

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Protistologie



Diplomová práce

**Rekonstrukce morfologické evoluce a fylogenetických vztahů
šupinatých chrysomonád rodu *Mallomonas***

**Reconstructing the evolution and phylogenetic relationships of
silica-scaled chrysophyte genus *Mallomonas***

Bc. Dora Čertnerová

Školitel: Doc. Mgr. Pavel Škaloud, Ph.D.

Praha, 2015

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, 12. 8. 2015

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli Pavlu Škaloudovi za trpělivé vedení mé práce i za neutuchající nápaditost a inspiraci. Ze srdce musím poděkovat i mému nejmilovanějšímu člověku, manželovi, Martinu Čertnerovi, který při mě po celou dobu studia stál a vše se mnou tolik prožíval! Za pomoc a inspiraci moc děkuji i kamarádovi Martinu Pusztaiovi a dále i Mirkovi Hylišovi. Děkuji také Lence Flaškové a Gábině Fuxové za cenné rady a připomínky k molekulárním analýzám. Velké poděkování patří také Yvonne Němcové a Evgenu Gusevovi, kterým tímto děkuji za zapůjčení kultur. Zároveň děkuji i všem kamarádům z algologické skupiny za příjemnou pracovní atmosféru!

Abstrakt:

Rod *Mallomonas* (Synurales, Synurophyceae) se vyznačuje obrovskou variabilitou křemičitých šupin, na kterých byl vystavěn i druhový koncept tohoto rodu. Cílem této práce bylo objasnit fylogenetické vztahy mezi jednotlivými zástupci a rekonstruovat morfologickou evoluci křemičitých struktur na šupinách. V rámci diplomové práce byly získány sekvence pro šest druhů, pro které doposud molekulární data chyběla. Poprvé je tak známo jejich umístění na fylogenetickém stromě zástupců rodu. Rod *Mallomonas* je rozdělen do dvou hlavních evolučních linií, které lze (s několika výjimkami) rozlišit i na základě přítomnosti či nepřítomnosti struktury V-žebra. Ornamentace povrchu křemičitých šupin je druhově specifická, a rozdíly v morfologii šupin do značné míry odrážejí i fylogenetické vztahy jednotlivých zástupců. Morfologický koncept pojetí druhu se tak zdá být v kontextu našich výsledků oprávněný. Morfologicky vymezené sekce rodu jsou však nezřídka parafyletické, v důsledku začlenění menších sekcí (často zastoupených jediným druhem) do sekcí větších jako jejich vnitřních skupin. U těchto druhů došlo k velmi rychlé morfologické evoluci, která měla za následek radikální odlišení fenotypu druhů od jejich nejbližších příbuzných. Ze srovnání křemičitých šupin recentních a fosilních zástupců rodu *Mallomonas* je zřejmé, že některé taxony zůstávají v morfologické stázi i po dobu desítek milionů let. Naopak taxony jiné prošly ve stejném časovém rámci nápadnou morfologickou proměnou. Evoluce morfologických znaků byla rekonstruována a graficky vynesena na fylogenetický strom pro 18 binárních a 11 kvantitativních znaků, u kterých byl na základě evolučních parametrů D a λ detekován signifikantní fylogenetický signál. Jednotlivé morfologické znaky se velmi často lišily rekonstruovanými evolučními trendy. Některé ze studovaných struktur vznikly v evoluci rodu *Mallomonas* jen jednou a byly konzervovány, vývoj jiných struktur byl podstatně dynamičtější a zahrnoval nezávislé vzniky a druhotné ztráty. Charakter evoluce křemičitých struktur je tak značně variabilní a závisí jak na konkrétní evoluční linii rodu, tak i na konkrétním sledovaném znaku.

Klíčová slova: *Mallomonas*, evoluce tvaru, křemičitá šupina, fylogeneze, Synurales

Abstract:

The taxonomic concept of the algal genus *Mallomonas* (Synurales, Synurophyceae) was based on an extraordinary morphological diversity of their siliceous scales. The main aims of this study were elucidation of phylogenetic relationships among its representatives and reconstruction of shape evolution of particular siliceous structures of their scales. Molecular data for six species were acquired for the first time, enabling a successful assessment of their phylogenetic relationships with the other representatives of the genus. On the basis of molecular data, the genus *Mallomonas* can be divided in two evolutionary lineages and this division is also reflected morphologically (with only a few exceptions) through presence or absence of a V-rib structure. Fine ornamentation of siliceous scales is species-specific and interestingly, the overall differences in morphology of siliceous scales are mostly reflecting phylogenetic relationships among representatives of the genus. In this context, morphological species concept of *Mallomonas* seems to be justified. Morphologically-based sections of the genus are often paraphyletic, because small sections (frequently containing only single species) tend to be nested within particular larger sections. The main reason for this discrepancy is accelerated morphological evolution of some species, which leads to striking differences in phenotypes between such species and their closest relatives. Morphological comparisons of siliceous scales belonging to both recent and fossil accessions of some species of *Mallomonas* suggested that morphology of some of the taxa have not changed over tens of millions years. On the other hand, some other taxa underwent conspicuous changes of their overall morphology in the same time frame. For morphological traits with a significant phylogenetic signal estimated using parameters D and lambda, reconstructed trends of shape evolution were mapped on a phylogenetic tree. The trends of shape evolution of particular morphological structures were quite various. While some of the structures likely had single origin and conserved evolution, the evolution of other structures was more dynamic, with independent origins and secondary losses. Thus the character of evolution of siliceous structures depends both on a morphological trait studied and a particular evolutionary lineage of the genus *Mallomonas*.

Key words: *Mallomonas*, shape evolution, siliceous scale, phylogeny, Synurales

Seznam použitých zkratk:

μm = mikrometry

BI = Bayesian inference, Bayesovská analýza

HGT = horizontální genový přenos

ML = Maximum likelihood, Metoda maximální věrohodnosti

MP = Maximum parsimony, Metoda maximální parsimonie

nm = nanometry

PP = posteriorní Bayesianská pravděpodobnost

Obsah

1. Úvod.....	3
1.1. Evoluce tvaru živých organismů.....	3
1.2. Studium evoluce struktur u organismů.....	4
1.2.1. Rekonstrukce ancestrálních hodnot kvantitativních znaků.....	4
1.2.2. Stochastické mapování kvalitativních znaků.....	5
1.2.3. Parametry popisující charakter evoluce znaku.....	6
1.2.3.1. Evoluční parametry lambda, kappa a delta.....	6
1.2.3.2. Evoluční parametr D.....	7
1.2.4. Rekonstrukce evoluce fenotypového znaku z fosilního záznamu.....	8
1.3. Biomineralizace.....	8
1.4. Biosilicifikace u Stramenopiles.....	8
1.5. Dostupnost křemíku během různých geologických období.....	9
1.6. Význam křemičitých struktur pro Stramenopilní organismy.....	10
1.7. Diverzita a vznik křemičitých struktur u zlativek (Chrysophyceae).....	11
1.8. Představení rodu <i>Mallomonas</i> jako modelové skupiny.....	13
1.8.1. Křemičité šupiny rodu <i>Mallomonas</i>	13
1.8.2. Fylogenetické vztahy rodu <i>Mallomonas</i>	14
1.8.3. Fosilní záznam křemičitých struktur rodu <i>Mallomonas</i> a dalších zástupců Chrysophyceae.....	15
2. Otázky kladené v diplomové práci.....	17
3. Materiál a metody.....	18
3.1. Odběr planktonních vzorků.....	18
3.2. Kultivace řas <i>in vitro</i>	18
3.2.1. Příprava modifikovaného DY IV média.....	19
3.3. Determinace druhů.....	19
3.3.1. Příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii.....	20
3.3.2. Transmisní elektronová mikroskopie.....	20
3.4. Molekulární analýzy.....	21
3.4.1. Izolace DNA.....	21
3.4.2. PCR amplifikace studovaných úseků DNA.....	21
3.4.3. Hodnocení sekvenčních dat.....	24

3.5.	Fylogenetické analýzy	24
3.5.1.	Pilotní Bayesovská analýza	24
3.5.2.	Fylogenetická analýza v programu BEAST	25
3.5.3.	Výpočet statistické podpory BI fylogenetických stromů	27
3.6.	Hodnocení morfologie křemičitých struktur rodu <i>Mallomonas</i>	27
3.6.1.	Analýza tvarové diverzity křemičitých struktur rodu <i>Mallomonas</i>	29
3.6.2.	Evoluce tvaru křemičitých struktur	30
3.6.2.1.	Testování evolučních trendů	30
3.6.2.2.	Rekonstrukce evoluce morfologických znaků	31
3.6.3.	Srovnání morfologické podobnosti a fylogenetických vztahů rodu <i>Mallomonas</i>	32
4.	Výsledky	33
4.1.	Fylogenetické analýzy	33
4.1.1.	Fylogenetický BI strom	33
4.1.2.	Časově kalibrovaný BI fylogenetický strom	36
4.2.	Tvarová diverzita křemičitých struktur u zástupců rodu <i>Mallomonas</i>	38
4.3.	Testování evolučních trendů pro jednotlivé znaky	40
4.3.1.	Evoluce morfologických znaků kódovaných binárními proměnnými	40
4.4.	Rekonstrukce evoluce morfologických znaků	45
4.4.1.	Mapování rekonstruované evoluce binárních znaků na fylogenetický strom	45
4.4.2.	Mapování rekonstruované evoluce kvantitativních znaků na fylogenetický strom	55
5.	Diskuze	65
5.1.	Fylogenetické vztahy mezi zástupci rodu <i>Mallomonas</i>	65
5.2.	Morfologická podpora současného taxonomického členění rodu <i>Mallomonas</i>	67
5.3.	Fosilní záznam a tempo evoluce	69
5.4.	Trendy evoluce tvaru křemičitých struktur zástupců rodu <i>Mallomonas</i>	70
5.5.	Vznik a zánik křemičitých struktur v průběhu evoluce	72
5.6.	Rekonstrukce fenotypu předka rodu <i>Mallomonas</i>	74
6.	Seznam citované literatury	75
7.	Přílohy	84

1. Úvod

1.1. Evoluce tvaru živých organismů

Současná rozmanitost tvarů a forem živých organismů (tzv. disparita) je výsledkem evoluce, resp. působení nejrůznějších evolučních procesů na předky dnes žijících organismů. Existuje celá řada procesů a faktorů, které ovlivnily, do jaké podoby se současné druhy vyvinuly. Jedním z nejdůležitějších evolučních procesů je přirozený výběr (Darwin, 1859). V průběhu přirozené selekce se mezi různými formami organismů vybírá ta, u které je reprodukční příspěvek jejich nositelů do následující generace vyšší, než nositelů podoby odlišné. Přirozený výběr však není zdaleka jediným faktorem ovlivňujícím morfologické vlastnosti jedince. Tvary živých organismů jsou dány i působením abiotických faktorů přirozeného prostředí, ve kterém se druhy nachází. Jedná se o teplotu, vlhkost, míru slunečního záření, pH apod., se kterými se druhy mohou vyrovnat v důsledku vzniku nejrůznějších adaptací (Orr, 2005). Na morfologii struktur živých organismů však působí i celá řada neadaptivních mechanismů. Mnohé vlastnosti organismu, označované jako spandrelly (Gould, 2002), se utvářejí jako nutnost či vedlejší produkt vzniku znaku jiného.

Existují také nejrůznější evoluční omezení (angl. „evolutionary constraints“), jež limitují teoreticky možnou fenotypovou variabilitu, do které se organismus může vyvinout, nebo jeho vývoj směřují po určité dráze. Vývojová omezení jsou způsobena strukturálními limitacemi stavebních plánů těl nebo charakterem a průběhem ontogenetického vývoje. Biomechanická omezení vyvstávají v důsledku působení fyzikálních zákonů, limitovaného prostoru, energie, nebo času (Brakefield & Roskam, 2006).

Složitě tělní plány či struktury však mohly vzniknout i procesem konstruktivní neutrální evoluce. Neutrální evoluce představuje proces neadaptivního driftu, resp. náhody. Často je ale velice obtížné rozpoznat, zda konkrétní struktura vznikla v důsledku adaptace, či v důsledku konstruktivní neutrální evoluce, jelikož struktura vzniklá neutrálně mohla v průběhu evoluce získat funkci jinou, již nesouvisející s jejím původním vznikem (Gray et al., 2010).

Podoba, do které se jednotlivé organismy vyvinuly, jim v jejich současném prostředí vyhovuje pouze tehdy, pokud se podmínky prostředí změnilo jen málo a zároveň pomalu. Dříve nebo později jsou však organismy vystaveny okolním změnám prostředí. V případě, že si druhy po dlouhou dobu uchovávají stále stejný vzhled, nachází se v tzv. evoluční stázi. Milným dojmem se nám může tento proces jevit jako pasivní. Fenotyp, jenž dlouhodobě neprochází změnami, musí ale neustále odolávat nejrůznějším selekčním tlakům či fluktuacím vlivem náhodných procesů (Erwin, 2000).

Celá řada organismů naopak prochází anagenetickými procesy a mění tak v průběhu vývoje svůj vzhled. Ke změnám dochází na základě dvou modelů: gradualistického, podle kterého změny probíhají pozvolně, a punktualistického, při kterém se vzhled změní skokově, a to pouze v průběhu speciace nebo v krátké době po ní. V případě punktualistické evoluce probíhá tzv. nespojitá anageneze podle teorie přerušovaných rovnováh (angl. „punctuated equilibrium“; Gould & Eldredge, 1993).

1.2. Studium evoluce struktur u organismů

Průběh evoluce morfologických struktur je možné rekonstruovat pomocí fylogenetických srovnávacích metod (angl. „phylogenetic comparative methods“), a to na základě znalosti fylogenetických vztahů mezi recentními zástupci studované skupiny a konkrétní podobou určitého morfologického znaku mezi nimi (Nunn, 2011). V datových souborech charakterizujících fenotyp organismů je často patrná fylogenetická závislost, vyplývající ze skutečnosti, že čím jsou si dva taxony příbuznější, tím také s větší pravděpodobností disponují podobnějšími hodnotami určitého znaku (Martins, 1996). Takové fylogenetické korelace mohou např. komplikovat statistické hodnocení fenotypových znaků, protože jednotlivá pozorování nejsou nezávislá. Fylogenetické srovnávací metody však disponují řadou evolučních aplikací, jakými jsou např. rekonstrukce ancestrálních stavů znaků nebo charakter předpokládaných změn znaku v průběhu evoluční historie studované skupiny (Martins, 1996). Z důvodu velkého množství různých fylogenetických srovnávacích metod jsou v následujících kapitolách představeny hlavně metody použité v této diplomové práci.

1.2.1. Rekonstrukce ancestrálních hodnot kvantitativních znaků

Pro modelování evoluce kvantitativních morfologických znaků v kontextu fylogeneze je často využívána metoda stanovení ancestrálních hodnot znaku (angl. „ancestral character estimation“), dostupná např. v knihovně „ape“ programu R (Popescu et al., 2012). Metodou „maximum likelihood“ (ML; případně dalšími metodami) je vytvořen základní model historické evoluce znaku, který odpovídá Brownovu pohybu (Schluter et al., 1997). Stejně jako se náhodným způsobem pohybují mikroskopické částice v kapalném či plynném médiu je i v modelu evoluce znaku Brownovým pohybem směr i míra změny hodnoty v každém bodu náhodná a zároveň nezávislá na ostatních větvích fylogenetického stromu. Brownův pohyb neslouží pouze k modelování neutrální evoluce, může být použit i pro rekonstrukci hodnot adaptivního znaku, jehož variabilita je do určité míry náhodná v rámci rozmezí určovaných selekčními tlaky (např. stabilizující selekce; Schluter et al., 1997). V případech,

kdy se předpokládá značný vliv selekce, může být model evoluce Brownovým pohybem nahrazen Ornstein-Uhlenbeckovým modelem, který je z modelu evoluce Brownovým pohybem odvozený (Revell, 2013). Ornstein-Uhlenbeckův model předpokládá náhodné změny v rámci stanoveného rozmezí hodnot (Beaulieu et al., 2012). Rekonstrukce ancestrálních hodnot znaku v ML modelu evoluce jsou založeny na minimalizaci součtu druhých mocnin změn podél větví fylogenetického stromu (Schluter et al., 1997). Ancestrální hodnoty znaků je možné graficky znázornit na fylogenetickém stromě např. prostřednictvím funkce „contMap“ z R knihovny „phytools“ (Revell, 2013). Tato funkce využívá k interpolaci hodnot z uzlů a jejich grafické vynesení na větve metodu, kterou zavedl Felsenstein (1985).

1.2.2. Stochastické mapování kvalitativních znaků

Mezi běžně užívané metody rekonstrukce evoluční historie kvalitativních znaků patří stochastické mapování znaku (angl. „stochastic character mapping“; Huelsenbeck et al., 2003). Principem stochastického mapování je náhodný výběr z množiny teoreticky možných evolučních historií znaku. Pravděpodobnost výběru konkrétní historie je určena její posteriorní pravděpodobností ve vytvořeném modelu evoluce znaku, která vychází z dané topologie fylogenetického stromu a hodnot fenotypového znaku. Jako model evoluce znaku je zpravidla využíván časově kontinuální Markovův řetězec (angl. „continuous-time Markov chain“, CTMC) nabývající diskretních hodnot (Huelsenbeck et al., 2003; Revell, 2014). Před vlastním stochastickým mapováním se vytvoří matice pravděpodobností přechodů mezi všemi hodnotami fenotypového znaku. Zpravidla je předpokládána stejná pravděpodobnost změn mezi všemi hodnotami znaku, fixovaná na nejpravděpodobnější hodnotu určenou prostřednictvím ML metody, jak např. předpokládají funkce stochastického mapování v knihovně „phytools“ statistického programu R (Revell, 2012). Náhodný výběr historií znaku je během stochastického mapování proveden opakovaně (obvykle 100 nebo 1000 krát), aby byl získán reprezentativní vzorek z posteriorní distribuce možných historií znaku. Vybrané historie znaku se mezi sebou často liší rekonstruovanými ancestrálními hodnotami v uzlech fylogenetického stromu a předpokládanými změnami hodnot podél jeho větví. Ve výsledku je tak shrnuta pravděpodobnost, s jakou byla konkrétní hodnota znaku na konkrétním nodu zastoupena v rámci opakovaných náhodných výběrů historie znaku. V případě, že studovaný kvalitativní znak nabývá dvou stavů (tj. binární), je možné jeho evoluční rekonstrukci graficky znázornit na fylogenetickém stromě vynesáním posteriorní pravděpodobnosti jedné z

hodnot ve všech nodech a na větvích, prostřednictvím funkce „densityMap“ dostupné v R knihovně „phytools“ (Revell, 2013).

Avšak omezením plynoucím z použití CTMC modelu při stochastickém mapování je, že hodnotu ancestrálního stavu znaku na kořenovém uzlu fylogenetického stromu (odpovídající předku studované skupiny) není možné spolehlivě rekonstruovat (Revell, 2014).

1.2.3. Parametry popisující charakter evoluce znaku

Vývoj morfologického znaku během fylogeneze studované skupiny je možné číselně vyjádřit a statisticky zhodnotit pomocí hodnot celé řady parametrů.

1.2.3.1. Evoluční parametry lambda, kappa a delta

Srovnáním současné podoby zvoleného kvantitativního znaku s topologií fylogenetického stromu lze stanovit hodnotu tzv. škálovacích parametrů lambda (λ), kappa (κ) a delta (δ ; Pagel et al., 2004). Výpočet těchto evolučních parametrů je založen na regresní metodě „phylogenetic generalized least squares“ (PGLS), implementované např. v knihovně „caper“ statistického programu R (Orme et al., 2013). Jednotlivé hodnoty škálovacích parametrů jsou vypočteny ML metodou, případně na základě Bayesovského principu (MCMC metodou). V případě, že se v datech nachází silný fylogenetický signál, a kvantitativní znak se vyvíjí v souladu s danou topologií fylogenetického stromu, blíží se hodnota parametru lambda (λ) jedné (tab. 1). Naopak hodnota lambdy klesající až k nule charakterizuje nezávislost zvoleného kvantitativního znaku na průběhu fylogeneze.

U kvantitativních morfologických znaků můžeme určit i předpokládanou rychlost jejich evoluce v různých částech fylogenetického stromu. Parametr kappa (κ ; Pagel et al., 2004) po svém začlenění do modelu evoluce znaku ovlivňuje „natahování“ a „zkracování“ délek různých větví fylogenetického stromu. Standardně je tento parametr nastaven na hodnotu 1, kdy je evoluce řízena modelem gradualismu. Pokud dosahuje parametr kappa hodnoty větší než 1, delší větve fylogenetického stromu přispívají k podobě fenotypového znaku více než ty krátké, a rychlost evoluce znaku jako by se na delších větvích zvyšovala. V opačné situaci, kdy je kappa nižší jedné, se dlouhé větve fylogenetického stromu nachází v evoluční stázi. V extrémním případě, kdy je kappa rovna nule, je evoluce znaku nezávislá na délce větví. Taková situace odpovídá punktualistickému modelu evoluce (tab. 1).

Škálovací parametr delta (δ ; Pagel et al., 2004) zohledňuje celkovou délku fylogenetické dráhy od kořene stromu k jednotlivým druhům i její jednotlivé části sdílené různými druhy.

Tento parametr odráží, jestli se rychlost evoluce znaku zrychluje či zpomaluje směrem od kořene fylogenetického stromu k jeho koncovým větvím, a slouží především k odhalení adaptivních radiací. V případě adaptivní radiace nabývá parametr delta hodnoty menší než 1 a k evoluční změně dojde na krátkých fylogenetických drahách v rámci skupiny příbuzných druhů. V opačné situaci, kdy parametr hodnotu 1 převyšuje, k evoluci znaku více přispívají delší fylogenetické dráhy a jednotlivé druhy se adaptují nezávisle na sobě (tab. 1).

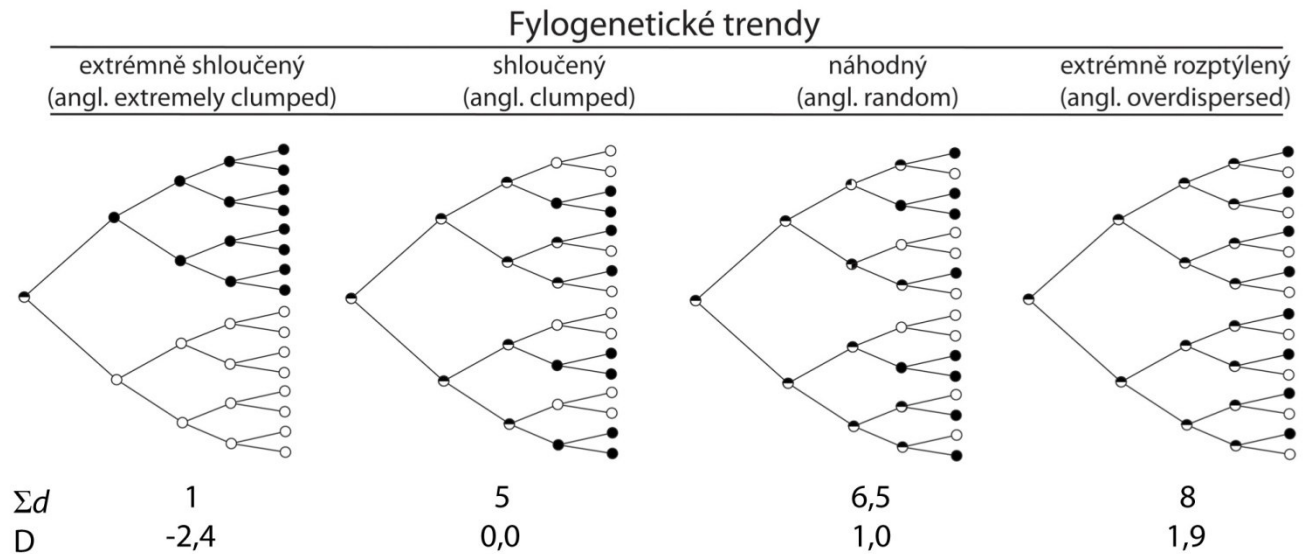
Tab. 1. Škálovací parametry charakterizující evoluci kvantitativního znaku a jejich interpretace (upraveno dle Pagel et al., 2004)

parametr:	interpretace:	0	<1	1	>1
lambda (λ)	vliv fylogeneze	bez vlivu fylogeneze	malý vliv fylogeneze	ovlivněno fylogenezi	nedefinováno
kappa (κ)	vliv délky větví fylogenetického stromu	punktualismus	stáze v delších větvích	gradualismus	více změn na delších větvích
delta (δ)	vliv vzdálenosti taxonu od kořene	nedefinováno	adaptivní radiace	gradualismus	druhově specifická radiace

1.2.3.2. Evoluční parametr D

Evoluční trendy u binárních fenotypových znaků (tj. přítomnost / nepřítomnost struktury) je možné vyjádřit pomocí parametru D (Fritz & Purvis, 2010). K výpočtu hodnoty parametru slouží tzv. Fritz-Purvisův test, který je implementovaný např. v knihovně „caper“ statistického programu R (Orme et al., 2013). Hodnota parametru D je odvozena ze součtu změn znaků mezi všemi sesterskými větvemi fylogenetického stromu. Pokud je fylogenetický signál v datech silný, hodnoty binárního znaku jsou extrémně shloučené a většina srovnávaných sesterských skupin se neliší charakterem znaku, parametr D pak nabývá nejnižších hodnot (tab. 2). V opačném případě jsou hodnoty binárního znaku extrémně rozptýlené (angl. „overdispersed“), kdy se naprostá většina sesterských skupin liší charakterem znaku a hodnota parametru D je tak vysoká. Pokud je distribuce hodnot znaku náhodná v souvislosti s danou topologií fylogenetického stromu, parametr D nabývá hodnoty 1. V případě, kdy je možné variabilitu binárního znaku vysvětlit modelem evoluce Brownovým pohybem, parametr D se blíží nule (Fritz & Purvis, 2010).

Tab. 2. Parametr D charakterizující evoluci kvalitativního znaku a jeho interpretace. Hodnoty Σd ilustrují rozdíly v počtu změn znaku mezi sesterskými skupinami fylogenetického stromu (upraveno dle Fritz & Purvis, 2010).



1.2.4. Rekonstrukce evoluce fenotypového znaku z fosilního záznamu

Alternativním způsobem, jak rekonstruovat průběh evoluce fenotypového znaku, je studium fosilního záznamu. Obvykle však bývá tento způsob velmi problematický, protože fosilní záznam většiny skupin organismů je neúplný (Eldredge & Gould, 1996). Tato skutečnost platí obzvláště pro protistní mikroorganismy, jejichž fosílie se jen velmi obtížně uchovávají ve fosilním záznamu. A pokud ano, jen zřídka jsou na nich vyvinuty morfologické znaky, které by bylo možno zkoumat. Výjimku však tvoří jednobuněčná eukaryota se schopností biomineralizace vytvářející nejrůznější mineralizované struktury (Lazarus, 1983).

1.3. Biomineralizace

U protistních mikroorganismů se tvorba různorodých mineralizovaných struktur stala velmi rozšířeným fenoménem (Mayama & Kuriyama, 2002; Belton et al., 2012; Lemloh et al., 2013). Mikroorganismy mohou jako materiál využívat křemík, vápník, mangan nebo železo. Křemík se však stal nejčastěji používaným prvkem pro stavbu nejrůznějších struktur, nejen díky svému běžnému výskytu v prostředí, ale i díky mnoha svým specifickým fyzikálním vlastnostem (Mayama & Kuriyama, 2002).

1.4. Biosilicifikace u Stramenopiles

Mezi největší eukaryotické skupiny hojně využívající křemík patří Stramenopiles. Jejich struktury vykazují značnou morfologickou i ultrastrukturní variabilitu, která může být i

druhově specifická. Taxonomie celé řady Stramenopilních organismů je tak založena právě na jejich proměnlivosti (například Siver, Wolfe, et al., 2013a; Škaloud et al., 2013; Kloster et al., 2014; Scoble & Cavalier-Smith, 2014). U linie Stramenopiles se schopnost tvorby křemičitých struktur (biosilicifikace) vyvinula v evoluci pravděpodobně hned několikrát nezávisle na sobě (např. u Chrysophyceae, Dictyochophyceae či Bacillariophyceae; Riisberg et al., 2009; Yang et al., 2012). Hlavním dokladem nezávislého vzniku je značná sekvenční odlišnost v genech pro transportéry hydroxidu křemičitého mezi různými liniemi Stramenopiles (Raven & Giordano, 2009). Tuto hypotézu podporují i fylogenetické studie založené na sekvencích jaderných i chloroplastových genů, podle nichž zástupci s křemičitými strukturami netvoří v rámci Stramenopiles monofyletickou linii (Riisberg et al., 2009; Yang et al., 2012). Skupiny, které využívají křemík jako stavební materiál jsou tak ve Stramenopiles rozmístěny mozaikovitě spolu se skupinami bez schopnosti biosilicifikace (např. Phaeophyceae, Eustigmatophyceae či Pedinellophyceae).

Kromě vysvětlení, že všechny Stramenopilní linie získali schopnost biosilicifikace nezávisle na sobě existují ale i další hypotézy vysvětlující hojný výskyt křemičitých struktur. Podle jedné teorie mohl existovat společný předek schopný vytvářet křemičité povrchy a jeho potomci tuto vlastnost zdělili. Tato možnost je velmi pravděpodobná zvláště pro nižší taxonomické jednotky, jako jsou třídy. Například u zlativek (Chrysophyceae) a rozsivek (Bacillariophyceae) se zřejmě schopnost biosilicifikace vyvinula pouze jednou (Raven & Giordano, 2009). Zároveň existuje i možnost, že předek schopný tvořit křemičité struktury mohl být dokonce předkem všech Stramenopiles. Takovou možnost podporuje i zařazení skupin se schopností biosilicifikace na bázi Ochrophytních Stramenopiles (Riisberg et al., 2009). U různých skupin mohlo dojít k druhotné ztrátě této schopnosti. Nicméně prostřednictvím vhodných mutací by se funkčnost všech kroků biosilicifikace mohla v evoluci Stramenopiles opět navracet. Takový scénář je pak pravděpodobnější, než vznik biosilicifikace *de novo*. Podle jiného scénáře se schopnost tvořit křemičité povrchy objevila díky horizontálnímu genovému přenosu (Boto, 2010). Možnost HGT však bývá standardně využívána k vysvětlení nesouladů ve fylogenetických datech, a tudíž v mnoha případech neoprávněně (Dacks et al., 2008).

1.5. Dostupnost křemíku během různých geologických období

Mikroorganismy v současnosti přijímají křemík z prostředí v podobě hydroxidu křemičitého a to pomocí různých typů transportérů (Thamatrakoln et al., 2006). V prekambriu však byla koncentrace rozpuštěného křemíku v oceánech natolik vysoká, že jeho příjem organismy byl

pravděpodobně možný i po koncentračním spádu. Jeho využití se tak mohlo jevit velmi lákavým, či dokonce nezbytným, v důsledku jeho hromadění uvnitř buněk (Medlin, 2002). Po příchodu biosilicifikujících organismů však začalo docházet k poklesu volného křemíku v prostředí (Siever, 1991). Výrazné snížení způsobila tzv. kambrijské exploze na počátku prvohor spojená se vznikem křemičitých hub (Hexactinellida; Malviva et al., 1989). Nastalá situace si vyžádala potřebu aktivního transportu křemíku do nitra biosilicifikujících buněk pomocí specifických membránových transportérů. K dalšímu poklesu koncentrace kyseliny křemičité došlo v ordoviku důsledkem rozvoje mřížovců (Radiolaria; Malviva et al., 1989). Ještě výraznější snížení však způsobily Stramenopilní skupiny, především rozmach rozsivkových společenstev na přelomu druhohor a třetihor (Siever, 1991). Rozsivky (Bacillariophyceae) se díky své četnosti a / nebo vyšší efektivitě získávání volného křemíku staly konkurenceschopnější než zástupci zbylých dvou mořských biosilicifikujících skupin. Jejich radiace byla spojena i s vytlačáním křemičitých hub z mělčin do hlubších moří (z eufotické zóny), snížením míry silicifikace u mřížovců (Malviva et al., 1989) a zároveň nutností zvýšit afinitu transportérů biosilicifikujících organismů (Raven & Giordano, 2009). S nedostatkem křemíku se však zřejmě začaly potýkat i samotné rozsivky, z fosilního záznamu je totiž od konce křídy patrné nápadné ztenčování stěn jejich schránek, pravděpodobně v důsledku úspory křemíku (Finkel & Kotrc, 2010). Tento trend je však zároveň možné vysvětlit i optimalizací vlastností schránek v evoluci rozsivek, nehledě na nedostupnost křemíku v prostředí. Zcela bez přítomnosti křemíku však rozsivky již nedokáží přežít a staly se na něm tak životně závislé. Bez jeho přísunu u nich nedochází k dělení buněk (výjimku představuje druh *Phaeodactylum tricornutum*; Brzezinski et al., 1990), pozorováno bylo i zastavení proteosyntézy již čtyři hodiny po vyčerpání křemíku v médiu (Coombs et al., 1967). U rozsivek je tak křemík zřejmě úzce spjat s mnoha metabolickými procesy. Na rozdíl od rozsivek, u jiné biosilicifikující Stramenopilní skupiny, třídy Synurophyceae, se vyčerpání křemíku v médiu projevuje pouze poklesem růstové rychlosti (Klaveness & Guillard, 1975).

1.6. Význam křemičitých struktur pro Stramenopilní organismy

Příjem a polymerace křemíku jsou energeticky velmi náročnými procesy (Belton et al., 2012), proto lze předpokládat, že biosilicifikujícím organismům přinášejí mnohé adaptivní výhody. Buňky vlastnící jakékoli křemičité struktury jsou vždy do jisté míry chráněny před predátory spočívající v omezení přístupu k zranitelnému protoplastu, v mechanické odolnosti, ve zvětšení velikosti silicifikovaného organismu či v možnosti zranění predátora ostrými výrůstky (Raven & Giordano, 2009; Finkel & Kotrc, 2010; van Tol et al., 2012). Evoluční

význam je však přikládán i ultrastruktuře křemičitých útvarů, jako je přítomnost a tvar výztuh či hustota a průměr pórů, které zásadním způsobem ovlivňují jejich pevnost (Vogel, 2003; Hamm & Smetacek, 2007; Schröder et al., 2008). Mnohé druhy rodu *Mallomonas* (Chrysophyceae) produkují křemičité šupiny s výrazným žebrem ve tvaru V. Mnozí autoři se domnívají, že takto strukturované šupiny napomáhají jejich vzájemnému uspořádání a rozmístění na buňce tak, aby utvořily celistvou robustní schránku (Siver, 1991; Lavau & Wetherbee, 1994; Siver et al., 2015). Křemičitá schránka ovlivňuje také dopadající světelné spektrum odstiňováním UV-B záření, podle některých autorů mohou perforace schránky klíčovou roli v soustředění světla do určitých oblastí buňky (De Stefano et al., 2007; Finkel & Kotrc, 2010; Chen et al., 2014). Hale & Mitchell (2001) na základě pozorování interakce drobných kuliček s perforovanou křemičitou schránkou pomocí vysokorychlostní mikrofotografie dospěli k závěru, že by mikrostruktura křemičitých povrchů mohla ovlivňovat směr pohybu částic či dokonce jejich velikostní třídění a zásadně tak zvyšovat efektivitu příjmu živin. Velikost křemičitých struktur by podle některých autorů mohla být ovlivněna průměrnou teplotou v různých geologických obdobích (Siver et al., 2015), ta totiž podle obecného pravidla ovlivňuje u protist velikost jejich buněk (Montagnes & Franklin, 2001; Atkinson et al., 2003). Se zvyšující se teplotou klesá velikost protistních buněk, proto se autoři Siver et al. (2015) domnívají, že teplejší klima během paleogénu mohlo u zástupců rodu *Mallomonas* způsobit postupné zmenšení velikosti jejich buněk, a to spolu s křemičitými šupinami tvořícími buněčný pokryv. Tuto myšlenku podporují i hojné paleocenní a eocenní fosilní nálezy, ze kterých vyplývá, že druhy, které lze přiřadit k současným liniím, tvořily ve třetihorách prokazatelně menší šupiny než dnes. Zajímavé je, že vyhynulé druhy, které nacházíme jen ve fosilním záznamu, vytvářely prokazatelně větší šupiny a pravděpodobně i celé buňky než většina současných druhů rodu *Mallomonas* (Siver et al., 2015). Možná se při zmenšení velikosti buněk v důsledku zvýšení průměrné teploty stala velikost šupin nevýhodou pro jejich nositele. Velké šupiny na menší buňce je totiž složitější přikrýt i přizpůsobit ohybu malé buňky (Siver et al., 2015).

1.7. Diverzita a vznik křemičitých struktur u zlativek (Chrysophyceae)

Linie Chrysophyceae představuje velmi významnou biosilicifikující skupinu. Pravděpodobně všichni její zástupci tvoří křemičité cysty, zvané stomatocysty (popř. statospory či statocysty). Stomatocysta je produkována jako součást jejich životního cyklu a to nejspíše jak pohlavní, tak nepohlavní cestou, přičemž oběma způsoby vznikají tvarově identické cysty (Sandgren, 1991). Cysty obvykle dosahují velikosti 2-30 μm , vždy je na nich umístěn okrouhlý pór

utěsněný organickou zátkou, která obsahuje křemík jen v omezeném množství nebo vůbec (Preisig, 1994). Pór může být navíc lemován křemičitým valem či celý zakryt křemičitým víčkem (angl. cap; Zeeb & Smol, 2001).

Kromě tvorby stomatocyst se u několika linií skupiny Chrysophyceae objevila schopnost tvořit i další křemičité struktury. Zástupci rodu *Chrysococcus* vytváří silicifikované loriky, přičemž křemík je obecně pro výstavbu lorik velmi neobvyklým materiálem (Preisig, 1994). Mezi nejvýznamnější struktury skupiny Chrysophyceae však patří křemičité šupiny. Tyto struktury jsou přítomny u linie Paraphysomonadaceae s rody *Paraphysomonas* a *Clathromonas* (Scoble & Cavalier-Smith, 2014), a jim nepříbuzných rodů *Polylepidomonas* a *Spiniferomonas* (Preisig & Hibberd, 1983; Scoble & Cavalier-Smith, 2014). Dále jsou vyvinuty v rámci Chromulinaceae u rodu *Chrysophaerella* (Škaloud et al., 2013; Guiry & Guiry 2014) a u linie Synurales, kde tvoří křemičité šupiny dokonce všichni zástupci. Jedná se o rody *Mallomonas*, *Synura* a *Chrysodidymus*, u kterých šupiny obklopují jednotlivé buňky a o rod *Tessellaria* s křemičitými šupinami obklopujícími celou kolonii buněk (Preisig, 1994; Škaloud et al., 2013). Navíc je velmi pravděpodobné, že se u skupin Synurophyceae, Paraphysomonadaceae a u rodu *Chrysophaerella* vyvinuly křemičité šupiny nezávisle na sobě (Škaloud et al., 2013). Křemičité šupiny zlativek jsou nesmírně diverzifikované a nabývají mnoha podob. U rodů *Synura* a *Mallomonas* tvoří šupiny křemičitou schránku ze spirálovitě se překrývajících šupin (angl. „scale-case“; Asmund & Kristiansen, 1986). Šupiny mnoha druhů rodu *Mallomonas* jsou opatřeny křemičitými ostny (angl. „bristles“), obdobně jsou u některých zástupců rodu *Synura* přítomny tzv. tubulární šupiny (druhy *S. spinosa*, *S. mammilosa*). O obou strukturách se mnozí autoři domnívají, že vznikají stejným způsobem, tj. srolováním ploché šupiny (Wujek & Kristiansen, 1978; Siver et al., 2015). Kolonie rodu *Tessellaria* jsou pokryty několika vrstvami jak plátovitých, tak osténkatých šupin (Pipes & Leedale, 1992). Stejně tak zástupci rodu *Chrysophaerella* produkují kromě základních šupin i šupiny ostnové s charakteristicky pohárovitě stočeným bazálním diskem. U rodu *Spiniferomonas* jsou ostnové šupiny také přítomné, avšak jejich bazální disk je mnohem jednodušší (Nicholls, 1980).

U linie Paraphysomonadaceae mají šupiny často paprscitou či bilaterální symetrii, u rodu *Paraphysomonas* jsou opatřeny prodlouženými centrálními osténky, zatímco u rodu *Clathromonas* mají síťovitou podobu, někdy vystupující do vyvýšené struktury (tzv. korunkové šupiny, angl. „crown scales“; Scoble & Cavalier-Smith, 2014).

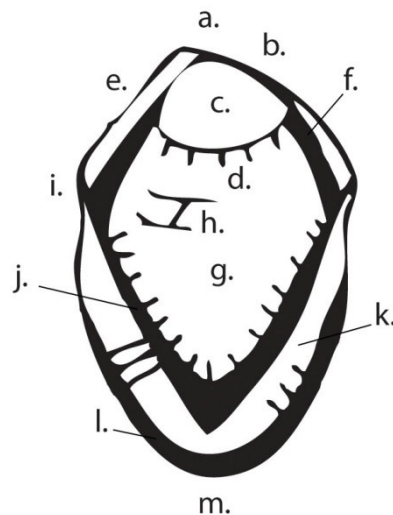
1.8. Představení rodu *Mallomonas* jako modelové skupiny

Šupinaté chrysomonády rodu *Mallomonas* představují unikátní modelovou skupinu pro studium morfologické evoluce v rámci protistních mikroorganismů. Jedná se o jednobuněčné bičíkovce produkující značně variabilní křemičité šupiny, které však zůstávají druhově specifické (Siver et al., 2015). Zástupci tohoto rodu se vyskytují především ve sladkých oligotrofních vodách, kde jsou zároveň důležitým ekologickým prvkem (Siver et al., 2015). Do tohoto rodu spadá přes 190 druhů (Guiry & Guiry 2014), jež jsou dále rozděleny do sekcí a sérií (Kristiansen, 2005). Taxonomie tohoto rodu je založena předně na morfologii křemičitých šupin. Šupiny mnoha druhů jsou opatřeny i velmi složitou ornamentací, jako jsou žebra, dóm, papily či sekundární síť. Evoluční příčiny vedoucí ke vzniku jednotlivých struktur na křemičitých šupinách však zůstávají z velké části skryty (Siver et al., 2015).

