

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

Studijní program: Učitelství biologie pro střední školy (N0114A300109)

Studijní obor: UN-B (0114TA300109)



**Bc. Adéla Čečmanová**

**Mikromorfologie segmentů středomořského druhu  
*Halimeda tuna* ve vztahu k jejich kalcifikaci uhličitánem  
vápenatým**

**Micromorphology of segments in *Halimeda tuna* and  
their relation to calcium carbonate precipitation**

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel: prof. RNDr, Jiří Neustupa, Ph.D.

Praha, 2022

## **Prohlášení**

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

V Praze, 11.08.2022

Bc. Adéla Čechmanová

## **Poděkování**

Děkuji především svému skvělému školiteli Jiřímu Neustupovi za jeho přístup a za pomoc jak s praktickou částí, tak s následným psaní práce. Také bych ráda poděkovala Vendule Lužné za podporu při psaní této diplomové práce.

# Abstrakt

Řasy rodu *Halimeda* jsou významní zástupci zelených řas, a to díky své schopnosti kalcifikovat. Kalcifikace je proces precipitace  $\text{CaCO}_3$  ve formě aragonitu nebo kalcitu, který se posléze ukládá na dně moří a podílí se tak na tvorbě sedimentárních hornin. O kalcifikaci u zástupců rodu *Halimeda* je známo poměrně malé množství informací, a to zejména o jeho následném ukládání či rozložení v rámci rostliny. Jedním ze zástupců kalcifikujících řas je *Halimeda tuna* žijící ve Středozezemním moři, kde zde tvoří nemalou část podmořské vegetace. Tyto řasy mají stélku složenou ze segmentů, jejichž vnitřní strukturu tvoří útvary zvané utrikuly – právě v nich se ukládá aragonit.

Moje práce si kladla za cíl zjistit, zda rozdílné velikosti utrikulů v rámci jednoho segmentu mají vliv i na následné rozložení aragonitu. Výsledky ukázaly, že rozložení mikrokrystalů aragonitu není závislé na velikosti utrikulů – je tedy rozprostřen rovnoměrně napříč segmentem. Dále jsme zkoumali, zda se proces kalcifikace bude lišit v závislosti na čase odběru v rámci roku. Z našich dat se zdá, že tento proces vykazuje určitou sezonalitu. Nejmenší míra kalcifikace byla pozorovaná v říjnu, největší v červnu. Zároveň jsme potvrdili předchozí zjištění naší laboratoře týkající se gradientu velikosti utrikulů. Výsledky této práce mohou sloužit jako podklad pro další bádání.

**Klíčová slova:** *Halimeda*, kalcifikující řasy, segment, utrikuly, aragonit

# Abstract

Algae of the genus *Halimeda* are important representatives of green algae, thanks to their ability to calcify. Calcification is the process of  $\text{CaCO}_3$  precipitation in the form of aragonite or calcite, which is then deposited on the bottom of the sea and thus participates in the formation of sedimentary rocks. Relatively small amount of information is known about calcification in representatives of the genus *Halimeda*, and in particular about its storage and distribution within the plant. One of the representatives of calcifying algae is *Halimeda tuna* living in the Mediterranean Sea, where it forms a significant part of the underwater vegetation. These algae have a thallus composed of segments, the internal structure of which is formed by utricles – a structure in which the aragonite is deposited.

The aim of this work was to find out whether the different sizes of utricles within one segment have an effect on the subsequent spatial distribution of aragonite. The results showed that the distribution of aragonite microcrystals is not dependent on the size of the utricles – it is therefore equally spread across the segment. Furthermore, we investigated whether the calcification process would differ depending on the time of sampling during the year. From our data it appears that this process exhibits some seasonality. The smallest amount of calcification was observed in October, the largest in June. At the same time, we confirmed our laboratory's previous findings regarding the utricle size gradient. This work can serve as a ground for further research.

**Key words:** *Halimeda*, calcifying algae, segment, utricles, aragonite

# Obsah

<b>1</b>	<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Taxonomie rodu <i>Halimeda</i></b> .....	<b>10</b>
<b>3.2</b>	<b>Morfologická struktura</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3</b>	<b>Ekologie</b> .....	<b>13</b>
3.3.1	Autoekologie.....	13
3.3.2	Rozmnožování.....	15
3.3.3	Kryptické druhy.....	16
<b>3.4</b>	<b>Geologický význam</b> .....	<b>16</b>
<b>3.5</b>	<b><i>Halimeda tuna</i> ve Středoze­mním moři</b> .....	<b>17</b>
3.5.1	Fylogeografie druhu <i>Halimeda tuna</i> ve Středoze­mním moři.....	17
3.5.2	Růst a produkce druhu <i>Halimeda tuna</i> ve Středoze­mním moři.....	18
<b>3.6</b>	<b>Epifytické organismy rostoucí na <i>Halimeda tuna</i></b> .....	<b>19</b>
<b>3.7</b>	<b>Kalcifikace segmentů u rodu <i>Halimeda</i></b> .....	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1</b>	<b>Odběr vzorků</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2</b>	<b>Mikrofotografie struktury segmentů</b> .....	<b>28</b>
<b>5.3</b>	<b>Sušení segmentů</b> .....	<b>29</b>
<b>5.4</b>	<b>Zpracování vzorků</b> .....	<b>29</b>
<b>5.5</b>	<b>Měření velikosti utrikulů</b> .....	<b>30</b>
<b>5.6</b>	<b>Statistická analýza</b> .....	<b>30</b>
3.6.1	Analýza obsahu CaCO <sub>3</sub> jednotlivých částí segmentů.....	30
3.6.2	Analýza velikostí utrikulů jednotlivých částí segmentů.....	31
<b>6</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>32</b>

<b>6.1</b>	<b>Množství CaCO<sub>3</sub> .....</b>	<b>32</b>
<b>6.2</b>	<b>Velikost utrikulů .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>46</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>47</b>

# 1 Seznam zkratek

$\text{Ca}^{2+}$	Vápník
$\text{CaCO}_3$	Uhličitan vápenatý
$\text{CO}_2$	Oxid uhličitý
$\text{CO}_3^{2-}$	Trioxid uhlíku
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
$\text{H}_2\text{O}$	Voda
HCl	Kyselina chlorovodíková
$\text{HCO}_3$	Hydrogenuhličitan
tufA	Translační elongační faktor Tu 1 (translation elongation factor Tu 1)



## 2 Úvod

Zelené řasy hrají důležitou roli v celém ekosystému. Kromě spotřebovávání uhlíku a produkce kyslíku na Zemi, tvoří také značnou část podmořské vegetace, která slouží např. jako úkryt nebo potrava pro živočichy. Makroskopické mořské zelené řasy, jakási obdoba suchozemských bylin, mohou tvořit podvodní louky. Jejich tělo se však na rozdíl od terestrických rostlin nazývá thallus. Jednou z takových řas jsou i ty z rodu *Halimeda*, jejichž thallus je tvořen jednotlivými segmenty. Zástupci tohoto rodu jsou v ekosystémech nepostradatelní, a to především kvůli jejich schopnosti ukládat uhlík v jeho anorganické formě. Tato vlastnost je klíčová, nejen kvůli udržování stabilního množství uhlíku na Zemi, ale i tvorbě vápencových hornin. Ty vznikají tzv. kalcifikací, což je proces přeměny  $\text{CO}_2$  na  $\text{CaCO}_3$  ve formě aragonitu.

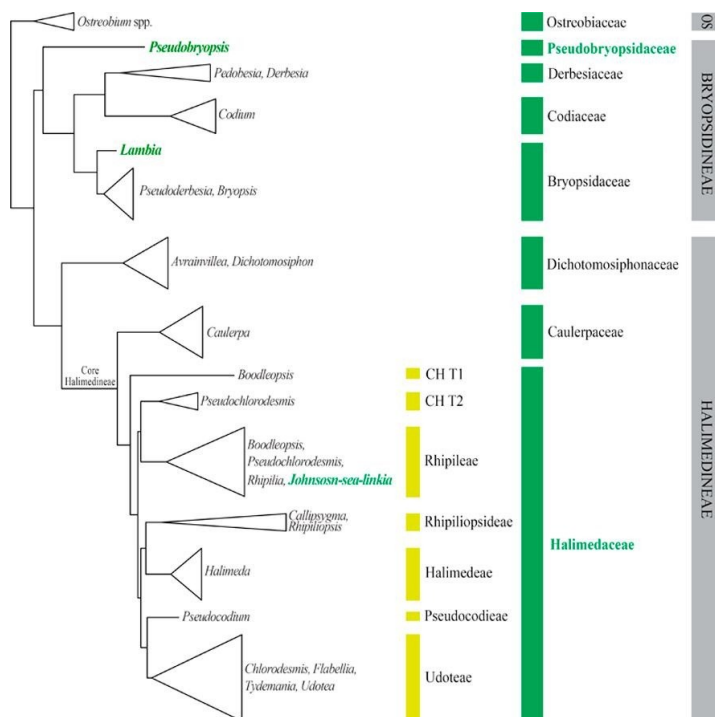
O celém průběhu kalcifikace, a především o její míře u rodu *Halimeda* je známo poměrně málo informací. Tato diplomová práce se zabývá detailně řasou *Halimeda tuna*, u níž byl sice vznik aragonitu obecně popsán již na konci 20. století, ale jeho následné ukládání nebo konečné rozložení nebylo dosud zkoumáno.

Předkládaná práce vychází z nedávné studie naší laboratoře, která se zabývala vnitřní strukturou segmentů u druhu *H. tuna*, a především velikostí tzv. povrchových utrikulů. To jsou ztluštěniny na okrajích jednotlivých segmentů, které u *H. tuna* utváří obdobu epidermis. Díky tomu, že známe stavbu segmentu, můžeme nyní dále navázat výzkumem zaměřujícím se na ukládání  $\text{CaCO}_3$  v rámci jednoho segmentu.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Taxonomie rodu *Halimeda*

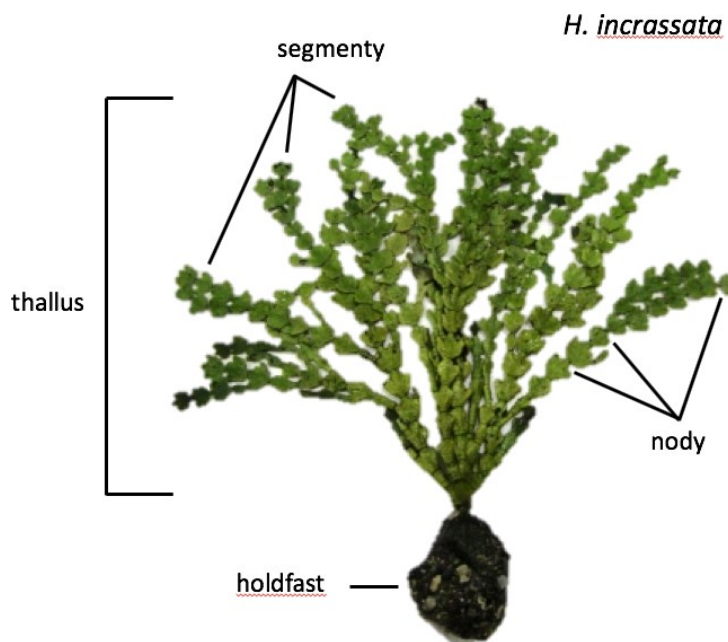
Zelené řasy rodu *Halimeda* se řadí do čeledi Halimedaceae, patřící do řádu Bryopsidales a třídy Ulvophyceae, která patří do chlorofytní větve zelených rostlin. Řád Bryopsidales se dříve členil na 8 čeledí (Udoteaceae, Pseudocodiaceae, Halimedaceae, Caulerpaceae, Dichotomosiphonaceae, Bryopsidaceae, Codiaceae, Derbesiaceae) (Lam & Zechman, 2006). S cílem blíže pochopit diverzitu řas na molekulární úrovni a upřesnit jejich taxonomické rozdělení byla provedena řada studií zaměřující se například na evoluci chloroplastových genomů (Cremen *et al.*, 2018). Z nich velmi důležitá byla studie provedená v roce 2019, kde vědci posoudili nejenom fylogenezi řádů pomocí chloroplastových genomů, ale také osekvenovali 32 nových, díky čemuž zvýšili množství vzorků a měli dobrou podporu pro zkoumání hlavních linií. Díky takto velkému souboru dat přinesli několik nových pohledů na fylogenetickou historii Bryopsidales a navrhnou nový klasifikační systém (viz. obrázek č.1), který je nyní obecně přijímaný jako platný. Čeď Halimedaceae tak nyní obsahuje 7 linií, kde linií 5 tvoří podrod Halimedeae, která zahrnuje 50 druhů včetně druhu *Halimeda tuna*, která je předmětem této diplomové práce (Cremen *et al.*, 2019, [www.algeabase.org](http://www.algeabase.org))



Obrázek č. 1: Návrh nového klasifikačního systému (podle Cremen *et al.*, 2019).

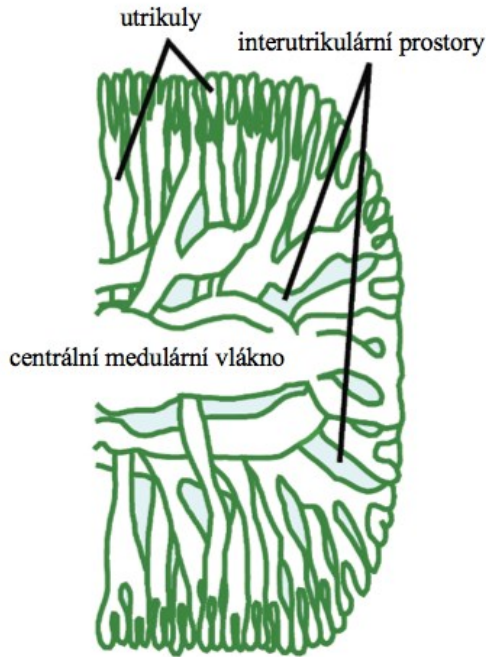
## 3.2 Morfologická struktura

Řasy rodu *Halimeda* mají sifonální neboli vláknitý typ stélky. Stélka neboli thallus je připevněna k povrchu pomocí propletených, též sifonálních vláken, která se nazývají holdfast. Thallus se skládá z vegetativních kalcifikovaných segmentů, které spojují nody (uzly), těmi prochází vlákna (viz. Obrázek č. 2). Ta jsou základní stavební jednotkou celé rostliny. Osu těla tvoří centrální medulární vlákno, které se dále větví. Sifonální typ vláken, který je charakteristickým znakem rodu *Halimeda*, neobsahuje v jednotlivých vláknech příčné stěny, které by rozdělovaly vlákna na samostatné buňky (Verbruggen *et al.*, 2009).



**Obrázek č. 2:** Stavba stélky řasy *H. incrassata* (upraveno podle: <https://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metas/view/23924>).

Vnitřní strukturu jednotlivých segmentů tvoří již zmiňovaná vlákna. Z hlavního medulárního vlákna vybočují vlákna postranní, které tvoří ztlustěninu neboli utrikuly. Na svých koncích vytváří krátké ztlustěninu neboli primární utrikuly, které na okrajích segmentu vytváří obdoby epidermis. Na primární navazují směrem dovnitř segmentu sekundární, a nakonec terciární utrikuly. Mezi jednotlivými utrikuly se tvoří tzv. intercelulární prostor, kam se ukládá aragonit ( $\text{CaCO}_3$ ), který vzniká procesem kalcifikace (viz. Obrázek č. 3) (Hillis-Colinvaux, 1980).



