylnost k deformaci lze u této oblasti jednoduše zdůvodnit jejím vyčníváním do prostředí, kde již není možnost podepření od zbytku schránky (obr. 1.6B). Druhou nejvíce deformovanou oblastí byl štít šupiny, u kterého byla maximální hodnota posunu přibližně poloviční (obr. 3.9). Sekundární struktury, na které se obecně přenášelo nejvíce napětí a nejvíce tak přispívaly k pevnosti šupiny, byly V-žebro a přilehlé posteriorní trámce (obr. 3.7A). Podobně přítomnost žeber (*costae*) u penátních rozsivek odklání a absorbuje napětí z křehkých oblastí nacházejících se mezi nimi (Hamm et al. 2003). Je tedy pravděpodobně, že se V-žebro na povrchu šupiny nepodílí jen na organizaci celé schránky, přičemž předpokládáme funkci V-žebra jako vodících lišt pro umístění sousedních šupin (Siver & Glew 1990). V souladu se studií Siver & Glew (1990) jsme potvrdili, že V-žebro zastává také významnou vyztužovací funkci (Siver & Glew 1990). Ke zvýšené koncentraci napětí docházelo také na bázi dómu v místech jeho dosedání na bazální desku šupiny (obr. 3.7A). Právě v této oblasti lze u křemičitých šupin v TEM často pozorovat mechanické poškození, a to jak u preparátů připravených z kultur, tak i přírodních vzorků (obr. 3.7B). Nemůžeme si sice být jistí, zda k tomuto poškození křemičitých šupin dochází za přirozených podmínek nebo zda jde jen o artefakt přípravy vzorku pro elektronovou mikroskopii, nicméně v obou případech tato analogie poukazuje na věrohodnost námi vytvořeného modelu.

V případě křemičitých šupin se pohybujeme na výrazně menším měřítku, než když hodnotíme pevnost frustul rozsivek. Pevnost křemičité schránky u řádu Synurales je dána nejen pevností jednotlivých komponent (šupin), ale především tím, jak pevně jsou šupiny vzájemně spojeny, což se u jednotlivých druhů může dost lišit.

#### 4.1.2 Vliv vzorovaných struktur na mechanické vlastnosti křemičitých šupin

Za účelem testování hypotézy, zda má žebrovaný vzor na štítu šupiny druhu *Mallomonas striata* var. *striata* vliv na její celkovou pevnost, byly vytvořeny čtyři upravené verze původního modelu šupiny (obr. 2.2). Výsledky analýzy provedené za použití metody konečných prvků ukázaly, že počet žeber a maximální hodnoty napětí a deformace spolu jasně souvisí (obr. 3.8 a 3.9). Největší deformace a míra napětí byla naměřena u modelu šupiny, který byl žebrovaného vzoru úplně zbaven. S postupným přibývajícím počtem štítových žeber tyto hodnoty vždy klesaly, nicméně v případě maximální deformace došlo k poklesu těchto hodnot skokově (obr. 3.9). Maximální deformace u modelu bez žeber a modelu s jejich polovičním počtem byla téměř totožná, podobně jako u původního modelu a modelu s dvojnásobným počtem žeber. Avšak rozdíl mezi modelem s polovičním počtem žeber a původní verzí byl značný. Z této skutečnosti lze vyvodit, že u křemičité šupiny druhu *M. striata* var. *striata* je pro zabránění deformace anteriorního konce zvolen optimální počet příčných štítových žeber v závislosti na úspoře materiálu. Obdobná efektivita využití materiálu je známa i u rozsivek, které skrze úsporné a komplexní pórovité struktury dokážou vytvořit velmi pevné a odolné schránky (Lu et al 2015).

Překvapivou výjimkou v těchto trendech je model s původním počtem žeber, která jsou ovšem pootočená oproti původnímu směru o 90°. U tohoto modelu bylo dosaženo v porovnání s ostatními modely nejnižších hodnot maximální deformace a zároveň, i maximálního napětí. Jinými slovy, model s pootočenými žebry disponuje větší pevností za použití stejného množství materiálu jako původní verze křemičité šupiny. Proč se na křemičitých šupinách v oblasti štítu vyskytují příčná žebra i přes to, že podélná jsou z hlediska pevnosti šupiny výhodnější, lze prozatím jen stěží odvodit. Jedním z vysvětlení by mohlo být evoluční omezení související s tvorbou šupiny (Wujek & Kristiansen 1978; Leadbeater 1990; Kondo 2017). Přestože model s pootočenými žebry disponuje nejnižšími hodnotami maximální deformace a napětí, má vzhledem k většině ostatních modelů výrazněji deformovanou oblast štítu. Tato deformace je dokonce druhá největší hned po modelu bez žeber. Tento fakt poukazuje na to, že funkce příčných žeber nacházejících se na reálných šupinách, by mohla spočívat ve vyztužení oblasti štítu a udržení tak jeho lehce vypouklého tvaru spíše než ve vyztužování celé šupiny. A právě vypouklý štít šupin, který se svým tvarem podobá optické čočce, by u rodu *Mallomonas* mohl sloužit k manipulaci se světlem obdobně jako je tomu u schránek rozsivek a kokolitek (Ellegaard et al. ; Monteiro et al. 2016; Hörning et al. 2020).

## 4.2 Růstové experimenty s UV zářením

### 4.2.1 Porovnání přírodních a experimentálních podmínek

Za účelem testování hypotézy, zda má vzorování na štítu šupin vliv na odolnost vůči UV záření, byly provedeny dva nezávislé experimenty. Ty se mezi sebou lišily dobou ozáření, intenzitou a vlnovou délkou UV záření, kterým byly experimentální kultury vystavovány. Hlavním cílem při tvorbě metodiky bylo vytvořit podmínky, které pozmění růstovou rychlost u většiny ozařovaných kmenů, ale nezpůsobí předčasné úmrtí žádné z experimentálních kultur. Tyto podmínky bylo nutné určit pomocí řady pilotních experimentů, u kterých byla pozměňována primárně intenzita UV záření a doba po kterou byly kultury ozářeny (kapitola 2.5). Jako hlavní problém při stanovování experimentálních podmínek se ukázal nepřímý vztah mezi intenzitou či dobou ozáření a jejich vlivem na růstovou rychlost u experimentálních kultur. Výrazně odlišné růstové rychlosti kmenů už v kontrolních podmínkách společně s různou citlivostí těchto kmenů na použité UV záření výrazně komplikovaly stanovení jednotných experimentálních podmínek. Konečné podmínky, v kterých probíhaly oba výsledné UV experimenty, tedy nebyly primárně určené k tomu, aby simulovaly přírodní podmínky a značně se od nich lišily.

Nejpodstatnějšími rozdíly oproti přírodním podmínkám byla zejména intenzita UV záření, která u obou experimentů dosahovala několikanásobně vyšších hodnot a dále úzký spektrální rozsah ve kterém bylo UV vyzařováno (obr. 2.6). Použitá intenzita UVA záření během experimentu byla  $72,4 \text{ W/m}^2$ , což v přepočtu na spektrální intenzitu činilo přibližně  $4,26 \text{ W/m}^2\text{nm}$ . Na zemském povrchu je za jasného dne průměrná spektrální intenzita UVA záření ve shodném spektrálním rozsahu jen přibližně  $0,42 \text{ W/m}^2\text{nm}$  (Diffey 1991; Kerr & Fioletov 2008). Obdobně vychází porovnání u UVB záření. Hodnota intenzity použitého UVB záření ( $11,6 \text{ W/m}^2$ ) přepočtená na spektrální intenzitu ( $3,86 \text{ W/m}^2\text{nm}$ ) byla opět výrazně vyšší než ta, s kterou se lze běžně setkat v přírodních podmínkách ( $0,045 \text{ W/m}^2\text{nm}$ ) (Diffey 1991; Kerr & Fioletov 2008). V historii ovšem intenzita dopadajícího UV záření oscillovala. Jeden z posledních výrazných nárůstů intenzity UV záření dopadajícího na zemský povrch se odehrál v období raného paleocénu (před 66–62 mil. let), kdy se v důsledku nárazu planetky a následné změny magnetického pole země výrazně oslabila ozónová vrstva (Reid et al. 1976; Sonnenfeld 1978; Glassmeier & Vogt 2010).