1.8.1. Křemičité šupiny rodu *Mallomonas*

U různých druhů rodu *Mallomonas* jsou šupiny značně variabilní, a to jak prostřednictvím křemičité ornamentace, počtem šupin nebo jejich velikostí (délka šupiny u *Mallomonas dickii* může dosahovat pouhého 1 μm , zatímco u *Mallomonas pseudocoronata* až 10 μm ; Preisig, 1994). Základní struktura šupiny (obr. 1) se skládá ze štítu (angl. „base plate“), obvykle proděravělého póry a s přehnutým proximálním okrajem (angl. „posterior rim“; Kristiansen, 2005). U mnoha druhů je však daleko složitější, šupina je opatřena výrazným V-žebrem (angl. „V-rib“) procházejícím napříč celou její délkou, s vybouleným dómem v přední části šupiny (angl. „dome“), na který se nezřídka napojuje dlouhý osten. Alternativně může být štít šupiny poset velkým počtem papil (angl. „papillae“), žeber, nebo trámců vycházejících z těchto žeber či sekundární sítě. Podoba šupiny se neliší jen mezi různými druhy, patrná je i určitá míra variability v ornamentaci šupin dle jejich umístění na buňce. Na základě toho lze odlišit šupiny apikální, tělní a posteriorní (angl. „apical scales“, „body s.“, „caudal s.“), přičemž apikální šupiny lze nalézt v blízkosti bičíku, tělové šupiny pokrývají většinu buňky a posteriorní šupiny jsou nejrůznějšími způsoby připojeny na konec buňky (Siver, 1991). Někdy je navíc báze bičíku obklopena zvláštním typem apikálních šupin, tzv. límečkovitými šupinami (angl. „collar scales“). Dalším typem šupin jsou křemičité ostny, s dlouhým paprskem (angl. „shaft“) a zduřelou bází (angl. „foot“; Wujek & Kristiansen, 1978; Siver et al., 2015). U většiny druhů je paprsek ostnu tvořen srolováním protažené šupiny a spojením jejich okrajů za vzniku dutého válce. Nejčastěji bývá osten celistvý, někdy může být jeho okraj lemován zuby. Ostny jsou buď roztroušeny po celé buňce, nebo je jejich přítomnost omezena na přední či zadní cíp buňky (Preisig, 1994; Siver et al., 2015). K šupinám jsou

ostny napojeny přes vyvýšený dóm svou přední částí se zduřeným koncem, jež vytváří jakési kloubní spojení (Beech et al., 1990). Zdá se však, že v minulosti některé druhy experimentovaly s alternativním připojením ostnu na šupinu. Například u fosilního druhu *Mallomonas porifera* byly ostny přichyceny šroubovitě svinutým koncem šupiny. Jen velmi vzácně mohou ostny na buňce zcela chybět (u druhů *M. insignis* a *M. adamas*; Siver et al., 2015).



Obr. 1. Základní struktury na tělní šupině rodu *Mallomonas*: **a.** distální konec, **b.** ret, **c.** dóm, **d.** trámce, **e.** anteriorní okraj, **f.** anteriorní submarginální žebro, **g.** štít, **h.** žebra, **i.** laterální zakřivení, **j.** V-žebro, **k.** posteriorní okraj, **l.** přehnutý okraj, **m.** proximální konec (upraveno podle Asmund & Kristiansen, 1986)

1.8.2. Fylogenetické vztahy rodu *Mallomonas*

Rod *Mallomonas* spadá společně s rody *Synura*, *Chrysodidymus* a *Tessellaria* do řádu Synurales (Škaloud et al., 2013), jako součást třídy Synurophyceae. Andersen (1987) ustanovil tuto třídu na základě přítomnosti chlorofylů *a* a *c₁*, a zároveň nepřítomnosti chlorofylu *c₂*, uspořádání mikrotubulárních a bičíkovitých kořenů, podle umístění fotoreceptoru v bičíkovité zduřenině, nepřítomnosti světločivné skvrny, posteriorně umístěné kontraktilní vakuole a přítomnosti bilaterálně symetrických křemičitých šupin. Fylogenetické vztahy třídy Synurophyceae s ostatními skupinami linie Stramenopiles, především s třídou Chrysophyceae, kam byly tradičně šupinaté chrysomonády zařazovány (Pascher, 1914; Bourrelly, 1957), nejsou dodnes uspokojivě objasněny (Andersen et al., 1999; Škaloud et al., 2013; Siver et al., 2015). Na základě současné molekulární fylogenetiky tak zůstává nedořešenou otázkou, zda synurofytní řasy tvoří monofyletickou linii oddělenou od blízkce příbuzné třídy Chrysophyceae (Andersen, 2007), či zda jsou přímo součástí této třídy (del

Campo & Massana, 2011; Škaloud et al., 2013; Scoble & Cavalier-Smith, 2014). Nehledě na nejasnosti týkající se jejich fylogenetického umístění tvoří Synurophyceae dobře definovanou monofyletickou linii.

Ani u samotného rodu *Mallomonas* nejsou vztahy mezi jednotlivými druhy příliš objasněny (Siver, Wolfe, et al., 2013b). Je to dáno především nízkým počtem získaných izolátů. Pro většinu druhů rozlišených na základě (ultra-)struktury šupin nejsou k dispozici doposud žádná molekulární data. Doposud byly získány molekulární sekvence pouze pro 37 druhů rodu *Mallomonas*, což je necelých 20 % jeho předpokládané diverzity.

Na základě získaných sekvencí bylo provedeno několik fylogenetických analýz rodu *Mallomonas*. První z nich byla publikována v roce 1997, obsahovala pouhých 8 zástupců rodu, a byla založena na jediném molekulárním markeru – SSU rDNA (Lavau et al., 1997). Následná fylogenetická analýza zahrnuje o dva druhy více, a byla již provedena na sekvencích dvou molekulárních markerů, SSU rDNA a rbcL (Andersen, 2007). Několik nedávno publikovaných fylogenetických studií bylo založeno na analýzách sekvencí tří markerů – SSU, LSU rDNA a rbcL, do kterých bylo začleněno 18-28 druhů (Jo et al., 2011, 2013; Siver, Wolfe, et al., 2013a; Kim et al., 2014). Jejich nejvýznamnějším závěrem bylo rozlišení dvou hlavních linií (označovaných jako C1 a C2, později jako A1 a A2 dle Siver et al., 2015), které je od sebe možné odlišit i na základě morfologie, podle přítomnosti či nepřítomnosti V-žebra. Ke stejnému závěru došli nedávno i Siver et al. (2015) ve své časově kalibrované fylogenetické analýze založené na sekvencích pěti genů, do které bylo začleněno 37 zástupců rodu *Mallomonas*. Dle autorů je molekulární fylogeneze silně kongruentní s morfologií křemičitých struktur rodu *Mallomonas*.

1.8.3. Fosilní záznam křemičitých struktur rodu *Mallomonas* a dalších zástupců Chrysophyceae

Protože jsou křemičité útvary značně mechanicky odolné, zůstávají po dlouhou dobu uchované v sedimentu. Nejstarší známou dochovanou fosílií ze skupiny Chrysophyceae jsou křídové křemičité stomatocysty datované do rozmezí období Aptian – Albian, jejichž stáří je odhadováno na 110 milionů let (Harwood & Gersonde, 1990). I když jsou v současné době chrysofytní cysty nalézány především ve sladkovodním prostředí, v tomto případě se jednalo se o mořský sediment. Cysty zde nalezené jsou označovány jako Archaeomonády. Ve fosilním záznamu však následuje dlouhá mezera, a další křemičité cysty jsou známy až z paleocenní lokality Wombat (64°29'46"N, 110°15'8"W; Siver, Lott, et al., 2013a). Tato

lokalita se nachází uprostřed jezera Lac de Gras v severní Kanadě a stáří zdejších fosilních nálezů se odhaduje mezi 56 až 66 miliony let. Zatím nejbohatším nalezištěm je však lokalita Giraffe, nacházející se v severní Kanadě (64°44' N, 109°45'W; Siver & Wolfe, 2009; Siver & Lott, 2012, Siver et al., 2015). Tato lokalita vznikla ve středním eocénu ze sopečného kráteru, který byl později vyplněn vodou. Vzniklé jezero se postupně zaplňovalo sedimentem a zazemňovalo, až bylo uzavřeno neogenní ledovcovou vrstvou (Wolfe et al., 2006). V těchto uloženinách bylo nalezeno pozoruhodné množství synurofytních šupin, ostnů i cyst, náležících vyhynulým taxonům, ale i taxonům, které lze přiřadit k současně žijícím druhům (Siver & Wolfe, 2005a; b; Siver, Lott, et al., 2013b). Stáří této lokality bylo kombinovanou analýzou na základě $^{87}\text{Rb}/^{87}\text{Sr}$ modelu (Creaser et al., 2004), rozpadu uhlíku přítomného v jehlicích *Metasequoia* (Doria et al., 2011) a pylových analýz (Rouse, 1977; Hamblin et al., 2003) odhadnuto na 38 až 48 milionů let. Mezi nejčastěji se vyskytující chrysofytní fosílie patří *Mallomonas insignis*, *M. lychenensis*, *M. asmundiae* či vyhynulý druh *Mallomonas porifera*. Lze zde však nalézt i šupiny patřící zástupcům rodů *Synura*, *Chrysosphaerella*, *Paraphysomonas*, *Clathromonas*, či *Spiniferomonas* (The Giraffe Pipe databáze; http://fmp.conncoll.edu/Silicasecchidisk/Giraffe_Pipe_homepage.html). Pomocí těchto fosilních nálezů je možné časově kalibrovat fylogenetické analýzy. Siver et al. (2015) tak odhadli, že se linie Synurophyceae poprvé objevila v pozdní juře, přibližně před 157 miliony lety. Rod *Mallomonas* se s rodem *Synura* oddělily pravděpodobně během rané křídy, přibližně před 130 miliony lety. Rod *Mallomonas* se dále rozdělil na 2 hlavní linie, a to zhruba před 110 miliony lety a bude tak pravděpodobně starším rodem, oproti odvozenějšímu rodu *Synura* (Siver et al., 2015). Autoři přišli také s teorií, že nejstarobylejší druhy, jakými jsou *Mallomonas bangladeshica*, *M. peronides* či *M. insignis* mají mnohem složitější morfologii šupin, v porovnání se zástupci některých recentních skupin, jako je *Mallomonas caudata*, jehož šupiny nesou nejjednodušší známou morfologii v rámci rodu (Siver & Wolfe, 2009; Siver, Wolfe, et al., 2013a; Siver et al. 2015). Toto zjištění je zcela v rozporu s původním předpokladem, že druhy s nejjednodušší morfologií šupin budou těmi nejstarobylejšími (Asmund & Kristiansen, 1986; Kristiansen, 2002).

2. Otázky kladené v diplomové práci

1) Jaké jsou fylogenetické vztahy mezi recentními zástupci rodu *Mallomonas*?

2) Je koncept rodu *Mallomonas*, založený na ornamentaci křemičitých šupin, podpořen molekulárními daty?

- odráží genetická diferenciace i tu morfologickou?

3) Co lze říci o evoluci tvaru jednotlivých struktur křemičitých šupin?

- je evoluce tvaru šupiny pozvolná či probíhá skokově?
- liší se tyto evoluční trendy mezi jednotlivými liniemi rodu?
- vznikly hlavní morfologické útvary pouze jednou, nebo vícekrát nezávisle?

4) Jak pravděpodobně vypadaly nejstarší křemičité šupiny rodu *Mallomonas*?

3. Materiál a metody

3.1. Odběr planktonních vzorků

Odběrová místa byla vybírána na základě lokalit uveřejněných v publikacích zabývajících se diverzitou šupinatých chrysomonád (Rojackers, 1981; Řezáčová, 2005; Pichrtová et al., 2007; Němcová, 2010; Němcová et al., 2012), zároveň byl však kladen důraz, aby jejich volba obsáhla co největší stanovištní variabilitu. Vzorky byly odebírány ve stojatých vodních nádržích přirozeného i umělého charakteru (jezera, tůňe, mrtvá říční ramena, kanály) na území Evropy. Většina lokalit byla soustředěna v České republice, a to především v oblastech Dokeska, Třeboňska a Polabí. Zastoupeny byly ale i zahraniční lokality v Nizozemí, Velké Británii, Švédsku nebo Francii. Odběrová místa, ze kterých pocházejí jednotlivé izoláty, jsou zobrazena na obr. 37 a shrnuje je tab. 10 v příloze. Vzorky byly na lokalitách odebírány pomocí planktonní sítě o velikosti ok 20 μm . Prvotní průzkumy naznačily, že se zástupci rodu *Mallomonas* zdržují nejčastěji v blízkosti vodní vegetace, proto se odběry v rámci vodních ploch soustředily právě na tato mikrostanoviště. Odběr vzorků byl také doplněn „vyždímáním“ submerzní vegetace rostoucí na okrajích nádrží. Na odběrových místech byly měřeny základní fyzikálně-chemické parametry prostředí (pH, vodivost, teplota) pomocí přenosného konduktometru WTW 340i (WTW GmbH, Wilhelm, Germany) a to ve svrchní vrstvě vodního tělesa, cca 20 cm pod hladinou. Vzorky byly umístěny do plastových nádobek se šroubovacími víčky a uloženy do chladicího boxu nebo do přenosné lednice, ve kterých byly skladovány až do jejich následného zpracování.

3.2. Kultivace řas *in vitro*

Jednotlivé buňky zástupců rodu *Mallomonas* byly izolovány z odebraných vzorků planktonu přímo, pomocí skleněné pipety zakončené tenkou kapilárou. Následně byly tyto buňky přeneseny do plastových kultivačních destiček nebo do skleněných zkumavek se sterilním modifikovaným DY IY médiem (jeho složení viz kap. 3.2.1). Paralelně s tímto postupem bylo v 5 ml stejného média kultivováno 0,5 ml přírodního vzorku (obsahujícího i další mikroorganismy), a po 3–6 dnech kultivace z něj byly jednotlivé buňky rodu *Mallomonas* opět chytány pomocí skleněné pipety do kultivační destičky s upraveným DY IV médiem za vzniku čistých kultur. Kultivace čistých kultur probíhala při teplotě 12°C a světelném režimu 24 hod. světla denně po dobu 3 týdnů. Kultury byly průběžně kontrolovány (množství média, přítomnost živých buněk, detekce případných kontaminací). V případě potřeby bylo doplněno médium, kontaminované kultury přeočkovány. Z každé narostlé kultury bylo automatickou

pipetou přeneseno 100 µl média s buňkami do 0,2 ml PCR mikrozkušavky pro molekulární analýzy. Další odběry kultur sloužily pro fotodokumentaci a identifikaci získaného taxonu pomocí elektronové mikroskopie.

3.2.1. Příprava modifikovaného DY IV média

Kultivační médium DY IV bylo připravováno dle upraveného návodu používaného ve Sbírce řas CAUP (dostupný z <http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media.html>). V Erlenmeyerově baňce o objemu 1 l byly smíchány složky kultivačního média v níže uvedených poměrech.

Složka	Koncentrace	Množství
MgSO ₄	0,2M	1 ml
KCl	0,04M	1 ml
NH ₄ Cl	0,05M	1 ml
NaNO ₃	0,24M	1 ml
β-glycerolfosfát	0,01M	1 ml
H ₃ BO ₃	0,13M	1 ml
Na ₂ EDTA	0,02M	1 ml
Na ₂ SiO ₃	0,05M	1 ml
FeCl ₃	0,01M	1 ml
CaCl ₂	0,68M	1 ml
DY Trace	-	1 ml
HEPES	-	243 mg
MES	-	200 mg
H ₂ O (destilovaná)	-	950 ml

Roztok mikroelementů DY Trace byl připraven rozpuštěním 31,4 mg MnCl₂·4H₂O, 4,5 mg MnSO₄·H₂O, 1,46 mg CoCl₂·6 H₂O, 2,35 mg Na₂MoO₄·2H₂O, 0,13 mg NH₄VO₃ a 0,27 mg Na₂SeO₃ v 1 litru destilované vody. Připravený roztok byl sterilizován v autoklávu (121°C po dobu 30 minut). Po vychladnutí bylo médium obohaceno roztokem vitamínů (10 mg vitamínu B1, 5 mg vitamínu B12).

3.3. Determinace druhů

Determinace zástupců rodu *Mallomonas* byla založena na morfologii křemičitých šupin, popř. ostnů pozorovaných pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Pro správné určení jednotlivých druhů byla vyžívána odborná literatura (zejména Kristiansen, 2002; Kristiansen & Preisig, 2007).

3.3.1. Příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii

Před vlastním mikroskopováním je nutné na speciální měděné sít'ky o průměru 3 mm nanést formvarovou blanku, a na ní následně přenést požadovaný vzorek.

Při přípravě formvarové blanky byla nejprve podložní sklíčka ponořena do roztoku detergentu (3 kapky Tritonu v 50 ml destilované vody) pro odstranění mastnoty. Po jejich dokonalém vyschnutí byla sklíčka ponořena na 3-5 minut do 0,4% roztoku formvaru rozpuštěného v chloroformu. Vytažená podložní sklíčka byla ponechána ve skleněném stojánku po dobu 3 minut pro ztuhnutí formvarové vrstvy. Vrstva formvaru byla následně ze sklíčka odříznuta skalpelem, a to přibližně 2 mm od jeho okraje. Celé sklíčko bylo na několik vteřin ponořeno do 1% roztoku kyseliny fluorovodíkové usnadňující uvolnění formvarové blanky. Po ponoření sklíčka do destilované vody se blanka uvolnila na její hladinu. Na plovoucí blanku byly nanесeny měděné sít'ky tak, aby ke blance přilnuly svou matnou stranou, a zároveň se vzájemně nepřekrývaly. Blanka posázená sít'kami byla překryta proužkem filtračního papíru. Po nasátí vody filtračním papírem se blanka se sít'kami opatrně přemístila na čisté podložní sklíčko, aby došlo k jejímu konečnému ztvrdnutí. V posledním kroku byly jednotlivé sít'ky přilnuté k blance vyřezány pomocí ostré pinzety.

Z každé narostlé kultury byly přeneseny 2-3 kapky vzorku na měděné TEM sít'ky s připravenou formvarovou blankou, na které se zachytily křemičité ultrastruktury buněk. Po nanесení vzorky usychaly několik hodin v uzavřené Petriho misce. Před vlastním mikroskopováním byly sít'ky ještě promyty ve 4 kapkách destilované vody po dobu 4 minut v každé kapce pro odstranění nečistot a několik hodin ponechány v uzavřené Petriho misce po dobu zasychání.

3.3.2. Transmisní elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie umožňuje prostřednictvím svazku elektronů zobrazit struktury i velikosti nanometrů (Gericke et al., 2008). V případě skenovací elektronové mikroskopie (SEM) získáme obraz detekcí signálu elektronů po jejich interakci se vzorkem. Naopak u transmisního elektronového mikroskopu (TEM) detekujeme elektrony procházející vzorkem.

V rámci diplomové práce probíhala pozorování a dokumentace vzorků na transmisním elektronovém mikroskopu JOEL 1011 dostupném v Laboratoři elektronové mikroskopie na PřF UK. Jednotlivé vzorky byly postupně prohlíženy při zvětšeních v rozmezí 4 000 – 20 000 ×. Obrazová dokumentace křemičitých šupin, ostnů, případně i celých šupinatých

schránek (angl. scale cases) byla pořizována pomocí CCD kamery Veleta ovládané akvizičním softwarem od firmy Olympus Soft Imaging Solution GmbH (Münster, Německo).

3.4. Molekulární analýzy

Pro zhodnocení fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy rodu *Mallomonas* byly využity sekvence tří molekulárních markerů: SSU rDNA, LSU rDNA a rbcL. Jaderná oblast SSU obsahuje geny kódující malou podjednotku ribozomu, ve fylogenetických studiích rodu *Mallomonas* je běžně používaným markerem (Lavau et al., 1997; Andersen, 2007; Jo et al., 2011, 2013; Siver, Wolfe, et al., 2013a; Kim et al., 2014). Další jaderná oblast, LSU, kóduje velkou podjednotku ribozomu a zvolili jsme ji pro četné využití tohoto markeru dalšími autory (Jo et al., 2011, 2013; Kim et al., 2014; Siver et al., 2015). Chloroplastový gen rbcL kódující velkou podjednotku enzymu RuBisCO byl vybrán kvůli své nezávislosti na předchozích dvou markerech. Skutečnost, že tyto úseky patří mezi nejčastěji používané molekulární markery ve fylogenetických studiích rodu, umožnila propojení námi získaných dat se sekvencemi již publikovanými dalšími autory.

3.4.1. Izolace DNA

Prvním krokem bylo odebrání 100 μ l narostlé kultury v médiu a její přenesení do plastové PCR zkumavky o objemu 0,2 ml. Tato směs byla centrifugována při 5 500 rpm po dobu tří minut s cílem oddělit buňky od živného média. Po centrifugaci byl opatrně odpipetován supernatant (médiu) tak, aby se zachoval pouze usazený pelet z buněk. Izolace genomové DNA byla provedena pomocí komerčního kitu InstaGene Matrix (Bio-Rad, USA), postupováno bylo dle pokynů výrobce. K peletu obsahujícímu buňky bylo přidáno 30 μ l roztoku InstaGene Matrix a vzniklá směs byla zahřáta na 95°C po dobu jedné minuty, následně zchlazena na 56°C a udržována při této teplotě 30 minut až do jejího opětovného zahřátí na 99°C po dobu osmi minut. Posledním krokem bylo zchlazení vzorku na 10°C. Do dalšího použití byly vzorky skladovány v lednici při teplotě 4°C.

3.4.2. PCR amplifikace studovaných úseků DNA

Specifické úseky genomu studovaných druhů byly zmnoženy prostřednictvím polymerázové řetězové reakce (PCR). Nejprve byl vytvořen tzv. „master mix“, obsahující všechny komponenty nezbytné pro správné proběhnutí amplifikace. Automatickou pipetou byly odměřeny jednotlivé složky směsi v níže uvedených poměrech.

„Master mix“ pro amplifikaci SSU rDNA oblasti (přepočet na jeden vzorek):

Složka	Objem
ddH ₂ O	13,1 µl
pufř Gold (Applied Biosystems)	2 µl
dNTP	0,4 µl
forward primer	0,25 µl
reverse primer	0,25 µl
MgCl ₂	2,2 µl
Gold DNA polymeráza (Applied enhancer	0,2 µl
	0,6 µl
DNA vzorku	1 µl

„Master mix“ pro amplifikaci LSU rDNA a rbcL oblastí (přepočet na jeden vzorek):

Složka	Objem
ddH ₂ O	14 µl
pufř MyTaqHS (Bioline)	4 µl
forward primer	0,4 µl
reverse primer	0,4 µl
MyTaqHS DNAPolymeráza (Bioline)	0,2 µl
DNA vzorku	1 µl

K namnožení studovaných úseků genomu byly využity specifické primery, které shrnuje tab. 3. Kromě již publikovaných sekvencí primerů byly pro účely diplomové práce rovněž zkonstruovány tři vlastní primery (28S_736F2, 28S_1435R, 28S_2022F), a to na základě nevariabilních úseků LSU rDNA oblasti. Kvalita těchto primerů byla otestována v programu Fastpcr verze 4.0.27 (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>). Požadované oligonukleotidy byly vytvořené na zakázku firmou KRD (<http://www.idtdna.com/site>). Syntetizované primery byly nejprve naředěny TE pufřem na zásobní koncentraci 250 pmol·µl⁻¹, a poté smíchaný v poměru 1 : 9 s ddH₂O na konečnou koncentraci 25 pmol·µl⁻¹ využívanou v PCR reakcích.

Tab. 3. Přehled specifických primerů využívaných pro amplifikaci studovaných úseků SSU rDNA, LSU rDNA a rbcL.

Úsek	Název	Sekvence primeru (5' - 3')	Zdroj
SSU	18S-F	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT	(Katana et al., 2001)
SSU	18S-R	TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC	(Katana et al., 2001)
SSU	34F	GTC TCA AAG ATT AAG CCA TGC	(Thüs et al., 2011)
SSU	402-23F	GCT ACC ACA TCC AAG GAA GGC	(Katana et al., 2001)
SSU	1308-39R	CTC GTT CGT TAA CGG AAT TAA	(Katana et al., 2001)
LSU	28S_25F	ACC CGC TGA ATT TAA GCA TAT A	(Jo et al., 2011)
LSU	28S_1228F	CCT GAA AAT GGA TGG CGC	(Jo et al., 2011)
LSU	28S_861R	GTT CGA TTA GTC TTT GCG CCC T	(Jo et al., 2011)
LSU	28S_2160R	CCG CGC TTG GTG GAA TCC	(Jo et al., 2011)
LSU	28S_2812R	GAT AGG AAG AGC CGA CAT CGA	(Jo et al., 2011)
LSU	28S_736F2	CCC GAA AGA TGG TGA ACT	<i>vlastní design</i>
LSU	28S_1435R	GTT CAC ATG GAA CCT TTC TCT	<i>vlastní design</i>
LSU	28S_2022F	ACT CAG AAC TGG AGC GGA CAA	<i>vlastní design</i>
rbcL	rbcL_2F	AAA AGT GAC CGT TAT GAA TC	(Daugbjerg & Andersen,
rbcL	rbcL_R3	GTAATATCTTTCTTCCATAAAT	(Jo et al., 2011)

Optimální podmínky pro PCR reakce byly udržovány prostřednictvím PCR termocykleru Eppendorf Mastercycler ep Gradient 5341 (Eppendorf GmbH, Hamburk, Německo). Pro každý amplifikovaný úsek byl na základě předešlých optimalizací stanoven jiný cyklus:

SSU rDNA:	LSU rDNA:	rbcL:
<u>94°C – 4 min.</u>	<u>94°C – 5 min.</u>	<u>95°C – 5 min.</u>
94°C – 1 min. } 35x	94°C – 30 s. } 35x	94°C – 1 min. } 35x
52°C – 1 min. } 35x	40°C – 1 min. } 35x	38°C – 1 min. } 35x
<u>72°C – 2 min.</u>	<u>72°C – 4 min.</u>	<u>72°C – 2:30 min.</u>
72°C – 10 min.	72°C – 10 min.	72°C – 10 min.

Úspěšnost PCR amplifikace byla ověřena prostřednictvím gelové elektroforézy. Do jamek v agarózovém gelu s ethidium bromidem byly automatickou pipetou nanášeny 3 µl získaného produktu. Do některých prázdných jamek gelu byly nanášeny 3 µl tzv. žebříku (angl. „ladder“) GeneRuler 100bp (společnost, město, země), díky němuž byla délka PCR produktů kalibrována. V případě namnoženého SSU rDNA úseku byl k nanášenému produktu přidán i 1 µl barviva (angl. „loading dye“), které se vážalo na DNA a umožnilo její následnou vizualizaci. U zbývajících dvou DNA úseků (LSU rDNA, rbcL) bylo barvivo již součástí použitého PCR mixu. Rozdělení molekul DNA podle jejich velikosti bylo založené na míře jejich pohyblivosti v elektrickém poli, k vizualizaci PCR produktů na gelu bylo využito UV

světla. Požadovaným výsledkem bylo získání většího množství produktu o délce 1,7 kb pro oblast SSU rDNA, 2 kb pro oblast LSU rDNA a 1 kb pro úsek rbcL.

Specificky namnožené PCR produkty byly následně přečištěny pomocí kitu SIGMA název kitu (Sigma-Aldrich), eventuálně kitem QIAEX II Gel Purification (Qiagen) v případě nutnosti extrahovat PCR produkt přímo z agarózového gelu v důsledku přítomnosti více namnožených úseků. Po přečištění byly vzorky odeslány na sekvenaci metodou Sangerova sekvenování do laboratoře Macrogen (<http://www.macrogen.com/eng/>).

3.4.3. Hodnocení sekvenčních dat

U získaných sekvencí byla nejprve manuálně provedena kontrola jejich kvality. Případné kontaminace byly odhaleny hledáním amplifikovaných úseků v databázi GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) pomocí programu Blast (Zhang et al., 2000). Manuální kontrola vícenásobného signálu proběhla v programu SeqAssem verze 9 (Hepperle, 2004). V témže programu byla následně jednotlivá čtení (angl. „reads“) byla spojena do konsenzuálních sekvencí. Výsledné sekvence všech tří studovaných markerů byly spojeny do jednoho úseku v programu Mega 5 (Tamura et al., 2011), v němž proběhl i jejich manuální alignment. Následně byly sekvence zalignovány pomocí Q-INS-i algoritmu v programu MAFFT verze 7 (Kato & Standley, 2013). Stejný postup byl použit i na sekvence převzaté z databáze GenBank. Sekvence z této databáze byly pečlivě vybírány na základě spolehlivosti určení, a to vzhledem k zjištěným nesrovnalostem ve správnosti určování druhů (Škaloud et al., 2013). Podmínkou využití sekvencí byla správnost jejich určení doložená mikrofotografií křemičité šupiny v originálním zdroji. Výsledný dataset obsahoval sekvence 59 izolátů zástupců rodu *Mallomonas* (z toho 21 izolátů získaných, 38 pocházejících z databáze GenBank) a dalších 29 taxonů mezi kterými byli zahrnuti zástupci všech významných linií třídy Chrysophyceae (Andersen, 2007; Škaloud et al., 2013). Druhy *Nannochloropsis limnetica* a *Synchroma grande* byly použity ve fylogenetických analýzách jako „outgroup“. Po vypuštění pozic s více delecemi dosahoval alignment délky 5 278 bází. Celý tento datový soubor byl následně podroben fylogenetické analýze.

3.5. Fylogenetické analýzy

3.5.1. Pilotní Bayesovská analýza

Datový soubor byl nejdříve podroben pilotní analýze metodou inference (BI), pomocí programu MrBayes verze 3.1.2. (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) pro ustanovení

fylogenetických vztahů mezi jednotlivými liniemi. Na základě výsledků jModelTestu verze 2.1.4. byl vybrán substituční model GTR + I + G (nst= 6 rate = invgamma) pro všechny tři molekulární markery (SSU rDNA, LSU rDNA i rbcL). Variabilita substitucí byla vzhledem k jejich pozici ošetřena gamma distribucí a do výpočtu byla zároveň zahrnuta proporce invariabilních pozic. V rámci každého MCMC (Markov chain Monte Carlo) běhu byl použit jeden studený a tři horké řetězce. Teplota zvolená pro běhy jednotlivých řetězců byla ponechána na přednastavené hodnotě $t = 0,2$. Běhy dvou paralelních řetězců MCMC byly nastaveny na 5 milionů generací. V průběhu analýzy byla zaznamenávána každá stá generace. Počátečních 20 % generací, než došlo k ustálení hodnot aposteriorní pravděpodobnosti (angl. „log likelihood values“), bylo z analýzy vyloučeno jako „burn-in“ perioda.

3.5.2. Fylogenetická analýza v programu BEAST

Pro vytvoření časově-kalibrovaného fylogenetického stromu, který kromě rekonstrukce fylogenetických vztahů umožní i datování významných událostí v evoluci studované skupiny, byla využita Bayesovská analýza v softwaru Beast verze 1.8.1 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/>). Vstupní datový soubor byl redukován tak, aby obsahoval od každého taxonu jen jednoho zástupce. Časová kalibrace byla založena na fosilních nálezích křemičitých šupin a ostnů publikovaných v literatuře (Harwood & Gersonde, 1990; Siver & Wolfe, 2005b, 2009; Siver et al., 2009; Boo et al., 2010; Siver, Lott, et al., 2013a) a Giraffe Pipe databázi (http://fmp.conncoll.edu/Silicasecchidisk/Giraffe_Pipe_homepage.html). Jednotlivé fosilní záznamy posloužily k dataci konkrétních monofyletických linií, které byly určené na základě fylogenetického stromu získaného pilotní Bayesovskou analýzou (viz kap. 3.5.1), shrnutí tab. 4. Pro snížení komplexity priors a úspěšnou iniciaci analýzy byl pro všechny studované molekulární markery zvolen Hasegawa, Kishino a Yano substituční model (HKY) + G + I. Pro odhad rychlosti změn napříč všemi evolučními liniemi byl zvolen model nekorelovaných lognormálních relaxovaných molekulárních hodin. MCMC analýza byla spuštěna v osmi nezávislých bězích po 100 milionech generací, ze kterých byly vybrány dva běhy konvergující na společné nejvyšší hladině pravděpodobnosti. Parametry probíhající analýzy byly zaznamenávány každých tisíc generací. Z vybraných fylogenetických stromů s nejvyššími posteriorními pravděpodobnostmi byla následně pomocí programu Tracer verze 1.6 (Rambaut A, Suchard MA, Xie D & Drummond AJ (2014) určena „burn-in“ perioda představující počátečních 25 milionů stromů (25 %) a následně zkonstruován konsenzuální chronogram pomocí programu Log Combiner verze 1.8.1 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/LogCombiner>). Pomocí softwaru Tree Anotator verze 1.8.1

(<http://beast.bio.ed.ac.uk/treeannotator>) byla zvolená „burn-in“ perioda vymazána z konsenzuálního chronogramu.

Tab. 4. Zvolená apriorní pravděpodobnost pro jednotlivé linie *Chrysophyceae* na základě fosilních nálezů

linie	taxony	stáří fosilie	apriorní pravděpodobnost	citace
<i>Chrysosphaerella</i>	<i>Chrysosphaerella brevispina</i>	39 mil. let	LN (R 50, 0.3)	(Siver & Wolfe, 2005b)
	<i>Chrysosphaerella longispina</i>	39 mil. let		Giraffe Pipe databáze
	<i>Chrysosphaerella rotundata</i>	39 mil. let		Giraffe Pipe databáze
<i>Mallomonas asmundiae</i>	<i>Mallomonas asmundiae</i>	48 - 38 mil. let	LN (R 43, 1)	(Siver et al., 2009)
<i>Mallomonas bangladeshica-peronoides</i>	<i>Mallomonas bangladeshica</i>	47 mil. let	LN (R 133, 0.6)	(Siver & Wolfe, 2009)
	<i>Mallomonas peronoides</i>	47 mil. let		(Siver & Wolfe, 2009)
<i>Mallomonas insignis</i>	<i>Mallomonas insignis</i>	47 mil. let	LN (R 135, 0.6)	(Siver & Wolfe, 2005b)
<i>Mallomonas pseudocratis-cratis</i>	<i>Mallomonas pseudocratis</i>	47 mil. let	LN (R 76, 0.6)	(Siver & Wolfe, 2005b)
	<i>Mallomonas cratis</i>	-		-
<i>Paraphysomonas</i>	<i>Clathromonas butcheri</i>	39 mil. let	LN (R 190, 0.6)	Giraffe Pipe databáze
	<i>Paraphysomonas aff. Imperforata</i>	39 mil. let		Giraffe Pipe databáze
	<i>Paraphysomonas vulgaris_brevispina</i>	39 mil. let		Giraffe Pipe databáze
<i>Synura curtispina-spinosa</i>	<i>Synura curtispina</i>	48 - 40 mil. let	LN (R 69, 0.8)	(Boo et al., 2010)
	<i>Synura spinosa</i>	-		-
<i>Synura ame-congla-mac-pet-tru</i>	<i>Synura americana</i>	-	LN (R 73, 0.6)	-
	<i>Synura conopea</i>	-		-
	<i>Synura glabra</i>	-		-
	<i>Synura macracantha</i>	66-56 mil. let		(Siver, Lott, et al., 2013a)
	<i>Synura petersenii</i>	66-56 mil. let		(Siver, Lott, et al., 2013a)
	<i>Synura truttiae</i>	-		-
<i>Synura uvella</i>	<i>Synura uvella</i>	47 mil. let	LN (R 123, 0.6)	(Siver & Wolfe, 2005b)
<i>Tessellaria</i>	<i>Tessellaria lapponica</i>	39 mil. let	LN (R 185, 0.3)	Giraffe Pipe databáze
	<i>Tessellaria volvocina</i>	39 mil. let		Giraffe Pipe databáze

3.5.3. Výpočet statistické podpory BI fylogenetických stromů

Výpočet maximální parsimonie (angl. maximum parsimony) proběhl v programu PAUP* verze 4.0.b10 (Swofford, 2002). Počet opakování *random stepwise addition sequence* byl nastaven na 1000, maximální počet stromů byl omezen na 100 na základě velikosti obou souborů dat. Metoda zprostředkovávající výměnu větví byla zvolena tree bisection reconnection. Hodnota bootstrapu byla vypočítána z 1000 opakování.

Výpočet největší věrohodnosti (angl. maximum likelihood) proběhl v programu GARLI verze 0.951 (Genetic Algorithm for Rapid Likelihood inference, Zwickl, D. J., 2006), za použití automatického ukončení heuristického vyhledávání (příkaz “*genthreshfortopterm*“ nastaven na 100 000). Hodnota bootstrapu byla vypočítána ze 100 opakování.

3.6. Hodnocení morfologie křemičitých struktur rodu *Mallomonas*

Morfologické znaky na šupinatých strukturách zástupců rodu *Mallomonas* byly hodnoceny z mikrofotografií pořízených elektronovým mikroskopem. Kromě TEM mikrofotografií pořízených během studia vlastních i sbírkových kultur byly využity mikrofotografie uveřejněné v odborných publikacích (pocházející z TEM nebo SEM). Při výběru mikrofotografií konkrétního zástupce rodu *Mallomonas* z literatury byly preferovány publikace, ze kterých byly převzaty sekvence DNA do fylogenetických analýz. K hodnocení většiny znaků byla využita analýza obrazu v programu ImageJ verze 1.45s (Schneider et al., 2012), další znaky byly získány převzetím údajů z odborných publikací (Kristiansen & Preisig, 2007; Jo et al., 2013; Kim et al., 2014). Celkem bylo u 39 druhů rodu *Mallomonas* hodnoceno 51 morfologických znaků. Z těchto znaků se jeden týkal tvaru ostnů, čtyři znaky popisovaly morfologii křemičité schránky jako celku a zbývajících 45 znaků sloužilo pro ohodnocení morfologie křemičitých šupin (jejich přehled v tab. 5). Nejvhodnějším typem křemičitých šupin pro komparativní srovnání jejich tvaru a ultrastruktury byly zvoleny tzv. tělní šupiny (angl. „body scales“), které pokrývají převážnou část buňky a zároveň byly identifikovány pro největší počet druhů (Siver, 1991). Hodnoty kvantitativních znaků šupin byly získány měřením nejméně deseti různých křemičitých šupin či ostnů, výjimku představovaly druhy, u kterých bylo k dispozici méně publikovaných mikrofotografií (*Mallomonas areolata*, *M. bronchartiana*, *M. elevata*, *M. hexareticulata*, *M. lacuna*, *M. pseudocratis*, *M. pseudomatvienkoeae*, *M. sorohexareticulata*, *M. splendens*). Snahou bylo získat hodnoty z co největšího počtu křemičitých šupin a na jejich základě spočítat průměrnou hodnotu daného znaku. Údaje o délce a šířce křemičitých šupin byly založeny na průměrných hodnotách dostupných v odborné literatuře (Kristiansen & Preisig, 2007; Jo et al., 2013; Kim

et al., 2014), stejně tak hodnoty délky a šířky křemičité schránky, oboje s výjimkou taxonu *Mallomonas* sp. nov. VN 802.

Hodnoceny byly i morfologické znaky u 19 fosilních druhů, jejichž mikrofotografie byly dostupné v odborné literatuře či databázi Giraffe Pipe (http://fmp.conncoll.edu/Silicasecchidisk/Giraffe_Pipe_homepage.html). Datový soubor byl však redukován o 18 znaků, které nemohly být s dostatečnou věrohodností zhodnoceny (viz tab. 5).

*Tab. 5. Morfologické znaky hodnocené na křemičitých strukturách zástupců rodu Mallomonas, u fosilních zástupců nebyly zhodnocené znaky označené **

Kvalitativní znaky:

- dóm s prohlubněmi *
- dóm s papilami
- dóm s žebry
- ostny přítomny jen na okraji buňky *
- ostny přítomny po celé buňce *
- papily na anteriorním okraji *
- papily na štítu šupiny
- póry na štítu šupiny *
- posteriorní okraj překryt až k V-žeburu *
- posteriorní okraj s póry *
- posteriorní okraj s trámci z V-žebra
- posteriorní okraj se sít'kou
- přítomnost anteriorního submarginalního žebra
- přítomnost centralní vyvýšeniny
- přítomnost dómu
- přítomnost okénka
- přítomnost posteriorního submarginalního žebra
- přítomnost V-žebra
- sekundární síť na štítu šupiny

Kvantitativní znaky:

- cirkularita šupiny
- délka křemičité schránky [μm] *
- délka ostnů [μm] *
- délka šupiny [μm]
- obvod šupiny [μm]
- plocha dómu [μm]
- plocha kápě [μm] *
- plocha okének [nm]
- počet okének
- počet pórů *
- počet póru v ohybu V-žebra *
- počet žeber na anteriorním okraji
- počet žeber na dómu
- počet žeber na štítu šupiny *
- plocha pórů [nm] *
- kruhovitost šupiny
- silicifikace šupiny
- šířka křemičité schránky [μm] *
- šířka přehnutého okraje [%]

- sekundární struktury na štítu šupiny
- šířka přehnutého okraje [μm]
- trámce z dómu
- šířka šupiny [μm]
- trámce z V-žebra na štít šupiny
- úhel V-žebra
- V-žebro dosahující až k okraji šupiny
- vzdálenost žeber na štítu šupiny [μm]
- zmenšené póry v ohybu V-žebra *
- zoubky na štítu z V-žebra *
- zuby na předním okraji šupiny *
- žebra na anteriorním okraji
- žebra na štítu šupiny

3.6.1. Analýza tvarové diverzity křemičitých struktur rodu *Mallomonas*

Hodnoty některých morfologických znaků, ať už měřených nebo převzatých z literatury, spolu mohou být korelovány. Před vlastními statistickými analýzami proto byla vypočtena párová matice korelačních koeficientů pro všechny znaky (přehled hodnot v tab. 13 a 14 v příloze). Protože naprostá většina morfologických znaků nesplňovala podmínku normálního rozdělení, použit byl Spearmanův korelační koeficient (ρ), který při výpočtu nezohledňuje konkrétní hodnotu znaku ale její pořadí v rámci seřazených hodnot dané veličiny (viz tab. 17 v příloze; Foster & Grassberger, 2011). Hodnoty korelačních koeficientů byly spočteny v programu R ver. 3.0.2.