**Obrázek č. 3:** Příčný řez segmentem řasy rodu *Halimeda* (upraveno podle Stanley *et al.*, 2010).

U sifonálního typu stélky se stále zkoumá, kdy vlastně během evolučního vývoje třídy Ulvophyceae vznikl. Předpokládalo se, že celá čeleď Halimedaceae se vyvinula z jedné ze 3 linií Bryopsidales, nazývané Protohalimedaceae, která byla charakteristická mnohočetnými medulárními vlákny. Čeleď se z linie měla vyvinout ve druhé polovině permu (prvohory) a diverzifikovat se v průběhu kenozoika (druhohory) (Dragastan & Schlagintweit, 2005). Nicméně podle studie z roku 2009 nejsou vztahy mezi fosilními taxony a liniemi ve fylogenezi existujících taxonů evidentní. Halimedaceae se sice vyvíjeli v období permu, ale samotná kalcifikace, která je především pro rod *Halimeda* specifická, se dříve podle výsledků v žádných záznamech řádu Bryopsidales nevyskytovala. Ze studie dále vyplývá, že vnitřní struktura stélky byla až do pozdního paleozoika poměrně jednoduchá. Zdá se, že složitější stélka složená z medulárních vláken a kůry se vyvinula několikrát nezávisle na sobě až v období permu a triasu (druhohory) (Verbruggen *et al.*, 2009b). Zda byla tedy linie Protohalimedaceae předkem v současnosti známé čeledi Halimedaceae se zatím neví, ale na základě této studie to vypadá, že bylo původní rozdělení na 3 linie chybné.

Morfologická klasifikace stélek druhů rodu *Halimeda* se také postupem času změnila. Historicky se stélky dělily na dva typy, a to na uniaxiální a multiaxiální. První typ stélky byl charakteristický tím, že má právě jedno centrální vlákno a velmi krátký holdfast, ale tomuto typu odpovídá pouze jediný známý druh, a to *H. cryptica*. Do druhého typu, který se vyznačuje tím, že se vlákna dále větví, se řadily všechny ostatní, do té doby známé druhy *Halimeda*. Tento typ se dělil ještě na dva podtypy, které se rozlišovaly délkou holdfastu, a také podle typu substrátu, na kterém rostly (Hillis-Colinvaux, 1980). Následně vzniklo na základě molekulárně-fylogenetické analýzy rozdělení nové, odpovídající fylogenetické struktury skupiny. Toto nové rozdělení dalo vznik pěti morfologickým skupinám (sekcím) – *Rhiphalis*, *Micronesicae*, *Halimeda*, *Pseudo-Opuntia*, *Opuntia*. Každá ze skupin má své charakteristické rysy, liší se např. lokalitou, kde rostou (řasy typu *Opuntia* rostou převážně na chráněných stanovištích, kdežto řasy typu *Micronesicae* rostou spíše v místech ovlivněných vlnami). Do třetí sekce – *Halimeda* – patří mimo jiné *Halimeda tuna*, která je předmětem této diplomové práce (Verbruggen & Kooistra, 2004).

### 3.3 Ekologie

#### 3.3.1 Autoekologie

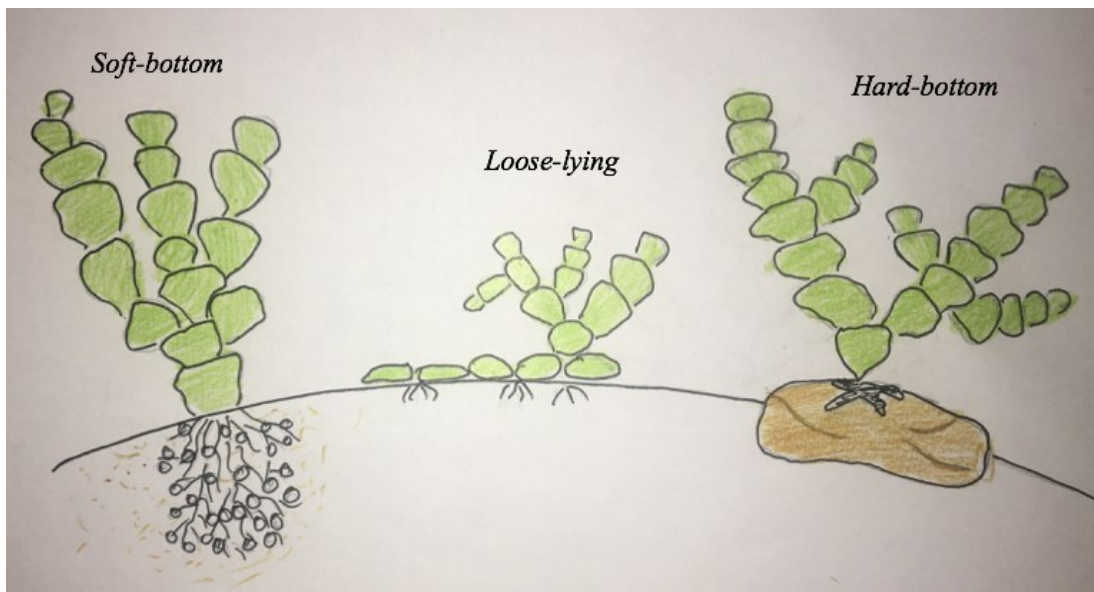
V současné době je popsáno 50 druhů v rámci rodu *Halimeda*. S tolika druhy se pojí také jejich fenotypová i ekologická rozmanitost. Řasy rodu *Halimeda* jsou ekologicky velmi úspěšné, za což vděčí bezpochyby právě své evoluční variabilitě. Vytvořily si hned tři druhy holdfastu, tedy způsobu přichycení k substrátu (viz. Obrázek č.4).

Prvním z těchto tří je tzv. typ *soft-bottom*, který se vyskytuje u zástupců, jež rostou převážně na písčitém podloží. Tento typ holdfastu je tvořen shlukem vláken, kamínků a písku a může se na první pohled zdát, že rostlina tvoří klasické kořeny cévnatých rostlin, proto se mu také říká rhizoidní. Tento „písčitý“ typ holdfastu můžeme najít např. u *H. favulosa*, *H. incrassata*, *H. monile*, *H. simulans*, *H. borneensis*, *H. cylindracea*, *H. incrassata*, *H. macroloba*, *H. melanesica*.

Druhý typ holdfastu je přizpůsobený životu na kamenech či skalách a podle svého substrátu nese název *hard-bottom*. Tento typ naopak potřebuje velmi rozvětvená vlákna, pomocí kterých se rostlina dokáže udržet na nerovném, ale pevném povrchu. Druhý typ holdfastu mají např. *H. cryptica*, *H. fragilis*, *H. micronesica*, *H. discoidea*, *H. hummii*, *H.*

*scabra*, *H. tuna*, *H. discoidea*, *H. gigas*, *H. lacunalis*, *H. macrophysa*, *H. magnidisca*, *H. taenicola*, *H. cuneata*, *H. gracilis*, *H. lacrimosa*.

Třetím, a také posledním typem holdfastu je tzv. *loose-lying*, který je velmi variabilní co se týče podloží, na kterém se potřebuje uchytit. Rostlina s takovýmto typem holdfastu může totiž vypustit vlákna v podstatě kdykoliv a z jakékoliv části rostliny. Tento univerzální typ je známý především u druhu *H. opuntia* (Hillis-Colinvaux, 1980).



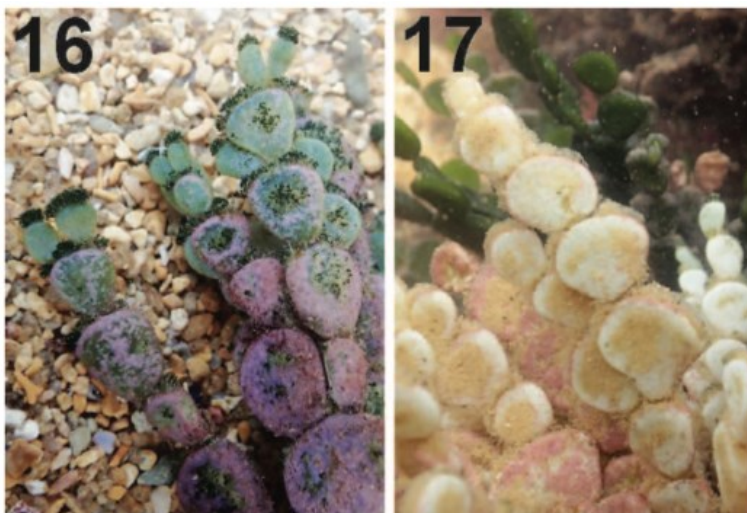
**Obrázek č. 4:** Tři typy holdfastu neboli typy přichycení rhizoidními kořeny (převzato z Čečmanová, Bakalářská práce 2020).

Halimedy se v přírodních společenstvech často vyskytují v tzv. *bioherms*, což jsou v podstatě takové podmořské louky, které jsou důležitým tropickým biotopem. Slouží především jako obrovská zásobárna  $\text{CaCO}_3$ , ale také jako úkryt či krmivo pro mnoho různých živočichů. Aktivní *bioherms*, tedy ty, které stále aktivně narůstají, byly popsány hned na několika lokalitách, jako jsou například chráněné šelfové oblasti v Jávském moři nebo v Indonésii (Roberts *et al.*, 1987a; Roberts *et al.*, 1987b; Roberts & Phipps 1988). Další z lokalit popsal Hine se svými kolegy v jihozápadním Karibiku (Hine *et al.*, 1988). Jiná zkoumaná lokalita byla na šelfech u velkého bariérového útesu, kde vědci zjišťovali, jaké množství uhličitánu vápenatého jsou tyto vodní louky schopné pojmout. Došli k závěru, že oproti dříve uváděným údajům jsou tyto *bioherms* schopny pohltit mnohem větší množství  $\text{CaCO}_3$ , než se původně předpokládalo. Dokonce podle této studie obsahují až 4x více sedimentu  $\text{CaCO}_3$  než korálové útesy v této oblasti, proto autoři upozorňují na to, aby se tyto

louky nepodceňovaly, a to především v jejich přínosu k ukládání uhlíku v jeho globálním koloběhu (Rees *et al.*, 2007).

### 3.3.2 Rozmnožování

U řas rodu *Halimeda* se setkáváme s oběma typy rozmnožování – pohlavním i vegetativním. Pohlavní rozmnožování u tohoto rodu je prozatím relativně málo prozkoumané, a to především proto, že je tento způsob rozmnožování spjat s odumřením příslušné stélky rostliny, což je pro vědce velká překážka pro jejich pozorování, protože se tím pádem halimedy tímto způsobem rozmnožují velmi zřídka, a to obvykle jen jednou za několik vegetativních generací. Samčí i samičí gamety jsou pravděpodobně morfologicky identické, jedná se tedy o rozmnožování izogamické. Tento proces zahrnuje tvorbu velkého množství dvou-bičíkatých gamet. Tyto gamety se následně uvolňují z gametangií, která jsou součástí gametoforu, ten se nachází na okrajích segmentů (viz. Obrázek č. 5). Poté gamety splývají. K samotné tvorbě gamet se využije celý mateřský protoplast, což by naznačovalo tvorbu velkého množství zygot. Bohužel o dalším osudu zygoty toho zatím není moc známo. S největší pravděpodobností klíčí, roste a vyvíjí se v prvních měsících velmi pomalu (Hillis-Colinvaux, 1980; Vroom *et al.*, 2003).



**Obrázek č. 5:** Gamety v gametoforu na okrajích segmentů (převzato z Ximenes *et al.*, 2017).

Vegetativní, též nepohlavní, způsob rozmnožování je, jak již bylo zmíněno, mnohem častější. Těchto způsobů rozmnožování je hned několik. Typické pro zástupce žijící na písčitém podloží je tzv. „vysílání běžců“. Tyto běžci jsou rhizoidní vlákna, která rostou pod



povrchem písku, což znamená, že na první pohled nejsou vidět, a proto rostliny žijící na písčitém podloží sice vypadají, jako by každá rostla samostatně, ale často tomu tak není. Nové rostlinky totiž častokrát vznikají právě z rhizoidních vláken, a tak se jedná v podstatě o jednoho jedince. Dalším způsobem vegetativního rozmnožování, který využívají řasy rostoucí např. na kamenech, je klíčení vegetativní části. Nové rostliny mohou vznikat z kousků stélek, ale také z celého segmentu (Hillis-Colinvaux, 1980; Vroom *et al.*, 2003).

### 3.3.3 Kryptické druhy

U řas rodu *Halimeda* existují tzv. kryptické druhy. Jsou to druhy, které se vyznačují tím, že dva nebo více zástupců bylo nebo stále je chybně považováno za jeden druh, protože je od sebe nelze jednoznačně morfologicky odlišit. To se povedlo až na základě genetických studií. Právě *H. tuna* je také jedním z druhů, které jsou tvořeny komplexem víceméně kryptických linií. Dříve se vědci domnívali, že je tento druh kosmopolitní, ale podle studie z roku 2005, kde byla použita molekulární data, to vypadá, že se jedná minimálně o druhy dva (Verbruggen *et al.*, 2005b). Dalším kryptickým druhem je *H. gracilis* která se měla např. u pobřeží Nové Kaledonie a Malediv vyskytovat jako jediný druh, ale po provedení studie z roku 2012 vědci zjistili, že je to komplex nejméně čtyř druhů (Dijoux *et al.*, 2012). Kryptických druhů bychom našli ještě mnohem více, jak naznačují studie např. z Andamanského moře týkající se druhů *H. borneensis*, *H. discoidea*, *H. gigas*, *H. macroloba*, *H. micronesica*, *H. minima*, *H. opuntia*, *H. renschii* a dvou druhů zatím nepopsaných (Pongparadon *et al.*, 2015) nebo druhů *H. soniae* a *H. jolyana* z brazilského pobřeží (Ximenes *et al.*, 2017; Ximenes *et al.*, 2019).

## 3.4 Geologický význam

Řasy rodu *Halimeda* kalcifikují, konkrétně pak ve svých stélkách tvoří aragonit. Jsou to tedy významní producenti vápencových hornin. Díky schopnosti kalcifikovat nacházíme jejich fosilní záznamy, díky čemuž jsou halimedy také významným geologickým zástupcem (Flügel, 1988). Fosilní záznamy můžeme potom využít ke zjišťování informací o šíření jednotlivých druhů. Toho využili vědci, kteří pomocí fosilních záznamů zjistili, jak a kdy se pravděpodobně *H. tuna* rozšířila do Středozemního moře. Pro šíření této primárně tropické řasy je nejdůležitějším faktorem teplota, čemuž nasvědčují i fosilní záznamy. Ideální teplota byla podle vědců v této oblasti zejména v první části období neogénu. Podle záznamů se v



tuto dobu směrem od rovníku rozšiřovaly i další organismy. I přesto, že se poté voda ve Středozezemním moři opět ochladila, *H. tuna* se tomuto prostředí přizpůsobila a již zde zůstala (Reuter *et al.*, 2012). Fosilní záznamy dalších zástupců rodu *Halimeda* byly získány např. z italských Dolomitů a odpovídají období svrchního triasu (Nose *et al.*, 2018). Další velmi významné naleziště halimedových sedimentů je v oblasti Maroka, které je velmi bohaté právě na pozůstatky řas z tohoto rodu z období raných třetihor. Oblast Maroka, kde se halimedy našly, je pro představu srovnatelná s dnešní oblastí podmořských luk v oblasti Velkého bariérového útesu (viz. kapitola xy). Našly se zde již záznamy z 12 taxonů staré více jak 50 miliónů let (Dragastan & Herbig, 2007).

## **3.5 *Halimeda tuna* ve Středozezemním moři**

### **3.5.1 Fylogeografie druhu *Halimeda tuna* ve Středozezemním moři**

Fylogeografie poskytuje důležitý vhled do evoluční historie různých taxonů. Odhaluje migrační cesty, vikarizační události nebo populační expanzi (Avisé, 2000). Během posledních 20 let vzniklo mnoho studií pro druhy z různých geografických oblastí, ale o původních středomořských řasách je těchto informací velmi málo, a to i přes jejich význam např. jako tzv. ekosystémových inženýrů. Několik málo těchto studií, které byly provedeny, se však zaměřily na makroskopické řasy *Caulerpa* či *Asparagopsis*, které jsou introdukované. Na původní druhy ještě do nedávna žádné takovéto studie příliš publikovány nebyly, první vlašťovky z let 2018 a 2019 byly zaměřené jen na některé části této oblasti (Bermejo *et al.*, 2018, De Jode *et al.*, 2019, Vitales *et al.*, 2019). Tento nedostatek informací je velmi zvláštní vzhledem k množství informací fylogenetických studií o středomořských rybách či bezobratlých (Rindi *et al.*, 2020).