Další ze zásadních rozdílů mezi přírodními a experimentálními podmínkami byla doba, po kterou byly kultury vystaveny UV záření. V přírodních podmínkách jsou organismy vystaveny UV záření obvykle během celé světelné fáze dne, avšak jeho intenzita se mění v závislosti na denní době, a především na ročním období. V letních měsících tak může na zemský povrch dopadat až 3 krát více UVB záření než v zimních měsících (Herman et al. 1999). V mírných zeměpisných šířkách na severní polokouli, tedy v místech, kde byla izolována většina experimentálních kmenů, se zvýšená intenzita UV záření vyskytuje v průměru 150 hodin ročně (Herman et al. 1999; Kerr & Fioletov 2008). Pro porovnání, při experimentu s UVA zářením jím byly experimentální kultury ozařovány 5 hodin denně, což v podstatě odpovídá časovému rozmezí, kdy má sluneční záření při letních měsících nejvyšší intenzitu (Kerr & Fioletov 2008). U experimentu s UVB zářením jím však byly experimentální kultury ozařované pouze 5 minut. V tomto případě by bylo pravděpodobně vhodné při následujících experimentech prodloužit čas během kterého jsou kultury ozařovány a radiační expozici vyrovnat snížením intenzity záření, čímž by se podmínky experimentu více přiblížily těm přírodním.

V přirozeném prostředí navíc mohou bičíkovci rodu *Mallomonas* migrovat ve vodním sloupci (Happey-Wood 1976). To jim umožňuje uniknout škodlivému UV záření do hlubších vrstev vodního sloupce, čímž však omezují i svůj přístup k fotosynteticky aktivnímu záření. Obdobně, ač na výrazně menší vzdálenost, mohly buňky migrovat i v experimentální kultuře, kde navíc mohlo hrát roli i odstínění ostatními buňkami při zvýšené hustotě populace.

#### 4.2.2 Odolnost vůči UV záření u rodu *Mallomonas*

Pro účely našeho experimentu jsme použili jako proxy pro růstovou rychlost plochu pod růstovou křivkou (AUC). Díky této metodě bylo možné mnohem lépe porovnávat účinky UV záření na experimentální kultury, jejichž růstová křivka se výrazněji odchylovala od logistické funkce (Sprouffske & Wagner 2016). Pro hodnocení bezprostředního fyziologického stavu kmenů byla zvolena hodnota maximálního kvantového výtěžku (QY<sub>max</sub>). Tato hodnota vyjadřuje kapacitu fotosystému II. Čím více je organismus stresován, tím méně otevřených reakčních center je ve fotosystému II k dispozici (Kitajima & Butler 1975; Maxwell & Johnson 2000). Průměrná hodnota QY<sub>max</sub> u kontrolních ošetření u obou UV experimentů byla 0,24, což je výrazně méně než udávané optimum u většiny druhů rostlin (0,79 až 0,84) (Maxwell & Johnson 2000). Ve srovnání s rostlinami jsou u řas tyto hodnoty často znatelně

nižší a variabilnější, například jen v rámci rozsivek se mohou tyto hodnoty pohybovat v rozmezí 0,3 – 0,7 (Flameling & Kromkamp 1998; Mönnich et al. 2020).

Výsledky experimentů ukázaly, že všechny kmeny rodu *Mallomonas* mnohem lépe snášely účinky UVA než UVB záření. Tento rozdíl byl zřetelný jak u poklesu růstových rychlostí, tak i u maximálního kvantového výtěžku, přičemž trendy těchto hodnot mezi sebou u kmenů blízce korelovaly. Výrazně vyšší škodlivost krátkovlnného UVB záření pro živé organismy je obecně známá, avšak odolnost vůči němu se u planktonních řas často znatelně liší (Smith et al. 1992; Rai & Gaur 2001). Jednou z nejprostudovanějších skupin řas, u které byla zkoumána odolnost proti UV záření, jsou bezpochyby rozsivky. Rozsivky, podobně jako zástupci rodu *Mallomonas*, tvoří křemičitou schránku a zároveň patří do společné fylogenetické skupiny Ochrophyta.

Naměřené účinky UVA a UVB záření na růst experimentálních kultur jsme se pokusili porovnat s publikovanými studii zabývajícími se vlivem UV záření na růst rozsivek. Srovnání našich výsledků však bylo hned z několika důvodů velmi obtížné. V naprosté většině publikovaných studií byla na rozdíl od našeho experimentu použita kombinace UVA a UVB záření. Často se lišilo i spektrální složení použitých zdrojů záření (Behrenfeld et al. 1992; Davidson et al. 1994; Hazzard et al. 1997; Zudaire & Roy 2001). Dále byly ve výše zmíněných studiích rozsivky vystaveny UVA záření v rozsahu intenzit 1,9-40 W/m<sup>2</sup> a UVB záření v rozsahu intenzit 0,1-3,4 W/m<sup>2</sup>, což je ve srovnání s námi použitými intenzitami (UVA 72,4 W/m<sup>2</sup> a UVB 11,6 W/m<sup>2</sup>) výrazně méně (Behrenfeld et al. 1992; Davidson et al. 1994; Buma et al. 1996; Hazzard et al. 1997; Zudaire & Roy 2001). Vysoká intenzita UVB záření, použitá v našem experimentu, by mohla také vysvětlovat, proč jsme během experimentu nezaznamenali výraznější obnovení růstové rychlosti v důsledku aklimatizace na stres způsobený zvýšeným UVB zářením, jako tomu bylo v jiných studiích (Hazzard et al. 1997; Zudaire & Roy 2001).

Podstatným rozdílem byl také časový interval, po který byly kultury vystaveny UV záření a celkové trvání experimentu. Buma et al. (1996) stejně jako Zudaire & Roy (2001) ve své studii pravidelně ozařovali experimentální kultury v intervalu 3-6 hodin denně po dobu několika týdnů. Naopak jednorázové vystavení UV záření ve své studii využívali Karentz et al. (1991). Autoři této studie vystavili kultury vysoké intenzitě UV záření po dobu několika minut či Davidson et al. (1994), kde kultury nepřetržitě ozařovali po dobu 24 hodin.

Naše výsledky ukazují, že některé kmeny rodu *Mallomonas* mají schopnost růst i při výrazně vyšší intenzitě UVA záření než s kterou se lze setkat v přírodních podmínkách. Průměrně se růst ozářených kultur snížil jen o 17 % a maximální kvantový výtěžek klesl pouze o 6 %. Tyto výsledky lze vzhledem k výše vyjmenovaným interpretačním problémům jen obtížně srovnat s ostatními studiemi. Překvapivé je, že pro 10 ze 40 experimentálních kmenů mělo vystavení vysoké intenzitě UVA záření dokonce pozitivní vliv na jejich růst. Nejvíce přitom vzrostla růstová rychlost o 23 % u kmene CZ38K (*M. adamas*). Již bylo zjištěno, že mírná intenzita UVA záření u řas stimuluje fixaci uhlíku nebo růstovou rychlost embryí u chaluhy druhu *Fucus gardneri* (Henry & Van Alstyne 2004; Li et al. 2011). Přímá stimulace růstu pomocí UVA záření byla již pozorována například u vnitřně pěstované zeleniny a dokonce i některých kmenů terestrických zelených řas (Kitzing & Karsten 2015; Kang et al. 2018; Chen et al. 2019)