Připravený datový soubor s hodnotami morfologických proměnných byl podroben ordinační analýze. Tato metoda počítá celkovou podobnost studovaných objektů, a to prostřednictvím koeficientů podobnosti či vzdálenosti hodnot znaků, vyjadřuje ji vzdáleností mezi objekty v ordinačním prostoru. Výstup ordinační analýzy tak odráží, jak moc se od sebe liší různí zástupci rodu *Mallomonas* tvarem všech hodnocených křemičitých struktur. Před vlastní ordinační analýzou byly z datového souboru vyloučeny silně korelované morfologické znaky. U dvojic proměnných s absolutní hodnotou Spearmanova koeficientu $\rho > 0,95$ byla vždy jedna z datového souboru vyřazena. Jednalo se o sedm znaků: dóm s žebry, zmenšené póry v ohybu V-žebra, vzdálenost žeber na štítu šupiny, přítomnost okénka, plocha okének, žebra na anteriorním okraji a posteriorní okraj se síťkou. Tři morfologické znaky, u kterých nebyly k dispozici hodnoty pro všechny zástupce (plocha kápě, počet pórů a průměrná plocha pórů) byly rovněž z datového souboru vyloučeny. S přihlédnutím ke smíšené povaze morfologických dat (binární, vícestavové i spojité kvantitativní znaky) a vzhledem k tomu, že počet hodnocených znaků (41) převažoval nad počtem studovaných druhů (39), zvolena byla

metoda analýzy hlavních koordinát (PCoA, angl. „Principal coordinates analysis“). Vzdálenostní matice byla vypočítána ze standardizovaných hodnot znaků prostřednictvím Gowerova koeficientu. Analýza hlavních koordinát morfologických znaků byla provedena pomocí programu Canoco ver. 5 (Lepš & Šmilauer, 2014) a její výstup graficky znázorněn ordinačním diagramem. Kromě datového souboru sestávajícího z recentních zástupců byla následně analogickým způsobem provedena i analýza kombinovaného datového souboru obsahujícího kromě recentních zástupců i třetihorní fosilie křemičitých struktur. Kombinovaný datový soubor byl však dále redukován na 19 znaků, které mohly být věrohodně zaznamenány na fosilním materiálu.

3.6.2. Evoluce tvaru křemičitých struktur

3.6.2.1. Testování evolučních trendů

Charakter evoluce morfologických znaků lze numericky vyjádřit prostřednictvím několika koeficientů (viz kap. 1.2.3.), jejichž hodnoty umožňují i statistické zhodnocení evoluce tvaru. Pro kvantitativní morfologické znaky byly vypočítány tzv. škálovací parametry: lambda (λ), kappa (κ) a delta (δ ; Pagel et al., 2004). Pro výpočet jednotlivých parametrů byly vytvořeny modely srovnávající hodnoty konkrétního morfologického znaku s topologií fylogenetického stromu zástupců rodu *Mallomonas*. Pro tyto účely byl využit časově kalibrovaný fylogenetický strom vytvořený Bayesovskou analýzou v programu BEAST (viz kap. 3.5.2), redukováný pouze na linii vedoucí k zástupcům rodu *Mallomonas*. Tyto modely, založené na regresní metodě „Phylogenetic generalized least squares“ (PGLS), byly vytvořeny pomocí knihovny „caper“ ver. 0.5.2 (Orme et al., 2013) v programu R. Morfologické znaky byly před začleněním do modelu logaritmicky transformovány. Hodnoty škálovacích parametrů byly vypočteny metodou „Maximum likelihood“ postupně, při výpočtu hodnot každého z parametrů byly hodnoty zbývajících dvou fixovány na hodnotu 1.

K hodnocení fylogenetického signálu v rozložení hodnot binárních znaků (presence / absence) byl využit parametr D (Fritz & Purvis, 2010). Výpočet hodnoty parametru byl proveden prostřednictvím tzv. Fritz-Purvisova testu dostupného rovněž v knihovně „caper“ v programu R. Vstupními daty byly hodnoty binární morfologické proměnné a tentýž fylogenetický strom rodu *Mallomonas*, jaký byl použit pro hodnocení kvantitativních znaků. Pro výpočet parametru D bylo použito 10 000 permutací.

Pro všechny parametry popisující evoluční trendy (lambda, kappa, delta a D) byly kromě vlastních hodnot vypočteny i 95% konfidenční intervaly. Rovněž byly provedeny statistické testy, hodnotící, zdali se vypočtená hodnota daného parametru prokazatelně liší od mezních

hodnot, kterých může parametr nabývat. V případě parametrů λ a D , hodnotících obecně vliv fylogeneze na přítomnost či hodnotu určitého morfologického znaku, vždy jedna z testovaných mezních hodnot odpovídala absenci fylogenetického signálu v datech. Binární i kvantitativní znaky, na jejichž variabilitu nebyl vliv fylogeneze průkazný (tj. $D = 1$ nebo $\lambda = 0$) byly vyloučeny z následných rekonstrukcí evoluce (viz kap. 3.9.2).

3.6.2.2. Rekonstrukce evoluce morfologických znaků

Moderní fylogenetické komparativní metody umožňují na základě hodnot znaku měřeného u různých druhů a znalosti fylogenetických vztahů mezi nimi rekonstruovat ancestrální stavy tohoto znaku pro všechny uzly (angl. „internal nodes“) fylogenetického stromu, i jejich grafické znázornění (viz kap. 1.2.2.).

K modelování evoluce kvantitativních morfologických znaků na fylogenetický strom byla použita funkce „contMap“ dostupná v R knihovně „phytools“ ver. 0.4-45 (Revell, 2012). Prostřednictvím funkce „ace“ z knihovny „ape“ ver. 3.2 (Popescu et al., 2012) byl metodou „Maximum likelihood“ vytvořen evoluční model k rekonstrukci ancestrálních hodnot znaku ve všech uzlech fylogenetického stromu, změny hodnot znaků byly modelovány pomocí Brownova pohybu. Ancestrální hodnoty znaků byly následně pomocí funkce „contMap“ graficky znázorněny na větvích fylogenetického stromu, hodnoty z úzlů byly interpolovány pomocí metody, kterou zavedl Felsenstein (1985). Hodnoty kvantitativních znaků byly před začleněním do modelu logaritmicky transformovány, aby byl omezen případný vliv extrémních hodnot u některých druhů. V modelu byl použit časově kalibrovaný fylogenetický strom rodu *Mallomonas* vytvořený Bayesovskou analýzou v programu BEAST (stejný jako pro výpočet parametrů v kap. 3.6.2.1.).

Rekonstrukce evoluce binárních morfologických znaků byla provedena pomocí funkcí „make.simmap“ a „densityMap“ obsažených také v R knihovně „phytools“. První z nich vytváří nejprve na základě vstupních dat matici pravděpodobností přechodů mezi znaky (presence / absence) metodou „Maximum likelihood“, následně jsou podle této matice náhodně vybírány možné evoluční historie znaku metodou stochastického mapování (viz kap. 1.2.2.). Vstupními daty byla binární morfologická proměnná a fylogenetický strom rodu *Mallomonas* (viz výše), simulace byla provedena s 999 opakováními. Pomocí funkce „densityMap“ byla ze simulovaných historií daného znaku vypočtena hustota posteriorních pravděpodobností přítomnosti znaku pro jednotlivé uzly fylogenetického stromu a graficky znázorněna.

3.6.3. Srovnání morfologické podobnosti a fylogenetických vztahů rodu *Mallomonas*

Ke srovnání fenotypu křemičitých struktur zástupců rodu *Mallomonas* v kontextu evolučních vztahů mezi zástupci této skupiny prostřednictvím většího počtu morfologických znaků byla využita vizualizační technika zvaná „phylogenetic space plot“ (Sidlauskas, 2008). Jejím principem je projekce fylogenetického stromu studované skupiny do 2-3 rozměrného ordinačního prostoru založeném na měřených morfologických znacích. Fenotyp křemičitých schránek byl vyjádřen PCoA analýzou s Gowerovou distancí, která byla založena na hodnotách 41 morfologických proměnných recentních zástupců rodu (detailněji viz kap. 3.6.). Hodnoty PCoA skóru pro první dvě osy byly exportovány z programu Canoco ver. 5 (Lepš & Šmilauer, 2014) do programu R. Zdrojem informace o evolučních vztazích byl časově kalibrovaný fylogenetický strom rodu *Mallomonas* vytvořený Bayesovskou analýzou v programu BEAST. Pomocí funkce „phylogenetic space“ z R knihovny „phytools“ ver. 0.4-45 (Revell, 2012) byly pro vnitřní uzly fylogenetického stromu stanoveny hodnoty ancestrálních stavů morfologických znaků a byl graficky vyneseno do PCoA diagramu.

4. Výsledky

4.1. Fylogenetické analýzy

Do fylogenetických analýz bylo zahrnuto celkem 89 taxonů, zástupci rodu *Mallomonas* představovali 59 z nich. Pro každý taxon byly analyzovány sekvence nejméně jednoho ze studovaných markerů (SSU rDNA, LSU rDNA, rbcL, viz tab. 10-12 v příloze). Sekvence 38 zástupců rodu *Mallomonas*, u kterých bylo možné ověřit správnost jejich určení v původním zdroji, byly převzaty z databáze GenBank (tab. 11 v příloze). V průběhu diplomové práce bylo zároveň do kultur vyizolováno 21 zástupců tohoto rodu, z nichž bylo úspěšně osekvenováno 16 SSU rDNA oblastí, 18 LSU rDNA oblastí a 17 úseků rbcL oblastí (tab. 10 v příloze). V případě druhů *Mallomonas intermedia* (sekce *Mallomonas*), *M. rasilis* (sekce *Papillosae*), *M. ouradion* (sekce *Ouradiotae*), *M. paludosa* (sekce *Leboimeanae*), *M. tolerans* (sekce *Planae*) a *M. pumilio* var. *dispersa* (sekce *Torquatae*) se jednalo taxony, pro něž doposud nebyla k dispozici žádná molekulární data. Získány byly sekvence i pro doposud nepopsaný taxon *Mallomonas* sp. nov. VN 802.

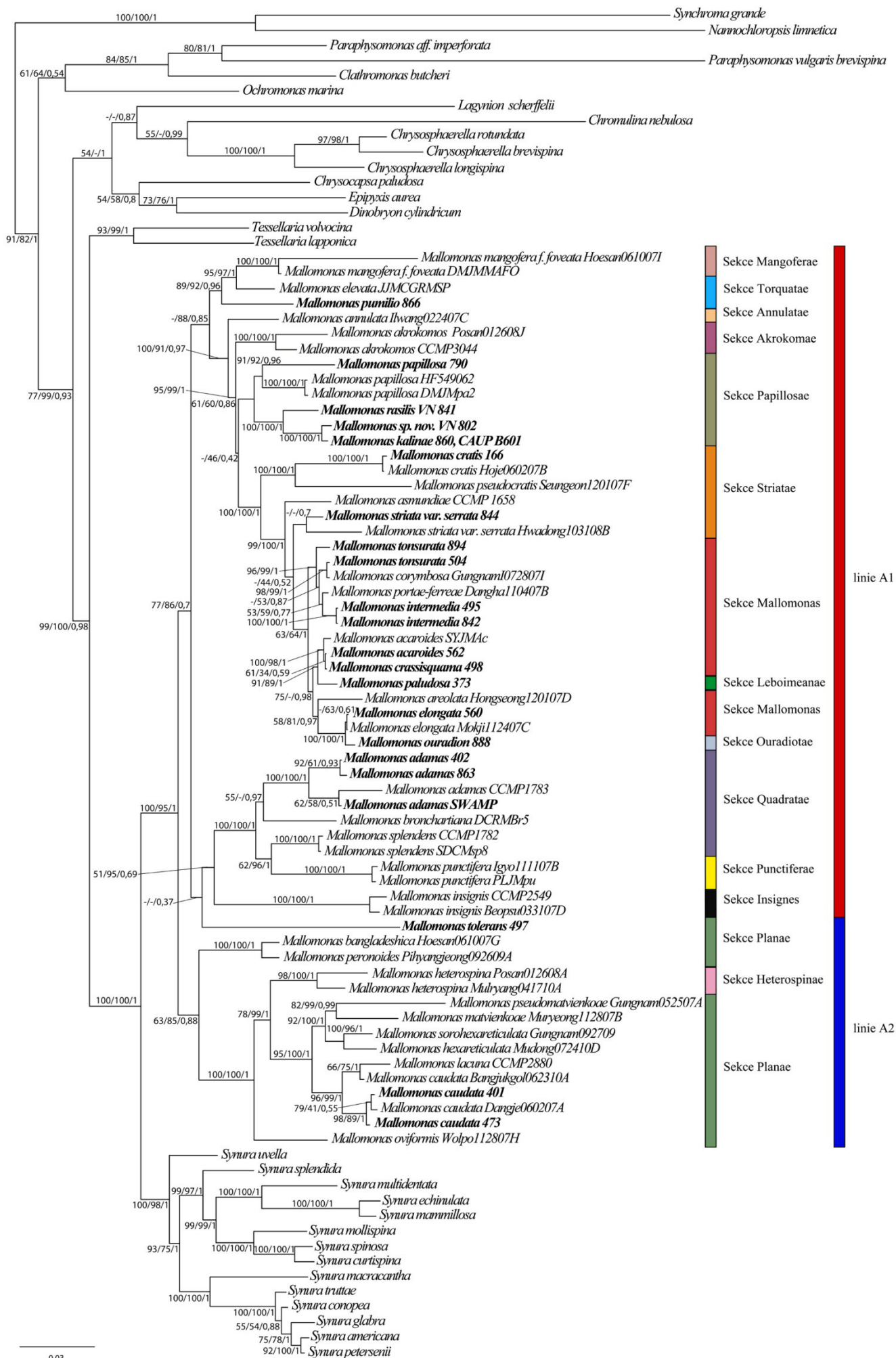
4.1.1. Fylogenetický BI strom

Fylogenetický strom získaný v programu MrBayes rozdělil zástupce skupiny Chrysophyceae do několika linií (obr. 2). Jednotlivé rody tvoří na fylogenetickém stromě monofyletické linie. Linie *Synurales* je zde představována rody *Tessellaria*, *Synura* a *Mallomonas*.

V rámci rodu *Mallomonas* je možné s nepříliš vysokou podporou rozlišit dvě hlavní linie. První z linií zahrnuje většinu zástupců tohoto rodu, převážně se jedná o zástupce nesoucí na svých křemičitých šupinách strukturu V-žebra. Patří sem taxony řazené do sekcí *Planae*, *Insignes*, *Mangoferae*, *Torquatae*, *Annulatae*, *Akrokomae*, *Papillosae*, *Striatae*, *Ouradiotae*, *Mallomonas*, *Leboimeanae*, *Quadratae* a *Punctiferae*. Naopak druhá linie je zpravidla představována zástupci bez struktury V-žebra na křemičitých šupinách. Do této linie náleží taxony ze sekcí *Planae* a *Heterospinae*. Malé sekce, představované ve fylogenetické analýze (obr. 2) nezřídka jen jediným zástupcem, se velmi často nachází jako vnitřní skupiny větších sekcí, čímž tvoří z větších sekcí parafyletické skupiny (sekce *Mangoferae* v sekci *Torquatae*, sekce *Leboimeanae* a *Ouradiotae* v sekci *Mallomonas*, sekce *Punctiferae* v sekci *Quadratae* a sekce *Heterospinae* v sekci *Planae*). Sekce *Planae* je navíc rozdělena do dvou linií, a to kvůli zařazení druhu *M. tolerans* mezi druhy které typicky disponují strukturou V-žebra na svých šupinách. Až na tyto výjimky utvářejí větší sekce konzistentní skupiny.

Druhy, pro které doposud nebyla k dispozici žádná molekulární data, se začlenily na různé pozice v rámci první linie (s V-žebrem). Konkrétně druh *Mallomonas pumilio* var. *dispersa* se zařadil k taxonům *M. mangofera* f. *foveata* a *M. elevata*. Druh *M. rasilis* se umístil na fylogenetickém stromě v blízkosti zástupců *M. kalinae* a *M. sp. nov. VN 802*. Druh *M. ouradion* se na fylogenetickém stromě zařadil do příbuzenstva *M. elongata*, *M. intermedia* pak k druhu *M. portae-ferreae*. Společnou skupinu s druhem *M. paludosa* utvořily druhy *M. acaroides* a *M. crassisquama*. Taxon *Mallomonas tolerans* se začlenil do jedné fylogenetické linie s druhy *M. adamas*, *M. bronchartiana*, *M. splendens*, *M. punctifera* a *M. insignis*. Parafyleticky se na fylogenetickém stromě rozdělují taxony *Mallomonas acaroides*, *M. caudata* a *M. tonsurata*.

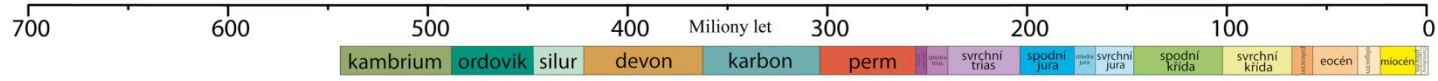
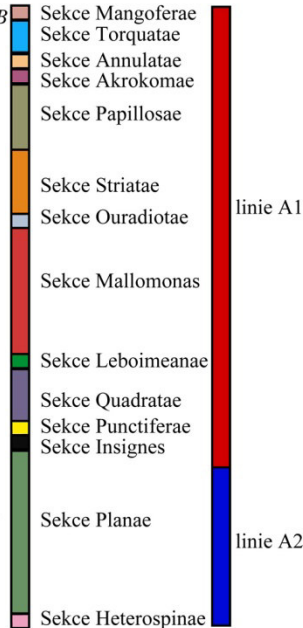
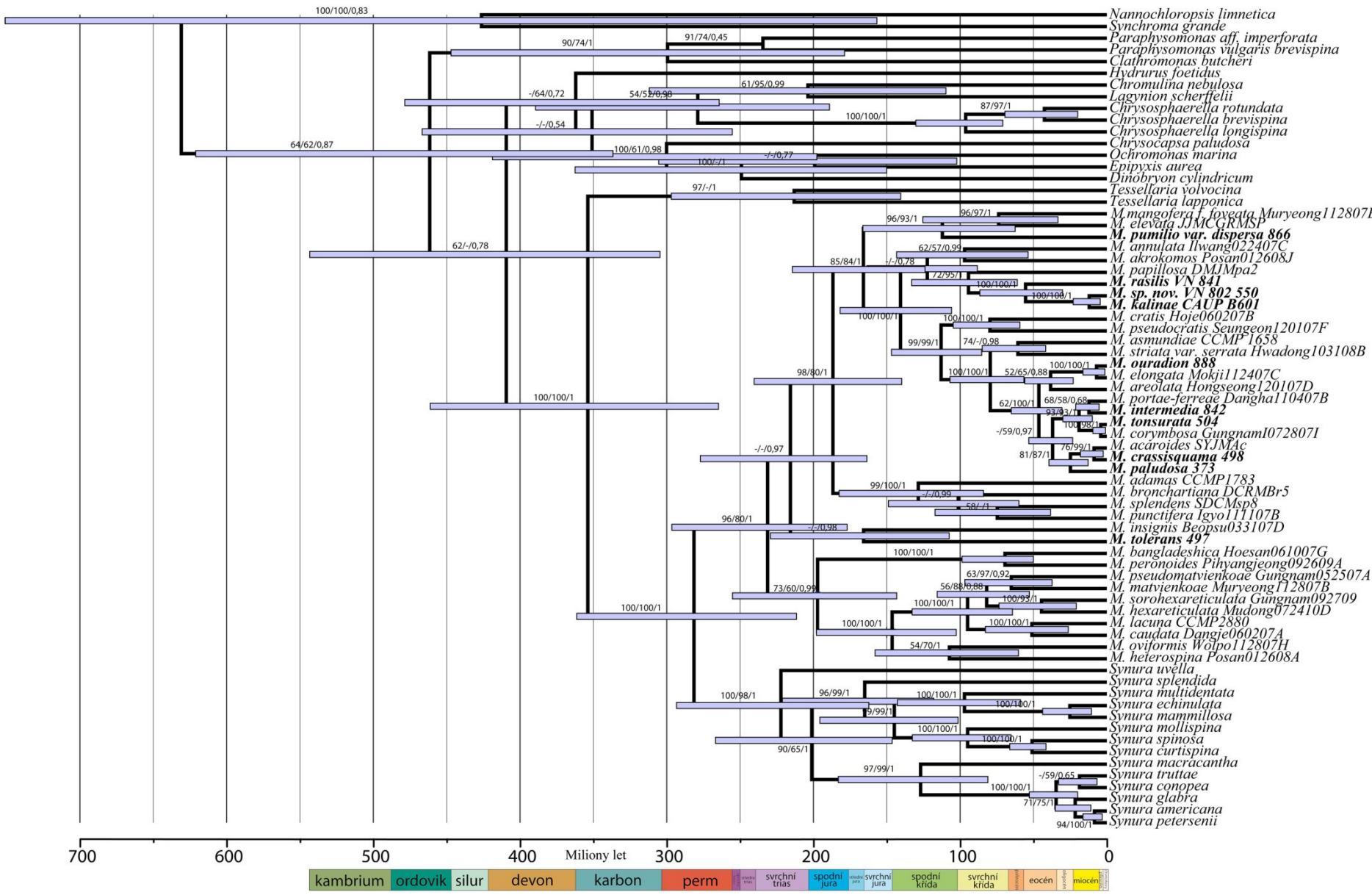
Obr. 2. (následující strana) Fylogenetický BI strom rodu *Mallomonas* a dalších zástupců linie *Chrysophyceae* založený na molekulárních markerech *SSU rDNA*, *LSU rDNA* a *rbcL* oblasti. Hodnoty u jednotlivých větví značí statistickou podporu odhadovanou třemi metodami: *ML* „bootstrap“ (vlevo), *MP* „bootstrap“ (uprostřed) a posteriorní Bayesovskou pravděpodobnost (*PP*, vpravo). Tučně jsou vyznačeny izoláty, pro které byly v rámci této práce získány sekvence. Měřítko ukazuje odhadovaný počet substitucí na místo.



4.1.2. Časově kalibrovaný BI fylogenetický strom

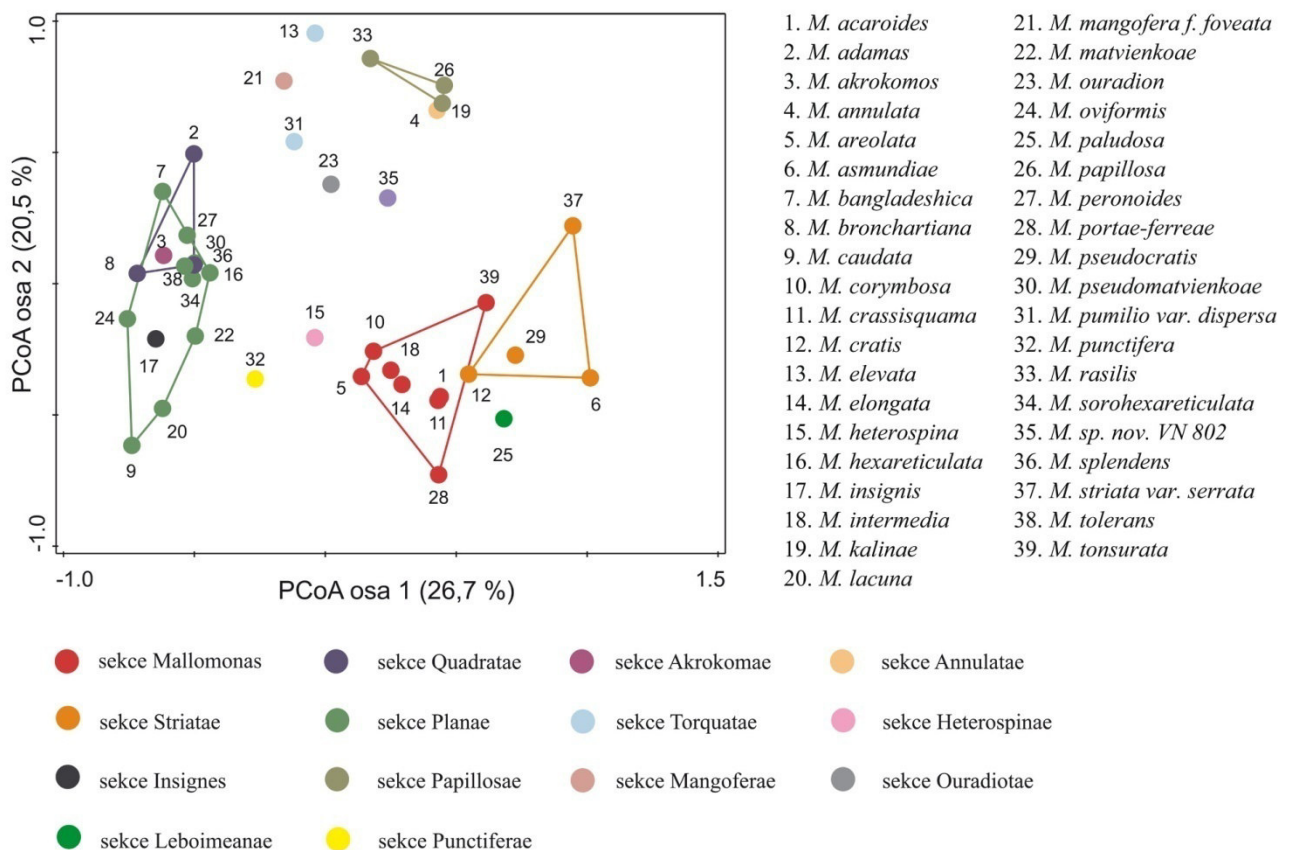
Ve zkonstruovaném časově-kalibrovaném fylogenetickém stromě (tzv. chronogramu; obr. 3) se linie vedoucí k jednotlivým rodům rozdělily kongruentně s předchozím BI fylogenetickým stromem (viz kap. 4.1.1). Stáří linie Synurales je odhadováno na přibližně 400 milionů let (95% konfidenční interval: 310 – 540 mil. let). Rod *Tessellaria* se od zbývajících linií skupiny Synurales oddělil jako první, následován rodem *Mallomonas*, který se objevil před cca 280 miliony lety (95% konfidenční interval 210 – 360 mil. let). Rod *Mallomonas* se dále rozdělil do dvou hlavních linií, ve kterých jsou jednotlivé sekce seřazeny shodně s předchozím BI fylogenetickým stromem. Oddělení těchto dvou hlavních linií rodu proběhlo přibližně před 230 miliony lety (95% konfidenční interval 170 – 290 mil. let). Mezi nejstarší taxony rodu *Mallomonas* patří *M. insignis* a *M. tolerans*. Zařazení taxonů, pro které byly poprvé získány sekvence (*Mallomonas intermedia*, *M. ouradion*, *M. paludosa*, *M. pumilio* var. *dispersa*, *M. rasilis* a *M. sp. nov. VN 802*), je v souladu s výsledky předchozího fylogenetického stromu.

Obr. 3. (následující strana) Časově kalibrovaný BI fylogenetický strom (chronogram) rodu Mallomonas a dalších zástupců Chrysophyceae. Fylogenetická analýza byla založena na molekulárních markerech SSU rDNA, LSU rDNA a rbcL oblasti. Číselné hodnoty u jednotlivých větví vyjadřují statistickou podporu stanovenou paralelně třemi metodami: ML „bootstrap“ (vlevo), MP „bootstrap“ (uprostřed) a posteriorní Bayesovskou pravděpodobností (PP, vpravo). Světle modré obdélníky znázorňují 95% konfidenční intervaly časových odhadů. Tučně jsou vyznačeny izoláty, pro které byly v rámci této práce získány sekvence.



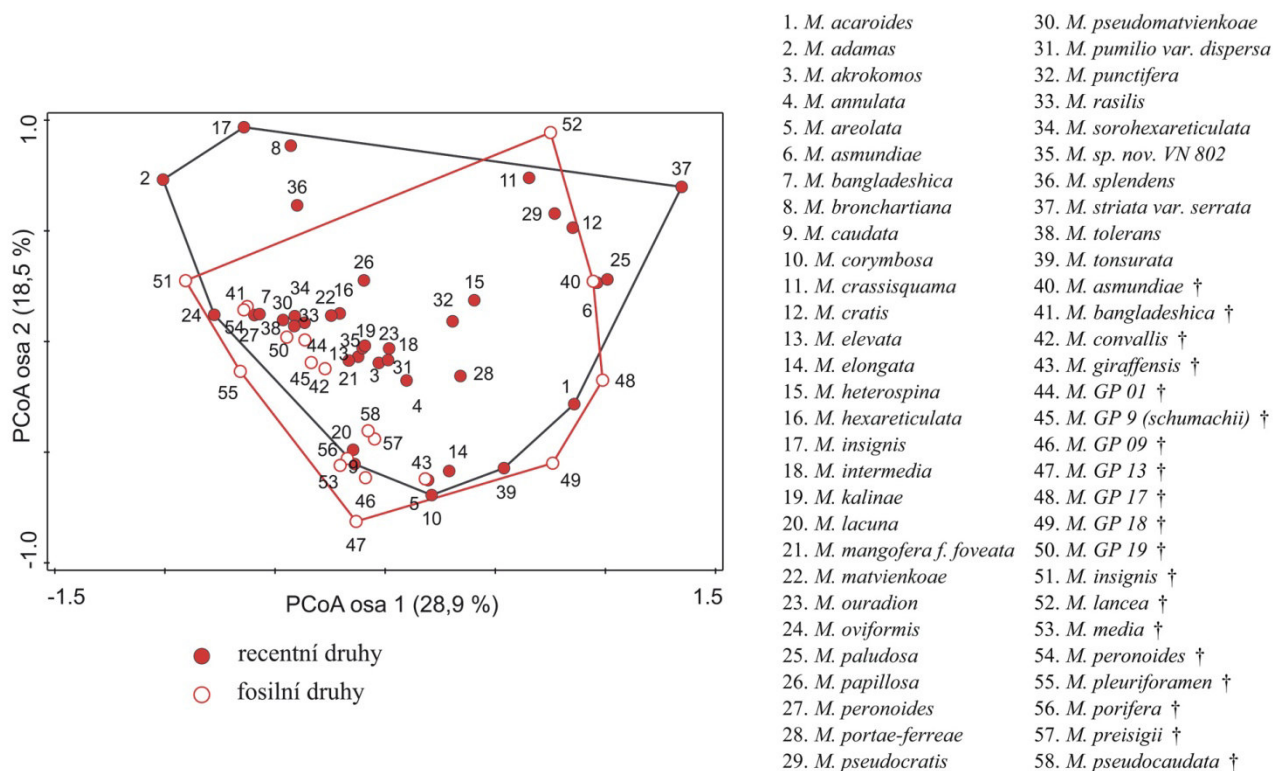
4.2. Tvarová diverzita křemičitých struktur u zástupců rodu *Mallomonas*

Analýza hlavních koordinát (PCoA) recentních zástupců rodu *Mallomonas* rozdělila většinu druhů spolehlivě v ordinačním prostoru na základě morfologických rozdílů jejich křemičitých struktur (obr. 4). První osa vysvětlila 26,7 % variability, druhá osa vysvětlila 20,5 % variability v morfologických znacích mezi studovanými druhy. Z ordinačního diagramu PCoA je patrné, že druhy náležící do stejných morfologicky definovaných sekcí (podle (Kristiansen, 2005; Siver et al., 2015) se zpravidla sdružují blíže k sobě, nezřídka však dochází i k překryvům sekcí (Annulatae a Papillosae; Akrokomae, Insignes a Quadratae se sekcí Planae). Jako velmi špatně odlišitelné se v PCoA analýze ukázaly druhy *Mallomonas pseudomatvienkoae*, *M. sorohexaretioclata*, *M. splendens* a *M. tolerans* či druhy *M. annulata* a *M. kalinae*.



Obr. 4. Diagram PCoA ukazuje rozmístění 39 recentních zástupců rodu *Mallomonas* v ordinačním prostoru na základě rozdílů ve 41 hodnocených znacích popisujících morfologii křemičitých struktur. U všech taxonů je barevně vyznačena příslušnost do jednotlivých morfologicky definovaných sekcí.

Druhá analýza PCoA zahrnovala kromě recentních i fosilní zástupce rodu *Mallomonas* pocházející z paleolimnologické lokality Giraffe Pipe v severní Kanadě. První dvě ordinační osy vysvětlily 28,9 % a 18,5 % celkové variability v morfologii křemičitých šupin. Z ordinačního diagramu je patrné, že se fosilní zástupci zařadili tvarem svých křemičitých struktur mezi druhy recentní (obr. 5). Fosilní zástupci *Mallomonas asmundiae*, *M. bangladeshica* a *M. peronoides* se nejvíce podobali svým recentním protějškům. Celou řadu fosilních taxonů však morfologie jejich křemičitých struktur přiřadila k recentním zástupcům jiných druhů. Jednalo se o fosilie *Mallomonas insignis* (podobné recentnímu druhu *M. oviformis*), *Mallomonas* GP 1 (podobné *M. rasilis*), *Mallomonas* GP 17 (podobné *M. acaroides*), *Mallomonas* GP 19 (podobné *M. tolerans*) a *M. giraffensis* (podobné *M. areolata*). Fosilní druhy *Mallomonas* GP 9, *M. media*, *M. porifera*, *M. pseudocaudata* a *M. preisigii* nejvíce připomínaly recentní druhy *M. caudata* a *M. lacuna*. Fosilní druhy *M. convallis* a *M. schumachii* se svou morfologií blížily recentnímu druhu *M. elevata*.



Obr. 5. Diagram PCoA ukazuje rozmístění 39 recentních (plné symboly) a 19 fosilních (prázdné symboly) zástupců rodu *Mallomonas* v ordinačním prostoru na základě rozdílů v 19 znacích odrážejících morfologii křemičitých struktur.

4.3. Testování evolučních trendů pro jednotlivé znaky

4.3.1. Evoluce morfologických znaků kódovaných binárními proměnnými

Pro vyhodnocení evolučních trendů spočívajících v přítomnosti či nepřítomnosti útvarů na křemičitých strukturách (tj. binární morfologické znaky) byl tzv. Fritz-Purvisovým testem získán evoluční parametr D (tab. 6). U šesti morfologických znaků nebyla hodnota parametru D prokazatelně odlišná od hodnoty 1, a na evoluci daného znaku tak neměla fylogeneze signifikantní vliv. Jednalo se o znaky trámce z dómu, póry na štítu šupiny, zoubky na štítu šupiny, zubatý přední okraj šupiny, posteriorní submarginální žebro a V-žebro až k okraji šupiny (tab. 6). Tyto znaky, neovlivněné fylogenetickým vývojem, nebyly dále mapovány na fylogenetický strom (viz kap. 4.5). Zbývajících 21 znaků nabývalo hodnot parametru D nelišících se prokazatelně od nuly, což svědčí o vlivu fylogeneze na evoluci daných znaků (tab. 6). Mezi morfologické znaky s nejnižšími stanovenými hodnotami parametru D, a tedy i s nejvyšším předpokládaným vlivem fylogeneze (viz kap. 1.2.3.2), patří přítomnost centrální vyvýšeniny (-1,80), dóm s papilami (-1,62), posteriorní okraj se síťkou (-1,44), posteriorní okraj překryt až k V-žebro (-1,39) a přítomnost V-žebra (-0,94).

4.3.2. Evoluce morfologických znaků kódovaných kvantitativními proměnnými

Pro vyhodnocení průběhu evoluce jednotlivých kvantitativních morfologických znaků byly na základě topologie BI chronogramu vypočteny tzv. škálovací parametry lambda (λ), kappa (κ) a delta (δ ; tab. 7-9).

Hodnoty škálovacího parametru lambda odráží míru fylogenetického signálu v morfologických datech. U osmi morfologických znaků se vypočtené hodnoty parametru lambda nelišily prokazatelně od nuly a evoluce těchto znaků tak nebyla signifikantně korelována s fylogenezí (tab. 7). Jednalo se o znaky: počet žeber na dómu, počet žeber na štítu šupiny, počet pórů, plocha pórů, šířka přehnutého okraje [%], vzdálenost žeber na štítu šupiny, cirkularita šupiny a délka křemičité schránky. Tyto znaky byly vyloučeny ze stanovení dalších škálovacích parametrů (kappa, delta) i následného mapování na fylogenetický strom (viz kap. 4.5). Evoluce zbývajících 15 morfologických znaků (tab. 7) byla ovlivněna fylogenezí. Deset znaků se svými hodnotami parametru lambda signifikantně lišilo od nuly i od jedné a nabývalo hodnot parametru v rozmezí 0 – 1 (zpravidla kolem hodnoty 0,5). Pro tyto znaky tak byla typická nižší intenzita vlivu fylogeneze na jejich evoluční vývoj. Jednalo se o plochu kápě V-žebra, plochu dómu, délku šupiny, šířku šupiny, počet zmenšených pórů v ohybu V-žebra, šířku přehnutého kraje, silicifikaci šupiny, obvod šupiny, roudness šupiny a šířku křemičité schránky. U pěti znaků se stanovená hodnota

parametru lambda nelišila prokazatelně od jedné, naznačující silný vliv fylogeneze na jejich evoluci: úhel V-žebra, počet okének, plocha okének, počet žeber na anteriorním okraji a délka ostnu.

U deseti morfologických znaků ovlivněných fylogenezí se hodnota parametru kappa nelišila prokazatelně od nuly, a vykazovaly tak charakter evoluce nezávislý na délce větví (tj. punktualistický vývoj). Jednalo se o plochu kápě V-žebra, plochu dómu, délku šupiny, šířku šupiny, počet zmenšených pórů v ohybu V-žebra, šířku přehnutého okraje, silicifikaci šupiny, obvod šupiny, kruhovitost šupiny a šířku křemičité schránky (tab. 8). Znak délka ostnů dosahoval hodnoty parametru blížíící se jedné (95% konfidenční interval 0,73– 1,43), kterou lze interpretovat v souladu s gradualistickým vývojem znaku v evoluci. Čtyři morfologické znaky dosahovaly hodnot parametru kappa nelišících se průkazně od $\kappa = 3$ (tab. 8): úhel V-žebra, počet okének, plocha okének a počet žeber na anteriorním okraji. U těchto znaků tak dochází k více proměnám na delších větvích fylogenetického stromu.

Většina znaků, jež byla ovlivněna fylogenezí, vykazovala hodnotu škálovacího parametru delta větší než 1 (nelišila se signifikantně od $\delta = 3$). U většiny z těchto znaků tak docházelo k hromadění stejného množství změn za jednotku času (tab. 9). Výjimkou byly čtyři znaky s odhady hodnot parametru $\delta < 1$: úhel V-žebra, počet okének, plocha okének a délka ostnů (tab. 9). Taková hodnota by odpovídala scénáři, podle kterého došlo k rychlé počáteční evoluci následované pomalejšími změnami (tj. adaptivní radiaci). Horní hranice 95% konfidenčních intervalů odhadu hodnot parametru delta však u těchto čtyř znaků přesahuje hodnotu 1, a tak u nich nelze adaptivní radiaci spolehlivě vyloučit ani potvrdit.

Binární morfologický znak	D	Pst. (D = 1)	Pst. (D = 0)
přítomnost V-žebra	-0,93	< 0,001	0,958
přítomnost dómu	-0,75	< 0,001	0,934
dóm s prohlubněmi	0,25	0,029	0,351
dóm s papilami	-1,62	< 0,001	0,979
dóm s žebry	0,05	0,041	0,497
trámce z dómu	0,4	0,08	0,28
žebra na štítu šupiny	-0,47	0,002	0,783
póry na štítu šupiny	0,51	0,094	0,181
papily na štítu šupiny	0,15	0,006	0,393
trámce z V-žebra na štít šupiny	-0,35	0,001	0,742
zmenšené póry v ohybu V-žebra	0,16	0,013	0,402
přítomnost okénka	-0,63	< 0,001	0,898
zoubky na štítu z V-žebra	0,38	0,076	0,289
sekundární struktury na štítu šupiny	0,24	0,032	0,356
sekundární síť na štítu šupiny	0,26	0,015	0,321
přítomnost anteriorního submarginalního žebra	-0,41	< 0,001	0,799
žebra na anteriorním okraji	-0,31	0,021	0,647
papily na anteriorním okraji	-0,06	0,011	0,566
zuby na předním okraji šupiny	1,24	0,559	0,175
přítomnost posteriorního submarginalního žebra	-0,63	0,231	0,64
posteriorní okraj s póry	0,26	0,016	0,325
posteriorní okraj s trámcí z V-žebra	-0,07	0,003	0,583
posteriorní okraj se sítkou	-1,44	0,005	0,906
posteriorní okraj překryt až k V-žeburu	-1,39	0,004	0,904
přítomnost centrální vyvýšeniny	-1,8	0,001	0,952
V-žebro dosahující až k okraji šupiny	0,82	0,306	0,103
ostny přítomny jen na okraji buňky	-0,23	0,004	0,676
ostny přítomny po celé buňce	-0,45	< 0,001	0,806

Tab. 6. Přehled hodnot parametru *D* pro jednotlivé binární znaky hodnocené na křemičitých strukturách zástupců rodu *Mallomonas*. Parametr *D* vyjadřuje charakter evoluce binárních morfologických znaků. Hypotézy, že *D* = 1 (charakter znaku se v evoluci mění náhodně) a *D* = 0 (znak je ovlivněn fylogenezí), byly statisticky testovány.