Rod *Halimeda* je díky svému rozšíření po celém světě ovšem ideálním modelem pro studie tohoto typu. Pro mediteránní oblast je *Halimeda tuna* původním druhem, v pobřežních biotopech je v podstatě všudypřítomná a je zde velmi důležitým producentem karbonátových sedimentů. Z těchto důvodů byla v roce 2020 provedena komplexní studie, kde byla zkoumána genetická diverzita tohoto druhu ve Středozezemním moři pomocí plastidové DNA. Díky tomu se vytvořily dva pohledy na genetickou diverzitu druhu *H. tuna* v této oblasti. Pro jeden z genetických markerů (gen *tufA*) platí nízká variabilita, což dokazuje, že ve Středomoří představuje tato řasa jediný, dobře definovaný druh. U dat

získaných na základě druhého markeru (oblast pěti genů pro ribozomální proteiny a intergenové spacery tzv. oblast *rpl2-rpl14*) se ukázala separace mezi populacemi západního a východního pobřeží, což dokazuje, že přechod mezi východem a západem představuje jednu z hlavních biogeografických diskontinuit tvořenou především Sicilským průlivem a Messinským průlivem ve Středozezemním moři. Toto tvrzení podporuje také studie u jiných organismů např. Sera *et al.*, (2010), která zkoumala genetickou diverzitu u trav *Posidonia oceanica*. I přesto, že je genetická separace mezi západem a východem Středomoří výsledkem minulých událostí, tento trend je stále udržován nízkým tokem genů, který je typický pro druhy s nízkým rozptylem, kam patří právě i *H. tuna* (Rindi *et al.*, 2020).

### 3.5.2 Růst a produkce druhu *Halimeda tuna* ve Středozezemním moři

V roce 1991 vědci provedli studii, která trvala celý rok, aby zjistili, jak a kdy v rámci roku *H. tuna* roste a jaká je její produkce. Studie byla prováděna na sublitorální populaci v hloubce cca 18 metrů na lokalitě v severozápadní části Středozezemního moře. Jedním z pozorovaných faktorů byl počet stélek, který byl v průběhu roku relativně stálý, přesto však u něj byly detekovány rozdíly: největší počet stélek byl zaznamenán v období červen–srpen a naopak nejmenší byl popsán v březnu. Období největšího úbytku bylo zaznamenáno září–říjen. Co se týče velikosti samotných stélek, tak tam byla naopak pozorována značná variabilita. Největší nárůst segmentů byl pozorován v létě a největší úbytek během pozdního podzimu a zimy. Tyto změny byly dány především množstvím stélek a také změnami v počtu segmentů v rámci jedné stélky. Dalším z faktorů byla produkce nových segmentů, která byla vysoká v létě, ale po zbytek roku byla velmi omezená. Výsledkem těchto dvou procesů je, že k čistému růstu studované populace *H. tuna* dochází v období květen–srpen a k poklesu populace pak dochází po celý zbytek roku (Ballesteros, 1991a).

Další částí studie bylo zkoumání vlivu vnějších faktorů jako jsou teplota, ozáření a koncentrace živin na růst *H. tuna*. Z výsledků vyplývá pozitivní korelace mezi teplotou a růstem, což dokazuje, že je růst druhu *H. tuna* závislý na vysokých teplotách. Ozáření přispívá k rychlejšímu růstu taktéž, ale v menší míře než teplota. Teplo a světlo jsou tak považovány za dva hlavní environmentální faktory ovlivňující růst halimed. Naopak podzimní úbytek pravděpodobně souvisí spíše se silnými bouřemi, které jsou na podzim pro oblast severozápadních vod Středozezemního moře typické (Ballesteros, 1989; Ballesteros, 1991a).

Další zkoumanou hodnotou je samotná kalcifikační produktivita druhu *H. tuna*. Ta se také měnila v závislosti na ročním období. Naměřené hodnoty primární produkce a produkce uhličitanu v této oblasti byly velmi vysoké a velmi podobné odhadům jiných hlubinných druhů halimed rostoucích v tropických oblastech. Z toho vyplývá, že příspěvek středomořské *H. tuna* v globálním měřítku bentické mořské kalcifikace bude pravděpodobně značný (Ballesteros, 1991a).

Podrobné složení druhů v této oblasti bylo zkoumáno ve stejnou dobu jako samotná produktivita růstu. Složení druhů je jistě dalším faktorem ovlivňující produktivitu. *H. tuna* byla v této oblasti ve vzpřímené vrstvě dominantním druhem. Biomasu v této oblasti tvoří především inkrustující řasy, tudíž její množství nejlépe reprezentuje pokrytí těmito řasami v rámci sezóny. Maximálního pokrytí, a tím i největší biomasy, bylo dosaženo začátkem léta. Minimální pokrytí bylo v zimě. Druhová diverzita není v této oblasti až tak vysoká kvůli dominantním dvou až třem druhům, ale i tak se v průběhu roku měnila. Nejvyšší byla na začátku léta a nejnižší pak koncem podzimu (Ballesteros, 1991b), což koreluje s daty vnějších faktorů z předchozí studie (Ballesteros, 1991a).

I na další lokalitě v oblasti Mallorca–Menorca byla zkoumána produkce uhličitanu a přesto, že primárními producenti byly na většině míst jiné druhy řas či jiné organismy, byla oblast, kde byla právě *H. tuna* dominantním producentem, a i v dalších oblastech přispívala k množství vyprodukovaného uhličitanu (Canals & Ballesteros, 1997).

### **3.6 Epifytické organismy rostoucí na *Halimeda tuna***

Na stélkách řas se často vyskytují epifytické organismy. Jedním z organismů, které na halimedách najdeme jsou epifytické druhy třídy Hydrozoa. Vyznačují se tím, že jsou to jedny z prvních organismů, kteří kolonizují nové substráty v bentickém mořském prostředí. Často jsou ale následně nahrazeny jinými – většími či konkurenceschopnějšími organismy, jako jsou epifytické řasy. Proto přišli polypovci s náhradním řešením, jak se vyhnout mezidruhové konkurenci – kolonizují sekundární substráty jako jsou např. trávy nebo makroskopické řasy. Ty obecně poskytují nový substrát pro mnoho druhů. Na stélkách *H. tuna* bylo zaznamenáno 35 druhů polypovců. Polypovci byli poté rozděleni do tří skupin podle místa růstu, a to na proximálních (nejstarších) člancích, kde byli relativně velcí a přítomní po celý rok. Druhá skupina rostoucí na mediálních (středních) segmentech, byla menší a často se vyskytovala po celý rok ve specifických oblastech, zatímco ti ve třetí části, tedy na distálních (nejmladších) segmentech byli malí a přítomní jen krátkou dobu. Tato

zonace pravděpodobně odráží mezidruhovou selekci nik, což umožňuje uspět v soutěži o prostor s dalšími polypovci či nějakou řasou. Velkou výhodou těchto organismů, je schopnost rychle obsadit dosud neobsazené části rostlin, což uplatňují, když v případě *H. tuny* odumírají staré stélky a společně s nimi epifytické řasy, a rostou stélky nové, které obsadí právě polypovci (Llobet *et al.*, 1991a).

To že jsou tyto epifyty úspěšní právě mimo sezónu dokazuje i další studie. Ta byla provedena u druhu *Orthopyxis crenata* v oblasti u východního Španělska. Podle výsledků studie byla jejich populace nejhojnější od listopadu do dubna, kdy se i pohlavně rozmnožovali. Jako možné odůvodnění, proč jsou v létě přítomni polypovci v tak malém počtu, uvádí autoři jednak nedostatek potravy, ale také velkou konkurenci epifytických řas a jiných organismů (Llobet *et al.*, 1991b)

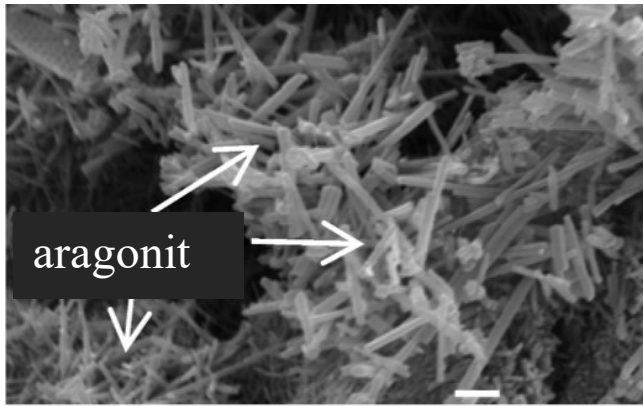
Mezi epifytické řasy pokrývající *H. tunu* patří např. *G. minuta Melobesia*, *Falkenbergia rufolanosa*, *Callithamnion decompositum* či *Hypoglossum hypoglossoides*, které jsou nejčastější právě na jaře a v létě, kdy je vytlačí výše zmiňovaní polypovci. Stejně tak se na jaře začínají vyvíjet zástupci *Mesogloioaceae*, kteří během léta pokrývají většinu plochy segmentů halimed (Ballesteros, 1991b).

### 3.7 Kalcifikace segmentů u rodu *Halimeda*

Kalcifikace je proces ukládání anorganického uhlíku ve formě uhličitanu vápenatého. Obecně lze proces kalcifikace zapsat následující rovnicí:



Tato schopnost je pro řasy rodu *Halimeda* typická a má mnoho výhod. Jsou díky němu jedním z důležitých globálních biologických producentů sedimentárního  $\text{CaCO}_3$ . Řasy tohoto rodu pracují velmi efektivně. Již 36 hodin po vzniku segmentu jsou schopny začít kalcifikovat, i když ne v takové míře jako kalcifikují dospělé rostliny. Oxid uhličitý je ukládán ve formě mikrokryсталů aragonitu (viz. Obrázek č.6).

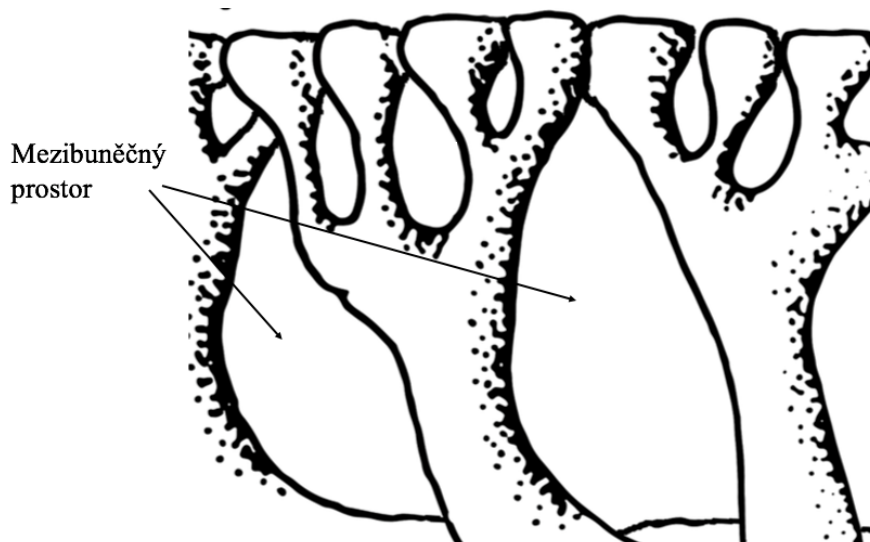


**Obrázek č. 6:** Fotografie z elektronového mikroskopu znázorňující jehlice aragonitu (upraveno podle Stanley *et al.*, 2010).

Míra kalcifikace je dána několika faktory jako je ozáření, věk rostliny, prostředí, pH či expozice lokality. Její rozsah se také liší u jednotlivých druhů především kvůli stavbě utrikulů, a to proto, že se aragonit tvoří a následně ukládá právě v interutrikulárních prostorech, a to jak v medulárních, tak i v subkortikálních. Asi nejdůležitějším faktorem je teplota, protože celý proces kalcifikace je úzce spjat právě s teplotou, tím pádem také není míra kalcifikace po celý rok stejná, ale můžeme u ní pozorovat určitou sezónnost (Ortegon-Aznar *et al.*, 2017), kterou lze pozorovat především v mořích s měnící se teplotou jako je např. Středozevní moře. Míra kalcifikace se zvyšuje s věkem rostliny, a především s věkem jednotlivých segmentů. U zralých segmentů tvoří u některých druhů až 90 % z jejich celkové suché hmotnosti. Stélka kalcifikací tuhne, díky tomu zůstává vzpřímená i při proudění vody a zároveň zůstává dostatečně exponovaná dopadajícím paprskům slunečního záření. I samotné segmenty jsou díky kalcifikaci poměrně tvrdé, tudíž jsou pro valnou většinu živočichů nestravitelné (Stanley *et al.*, 2010). Existují však i herbivorní živočichové, kteří se těmito řasami živí jako je např. ježovka *Paracentrotus lividus* nebo ryba *dusky spinefoot* – *Siganus luridus*. I přesto, že mají velmi malou nutriční hodnotu, protože je aragonit pro většinu živočichů nevyužitelný jako zdroj energie, stejně tyto ryby či jiní herbivoři halimedy okusují (Multer & Clavijo, 2004). Herbivorní živočichové jsou tak pro bentické mořské řasy jedním z klíčových stresových faktorů.

Proces kalcifikace začíná v mezibuněčném prostoru stélky (viz. Obrázek č. 7), kde se tvoří krystaly  $\text{CaCO}_3$ , které poté postupně vyplňují interutrikulární prostor. Vytvořený aragonit má nejprve podobu jehel o délce 0,08 – 0,6  $\mu\text{m}$ , ty se ukládají k vnějším okrajům stěn směřujících do mezibuněčného prostoru mezi vlákna stélky. Jejich velikost i množství závisí na stáří segmentu, ale také na lokalitě či na jednotlivých zástupcích (Hillis-Colinvaux,

1980). Samotné mikrokrystaly aragonitu nemají specifickou orientaci, nebyla pozorována žádná organická matrice na rozdíl např. od měkkýšů či jiných kalcifikujících organismů, pouze se sdružují u buněčné stěny a jejich hustota je tam největší. Jádra krystalů se postupně zvětšují až zaplní celý interutrikulární prostor (Borowitzka, 1982).

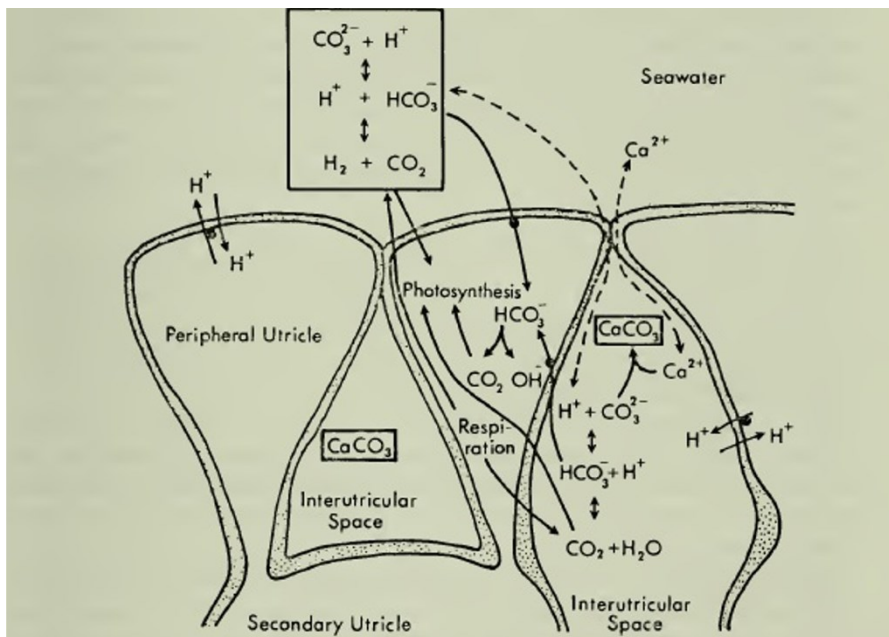


**Obrázek č. 7:** Mezibuněčné prostory stélky, ve kterých probíhá proces kalcifikace (upraveno podle Peach *et al.*, 2017).