Studie, která se svou metodikou nejvíce podobala našemu UVB experimentu, byla provedena týmem Karentz et al. (1991). V této studii bylo jednorázově po dobu 7 minut vystaveno 12 druhů antarktických rozsivek UVB záření s maximem ve vlnové 313 nm a intenzitě 12,5 W/m<sup>2</sup>, což se přibližuje námi použité vlnové délce (311 nm) a intenzitě (11,6 W/m<sup>2</sup>). Nicméně zásadním rozdílem je, že v našem experimentu nebyly experimentální kultury ozářeny jednorázově, ale pravidelně vždy 5 minut denně po dobu 14 dní. Obdobně jako v našem experimentu i Karentz et al. (1991) zaznamenali vysokou variabilitu v citlivosti na UVB záření mezi studovanými organismy. Pro porovnání u nejodolnějšího kmene v našem experimentu CZ38P (*M. adamas*) došlo při pravidelném vystavení UVB záření pouze k 35% poklesu růstové rychlosti, zatímco u nejnáchylnějšího kmene CZ35K (*M. flora*) až k 85% poklesu. Ve studii Karentz et al. (1991) u nejodolnějšího druhu *Corethron cryophilum* nedošlo po vystavení UVB záření k žádnému zaznamenanému úmrtí buněk, zatímco u nejcitlivějšího druhu *Thalassiosira australis* došlo k úmrtí všech buněk v kultuře. U našich experimentálních kultur po vystavení UVB záření poklesla i hodnota QY<sub>max</sub> o 36 %. Pro srovnání, ve studii Kitzing & Karsten (2015) byl pokles hodnot QY<sub>max</sub> po vystavení kombinaci záření UVA a UVB u kmenů terestrických vláknitých řas rodu *Klebsormidium* (10-70%), *Interfilum* (10-20%) a *Entransia* (80-85%) srovnatelný či znatelně vyšší. Z našich výsledků lze tudíž vyvozovat, že vybrané kmeny druhu *Mallomonas* jsou schopné podobně jako některé druhy rozsivek či terestrických řas odolávat zvýšené intenzitě UVB záření.

### 4.2.3 Vliv křemičitých šupin na odolnost vůči UV záření

Lze předpokládat, že na zvýšenou odolnost vůči UVA a UVB záření u experimentálních kmenů rodu *Mallomonas* mají značný vliv jejich křemičité schránky. Tento předpoklad vychází z řady studií, které demonstrují hned několik vlastností křemičitých frustul rozsivek. Právě díky nim se mohou účinně bránit před škodlivým UV zářením, aniž by omezily přísun fotosynteticky aktivního záření (Ellegaard et al. 2016). Díky chemickým vlastnostem křemíku a častým narušením jeho krystalické mřížky je frustula schopna škodlivé UV záření absorbovat či ho pomocí fotoluminiscence vyzářit v podobě záření o delší vlnové délce (Kitamura & Laurent 2007; Qin et al. 2008; Tommasi et al. 2018). Do obrany proti UV záření se také zapojují nanostruktury na povrchu frustul, které díky svému pravidelnému uspořádání dokážou, obdobně jako fotonické krystaly, odstínit část UV záření (Fuhrmann et al. 2004; Vaz et al. 2020; De Tommasi et al. 2018; 2021). Pro zjištění, v jaké míře se tyto mechanismy uplatňují u křemičitých šupin rodu *Mallomonas*, by bylo nutné zhotovit jejich monovrstvu a ve spektrofotometru experimentálně změřit záření procházející skrze ní, podobně jako tomu bylo již učiněno u frustul (Aguirre et al. 2018 Suppl. info).

Aby se tyto obranné vlastnosti proti UV záření mohly u křemičitých šupin projevit, je důležité, aby byly dostatečně silicifikovány. Míra silicifikace křemičitých struktur přitom přímo závisí na dostupnosti kyseliny křemičité a schopnosti buňky jí přijímat, což ovlivňuje převážně pH a další podmínky prostředí (Reynolds 2006; Němcová & Pichrtová 2012). Právě rozdílná míra silicifikace šupin pravděpodobně způsobila výrazně odlišnou odpověď na vystavení UVA záření mezi kmeny v rámci druhu *Mallomonas intermedia*, *M. splendens* a *M. papillosa* (obr. 3.11). Rozdíly v míře silicifikace šupin mezi kmeny těchto druhů byly zjištěny po důkladném prohlédnutí vzorků, získaných z experimentálních kultur po skončení experimentu, v elektronovém transmisním mikroskopu (obr. 3.1). Avšak lze jen stěží zdůvodnit, proč k rozdílné míře silicifikace u šupin došlo. Všechny kultury daných kmenů byly pěstovány ve stejných podmínkách, takže předčasné vyčerpání křemíku z média, navíc u pomaleji rostoucích kultur, je velmi nepravděpodobné.

Naše výsledky ukázaly signifikantně odlišnou citlivost na vystavení UV záření u dvou experimentálních skupin (síťované a tlustostěnné) (obr. 3.12 a 3.15). Abychom zjistili, zda rozdíl v odolnosti vůči UV záření závisí především na typu vzorování či tloušťce křemičité šupiny, bylo nutné vyloučit vliv velikosti buňky, velikosti křemičitých šupin a fylogenetické příbuznosti. Větší buňky dokážou přirozeně nahromadit více ochranných pigmentů, což by jim mělo pomoci lépe zvládat vystavení škodlivému záření (Garcia-Pichel 1994). Avšak při

našich experimentech byl vztah mezi odolností vůči oběma UV zářením a velikostí buněk jen velmi slabý ( $r = -0,11$ ). Absence tohoto vztahu byla také pozorována u epipelických rozsivek, což lze zdůvodnit obecně nižšími koncentracemi ochranných pigmentů, které byly u rozsivek naměřeny (Davidson et al. 1994; Waring et al. 2006). Obdobně bezvýznamnou roli hrála i velikost šupin, která pravděpodobně nijak zvlášť neovlivňuje odolnost kmenů vůči UVA záření ( $r = -0,12$ ) ani UVB záření ( $r = -0,04$ ). Vliv fylogenetické příbuznosti na odolnost vůči UV záření byl vyvrácen pomocí PGLS analýzy, a to jak u síťovaných ( $p = 0,008125$ ) tak u tlustostěnných druhů ( $p = 0,04185$ ). Vše tedy nasvědčuje tomu, že právě rozdílné vzorování a tloušťka křemičitých šupin by mohla u vybraných druhů rodu *Mallomonas* ovlivňovat odolnost vůči UVA, respektive UVB záření.

#### 4.2.4 Vliv typu vzorování na odolnost vůči UV záření

Vzorované nanostruktury na povrchu frustuly jsou jedním z možných vysvětlení variability v odpovědích na UV záření u rozsivek (Ellegaard et al. 2016). V naší práci jsme se zaměřili na možnou ochrannou funkci vzorů nacházejících se na štítu křemičitých šupin, tedy v místech, které jsou stejně jako povrch frustuly, exponované do okolního prostředí.

Při experimentu s UVB zářením se ukázaly druhy s výrazně silicifikovanými šupinami jako jednoznačně nejodolnější (obr. 3.15). Tloušťka šupin v oblasti štítu u těchto druhů dosahuje až 600 nm, což je v porovnání s bazálními deskami běžných šupin (40nm) až 15x více (Němcová 2022, nepublikováno). Významnou roli tloušťky křemičitých struktur lze odvodit i z prosté skutečnosti, že dvojvrstva tvořená křemičitými frustulami pohlcuje mnohem více UV záření než pouze jejich monovrstva (Su et al. 2018). Tuto myšlenku podporuje také fakt, že v rámci experimentální skupiny byly vůči UVB záření nejodolnější kmeny druhu *Mallomonas adamas*, které také disponují nejtlustšími šupinami (tab. 3.1) (Lavau & Wetherbee 1994). Lze se tedy domnívat, že v ochraně proti UVB záření o vysoké intenzitě je nejdůležitějším faktorem právě tloušťka křemičitých šupin. Rozdílná tloušťka šupin, která například mezi druhy *M. adamas* a *M. splendens* činí v průměru 150 nm, mohla také způsobit variabilitu v rámci skupiny v odpovědi na UV záření (obr. 3.12). Zvýšenou odolnost vůči UV záření u tlustostěnných experimentálních kmenů je možné interpretovat i v závislosti na jejich ekologii. Všechny tlustostěnné kmeny byly totiž izolovány z velmi mělkých lokalit, ve kterých nemají možnost uniknout před škodlivým UV zářením do větších hloubek (Škaloud, osobní sdělení).