Kvantitativní morfologický znak	lambda (ML)	Pst. ($\lambda = 0$)	Pst. ($\lambda = 1$)	95% konf. interval
úhel V-žebra	1	< 0,001	1	0,959-?
plocha kápě [μm]	0,59	< 0,001	< 0,001	0,26-0,84
počet žeber na dómu	0,13	0,464	< 0,001	?-0,67
plocha dómu [μm]	0,62	< 0,001	< 0,001	0,29-0,85
délka šupiny [μm]	0,69	0,01	< 0,001	0,2-0,92
šířka šupiny [μm]	0,82	< 0,001	< 0,001	0,53-0,94
počet žeber na štítu šupiny	0,33	0,160	< 0,001	?-0,8
počet pórů	0,41	0,199	< 0,001	?-0,84
plocha pórů [nm]	0,31	0,323	< 0,001	?-0,79
počet póru v ohybu V-žebra	0,32	0,026	< 0,001	0,03-0,68
počet okének	1	< 0,001	1	0,97-?
plocha okének [nm]	1	< 0,001	1	0,97-?
počet žeber na anteriorním okraji	1	< 0,001	1	0,96-?
šířka přehnutého okraje [μm]	0,86	0,014	0,015	0,29-0,99
šířka přehnutého okraje [%]	0,68	0,121	< 0,001	?-0,92
vzdálenost žeber na štítu [μm]	0,1	0,433	< 0,001	?-0,51
silicifikace šupiny	0,78	0,001	0,003	0,35-0,96
obvod šupiny [μm]	0,6	0,025	< 0,001	0,08-0,88
cirkularita šupiny	0,87	0,238	0,017	?-0,99
kruhovitost šupiny	0,7	0,013	< 0,001	0,12-0,95
délka ostnů [μm]	0,97	< 0,001	0,186	0,834-?
délka křemičité schránky [μm]	0,63	0,203	< 0,001	?-0,9
šířka křemičité schránky [μm]	0,69	0,019	< 0,001	0,15-0,9

Tab. 7. Přehled hodnot parametru lambda (λ) pro jednotlivé kvantitativní znaky hodnocené na křemičitých strukturách zástupců rodu Mallomonas. Parametr λ odráží charakter evoluce kvantitativních morfologických znaků. Hypotézy, že $\lambda = 0$ (charakter znaku se v evoluci mění náhodně) a $\lambda = 1$ (znak je ovlivněn fylogenezí), byly statisticky testovány. Přesnost odhadu parametru byla doplněna 95% konfidenčním intervalem, kde jeho mezní hodnoty nebyly k dispozici, byly nahrazeny znakem „?“.

kontinuální morfologický znak	kappa (ML)	Pst ($\kappa = 0$)	Pst ($\kappa = 3$)	95% konf. interval
úhel V-žebra	2,8	< 0,001	0,447	2,21-?
plocha kápě [μm]	0	1	< 0,001	?-0,30
plocha dómu [μm]	0	1	< 0,001	?-0,24
délka šupiny [μm]	0,26	0,226	< 0,001	?-0,64
šířka šupiny [μm]	0,15	0,442	< 0,001	?-0,50
počet póru v ohybu V-žebra	0	1	< 0,001	?-0,20
počet okének	3	< 0,001	1	2,58-?
plocha okének [nm]	2,98	< 0,001	0,937	2,32-?
počet žeber na anteriorním okraji	3	< 0,001	1	2,65-?
šířka přehnutého okraje [μm]	0,56	0,053	< 0,001	?-1,02
silicifikace šupiny	0,34	0,187	< 0,001	?-0,83
obvod šupiny [μm]	0,22	0,273	< 0,001	?-0,6
kruhovitost šupiny	0	1	< 0,001	?-0,46
délka ostnů [μm]	1,1	< 0,001	< 0,001	0,73-1,43
šířka křemičité schránky [μm]	0,08	0,722	< 0,001	?-0,47

Tab. 8. Přehled hodnot parametru kappa (κ) pro jednotlivé kvantitativní morfologické znaky s prokazatelným vlivem fylogeneze (tj. $\lambda = 1$). Parametr κ odráží charakter evoluce kvantitativních morfologických znaků. Hypotézy, že $\kappa = 0$ (evoluce znaku nezávisí na délce větve fylogenetického stromu) a $\kappa = 3$ (delší větve fylogenetického stromu přispívají více k evoluci znaku), byly statisticky testovány. Přesnost odhadu parametru byla doplněna 95% konfidenčním intervalem, kde jeho mezní hodnoty nebyly k dispozici, byly nahrazeny znakem „?“.

kontinuální morfologický znak	delta (ML)	Pst. ($\delta = 0$)	Pst. ($\delta = 3$)	95% konf. interval
úhel V-žebra	0,43	< 0,001	< 0,001	0,04-1,18
plocha kápě [μm]	3	< 0,001	1	2,01-?
plocha dómu [μm]	3	< 0,001	1	2,14-?
délka šupiny [μm]	3	< 0,001	1	1,93-?
šířka šupiny [μm]	3	< 0,001	1	1,78-?
počet póru v ohybu V-žebra	3	< 0,001	1	2,42-?
počet okének	0,76	< 0,001	0,015	0,06-2,4
plocha okének [nm]	0,47	< 0,001	0,003	0,03-1,81
počet žeber na anteriorním okraji	1,65	< 0,001	0,19	0,36-?
šířka přehnutého okraje [μm]	2,92	< 0,001	0,964	0,9-?
silicifikace šupiny	2,86	< 0,001	0,915	1,12-?
obvod šupiny [μm]	3	< 0,001	1	1,94-?
kruhovitost šupiny	3	< 0,001	1	1,84-?
délka ostnů [μm]	0,87	< 0,001	0,039	0,1-2,82
šířka křemičité schránky [μm]	3	< 0,001	1	1,99-2

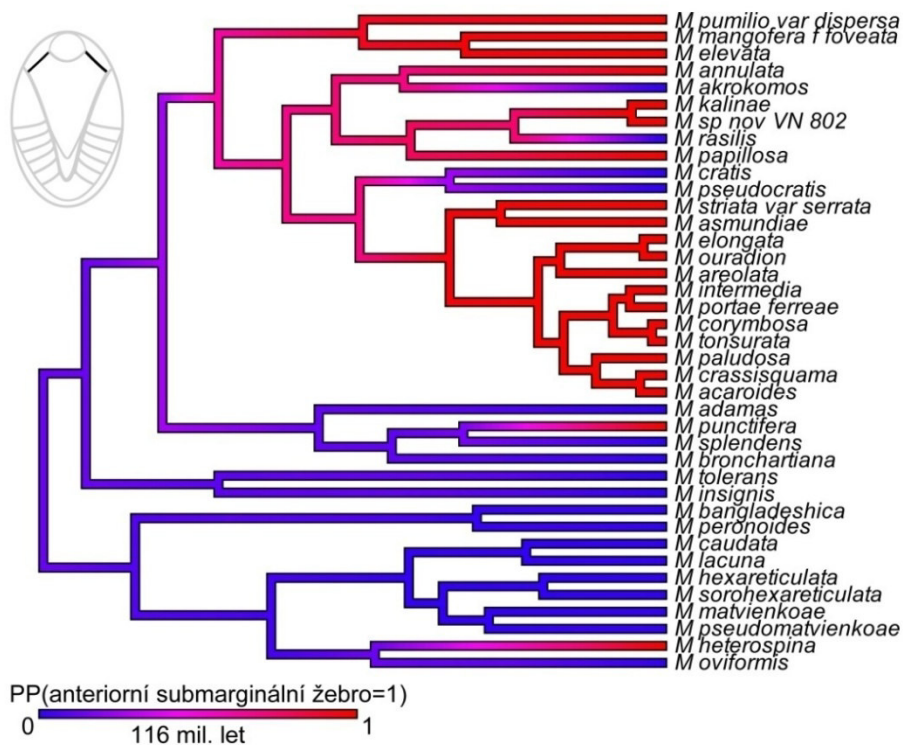
Tab. 9. Přehled hodnot parametru delta (δ) pro jednotlivé kvantitativní morfologické znaky s prokazatelným vlivem fylogeneze (tj. $\lambda = 1$). Parametr δ odráží charakter evoluce kvantitativních morfologických znaků. Hypotézy, že $\delta = 0$ (změny znaku v ranější evoluční historii) a $\delta = 3$ (změny znaku v pozdější evoluční historii), byly statisticky testovány. Přesnost odhadu parametru byla doplněna 95% konfidenčním intervalem, kde jeho mezní hodnoty nebyly k dispozici, byly nahrazeny znakem „?“.

4.4. Rekonstrukce evoluce morfologických znaků

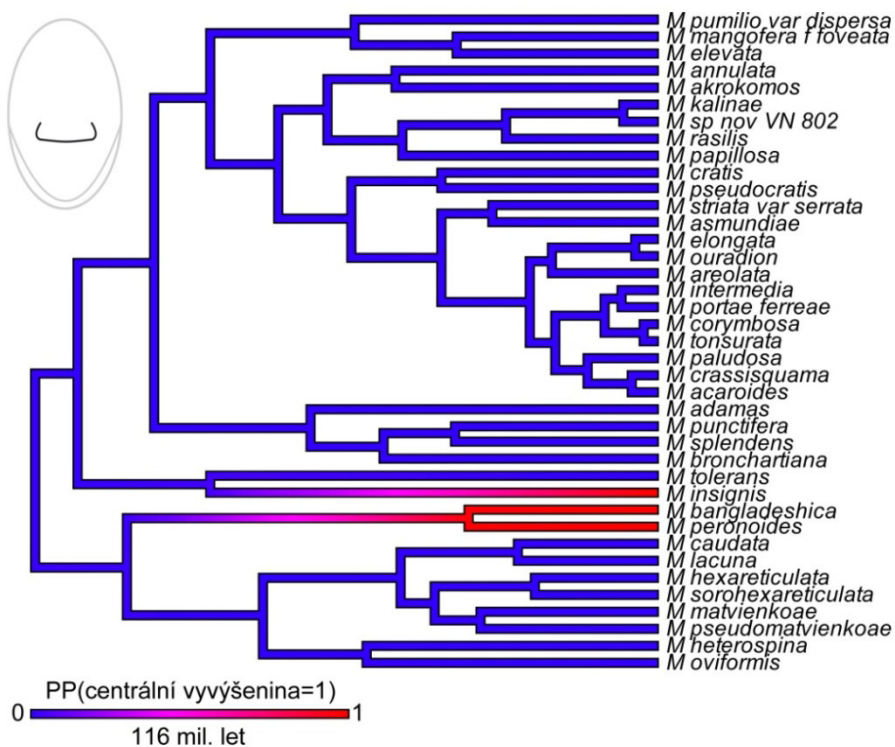
4.4.1. Mapování rekonstruované evoluce binárních znaků na fylogenetický strom

Předpokládaný průběh evoluce 18 hodnocených binárních morfologických znaků byl rekonstruován vynesemím Bayesovských posteriorních pravděpodobností přítomnosti znaku na větve fylogenetického stromu (obr. 6 – 23). Znaky, u nichž hodnota parametru D nepotvrdila prokazatelný vliv fylogeneze na jejich evoluci (viz kap. 4.3.1) nebyly do těchto rekonstrukcí zařazeny. Zároveň byly z grafické prezentace vyřazeny čtyři znaky, u nichž tato rekonstrukce nebyla informativní (tj. na většině fylogenetického stromu byla konstantně predikována 50% pravděpodobnost presence znaku): dóm s prohlubněmi, sekundární struktury na štítu šupiny, zmenšené póry v ohybu V-žebra a žebra na štítu šupiny.

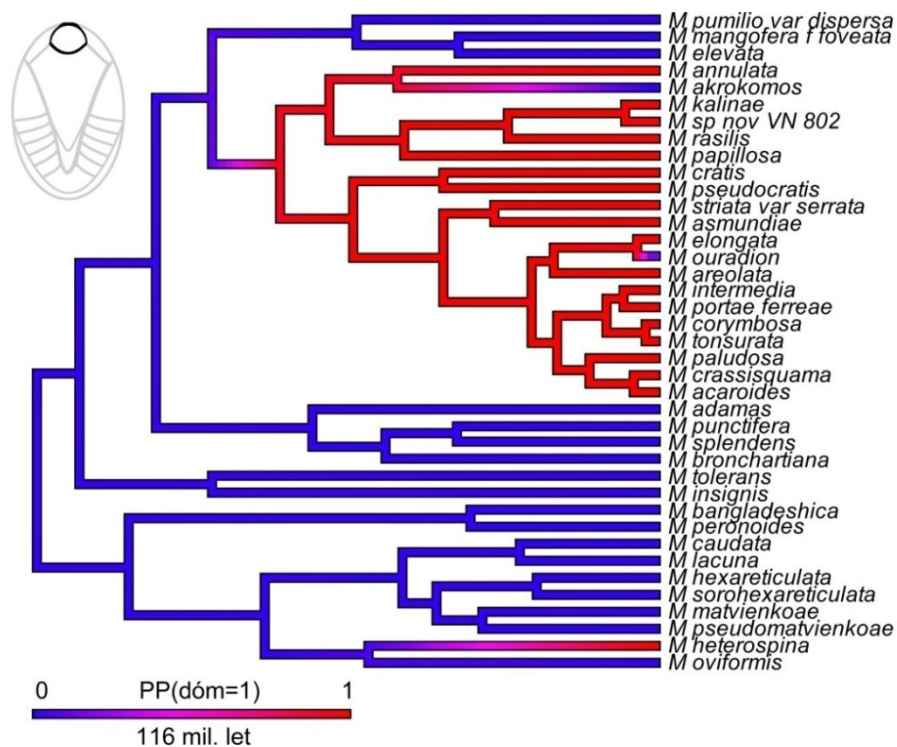
Evoluci rekonstruovaných znaků v rámci rodu *Mallomonas* (obr. 6 – 23) je možné rozdělit do čtyř hlavních scénářů. V prvním z nich předek rodu znakem nedisponoval, znak se vyvinul pouze jedenkrát ve fylogenezi rodu jako synapomorfie konkrétní linie a v případě v některých taxonů druhotně vymizel. Do tohoto scénáře zapadá evoluce znaků: dóm s papilami (obr. 9), přehnutý posteriorní okraj překryt až k V-žeburu (obr. 16) a posteriorní okraj se síťkou (obr. 19). Druhým scénářem je opět absence znaku u společného předka rodu, avšak daný znak vznikl dva a vícekrát, a to zřejmě nezávisle na sobě. Tento druhý a nejčastější scénář, někdy doprovázený druhotnými zániky znaku, nejlépe vysvětluje evoluci znaků: přítomnost anteriorního submarginálního žebra (obr. 6), přítomnost dómu (obr. 8), papily na anteriorním okraji (obr. 14), ostny jen na okraji (obr. 13), posteriorní okraj s trámci z V-žebra (obr. 18), trámce z V-žebra na štítu šupiny (obr. 21), žebra na anteriorním okraji (obr. 23), přítomnost centrální vyvýšeniny (obr. 7) a dóm s žebry (obr. 10). Třetí scénář předpokládá, že daná struktura byla se značnou pravděpodobností přítomna již u předka celého rodu a v průběhu evoluce docházelo druhotně k jejím zánikům (případně následovaným druhotnými vznikly). Takový průběh dobře vystihuje evoluci znaků: posteriorní okraj s póry (obr. 17), papily na štítu šupiny (obr. 15) a ostny po celé buňce (obr. 12). Podle posledního scénáře není možné spolehlivě určit, zda se daný znak u společného předka vyskytoval či nikoliv, obě možnosti jsou takřka stejně pravděpodobné. Zpravidla pak následovalo množství vzniků či zániků dané struktury, jako v případě přítomnosti okénka (obr. 11) a sekundární sítě na štítu šupiny (obr. 20), nebo byl stav znaku do značné míry konzervativní jako u struktury V-žebra (obr. 22).



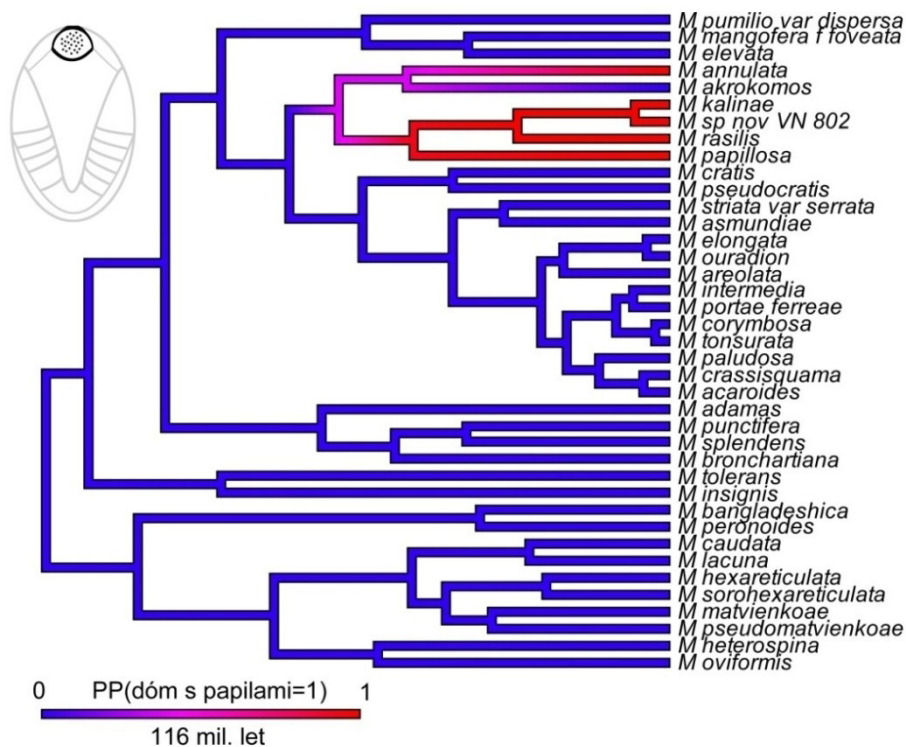
Obr. 6. Rekonstrukce evoluce anteriorního submarginálního žebra ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



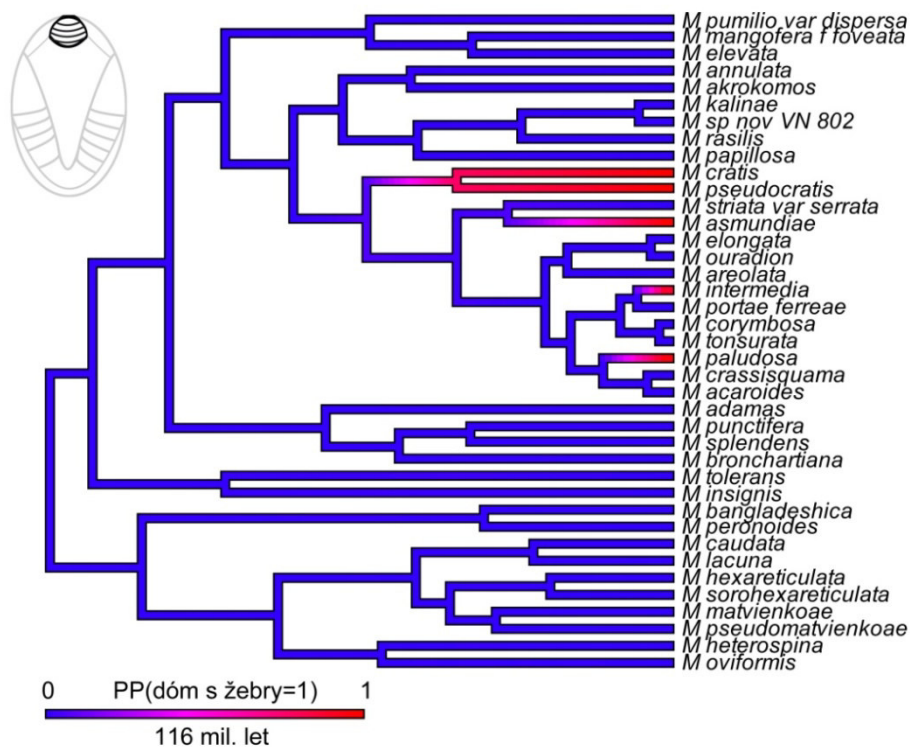
Obr. 7. Rekonstrukce evoluce centrální vyvýšeniny ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



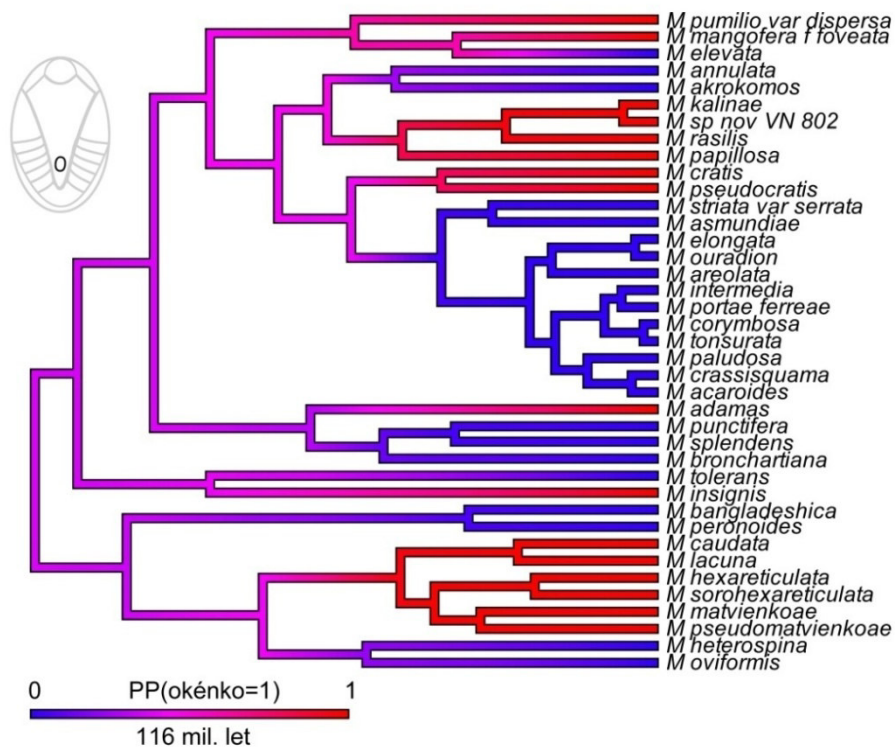
Obr. 8. Rekonstrukce evoluce dómu ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



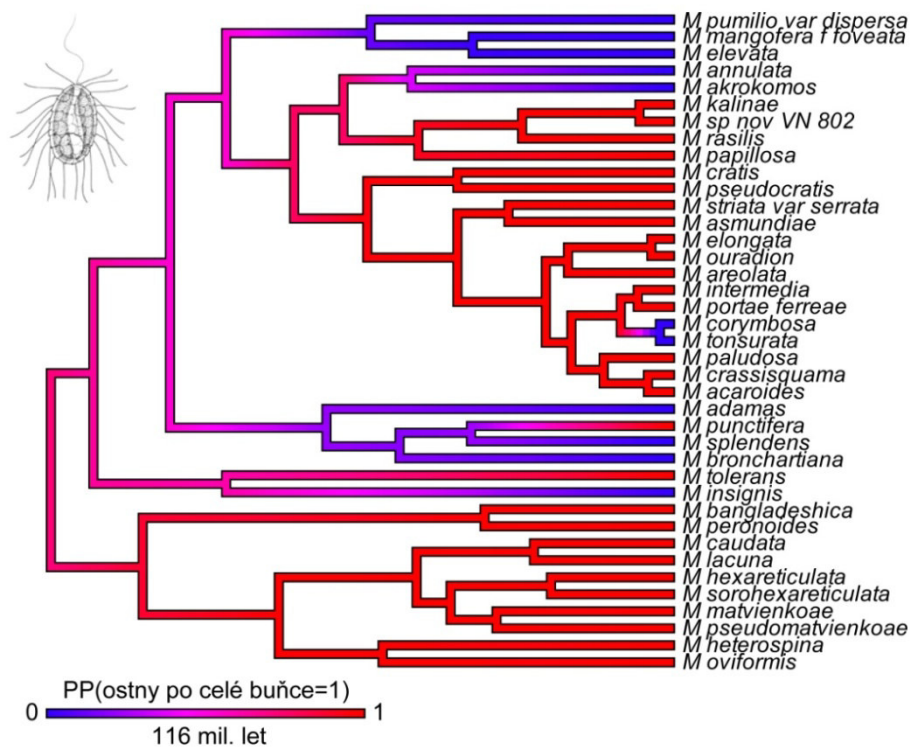
Obr. 9. Rekonstrukce evoluce papil na dómu ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



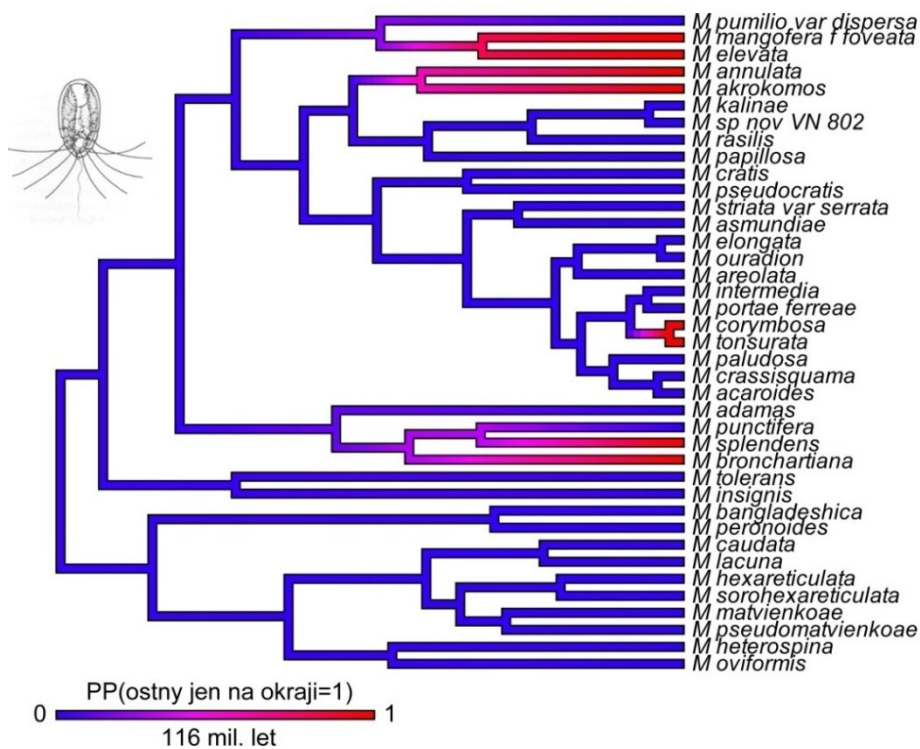
Obr. 10. Rekonstrukce evoluce žeber na dómu ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



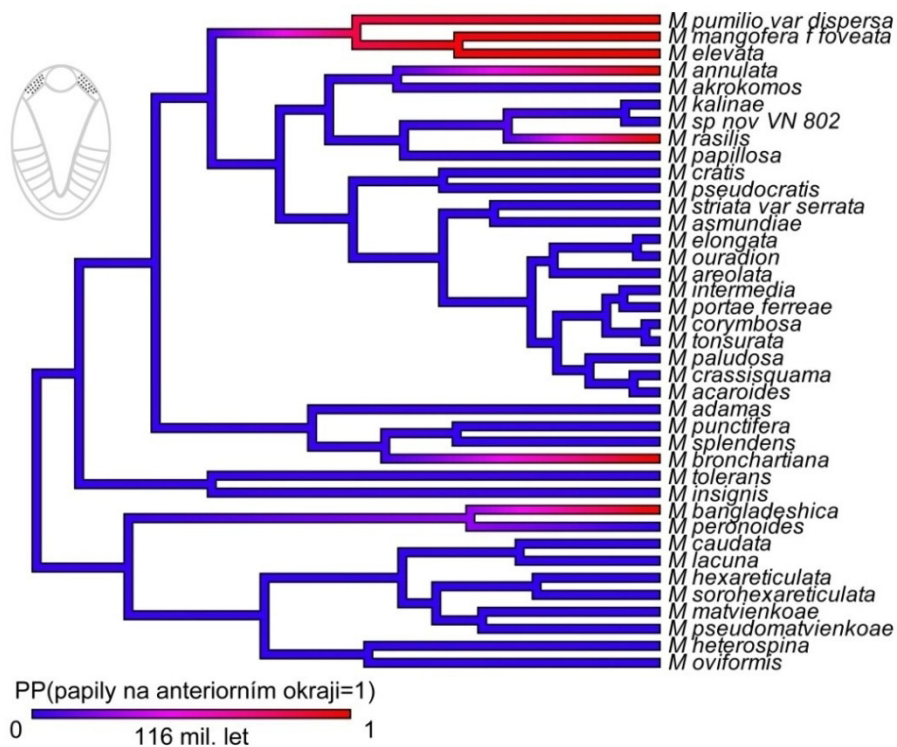
Obr. 11. Rekonstrukce evoluce okénka ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



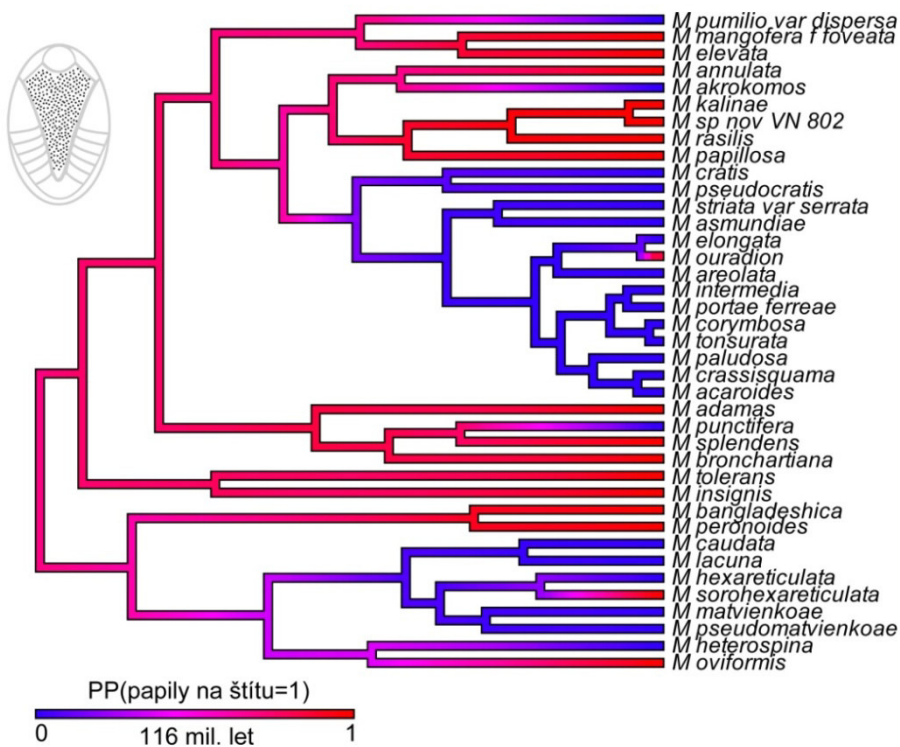
Obr. 12. Rekonstrukce evoluce ostnů přítomných po celé buňce ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



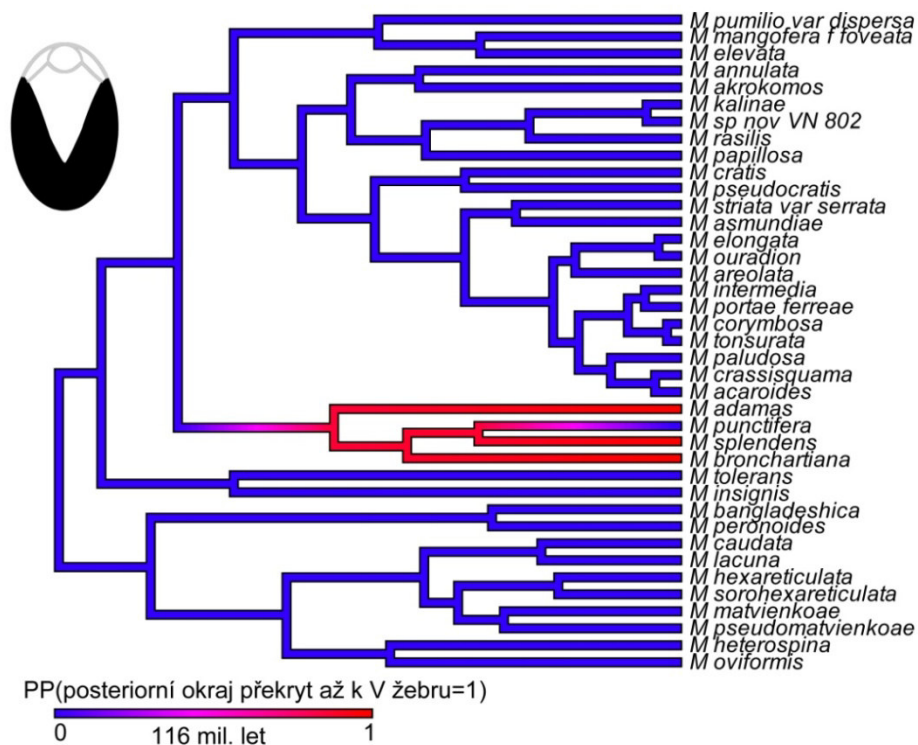
Obr. 13. Rekonstrukce evoluce ostnů přítomných pouze na okraji buňky ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



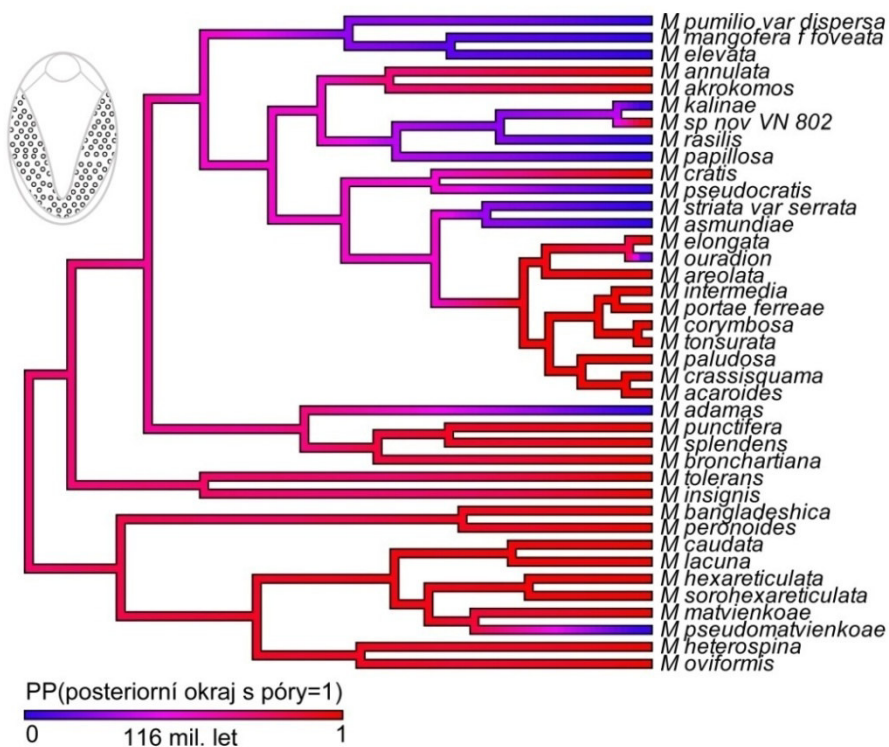
Obr. 14. Rekonstrukce evoluce papil na anteriorním okraji ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



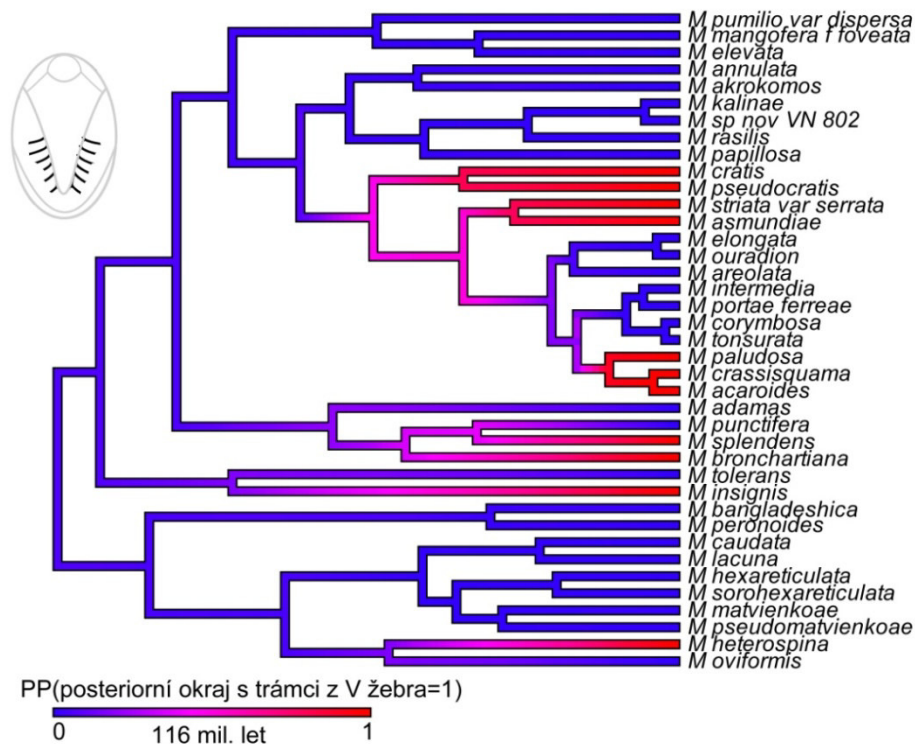
Obr. 15. Rekonstrukce evoluce papil na štítu šupiny ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



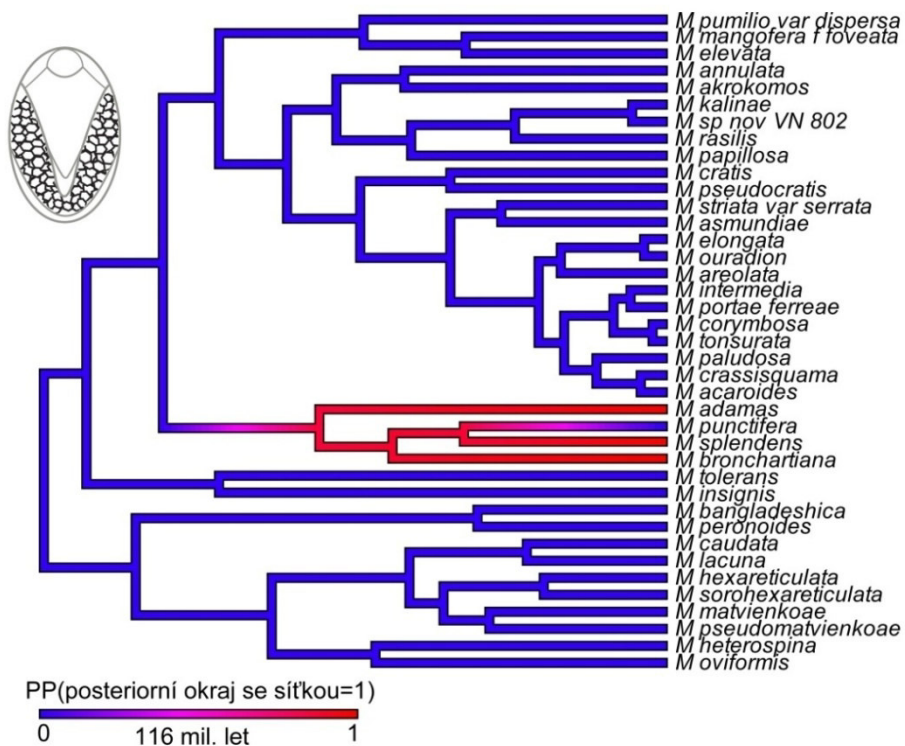
Obr. 16. Rekonstrukce evoluce přehnutého posteriorního okraje dosahujícího až k V-žeburu ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



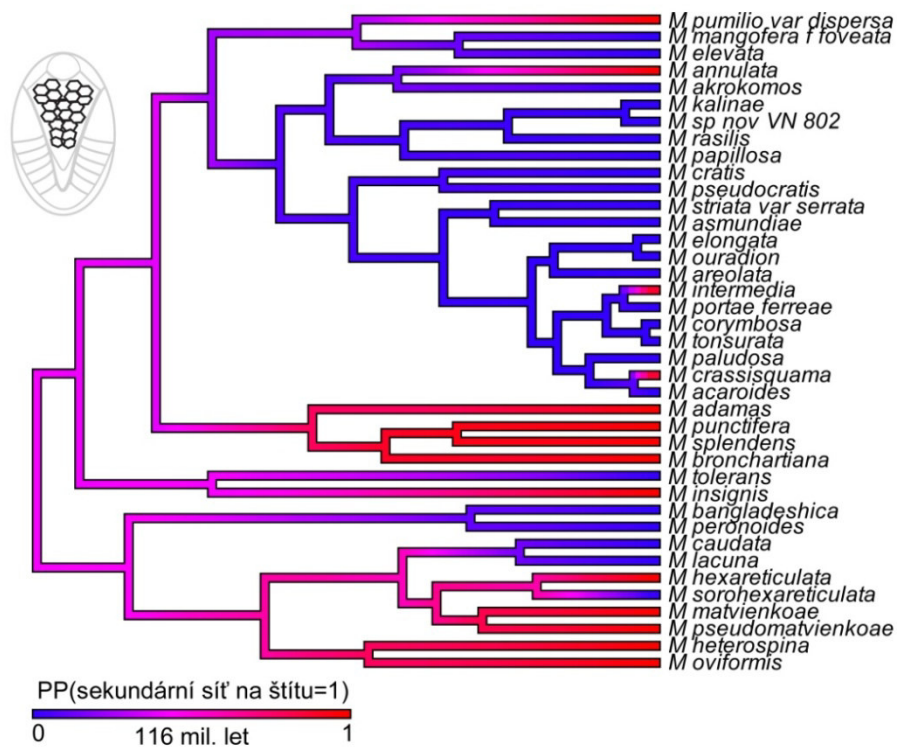
Obr. 17. Rekonstrukce evoluce pórů na posteriorním okraji ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



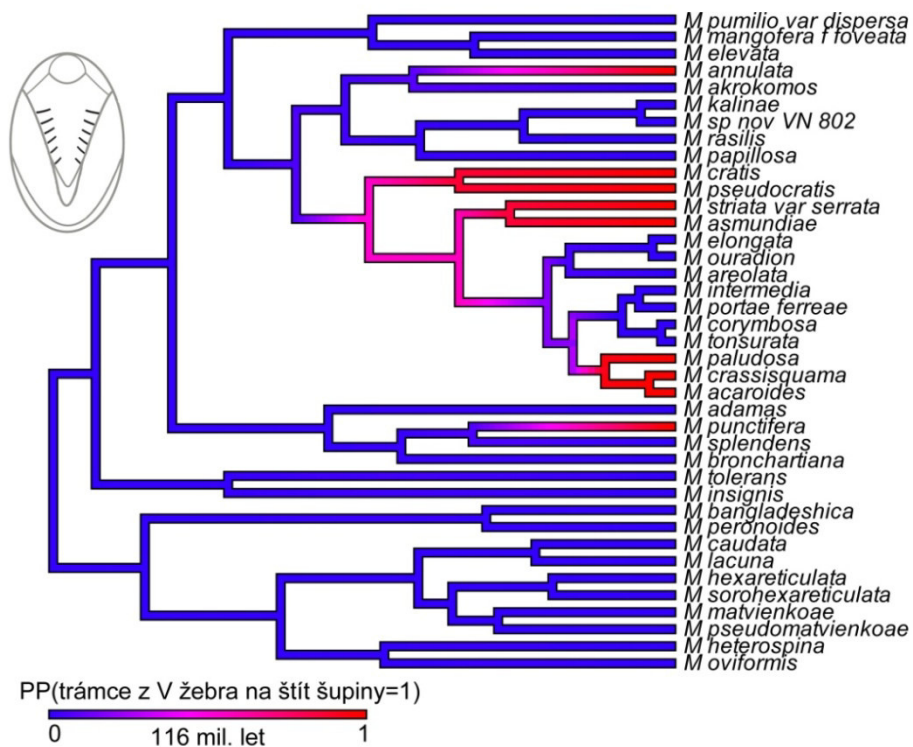
Obr. 18. Rekonstrukce evoluce trámců z V-žebra na posteriorním okraji ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



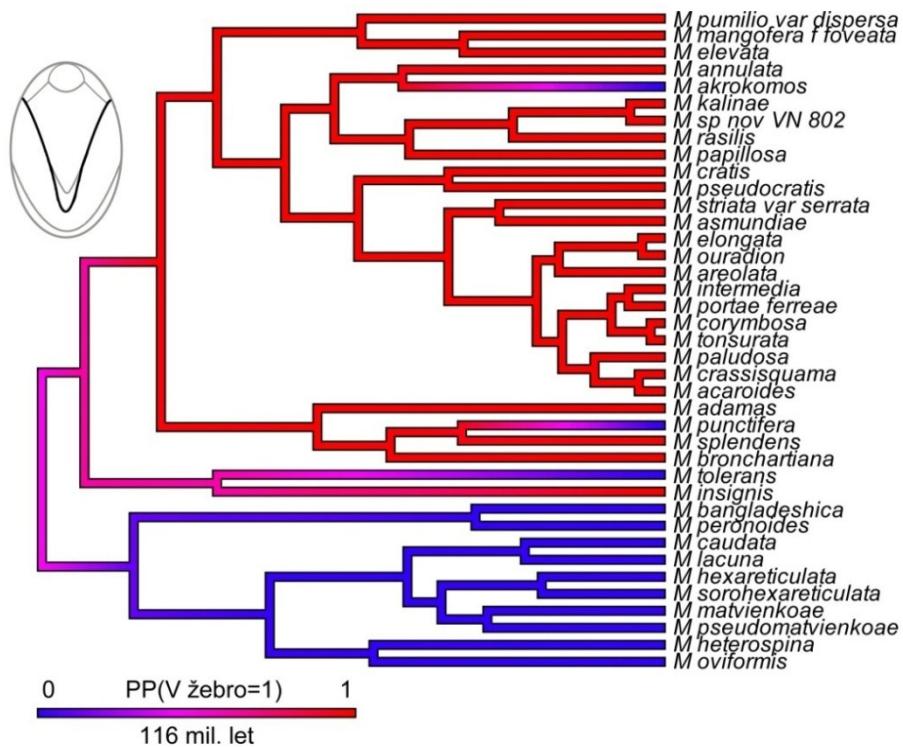
Obr. 19. Rekonstrukce evoluce sítky na posteriorním okraji ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



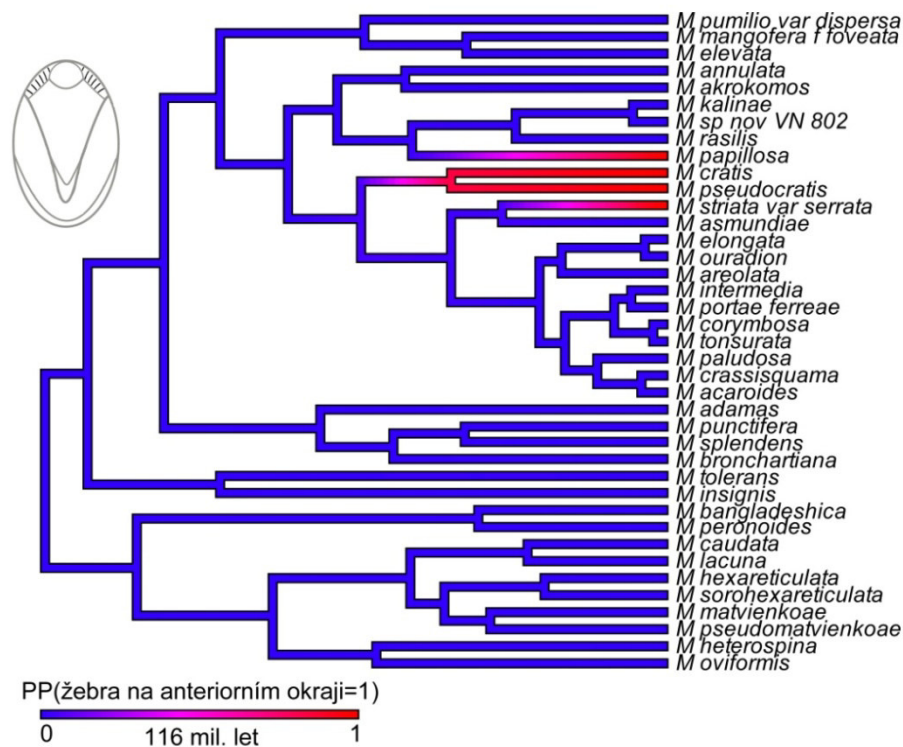
Obr. 20. Rekonstrukce evoluce sekundární sítě na štítu šupiny ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



Obr. 21. Rekonstrukce evoluce trámců z V-žebra na štítu šupiny ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



Obr. 22. Rekonstrukce evoluce V-žebra ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).