Jedním z fyziologických faktorů, který ovlivňuje míru kalcifikace, je adheze utrikulů. Jak již bylo zmíněno, proces probíhá v mezibuněčných prostorech, které mohou či nemusí být zcela nepropustné pro okolní vodu. Kalcifikace může probíhat jak ve zcela uzavřeném prostředí bez komunikace s okolní vodou, tak i v otevřeném prostředí, což může nastat především u mladých nedospělých segmentů. Izolovaný prostor však pravděpodobně napomáhá celému procesu, což může být další z důvodů, proč řasa produkuje více  $\text{CaCO}_3$  s přibývajícím věkem (Wilbur *et al.*, 1969).

Proces kalcifikace je úzce spjat s fotosyntézou, společně tvoří jakýsi cyklus. Rostlina si v mezibuněčných prostorech tvoří mikroprostředí díky již zmiňované adhezi utrikulů. Odtud si rostlina odebírá oxid uhličitý – potřebný pro fotosyntézu a spotřebovává ho. Následně se díky odebrání  $\text{CO}_2$  zvýší v mezibuněčných prostorech koncentrace ostatních dvou sloučenin rozpuštěného uhlíku, tedy  $\text{CO}_3^{2-}$  a  $\text{HCO}_3^-$ , zvýší se také pH, které při intenzivní fotosyntetické aktivitě také reflektuje relativní podíl aniontů  $\text{CO}_3^{2-}$  v kalcifikačním roztoku. Tyto anionty potom reakcí s rozpuštěnými vápenatými kationty  $\text{Ca}^{2+}$

precipitují za vzniku  $\text{CaCO}_3$  (viz. Obrázek č. 8) (Hillis-Colinvaux, 1980; Stanley *et al.*, 2010).



**Obrázek č. 8:** Schéma výměny iontů uhlikatých sloučenin mezi vnějším prostředím a segmentem (převzato z Hillis-Colinvaux, 1980).

Morfologická stavba segmentů je dalším faktorem ovlivňujícím kalcifikaci. Ve studii z roku 2017 byly různé parametry zkoumány u šesti druhů. Nejprve se vědci zaměřili na průměrnou velikost primárních (povrchových) utrikulů; ta se u jednotlivých druhů velmi liší a *H. tuna* má jedny z největších ze zkoumaných druhů. Dalším zkoumaným parametrem byla délka difuzní dráhy (úsek, kde mezi dvěma primárními utrikuly probíhá adheze neboli přilnutí), která se taktéž lišila u jednotlivých druhů a *H. tuna* měla opět jednu z nejdelších. Vědci také podle dat zjistili pozitivní vztah mezi průměrnou délkou difuzní dráhy a průměrnou velikostí primárních utrikulů napříč zkoumanými druhy. Následně byl měřen minerální obsah  $\text{CaCO}_3$  celé nadzemní části stélek a bylo zjištěno, že *Halimeda tuna* je z měřených šesti druhů nejméně kalcifikovaná. Poté byla provedena analýza mezi průměrným obsahem uhličitanu vápenatého a délkou difuzní dráhy pro všechny druhy a byl odhalen silný inverzní vztah mezi těmito veličinami. Druhy jako je *H. tuna*, mající velké utrikuly a dlouhé difuzní dráhy, obsahují užší jehlice aragonitu. Naproti tomu druhy s malými utrikuly a krátkými difuzními cestami mají širší aragonitové jehlice a celkově větší obsah  $\text{CaCO}_3$  ve svých segmentech. Zdá se, že delší difuzní dráha zapříčiňuje méně efektivní

výměnu iontů s vnějším prostředím, což pravděpodobně zpomaluje následnou kalcifikaci (Peach *et al.*, 2017).

V globálním měřítku jsou řasy rodu *Halimeda* v produkci uhličitanu vápenatého jedny z nejvýznamnějších. Proto se provádí řada studií v různých oblastech a zkoumá se množství vyprodukovaného CaCO<sub>3</sub>, ale také jaká je v produkci variabilita druhů. Jedna ze studií byla provedena roku 1983 a i přesto, že je tato studie stará víc než 40 let, naměřené hodnoty jsou stále jedny z nejvyšších vůbec, proto je zde důležité tuto studii zmínit. První studovaná oblast byla u Velkého bariérového útesu, kde byly zkoumány hlavně vnější faktory ovlivňující kalcifikaci a také rozložení jednotlivých druhů, poté následoval výzkum na lokalitě druhé, tato studie byla už konkrétnější. Probíhala na *Davies reef* a zkoumala růst a produkci u dvou druhů (*H. opuntia*, *H. copiosa*), které zde byly nejhojnější. Variabilita růstu zde byla obrovská i v rámci jednoho druhu. Některé rostliny nerostly vůbec, za to jiné přirůstaly i o několik segmentů za den. Co se týče produkce, tak na každý m<sup>2</sup> vyprodukovala halimední vegetace 2 234 g/m<sup>2</sup>/rok uhličitanu vápenatého, což je opravdu velké množství např. oproti *H. macroloba*, která v okolí ostrova Guam vyprodukovala sotva pětinu (Merten, 1971; Drew, 1983).

Jedna z dalších studií prováděná na druhu *H. macroloba* je z lokality u ostrova Lidee lek v Thajsku, kde byla také studována její produktivita. Měření probíhalo na základě různých veličin jako např. růst či počet krystalů a byly také naměřeny velmi vysoké hodnoty, a to v rozmezí 1910 – 5950 g/m<sup>2</sup>/rok uhličitanu vápenatého, což může být způsobeno několika faktory. Na rozdíl od jiných studií byla při této pozorovaná určitá periodicitu, a to tak, že nejmenší hustota zde byla v období od srpna do září – období reprodukce a nejvyšší od února do dubna – období sucha. Výsledky této, ale i jiných studií dokazují, že zástupce *Halimeda macroloba* patří mezi velmi produktivní druhy (Mayakum & Prathep, 2018).

Mezi významné druhy, co se týče produktivity bezpochyby patří právě i *H. tuna*, která ve Středozezemním moři také vykazuje periodicitu. Nejvyšší produktivita zde byla zaznamenaná v létě a nejnižší potom v zimě. Produkce uhličitanu vápenatého zde byla odhadnuta okolo 314 g/m<sup>2</sup>/rok, což jsou řádově velmi podobné hodnoty jako u jiných odhadů dalších druhů v tropických oblastech (Ballesteros, 1991a).

Jak lze vidět, produkce je u jednotlivých druhů rodu *Halimeda* velmi variabilní. Rozdílnost může způsobovat např. množství segmentů na jednotlivých rostlinách, ale také samotná velikost jednotlivých segmentů či velikost urtikulů uvnitř segmentu.



Přestože byl vznik aragonitu u řas rodu *Halimeda* popsán již v 80. letech 20. století, nebyl proces jeho ukládání u *H. tuna* až do nedávna předmětem experimentu. Tato diplomová práce navazuje na pionýrskou studii naší laboratoře týkající se porovnávání velikosti utrikulů v rámci jednoho segmentu (Neustupa & Němcová, 2020) a klade si za cíl tyto poznatky dále rozšířit.

## 4 Cíle práce

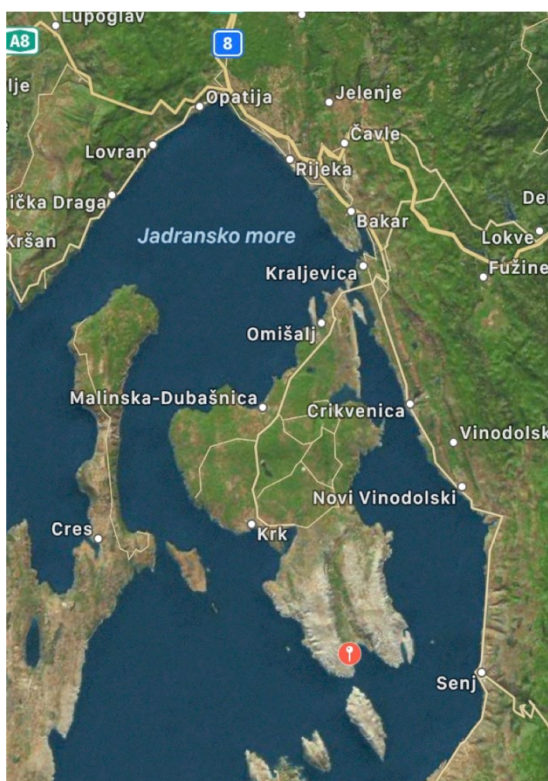
Hlavním cílem práce bylo zjistit více informací o morfologické struktuře segmentů řasy *Halimeda tuna* a zda na ní je či není závislá míra kalcifikace. Práce si dále klade dílčí cíle:

- Zjistit, zda je segment v celé své struktuře stejně kalcifikován.
- Naměřit rozdíly velikostí periferních utrikulů v rámci jednoho segmentu.
- Porovnat naměřené parametry v různých částech roku.

## 5 Metodika

### 5.1 Odběr vzorků

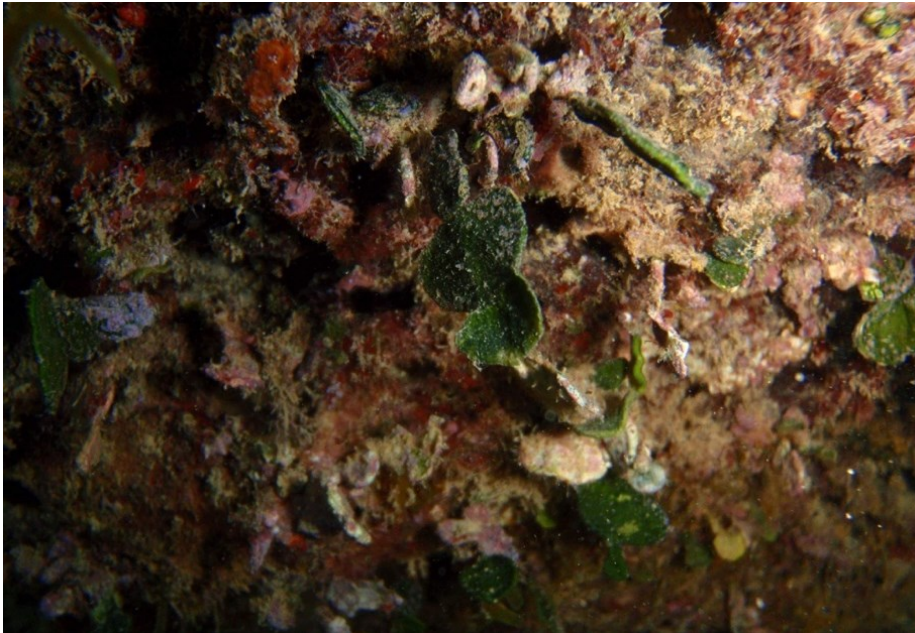
Pro odběr vzorků byla zvolena lokalita ve Středozezemním moři na jihu ostrova Krk v Chorvatsku, na souřadnicích 44.9576175N, 14.7489017E (viz. Obrázek č.9). Lokalita byla vybrána především kvůli hojné populaci řas druhu *Halimeda tuna* (viz. Obrázek č.10). Výhodou této lokality potom byla také její dobrá dostupnost. Díky hojné populaci stačila k odběru oblast okolo 60 m<sup>2</sup>. Řasy byly odebírány ze svrchního sublitorálu z hloubky cca 1 m a uchovávány v průhledných plastových laboratorních lahvičkách. Byly provedeny celkem tři odběry. První se uskutečnil na začátku října roku 2020, druhý odběr proběhl v polovině června roku 2021, třetí byl proveden na začátku září téhož roku.



**Obrázek č. 9:** Výřez mapou s vyznačeným odběrovým místem – červený špendlík (<https://www.google.com/maps>).

Odebráno bylo vždy 12 segmentů, kdy každý segment byl z jiné rostliny. Jednotlivé segmenty byly vybírány tak, aby byly co největší a zároveň měly co nejpodobnější pozici v rámci jedné rostliny. To v zásadě znamenalo, že k analýzám byly vybrány segmenty nacházející se ve středních částech stélek, kde typicky dosahují největších velikostí

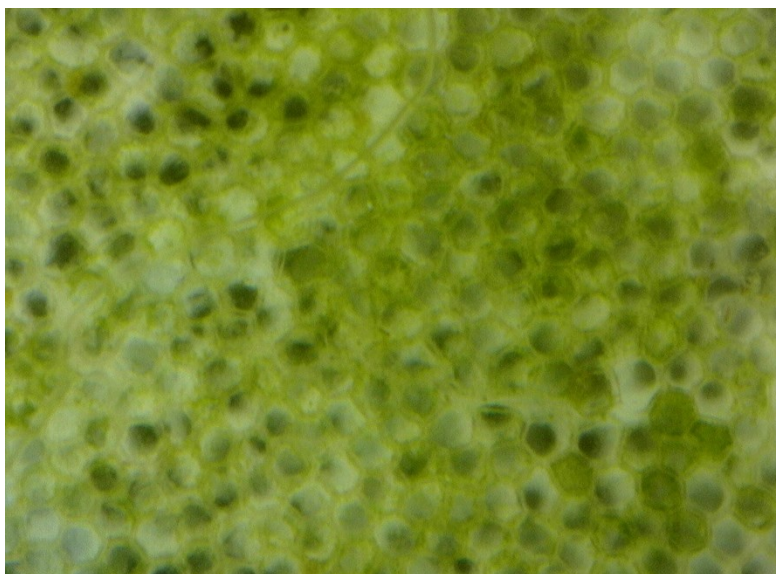
(Neustupa & Němcová, 2022). Také bylo důležité vybrat segmenty co nejméně porostlé epifytickými ruduchami, a to jednak kvůli vážení, ale také kvůli focení utrikulů.



**Obrázek č. 10:** Odběrové místo pod vodou – 1.odběr, říjen 2020.

## **5.2 Mikrofotografie struktury segmentů**

Odebrané segmenty byly ještě tentýž den nafoceny pomocí digitální kamery DinoEye AM7025X (DinoLite) připevněného na mikroskopu Evolution PM (Gaticules Optics Ltd.) při zvětšení 100×. Na každém segmentu byly foceny tři pozice: vnější (apikální) část (nejvzdálenější od nodu), střed a vnitřní strana, tzn. u nodu. Struktura segmentu byla focena při pohledu kolmo shora, tak, aby byly zachyceny tzv. periferní utrikuly, které vytváří většinou pěti- nebo šestiúhelníky (viz. Obrázek č.11). Vyfocena byla vždy tři různá náhodná místa, aby byl u následného měření velikosti k dispozici dostatečný počet utrikulů.