Vystavení zvýšené intenzitě UVA záření nejvíce snížilo růstovou rychlost u druhů se síťovaným vzorováním (obr. 3.12). Tato snížená odolnost k UVA záření by mohla být způsobena výraznou nepravidelností vzoru (obr. 3.3), kvůli které není schopen polarizovat a odstínit UV záření na principu využitém u fotonických krystalů. Na základě výpočtu založeném na indexech lomu vody a křemičitých šupin vychází pro interakci s krátkovlnným zářením (280-380 nm) jako nejvhodnější struktury ty, jejichž periodičita se pohybuje v rozmezí 200-250 nm (Su et al. 2018). Ačkoliv postrádají pravidelnost, splňují tyto rozměry vzory u dvou síťovaných druhů *Mallomonas crassisquama* a *M. munda* (tab. 3.1), avšak paradoxně právě tyto druhy byly nejméně odolné vůči UVA záření (obr. 3.11). U vzorování tvořených žebry a papilami byla periodičita vzoru sice mnohem pravidelnější, ale vzdálenost mezi žebry či papilami se zas pohybovala pouze v rozmezí přibližně od 110 do 180 nm (tab. 3.1). I přes to však dokázaly obě tyto skupiny odolávat UVA záření lépe než druhy s nepravidelným síťovaným vzorem. Nápadná je i nízká variabilita v odpovědi na UV záření mezi druhy s papilnatým vzorem, kterou lze možná přisuzovat právě vysoké míře podobnosti vzorování na jejich křemičitých šupinách (tab. 3.1). Možná funkce v obraně proti UV záření u vzoru tvořeného papilami na šupinách rodu *Mallomonas*, byla navíc již dříve diskutována ve studii Hörning et al. (2020). Obdobně nízká variabilita v odpovědi na UV záření byla pozorována u druhů, které vzorování na štítu šupiny úplně postrádají (hladké). Tyto druhy se sice výrazně odlišují v průměru či počtu pórů na 1  $\mu\text{m}^2$  (tab. 3.1), což ukazuje na jejich nízký význam při ochraně proti UV záření, ale spojuje je právě absence vzorovaných struktur v oblasti štítu šupiny (obr. 3.2). Jen obtížně interpretovatelná je však u hladkých druhů odolnost vůči UVA záření, která je oproti ostatním experimentálním skupinám srovnatelná. Tento výsledek je v rozporu i s daty získanými ve studii zabývající se rozdíly v odolnosti vůči UV záření mezi centrickými a penátními rozsivkami (De Stefano et al. 2007). V případě rozsivek jsou totiž vůči UV záření výrazněji náchylnější penátní rozsivky, jejichž valvy, oproti centrickým rozsivkám, postrádají vnitřní sekundární vrstvu. Je nutné si ovšem uvědomit, že i přirovnání křemičitých šupin rodu *Mallomonas* k valvám rozsivek má svá slabá místa. Křemičité šupiny jsou například v porovnání s valvami výrazně menší a sekundární struktury se u nich nachází na vnějším povrchu bazální desky. Obtíže spojené s interpretací našich výsledků jen dokazují, že výzkum zabývající se možnou ochrannou funkcí proti škodlivému UV záření je u křemičitých šupin teprve na počátku, přičemž tato práce je jedním z prvních kroků, které byly tímto směrem učiněny.

## 5 Závěr

Pomocí FEM analýzy jsme zjistili, že sekundární žebrované struktury v oblasti štítu mají jen nepatrný vliv na celkovou pevnost křemičité šupiny. Naopak nejvíce napětí bylo přenášeno na strukturu V-žebra a přilehlé posteriorní trámce, které se tím ukázaly jako nejpodstatnější vyztužovací prvky na šupině. Bylo zjištěno, že žebrovaná sekundární struktura nachází své uplatnění spíše ve vyztužování oblasti štítu, čímž zajišťuje jeho mírně vypouklý tvar podobný optické čočce. Dá se spekulovat, že díky tomuto tvaru by mohla šupina dosahovat fotonických vlastností, podobně jako tomu bylo již zjištěno u frustul rozsivek (Hörning et al. 2020). Spolehlivost našeho modelu přitom demonstruje skutečnost, že v místech modelu šupiny, kde docházelo ke zvýšenému napětí, lze často pozorovat mechanické poškození u reálných šupin.

Z růstových experimentů vyplývá, že vzorované nanostruktury na štítu křemičitých šupin mají větší vliv v obraně proti méně škodlivému UVA záření. Jako nejnáchylnější na vystavení vysoké intenzitě UVA záření byly experimentální druhy mající na svých šupinách síťované vzorování. Domníváme se, že míra pravidelnosti vzorování, která je u tohoto vzoru výrazně nejnižší, je podstatný aspekt ovlivňující schopnost šupiny odstiňovat UVA záření. Předpokládáme tak na základě pravidelné a periodicky se opakující geometrie fotonických krystalů, která umožňuje v závislosti na svých rozměrech odstínit část světelného spektra (Fuhrmann et al. 2004). Na podobnost struktury schránek mikroorganismů a fotonických krystalů je v poslední době upozorňováno především u rozsivek (Tommasi et al. 2018). Silné expozici krátkovlnnému UVB záření se dokázaly nejlépe bránit druhy s tlustostěnnými křemičitými šupinami. Významnou roli v tomto případě pravděpodobně hrála absorpce UV záření podmíněná chemickým složením a tloušťkou šupiny (Su et al. 2018). Tato myšlenka je podpořena i faktem, že experimentální druh s nejvíce silicifikovanými a nejtlustšími křemičitými šupinami byl zároveň i nejodolnější vůči UVB záření. Zvýšená odolnost vůči UVB záření lze u tlustostěnných experimentálních druhů interpretovat i v závislosti na jejich ekologii, jelikož všechny tlustostěnné kmeny byly izolovány z velmi mělkých lokalit, ve kterých nemají možnost uniknout před škodlivým UV zářením do větších hloubek.

Tato práce jako jedna z prvních vrhá světlo na možné funkce, kterých mohou nabývat vzorované nanostruktury na křemičitých šupinách řádu Synurales. V práci je zahrnuta nová metodika, kterou je možné uplatnit v růstových experimentech zahrnujících ozařování úzkým spektrem UV záření. Především se však snaží upozornit na nedostatečné vědomosti, kterými o vzorovaných strukturách v mikrosvětě disponujeme.

## 6 Zdroje

- Aguirre, Luis Ever, Liangqi Ouyang, Anders Elfving, Mikael Hedblom, Angela Wulff, and Olle Inganäs. 2018. "Diatom Frustules Protect DNA from Ultraviolet Light." *Scientific Reports* 8 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21810-2>.
- Ahlmann-Eltze, Constantin. 2021. "Ggsignif: R Package for Displaying Significance Brackets for 'ggplot2' A Preprint," no. March: 2–5. <https://doi.org/10.31234/osf.io/7awm6>.
- Aitken, Zachary H., Shi Luo, Stephanie N. Reynolds, Christian Thaulow, and Julia R. Greer. 2016. "Microstructure Provides Insights into Evolutionary Design and Resilience of *Coscinodiscus* Sp. Frustule." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (8): 2017–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519790113>.
- Andersen, Robert A. 1987. "Synurophyceae Classis Nov., A New Class of Algae." *American Journal of Botany* 74 (3): 337. <https://doi.org/10.2307/2443810>.
- Arnal, C., O. Verneau, and Y. Desdevises. 2006. "Phylogenetic Relationships and Evolution of Cleaning Behaviour in the Family Labridae: Importance of Body Colour Pattern." *Journal of Evolutionary Biology* 19 (3): 755–63. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.01059.x>.
- Beardall, John, and John A. Raven. 2004. "The Potential Effects of Global Climate Change on Microalgal Photosynthesis, Growth and Ecology." *Phycologia* 43 (1): 26–40. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-1-26.1>.
- Behrenfeld, Michael J., John T. Hardy, and Henry Lee. 1992. "Chronic Effects of Ultraviolet-B Radiation on Growth and Cell Volume of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae)." *Journal of Phycology* 28 (6): 757–60. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1992.00757.x>.
- Berman, Amir, Jonathan Hanson, Leslie Leiserowitz, Thomas F. Koetzle, Stephen Weiner, and Lia Addadi. 1993. "Biological Control of Crystal Texture: A Widespread Strategy for Adapting Crystal Properties to Function." *Science* 259 (5096): 776–79. <https://doi.org/10.1126/science.259.5096.776>.
- Bonner, John Tyler. 2013. *Randomness in Evolution*.
- Buma, A. G.J., H. J. Zemmeling, K. Sjollem, and W. W.C. Gieskes. 1996. "UVB Radiation Modifies Protein and Photosynthetic Pigment Content, Volume and Ultrastructure of Marine Diatoms." *Marine Ecology Progress Series* 142 (1–3): 47–54. <https://doi.org/10.3354/meps142047>.
- Camazine, Scott. 2003. "Patterns in Nature." *Natural History* 112 (5): 34–41. <https://doi.org/10.1088/0031-9112/28/1/032>.