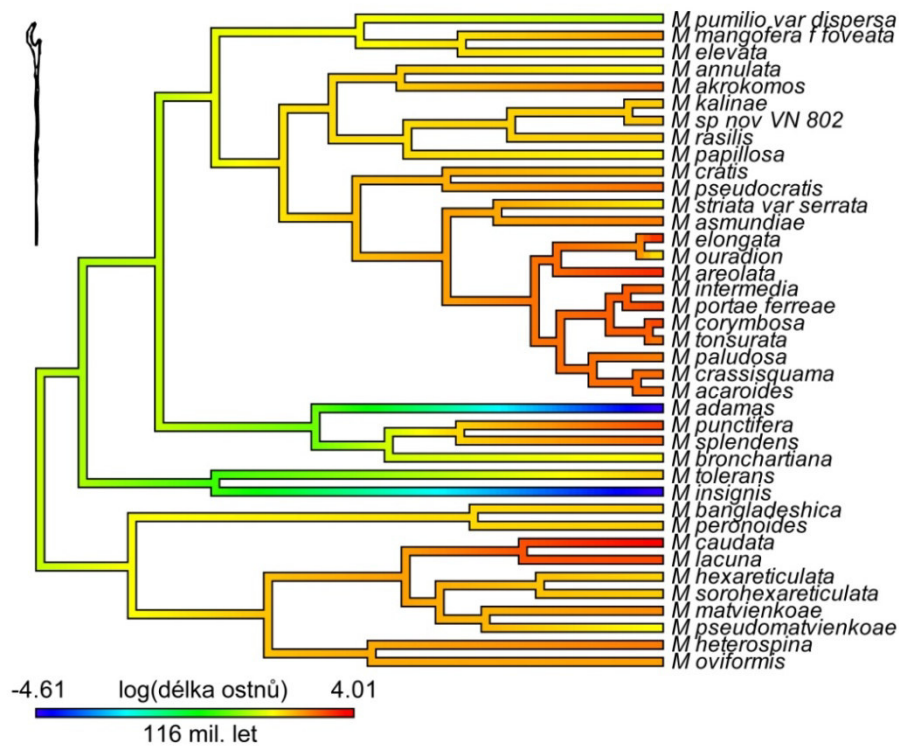
Obr. 23. Rekonstrukce evoluce žebra na anteriorním okraji ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě je barevně znázorněna posteriorní pravděpodobnost přítomnosti struktury (červeně) a její absence (modře).

4.4.2. Mapování rekonstruované evoluce kvantitativních znaků na fylogenetický strom

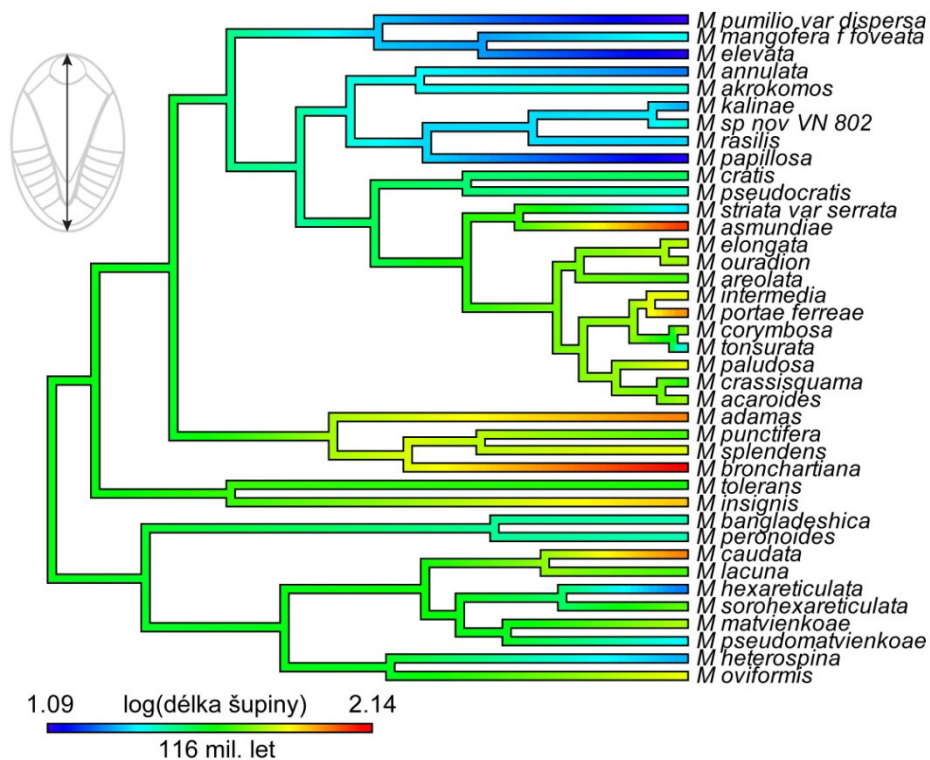
Předpokládaný průběh evoluce 11 hodnocených kvantitativních znaků byl rekonstruován vynesáním ancestrálních hodnot znaku z ML modelu na uzly fylogenetického stromu a jejich následnou interpolací podél větví (detailněji viz kap. 3.6.2.2). Grafické znázornění předpokládaného průběhu evoluce jednotlivých znaků je zachyceno na obr. 24 – 34. Znaky, u nichž hodnota škálovacího parametru lambda nepotvrdila prokazatelný vliv fylogeneze na jejich evoluci (viz kap. 4.3.2) nebyly do těchto rekonstrukcí zařazeny.

Zároveň byly z grafické prezentace vyřazeny čtyři znaky, u nichž tato rekonstrukce nebyla informativní (např. proto, že daný znak byl korelován s již rekonstruovaným binárně kódovaným znakem): úhel V-žebra, plocha kápě, počet žeber na anteriorním okraji, obvod šupiny.

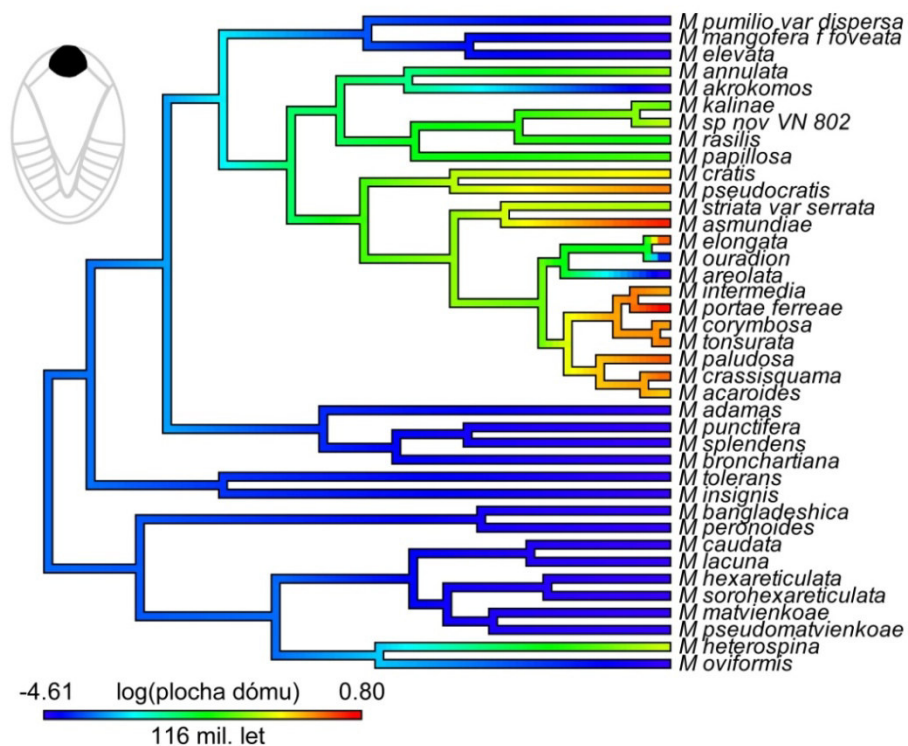
Rekonstruované evoluce kvantitativních znaků jsou zpravidla v souladu s tendencemi, které byly vyjádřeny škálovacími koeficienty kappa a delta (viz kap. 4.3.2). U znaku délka ostnů (obr. 24) je tak patrný gradualistický vývoj, kdy u společného předka rodu je predikována nižší hodnota než u většiny současných zástupců a evoluční rekonstrukce předpokládá postupný nárůst délky ostnů. Výjimku však představují druhy *Mallomonas adamas* a *M. insignis*, u kterých došlo k pravděpodobně druhotné ztrátě přítomnosti ostnů. Stejně tak u znaků plocha okének (obr. 27) a počet okének (obr. 28) jsou rekonstruované evoluční trendy v souladu s předpokládanou adaptivní radiací. Evoluční předci středně velkých monofyletických linií v rámci rodu se mezi sebou liší rekonstruovanými hodnotami znaku, ty jsou však do značné míry konzervativní v rámci jednotlivých linií odvozených z těchto předků. Ve většině sledovaných kvantitativních znaků je však patrná značná variabilita jejich rekonstruovaných hodnot v průběhu evoluce rodu. Nezřídka dochází k situacím, kdy se od sebe sesterské taxony liší evolučními trendy (zvyšování či snižování hodnoty znaku). Mezi tyto znaky patří: délka a šířka šupiny (obr. 25 a 34), kruhovitost šupiny (obr. 30), míra silicifikace šupiny (obr. 31), šířka křemičité schránky (obr. 32) a šířka přehnutého okraje (obr. 33). U dvou znaků [plocha dómu (obr. 26), počet zmenšených pórů v ohybu V-žebra (obr. 29)] byl podobný trend patrný v liniích, které danou strukturou disponují.



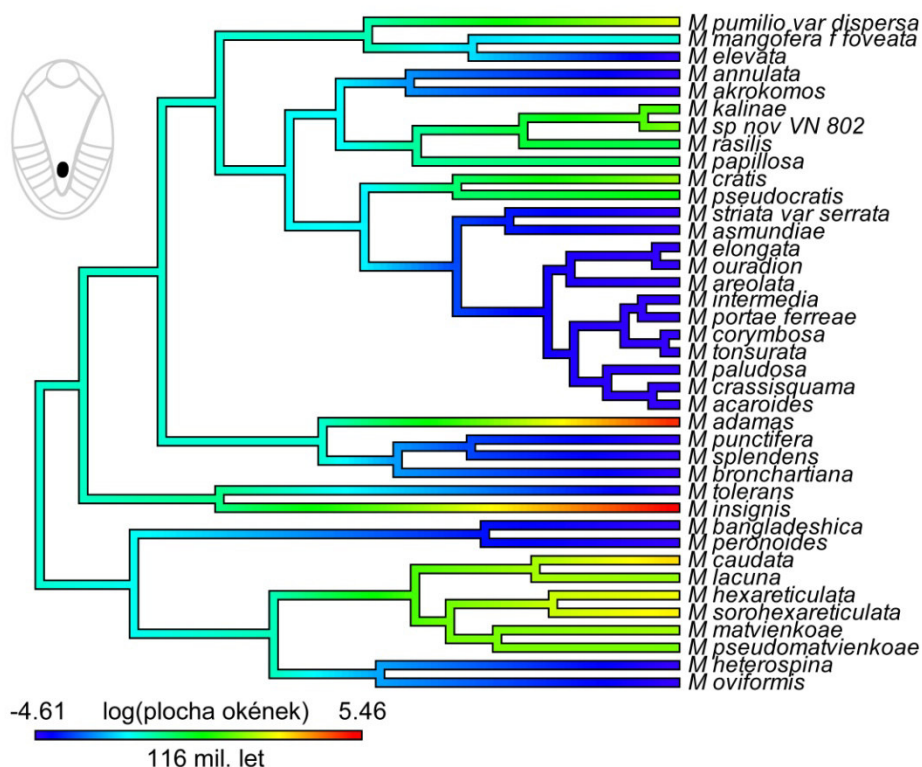
Obr. 24. Rekonstrukce evoluce délky ostnu ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).



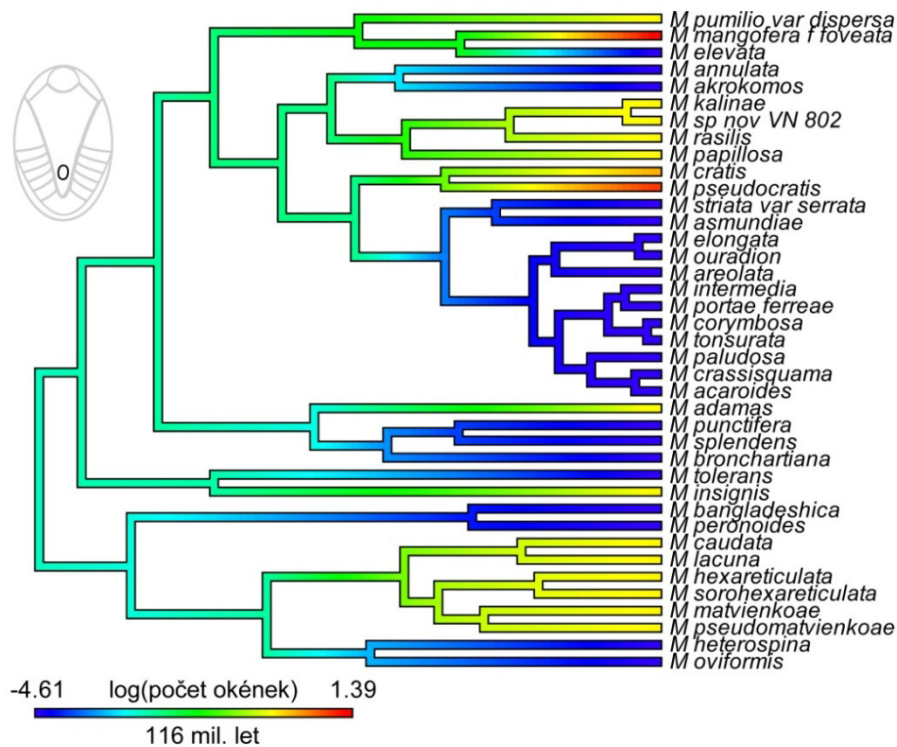
Obr. 25. Rekonstrukce evoluce délky šupiny ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).



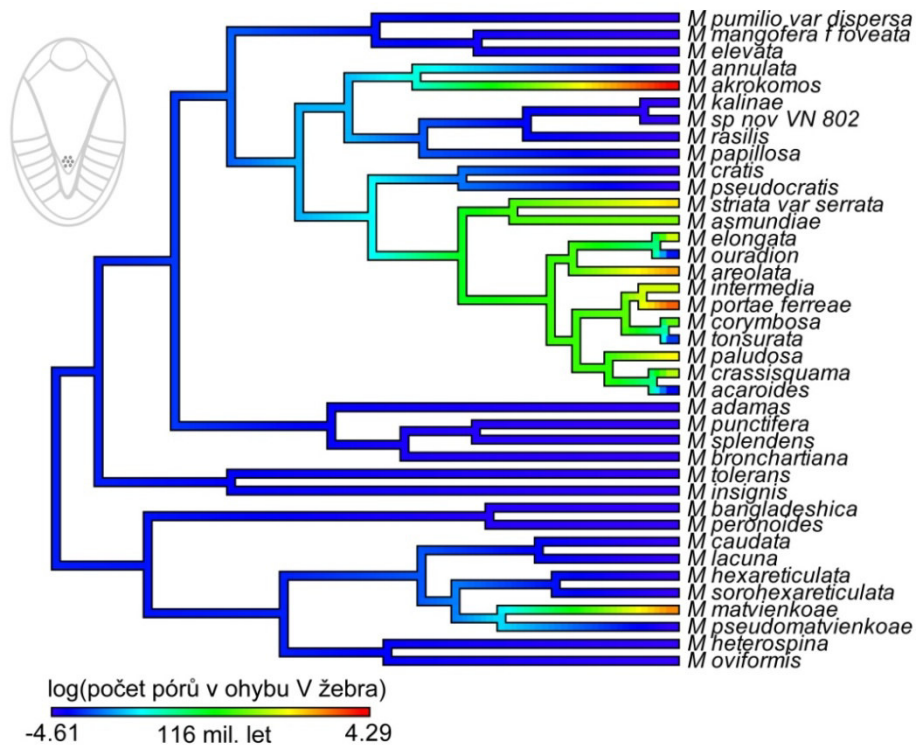
Obr. 26. Rekonstrukce evoluce plochy dómu ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).



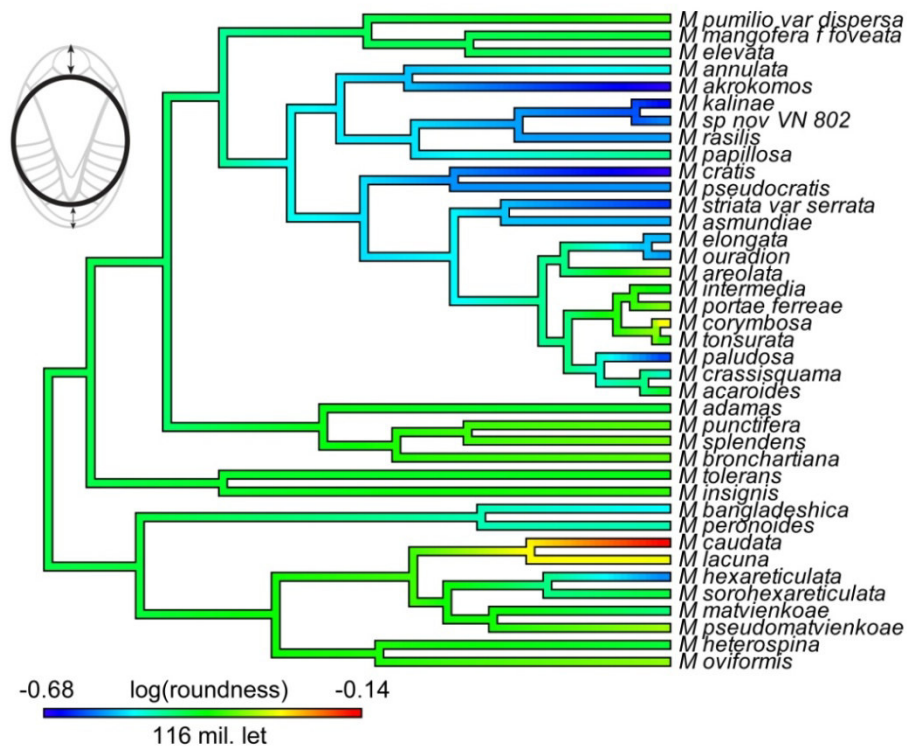
Obr. 27. Rekonstrukce evoluce plochy okének ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).



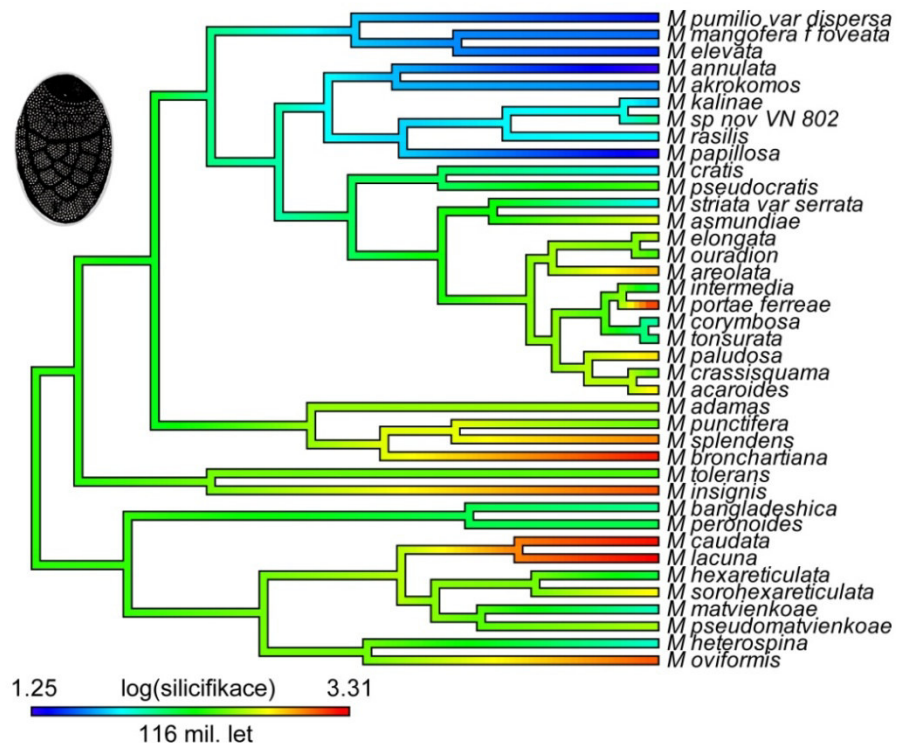
Obr. 28. Rekonstrukce evoluce počtu okének ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).



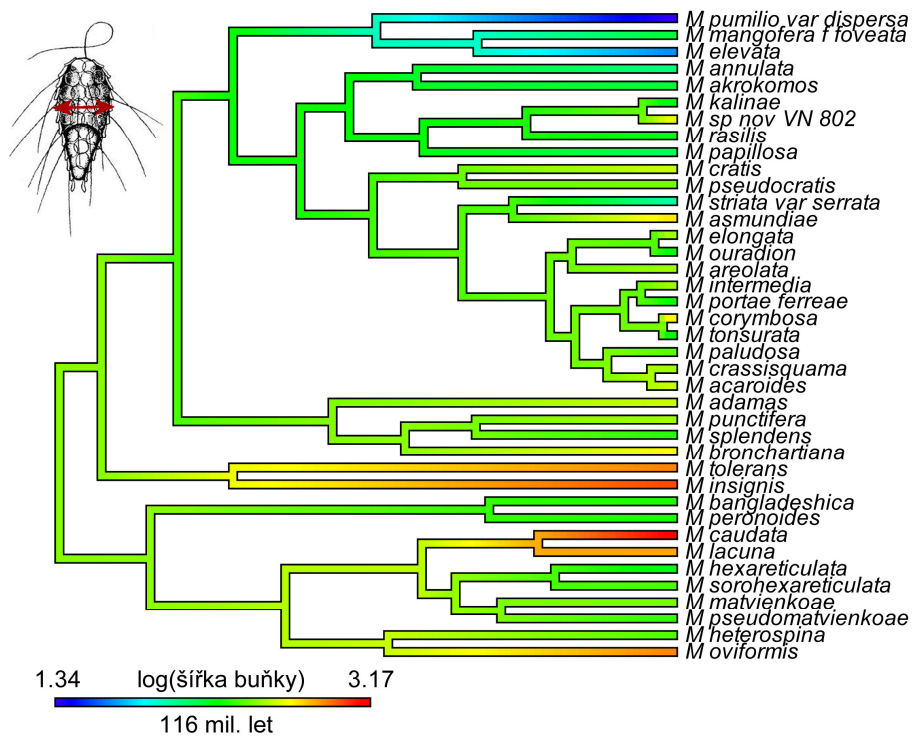
Obr. 29. Rekonstrukce evoluce počtu zmenšených pórů v ohybu V-žebra ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).



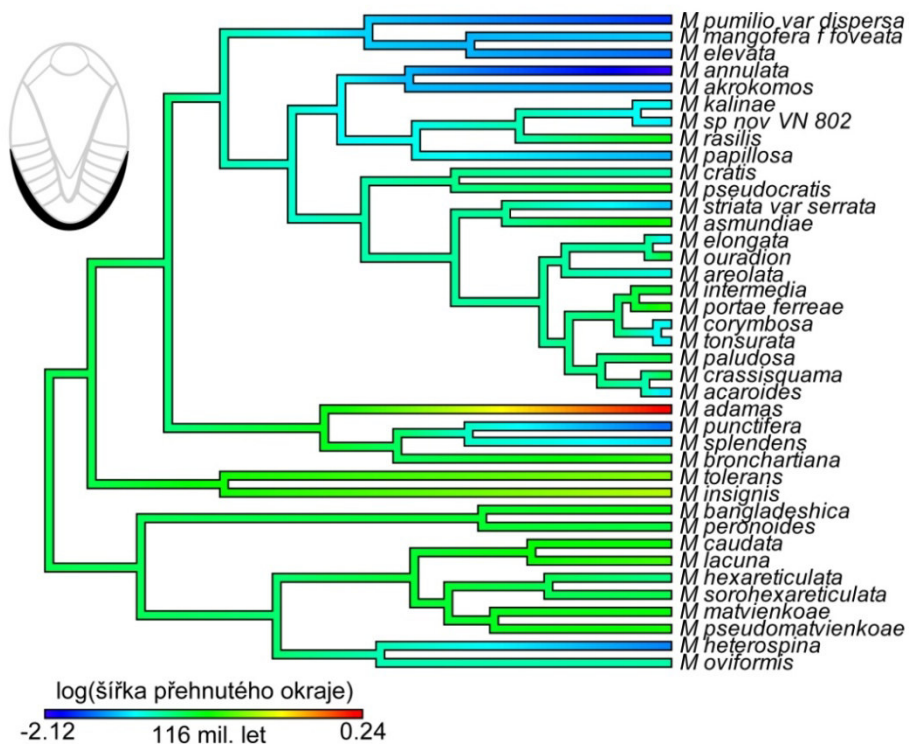
Obr. 30. Rekonstrukce evoluce kruhovitosti šupiny ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).



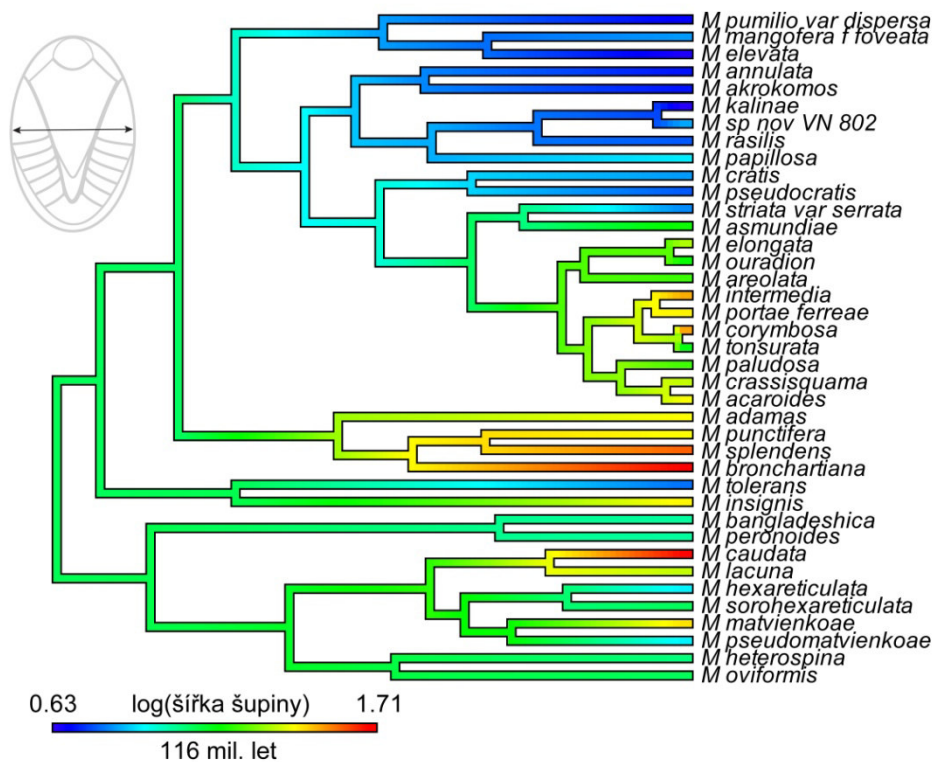
Obr. 31. Rekonstrukce evoluce míry silicifikace šupiny ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).



Obr. 32. Rekonstrukce evoluce šířky křemičité schránky ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).



Obr. 33. Rekonstrukce evoluce šířky přehnutého posteriorního okraje ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).

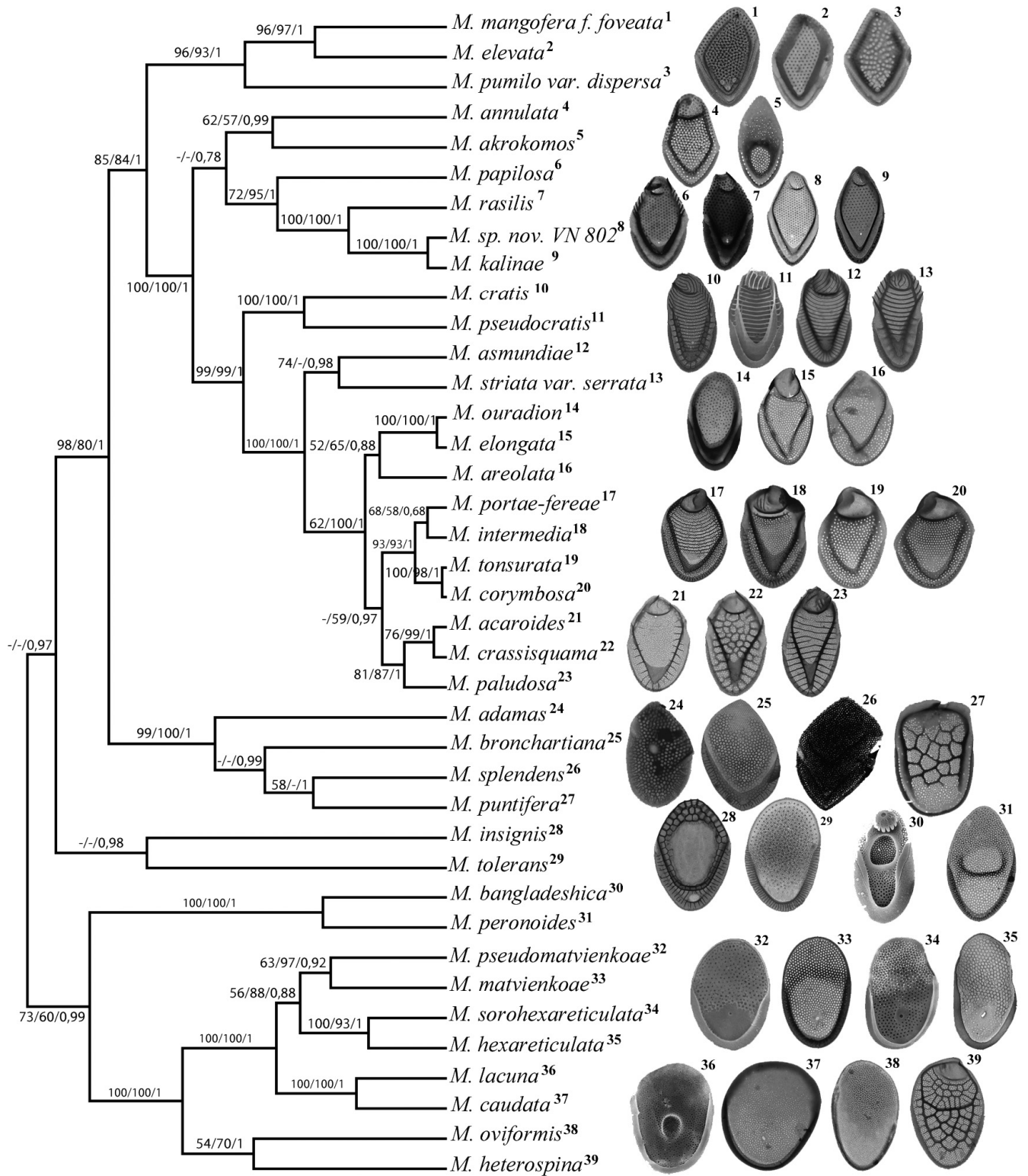


Obr. 34. Rekonstrukce evoluce šířky šupiny ve fylogenezi rodu *Mallomonas*. Ve fylogenetickém stromě jsou barevně znázorněny rekonstruované ancestrální hodnoty znaku po logaritmické transformaci, od nejnižších (modře) po nejvyšší (červeně).

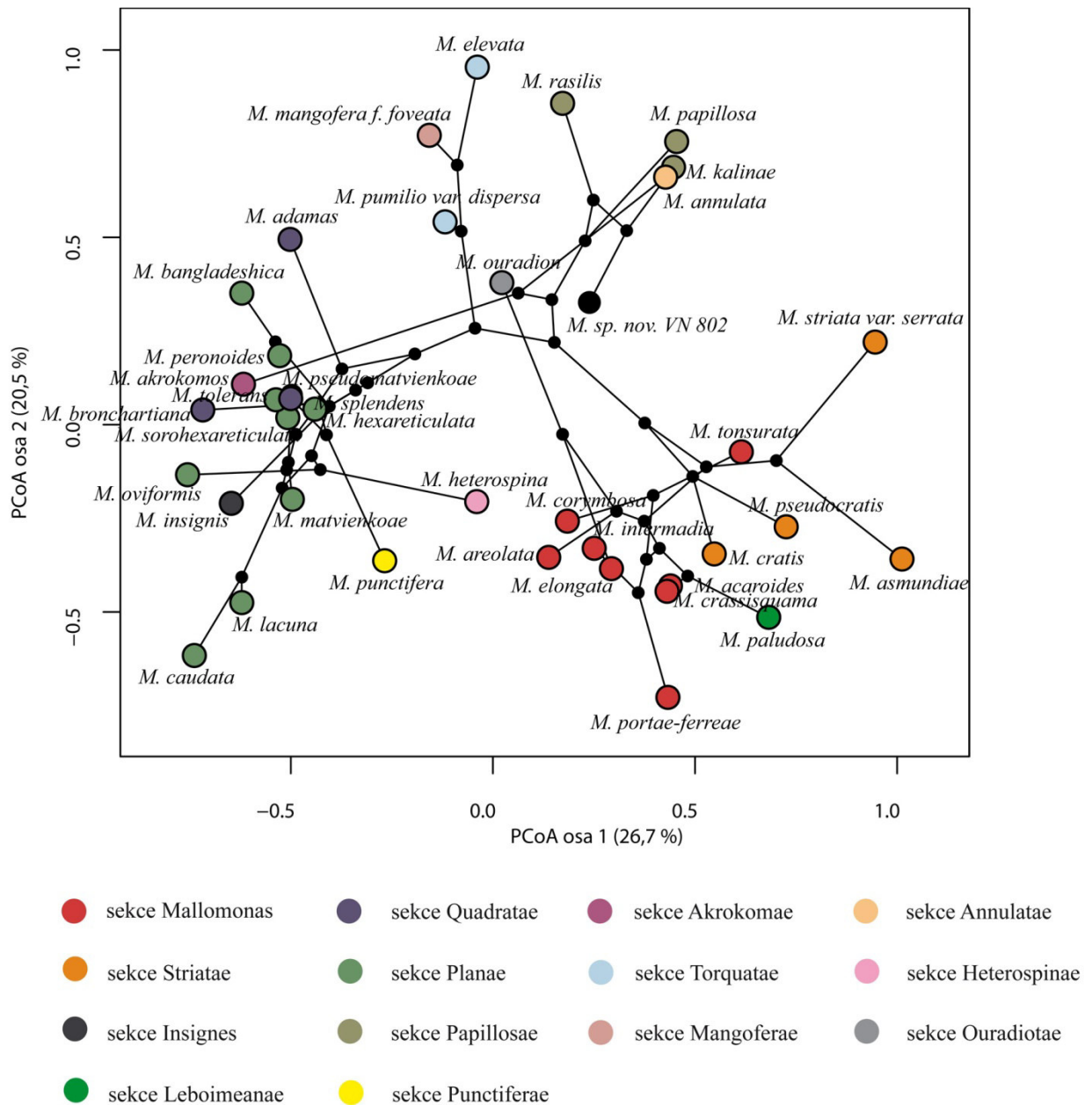
4.5. Morfologie křemičitých struktur v kontextu fylogenetických vztahů mezi zástupci rodu *Mallomonas*

Po vynesení mikrofotografií křemičitých tělních šupin do fylogenetického stromu zástupců rodu *Mallomonas* (obr. 35) je velmi dobře patrné, že evolučně příbuznější taxony jsou si zároveň i podobnější v celkové morfologii svých šupin.

K hodnocení vztahu morfologické podobnosti a fylogenetické příbuznosti byla využita technika tzv. „phylomorpospace plot“, která umožňuje projekci fylogenetického stromu do dvourozměrného ordinačního prostoru srovnávajícího morfologii studovaných zástupců (detailněji viz kap. 3.6.3. v metodice). Diagram „phylomorpospace plot“ (obr. 36) byl zkonstruován kombinací PCoA morfologie hodnocených křemičitých struktur (viz kap. 4.2.) s časově kalibrovaným fylogenetickým stromem rodu *Mallomonas* (viz kap. 4.1.2.). V diagramu je patrné, že většina sesterských linií fylogenetického stromu (spojené v obr. 36 čarami) zahrnuje zástupce s morfologicky relativně podobnými křemičitými strukturami. Nachází se zde však i celá řada výjimek, kdy fylogenetická příbuznost není reflektována morfologickou podobností (druhy *M. akrokomos*, *M. heterospina*, *M. insignis*, *M. ouradion*, *M. punctifera*, *M. tolerans*).



Obr. 35. Výřez z časově kalibrovaného BI fylogenetického stromu (chronogramu) pro rod *Mallomonas* založeného na sekvencích tří molekulárních markerů (SSU rDNA, LSU rDNA a *rbcL*). K jednotlivým taxonům byly přiřazeny mikrofotografie křemičitých tělních šupin. Měřítka vlevo dole ukazuje odhadovaný počet substitucí na místo.