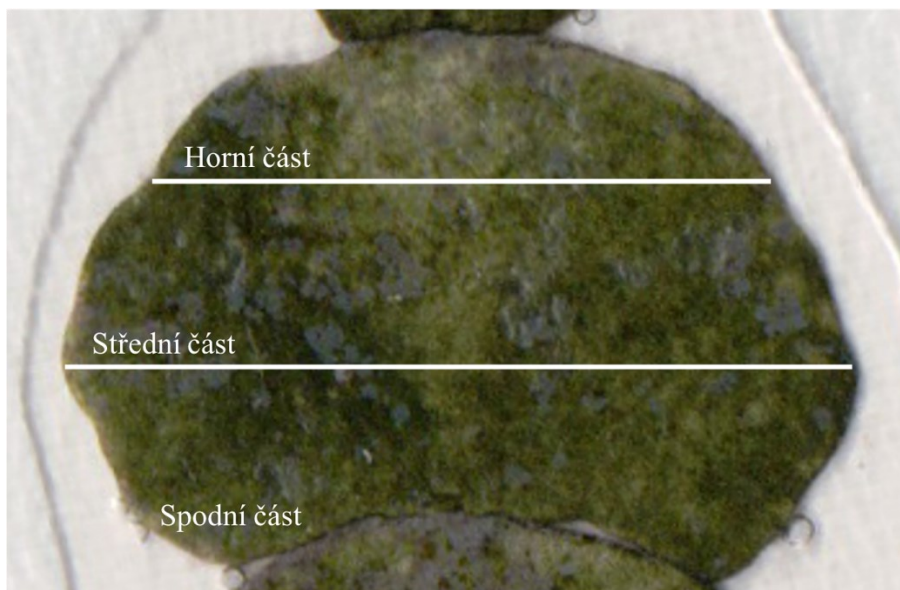
**Obrázek č. 11:** Fotografie struktury segmentu nafoceny pomocí digitální kamery DinoEye AM7025X (DinoLite) připevněného na mikroskopu Evolution PM (Graticules Optics Ltd.), a to konkrétně z prvního odběru v září 2020 a střední části.

### **5.3 Sušení segmentů**

Po nafocení se segmenty několik dní sušily při pokojové teplotě a následně byly převezeny pečlivě zabalené v savém papíru do Prahy na fakultu. Tím, že byly segmenty vysušené, nemuselo následné zpracování probíhat neprodleně po příjezdu, což byla velká výhoda.

### **5.4 Zpracování vzorků**

Každý segment byl nařezán na již zmíněné části – nejbližší oblast od nodu, tj. horní část, střední oblast segmentu a oblast nejbližší u nodu, tj. spodní část (viz. Obrázek č.12). Každá část ze všech segmentů byla vážena pomocí analytických vah. Následně byla každá část dekalifikována ponořením do 5% roztoku HCl po dobu 5 minut nebo dokud neustalo bublání značící konec procesu tvorby plynného CO<sub>2</sub> (Vroom *et al.*, 2003). Dekalcifikované segmenty byly poté opláchnuty destilovanou vodou a sušeny při teplotě 60°C po dobu 45 minut. Po usušení byly všechny části opět zváženy pomocí přesných vah a byl zaznamenán hmotnostní rozdíl (Vroom *et al.*, 2003).



Obrázek č. 12: Ilustrační náčrt řezů segmentem.

## 5.5 Měření velikosti utrikulů

Ještě za čerstvého stavu byly nafoceny jednotlivé pozice na všech 36 studovaných segmentech, jak již bylo zmíněno. Dohromady bylo těchto 72 fotografií nahráno do programu TpsDig, verze 2.22 (Rohlf, 2015), kdy bylo vždy z jedné pozice u jednoho segmentu, tj. ze tří fotografií, náhodně vybráno 30 utrikulů a u každého zvlášť byl (modul *draw\_background\_curves*) digitalizován průběh jejich stěn. Program následně vypočítal také velikost (obsah) každého jednotlivého utrikulu v pixelech.

## 5.6 Statistická analýza

### 5.6.1 Analýza obsahu $\text{CaCO}_3$ jednotlivých částí segmentů

Pro tuto analýzu byla použita data z každého odběru zvlášť získaná z výpočtu hmotnostního rozdílu mezi částí segmentu před dekalifikací a po ní. Poměrný obsah minerálů v každém segmentu byl stanoven jako  $C=1-dcw/drw$ , kde  $drw$  je celková suchá hmotnost a  $dcw$  je suchá hmotnost po dekalifikaci (Neustupa & Němcová, 2022), přičemž byly vyhodnocovány vztahy mezi jednotlivými pozicemi. Všechny naměřené hodnoty byly nejdříve otestovány na normální rozložení dat pomocí Shapiro-Wilk testu. Následně byly naměřené hodnoty vždy ze všech tří měření pozic v rámci jednoho segmentu nebo jedna

pozice u všech tří odběrů vyhodnoceny pomocí neparametrického Kruskal-Wallis testu a následně byly jednotlivé dvojice dat porovnány vždy mezi sebou pomocí Dunn's multiple comparisons testu. Tento test zjišťuje, zda se mediány tří nezávislých vzorků od sebe liší a je vhodný pro datové soubory, u nichž není zaručeno normální rozdělení dat. Všechny analýzy a z nich vzešlé grafy byly vypracovány v programu PAST, ver. 4.04. (Hammer *et al.*, 2001).

### **5.6.2 Analýza velikostí utrikulů jednotlivých částí segmentů**

Pro tuto analýzu byla také použita data z každého odběru zvláště získaná tentokrát z programu TpsDig, verze 2.22. Zde bylo použito stejné statistické vyhodnocení jako při první analýze. Vzhledem k nenormálnímu rozložení dat bylo vhodné pro tuto analýzu taktéž vybrat právě neparametrický Kruskal-Wallis test. Všechny analýzy a z nich vzešlé grafy byly vypracovány v programu PAST, ver. 4.04. (Hammer *et al.*, 2001).

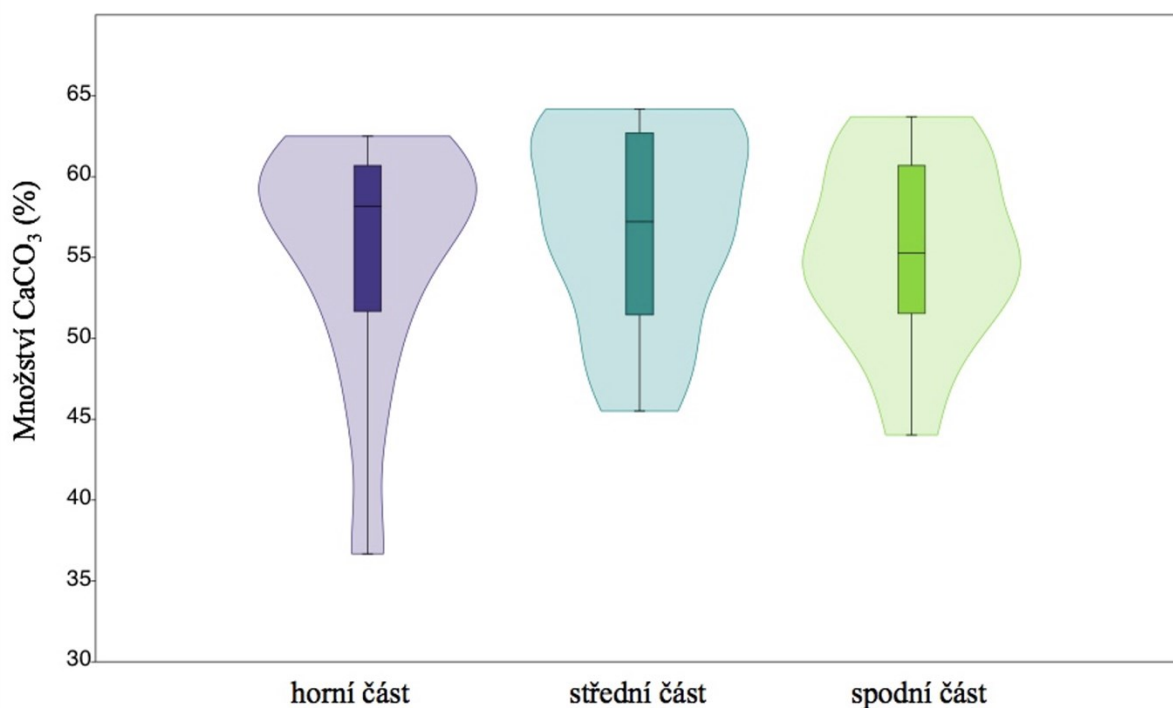


## 6 Výsledky

### 6.1 Množství CaCO<sub>3</sub>

V rámci výzkumu jsme provedli tři odběry řas rodu *Halimeda* na stejné lokalitě na ostrově Krk v Chorvatsku. Odběry byly prováděny po dobu dvou let (2020-2021) s cílem zjistit rozložení aragonitu (CaCO<sub>3</sub>) v rámci jednoho segmentu jedné rostliny. Analyzovali jsme vždy tři části (horní, spodní a střední) jednotlivých segmentů.

V prvním odběru provedeném v říjnu roku 2020 jsme zjistili, že se obsah aragonitu v jednotlivých částech segmentu neliší. Jeho obsah zaujímal v průměru okolo 55-60 % hmotnosti segmentu (viz. Obrázek č.13, Tabulka č.1). Ani v následujícím odběru uskutečněném v červnu roku 2021 nebyla zjištěna žádná signifikantní odlišnost. Při tomto odběru CaCO<sub>3</sub> zaujímal v průměru cca 70 % hmotnosti segmentu (viz. Obrázek č.14, Tabulka č.2). Ve třetím odběru provedeném v září téhož roku také nebyl zjištěn rozdíl mezi naměřenými hodnotami. V tomto měsíci bylo naměřené množství aragonitu s největším rozptylem, zaujímal v průměru mezi 55-70 % hmotnosti segmentu (viz. Obrázek č.15, Tabulka č.3). Můžeme tedy říci, že množství aragonitu v rámci segmentu není závislé na jeho umístění.

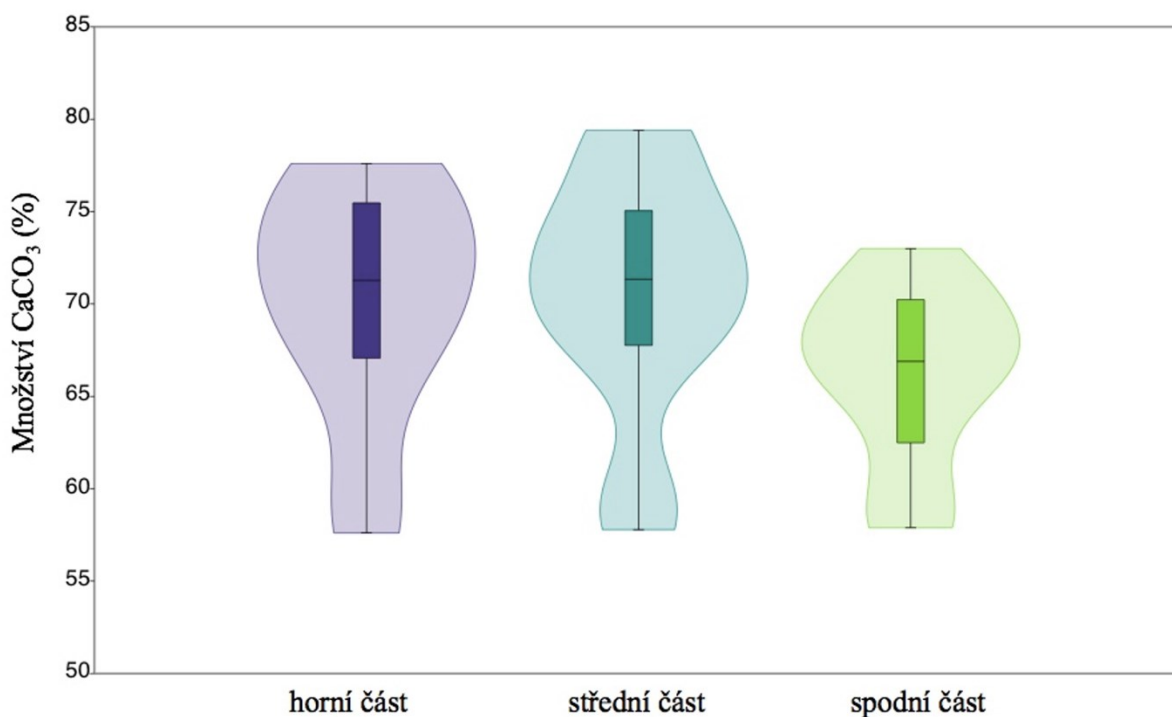


Obrázek č.13: Vztah mezi obsahem CaCO<sub>3</sub> a polohou v rámci segmentu – 1. odběr



Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
horní vs. střední	>0,9999
horní vs. spodní	>0,9999
střední vs. spodní	>0,9999

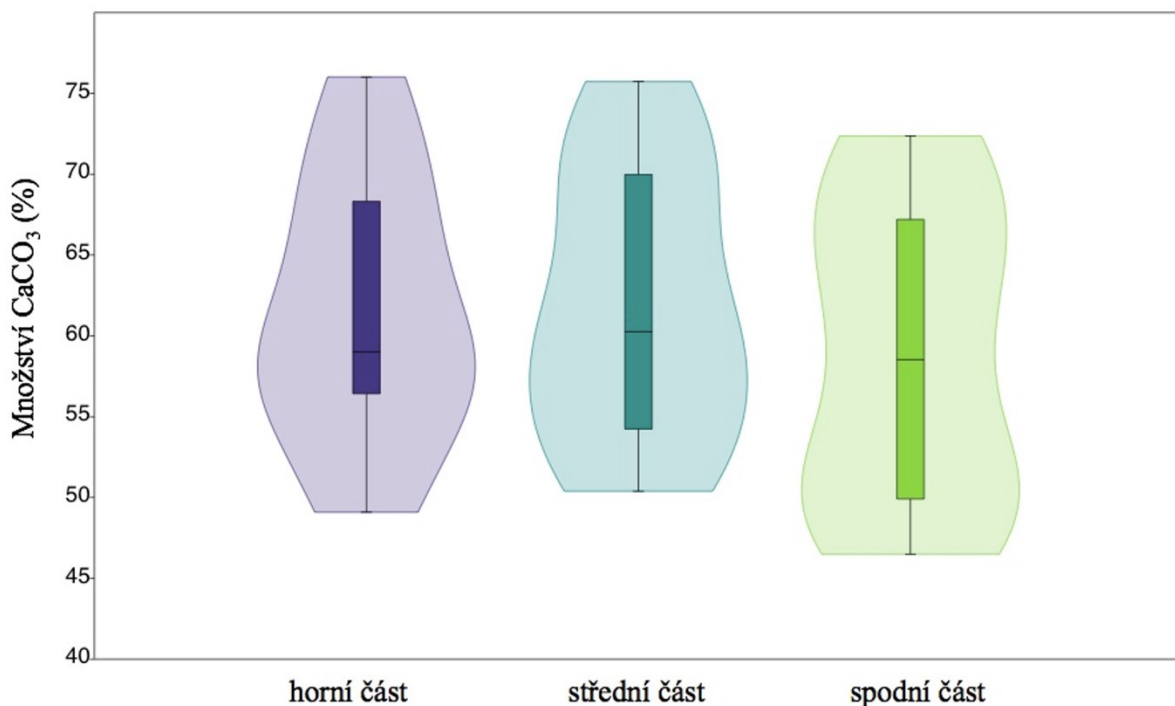
**Tabulka č.1:** Výsledek statistického srovnání obsahu CaCO<sub>3</sub> a polohy v rámci segmentu – 1. odběr



**Obrázek č.14:** Vztah mezi obsahem CaCO<sub>3</sub> a polohou v rámci segmentu – 2. odběr

Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
horní vs. střední	>0,9999
horní vs. spodní	0,2337
střední vs. spodní	0,1317