- Castets, V, E Dulos, J Boissonade, and P De Kepper. 1990. “Experimental Evidence of a Sustained Standing Turing-Type Nonequilibrium Chemical Pattern.” *Phys. Rev. Lett.* 64 (24): 2953–56. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.64.2953>.
- Chen, Yongcheng, Tao Li, Qichang Yang, Yating Zhang, Jie Zou, Zhonghua Bian, and Xiangzhen Wen. 2019. “UVA Radiation Is Beneficial for Yield and Quality of Indoor Cultivated Lettuce.” *Frontiers in Plant Science* 10 (December). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01563>.
- Darwin, Charles. 1902. *The Origin of Species by Means of Natural Selection, or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London,: J. Murray., <https://doi.org/10.5962/bhl.title.87916>.
- Davidson, A. T., D. Bramich, H. J. Marchant, and A. McMinn. 1994. “Effects of UV-B Irradiation on Growth and Survival of Antarctic Marine Diatoms.” *Marine Biology* 119 (4): 507–15. <https://doi.org/10.1007/BF00354312>.
- Davis, Stan C., Vonda C. Sheppard, Gousia Begum, Ye Cai, Yunnan Fang, John D. Berrigan, Nils Kröger, and Kenneth H. Sandhage. 2013. “Rapid Flow-through Biocatalysis with High Surface Area, Enzyme-Loaded Carbon and Gold-Bearing Diatom Frustule Replicas.” *Advanced Functional Materials* 23 (36): 4611–20. <https://doi.org/10.1002/adfm.201203758>.
- Demadis, Konstantinos D. 2018. “Biosilica: Structure, Function, Science, Technology, and Inspiration.” *American Mineralogist* 103 (7): 1009–10. <https://doi.org/10.2138/am-2018-6583>.
- Devlin, K. 1996. *Mathematics: The Science of Patterns: The Search for Order in Life, Mind and the Universe*. A Scientific American Library Paperback. Henry Holt and Company. <https://books.google.cz/books?id=HW26uSG2yVgC>.
- Diffey, B. L. 1991. “Solar Ultraviolet Radiation Effects on Biological Systems.” *Physics in Medicine and Biology* 36 (3): 299–328. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/36/3/001>.
- Ellegaard, Marianne, Torben Lenau, Nina Lundholm, Christian Maibohm, Søren Michael Mørk Friis, Karsten Rottwitt, and Yanyan Su. 2016a. “The Fascinating Diatom Frustule—Can It Play a Role for Attenuation of UV Radiation?” *Journal of Applied Phycology* 28 (6): 3295–3306. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0893-5>.
- Ferrara, Maria Antonietta, Principia Dardano, Luca De Stefano, Ilaria Rea, Giuseppe Coppola, Ivo Rendina, Roberta Congestri, Alessandra Antonucci, Mario De Stefano, and Edoardo De Tommasi. 2014. “Optical Properties of Diatom Nanostructured Biosilica in *Arachnoidiscus* Sp: Micro-Optics from Mother Nature.” *PLoS ONE* 9 (7): 3–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103750>.

- Flameling, Inez A, and Jacco Kromkamp. 1998. "Light Dependence of Quantum Yields for PSII Charge Separation and Oxygen Evolution in Eucaryotic Algae." *Limnology and Oceanography* 43 (2): 284–97.
- Fuhrmann, T., S. Landwehr, M. El Rharbl-Kucki, and M. Sumper. 2004. "Diatoms as Living Photonic Crystals." *Applied Physics B: Lasers and Optics* 78 (3–4): 257–60. <https://doi.org/10.1007/s00340-004-1419-4>.
- Fuseya, Yuki, Hiroyasu Katsuno, Kamran Behnia, and Aharon Kapitulnik. 2021. "Nanoscale Turing Patterns in a Bismuth Monolayer." *Nature Physics* 17 (9): 1031–36. <https://doi.org/10.1038/s41567-021-01288-y>.
- Garcia-Pichel, Ferran. 1994. "A Model for Internal Self-shading in Planktonic Organisms and Its Implications for the Usefulness of Ultraviolet Sunscreens." *Limnology and Oceanography* 39 (7): 1704–17. <https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.7.1704>.
- Glassmeier, Karl Heinz, and Joachim Vogt. 2010. "Magnetic Polarity Transitions and Biospheric Effects : Historical Perspective and Current Developments." *Space Science Reviews* 155 (1–4): 387–410. <https://doi.org/10.1007/s11214-010-9659-6>.
- Golovin, Alexander A., and Alexander A. Nepomnyashchy. 2006. *Self-Assembly, Pattern Formation and Growth Phenomena in Nano-Systems*. Springer.
- Guillard, Robert R. L., and Carl J. Lorenzen. 1972. "Yellow-Green Algae with Chlorophyllide C 1, 2." *Journal of Phycology* 8 (1): 10–14. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x>.
- Häder, Donat-P. 1997. "Effects of UV Radiation on Phytoplankton." In *Arctic Alpine Ecosystems and People in a Changing Environment*, 1–26. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9074-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9074-0_1).
- Häder, Donat-P, Robert C Worrest, H D Kumar, and Raymond C Smith. 1995. "Effects of Increased Solar Ultraviolet Radiation on Aquatic Ecosystems." *Ambio* 24.
- Haeckel, Ernest. 1904. *Kunstformen Der Natur*.
- Hale, Michelle S., and James G. Mitchell. 2001. "Functional Morphology of Diatom Frustule Microstructures: Hydrodynamic Control of Brownian Particle Diffusion and Advection." *Aquatic Microbial Ecology* 24 (3): 287–95. <https://doi.org/10.3354/ame024287>.
- Hamm, Christian E. 2005. "The Evolution of Advanced Mechanical Defenses and Potential Technological Applications of Diatom Shells." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 5 (1): 108–19. <https://doi.org/10.1166/jnn.2005.023>.