Obr. 36. Diagram typu „phylomorphospace plot“ kombinující PCoA morfologické podobnosti křemičitých struktur (viz obr. 4) s dosazenými fylogenetickými vztahy jednotlivých zástupců rodu *Mallomonas*. Větší body odpovídají pozici jednotlivých taxonů v ordinačním prostoru PCoA, barevné kódování odráží jejich zařazení do sekcí rodu. Fylogenetické vztahy mezi těmito taxony jsou znázorněny čarami, menší černé body představují umístění předpokládaných ancestrálních morfotypů v ordinačním prostoru.

5. Diskuze

5.1. Fylogenetické vztahy mezi zástupci rodu *Mallomonas*

Vznik linie Synurales, do které patří rod *Mallomonas*, je na základě našeho časově-kalibrovaného fylogenetického stromu (chronogramu) odhadován již do období před cca 400 miliony lety. Široký konfidenční interval (310 – 540 mil. let) však značí vysokou nepřesnost daného odhadu. Autoři Siver et al. (2015) určili stáří této linie na přibližně 230 milionů let. Takový výsledek je pak ve větším souladu s nezávislou studií autorů Brown a Sorhannus (2010), kteří ve své časově-kalibrované fylogenetické analýze Ochrophytních Stramenopiles datovali vznik Chrysophytní-Synurophytní linie, do které linie Synurales spadá, přibližně na 280 milionů let.

V našich fylogenetických analýzách byla linie Synurales dále dělena do monofyletických rodů *Tessellaria*, *Mallomonas* a *Synura* o vysoké statistické podpoře, což je v souladu s výsledky ostatních autorů (Siver et al., 2015). Podle chronogramu se od zbylých zástupců linie Synurales nejraněji odděluje rod *Tessellaria*, následovaná rodem *Mallomonas*. Rod *Synura* by tak mohl být nejmladším rodem linie Synurales, jak se ukázalo i ve studiích dalších autorů (Jo et al., 2013; Siver et al., 2015). Rod *Mallomonas* se na základě naší fylogenetické analýzy mohl objevit v období před 170 až 290 miliony lety. Doposud nikdo z autorů neodhadl tak vysoké stáří rodu *Mallomonas*. Autoři Jo et al. (2013) určili jeho stáří na přibližně 130 milionů let, autoři Siver et al. (2015) následně na 150 milionů let. Náš odhad stáří rodu *Mallomonas* se, stejně jako odhad vzniku výše zmíněné linie *Synurales*, zdá být ve srovnání s literaturou nadhodnocený. O možné nepřesnosti časového datování v chronogramu svědčí i široké 95% konfidenční intervaly, které nezdědka dosahují rozpětí 100 – 200 milionů let. Na druhou stranu, zmíněné fylogenetické analýzy zahrnovaly podstatně méně taxonů zastupujících různé linie skupiny Chrysophyceae ve srovnání s naší analýzou. Nelze tak vyloučit, že studované skupiny jsou skutečně staršího původu, než se doposud udávalo. Bohužel k dispozici je jen velmi omezené množství prací, se kterými lze dosažené výsledky porovnat. Do budoucna by bylo jistě příhodné provést další časově-kalibrované fylogenetické analýzy s větším počtem taxonů z různých linií skupin Synurophyceae i Chrysophyceae.

Rod *Mallomonas* je v našich fylogenetických analýzách dále rozdělen do dvou hlavních linií. Ke stejnému závěru dospěli i autoři mnoha nedávných fylogenetických studií rodu *Mallomonas* (Jo et al., 2011, 2013; Siver, Wolfe, et al., 2013a; Kim et al., 2014; Siver et al., 2015). První linie tohoto rodu [autory Jo et al. (2011, 2013), Siver, Wolfe, et al. (2013a), Kim et al. (2014) označovaná jako C1, následně dle Siver et al. (2015) jako A1] zahrnuje

především druhy nesoucí na svých křemičitých šupinách strukturu V-žebra. Druhá linie rodu *Mallomonas* [autory Jo et al. (2011, 2013), Siver, Wolfe, et al. (2013a), Kim et al. (2014) označovaná jako C2, dle Siver et al. (2015) jako A2] zahrnuje druhy, jež na svých křemičitých šupinách postrádají strukturu V-žebra. V následujícím textu budou pro rozlišení obou zmíněných linií použity názvy A1 a A2. V linii A1 však nenesou strukturu V-žebra všichni zástupci, což je výše zmíněnými autory zcela opomíjeno. Do této linie jsou tradičně řazeny druhy *Mallomonas akrokomos* a *M. puctifera*, u kterých struktura V-žebra na křemičitých šupinách chybí. U druhu *M. puctifera* je sice patrné výrazné anteriorní submarginální žebro, prodlužující se do podoby potenciálně nedokončené struktury V-žebra, u druhu *M. akrokomos* se však s velkou pravděpodobností jedná o sekundární zánik této struktury (viz dále). Na základě námi zkonstruovaných fylogenetických stromů byl do linie A1 zařazen i druh *Mallomonas tolerans*, jež strukturu V-žebra rovněž postrádá. Pozice tohoto druhu se však ukázala být značně nejistá, s ohledem na nízkou statistickou podporu zařazení ve fylogenetickém stromě i chronogramu. Linie A2 zahrnovala v obou námi zkonstruovaných fylogenetických stromech pouze zástupce bez struktury V-žebra na křemičitých šupinách, v souladu s fylogenetickými analýzami ostatních autorů.

Na fylogenetických stromech je patrné seskupení jednotlivých zástupců rodu *Mallomonas* do sekcí, které byly definované pouze na základě morfologie křemičitých struktur (obr. 2, 3). V linii A1 se nachází taxony řazené do sekcí Planae, Insignes, Mangoferae, Torquatae, Annulatae, Akrokomae, Papillosae, Striatae, Ouradiotae, Mallomonas, Leboimeanae, Quadratae a Punctiferae. V linii A2 jsou to pak zástupci sekcí Planae a Heterospinae. Rozdělení sekce Planae mezi linie A1 a A2 je způsobeno již komentovanou přítomností druhu *Mallomonas tolerans* v linii A1.

Zařazení jednotlivých druhů rodu *Mallomonas* se mezi námi získaným BI fylogenetickým stromem a chronogramem mírně odlišuje, tyto změny však nejsou nikterak významné. Zařazení druhů v chronogramu je konzistentní s jejich pozicí v recentně publikovaných fylogenetických analýzách rodu (např. Siver et al., 2013; Jo et al., 2013; Kim et al., 2014; Siver et al., 2015). Konzistentní je i zařazení druhů, pro něž byla nově získána molekulární data paralelně v průběhu této diplomové práce a v recentní studii Siver et al. (2015). Jedná se o druhy *Mallomonas crassisquama* a *M. tonsurata* (izolát č. 504). Je však zajímavé, že druhý námi získaný izolát druhu *M. tonsurata* (č. 894) se v BI fylogenetickém stromě zařadil blíže k příbuznému druhu *M. corymbosa* než k jinému izolátu stejného druhu.

Pro taxony *Mallomonas intermedia*, *M. ouradion*, *M. paludosa*, *M. pumilio* var. *dispersa*, *M. rasilis* a *M. tolerans* byly DNA sekvence získány poprvé, což nám umožnilo jako prvním začlenit tyto druhy do fylogenetického stromu a posoudit tak jejich fylogenetické vztahy s dalšími zástupci. Doposud byla k dispozici molekulární data pouze pro 37 druhů (databáze GenBank) ze současných 192 popsáných druhů (Guiry & Guiry 2014). Pro druh *Mallomonas rasilis* jsou sice v databázi GenBank uvedeny sekvence, jedná se však o záměnu s druhem *M. kalinae* [týká se sekvencí s označením U73231 a EF165195 (Škaloud et al., 2013)]. Chybná determinace byla odhalena i u sekvencí taxonu nazývaného *Mallomonas sorofavus* (Kim et al., 2014), a které ve skutečnosti náleží druhu *M. sorohexareticulata*. Z tohoto důvodu byly sekvence druhu *M. sorofavus* z fylogenetických analýz vyloučeny (byly totožné se sekvencemi druhu *M. sorohexareticulata*).

5.2. Morfologická podpora současného taxonomického členění rodu *Mallomonas*

Druhový koncept rodu *Mallomonas*, založený takřka výhradně na morfologii křemičitých šupin jednotlivých zástupců (Kristiansen 2005, Siver et al., 2015), je značně kongruentní s výsledky námi provedených fylogenetických analýz. Fylogenetická příbuznost taxonů je často následována i jejich morfologickou podobností. Druhy, které se v ordinačním prostoru PCoA nacházely blízko sebe, se i ve fylogenetických analýzách sdružovaly do příbuzných linií, což je dobře patrné zejména v diagramu typu „phylomorphospace plot“ (obr. 36). V tomto diagramu je např. patrné shloučení fylogeneticky příbuzných druhů do morfologicky vymezených sekcí, podporující oprávněnost tohoto členění. V ordinační analýze PCoA se na základě morfologie křemičitých struktur dobře seskupili zástupci sekcí *Mallomonas*, *Striatae* či *Papillosae*. U sekcí reprezentovaných jediným zástupcem bohužel taková srovnání nebyla možná. Bez dalšího rozšíření počtu druhů z těchto sekcí s dostupnými molekulárními daty nelze oprávněnost jejich vymezení ověřit. Je však zajímavé, že některé sekce se morfologickým vymezením svých zástupců překrývají (sekce *Planae* se sekcí *Quadratae* a *Akrokomae*, sekce *Papillosae* se sekcí *Annulatae*). Tato skutečnost nemusí nezbytně svědčit o jejich nedostatečném morfologickém vymezení. V ordinačním prostoru PCoA totiž byla podobnost křemičitých struktur jednotlivých zástupců hodnocena rovnocenně prostřednictvím všech 41 zaznamenaných znaků, zatímco v taxonomických příručkách je některým (často subjektivně vybraným) znakům přisuzována vyšší váha.

S nově získanými molekulárními daty pro šest druhů vzrostl ve fylogenetickém stromě i počet zastoupených sekcí o dvě (sekce *Leboimeanae* a *Ouradiotae*), které nebyly součástí doposud publikovaných fylogenetických analýz (např. Jo et al., 2013; Kim et al., 2014; Siver et al.,

2015). Jak již bylo zmíněno, celá řada menších sekcí (zpravidla představovaných v analýzách jediným druhem) se na fylogenetickém stromě včlenila do sekcí jiných a dala tak vznik parafyletickým skupinám (sekce Mangoferae v sekci Torquatae, sekce Leboimeanae a Ouradioatae v sekci Mallomonas, sekce Punctiferae v sekci Quadratae a sekce Heterospinae v sekci Planae). Na parafylii sekce Planae již v minulosti upozornili někteří autoři (Jo et al., 2011; Jo et al., 2013; Kim et al., 2014). Kromě začlenění sekce Heterospinae do sekce Planae, je v námi získaných fylogenetických stromech sekce Planae ještě rozdělena do dvou linií, a to z důvodu zařazení druhu *M. tolerans* mezi druhy linie A1. V budoucnu by mohlo být vhodné rozšířit tyto parafyletické sekce tak, aby lépe odrážely přirozené evoluční vztahy svých zástupců. Monofyletickou linii tvoří, kromě sekcí zahrnujících pouze jednoho zástupce, také sekce Papillosae.

Mnohé druhy, pro které byla v rámci této diplomové práce prvně získána molekulární data se v diagramu „phylomorphospace plot“ umístily dle očekávání k morfologicky podobným taxonům se známými DNA sekvencemi. To je případ zařazení druhů *Mallomonas intermedia*, *M. rasilis* a *M. pumilio* var. *dispersa*, které se shlukují s morfologicky podobnými a fylogeneticky blízkými taxony. U některých dalších druhů je však úzký vztah fenotypu křemičitých struktur a fylogenetické příbuznosti narušen. Například druh *Mallomonas ouradion* se morfologií svých křemičitých šupin výrazně liší od svého sesterského taxonu *M. elongata*. Tyto výjimky však nebyly vázány pouze na nově osekvenované druhy, a tudíž je nepravděpodobné, že by jejich příčinou byla nízká kvalita získaných molekulárních dat. Patří mezi ně i druh *M. akrokomos*, který se fylogeneticky řadí do příbuzenstva zástupců sekcí Annulatae a Papillosae, avšak jeho fenotyp odpovídá zástupcům sekcí Planae a Quadratae. Druhy *M. heterospina* a *M. punctifera* jsou naopak fylogeneticky příbuzné zástupcům sekcí Planae a Quadratae, vymykají se však značně morfologií svých křemičitých šupin. Druh *Mallomonas insignis* patřící do linie A1 se svým fenotypem blíží zástupcům druhé hlavní linie rodu, A2. Možným vysvětlením těchto případů by mohly být náhlé změny trendů v evoluci morfologických znaků, ke kterým by došlo pouze na jednotlivých liniích vedoucích k těmto druhům. Zmíněné druhy se od svých sesterských taxonů lišily především ve struktuře dómu (obr. 8), V-žebra (obr. 22) a sekundární síť na štítu šupiny (obr. 20). Kvůli své značně odlišné (a do jisté míry unikátní) morfologii patří tyto druhy do nezávislých malých sekcí rodu *Mallomonas* (Ouradiotae, Akrokomae, Heterospinae, Punctiferae, Insignes; Kristiansen & Preisig, 2007). Ve fylogenetických analýzách se tyto druhy včlenily mezi zástupce jiných sekcí, do kterých pravděpodobně původně patřily, než u nich došlo ke změně evolučních

trendů v morfologii křemičitých struktur. Po jejich taxonomickém zařazení do nezávislých sekcí se jejich „původní“ sekce staly parafyletickými (diskutováno výše).

Konkrétní umístění několika dalších druhů v ordinačním prostoru PCoA na základě morfologie jejich křemičitých struktur však mohlo být do jisté míry zkresleno porovnáváním mikrofotografií pocházejících ze skenového elektronového mikroskopu (SEM) s mikrofotografiemi pocházejícími z transmisního elektronového mikroskopu (TEM). To mohlo být příčinou např. oddálení druhu *Mallomonas bangladeshica* od *M. peronoides* či druhu *M. cratis* od *M. pseudocratis*. Pomocí SEM mikroskopie totiž není možné odhalit vnitřní struktury křemičitých šupin. Toto omezení vysvětluje i začnou odlišnost šupin recentního a fosilního zástupce druhu *M. insignis*, jež pod křemičtým valem v anteriorní i posteriorní části šupiny skrývá mohutnou sekundární síť s vystupujícími trámci na posteriorní okraj. Pro čtyři námi studované zástupce rodu *Mallomonas* jsou v literatuře uveřejněny pouze SEM mikrofotografie (*M. hexareticulata*, *M. lacuna*, *M. pseudomatvienkoae* a *M. sorohexareticulata*), také mikrofotografie všech fosilních zástupců v databázi Giraffe Pipe pochází ze SEM. Domnívám se však, že TEM mikroskopie je pro komparativní studium morfologie křemičitých struktur šupinatých chrysomonád výrazně vhodnější.

Další komplikací při srovnávání křemičitých šupin je řada nekvalitních mikrofotografií publikovaných v době počátků TEM šupinatých chrysomonád (mikrofotografie druhů *Mallomonas bangladeshica*, *M. pseudocratis*, *M. splendens*; Dürschmidt, 1983; Wujek & Timpano 1984; Croome et al., 1985), jež mohly ovlivnit přesnost hodnocení jednotlivých morfologických znaků. Mezi různými TEM mikrofotografiemi je ale také patrný rozdíl v expozici během pořizování snímku, který mohl především ovlivnit hodnocení míry silicifikace křemičitých šupin.

5.3. Fosilní záznam a tempo evoluce

Šupiny fosilních zástupců rodu *Mallomonas* z paleolimnologické lokality Giraffe Pipe se charakterem morfologické variability neliší od recentních taxonů, obě skupiny se překrývaly v ordinačním prostoru PCoA (obr. 5). U tří druhů (*M. asmundiae*, *M. bangladeshica* a *M. peronoides*) se dokonce fosilní šupiny zařadily v ordinačním prostoru do blízkosti recentních šupin patřících ke stejnému druhu. Skutečnost, že se křemičité šupiny minimálně těchto druhů po dobu několika desítek milionů let (stáří fosílií je datováno na 39 – 48 mil. let) prakticky nezměnily, svědčí o značné stázi morfologické evoluce. Lze spekulovat, že pokud zůstává morfologie křemičitých šupin v rámci evoluční linie po tak dlouhou dobu takřka stejná, mohla by být pod vlivem stabilizující selekce, která by dlouhodobě udržovala již optimalizovaný

fenotyp (Eldredge & Gould, 1996). Je totiž dosti nepravděpodobné, že by se komplikovaná struktura křemičité šupiny vystavená pouze neutrální evoluci po tak dlouhou dobu neměnila.

V kontextu výše zmíněné evoluční stáze je zajímavé, že naše výsledky podporují i přesně opačný scénář zrychlené tvarové evoluce. Z rekonstrukcí evoluční historie celé řady morfologických znaků je patrné, že u několika druhů došlo v řádově stejném časovém intervalu (30 – 50 mil. let podle chronogramu) k nápadnému odlišení morfologie jejich šupin od sesterských taxonů. Jedná se o *Mallomonas ouradion* (přítomnost dómu, papily na štítu šupiny, posteriorní okraj s póry, délka ostnu, počet pórů v ohybu V-žebra; obr. č. 8, 15, 17, 24, 29), *M. portae-ferreae* (plocha dómu, délka šupiny, počet pórů v ohybu V-žebra, míra silicifikace; obr. č. 25, 26, 29, 31), *M. intermedia* (sekundární síť na štítu šupiny; obr. č. 20) a *M. crassisquama* (sekundární síť na štítu šupiny; obr. č. 20). Evoluce tvaru křemičitých šupin tak zřejmě může u různých zástupců rodu *Mallomonas* probíhat různým tempem.

Kromě tří na počátku zmíněných druhů byly do PCoA analýzy zahrnuty i recentní a fosilní šupiny druhu *M. insignis*, ty však byly v ordinačním diagramu nápadně odděleny. Tento výsledek je v rozporu s poznatky práce Siver et al. (2013), ve které nebyly detekovány rozdíly v ornamentaci těchto šupin. V našem případě bylo pravděpodobnou příčinou rozdílů porovnávání TEM a SEM mikrofotografií (viz výše). Přispět také mohla snížená kvalita fosilního materiálu (poškození šupin na jejich okrajích, poškození vyvýšených struktur na šupinách apod.). Některé ze zahrnutých fosilních druhů, u kterých autoři Siver et al. (2015) uvádí, že nemohou být přiřazeny k žádným ze současných taxonů, se v našem PCoA diagramu shlucovaly s recentními zástupci. Druhy *M. porifera* a *M. media* se v ordinačním prostoru přiřadily k recentním zástupcům *M. caudata* a *M. lacuna*. U taxonu *Mallomonas* GP 19 autoři Siver et al. (2015) navrhli příbuznost s druhem *M. oviformis*, v našem ordinačním diagramu se však tento taxon přiřadil nejbližše druhu *M. tolerans*.

5.4. Trendy evoluce tvaru křemičitých struktur zástupců rodu *Mallomonas*

U osmi kvantitativních a šesti binárních (prezenčních) morfologických znaků se nám nepodařilo prostřednictvím evolučních parametrů lambda a D prokázat vliv fylogeneze na jejich rekonstruované změny (viz kap. 4.3.1 a 4.3.2). V takovém případě by změny znaků byly v delším časovém měřítku do značné míry nezávislé na jejich dosavadním evolučním vývoji. Lze předpokládat, že celá řada změn hodnot znaků by mohla být produktem náhody, v souladu s pravidly neutrální evoluce. Stejně tak se ale na vývoji daného znaku mohl podílet přirozený výběr v reakci na tehdejší abiotické a biotické podmínky prostředí.

Rekonstrukce evoluční historie kvantitativních znaků byla doplněna výpočtem škálovacích parametrů kappa a delta. Pomocí parametru kappa bylo možné rozdělit kvantitativní znaky s průkazným fylogenetickým signálem do tří kategorií odrážejících charakter jejich evoluce: punktualistický model, gradualistický model a model zrychlení evoluce na delších větvích fylogenetického stromu. Většina sledovaných znaků (10 z 15ti) se vyvíjela nezávisle na délce větví fylogenetického stromu, v souladu s punktualistickým modelem evoluce. Je možné spekulovat, že právě do této kategorie by měly spadat znaky, jejichž změny jsou pod vlivem selekčních tlaků měnícího se prostředí. V našich analýzách byly mnohé z takto charakterizovaných znaků spjaté s velikostí a tvarem obrysu šupiny (šířka šupiny, délka šupiny, kruhovitost šupiny, šířka křemičité schránky, obvod šupiny). Siver et al. (2015) předpokládají, že s měnící se velikostí buněk dochází u zástupců rodu *Mallomonas* zároveň i ke změně velikosti křemičitých šupin. Jelikož u protistních mikroorganismů obecně s rostoucí teplotou klesá velikost jejich buněk (Montagnes & Franklin, 2001; Atkinson et al., 2003), mohlo by i u šupinatých chrysomonád během dlouhodobého nárůstu teploty vodního prostředí docházet ke zmenšování velikosti buněk a potažmo i jejich křemičitých šupin (Siver et al., 2015). Pokud by tento předpoklad platil, lze se domnívat, že změny teplot v různých geologických obdobích mohly ovlivnit punktualistický vývoj morfologických znaků spjatých s velikostí šupin. Další skupinou znaků, jejichž evoluce probíhala v souladu s punktualistickým modelem, jsou znaky spjaté s množstvím křemíku ukládaného do šupin (silicifikace, šířka přehnutého okraje, plocha kápě V-žebra). Protože koncentrace hydroxidu křemičitého dostupného ve vodním prostředí se nezdá v různých geologických obdobích značně lišit (Siever, 1991), tento faktor mohl do značné míry ovlivnit morfologii křemičitých schránek. V obdobích, kdy byly vodní biosilicifikující mikroorganismy limitovány dostupností rozpuštěného křemíku, mohlo docházet ke snižování celkové silicifikace křemičitých struktur (např. jejich ztenčováním) nebo ke strukturním změnám vedoucím mimo jiné k podpoře výskytu pórů a výztuh, o kterých je známo, že mohou zvyšovat pevnost křemičitých struktur (Vogel, 2003, Hamm & Smetacek, 2007, Schröder et al., 2008) a zároveň šetřit křemíkem. Evoluční trendy vedoucí ke ztenčování křemičitých schránek a snížení míry celkové silicifikace, pravděpodobně v reakci na nedostatek rozpuštěného křemíku ve vodním prostředí, byly zaznamenány u rozsivek (Finkel & Kotrc, 2010) a mřížovců (Malviva et al., 1989).

V souladu s gradualistickým modelem evoluce se z námi sledovaných znaků vyvíjel jediný – délka ostnů. Oproti předchozímu punktualistickému modelu, u kterého jsou změny fenotypu zástupců evoluční linie takřka výhradně vázány na probíhající speciaci, gradualismus

předpokládá, že se fenotyp organismů mění průběžně (Gould, 2002). Z rekonstrukce délky ostnů (obr. 24) je patrný trend postupného zvětšování jejich velikosti napříč takřka všemi evolučními liniemi rodu (s výjimkou dvou druhů, u kterých ostny vymizely). Lze spekulovat, že takto směřovaná a dlouhodobá evoluční změna tvaru struktury by spíše než průběžně se měnící podmínky prostředí mohla odrážet selekční tlaky s obecnější platností. Uváděno je například, že přítomnost a velikost křemičitých výrůstků může ovlivnit, zda se jejich nositelé stanou s větší pravděpodobností kořistí predátora (Raven & Giordano, 2009; Finkel & Kotrc, 2010, van Tol et al., 2012). Výrůstky na povrchu buněk mohou zároveň výrazně snižovat rychlost poklesu protistních mikroorganismů ve vodním sloupci (Padisak et al., 2003), i když v případě rodu *Mallomonas*, jehož zástupci jsou schopní aktivního pohybu, nebude zřejmě výhodnost tohoto znaku natolik významná.

Poslední kategorií rozlišenou pomocí parametru kappa je model zrychlení evoluce na delších větvích fylogenetického stromu. V souladu s tímto modelem se v evoluci vyvíjely čtyři znaky: úhel V-žebra, počet okének, plocha okének a počet žeber na anteriorním okraji. Ve fylogenetickém stromě s rekonstruovanými hodnotami znaků se tento model projeví tím, že k předpokládaným změnám došlo hlouběji ve fylogenezi rodu a na krátkých větvích fylogenetického stromu (vedoucí k evolučně mladším taxonům) změny v těchto znacích již prakticky chybí (např. obr. 27). Pro tři z těchto znaků (všechny kromě počtu žeber na anteriorním okraji), byla stanovena hodnota škálovacího parametru delta odpovídající scénáři adaptivní radiace. Nelze proto vyloučit, že získání těchto struktur v evoluční historii rodu spustilo adaptivní radiace, během kterých evoluční linie těžily z výhod poskytovaných adaptivní strukturou. Pro tento scénář však existuje i neadaptivní vysvětlení, ve kterém není předpokládána evoluční výhodnost daných morfologických struktur. Pokud by po získání struktury byla její druhotná ztráta velmi komplikovaná, např. v důsledku nejrůznějších strukturních a ontogenetických omezení, struktura by se s největší pravděpodobností velmi úspěšně předávala do dalších generací a potažmo odvozených evolučních linií.

5.5. Vznik a zánik křemičitých struktur v průběhu evoluce

Na základě evolučních rekonstrukcí jednotlivých binárních morfologických znaků (přítomnost / nepřítomnost struktury) se jako nejkonzervovanější struktury v evoluci jeví V-žebro, dóm s papilami, přehnutý posteriorní okraj překrytý až k V-žeburu a síť na posteriorním okraji šupiny. Tyto morfologické struktury totiž zřejmě vznikly v evoluci jen jednou, a pro linie, ve kterých došlo k vzniku takové struktury, bylo navíc velmi obtížné tuto strukturu druhotně ztratit nebo přeměnit do podoby zcela jiné. Pokud by struktura V-žebra byla

homologickou k centrální vyvýšenině, kterou nalézáme u tří druhů rodu *Mallomonas* (*M. bangladeshica*, *M. insignis* a *M. peronoides*), značně by to zvýšilo pravděpodobnost jejího výskytu u společného předka, následovanou čtyřikrát druhotným vymizením.

Naopak mezi evolučně dynamičtější struktury, častěji vznikající a zároveň i zanikající, patří na základě našich výsledků anteriorní submarginální žebro, dóm, anteriorní okraj s papilami, ostny přítomné pouze na okraji křemičité schránky, trámce z V-žebra vystupující na posteriorní okraj i na štít šupiny, anteriorní okraj s žebry, dóm s žebry a centrální vyvýšenina (za předpokladu, že by se nejednalo o strukturu homologickou V-žebra). Ke vzniku dómu a centrální vyvýšeniny mohlo v evoluci dojít dvakrát nezávisle na sobě. Jako velmi dynamické struktury, disponující až pět nezávislými vzniků v průběhu evoluce rodu *Mallomonas*, byly v našich rekonstrukcích stanoveny papily na anteriorním okraji a trámce z V-žebra na posteriorním okraji. Struktura papil na štítu šupiny podléhá sice často druhotným zánikům, nejméně dvakrát však zřejmě došlo i k nezávislému vzniku této struktury (u zástupců *M. ouradion*, *M. sorohexareticulata*). Relativně často zřejmě v evoluci rodu zanikaly i póry na posteriorním okraji. Na základě výsledků rekonstrukce evoluce ostnů se domnívám, že u společného pokrývaly celý povrch křemičité schránky a následně u několika linií došlo k omezení jejich výskytu pouze na okraj křemičité schránky. U druhu *M. punctifera* se však zřejmě ostny druhotně navrátily z okrajů na celý povrch. Zajímavé je, že pokrytí schránky ostny u tohoto druhu je nápadně řidší v porovnání s hustotou výskytu ostnů u jiných zástupců rodu, což je v souladu s druhotným nezávislým vznikem tohoto znaku. Autoři Siver et al. (2015) se naopak domnívají, že ostny u společného předka nebyly přítomny a ještě než se tato struktura objevila v evoluci, došlo k oddělení linie vedoucí k druhu *M. insignis*, u kterého ostny v současnosti chybí.

Lze spekulovat, že zmíněné evolučně konzervované morfologické znaky by mohly být dlouhodobě udržovány stabilizující selekcí. Alespoň některé z nich (V-žebro, přehnutý posteriorní okraj překrytý až k V-žebra, síť na posteriorním okraji šupiny) mohou do značné míry ovlivňovat celkovou pevnost křemičitých šupin a představovat tak selekcí udržovaný „optimalizovaný“ fenotyp. Struktura V-žebra by pravděpodobně mohla díky své pozici na křemičité šupině zabraňovat zlomení v její centrální části. Jak struktura V-žebra, tak výrazně přehnutý posteriorní okraj podpořený křemičitou sítí by pravděpodobně mohly výrazně napomoci rozvrstvení šupin po celém povrchu buňky tak, aby utvořily těsnou a zároveň celistvou schránku (Siver, 1991; Lavau & Wetherbee, 1994; Siver et al., 2015). Vysvětlení převahy některých struktur na křemičitých šupinách v evoluci rodu však může být i podstatně prozaičtější. Evoluce výrazně přehnutého posteriorního okraje je velmi těsně spjata s evolucí sítě na posteriorním okraji (obr. 16, 19) a je tedy velmi pravděpodobné, že obě struktury jsou

součástí určitého konstrukčního řešení. Je možné si představit, že křemičitá síť by mohla zevnitř vyztužovat přehnutý posteriorní okraj tak, aby unesl tíhu anteriorních okrajů sousedících šupin. Přítomnost posteriorní sítě by ta byla příkladem strukturního omezení nebo spandrelu (viz kap. 1.1. v úvodu). V důsledku nejrůznějších strukturních a ontogenetických omezení mohou být dlouhodobě udržovány i suboptimální struktury (Gould, 2002). U struktur podstatně dynamičtějších, které v průběhu evoluce rodu opakovaně vznikaly a zanikaly, lze předpokládat kombinaci vlivu neutrální evoluce a selekčních tlaků odrážejících měnící se podmínky prostředí.

5.6. Rekonstrukce fenotypu předka rodu *Mallomonas*

Jen u některých morfologických struktur, jejichž evoluce byla rekonstruována, je možné odhadnout, zda se u společného předka studovaných zástupců vyskytovaly, či nikoli. Křemičitá schránka hypotetického předka měla pravděpodobně po celém svém povrchu křemičité ostny, které dosahovaly ve srovnání se současně žijícími zástupci menší velikosti. Jednotlivé šupiny skládající křemičitou schránku byly pravděpodobně proděravělé póry, a to alespoň na posteriorním okraji, a disponovaly vystupujícími papilami na štítu šupiny. Přední část křemičité šupiny předka zřejmě nebyla nápadně oddělena dómem ani strukturami na anteriorním okraji (papily, submarginální žebro, žebra). Autoři Siver & Wolfe (2010) z fosilního záznamu pozorovali, že někteří pravděpodobně vyhynulí zástupci rodu zřejmě experimentovali s uchycením ostnu v přední části šupiny. Příkladem může být druh *Mallomonas porifera*, který pro napojení ostnu na šupiny využívá zkroucenou anteriorní část šupiny namísto struktury dómu.

Na posteriorním okraji šupina předka nedisponovala přehnutým okrajem ani síťkou. Zda se u tohoto předka vyskytovala jinými autory nejvíce sledovaná struktura V-žebra (Jo et al., 2013; Kim et al., 2014, Siver et al., 2015), není možné na základě našich dat posoudit.

Skutečnost, že celá řada morfologických struktur na křemičitých šupinách pravděpodobně chyběla u společného předka rodu *Mallomonas* však nemusí nezbytně znamenat, že původní křemičité struktury byly jednodušší než jejich podoba u současných zástupců. V našich analýzách totiž mohla být rekonstruována pouze evoluce znaků, které se zachovaly u recentních zástupců rodu. Společný předek však mohl disponovat stejně komplikovanou (či dokonce komplikovanější) morfologií křemičitých šupin, jejíž struktury mohly v evoluci buď vymizet, nebo se radikálně přeměnit do podoby jiných současných struktur.

6. Seznam citované literatury

- ANDERSEN, R., Y. VAN DE PEER, D. POTTER, J. SEXTON, M. KAWACHI, AND T. LAJEUNESSE. 1999. Phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the Chrysophyceae. *Protist* 150: 71–84.
- ANDERSEN, R.A. 2007. Molecular systematics of the Chrysophyceae and Synurophyceae. In J. Brodie, and J. Lewis [eds.], *Unravelling the algae*, 285–313. CRC Press, New York.
- ANDERSEN, R.A. 1987. Synurophyceae Classis Nov., A New Class of Algae. *American Journal of Botany* 74: 337.
- ASMUND, B., AND J. KRISTIANSEN. 1986. The genus *Mallomonas* (Chrysophyceae). *Opera Botanica* 85: 5–128.
- ATKINSON, D., B.J. CIOTTI, AND D.J.S. MONTAGNES. 2003. Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% degrees C(-1). *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 270: 2605–11.
- BEAULIEU, J.M., D.-C. JHWUENG, C. BOETTIGER, AND B.C. O'MEARA. 2012. Modeling stabilizing selection: expanding the Ornstein-Uhlenbeck model of adaptive evolution. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 66: 2369–83.
- BEECH, P.L., R. WETHERBEE, AND J.D. PICKETT-HEAPS. 1990. Secretion and deployment of bristles in *Mallomonas splendens* (Synurophyceae). *Journal of Phycology* 26: 112–122.
- BELTON, D.J., O. DESCHAUME, AND C.C. PERRY. 2012. An overview of the fundamentals of the chemistry of silica with relevance to biosilicification and technological advances. *FEBS Journal* 279: 1710–1720.
- BOO, S.M., H.S. KIM, W. SHIN, G.H. BOO, S.M. CHO, B.Y. JO, J.H. KIM, ET AL. 2010. Complex phylogeographic patterns in the freshwater alga *Synura* provide new insights into ubiquity vs. endemism in microbial eukaryotes. *Molecular Ecology* 19: 4328–4338.
- BOTO, L. 2010. Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 277: 819–27.
- BOURRELLY. 1957. Recherches sur les Chrysophycées: Morphologies, phylogénie, systématique. *Revue Algologique, Mémoire Hors-Série* 1: 1–412.
- BRAKEFIELD, P.M., AND J.C. ROSKAM. 2006. Exploring evolutionary constraints is a task for an integrative evolutionary biology. *The American Naturalist* 168 Suppl: S4–13.
- BROWN, J.W., AND U. SORHANNUS. 2010. A molecular genetic timescale for the diversification of autotrophic stramenopiles (Ochrophyta): Substantive underestimation of putative fossil ages. *PLoS ONE* 5: 1–11.
- BRZEZINSKI, M., R. OLSON, AND S. CHISHOLM. 1990. Silicon availability and cell-cycle progression in marine diatoms. *Marine Ecology Progress Series* 67: 83–96.

- DEL CAMPO, J., AND R. MASSANA. 2011. Emerging diversity within chrysophytes, choanoflagellates and bicosoecids based on molecular surveys. *Protist* 162: 435–48.
- COOMBS, J., W.M. DARLEY, O. HOLM-HANSEN, AND B.E. VOLCANI. 1967. Studies on the Biochemistry and Fine Structure of Silica Shell Formation in Diatoms. Chemical Composition of *Navicula pelliculosa* during Silicon-Starvation Synchrony. *Plant Physiology* 42: 1601–1606.
- CREASER, R.A., H. GRÜTTER, J. CARLSON, AND B. CRAWFORD. 2004. Macrocrystal phlogopite Rb–Sr dates for the Ekati property kimberlites, Slave Province, Canada: evidence for multiple intrusive episodes in the Paleocene and Eocene. *Lithos* 76: 399–414.
- CROOME, R., M. DURRSCHMIDT, AND P. TYLER. 1985. A light and electron microscopical investigation of *Mallomonas splendens* (GS West) Playfair (Mallomonadaceae, Chrysophyceae). *Nova Hedwigia* 41: 463–470.
- DACKS, J.B., G. WALKER, AND M.C. FIELD. 2008. Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitology international* 57: 97–104.
- DARWIN, C. 1859. On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. 1. ed. M. John [ed.],. Nature, London.
- DAUGBJERG, N., AND R.A. ANDERSEN. 1997. Phylogenetic analyses of rbcL sequences from haptophytes and heterokont algae suggest their chloroplasts are unrelated. *Phycologia* 36: 23–23.
- DORIA, G., D.L. ROYER, A.P. WOLFE, A. FOX, J.A. WESTGATE, AND D.J. BEERLING. 2011. Declining atmospheric CO₂ during the late Middle Eocene climate transition. *American Journal of Science* 311: 63–75.
- DÜRRSCHMIDT, M. 1983. New taxa of the genus *Mallomonas* (Mallomonadaceae, Chrysophyceae) from Southern Chile. *Nova Hedwigia* 38: 717–726.
- ELDRIDGE, N., AND S.J. GOULD. 1996. Fossils: The Evolution and Extinction of Species. 1. ed. Princeton University Press.
- ERWIN, D.H. 2000. Macroevolution is more than repeated rounds of microevolution. *Evolution and Development* 2: 78–84.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist* 125: 1.
- FINKEL, Z. V., AND B. KOTRC. 2010. Silica Use Through Time: Macroevolutionary Change in the Morphology of the Diatom Fustule. *Geomicrobiology Journal* 27: 596–608.
- FOSTER, D. V., AND P. GRASSBERGER. 2011. Lower bounds on mutual information. *Physical Review E* 83: 010101.
- FRITZ, S.A., AND A. PURVIS. 2010. Selectivity in mammalian extinction risk and threat types: a new measure of phylogenetic signal strength in binary traits. *Conservation biology* : *The Journal of the Society for Conservation Biology* 24: 1042–51.

- GERICKE, T., P. WÜRTZ, D. REITZ, T. LANGEN, AND H. OTT. 2008. High-resolution scanning electron microscopy of an ultracold quantum gas. *Nature Physics* 4: 949–953.
- GOULD, S.J. 2002. *The Structure of Evolutionary Theory*. Harvard University Press, Cambridge.
- GOULD, S.J., AND N. ELDREDGE. 1993. Punctuated equilibrium comes of age. *Nature* 366: 223–7.
- GUIRY, M.D., GUIRY, G.M. 2015. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
- GRAY, M.W., J. LUKES, J.M. ARCHIBALD, P.J. KEELING, AND W.F. DOOLITTLE. 2010. Cell biology. Irremediable complexity? *Science (New York, N.Y.)* 330: 920–1.
- HALE, M.S., AND J.G. MITCHELL. 2001. Motion of Submicrometer Particles Dominated by Brownian Motion near Cell and Microfabricated Surfaces. *Nano Letters* 1: 617–623.
- HAMBLIN, A.P., L.D. STASIUK, A.R. SWEET, G.D. LOCKHART, D.R. DYCK, K. JAGGER, AND L.R. SNOWDON. 2003. Post-kimberlite Eocene strata within a crater basin, Lac de Gras, Northwest Territories, Canada. *In* Eighth International Kimberlite Conference, unpagged. Victoria, British Columbia, Canada.
- HAMM, C.E., AND V. SMETACEK. 2007. Armor: why, when, and, how. *In* P. G. Falkowski, and A. H. Knoll [eds.], *Evolution of primary producers in the sea*, 311–332. Elsevier, Amsterdam.
- HARWOOD, D.M., AND R. GERSONDE. 1990. Lower Cretaceous Diatoms From ODP Leg 113 Site 693 (Weddell Sea). Part 2 : Resting Spores , Chrysophycean Cysts , an Endoskeletal Dinoflagellate , and Notes on the Origin of Diatoms. *Proceedings of the Ocean Drilling Program , Scientific Results* 113: 403–425.
- HEPPERLE, D. 2004. SeqAssem. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version.
- HUELSENBECK, J.P., R. NIELSEN, AND J.P. BOLLBACK. 2003. Stochastic Mapping of Morphological Characters. *Systematic Biology* 52: 131–158.
- CHEN, X., C. WANG, E. BAKER, J. WANG, AND C. SUN. 2014. Understanding the nanophotonic light-trapping structure of diatom frustule for enhanced solar energy conversion: a theoretical and experimental study. *In* *Bioinspired, Biointegrated, Bioengineered, Photonic devices II*, 89580I. WA 98227-0010 USA.
- JO, B.Y., W. SHIN, S.M. BOO, H.S. KIM, AND P.A. SIVER. 2011. Studies on ultrastructure and three-gene phylogeny of the genus *Mallomonas* (Synurophyceae). *Journal of Phycology* 47: 415–425.
- JO, B.Y., W. SHIN, H.S. KIM, P.A. SIVER, AND R.A. ANDERSEN. 2013. Phylogeny of the genus *Mallomonas* (Synurophyceae) and descriptions of five new species on the basis of morphological evidence. *Phycologia* 52: 266–278.

- KATANA, A., J. KWIATOWSKI, K. SPALIK, B. ZAKRYS, E. SZALACHA, AND H. SZYMANSKA. 2001. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. *Journal of Phycology* 37: 443–451.
- KATOH, K., AND D.M. STANDLEY. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution* 30: 772–80.
- KIM, H.S., J.H. KIM, W. SHIN, AND B.Y. JO. 2014. *Mallomonas elevata* sp. nov. (Synurophyceae), a new scaled Chrysophyte from Jeju Island, South Korea. *Nova Hedwigia* 98: 89–102.
- KLAVENESS, D., AND R.R.L. GUILLARD. 1975. The requirement for silicon in *Synura petersenii* (Chrysophyceae). *Journal of Phycology* 11: 349–355.
- KLOSTER, M., G. KAUER, AND B. BESZTERI. 2014. SHERPA: an image segmentation and outline feature extraction tool for diatoms and other objects. *BMC Bioinformatics* 15: 218.
- KRISTIANSEN, J. 2005. Golden algae: A biology of chrysophyta. Gantner Verlag, Germany.
- KRISTIANSEN, J. 2002. The genus *Mallomonas* (Synurophyceae) - A taxonomic survey based on the ultrastructure of silica scales and bristles. *In Opera Botanica*, 139: 5–218.
- KRISTIANSEN, J., AND H.R. PREISIG. 2007. Süßwasserflora von Mitteleuropa Freshwater Flora of Central Europe: Chrysophyte and Haptophyte Algae. 2nd ed. B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz, H. R.Preisig, and M. Schagerl [eds.]. Springer, Berlin.
- LAVAU, S., G.W. SOUNDERS, AND R. WETHERBEE. 1997. A phylogenetic analysis of the Synurophyceae using molecular data and scale case morphology. *Journal of Phycology* 33: 135–151.
- LAVAU, S., AND R. WETHERBEE. 1994. Structure and development of the scale case of *Mallomonas adamas* (Synurophyceae). *Protoplasma* 181: 259–268.
- LAZARUS, D. 1983. Speciation in pelagic protista and its study in the planktonic microfossil record - A review. *Paleobiology* 9: 327–340.
- LEMLOH, M.-L., F. MARIN, AND F. HERBST. 2013. Genesis of amorphous calcium carbonate containing alveolar plates in the ciliate *Coleps hirtus* (Ciliophora, Prostomatea). *Journal of structural biology* 181: 155–161.
- LEPŠ, J., AND P. ŠMILAUER. 2014. Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO 5. 2. ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- MADDISON, W.P., MADDISON, D.R. 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.01. Dostupné z URL: <http://mesquiteproject.org>
- MALVIVA, R.G., A.H. KNOLL, AND R. SIEVER. 1989. Secular change in chert distribution: A reflection of evolving biological participation in the silica cycle. *Palaios* 4: 519–532.