**Tabulka č.2:** Výsledek statistického srovnání obsahu CaCO<sub>3</sub> a polohy v rámci segmentu – 2. odběr

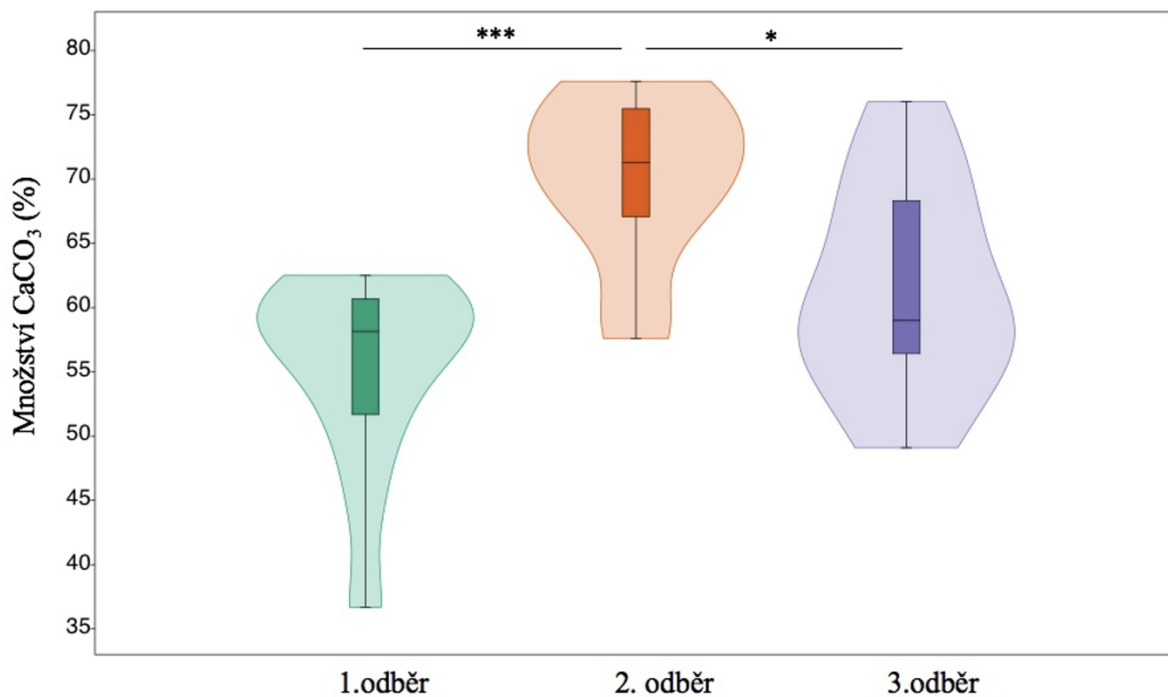


**Obrázek č.15:** Vztah mezi obsahem CaCO<sub>3</sub> a polohou v rámci segmentu – 3. odběr

Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
horní vs. střední část	>0,9999
horní vs. spodní část	>0,9999
střední vs. spodní část	>0,9999

**Tabulka č.3:** Výsledek statistického srovnání obsahu CaCO<sub>3</sub> a polohy v rámci segmentu – 3. odběr

Dále nás zajímalo, zda má na množství aragonitu v jednotlivých částech segmentu vliv část roku, ve které je odběr proveden. Porovnávali jsme tedy vždy jednu z částí napříč všemi třemi odběry. Při porovnání horních částí segmentu se ukázalo, že mezi prvním odběrem v říjnu roku 2020 a druhým odběrem v červnu roku 2021 je značná odlišnost. V říjnu bylo aragonitu v horní části segmentů výrazně méně. Signifikantní rozdíl byl také zaznamenán mezi červnovým a zářijovým odběrem v roce 2021. I zde bylo na podzim aragonitu méně. Podzimní odběry se mezi sebou signifikantně nelišily (viz. Obrázek č.16, Tabulka č.4).



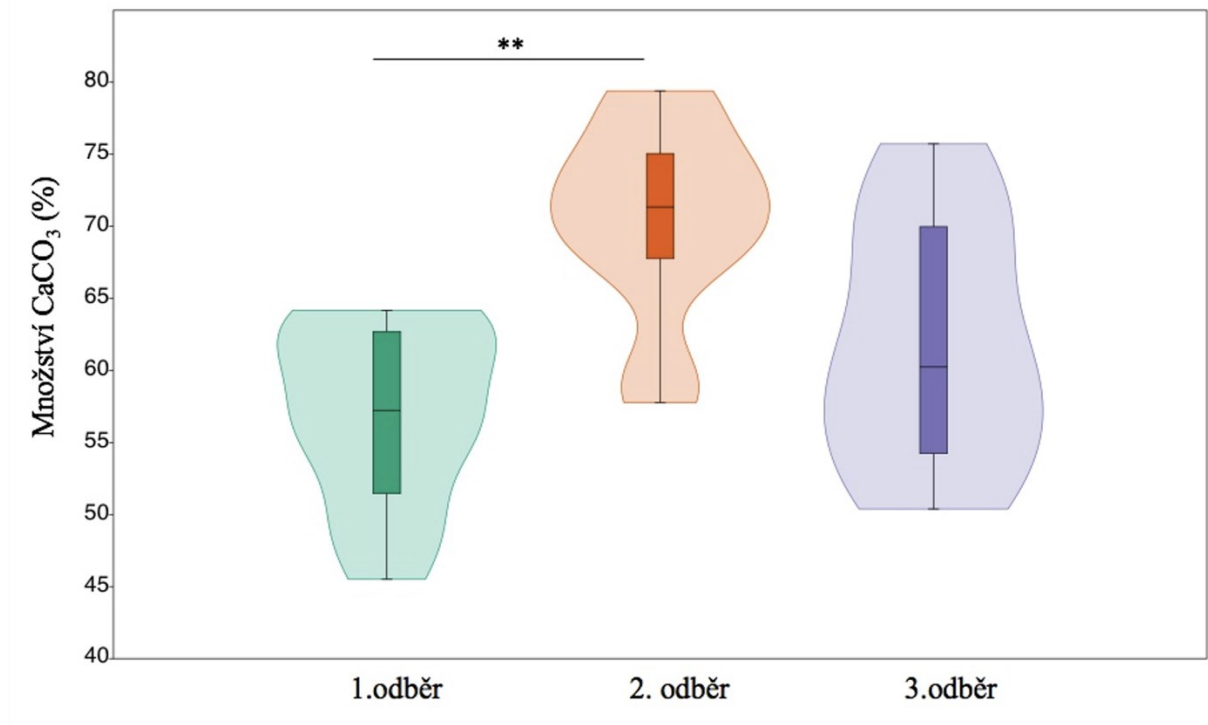
**Obrázek č.16:** Vztah mezi obsahem CaCO<sub>3</sub> a jednotlivými odběry – horní část

Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
1. odběr vs. 2. odběr	0,0006
1. odběr vs. 3. odběr	0,7118
2. odběr vs. 3. odběr	0,0353

**Tabulka č.4:** Výsledek statistického srovnání obsahu CaCO<sub>3</sub> v jednotlivých odběrech – horní část

Taktéž při srovnání středních částí byl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi 1. a 2. odběrem, 3. odběr se od ostatních nelišil (viz. Obrázek č.17, Tabulka č.5). Porovnání spodních částí ukázalo stejný trend jako u středních částí (viz. Obrázek č.18, Tabulka č.6).

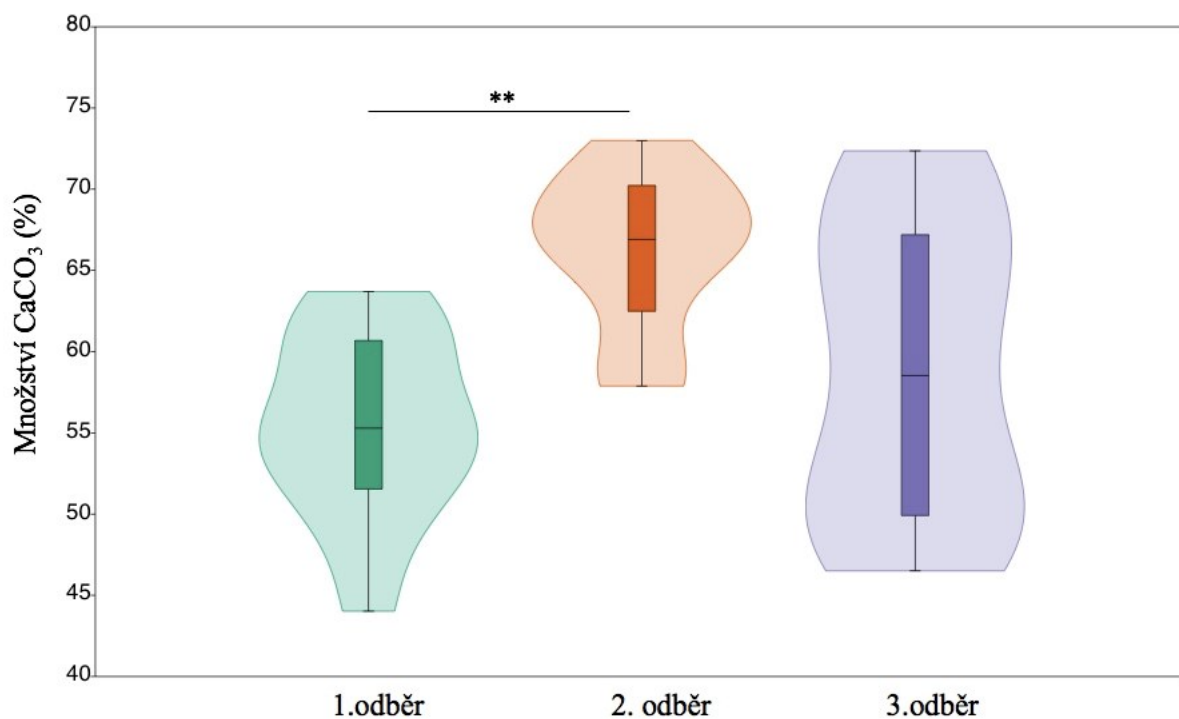
Zdá se tedy, že 1. odběr se výrazně odlišuje od 2. svým množstvím aragonitu v jednotlivých částech segmentu.



**Obrázek č.17:** Vztah mezi obsahem CaCO<sub>3</sub> a jednotlivými odběry – střední část

Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
1. odběr vs. 2.odběr	0,0011
1. odběr vs. 3. odběr	0,6237
2.odběr vs. 3. odběr	0,0634

**Tabulka č.5:** Výsledek statistického srovnání obsahu CaCO<sub>3</sub> v jednotlivých odběrech – střední část

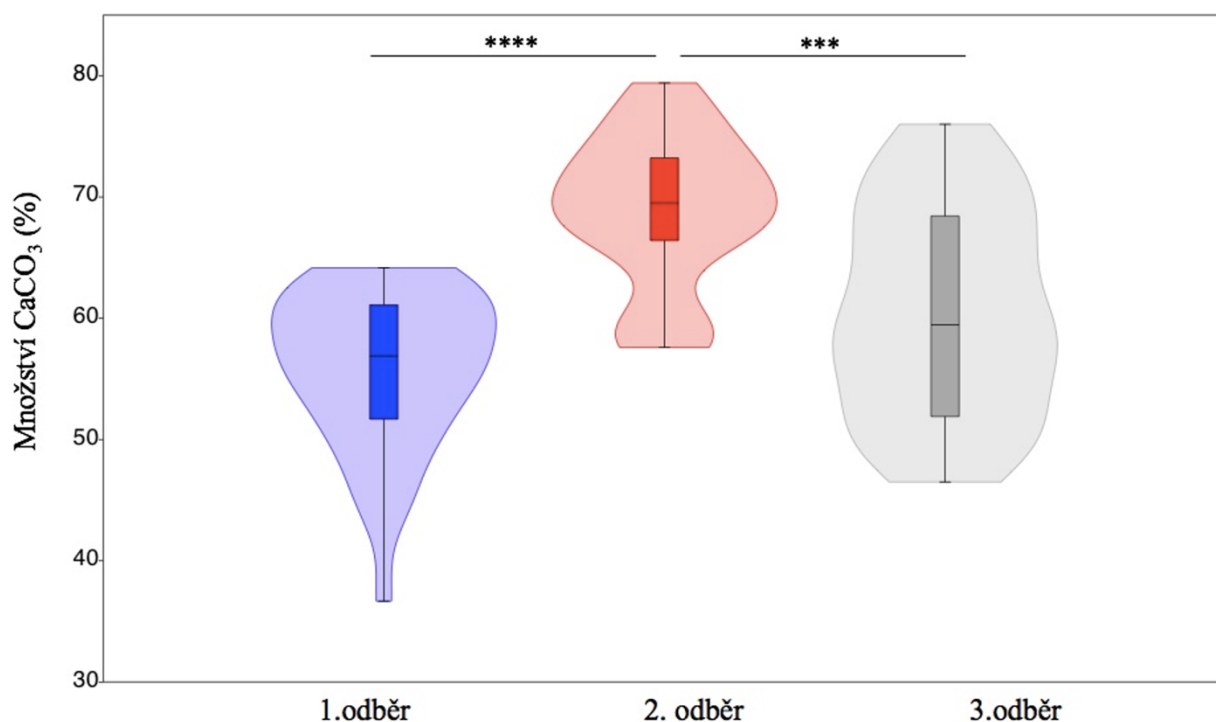


**Obrázek č.18:** Vztah mezi obsahem CaCO<sub>3</sub> a jednotlivými odběry – **spodní část**

Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
1. odběr vs. 2. odběr	0,0028
1. odběr vs. 3. odběr	0,8864
2. odběr vs. 3. odběr	0,0702

**Tabulka č.6:** Výsledek statistického srovnání obsahu CaCO<sub>3</sub> v jednotlivých odběrech – **spodní část**

Tuto skutečnost jsme ověřili při porovnání všech získaných hodnot v jednotlivých měsících bez ohledu na část segmentu. Z něj jednoznačně vyplynulo, že množství  $\text{CaCO}_3$  ve stélkách řas *Halimeda tuna* bylo v říjnu roku 2020 nižší než v létě roku následujícího, a navíc se ukázal signifikantní rozdíl i mezi oběma odběry roku 2021 (viz. Obrázek č.19, Tabulka č.7). Zdá se tedy, že množství aragonitu uloženém ve stélkách řas *Halimeda tuna* je závislé na tom, ve které části roku jej zkoumáme.



Obrázek č.19: Vztah mezi obsahem  $\text{CaCO}_3$  a jednotlivými odběry – všechny části

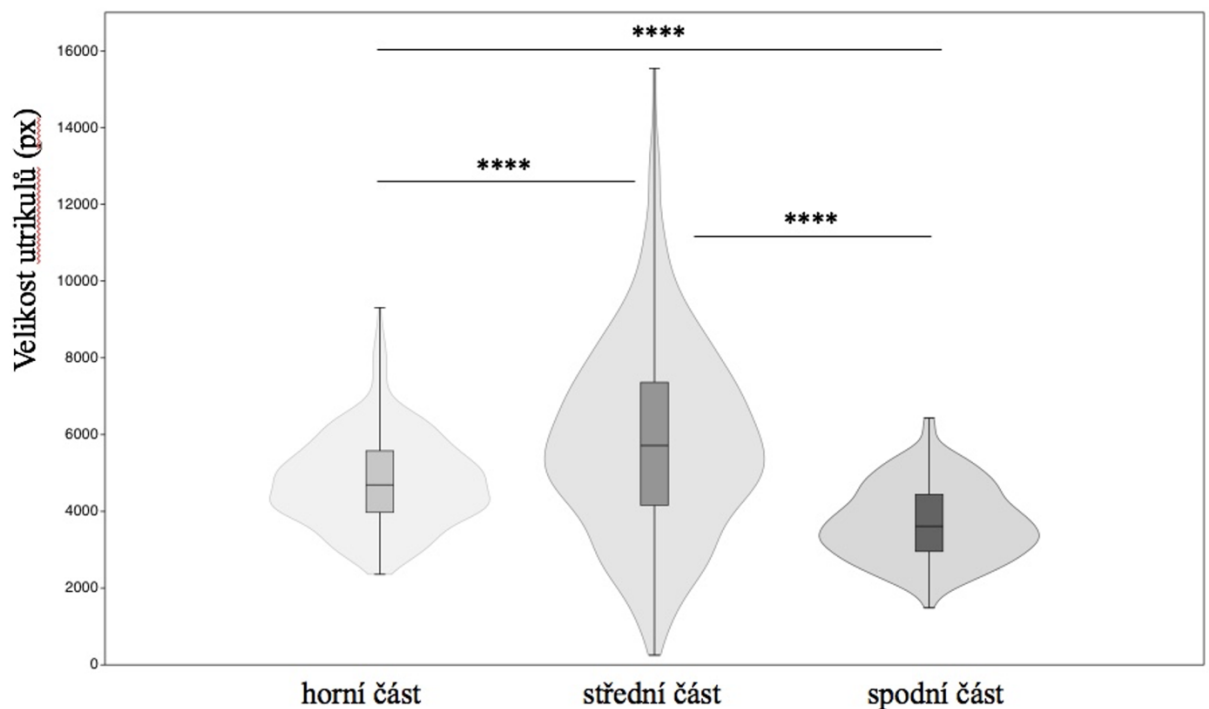
Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
1. odběr vs. 2.odběr	<0,0001
1. odběr vs. 3. odběr	0,0881
2.odběr vs. 3. odběr	0,0002

Tabulka č.7: Výsledek statistického srovnání obsahu  $\text{CaCO}_3$  v jednotlivých odběrech – všechny části

## 6.2 Velikost utrikulů

V rámci našeho výzkumu jsme každou odebranou řasu před usušením vyfotili pod mikroskopem. Na jednotlivých snímcích jsme poté provedli analýzu velikosti 30 utrikulů vždy v rámci jedné části, utrikuly jsme měřili v pixelech. V dřívější práci naší laboratoře se ukázal gradient velikosti utrikulů napříč segmentem (Neustupa & Němcová, 2020), na kterou navazuje tato diplomová práce. Proto jsme toto zjištění chtěli ověřit a získaná data tak podpořit.