- Hamm, Christian E., Rudolf Merkel, Olaf Springer, Piotr Jurkojc, Christian Maiert, Kathrin Prechtelt, and Victor Smetacek. 2003. "Architecture and Material Properties of Diatom Shells Provide Effective Mechanical Protection." *Nature* 421 (6925): 841–43. <https://doi.org/10.1038/nature01416>.
- Happey-Wood, Christine M. 1976. "Vertical Migration Patterns in Phytoplankton of Mixed Species Composition." *British Phycological Journal* 11 (4): 355–69. <https://doi.org/10.1080/00071617600650411>.
- Hazzard, Christina, Michael P. Lesser, and Robert A. Kinzie. 1997. "Effects of Ultraviolet Radiation on Photosynthesis in the Subtropical Marine Diatom, *Chaetoceros Gracilis* (Bacillariophyceae)." *Journal of Phycology* 33 (6): 960–68. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00960.x>.
- Henry, Brianne E., and Kathryn L. Van Alstyne. 2004. "Effects of UV Radiation on Growth and Phlorotannins in *Fucus Gardneri* (Phaeophyceae) Juveniles and Embryos." *Journal of Phycology* 40 (3): 527–33. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03103.x>.
- Herman, J. R., N. Krotkov, E. Celarier, D. Larko, and G. Labow. 1999. "Distribution of UV Radiation at the Earth's Surface from TOMS-Measured UV-Backscattered Radiances." *Journal of Geophysical Research Atmospheres* 104 (D10): 12059–76. <https://doi.org/10.1029/1999JD900062>.
- Holzinger, Andreas, and Cornelius Lütz. 2006. "Algae and UV Irradiation: Effects on Ultrastructure and Related Metabolic Functions." *Micron* 37 (3): 190–207.
- Hörning, Marcel, Andreas Schertel, Ralf Schneider, Marie Louise Lemloh, Michael R. Schweikert, and Ingrid M. Weiss. 2020. "Mineralized Scale Patterns on the Cell Periphery of the Chrysophyte *Mallomonas* Determined by Comparative 3D Cryo-FIB SEM Data Processing." *Journal of Structural Biology* 209 (1): 107403. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.10.005>.
- Jeffrey, SW, HS MacTavish, WC Dunlap, M Vesk, and K Groenewoud. 1999. "Occurrence of UVA- and UVB-Absorbing Compounds in 152 Species (206 Strains) of Marine Microalgae." *Marine Ecology Progress Series* 189 (1992): 35–51. <https://doi.org/10.3354/meps189035>.
- Jeong, Minseok, Jong Im Kim, Bok Yeon Jo, Han Soon Kim, Peter A. Siver, and Woongghi Shin. 2019. "Surviving the Marine Environment: Two New Species of *Mallomonas* (Synurophyceae)." *Phycologia* 58 (3): 276–86. <https://doi.org/10.1080/00318884.2019.1565718>.
- Kang, Soohyun, Yating Zhang, Yuqi Zhang, Jie Zou, Qichang Yang, and Tao Li. 2018. "Ultraviolet-a Radiation Stimulates Growth of Indoor Cultivated Tomato (*Solanum Lycopersicum*) Seedlings." *HortScience* 53 (10): 1429–33. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13347-18>.

- Karentz, Deneb, James E. Cleaver, and David L. Mitchell. 1991. "Cell Survival Characteristics and Molecular Responses of Antarctic Phytoplankton To Ultraviolet-B Radiation." *Journal of Phycology*. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00326.x>.
- Kerr, J. B., and Vitali E. Fioletov. 2008. "Surface Ultraviolet Radiation." *Atmosphere - Ocean* 46 (1): 159–84. <https://doi.org/10.3137/ao.460108>.
- Kirk, John T O. 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge university press.
- Kitajima, MBWL, and W L Butler. 1975. "Quenching of Chlorophyll Fluorescence and Primary Photochemistry in Chloroplasts by Dibromothymoquinone." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 376 (1): 105–15.
- Kitamura, Rei, and Pilon Laurent. 2007. "Optical Constants of Silica Glass from Extreme Ultraviolet to Far Infrared at near Room Temperature." *Applied Optics* 46 (33). <https://escholarship.org/uc/item/3w1982rh>.
- Kitzing, Christine, and Ulf Karsten. 2015. "Effects of UV Radiation on Optimum Quantum Yield and Sunscreen Contents in Members of the Genera *Interfilum*, *Klebsormidium*, *Hormidiella* and *Entransia* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta)." *European Journal of Phycology* 50 (3): 279–87. <https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1031190>.
- Kondo, Shigeru. 2017. "An Updated Kernel-Based Turing Model for Studying the Mechanisms of Biological Pattern Formation." *Journal of Theoretical Biology* 414 (November 2016): 120–27. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.11.003>.
- Kooistra, Wiebe H. C. F., and Göran Pohl. 2015. "Diatom Frustule Morphology and Its Biomimetic Applications in Architecture and Industrial Design." In , 75–102. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9398-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9398-8_5).
- Kristiansen, Jørgen, and Š Pavel. 2017. *Handbook of the Protists. Handbook of the Protists*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6>.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lahr, Daniel J.G., Haywood Dail Laughinghouse, Angela M. Oliverio, Feng Gao, and Laura A. Katz. 2014. "How Discordant Morphological and Molecular Evolution among Microorganisms Can Revise Our Notions of Biodiversity on Earth." *BioEssays* 36 (10): 950–59. <https://doi.org/10.1002/bies.201400056>.
- Lavau, S., and R. Wetherbee. 1994. "Structure and Development of the Scale Case of *Mallomonas Adamas* (Synurophyceae)." *Protoplasma* 181 (1–4): 259–68. <https://doi.org/10.1007/BF01666400>.

- Leadbeater, Barry S.C. 1990. "Ultrastructure and Assembly of the Scale Case in *Synura* (Synurophyceae andersen)." *British Phycological Journal* 25 (2): 117–32. <https://doi.org/10.1080/00071619000650111>.
- Leblanc, Karine, Véronique Cornet, Justine Legras, and Augustin Lafond. 2022. "MIO Plankton Images." Mediterranean Institute of Oceanography. 2022. <https://plankton.mio.osupytheas.fr>.
- Lehman, Joel, and Kenneth O. Stanley. 2011. "Evolving a Diversity of Creatures through Novelty Search and Local Competition." *Genetic and Evolutionary Computation Conference, GECCO'11*, 211–18. <https://doi.org/10.1145/2001576.2001606>.
- Li, Gang, Kunshan Gao, and Guang Gao. 2011. "Differential Impacts of Solar UV Radiation on Photosynthetic Carbon Fixation from the Coastal to Offshore Surface Waters in the South China Sea." *Photochemistry and Photobiology* 87 (2): 329–34. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00862.x>.
- Losic, Dusan, James G. Mitchell, and Nicolas H. Voelcker. 2009. "Diatomaceous Lessons in Nanotechnology and Advanced Materials." *Advanced Materials* 21 (29): 2947–58. <https://doi.org/10.1002/adma.200803778>.
- Lu, Jie, Cheng Sun, and Q. Jane Wang. 2015. "Mechanical Simulation of a Diatom Frustule Structure." *Journal of Bionic Engineering* 12 (1): 98–108. [https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(14\)60104-9](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(14)60104-9).
- Ludwig, Martha, JanL. Lind, ElizabethA. Miller, and Richard Wetherbee. 1996. "High Molecular Mass Glycoproteins Associated with the Siliceous Scales and Bristles of *Mallomonas Splendens* (Synurophyceae) May Be Involved in Cell Surface Development and Maintenance." *Planta* 199 (2): 219–28. <https://doi.org/10.1007/BF00196562>.
- Maxwell, Kate, and Giles N Johnson. 2000. "Chlorophyll Fluorescence—a Practical Guide." *Journal of Experimental Botany* 51 (345): 659–68.
- "MES Wash Buffer." 2015. *Cold Spring Harbor Protocols* 2015 (10): pdb.rec088500. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec088500>.
- Michels, Jan, Jürgen Vogt, and Stanislav N. Gorb. 2012. "Tools for Crushing Diatoms - Opal Teeth in Copepods Feature a Rubber-like Bearing Composed of Resilin." *Scientific Reports* 2: 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep00465>.
- Mignot, Jean Pierre, and Guy Brugerolle. 1982. "Scale Formation in Chrysomonad Flagellates." *Journal of Ultrastructure Research* 81(1):13–26 [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(82\)90037-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(82)90037-5).
- Milligan, Allen J., and François M.M. Morel. 2002. "A Proton Buffering Role for Silica in Diatoms." *Science* 297 (5588): 1848–50. <https://doi.org/10.1126/science.1074958>.