- MARTINS, E.P. 1996. *Phylogenies and the Comparative Method in Animal Behavior*. Oxford University Press, New York.
- MAYAMA, S., AND A. KURIYAMA. 2002. Diversity of mineral cell coverings and their formation processes: a review focused on the siliceous cell coverings. 115: 289–295.
- MEDLIN, L. 2002. Why silica or better yet why not silica? Speculations as to why the diatoms utilise silica as their cell wall material. *Diatom research*: 453–459.
- MONTAGNES, D., AND D. FRANKLIN. 2001. Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms. *Limnology and Oceanography* 46: 2008–2018.
- NĚMCOVÁ, Y. 2010. Diversity and ecology of silica-scaled chrysophytes (Synurophyceae, Chrysophyceae) in the National Nature Monument Swamp and Brehynsky Pond, Czech Republic. *Cryptogamie Algologie* 31: 229–243.
- NĚMCOVÁ, Y., J. KREIDLOVÁ, A. KOSOVÁ, AND J. NEUSTUPA. 2012. Lakes and pools of Aquitaine region (France) – a biodiversity hotspot of Synurales in Europe. *Nova Hedwigia* 95: 1–24.
- NICHOLLS, K.H. 1980. A reassessment of *Chrysosphaerella longispina* and *C. multispina*, and a revised key to related genera in the Synuraceae (Chrysophyceae). *Plant Systematics and Evolution* 135: 95–106.
- NUNN, C.L. 2011. *The Comparative Approach in Evolutionary Anthropology and Biology*. University of Chicago Press, Chicago.
- ORME, D., FRECKLETON, R., THOMAS, G., PETZOLDT, T., FRITZ, S., ISAAC, N., PEARSE, W. 2013. Caper: Comparative Analysis of Phylogenetics and Evolution in R. R package version 0.5.2. Dostupné z URL: <http://CRAN.R-project.org/package=caper>
- ORR, H.A. 2005. The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nature reviews. Genetics* 6: 119–27.
- PADISÁK, J., É. SORÓCZKI-PINTÉR, AND Z. REZNER. 2003. Sinking properties of some phytoplankton shapes and the relation of form resistance to morphological diversity of plankton – an experimental study. *Hydrobiologia* 500: 243–257.
- PAGEL, M., A. MEADE, AND D. BARKER. 2004. Bayesian estimation of ancestral character states on phylogenies. *Systematic biology* 53: 673–84.
- PASCHER, A. 1914. Über flagellaten und algen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 32: 136–160.
- PICHRTOVÁ, M., M. ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ, AND P. ŠKALOUD. 2007. The silica-scaled chrysophytes of the Czech-Moravian Highlands. *Fottea* 7: 43–48.
- PIPES, L., AND G. LEEDALE. 1992. Scale formation in *Tessellaria volvocina* (Synurophyceae). *British Phycological Journal* 27: 11–19.

- POPESCU, A.-A., K.T. HUBER, AND E. PARADIS. 2012. ape 3.0: New tools for distance-based phylogenetics and evolutionary analysis in R. *Bioinformatics (Oxford, England)* 28: 1536–7.
- PREISIG, H.R. 1994. Siliceous structures and silicification in flagellated protists. *Protoplasma* 181: 29–42.
- PREISIG, H.R., AND D.J. HIBBERD. 1983. Ultrastructure and taxonomy of *Paraphysomonas* (Chrysophyceae) and related genera. *Nordic Journal of Botany* 3: 695–723.
- RAMBAUT, A. SUCHARD, M.A., XIE, D., DRUMMOND A.J. 2014. Tracer version 1.6. Dostupné z URL <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- RAVEN, J.A., AND M. GIORDANO. 2009. Biomineralization by photosynthetic organisms: Evidence of coevolution of the organisms and their environment? *Geobiology* 7: 140–154.
- REVELL, L.J. 2014. Graphical Methods for Visualizing Comparative Data on Phylogenies. In L. Z. Garamszegi [ed.], *Modern Phylogenetic Comparative Methods and Their Application in Evolutionary Biology*, 77–103. Springer, Berlin.
- REVELL, L.J. 2012. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* 3: 217–223.
- REVELL, L.J. 2013. Two new graphical methods for mapping trait evolution on phylogenies. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 754–759.
- RIISBERG, I., R.J.S. ORR, AND R. KLUGE. 2009. Seven Gene Phylogeny of Heterokonts. *Protist* 160: 191–204.
- ROIJACKERS, R.M.M. 1981. Chrysophyceae from freshwater localities near Nijmegen, The Netherlands. *Hydrobiologia* 76: 179–189.
- RONQUIST, F., AND J.P. HUELSENBECK. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- ROUSE, G.E. 1977. Paleogene palynomorph ranges in western and northern Canada. In American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation, Contributions Series, serie A, 48–65.
- ŘEZÁČOVÁ, M. 2005. Sezónní dynamika a ekologie chysomonád s křemičitými šupinami (Chrysophyceae, Synurophyceae). Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze. 124.
- SANDGREN, C.D. 1991. Chrysophyte reproduction and resting cysts: a paleolimnologist's primer. *Journal of Paleolimnology* 5: 1–9.
- SCOBLE, J.M., AND T. CAVALIER-SMITH. 2014. Scale evolution in Paraphysomonadida (Chrysophyceae): Sequence phylogeny and revised taxonomy of *Paraphysomonas*, new genus *Clathromonas*, and 25 new species. *European Journal of Protistology* 50: 551–92.

- SCHLUTER, D., T. PRICE, A.O. MOOERS, AND D. LUDWIG. 1997. Likelihood of Ancestor States in Adaptive Radiation. *Evolution* 51: 1699.
- SCHNEIDER, C.A., W.S. RASBAND, AND K.W. ELICEIRI. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671–675.
- SCHRÖDER, H.C., X. WANG, W. TREMEL, H. USHIJIMA, AND W.E.G. MÜLLER. 2008. Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. *Natural Product Reports* 25: 455–74.
- SIDLAKUSKAS, B. 2008. Continuous and arrested morphological diversification in sister clades of characiform fishes: a phylomorphospace approach. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 62: 3135–56.
- SIEVER, R. 1991. Silica in the oceans: Biological-Geochemical interplay. In S. H. Schneider, and P. J. Boston [eds.], *Scientists on Gaia*, 287–295. MIT Press, Cambridge.
- SIVER, P. A., AND A. P. WOLFE. 2005a. Scaled chrysophytes in Middle Eocene lake sediments from Northwestern Canada, including descriptions of six new species. *Chrysophytes: Past and Present. CHRYS 2004. Proceedings of the Sixth International Chrysophyte Symposium, 2-7 August 2004, Lammi, Finland*: 295–308.
- SIVER, P. A., AND A. P. WOLFE. 2009. Tropical Ochrophyte Algae From the Eocene of Northern Canada: a Biogeographic Response To Past Global Warming. *Palaios* 24: 192–198.
- SIVER, P. A., A. P. WOLFE, F.J. ROHLF, W. SHIN, AND B.Y. JO. 2013a. Combining geometric morphometrics, molecular phylogeny, and micropaleontology to assess evolutionary patterns in *Mallomonas* (Synurophyceae: Heterokontophyta). *Geobiology* 11: 127–138.
- SIVER, P. A., AND A.P. WOLFE. 2005b. Eocene Scaled Chrysophytes with Pronounced Modern Affinities. *International Journal of Plant Sciences* 166: 533–536.
- SIVER, P.A. 1991. *The Biology of Mallomonas: Morphology, Taxonomy and Ecology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- SIVER, P.A., AND A.M. LOTT. 2012. Fossil species of *Mallomonas* from an Eocene Maar Lake with recessed dome structures: Early attempts at securing bristles to the cell covering? *Nova Hedwigia* 95: 517–529.
- SIVER, P.A., AND A.P. WOLFE. 2010. A whole-cell reconstruction of *Mallomonas porifera* Siver & Wolfe from the Eocene: Implications for the evolution of Chrysophyte cell architecture. 117–126.
- SIVER, P.A., A.M. LOTT, AND A.P. WOLFE. 2013a. A summary of Synura taxa in early Cenozoic deposits from Northern Canada. *Nova Hedwigia* 181–190.
- SIVER, P.A., A.M. LOTT, AND A.P. WOLFE. 2013b. *Nova Hedwigia*, Beiheft 142, 181–190 Stuttgart, September 2013 Article. 181–190.

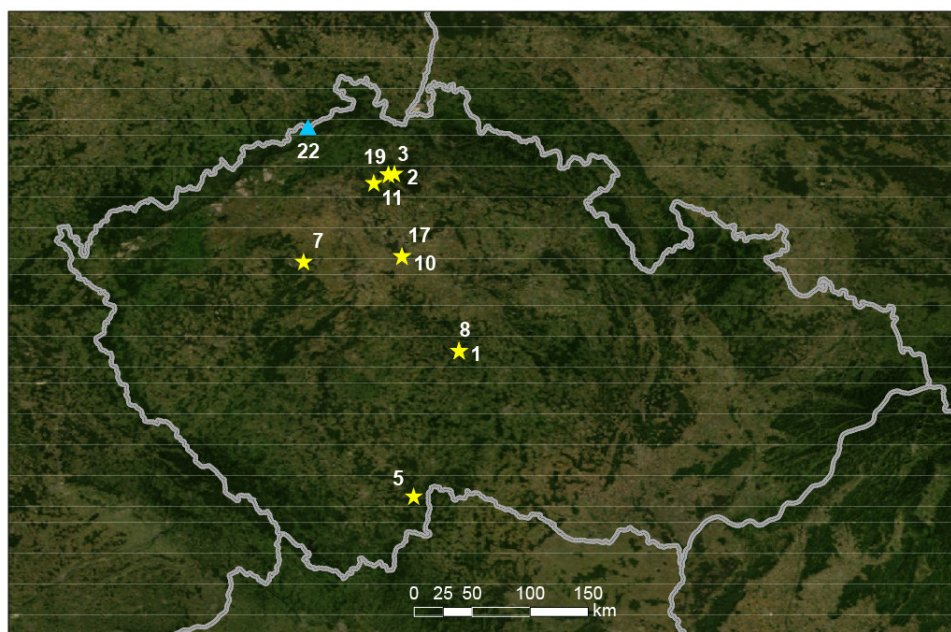
- SIVER, P.A., A.M. LOTT, AND A.P. WOLFE. 2009. Taxonomic significance of asymmetrical helmet and lance bristles in the genus *Mallomonas* (Synurophyceae) and their discovery in Eocene lake sediments. *European Journal of Phycology* 44: 447–460.
- SIVER, P.A., B.Y. JO, J.I. KIM, W. SHIN, A.M. LOTT, AND A.P. WOLFE. 2015. Assessing the evolutionary history of the class Synurophyceae (Heterokonta) using molecular, morphometric, and paleobiological approaches. *American Journal of Botany* 102: 921–41.
- SIVER, P.A., A.P. WOLFE, F.J. ROHLF, W. SHIN, AND B.Y. JO. 2013b. Combining geometric morphometrics, molecular phylogeny, and micropaleontology to assess evolutionary patterns in *Mallomonas* (Synurophyceae: Heterokontophyta). *Geobiology* 11: 127–38.
- DE STEFANO, L., I. REA, I. RENDINA, M. DE STEFANO, AND L. MORETTI. 2007. Lensless light focusing with the centric marine diatom *Coscinodiscus walesii*. *Optics Express* 15: 18082.
- ŠKALOUD, P., J. KRISTIANSEN, AND M. ŠKALOUDOŤ. 2013. Developments in the taxonomy of silica-scaled chrysophytes - From morphological and ultrastructural to molecular approaches. *Nordic Journal of Botany* 31: 385–402.
- TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI, AND S. KUMAR. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–9.
- THAMATRAKOLN, K., A.J. ALVERSON, AND M. HILDEBRAND. 2006. Comparative sequence analysis of diatom silicon transporters: Toward a mechanistic model of silicon transport. *Journal of Phycology* 42: 822–834.
- THÜS, H., L. MUGGIA, S. PÉREZ-ORTEGA, S.E. FAVERO-LONGO, S. JONESON, H. O'BRIEN, M.P. NELSEN, ET AL. 2011. Revisiting photobiont diversity in the lichen family Verrucariaceae (Ascomycota). *European Journal of Phycology* 46: 399–415.
- VAN TOL, H.M., A.J. IRWIN, AND Z. V. FINKEL. 2012. Macroevolutionary trends in silicoflagellate skeletal morphology: the costs and benefits of silicification. *Paleobiology* 38: 391–402.
- VOGEL, S. 2003. Comparative biomechanics: life's physical world. Princeton University Press, Princeton.
- WOLFE, A.P., M.B. EDLUND, A.R. SWEET, AND S.D. CREIGHTON. 2006. A First Account of Organelle Preservation in Eocene Nonmarine Diatoms: Observations and Paleobiological Implications. *Palaios* 21: 298–304.
- WUJEK, D.E., AND J. KRISTIANSEN. 1978. Observations on bristle-production and scale-production in *Mallomonas caudata* (Chrysophyceae). *Archiv Fur Protistenkunde* 120: 213–221.
- WUJEK, D.E., AND P. TIMPANO. 1984. The Genus *Mallomonopsis* in the United States. *Transactions of the Kansas Academy of Science* 87: 73–82.

- YANG, E.C., G.H. BOO, AND H.J. KIM. 2012. Supermatrix Data Highlight the Phylogenetic Relationships of Photosynthetic Stramenopiles. 163: 217–231.
- ZEEB, B.A., AND J.P. SMOL. 2001. Chrysophyte scales and cysts. *In* J. P. Smol, H. J. B. Birks, and W. M. Last [eds.], *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. Volume 3: Terrestrial, Algal, and Siliceous Indicators*, 204–222. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- ZHANG, Z., S. SCHWARTZ, L. WAGNER, AND W. MILLER. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 7: 203–14.
- ZWICKL, D.J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

7. Přílohy



Obr. 37. Lokality izolátů rodu *Mallomonas* zahrnutých ve fylgenetických analýzách převzatých z databáze GenBank (červeně), sbírky řas CAUP a získaných v rámci diplomové práce (žlutě); konkrétní izoláty viz tab. 11, 12



Obr. 38. Česká republika, detail lokalit izolátů rodu *Mallomonas* zahrnutých ve fylgenetických analýzách převzatých ze sbírky řas CAUP (modře) a získaných v rámci diplomové práce (žlutě); konkrétní izoláty viz tab. 11

Tab. 10. Seznam získaných izolátů a sekvencí (sekvence druhu *M. kalinae* byla získána ze sbírkového kmene)

číslo izolátu v mapě	druh	název izolátu	lokalita	teplota	pH	konduktivita	sekvence zahrnuté do fylogenetických analýz
1	<i>M. acaroides</i>	562	ČR, blízko Zahájí, řeka Sázava	NA	NA	NA	SSU, rbcL
2	<i>M. adamas</i>	402	ČR, Doksy, Břehyňský rybník	NA	NA	NA	SSU, LSU, rbcL
3	<i>M. adamas</i>	863	ČR, Doksy, Máchovo jezero	4.8	7.5	428	rbcL
4	<i>M. caudata</i>	401	Velká Británie, Skotsko, Loch Mullardoch	10	6.5	29	SSU, LSU, rbcL
5	<i>M. caudata</i>	473	ČR, Majdalena, slepé rameno Lužnice	7,4	7,2	210	LSU
6	<i>M. crassisquama</i>	498	Nizozemí, Amsterdam, kanál, Oosteinderweg	3.3	7.9	850	LSU, rbcL
7	<i>M. cratis</i>	166	ČR, Srby, Turyňský rybník	NA	NA	NA	SSU, LSU, rbcL
8	<i>M. elongata</i>	560	ČR, blízko Zahájí, řeka Sázava	NA	NA	NA	LSU, rbcL
9	<i>M. intermedia</i>	495	Nizozemí, Amsterdam, kanál, Oosteinderweg	3.3	7.9	850	SSU, LSU, rbcL
10	<i>M. intermedia</i>	842	ČR, Čelákovice, Hrbáčkovy tůně	3.7	6.98	453	SSU, LSU, rbcL
11	<i>M. ouradion</i>	888	ČR, Doksy, Máchovo jezero	4.8	7.5	428	LSU
12	<i>M. oviformis</i>	840	Nizozemí, Amsterdam, Aalsmeer	7.1	7.8	943	SSU, LSU
13	<i>M. paludosa</i>	373	Velká Británie, Skotsko, Loch Buidhe	11	4.1	57	SSU, LSU, rbcL
14	<i>M. papillosa</i>	790	Švédsko, Riksgränsen, Vassijaure	11	6.9	24	SSU, rbcL
15	<i>M. pumilio</i>	866	Francie, Vogézy, Lac de la Ténine	16	6.9	35	SSU, LSU, rbcL
16	<i>M. rasilis</i>	VN 841	Vietnam, Khánh Hoà, Ninh Hòa	30.2	5.2	49	SSU, rbcL
17	<i>M. striata</i> var. <i>serrata</i>	844	ČR, Čelákovice, Hrbáčkovy tůně	7.3	4.3	452	SSU, LSU, rbcL
18	<i>M. tolerans</i>	497	Nizozemí, Amsterdam, kanál, Oosteinderweg	3.3	7.9	850	SSU, LSU
19	<i>M. tonsurata</i>	894	ČR, Nedamov, Černý rybník	4.8	7.5	428	LSU, rbcL
20	<i>M. tonsurata</i>	504	Nizozemí, Amsterdam, kanál, Molenpoel	3.4	7.9	946	SSU, LSU, rbcL
21	<i>M. VN 802</i>	550	Vietnam, Khánh Hoà, Ninh Hòa	30.2	5.2	49	SSU, LSU, rbcL
22	<i>M. kalinae</i>	CAUP B601	ČR, Ostrov, blízko města Tichá	16	5.5	56	LSU

Tab. 11. Seznam izolátů a sekvencích dostupných v odborné literatuře a databázi GenBank použitých ve fylogenetických a morfologických analýzách

číslo izolátu v mapě	druh	název izolátu	lokality	číslo sekvence SSU rDNA oblasti (GenBank)	číslo sekvence LSU rDNA oblasti (GenBank)	číslo sekvence rbcL oblasti (GenBank)
22	<i>M. kalinae</i>	CAUP B601	ČR, Ostrov, blízko města Tichá	HF549061	-	HF549073
23	<i>M. acaroides</i>	SYJMAc	Jižní Korea, Daegu, Sinyongji	JX946333	JX946341	JX946349
24	<i>M. adamas</i>	CCMP1783	Austrálie, Mount Macedon	JQ281515	JQ281508	JQ281502
25	<i>M. akrokomos</i>	Posan012608J	Jižní Korea, Jeonnam, Jindo, Posanji	GU935625	GU935647	GU935667
26	<i>M. akrokomos</i>	CCMP3044	Rakousko, Ödensee	JQ281520	JQ281509	JQ281503
27	<i>M. annulata</i>	Ilwang022407C	Jižní Korea, Gyeonggi-do, Suwon, Ilwang	GU935626	GU935648	GU935668
28	<i>M. areolata</i>	Hongseong120107D	Jižní Korea, Chungnam, Cheongyang, Hongseong	GU935619	GU935641	GU935661
29	<i>M. asmundiae</i>	CCMP 1658	USA, IL, McHenry County	M87333	AF409122	AF015585
30	<i>M. bangladeshica</i>	Hoesan061007G	Jižní Korea, Jeonnam, Muan, Hoesan	GU935630	GU935652	GU935672
31	<i>M. bronchartiana</i>	DCRMBR5	Jižní Korea, Jeju, Bukjeju, Gujwa	JQ955670	JQ955675	JQ955665
32	<i>M. caudata</i>	Dangje060207A	Jižní Korea, Jeonbuk, Gimje, Dangje	GU935629	GU935651	GU935671
33	<i>M. caudata</i>	Bangjukgol062310A	Jižní Korea, Chungnam, Munui, Bangjukgol	JN991176	JN991185	JN991167
34	<i>M. corymbosa</i>	GungnamI072807I	Jižní Korea, Chungnam, Buyeo, Gungnamji	GU935620	GU935642	GU935662
35	<i>M. cratis</i>	Hoje060207B	Jižní Korea, Jeonbuk, Gimje, Hoje	GU935623	GU935645	GU935665
36	<i>M. elevata</i>	JJMCGRMSP	Jižní Korea, Jeju Island, Micheongul	JX946339	JX946347	JX946355

číslo izolátu v mapě	druh	název izolátu	lokalita	číslo sekvence SSU rDNA oblasti (GenBank)	číslo sekvence LSU rDNA oblasti (GenBank)	číslo sekvence rbcL oblasti (GenBank)
37	<i>M. elongata</i>	Mokji112407C	Jižní Korea, Gyeonggi-do, Changnyeong, Mokji	GU935621	GU935643	GU935663
38	<i>M. heterospina</i>	Posan012608A	Jižní Korea, Jeonanam, Jindo, Posanji	GU935617	GU935639	GU935659
39	<i>M. heterospina</i>	Mulryang041710A	Jižní Korea, Gyeonbuk, Sangju, Mulryangji	JN991179	JN991188	JN991170
40	<i>M. hexareticulata</i>	Mudong072410D	Jižní Korea, Gyeonbuk, Mungyeong, Mudong	JN991182	JN991191	JN991173
41	<i>M. insignis</i>	CCMP2549	USA, Maine, West Harbor	EF165118	-	EF165198
42	<i>M. insignis</i>	Beopsu033107D	Jižní Korea, Gyeongnam, Haman, Beopsu	GU935634	GU935656	GU935676
43	<i>M. lacuna</i>	CCMP2880	Rakousko, Prebersee	JN991177	JN991186	JN991168
44	<i>M. mangofera</i> f. <i>foveata</i>	Hoesan061007I	Jižní Korea, Jeonanam, Muan, Hoesan	GU935633	GU935635	GU935675
45	<i>M. mangofera</i> f. <i>foveata</i>	DMJMMAFO	Jižní Korea, Jeju Island, Dumoji	JX946338	JX946346	JX946354
46	<i>M. matvienkoeae</i>	Muryeong112807B	Jižní Korea, Jeonanam, Yeonggwang, Mureng	GU935628	GU935650	GU935670
47	<i>M. oviformis</i>	Wolpo112807H	Jižní Korea, Gyeongnam, Changnyeong, Wolpo	GU935631	GU935653	GU935673
48	<i>M. punctifera</i>	Igyo111107B	Jižní Korea, Jeonbuk, Jeongeup, Igyo	GU935632	GU935653	GU935673
49	<i>M. papillosa</i>	DMJMpa2	Jižní Korea, Jeju Island, Dumoji	JX946337	JX946345	JX946353
50	<i>M. peronoides</i>	Pihyangjeong092609A	Jižní Korea, Jeonbuk, Jeongeup, Pihyanjeong	JN991180	JN991189	JN991171
51	<i>M. portae-ferreae</i>	Dangha110407B	Jižní Korea, Chungnam, Taean, Dangha	GU935618	GU935640	GU935660
52	<i>M. pseudocratis</i>	Seungeon120107F	Jižní Korea, Chungnam, Taean, Seungeon	GU935624	GU935646	GU935666

číslo izolátu v mapě	druh	název izolátu	lokalita	číslo sekvence SSU rDNA oblasti (GenBank)	číslo sekvence LSU rDNA oblasti (GenBank)	číslo sekvence rbcL oblasti (GenBank)
53	<i>M. pseudomatvienkoae</i>	Gungnam052507A	Jižní Korea, Chungnam, Buyeo, Gungnamji	GU935627	GU935649	GU935669
54	<i>M. punctifera</i>	Igyo111107B	Jižní Korea, Jeonbuk, Jeongeup, Igyo	GU935632	GU935654	GU935674
55	<i>M. punctifera</i>	PLJMpu	Jižní Korea, Kyungbuk, Kyungsan, Punglakji	JX946340	JX946348	JX946356
56	<i>M. sorohexareticulata</i>	Gungnam092709	Jižní Korea, Chungnam, Buyeo, Gungnamji	JN991183	JN991192	JN991174
57	<i>M. splendens</i>	CCMP1782	Austrálie, Melbourn	JQ955668	JQ955673	JQ955663
58	<i>M. splendens</i>	SDCMsp8	Jižní Korea, Jeju, Bukjeju, Gujwa	JQ955669	JQ955674	JQ955664
59	<i>M. striata</i> var. <i>serrata</i>	Hwadong103108B	Jižní Korea, Gyeongnam, Gimhae, Hwadongji	GU935622	GU935644	GU935664

Tab. 12. Seznam druhů linie Chrysophyceae a jejich sekvencí dostupných v databázi GenBank, použitých pro fylogenetické analýzy (druhy značené hvězdičkou byly použity jako outgroup)

druhy linie Chrysophyceaea	název izolátu	číslo sekvence SSU rDNA oblasti (GenBank)	číslo sekvence LSU rDNA oblasti (GenBank)	číslo sekvence rbcL oblasti (GenBank)
<i>Clathromonas butcheri</i>	MD03	JQ967291	-	-
<i>Dinobryon cylindricum</i>	CCMP2766	EF165140	-	EF165157
<i>Epipyxis aureus</i>	CCMP385	AF123301	-	EF165155
<i>Hydrurus foetidus</i>	-	FM955256	FM955257	-
<i>Chromulina nebulosa</i>	AF123285	AF123285	-	-
<i>Chrysocapsa paludosa</i>	CCMP380	EF165145	-	EF165149
<i>Chrysosphaerella brevispina</i>	S74.D5	HF549059	-	-
<i>Chrysosphaerella longispina</i>	S 61A.B4	HG315743	-	HF549072
<i>Chrysosphaerella rotundata</i>	S89.C4	HG315742	-	HG315743
<i>Lagynion scherffelii</i>	CCMP465	AF123288	-	EF165162
<i>Nannochloropsis limentica</i> *	AS3-9	DQ977726	-	DQ977741
<i>Ochromonas marina</i>	AC22	EF165138	-	EF165203
<i>Paraphysomonas aff. imperforata</i>	CCAP93513	JQ967324	-	-
<i>Paraphysomonas vulgaris brevispina</i>	JMS-2012	JQ967311	-	-
<i>Synchroma grande</i> *	CCMP2876	DQ788730	-	DQ788731
<i>Synura americana</i>	Johae010508F	JX455151	JX455155	JX455147
<i>Synura conopea</i>	Gonggeomji4031909C	KM590555	KM590621	KM590842
<i>Synura curtispina</i>	Gaekmang111107A	KM590559	KM590625	KM590846
<i>Synura echinulata</i>	CCMP853	KM590563	KM590629	KM590850
<i>Synura glabra</i>	Dohak111107C	JX455149	JX455153	JX455145
<i>Synura macracantha</i>	S90B5	HF549064	KM590648	HF549075
<i>Synura mammillosa</i>	Santaek072410C	KM590583	KM590649	KM590870
<i>Synura mollispina</i>	S71C10	HF549067	KM590655	HF549077
<i>Synura multidentata</i>	S90C11	HF549068	KM590656	HF549078
<i>Synura petersenii</i>	Youngji101407A	JX455150	JX455154	JX455146
<i>Synura spinosa</i>	Igyo111107A	JX455148	JX455152	JX455144
<i>Synura splendida</i>	S90E6	KM590603	KM590674	KM590890
<i>Synura truttae</i>	Hanjeong080611J	KM590609	KM590680	KM590896
<i>Synura uvella</i>	CCMP870	KM590615	KM590686	AF015586
<i>Tessellaria lapponica</i>	S59C4	HF549063	KM590690	HF549074
<i>Tessellaria volvocina</i>	CCMP1782	EF165119	KM590691	EF165199



2 μm

M. acaroides



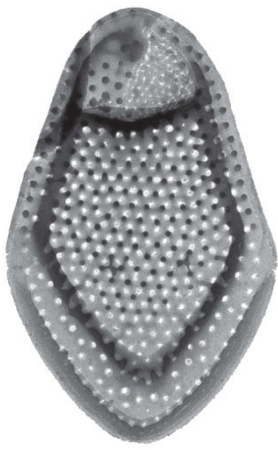
2 μm

M. adamas



2 μm

M. akrokomos



2 μm

M. annulata



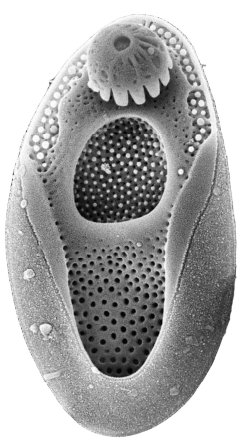
2 μm

M. areolata



2 μm

M. asmundiae



2 μm

M. bangladeshica



2 μm

M. bronchartiana



2 μm

M. caudata



2 μm

M. corymbosa



2 μm

M. crassisquama



2 μm

M. cratis



2 μm

M. elevata



2 μm

M. elongata



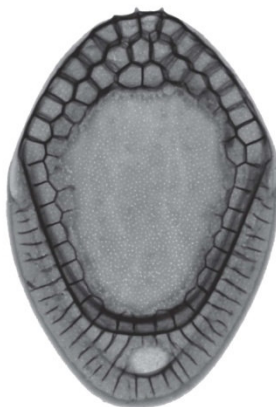
2 μm

M. heterospina



2 μm

M. hexareticulata



2 μm

M. insignis



2 μm

M. intermedia



2 μm

M. kalinae



2 μm

M. lacuna



1 μm

M. mangofera f. *foveata*



2 μm

M. matvienkoae



2 μm

M. ouradion



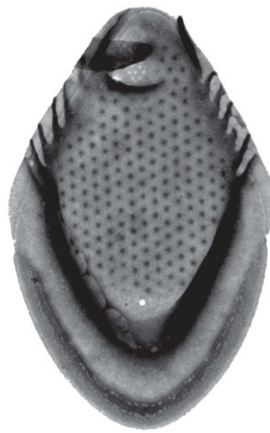
2 μm

M. oviformis



2 μm

M. paludosa



1 μm

M. papillosa



2 μm

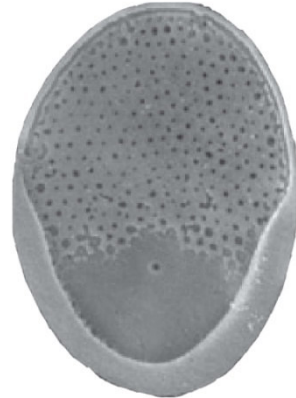
M. peronoides



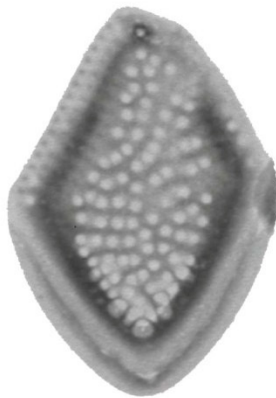
M. portae-ferreae



M. pseudocratis



M. pseudomatvienkoae



M. pumilio



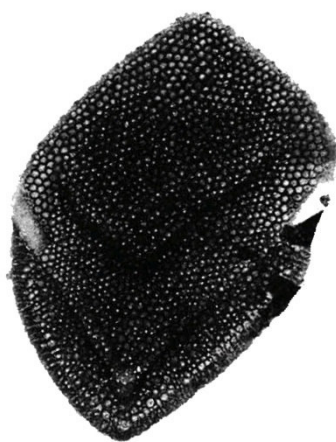
M. punctifera



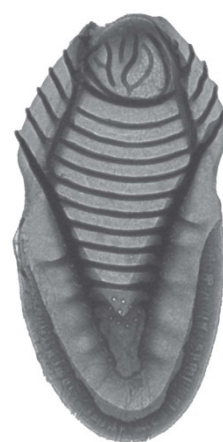
M. rasilis



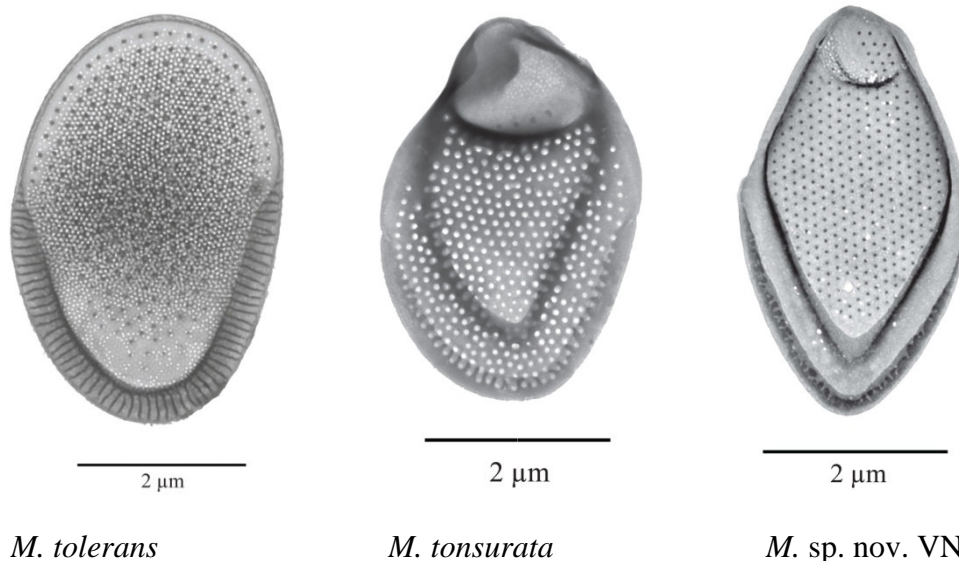
M. sorohexareticulata



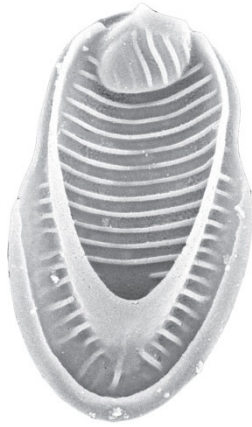
M. splendens



M. striata var. *serrata*



Obr. 39. Mikrofotografie křemičitých šupin recentních druhů, které byly zařazeny do morfoložických analýz (vlastní fotografie; www.chrysophytes.eu; Dürschmidt, 1983; Wujek & Timpano 1984; Croome et al., 1985; Jo et al., 2011, 2013; Kim et al., 2014; Siver et al., 2015)



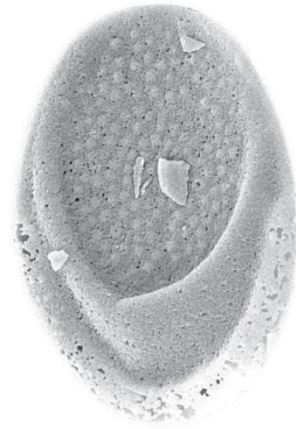
2 µm

M. asmundiae, fosilní



2 µm

M. bangladeshica, fosilní



2 µm

M. convalis



2 µm

M. giraffensis



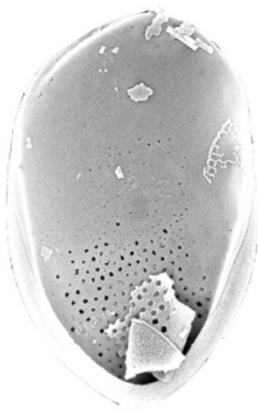
2 µm

M. GP 1



2 µm

M. GP 8



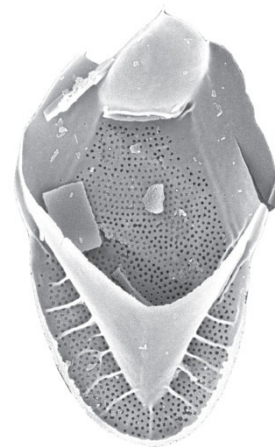
2 µm

M. GP 9



2 µm

M. GP 13



2 µm

M. GP 17



2 μm

M. GP 18



2 μm

M. GP 19



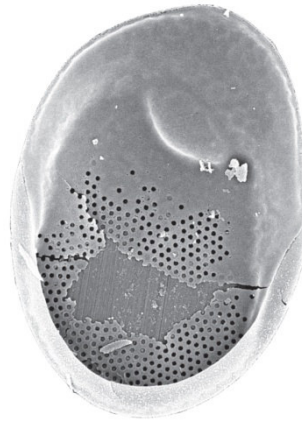
2 μm

M. insignis, fosilní



2 μm

M. lancea



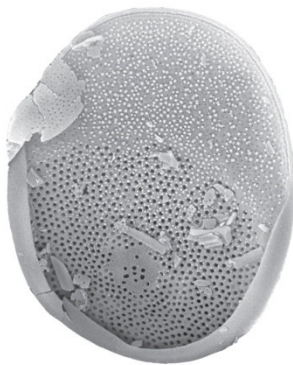
2 μm

M. media



2 μm

M. peronoides



2 μm

M. pleuriformen



2 μm

M. porifera



2 μm

M. preisigii



2 μm

M. pseudocaudata

Obr. 40. Mikrofotografie křemičitých šupin fosilních druhů, které byly zařazeny do morfologických analýz (Giraffe Pipe databáze)

Tab. 13. Kvalitativní znaky křemičitých schránkek recentních zástupců rodu *Mallomonas* a jejich hodnoty pro jednotlivé druhy

druh	anteriorní submarginální žebro	centrální vyvýšenina	dóm	dóm s papilami	dóm s prohlubněmi	dóm s žebry	okénko
<i>M. acaroides</i>	1	0	1	0	1	0	0
<i>M. adamas</i>	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. akrokomos</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. annulata</i>	1	0	1	1	1	0	0
<i>M. areolata</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>M. asmundiae</i>	1	0	1	0	0	1	0
<i>M. bangladeshica</i>	0	1	0	0	0	0	0
<i>M. bronchartiana</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. caudata</i>	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. corymbosa</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>M. crassisquama</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>M. cratis</i>	0	0	1	0	0	1	1
<i>M. elevata</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. elongata</i>	1	0	1	0	1	0	0
<i>M. heterospina</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>M. hexareticulata</i>	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. insignis</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>M. intermedia</i>	1	0	1	0	1	1	0
<i>M. kalinae</i>	1	0	1	1	1	0	1
<i>M. lacuna</i>	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. mangofera</i> f. <i>foveata</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>M. matvienkoae</i>	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. ouradion</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. oviformis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. paludosa</i>	1	0	1	0	1	1	0
<i>M. papillosa</i>	1	0	1	1	0	0	1
<i>M. peronoides</i>	0	1	0	0	0	0	0
<i>M. portae-ferreae</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>M. pseudocratis</i>	0	0	1	0	0	1	1
<i>M. pseudomatvienkoae</i>	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. pumilio</i> var. <i>dispersa</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>M. punctifera</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. rasilis</i>	0	0	1	1	1	0	1
<i>M. sorohexareticulata</i>	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. sp. nov.</i> VN 802	1	0	1	1	1	0	1
<i>M. splendens</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. striata</i> var. <i>serrata</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>M. tolerans</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. tonsurata</i>	1	0	1	0	1	0	0

druh	ostny po celé buňce	ostny pouze na okraji buňky	papily na anteriorním okraji	papily na štítu	póry na štítu	posteriovní okraj překryt až k V-žeburu	posteriovní okraj s póry	posteriovní okraj s trámci z V-žebra
<i>M. acaroides</i>	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>M. adamas</i>	0	0	0	1	0	1	0	0
<i>M. akrokomos</i>	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. annulata</i>	0	1	1	1	1	0	1	0
<i>M. areolata</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>M. asmundiae</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. bangladeshica</i>	1	0	1	1	1	0	1	0
<i>M. bronchartiana</i>	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>M. caudata</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>M. corymbosa</i>	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. crassisquama</i>	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>M. cratis</i>	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>M. elevata</i>	0	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. elongata</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>M. heterospina</i>	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>M. hexareticulata</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>M. insignis</i>	0	0	0	1	1	0	1	1
<i>M. intermedia</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>M. kalinae</i>	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>M. lacuna</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>M. mangofera f. foveata</i>	0	1	1	1	1	0	0	0
<i>M. matvienkoae</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>M. ouradion</i>	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>M. oviformis</i>	1	0	0	1	1	0	1	0
<i>M. paludosa</i>	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>M. papillosa</i>	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>M. peronoides</i>	1	0	0	1	1	0	1	0
<i>M. portae-ferreae</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>M. pseudocratis</i>	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>M. pseudomatvienkoae</i>	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. pumilio</i> var. <i>dispersa</i>	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>M. punctifera</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>M. rasilis</i>	1	0	1	1	0	0	0	0
<i>M. sorohexareticulata</i>	1	0	0	1	1	0	1	0
<i>M. sp. nov. VN 802</i>	1	0	0	1	1	0	1	0
<i>M. splendens</i>	0	1	0	1	0	1	1	1
<i>M. striata</i> var. <i>serrata</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. tolerans</i>	1	0	0	1	1	0	1	0
<i>M. tonsurata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0

druh	posteriorní okraj se sít'kou	posteriorní submarginální žebro	sekundární sít' na štítu	sekundární struktury na štítu	trámce z dómu	trámce z V-žebra na štítu	V-žebro
<i>M. acaroides</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>M. adamas</i>	1	0	1	1	0	0	1
<i>M. akrokomos</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. annulata</i>	0	0	1	0	1	1	1
<i>M. areolata</i>	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. asmundiae</i>	0	0	0	1	1	1	1
<i>M. bangladeshica</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. bronchartiana</i>	1	0	1	1	0	0	1
<i>M. caudata</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. corymbosa</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>M. crassisquama</i>	0	0	1	1	1	1	1
<i>M. cratis</i>	0	0	0	1	0	1	1
<i>M. elevata</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>M. elongata</i>	0	0	0	0	0	0	1
<i>M. heterospina</i>	0	1	1	1	0	0	0
<i>M. hexareticulata</i>	0	0	1	1	0	0	0
<i>M. insignis</i>	0	0	1	1	0	0	1
<i>M. intermedia</i>	0	0	1	1	0	0	1
<i>M. kalinae</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>M. lacuna</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. mangofera</i> f. <i>foveata</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>M. matvienkoae</i>	0	0	1	1	0	0	0
<i>M. ouradion</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>M. oviformis</i>	0	0	1	1	0	0	0
<i>M. paludosa</i>	0	0	0	1	0	1	1
<i>M. papillosa</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>M. peronoides</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. portae-ferreae</i>	0	0	0	1	1	0	1
<i>M. pseudocratis</i>	0	0	0	1	1	1	1
<i>M. pseudomatvienkoae</i>	0	0	1	1	0	0	0
<i>M. pumilio</i> var. <i>dispersa</i>	0	0	1	1	0	0	1
<i>M. punctifera</i>	0	0	1	1	0	1	0
<i>M. rasilis</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>M. sorohexareticulata</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. sp. nov.</i> VN 802	0	0	0	1	0	0	1
<i>M. splendens</i>	1	0	1	1	0	0	1
<i>M. striata</i> var. <i>serrata</i>	0	0	0	1	0	1	1
<i>M. tolerans</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. tonsurata</i>	0	0	0	0	1	0	1

druh	V-žebro až k okraji šupiny	zmenšené póry v ohybu V-žebra	zoubky na štítu z V-žebra	zubatý přední okraj šupiny	žebra na anteriorním okraji	žebra na štítu
<i>M. acaroides</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. adamas</i>	1	0	0	0	0	0
<i>M. akrokomos</i>	0	1	0	1	0	0
<i>M. annulata</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. areolata</i>	0	1	1	0	0	0
<i>M. asmundiae</i>	0	1	0	0	0	1
<i>M. bangladeshica</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. bronchartiana</i>	1	0	0	0	0	0
<i>M. caudata</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. corymbosa</i>	0	1	0	0	0	0
<i>M. crassisquama</i>	1	1	0	0	0	0
<i>M. cratis</i>	0	0	1	0	1	1
<i>M. elevata</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. elongata</i>	0	1	0	0	0	0
<i>M. heterospina</i>	0	0	0	1	0	0
<i>M. hexareticulata</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. insignis</i>	1	0	1	0	0	0
<i>M. intermedia</i>	0	1	1	0	0	0
<i>M. kalinae</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. lacuna</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. mangofera</i> f. <i>foveata</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. matvienkoae</i>	0	1	0	0	0	0
<i>M. ouradion</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. oviformis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. paludosa</i>	0	1	0	0	0	1
<i>M. papillosa</i>	1	0	1	0	1	0
<i>M. peronoides</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. portae-ferreae</i>	0	1	1	0	0	1
<i>M. pseudocratis</i>	0	0	0	0	1	1
<i>M. pseudomatvienkoae</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. pumilio</i> var. <i>dispersa</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. punctifera</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. rasilis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. sorohexareticulata</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. sp. nov.</i> VN 802	0	0	0	0	0	0
<i>M. splendens</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. striata</i> var. <i>serrata</i>	1	1	0	0	1	1
<i>M. tolerans</i>	0	0	0	0	0	0
<i>M. tonsurata</i>	0	0	1	0	0	1