Při analýze prvního odběru provedeného v říjnu byl zjištěn výrazný signifikantní rozdíl mezi všemi třemi pozicemi navzájem, přičemž nejmenší velikost utrikulů byla zaznamenána ve spodní části segmentu a největší velikost byla ve střední části (viz. Obrázek č.20, Tabulka č.8).

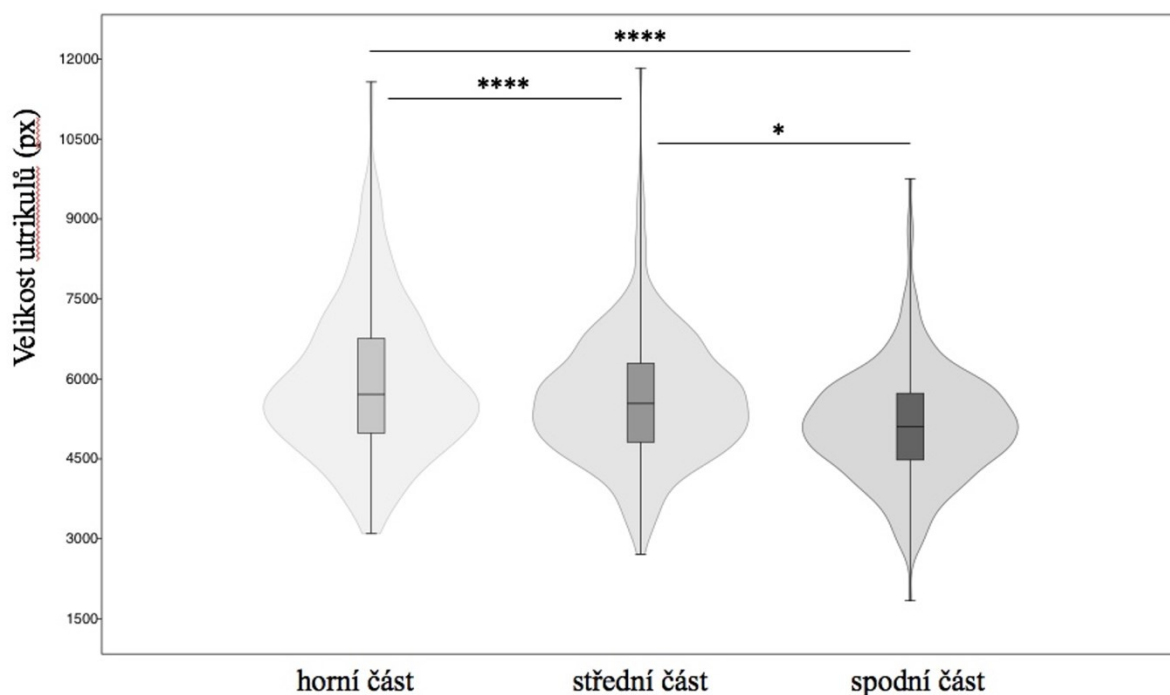


Obrázek č.20: Vztah mezi velikostí utrikulů a polohou v rámci segmentu – 1. odběr

Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
horní vs. střední	<0,0001
horní vs. spodní	<0,0001
střední vs. spodní	<0,0001

**Tabulka č.8:** Výsledek statistického srovnání velikosti utrikulů a polohy v rámci segmentu – 1. odběr

V následujících dvou odběrech vyšly všechny části vždy výrazně signifikantní (s výjimkou 2. odběru – zde byl mezi střední a spodní částí taktéž zaznamenán rozdíl, ovšem menší než v ostatních případech) se stejným trendem, tj. největší utrikuly byly v horní části segmentů, nejmenší potom v části spodní (viz. Obrázek č.21, Obrázek č.22, Tabulka č.9, Tabulka č.10). I v našich výsledcích se tedy ukázal trend gradientu velikostí utrikulů v rámci jednoho segmentu.

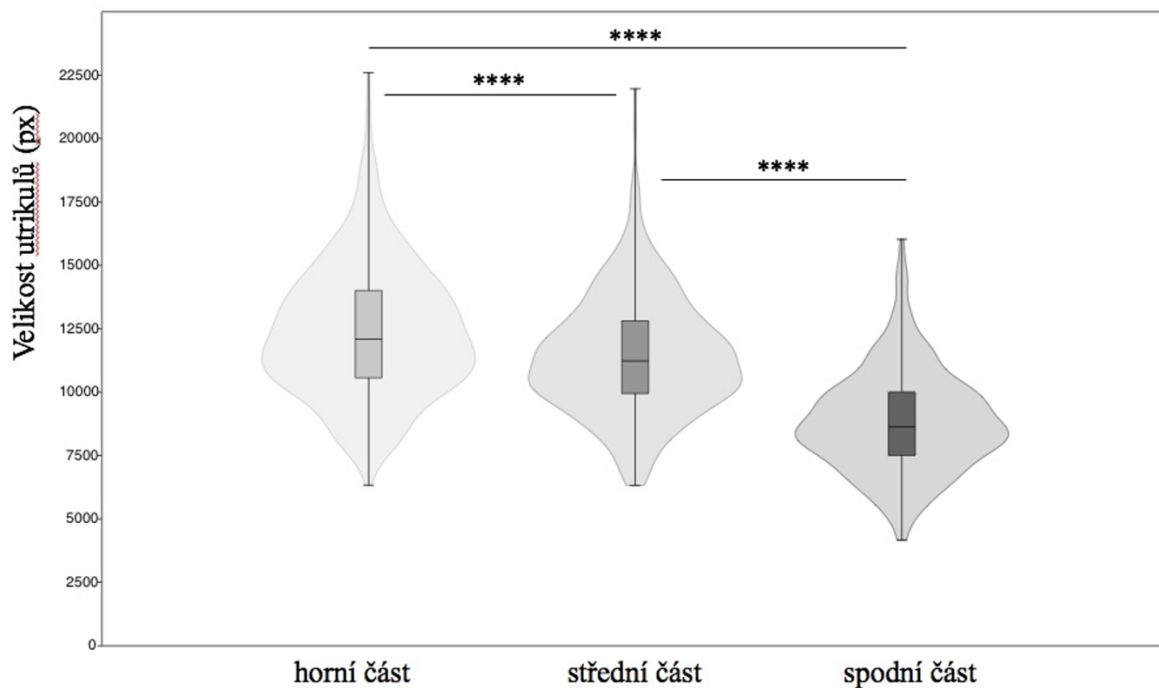


**Obrázek č.21:** Vztah mezi velikostí utrikulů a polohou v rámci segmentu – 2. odběr



Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
horní vs. střední	<0,0001
horní vs. spodní	<0,0001
střední vs. spodní	0,0429

**Tabulka č.9:** Výsledek statistického srovnání velikosti utrikulů a polohy v rámci segmentu – 2. odběr

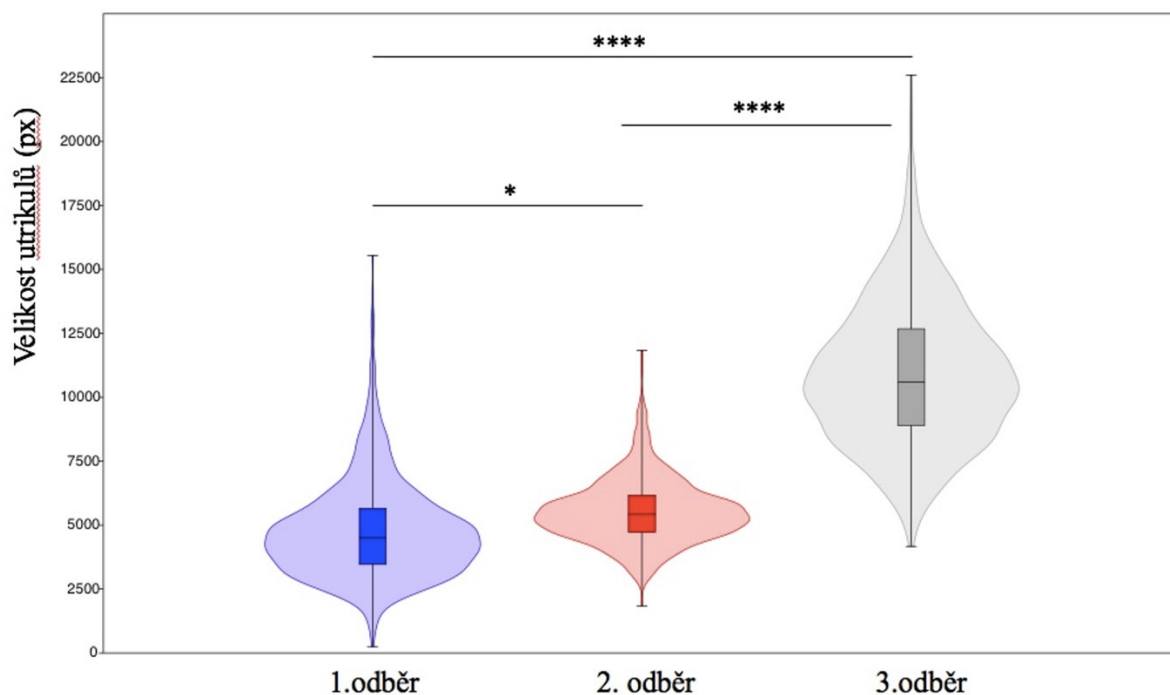


**Obrázek č.22:** Vztah mezi velikostí utrikulů a polohou v rámci segmentu – 3. odběr

Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
horní vs. střední	<0,0001
horní vs. spodní	<0,0001
střední vs. spodní	<0,0001

**Tabulka č.10:** Výsledek statistického srovnání velikosti utrikulů a polohy v rámci segmentu – 3. odběr

Na závěr byla provedena analýza utrikulů porovnávající všechny naměřené hodnoty v jednotlivých měsících bez ohledu na část segmentu. I zde se objevují rozdíly týkající se období odběru. 3. odběr se výrazně lišil jak od prvního, tak od druhého odběru. Velikost utrikulů byla v září roku 2021 téměř dvojnásobná (viz. Obrázek č.23, Tabulka č.11).



**Obrázek č.23:** Vztah mezi velikostí utrikulů a jednotlivými odběry – všechny části

Dunn's multiple comparisons test	Hodnota P
1. odběr vs. 2.odběr	0,0102
1. odběr vs. 3. odběr	<0,0001
2.odběr vs. 3. odběr	<0,0001

**Tabulka č. 11:** Výsledek statistického srovnání velikosti utrikulů v jednotlivých odběrech – všechny části

Naše výsledky tedy ukazují, že z pohledu množství uloženého aragonitu nezáleží na části segmentu, a to i přesto, že se velikost utrikulů, a tedy prostor pro ukládání CaCO<sub>3</sub> napříč segmentem liší. Naopak se zdá, že záleží na tom, ve kterém měsíci v roce je odběr proveden.

## 7 Diskuse

Řasy rodu *Halimeda* patří mezi významné zástupce bentických mořských ekosystémů, jelikož se ve svém důsledku podílejí na vzniku sedimentárních hornin (Hillis-Colinvaux, 1980). Přesto jsou však v řadě aspektů své biologie poměrně málo prozkoumané. Tato práce se zaměřila na vztah anatomické struktury a mikromorfologie s mírou kalcifikace u segmentů druhu *Halimeda tuna* a změny těchto parametrů v průběhu roku na stanovišti poblíž chorvatského ostrova Krk.

Nejdůležitějším bodem diplomové práce bylo zjistit, zda je rozložení aragonitu uvnitř stélek závislé na poloze v rámci jednoho segmentu. Tato otázka byla formulována na základě dat z naší laboratoře publikovaných v roce 2020 (Neustupa & Němcová, 2020). Ta ukázala gradient ve velikostech utrikulů, kdy u nodu (tedy báze) jsou nejmenší a zvětšují se směrem k okrajům a apikální části segmentu. Na základě tohoto faktu jsme předpokládali, že množství uloženého aragonitu by mohlo kopírovat velikost utrikulů, ve kterých je uložen. Výsledky této diplomové práce však tuto hypotézu nepodporují. Podle nich totiž není množství  $\text{CaCO}_3$  nijak závislé na části segmentu, ve které se nachází. Zdá se tedy, že různá velikost utrikulů v rámci jednoho segmentu neovlivňuje množství aragonitu v nich uložených. Alternativní vysvětlení může být, že ke kalcifikaci dochází s různou intenzitou v různých částech segmentů, ale mikrokrystaly aragonitu jsou poté víceméně rovnoměrně transportovány v rámci celého segmentu.

Protože jsme tento výsledek neočekávali, rozhodli jsme se i na našich vzorcích prozkoumat velikost utrikulů. Naše data taktéž potvrzují gradient v jejich velikosti v rámci jednoho segmentu.

Zajímavostí je, že jednotlivé naměřené hodnoty se poměrně značně lišily mezi jednotlivými rostlinami, a tedy indikovaly zjevné rozdíly v množství uloženého  $\text{CaCO}_3$ . I přesto, že byly rostliny odebírány z poměrně malého stanoviště, mohly mít různé podmínky v rámci svého mikrostanoviště, např. v množství dopadajícího světla. Stálo by tedy za zvážení zahrnout v budoucím výzkumu do měřených parametrů i míru ozáření jednotlivých rostlin. Je totiž známo, že kalcifikace je na ozáření přímo závislá (Ortegon-Aznar *et al.*, 2017).

Jako další jsme si položili otázku, zda se námi naměřená data budou nějak lišit v průběhu roku. Za tímto účelem jsme uskutečnili tři odběry – dva na podzim (říjen 2020 a září 2021) a jeden v létě (červen 2021). Původně zamýšlené porovnání množství aragonitu napříč celým rokem (především jaro vs. podzim) se bohužel nepodařilo uskutečnit, a to v důsledku omezení vycestování z České republiky a vstupu do Chorvatska z důvodu pandemie koronaviru. I přesto, že byly odběry v jinou dobu, než se původně zamýšlelo, ukazují získaná data na určitou sezonalitu. Při porovnávání jednotlivých částí segmentů se projevuje vždy stejný trend – nejméně aragonitu se v utrikulech halimedy vyskytuje v říjnu. Tudíž se zdá, že se množství  $\text{CaCO}_3$  v rámci populace konzistentně mění v rámci roku. Sezónní vzorec růstu *H. tuna* byl pozorován již dříve, a to konkrétně u množství stélek a nových segmentů (Ballesteros, 1991a). Sezónní změny jsme potvrdili i při porovnání celých segmentů v jednotlivých odběrech. Nejvíce kalcifikované segmenty byly v červnu. Naše měření jsou v tomto aspektu v souladu s dříve publikovanou studií, která se zabývala mírou kalcifikace v závislosti na teplotě u různých kalcifikujících druhů řas (Ortegon-Aznar *et al.*, 2017). Variabilita v rámci roku je pravděpodobně způsobena měnící se teplotou vody, která byla na ostrově Krk v říjnu roku 2020 průměrně 18,6 °C, v červnu 2021 22°C, zatímco v září téhož roku byla průměrná teplota vody 20,8°C a tyto teploty se zásadně neliší od naměřených hodnot v minulých letech (<https://seatemperature.info>). Naopak, při porovnávání velikosti utrikulů se sezónnost nepotvrdila, z čehož vyplývá, že velikost utrikulů není nijak závislá ani na sezóně ani na míře kalcifikace.