- Mönnich, Julian, Jan Tebben, Jennifer Bergemann, Rebecca Case, Sylke Wohlrab, and Tilmann Harder. 2020. “Niche-Based Assembly of Bacterial Consortia on the Diatom *Thalassiosira rotula* Is Stable and Reproducible.” *The ISME Journal* 14 (6): 1614–25. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0631-5>.
- Monteiro, Fanny M., Lennart T. Bach, Colin Brownlee, Paul Bown, Rosalind E.M. Rickaby, Alex J. Poulton, Toby Tyrrell, et al. 2016. “Why Marine Phytoplankton Calcify.” *Science Advances* 2 (7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501822>.
- Munch, C. S. 1980. “Fossil Diatoms and Scales of Chrysophyceae in the Recent History of Hall Lake, Washington.” *Freshwater Biology* 10 (1): 61–66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1980.tb01180.x>.
- Němcová Yvonne. 2000. “Ultrastruktura a taxonomie vybraných skupin řas”, 136 pp. Disertační práce – depon. in: Knihovna katedry botaniky PřF UK, Benátská 2, Praha2.
- Němcová, Yvonne. 2014. “Synthesis of Metallic Nanoparticles by Silica Based Algae – Outline , Prospect Synthesis of Metallic Nanoparticles by Diatoms – Prospects and Applications,” no. March 2018.
- Němcová, Yvonne (n.d.) Silica-scaled chrysophytes of Europe. 5th April 2022. <https://chrysophytes.eu>
- Němcová, Yvonne, and Martina Pichrtová. 2012. “Shape Dynamics of Silica Scales (Chrysophyceae, Stramenopiles) Associated with PH.” *Fottea* 12 (2): 281–91. <https://doi.org/10.5507/fot.2012.020>.
- Neustupa, Jiří, and Yvonne Němcová. 2007. “A Geometric Morphometric Study of the Variation in Scales of *Mallomonas striata* (Synurophyceae, Heterokontophyta).” *Phycologia* 46 (2): 123–30. <https://doi.org/10.2216/05-61.1>.
- Nimer, Nabil A., Miao Xiao Ling, Colin Brownlee, and Michael J. Merrett. 1999. “Inorganic Carbon Limitation, Exofacial Carbonic Anhydrase Activity, and Plasma Membrane Redox Activity in Marine Phytoplankton Species.” *Journal of Phycology* 35 (6): 1200–1205. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3561200.x>.
- Noyes, Joseph, Manfred Sumper, and Pete Vukusic. 2008. “Light Manipulation in a Marine Diatom.” *Journal of Materials Research* 23 (12): 3229–35. <https://doi.org/10.1557/JMR.2008.0381>.
- Ouyang, Q, and Harry L Swinney. 1991. “Transition from a Uniform State to Hexagonal and Striped Turing Patterns.” *Nature* 352 (6336): 610–12. <https://doi.org/10.1038/352610a0>.
- Pappas, Janice L. 2005. “Geometry and Topology of Diatom Shape and Surface Morphogenesis for Use in Applications of Nanotechnology.” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 5 (1): 120–30. <https://doi.org/10.1166/jnn.2005.009>.

- Qin, Tian, Timothy Gutu, Jun Jiao, Chih Hung Chang, and Gregory L. Rorrer. 2008. "Photoluminescence of Silica Nanostructures from Bioreactor Culture of Marine Diatom *Nitzschia Frustulum*." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 8 (5): 2392–98. <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.241>.
- R Core Team. 2021. "R: A Language and Environment for Statistical Computing." Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
- Rai, Lal Chand, and Jai Prakash Gaur, eds. 2001. *Algal Adaptation to Environmental Stresses*. *Algal Adaptation to Environmental Stresses*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59491-5>.
- Raven, J. A., and M. Giordano. 2009. "Biomineralization by Photosynthetic Organisms: Evidence of Coevolution of the Organisms and Their Environment?" *Geobiology* 7 (2): 140–54. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00181.x>.
- Reid, G. C., I. S. A. Isaksen, T. E. Holzer, and P. J. Crutzen. 1976. "Influence of Ancient Solar-Proton Events on the Evolution of Life." *Nature* 259 (5540): 177–79. <https://doi.org/10.1038/259177a0>.
- Reynolds, Colin S. 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Řezáčová, Magda. 2006. "Mallomonas Kalinae (Synurophyceae), a New Species of Alga from Northern Bohemia, Czech Republic." *Preslia* 78 (3): 353–58.
- Rice, E W, L Bridgewater, American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. <https://books.google.cz/books?id=dd2juAAACAAJ>.
- Romann, Julien, Jean Christophe Valmalette, Matilde Skogen Chauton, Gabriella Tranell, Mari Ann Einarsrud, and Olav Vadstein. 2015. "Wavelength and Orientation Dependent Capture of Light by Diatom Frustule Nanostructures." *Scientific Reports* 5 (7491): 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep17403>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539-542.
- Sandgren, Craig D, and S B Barlow. 1989. "Siliceous Scale Production in Chrysophyte Algae. II. SEM Observations Regarding the Effects of Metabolic Inhibitors on Scale Regeneration in Laboratory Population of Scale-Free *Synura Petersenii* Cells." *Nova Hedwigia* 95: 27–44.

- Sandgren, Craig D, and William E Walton. 1995. "The Influence of Zooplankton Herbivory on the Biogeography of Chrysophyte Algae." In *Chrysophyte Algae: Ecology, Phylogeny and Development*, edited by Craig D Sandgren, J P Smol, and J.Editors Kristiansen, 269–302. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511752292.013>.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. "Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis." *Nature Methods* 9 (7): 676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Seppälä, Jukka, and Maija Balode. 1997. "The Use of Spectral Fluorescence Methods to Detect Changes in the Phytoplankton Community." *Hydrobiologia* 363: 207–17. <https://doi.org/10.1023/A:1003129906730>.
- Siver, Peter A., B. Y. Jo, J. I. Kim, W. Shin, A. M. Lott, and A. P. Wolfe. 2015. "Assessing the Evolutionary History of the Class Synurophyceae (Heterokonta) Using Molecular, Morphometric, and Paleobiological Approaches." *American Journal of Botany* 102 (6): 921–41. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500004>.
- Siver, Peter A. 1991. *The Biology of Mallomonas*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-3376-0>.
- Siver, Peter A., and John R. Glew. 1990. "The Arrangement of Scales and Bristles on Mallomonas (Chrysophyceae): A Proposed Mechanism for the Formation of the Cell Covering ." *Canadian Journal of Botany* 68 (2): 374–80. <https://doi.org/10.1139/b90-049>.
- Siver, Peter A., and Josephine S. Hamer. 1990. "Use of Extant Populations of Scaled Chrysophytes for the Inference of Lakewater PH."
- Siver, Peter A., and Laurence J. Marsicano. 1996. "Inferring Lake Trophic Status Using Scaled Chrysophytes."
- Siver, Peter A., and John P. Smol. n.d. "The Use of Scaled Chrysophytes in Long Term Monitoring Programs for the Detection of Changes in Lakewater Acidity."
- Smetacek, V. 2001. "A Watery Arms Race." *Nature* 411 (6839): 745. <https://doi.org/10.1038/35081210>.
- Smith, R. C., B. B. Prézelin, K. S. Baker, R. R. Bidigare, N. P. Boucher, T. Coley, D. Karentz, et al. 1992. "Ozone Depletion: Ultraviolet Radiation and Phytoplankton Biology in Antarctic Waters." *Science* 255 (5047): 952–59. <https://doi.org/10.1126/science.1546292>.
- Smol, John P. 1984. "The Statospore of Mallomonas Pseudocoronata (Mallomonadaceae, Chrysophyceae)." *Nordic Journal of Botany* 4 (6): 827–31. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1984.tb02014.x>.