Jak již bylo řečeno, výběr času odběrů nebyl ideální, nicméně z důvodů pandemie koronaviru byl pro tuto diplomovou práci jediný možný. Přesto jsme si i u dalšího sledovaného parametru povšimli pravděpodobné sezonality. Epifytické řasy rostoucí na stélkách *H.tuny* vykazovaly zajímavé rozložení. K našemu překvapení jsme je pozorovali nejvíce v září, v menší míře v červnu. Nicméně v říjnu se již na stélkách naopak nevyskytovaly téměř žádné. Zatímco výskyt epifytů v letním období je v souladu s dřívějšími poznatky (Ballesteros, 1991b), jejich absenci v říjnu jsme neočekávali. Toto pozorování může mít několik vysvětlení. Jedním z pravděpodobných důvodů pro absenci epifytických řas při říjnovém odběru by mohly být rozdílné teploty vody, které se mezi sebou lišily o dva stupně (<https://seatemperature.info>). Dalším možným vysvětlením je existence dvou sezónních cyklů vývoje nových segmentů, kdy první skončí v září a druhý začne v říjnu. Tím pádem ještě epifyté nestihly nové „podzimní“ segmenty porůst.

Spíše spekulativní je potom třetí vysvětlení, a tím je lidský faktor. V sezóně 2020 došlo k dramatickému úbytku lidí v této turisticky vyhledávané lokalitě. Zatím co sezóna 2021 nebyla již tolik ovlivněná protipandemickými opatřeními. Je tedy možné, že víření vody způsobené velkým množstvím lidí je pro epifytické řasy výhodou.

Na základě porovnání množství  $\text{CaCO}_3$  i pozorování množství epifytů se nejvíce pravděpodobná zdá varianta s dvojitým cyklem vývoje segmentů *H. tuna*, jelikož kalcifikace je spjata s fotosyntézou – pokud má tedy rostlina méně světla z důvodu porostu epifytů, měla by i méně kalcifikovat. Jelikož však výsledky této práce ukazují pravý opak, mohlo by se jednat o nové rostliny. Tato hypotéza je poměrně inovativní a bylo by dobré se ji pokusit co nejdříve ověřit.

Přesto že tedy tato diplomová práce nese některé výše diskutované nedostatky, přinesla zajímavé výsledky, které vybízejí k dalšímu zkoumání.

## 8 Závěr

Předmětem této diplomové práce byla zelená makroskopická řasa *Halimeda tuna* z rodu *Halimeda*. Nejdříve byly nasbírány přírodní vzorky na chorvatském ostrově Krk. Na těchto vzorcích jsme zkoumali především rozložení minerálu aragonitu v rámci jednoho segmentu rostliny. Ukázalo se, že v rozprostření  $\text{CaCO}_3$  není viditelný žádný trend – je rovnoměrné. Další zkoumanou veličinou bylo, zda tvorba aragonitu v segmentech vykazuje sezonalitu. Naše data naznačují určité rozdíly na základě odběrů provedených ve třech různých měsících, ovšem pro potvrzení sezonality by bylo nutné sběr dat provést s větší frekvencí. Nakonec jsme provedli měření velikosti utrikulů, které sloužilo jako kontrola předchozí studie naší laboratoře, ze které vyplívá tato diplomová práce. Výsledky tohoto měření dokazují gradient ve velikost utrikulů v rámci jednoho segmentu a vyvrací tedy naši primární hypotézu, že množství aragonitu v jednom segmentu bude ovlivněno jeho stavbou. Povedlo se tedy odpovědět na většinu položených otázek a naplnit tak cíle práce, které jsme si vytyčili. Na tuto práci je možné navázat dalším výzkumem, a to především v oblasti sezonality tvorby  $\text{CaCO}_3$ , kde by výsledky mohly být velmi zajímavé pro širší vědeckou obec.

## 9 Seznam použité literatury

- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*.
- Ballesteros, E. (1989). Production of seaweeds in North-Western Mediterranean marine communities: its relation with environmental factors. *Scientia Marina*. *53*, 357–364.
- Ballesteros, E. (1991a). Seasonality of Growth and Production of a Deep-water Population of *Halimeda tuna* (Chlorophyceae, Caulerpales) in the North-western Mediterranean. *Botanica Marina*. *34*, 291–302.
- Ballesteros, E. (1991b). Structure of a deep-water community of *Halimeda tuna* (Chlorophyceae, Caulerpales) from the North-Western Mediterranean. *Collectanea Botanica*. *20*, 5–21.
- Bermejo, R., Chefaoui, R. M., Engelen, A. H., Buonomo, R., Neiva, J., Ferreira-Costa, J., Pearson, G. A. et al. (2018). Marine forests of the Mediterranean-Atlantic *Cystoseira tamariscifolia* complex show a southern Iberian genetic hotspot and no reproductive isolation in parapatry. *Scientific Reports*. *8*.
- Borowitzka, M. (1982). Morphological and Cytological Aspects of Algal Calcification. *International Review of Cytology*. *74*, 127–162.
- Canals, M., Ballesteros, E. (1997). Production of carbonate particles by phytobenthic communities on the Mallorca-Menorca shelf, northwestern Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. *44*, 611–629.
- De Jode, A., David, R., Haguenaer, A., Cahill, A., Erga, Z., Guillemain, D., Sartoretto, S. et al. (2019). From seascape ecology to population genomics and back. Spatial and ecological differentiation among cryptic species of the red algae *Lithophyllum stictiforme*/L. *cabiochia*, main bioconstructors of coralligenous habitats. *Molecular Phylogenetics Evolution*. *137*, 104–113.
- Dijoux, L., Verbruggen, H., Mattio, L., Duong, N., Payri, C. (2012). Diversity of *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in New Caledonia: A Combined Morphological and Molecular Study. *Journal of Phycology*. *48*, 1465–1481.

- Dragastan, O., Herbig, H.G. (2007). Halimeda (green siphonous algae) from the Paleogene of (Morocco) Taxonomy, phylogeny and paleoenvironment. *Micropaleontology*. 53, 1–72.
- Dragastan, O.N., Schlagintweit, F. (2005). Mesozoic algae of family Protohalimedaceae Dragastan, Littler & Littler, 2002 (Chlorophycota): a critical review. *Acta Palaeontologica Romaniaiae*. 5, 107–140.
- Drew, E. (1983). Halimeda biomass, growth rates and sediment generation on reefs in the central Great Barrier Reef province. *Coral Reefs*. 2, 101–110.
- Flügel, E. (1988). Halimeda: paleontological record and palaeoenvironmental significance. *Coral Reefs*. 6, 123–130.
- Hammer, O., Harper, D., Ryan, P. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4, 1–9.
- Hillis-Colinvaux, L. (1980). Ecology and taxonomy of Halimeda: primary producer of coral reefs. *Advances in Marine Biology*. 17, 1–327.
- Hine, A.C., Hillock, P., Harris, M.W., Mullins, H.T., Belknap, D.F., Jaap, W.C. (1988). Halimeda bioherms along an open seaway: Miskito Channel, Nicaraguan Rise, SW Caribbean Sea. *Coral Reefs*. 6, 173–178.
- Lam, D., Zechman, F. (2006). Phylogenetic analyses of the bryopsidales (Ulvophyceae, Chlorophyta) based on RUBISCO large subunit gene sequences. *Journal of Phycology*. 42, 669–678.
- Llobet, Coma, R., Zabala, M., Gili, Josep-Maria, Hughes, R. (1991). The population dynamics of *Orthopyxis crenata* (Hartlaub, 1901) (Hydrozoa, Cnidaria), an epiphyte of *Halimeda tuna* in the northwestern Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 150, 283–292.
- Llobet, I., Gili, Josep-Maria, Hughes, R. (1991). Horizontal, vertical and seasonal distributions of epiphytic hydrozoa on the alga *Halimeda tuna* in the Northwestern Mediterranean Sea. *Marine Biology*. 110, 151–159.



- Ma. Chiela, C., Leliaert, F., Rossetto Marcelino, V., Verbruggen, H. (2018). Large Diversity of Nonstandard Genes and Dynamic Evolution of Chloroplast Genomes in Siphonous Green Algae (Bryopsidales, Chlorophyta). *Genome Biology and Evolution*. *10*, 1048–1061.
- Ma. Chiela, C., Leliaert, F., West, J., Lam, D., Shimada, S., Lopez-Bautista, J., Verbruggen, H. (2018). Reassessment of the classification of Bryopsidales (Chlorophyta) based on chloroplast phylogenomic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. *130*, 397–405.
- Mayakun, J., Prathep, A. (2018). Calcium carbonate productivity by *Halimeda macroloba* in the tropical intertidal ecosystem: The significant contributor to global carbonate budgets. *Phycological Research*. *67*, 94–101.
- Merten, M.J. (1971). Ecological observations of *Halimeda macroloba* De-caisne (Chlorophyta) on Guam. *Micronesica*. *7*, 27–44.
- Multer, H. G., Clavijo, I. (2004). *Halimeda* investigations: progress and problems. *NOAA/RSMAS*, 117–127.
- Neustupa, J., Nemcova, Y. (2020). Morphometric Analysis of Surface Utricles in *Halimeda tuna* (Bryopsidales, Ulvophyceae) Reveals Variation in Their Size and Symmetry within Individual Segments. *Symmetry*. *12*, 1271.
- Neustupa, J., Nemcova, Y. (2022). Geometric morphometrics shows a close relationship between the shape features, position on thalli, and CaCO<sub>3</sub> content of segments in *Halimeda tuna* (Bryopsidales, Ulvophyceae). *Hydrobiologia*. *849*, 2581–2594.
- Nose, M., Schlagintweit, F., Nützel, A. (2018). New record of halimedacean algae from the Upper Triassic of the Southern Alps (Dolomites, Italy). *Research in Paleontology and Stratigraphy*. *124*, 421–431.
- Ortegon-Aznar, I., Chuc-Contreras, A., Collado-Vides, L. (2017). Calcareous green algae standing stock in a tropical sedimentary coast. *Journal of Applied Phycology*. *29*, 2685–2693.

- Peach, K., Koch, M., Blackwelder, P., Guerrero-Given, D., Kamasawa, N. (2017). Primary utricle structure of six *Halimeda* species and potential relevance for ocean acidification tolerance. *Botanica Marina*. *60*, 1–11.
- Pongparadon, S., Zuccarello, G.C., Phang, S.M., Kawai, H., Hanyuda, T., Prathep, A. (2015). Diversity of *Halimeda* (Chlorophyta) from the Thai–Malay Peninsula. *Phycologia*. *54*, 349–366.
- Rees, S.A., Opdyke, B., Wilson, P.A., Henstock, T. (2007). Significance of *Halimeda* bioherms to the global carbonate budget based on a geological sediment budget for the Northern Great Barrier Reef, Australia. *Coral Reefs*. *26*, 177–188.
- Reuter, M., Piller, W., Richoz, S. (2012). The dispersal of *Halimeda* in northern hemisphere mid-latitudes: Palaeobiogeographical insights. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics*. *14*, 303–309.
- Rindi, F., Pasella, M., Lee, M., Verbruggen, H. (2020). Phylogeography of the mediterranean green seaweed *Halimeda tuna* (Ulvophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*. *56*, 1109–1113.
- Roberts, H.H., Aharon, P., Phipps, C.V. (1988). Morphology and sedimentology of *Halimeda* bioherms from the eastern Java Sea (Indonesia). *Coral Reefs*. *6*, 161–172.
- Roberts, H.H., Phipps, C.V., Effendi, L. (1987a). *Halimeda* bioherms of the eastern Java Sea, Indonesia. *Geology*. *15*, 371–374.
- Roberts, H.H., Phipps, C.V., Effendi, L. (1987b). Morphology of large *Halimeda* bioherms, eastern Java Sea (Indonesia): a side scan sonar study. *Geo-Marine Letters*. *7*, 7–14.
- Rohlf, F. (2015). The Tps series of software. *Hystrix*. *26*, 1–4.
- Serra, I. A., Innocenti, A. M., Di Maida, G., Calvo, S., Migliaccio, M., Zambianchi, E., Pizzigalli, C., Arnaud-Haond, S., Duarte, C. M., Serrão, E. A., Procaccini, G. (2010). Genetic structure in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: disentangling past vicariance events from contemporary patterns of gene flow. *Molecular ecology*. *19*, 557–568.

- Stanley, S., Ries, J., Hardie, L.A. (2010). Increased Production of Calcite and Slower Growth for the Major Sediment-Producing Alga *Halimeda* as the Mg/Ca Ratio of Seawater is Lowered to a "Calcite Sea" Level. *Journal of Sedimentary Research*. *80*, 6–16.
- Verbruggen, H., De Clerck, O., Schils, T., Kooistra, W.H.C.F. (2005b). Evolution and phylogeography of *Halimeda* section *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. *37*, 789–803.
- Verbruggen, H., Kooistra, W.H.C.F. (2004). Morphological characterization of lineages within the calcified tropical seaweed genus *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*. *39*, 213–228.
- Verbruggen, H., Vlaeminck, C., Sauvage, T., Sherwood, A. R., Leliaert, F., De Clerck, O. (2009). Phylogenetic analysis of pseudochlorodesmis strains reveals cryptic diversity above the family level in the siphonous green algae (bryopsidales, chlorophyta). *Journal of phycology*. *45*, 726–731.
- Verbruggen, H., Ashworth, M., LoDuca, S., Vlaeminck, C., Cocquyt, E., Sauvage, T., Zechman, F., Littler, D., Littler, M., Leliaert, F., Clerck, O. (2009). A multi-locus time-calibrated phylogeny of the siphonous green algae. *Molecular phylogenetics and evolution*. *50*, 642–53.
- Vitales, D., Aragay, J., Garnatje, T., Gomez Garreta, A., Rull Lluç, J. (2019). Phylogeography of *Dictyota fasciola* and *Dictyota mediterranea* (Dictyotales, Phaeophyceae): unexpected patterns on the Atlantic-Mediterranean marine transition and taxonomic implications. *Peer J*. *7*, e6916.
- Vroom, P. S., Smith, C. M., Coyer, J. A., Walters, L. J., Hunter, C. L., Beach, K. S., Smith, J. E. (2003). Field biology of *Halimeda tuna* (Bryopsidales, Chlorophyta) across a depth gradient: comparative growth, survivorship, recruit-ment, and reproduction. *Hydrobiologia*. *501*, 149–166.
- Wilbur, K. M., Colinvaux, L., Hillis, Watabe, N. (1969). Electron microscope study of calcification in the alga *Halimeda* (order Siphonales). *Phycologia*. *8*, 27–35.

Ximenes, C., Cassano, V., Oliveira-Carvalho, M., Bandeira-Pedrosa, M., Gurgel, C., Verbruggen, H., Barreto-Pereira, S. (2017). Systematics of the genus *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil including the description of *Halimeda jolyana* sp. nov. *Phycologia*. 56, 369–381.

Ximenes, C., Oliveira-Carvalho, M., Bandeira-Pedrosa, M., Cassano, V. (2019). Updates on Section *Pseudo-opuntia* of *Halimeda* phylogenetic analyses of *H. soniae* sp. nov. (Bryopsidales Chlorophyta) along the Brazilian coast. *Botanica Marina*. 62, 327–336.

Čečmanová, A., (2020). Zelené řasy čeledi Halimedaceae a jejich globální ekologický význam. 38.

Internetové zdroje:

[www.algeabase.org](http://www.algeabase.org) (stav z července 2022)

<https://seatemperature.info> (stav z července 2022)