- Sonnenfeld, Peter. 1978. "Effects of a Variable Sun at the Beginning of the Cenozoic Era." *Climatic Change* 1 (4): 309--352. <https://doi.org/10.1007/BF00135156>.
- Sprouffske, Kathleen, and Andreas Wagner. 2016. "Growthcurver: An R Package for Obtaining Interpretable Metrics from Microbial Growth Curves." *BMC Bioinformatics* 17 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1016-7>.
- Stefano, Luca De, Ilaria Rea, Ivo Rendina, Mario De Stefano, and Luigi Moretti. 2007. "Lensless Light Focusing with the Centric Marine Diatom *Coscinodiscus Walesii*." *Optics Express* 15 (26): 18082. <https://doi.org/10.1364/oe.15.018082>.
- Stevens, Peter S. 1974. *Patterns In Nature*. Vol. 112. Little Brown and Company.
- Su, Yanyan, Torben A. Lenau, Emil Gundersen, Jacob J.K. Kirkensgaard, Christian Maibohm, Jérôme Pinti, and Marianne Ellegaard. 2018. "The UV Filtering Potential of Drop-Casted Layers of Frustules of Three Diatom Species." *Scientific Reports* 8 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19596-4>.
- Subhash, G., S. Yao, B. Bellinger, and M. R. Gretz. 2005. "Investigation of Mechanical Properties of Diatom Frustules Using Nanoindentation." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 5 (1): 50–56. <https://doi.org/10.1166/jnn.2005.006>.
- Sumper, Manfred. 2002. "A Phase Separation Model for the Nanopatterning of Diatom Biosilica." *Science* 295 (5564): 2430–33. <https://doi.org/10.1126/science.1070026>.
- Takahashi, Eiji. 1973. "Studies on Genera *Mallomonas* and *Synura*, and Other Plankton in Freshwater with the Electron Microscope - VII. New Genus *Spiniferomonas* of the Synuraceae (Chrysophyceae)." *The Botanical Magazine Tokyo* 86 (2): 75–88. <https://doi.org/10.1007/BF02488517>.
- Takahashi, Kazuya, and Richard W Jordan. 2013. "Synurophytes Lakes Ponds Kenmin-No-Mori, Japan," no. September.
- "TES Buffer." 2017. *Cold Spring Harbor Protocols* 2017 (4): pdb.rec093245. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec093245>.
- Thompson, D. W., 1917. *On Growth and Form*. Cambridge University Press.
- Tirlapur, Uday, Robert Scheuerlein, and Donat-P Häder. 1993. "Motility and Orientation of a Dinoflagellate, *Gymnodinium*, Impaired by Solar and Ultraviolet Radiation." *FEMS Microbiology Ecology* 11 (3–4): 167–74.
- Tommasi, Edoardo De. 2016. "Light Manipulation by Single Cells: The Case of Diatoms." *Journal of Spectroscopy* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2490128>.

- Tommasi, Edoardo De, Roberta Congestri, Principia Dardano, Anna Chiara De Luca, Stefano Managò, Ilaria Rea, and Mario De Stefano. 2018. “UV-Shielding and Wavelength Conversion by Centric Diatom Nanopatterned Frustules.” *Scientific Reports* 8 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34651-w>.
- Tommasi, Edoardo De, Roberta Congestri, Principia Dardano, Anna Chiara De Luca, Stefano Managò, Ilaria Rea, and Mario De Stefano. 2018. “UV-Shielding and Wavelength Conversion by Centric Diatom Nanopatterned Frustules,” no. October: 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34651-w>.
- Tommasi, Edoardo De, Ilaria Rea, Maria Antonietta Ferrara, Luca De Stefano, Mario De Stefano, Adil Y. Al-Handal, Marija Stamenković, and Angela Wulff. 2021. “Underwater Light Manipulation by the Benthic Diatom Ctenophora Pulchella: From Par Efficient Collection to Uvr Screening.” *Nanomaterials* 11 (11). <https://doi.org/10.3390/nano11112855>.
- Topal, Emre, Hariskaran Rajendran, Izabela Zgłobicka, Jürgen Gluch, Zhongquan Liao, André Clausner, Krzysztof Jan Kurzydłowski, and Ehrenfried Zschech. 2020. “Numerical and Experimental Study of the Mechanical Response of Diatom Frustules.” *Nanomaterials* 10 (5): 1–14. <https://doi.org/10.3390/nano10050959>.
- Tripp, B. C., and J. G. Ferry. 2000. “A Structure-Function Study of a Proton Transport Pathway in the  $\gamma$ -Class Carbonic Anhydrase from *Methanosarcina Thermophila*.” *Biochemistry* 39 (31): 9232–40. <https://doi.org/10.1021/bi0001877>.
- Turing, A M. 1952. “The Chemical Basis of Morphogenesis.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 237 (641): 37–72. <https://doi.org/10.1098/rstb.1952.0012>.
- Vaz, Raquel, Manuela F. Frasco, and M. Goreti F. Sales. 2020. “Photonics in Nature and Bioinspired Designs: Sustainable Approaches for a Colourful World.” *Nanoscale Advances* 2 (11): 5106–29. <https://doi.org/10.1039/d0na00445f>.
- Vigna, M. S. 1990. “Silica-Scaled, Subtropical Chrysophytes from the Uruguay River, Argentina.” *Phycologia* 29 (4): 524–29. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-29-4-524.1>.
- Wada, Naoki, Toshio Sakamoto, and Seiichi Matsugo. 2015. “Mycosporine-like Amino Acids and Their Derivatives as Natural Antioxidants.” *Antioxidants* 4 (3): 603–46. <https://doi.org/10.3390/antiox4030603>.
- Wang, Lulu, Kehou Pan, Lin Zhang, Chengxu Zhou, Yun Li, Baohua Zhu, and Jichang Han. 2021. “Tentative Identification of Key Factors Determining the Hemostatic Efficiency of Diatom Frustule.” *Biomaterials Science* 9 (6): 2162–73. <https://doi.org/10.1039/d0bm02002h>.

- Waring, Jen, Graham J.C. Underwood, and Neil R. Baker. 2006. "Impact of Elevated UV-B Radiation on Photosynthetic Electron Transport, Primary Productivity and Carbon Allocation in Estuarine Epipelagic Diatoms." *Plant, Cell and Environment* 29 (4): 521–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01429.x>.
- Watson, Susan B., T. Satchwill, and Edward McCauley. 2001. "Drinking Water Taste and Odour: A Chrysophyte Perspective." *Nova Hedwigia Beiheft* 122: 119–146.
- Watson, Susan B., and Trevor Satchwill. 2003. "Chrysophyte Odour Production: Resource-Mediated Changes at the Cell and Population Levels." *Phycologia* 42 (4): 393–405. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-42-4-393.1>.
- Whyte, Lancelot Law. 1965. *Internal Factors in Evolution*. G. Braziller.
- Wickham, Hadley. 2016. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wolfgang, Wickler,, Martin, R. D. 1968. *Mimicry in Plants and Animals*. New York: McGraw-Hill.
- Wujek, Daniel E., and Jørgen Kristiansen. 1978. "Observations on Bristle- and Scale-Production in *Mallomonas Caudata* (Chrysophyceae)." *Archiv Fur Protistenkunde* 120 (1–2): 213–21. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(78\)80024-4](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(78)80024-4).
- Xu, Juntian, and Kunshan Gao. 2010. "Use of UV-A Energy for Photosynthesis in the Red Macroalga *Gracilaria Lemaneiformis*." *Photochemistry and Photobiology* 86 (3): 580–85.
- Young, J.R., Bown P.R., Lees J.A. (n.d.) Nannotax3 website. 5th April 2022. <https://www.mikrotax.org/Nannotax3/>
- Zachleder, Vilém, Kateřina Bišová, and Milada Vítová. 2016. "The Cell Cycle of Microalgae." In *The Physiology of Microalgae*, 3–46. Springer.
- Zudaire, Laurent, and Suzanne Roy. 2001. "Photoprotection and Long-Term Acclimation to UV Radiation in the Marine Diatom *Thalassiosira Weissflogii*." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 62 (1–2): 26–34. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00150-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00150-6).

## 7 Přílohy

- **Příloha 1** – Tabulka AUC hodnot pro UVA experiment (UVA\_AUC.csv)
- **Příloha 2** – Tabulka AUC hodnot pro UVB experiment (UVB\_AUC.csv)
- **Příloha 3** – Tabulka QYmax hodnot pro UVA experiment (UVA\_QYmax.csv)
- **Příloha 4** – Tabulka QYmax hodnot pro UVB experiment (UVB\_QYmax.csv)
- **Příloha 5** – Růstové křivky jednotlivých opakování pro UVA experiment (UVA\_AUC-křivky.pdf)
- **Příloha 6** – Růstové křivky jednotlivých opakování pro UVB experiment (UVB\_AUC-křivky.pdf)

Veškeré přílohy lze zobrazit na odkazu: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6470707>