Tab. 14. Kvantitativní znaky křemičitých schránkek recentních zástupců rodu *Mallomonas* a jejich hodnoty pro jednotlivé druhy

druh	cirkularita šupiny	délka buňky [μm]	délka ostnů [μm]	délka šupiny [μm]	plocha pórů [nm]
<i>M. acaroides</i>	0,706	25,50	23,50	6,00	2,000
<i>M. adamas</i>	0,637	20,00	0	7,50	0
<i>M. akrokomos</i>	0,391	43,00	21,50	4,15	0,348
<i>M. annulata</i>	0,715	22,50	7,50	3,50	0,441
<i>M. areolata</i>	0,818	29,75	39,00	5,50	3,000
<i>M. asmundiae</i>	0,766	20,00	20,00	8,05	0
<i>M. bangladeshica</i>	0,795	17,37	10,50	4,30	2,000
<i>M. bronchartiana</i>	0,810	52,12	7,50	8,50	0,285
<i>M. caudata</i>	0,839	51,86	55,00	7,50	1,000
<i>M. corymbosa</i>	0,788	34,00	33,50	6,25	0,362
<i>M. crassisquama</i>	0,738	24,25	23,30	5,35	2,000
<i>M. cratis</i>	0,693	25,00	11,00	4,70	2,000
<i>M. elevata</i>	0,746	16,10	8,00	3,00	0
<i>M. elongata</i>	0,636	55,50	41,00	6,20	4,000
<i>M. heterospina</i>	0,605	15,91	20,50	3,70	0,482
<i>M. hexareticulata</i>	0,756	15,34	10,00	3,50	0,537
<i>M. insignis</i>	0,725	62,50	0	7,00	0,237
<i>M. intermedia</i>	0,553	30,00	23,90	6,50	0,290
<i>M. kalinae</i>	0,734	17,50	10,50	3,70	0
<i>M. lacuna</i>	0,856	51,72	31,50	5,50	2,000
<i>M. mangofera</i> f. <i>foveata</i>	0,767	18,50	16,00	4,05	0,060
<i>M. matvienkoeae</i>	0,638	16,33	18,00	6,10	0,757
<i>M. ouradion</i>	0,770	22,00	8,00	6,00	0
<i>M. oviformis</i>	0,210	20,28	15,50	6,50	0,181
<i>M. paludosa</i>	0,586	24,00	20,50	6,50	0,402
<i>M. papillosa</i>	0,677	13,50	7,50	3,00	0
<i>M. peronoides</i>	0,684	18,59	10,50	4,30	0,858
<i>M. portae-ferreae</i>	0,801	45,00	31,35	7,40	0,788
<i>M. pseudocratis</i>	0,746	35,00	22,50	4,25	NA
<i>M. pseudomatvienkoeae</i>	0,860	20,14	7,00	4,00	NA
<i>M. pumilio</i> var. <i>dispersa</i>	0,698	9,75	4,00	2,95	NA
<i>M. punctifera</i>	0,735	37,30	30,00	5,50	21,000
<i>M. rasilis</i>	0,749	17,50	10,50	3,82	0
<i>M. soro-hexareticulata</i>	0,820	31,92	10,50	5,65	4,000
<i>M. sp. nov. VN 802</i>	0,741	24,00	11,37	4,16	0,296
<i>M. splendens</i>	0,495	34,00	23,50	6,45	NA
<i>M. striata</i> var. <i>serrata</i>	0,657	15,50	8,15	3,90	0
<i>M. tolerans</i>	0,712	31,00	10,75	5,25	0,284
<i>M. tonsurata</i>	0,692	20,50	20,50	3,90	1,000

druh	obvod šupiny [μm]	plocha dómu [μm]	plocha kápě [μm]	plocha okének [nm]	počet okének	počet pórů
<i>M. acaroides</i>	17,49	0,77	0,91	0	0	654
<i>M. adamas</i>	16,60	0	NA	162,00	1	0
<i>M. akrokomos</i>	12,70	0	0	0	0	70
<i>M. annulata</i>	7,82	0,34	0,11	0	0	244
<i>M. areolata</i>	17,20	0	0,77	0	0	344
<i>M. asmundiae</i>	16,18	1,93	1,31	0	0	0
<i>M. bangladeshica</i>	11,20	0	0	0	0	296
<i>M. bronchartiana</i>	20,18	0	2,82	0	0	518
<i>M. caudata</i>	20,02	0	0	30,00	1	905
<i>M. corymbosa</i>	10,85	0,96	0,40	0	0	505
<i>M. crassisquama</i>	14,48	1,34	0,73	0	0	360
<i>M. cratis</i>	10,82	0,65	1,00	8,00	1,5	205
<i>M. elevata</i>	8,40	0	0,01	0	0	0
<i>M. elongata</i>	17,06	2,14	0	0	0	511
<i>M. heterospina</i>	12,05	0,47	0	0	0	975
<i>M. hexareticulata</i>	12,47	0	0	19,00	1	28
<i>M. insignis</i>	20,27	0	0	235,00	1	957
<i>M. intermedia</i>	14,11	0,95	0,95	0	0	375
<i>M. kalinae</i>	9,92	0,27	0,07	3,78	1	0
<i>M. lacuna</i>	20,09	0	0	8,00	1	261
<i>M. mangofera</i> f. <i>foveata</i>	8,79	0	0,27	0,25	4	79
<i>M. matvienkoae</i>	11,93	0	0	9,00	1	890
<i>M. ouradion</i>	8,19	0	1,40	0	0	0
<i>M. oviformis</i>	37,30	0	0	0	0	810
<i>M. paludosa</i>	19,45	1,41	0,77	0	0	597
<i>M. papillosa</i>	8,27	0,23	0,06	1,00	1	0
<i>M. peronoides</i>	12,83	0	0	0	0	918
<i>M. portae-ferreae</i>	20,01	2,20	1,07	0	0	751
<i>M. pseudocratis</i>	14,08	1,15	1,26	2,00	3	NA
<i>M. pseudomatvienkoae</i>	14,41	0	0	6,00	1	NA
<i>M. pumilio</i> var. <i>dispersa</i>	8,48	0	0,10	16,00	1	NA
<i>M. punctifera</i>	14,66	0	0	0	0	1412
<i>M. rasilis</i>	10,32	0,16	0,41	0,96	1	0
<i>M. sorohexareticulata</i>	16,11	0	0	24,00	1	277
<i>M. sp nov.</i> VN 802	11,44	0,43	0,24	6,31	1	91
<i>M. splendens</i>	23,23	0	NA	0	0	NA
<i>M. striata</i> var. <i>serrata</i>	11,08	0,38	0,30	0	0	0
<i>M. tolerans</i>	14,46	0	0	0	0	1717
<i>M. tonsurata</i>	12,19	1,20	0,18	0	0	373

druh	počet pórů v ohybu V-žebra	počet žeber na anteriorním okraji	počet žeber na dómu	počet žeber na štítu	kruhovitost šupiny	silicifikace šupiny	šířka buňky [μm]
<i>M. acaroides</i>	0	0	0	0	0,654	17,175	14,00
<i>M. adamas</i>	0	0	0	0	0,645	14,000	14,00
<i>M. akrokomos</i>	73	0	0	0	0,501	5,010	9,00
<i>M. annulata</i>	0	0	0	0	0,590	3,490	8,00
<i>M. areolata</i>	20	0	0	0	0,708	19,236	13,00
<i>M. asmundiae</i>	3	0	8	15	0,560	16,000	16,00
<i>M. bangladeshica</i>	0	0	0	0	0,583	7,900	10,44
<i>M. bronchartiana</i>	0	0	0	0	0,695	26,260	15,29
<i>M. caudata</i>	0	0	0	0	0,861	26,751	23,69
<i>M. corymbosa</i>	5	0	0	0	0,773	7,382	17,00
<i>M. crassisquama</i>	7	0	0	0	0,598	12,400	13,00
<i>M. cratis</i>	0	6	5	16	0,498	6,453	14,00
<i>M. elevata</i>	0	0	0	0	0,630	4,200	5,30
<i>M. elongata</i>	10	0	0	0	0,562	14,720	13,50
<i>M. heterospina</i>	0	0	0	0	0,646	6,992	11,38
<i>M. hexareticulata</i>	0	0	0	0	0,548	9,355	9,50
<i>M. insignis</i>	0	0	0	0	0,680	23,709	21,00
<i>M. intermedia</i>	6	0	3	0	0,657	8,765	13,00
<i>M. kalinae</i>	0	0	0	0	0,512	5,742	9,50
<i>M. lacuna</i>	0	0	0	0	0,752	27,489	17,85
<i>M. mangofera</i> f. <i>foveata</i>	0	0	0	0	0,646	4,721	9,00
<i>M. matvienkoae</i>	25	0	0	0	0,626	7,227	12,24
<i>M. ouradion</i>	0	0	0	0	0,555	11,450	9,50
<i>M. oviformis</i>	0	0	0	0	0,714	23,400	18,93
<i>M. paludosa</i>	10	0	2	10	0,528	17,652	11,50
<i>M. papillosa</i>	0	6	0	0	0,619	3,681	8,50
<i>M. peronoides</i>	0	0	0	0	0,607	8,960	10,39
<i>M. portae-ferreae</i>	39	0	0	10	0,709	25,531	10,00
<i>M. pseudocratis</i>	0	6	6	12,5	0,552	11,764	12,00
<i>M. pseudomatvienkoae</i>	0	0	0	0	0,720	14,213	10,83
<i>M. pumilio</i> var. <i>dispersa</i>	0	0	0	0	0,681	4,000	3,80
<i>M. punctifera</i>	0	0	0	0	0,692	12,566	13,00
<i>M. rasilis</i>	0	0	0	0	0,554	6,343	9,50
<i>M. sorohexareticulata</i>	0	0	0	0	0,644	16,947	11,33
<i>M. sp. nov.</i> VN 802	0	0	0	0	0,548	7,719	15,00
<i>M. splendens</i>	0	0	0	0	0,703	21,279	10,50
<i>M. striata</i> var. <i>serrata</i>	11	6,5	0	12	0,524	6,419	7,50
<i>M. tolerans</i>	0	0	0	0	0,658	11,842	19,00
<i>M. tonsurata</i>	0	0	0	0	0,667	8,182	9,00

druh	šířka přehnutého okraje [μm]	šířka přehnutého okraje [%]	šířka šupiny [μm]	úhel V-žebra	vzdálenost žeber na štítu [μm]
<i>M. acaroides</i>	0,21	3,50	4,25	42	0
<i>M. adamas</i>	1,26	16,80	4,25	57	0
<i>M. akrokomos</i>	0,18	4,34	2,00	0	0
<i>M. annulata</i>	0,11	3,14	2,00	59	0
<i>M. areolata</i>	0,24	4,36	3,50	53	0
<i>M. asmundiae</i>	0,42	5,22	3,35	37	0,16
<i>M. bangladeshica</i>	0,40	9,30	2,80	0	0
<i>M. bronchartiana</i>	0,45	5,31	5,50	58	0
<i>M. caudata</i>	0,40	5,33	5,50	0	0
<i>M. corymbosa</i>	0,23	3,68	5,00	51	0
<i>M. crassisquama</i>	0,34	6,36	4,00	46	0
<i>M. cratis</i>	0,27	5,74	2,30	24	0,09
<i>M. elevata</i>	0,16	5,33	1,90	44	0
<i>M. elongata</i>	0,23	3,67	4,00	46	0
<i>M. heterospina</i>	0,17	4,59	2,90	0	0
<i>M. hexareticulata</i>	0,30	6,67	2,50	0	0
<i>M. insignis</i>	0,61	8,71	4,30	46	0
<i>M. intermedia</i>	0,36	5,55	4,65	40	0
<i>M. kalinae</i>	0,23	6,43	1,87	47	0
<i>M. lacuna</i>	0,46	6,77	4,00	0	0
<i>M. mangofera</i> f. <i>foveata</i>	0,20	4,94	2,30	41	0
<i>M. matvienkoae</i>	0,40	6,56	4,40	0	0
<i>M. ouradion</i>	0,36	6,04	3,25	38	0
<i>M. oviformis</i>	0,27	4,22	3,00	0	0
<i>M. paludosa</i>	0,35	5,35	3,50	35	0,27
<i>M. papillosa</i>	0,19	6,33	2,50	44	0
<i>M. peronoides</i>	0,35	8,14	2,80	0	0
<i>M. portae-ferreae</i>	0,44	5,95	4,30	52	0,17
<i>M. pseudocratis</i>	0,38	8,94	2,15	30	0
<i>M. pseudomatvienkoae</i>	0,42	10,50	2,50	0	0
<i>M. pumilio</i> var. <i>dispersa</i>	0,14	4,63	1,95	60	0
<i>M. punctifera</i>	0,16	2,91	4,25	0	0
<i>M. rasilis</i>	0,39	10,12	2,15	47	0
<i>M. sorohexareticulata</i>	0,34	5,96	3,00	0	0
<i>M. sp. nov.</i> VN 802	0,22	5,35	2,36	47	0
<i>M. splendens</i>	0,21	3,26	5,00	98	0
<i>M. striata</i> var. <i>serrata</i>	0,20	5,13	2,25	43	0,11
<i>M. tolerans</i>	0,55	10,46	2,20	0	0
<i>M. tonsurata</i>	0,22	5,74	3,00	53	0

Tab. 15. Kvalitativní znaky křemičitých schránkek fosilních zástupců rodu *Mallomonas* a jejich hodnoty pro jednotlivé druhy

druh	anteriorní submarginalní žebro	centrální vyvýšenina	dóm	dóm s papilami	dóm s žebry	okénko	papily na štítu šupiny	posteriovní okraj s trámci z V-žebra	posteriovní okraj se síčkou
<i>M. asmundiae</i> †	1	0	1	0	1	0	0	1	0
<i>M. bangladeshica</i> †	0	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>M. convallis</i> †	1	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>M. giraffensis</i> †	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. GP 01</i> †	1	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>M. GP 09</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. GP 13</i> †	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. GP 17</i> †	1	0	1	0	1	0	0	1	0
<i>M. GP 18</i> †	1	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>M. GP 19</i> †	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>M. insignis</i> †	0	1	0	0	0	1	1	0	0
<i>M. lancea</i> †	0	0	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. media</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. peronoides</i> †	0	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>M. pleuriformen</i> †	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>M. porifera</i> †	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. preisigii</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. pseudocaudata</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. schumachii</i> †	0	0	1	0	0	0	0	0	0

druh	posteriorní submarginalní žebro	sekundární síť na štítu šupiny	sekundární struktury na štítu šupiny	trámce z dómu	trámce z V-žebra na štítu šupiny	V-žebro	V-žebro dosahující až k okraji šupiny	žebra na anteriorním okraji	žebra na štítu šupiny
<i>M. asmundiae</i> †	0	0	1	0	1	1	0	0	1
<i>M. bangladeshica</i> †	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. convallis</i> †	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>M. giraffensis</i> †	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>M. GP 01</i> †	0	1	1	0	0	1	0	0	0
<i>M. GP 09</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. GP 13</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. GP 17</i> †	0	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>M. GP 18</i> †	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. GP 19</i> †	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. insignis</i> †	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>M. lancea</i> †	0	0	1	1	1	1	1	0	1
<i>M. media</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. peronoides</i> †	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. pleuriformen</i> †	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. porifera</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. preisigii</i> †	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>M. pseudocaudata</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. schumachii</i> †	0	1	1	0	0	0	0	0	0

Tab. 16. Kvantitativní znaky křemičitých schránkek fosilních zástupců rodu *Mallomonas* a jejich hodnoty pro jednotlivé druhy

druh	cirkularita š.	délka šupiny [μm]	obvod š. [μm]	plocha dómu [μm]	plocha okének [nm]	počet okének	počet žeber na anteriorním okraji	počet žeber na dómu
<i>M. asmundiae</i> †	0.77	5.95	16.58	1.32	0.00	0.00	0.00	6.00
<i>M. bangladeshica</i> †	0.74	4.05	12.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. convallis</i> †	0.84	5.50	0.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. giraffensis</i> †	0.79	9.50	0.37	4.97	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. GP 01</i> †	0.78	5.33	0.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. GP 09</i> †	0.00	5.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. GP 13</i> †	0.82	8.90	1.47	2.92	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. GP 17</i> †	0.70	6.57	0.38	2.36	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. GP 18</i> †	0.62	6.92	0.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. GP 19</i> †	0.81	3.97	0.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. insignis</i> †	0.85	5.80	0.67	0.00	264.10	1.00	0.00	0.00
<i>M. lancea</i> †	0.76	6.35	15.07	2.32	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. media</i> †	0.84	8.27	23.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. peronoides</i> †	0.76	5.06	13.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. pleuriformen</i> †	0.81	7.16	22.76	0.00	4.88	10.00	0.00	0.00
<i>M. porifera</i> †	0.88	5.85	19.03	0.00	56.16	1.00	0.00	0.00
<i>M. preisigii</i> †	0.78	3.91	11.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. pseudocaudata</i> †	0.78	5.90	17.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. schumachii</i> †	0.80	8.69	1.05	1.32	0.00	0.00	0.00	0.00

druh	kruhovitost šupiny	silicifikace šupiny	šířka přehnutého okraje [%]	šířka přehnutého okraje [μm]	šířka šupiny [μm]	úhel V-žebra	vzdálenost žeber na štítu šupiny [μm]
<i>M. asmundiae</i> †	0.57	16.92	6.82	0.41	3.35	22.30	0.15
<i>M. bangladeshica</i> †	0.53	9.25	12.38	0.50	2.65	0.00	0.00
<i>M. convallis</i> †	0.67	19.37	10.25	0.56	4.25	25.40	0.00
<i>M. giraffensis</i> †	0.61	61.64	7.67	0.73	5.75	55.00	0.00
<i>M. GP 01</i> †	0.65	0.42	0.05	0.00	3.06	50.40	0.00
<i>M. GP 09</i> †	0.65	13.04	6.09	0.36	3.78	0.00	0.00
<i>M. GP 13</i> †	0.83	59.95	3.04	0.27	7.19	0.00	0.00
<i>M. GP 17</i> †	0.59	24.68	2.55	0.17	4.08	57.60	0.16
<i>M. GP 18</i> †	0.49	32.02	2.80	0.19	3.87	0.00	0.00
<i>M. GP 19</i> †	0.64	7.13	8.85	0.35	2.75	0.00	0.00
<i>M. insignis</i> †	0.70	18.63	13.52	0.78	3.80	58.70	0.00
<i>M. lancea</i> †	0.57	13.71	7.37	0.47	1.00	47.60	NA
<i>M. media</i> †	0.71	37.88	7.47	0.62	5.86	0.00	0.00
<i>M. peronoides</i> †	0.58	10.99	11.30	0.57	2.95	0.00	0.00
<i>M. pleuriformen</i> †	0.80	33.47	3.81	0.27	5.93	0.00	0.00
<i>M. porifera</i> †	0.88	25.45	8.49	0.55	5.05	0.00	0.00
<i>M. preisigii</i> †	0.69	8.26	6.33	0.25	2.69	64.90	0.00
<i>M. pseudocaudata</i> †	0.67	18.58	7.31	0.43	3.98	0.00	0.00
<i>M. schumachii</i> †	0.77	38.89	4.74	0.41	6.90	0.00	0.00

Tab. 17. Výpočet Spearmanova koeficientu pro hodnocené znaky

Spearman (ρ)	V-žebro	úhel V-žebra	plocha kápě [μm]	dóm	dóm s prohlubněmi	dóm s papilami	dóm s žebry	počet žeber na dómu
V-žebro	-	-	-	-	-	-	-	-
úhel V-žebra	0.832	-	-	-	-	-	-	-
plocha kápě [μm]	0.785	0.560	-	-	-	-	-	-
dóm	0.580	0.372	0.561	-	-	-	-	-
dóm s prohlubněmi	0.387	0.336	0.205	0.562	-	-	-	-
dóm s papilami	0.271	0.326	0.061	0.393	0.518	-	-	-
dóm s žebry	0.271	-0.132	0.502	0.393	0.154	-0.147	-	-
počet žeber na dómu	0.270	-0.132	0.507	0.392	0.126	-0.147	0.997	-
plocha dómu [μm]	0.526	0.279	0.532	0.893	0.512	0.156	0.490	0.490
trámce z dómu	0.331	0.309	0.415	0.480	0.061	0.020	0.220	0.250
délka šupiny [μm]	0.048	0.012	0.222	-0.112	-0.106	-0.436	0.239	0.236
šířka šupiny [μm]	-0.005	0.071	0.097	-0.082	-0.103	-0.420	-0.007	-0.018
žebra na štítu šupiny	0.331	0.060	0.498	0.480	0.061	-0.179	0.620	0.628
počet žeber na š. š.	0.300	-0.038	0.518	0.436	-0.082	-0.163	0.711	0.724
póry na š. š.	-0.387	-0.311	-0.261	-0.075	0.011	-0.336	0.028	0.009
počet pórů	-0.426	-0.299	-0.332	-0.162	-0.078	-0.411	-0.076	-0.094
plocha pórů [nm]	-0.366	-0.253	-0.256	0.014	0.007	-0.346	-0.058	-0.065
papily na š. š.	0.073	0.187	-0.117	-0.340	0.009	0.436	-0.337	-0.336
trámce z V-žebra na š. š.	0.258	-0.033	0.412	0.440	0.133	-0.028	0.518	0.526
zmenšené póry v ohybu V-žebra	0.201	0.083	0.269	0.415	0.062	-0.240	0.271	0.261
počet pórů v ohybu V-žebra	0.149	0.064	0.214	0.362	0.034	-0.236	0.193	0.181
okénko	-0.074	-0.094	-0.203	-0.187	-0.086	0.304	-0.008	0.000
počet okének	-0.022	-0.105	-0.117	-0.152	-0.112	0.250	0.086	0.096
plocha okének [nm]	-0.138	-0.108	-0.294	-0.289	-0.152	0.160	-0.042	-0.036
zoubky na štítu z V-žebra	0.331	0.248	0.251	0.346	0.061	0.020	0.220	0.209
sekundární struktury na š. š.	-0.090	-0.213	0.022	-0.267	-0.325	0.005	0.195	0.194

Spearman (ρ)	V-žebro	úhel V-žebra	plocha kápě [μm]	dóm	dóm s prohlubněmi	dóm s papilami	dóm s žebry	počet žeber na dómu
sekundární síť na š. š.	-0.151	0.082	-0.213	-0.302	-0.156	-0.127	-0.127	-0.135
sekundární síť na š. š.	0.546	0.410	0.418	0.594	0.385	0.201	0.047	0.039
žebra na anteriorním okraji	0.239	-0.046	0.262	0.347	-0.185	0.123	0.376	0.388
počet žeber na ant. okr.	0.239	-0.043	0.259	0.346	-0.185	0.117	0.363	0.374
papily na ant. okr.	0.189	0.315	0.107	-0.189	0.061	0.220	-0.179	-0.179
zuby na předním okraji šupiny	-0.329	-0.274	-0.255	0.006	-0.127	-0.089	-0.089	-0.089
posteriorní submarginalní žebro	-0.229	-0.191	-0.178	0.166	-0.089	-0.062	-0.062	-0.062
posteriorní okr. s póry	-0.354	-0.189	-0.269	-0.017	0.101	-0.243	-0.077	-0.102
post. okr. s trámci z V-žebra	0.322	0.093	0.434	0.301	-0.073	-0.240	0.441	0.449
post. okr. se síťkou	0.204	0.436	0.291	-0.281	-0.158	-0.111	-0.111	-0.110
post. okr. překryt až k V-žeburu	0.204	0.436	0.291	-0.281	-0.158	-0.111	-0.111	-0.110
šířka přehnutého okraje [μm]	-0.167	-0.196	0.055	-0.237	-0.203	-0.245	0.174	0.181
šířka přehnutého okraje [μm].procentualne	-0.186	-0.250	-0.132	-0.196	-0.146	0.068	0.061	0.063
vzdálenost žeber na š. š. [μm]	0.300	-0.017	0.510	0.436	-0.043	-0.163	0.673	0.678
centralní vyvýšenina	-0.204	-0.174	-0.317	-0.281	-0.158	-0.111	-0.111	-0.110
silicifikace šupiny	-0.159	-0.107	0.019	-0.201	-0.157	-0.463	0.048	0.047
obvod š. [μm]	-0.188	-0.094	-0.099	-0.182	-0.119	-0.463	0.061	0.057
cirkularita š.	-0.082	-0.049	0.127	-0.153	-0.260	-0.014	-0.167	-0.143
kruhovitost š.	-0.198	0.084	-0.189	-0.328	-0.297	-0.348	-0.341	-0.341
V-žebro dosahující až k okr. š.	0.302	0.302	0.138	0.011	-0.234	0.049	-0.164	-0.163
ostny jen na okr. buňky	0.225	0.391	0.114	-0.114	0.023	-0.005	-0.195	-0.194
ostny po celé buňce	-0.322	-0.552	-0.037	0.269	0.073	0.070	0.240	0.240
délka ostnů [μm]	-0.073	-0.126	0.082	0.317	0.127	-0.280	0.177	0.174
délka křemičité schránky [μm]	0.015	0.040	0.076	-0.032	0.022	-0.269	0.095	0.092
bunka.sirka	-0.165	-0.204	-0.038	-0.048	-0.089	-0.266	0.188	0.195

Spearman (ρ)	plocha dómu [μm]	trámce z dómu	délka šupiny [μm]	šířka šupiny [μm]	žebra na štítu šupiny	počet žeber na š. š.	póry na š. š.	počet pórů
trámce z dómu	0.614	-	-	-	-	-	-	-
délka šupiny [μm]	0.073	0.065	-	-	-	-	-	-
šířka šupiny [μm]	0.055	0.056	0.828	-	-	-	-	-
žebra na štítu šupiny	0.607	0.478	0.101	-0.086	-	-	-	-
počet žeber na š. š.	0.541	0.355	0.164	-0.109	0.908	-	-	-
póry na š. š.	0.024	0.098	0.111	0.192	-0.061	-0.112	-	-
počet pórů	-0.020	-0.011	0.394	0.520	-0.106	-0.152	0.732	-
plocha pórů [nm]	0.077	0.076	0.113	0.338	-0.026	-0.089	0.733	0.516
papily na š. š.	-0.435	-0.276	-0.076	-0.223	-0.411	-0.373	-0.378	-0.234
trámce z V-žebra na š. š.	0.483	0.378	0.024	-0.084	0.537	0.624	0.011	-0.027
zmenšené póry v ohybu V-žebra	0.479	0.301	0.332	0.291	0.301	0.339	0.073	0.031
počet pórů v ohybu V-žebra	0.410	0.243	0.292	0.252	0.292	0.323	0.099	0.047
okénko	-0.262	-0.254	-0.218	-0.213	-0.118	-0.044	-0.038	-0.289
počet okének	-0.215	-0.205	-0.226	-0.254	-0.034	0.050	0.000	-0.294
plocha okének [nm]	-0.326	-0.273	-0.080	-0.076	-0.143	-0.075	0.018	-0.190
zoubky na štítu z V-žebra	0.246	0.129	0.077	0.172	0.304	0.175	0.098	0.068
sekundární struktury na š. š.	-0.197	-0.259	-0.096	-0.271	0.072	0.216	-0.278	-0.163
sekundární síť na š. š.	-0.264	-0.071	0.093	0.271	-0.350	-0.318	0.156	0.303
sekundární síť na š. š.	0.552	0.299	-0.194	-0.064	0.165	0.087	-0.141	-0.161
žebra na anteriorním okraji	0.253	0.062	-0.263	-0.304	0.503	0.586	-0.216	-0.325
počet žeber na ant. okr.	0.252	0.056	-0.264	-0.305	0.508	0.590	-0.226	-0.327
papily na ant. okr.	-0.246	-0.045	-0.336	-0.345	-0.219	-0.199	-0.061	-0.249
zuby na předním okraji šupiny	-0.011	-0.109	-0.217	-0.181	-0.109	-0.099	0.127	0.086
posteriorní submarginalní žebro	0.126	-0.076	-0.202	-0.029	-0.076	-0.069	0.089	0.256
posteriorní okr. s póry	0.048	0.022	0.353	0.487	-0.122	-0.189	0.690	0.749
post. okr. s trámci z V-žebra	0.369	0.152	0.238	0.180	0.449	0.536	-0.062	0.124

Spearman (ρ)	plocha dómu [μm]	trámce z dómu	délka šupiny [μm]	šířka šupiny [μm]	žebra na štítu šupiny	počet žeber na š. š.	póry na š. š.	počet pórů
post. okr. se sítčkou	-0.251	-0.135	0.389	0.385	-0.135	-0.123	-0.299	-0.092
post. okr. překryt až k V-žeburu	-0.251	-0.135	0.389	0.385	-0.135	-0.123	-0.299	-0.092
šířka přehnutého okraje [μm]	-0.111	0.024	0.595	0.403	0.095	0.141	0.049	0.175
šířka přehnutého okraje [μm].procentualne	-0.170	-0.077	-0.072	-0.152	0.036	0.032	-0.111	-0.142
vzdálenost žeber na š. š. [μm]	0.557	0.350	0.200	-0.063	0.908	0.985	-0.103	-0.108
centralní vyvýšenina	-0.251	-0.135	0.060	0.047	-0.135	-0.123	0.158	0.264
silicifikace šupiny	-0.060	-0.012	0.780	0.705	0.065	0.075	0.238	0.481
obvod š. [μm]	-0.042	-0.053	0.749	0.667	0.047	0.055	0.281	0.555
cirkularita š.	-0.188	0.175	0.046	0.071	-0.074	-0.032	0.105	-0.130
kruhovitost š.	-0.294	0.042	0.364	0.561	-0.297	-0.377	0.292	0.571
V-žebro dosahující až k okr. š.	-0.021	-0.014	0.136	0.196	-0.014	0.010	-0.272	-0.147
ostny jen na okr. buňky	-0.086	0.259	-0.116	-0.040	-0.072	-0.216	-0.023	-0.146
ostny po celé buňce	0.226	-0.152	0.046	0.008	0.145	0.266	0.062	0.130
délka ostnů [μm]	0.384	0.244	0.361	0.452	0.137	0.104	0.347	0.418
délka křemičité schránky [μm]	0.093	0.154	0.629	0.535	0.018	0.032	0.403	0.470
bunka.sirka	0.033	-0.021	0.723	0.598	-0.083	0.015	0.328	0.513

Spearman (ρ)	plocha pórů [nm]	papily na š. š.	trámce z V-žebra na š. š.	zmenšené póry v ohybu V-žebra	počet pórů.v.ohyb u.V.zebra	okénko	počet okének	plocha okének [nm]
papily na š. š.	-0.489	-	-	-	-	-	-	-
trámce z V-žebra na š. š.	0.163	-0.359	-	-	-	-	-	-
zmenšené póry v ohybu V-žebra	0.095	-0.551	0.198	-	-	-	-	-
počet pórů.v.ohybu.V.zebra	0.124	-0.541	0.150	0.982	-	-	-	-
okénko	-0.124	0.108	-0.209	-0.407	-0.382	-	-	-
počet okének	-0.114	0.090	-0.130	-0.407	-0.384	0.979	-	-
plocha okének [nm]	-0.058	0.072	-0.227	-0.380	-0.356	0.956	0.908	-
zoubky na štítu z V-žebra	0.093	-0.142	-0.098	0.152	0.172	0.017	0.034	0.030
sekundární struktury na š. š.	-0.451	0.319	-0.023	-0.105	-0.085	0.166	0.181	0.123
sekundární síť na š. š.	0.003	-0.011	-0.029	-0.113	-0.123	0.028	-0.022	0.128
sekundární síť na š. š.	-0.081	-0.223	0.263	0.352	0.299	-0.378	-0.362	-0.441
žebra na anteriorním okraji	-0.163	-0.127	0.417	-0.024	-0.014	0.234	0.319	0.139
počet žeber na ant. okr.	-0.170	-0.131	0.421	-0.010	0.001	0.220	0.303	0.128
papily na ant. okr.	-0.219	0.397	-0.098	-0.293	-0.288	0.017	0.048	-0.060
zuby na předním okraji šupiny	0.000	-0.204	-0.127	0.113	0.176	-0.194	-0.190	-0.185
posteriorní submarginalní žebro	0.034	-0.143	-0.089	-0.102	-0.100	-0.135	-0.132	-0.129
posteriorní okr. s póry	0.763	-0.198	-0.030	0.171	0.193	-0.348	-0.368	-0.216
post. okr. s trámci z V-žebra	-0.026	-0.206	0.603	0.114	0.070	-0.175	-0.110	-0.150
post. okr. se síťkou	-0.227	0.328	-0.158	-0.181	-0.178	-0.045	-0.059	0.019
post. okr. překryt až k V-žeburu	-0.227	0.328	-0.158	-0.181	-0.178	-0.045	-0.059	0.019
šířka přehnutého okraje [μm]	-0.071	0.074	-0.187	0.033	0.017	0.211	0.176	0.283
šířka přehnutého okraje [μm].procentualne	-0.196	0.223	-0.238	-0.238	-0.226	0.498	0.462	0.484
vzdálenost žeber na š. š. [μm]	-0.091	-0.373	0.594	0.395	0.385	-0.096	-0.016	-0.119
centralní vyvýšenina	0.102	0.328	-0.158	-0.181	-0.178	-0.045	-0.059	0.029
silicifikace šupiny	0.370	-0.142	-0.016	0.071	0.061	-0.125	-0.159	0.006
obvod š. [μm]	0.352	-0.175	0.000	0.147	0.149	-0.167	-0.198	-0.034

Spearman (ρ)	plocha pórů [nm]	papily na š. š.	trámce z V-žebra na š. š.	zmenšené póry v ohybu V-žebra	počet pórů.v.oHyb u.V.zebra	okénko	počet okének	plocha okének [nm]
cirkularita š.	0.189	0.016	-0.116	-0.172	-0.189	0.257	0.250	0.234
kruhovitost š.	0.238	-0.078	-0.368	-0.116	-0.127	-0.083	-0.122	-0.010
V-žebro dosahující až k okr. š.	-0.314	0.198	0.104	0.049	0.040	0.078	0.044	0.135
ostny jen na okr. buňky	-0.157	0.194	-0.128	-0.036	-0.028	-0.295	-0.240	-0.329
ostny po celé buňce	0.277	-0.253	0.208	0.140	0.131	0.059	0.041	0.006
délka ostnů [μ m]	0.585	-0.573	0.122	0.472	0.457	-0.320	-0.275	-0.333
délka křemičité schránky [μ m]	0.440	-0.159	0.049	0.165	0.172	-0.167	-0.144	-0.084
bunka.sirka	0.220	-0.113	0.043	0.063	0.000	0.016	0.004	0.123

Spearman (ρ)	zoubky na štítu z V-žebra	sekundární struktury na š. š.	sekundární síť na š. š.	sekundární síť na š. š.	žebra na anteriorním okraji	počet žeber na ant. okr.	papily na ant. okr.	zuby na předním okraji šupiny
sekundární struktury na š. š.	-0.093	-						
sekundární síť na š. š.	-0.071	0.248	-	-	-	-	-	-
sekundární síť na š. š.	0.165	-0.216	-0.165	-	-	-	-	-
žebra na anteriorním okraji	0.282	0.172	-0.253	-0.026	-	-	-	-
počet žeber na ant. okr.	0.271	0.172	-0.253	-0.017	0.999	-	-	-
papily na ant. okr.	-0.219	0.072	0.068	0.031	-0.158	-0.158	-	-
zuby na předním okraji šupiny	-0.109	0.118	0.068	-0.018	-0.079	-0.079	-0.109	-
posteriorní submarginalní žebro	-0.076	0.082	0.217	0.150	-0.055	-0.055	-0.076	0.698
posteriorní okr. s póry	0.167	-0.339	0.151	-0.171	-0.324	-0.328	-0.267	0.155
post. okr. s trámci z V-žebra	0.004	0.177	0.125	0.009	0.352	0.356	-0.145	0.113
post. okr. se sítíkou	-0.135	0.147	0.386	-0.312	-0.098	-0.097	0.116	-0.067
post. okr. překryt až k V-žebro	-0.135	0.147	0.386	-0.312	-0.098	-0.097	0.116	-0.067
šířka přehnutého okraje [μm]	0.071	0.133	0.010	-0.556	-0.146	-0.151	-0.190	-0.300
šířka přehnutého okraje [μm].procentualne	0.083	0.370	-0.071	-0.500	0.113	0.104	-0.074	-0.227
vzdálenost žeber na š. š. [μm]	0.170	0.216	-0.318	0.138	0.502	0.508	-0.199	-0.099
centralní vyvýšenina	0.116	0.147	-0.015	-0.312	-0.098	-0.097	0.116	-0.067
silicifikace šupiny	0.047	-0.203	0.095	-0.306	-0.285	-0.286	-0.398	-0.238
obvod š. [μm]	0.053	-0.147	0.199	-0.343	-0.278	-0.277	-0.404	-0.072
cirkularita š.	-0.065	-0.197	-0.256	-0.085	-0.154	-0.158	0.229	-0.331
kruhovitost š.	0.148	-0.361	0.299	-0.087	-0.375	-0.378	-0.012	-0.165
V-žebro dosahující až k okr. š.	0.171	0.217	0.274	-0.033	0.324	0.336	-0.014	-0.099
ostny jen na okr. buňky	-0.072	-0.214	0.017	0.088	-0.172	-0.172	0.424	0.170
ostny po celé buňce	-0.004	0.105	-0.244	-0.009	0.212	0.212	-0.449	-0.113
délka ostnů [μm]	0.080	-0.489	-0.264	0.199	-0.135	-0.139	-0.401	0.124
délka křemičité schránky [μm]	0.154	-0.358	-0.071	-0.194	-0.150	-0.159	-0.288	-0.021
bunka.sirka	0.006	-0.223	0.086	-0.302	-0.165	-0.174	-0.407	-0.145

Spearman (ρ)	posteriorní submarginální žebro	posteriorní okr. s póry	post. okr. s trámci z V-žebra	post. okr. se sítkou	post. okr. překryt až k V-žeburu	šířka přehnutého okraje [μm]	šířka přehnutého okraje [μm].procentualne	vzdálenost žeber na š. š. [μm]
posteriorní okr. s póry	0.108	-	-	-	-	-	-	-
post. okr. s trámci z V-žebra	0.259	0.047	-	-	-	-	-	-
post. okr. se sítkou	-0.047	-0.016	0.247	-	-	-	-	-
post. okr. překryt až k V-žeburu	-0.047	-0.016	0.247	1.000	-	-	-	-
šířka přehnutého okraje [μm]	-0.216	0.047	0.048	0.210	0.210	-	-	-
šířka přehnutého okraje [μm].procentualne	-0.144	-0.259	-0.132	-0.026	-0.026	0.705	-	-
vzdálenost žeber na š. š. [μm]	-0.069	-0.157	0.508	-0.123	-0.123	0.153	0.020	-
centralní vyvýšenina	-0.047	0.192	0.033	-0.083	-0.083	0.274	0.342	-0.123
silicifikace šupiny	-0.130	0.405	0.243	0.299	0.299	0.597	0.037	0.118
obvod š. [μm]	-0.072	0.479	0.304	0.359	0.359	0.478	-0.067	0.099
cirkularita š.	-0.202	-0.123	-0.195	-0.128	-0.128	0.359	0.256	-0.038
kruhovitost š.	0.029	0.247	-0.197	0.205	0.205	0.191	-0.164	-0.344
V-žebro dosahující až k okr. š.	-0.069	-0.178	0.364	0.410	0.410	0.183	0.208	0.010
ostny jen na okr. buňky	-0.082	0.064	-0.036	0.330	0.330	-0.381	-0.432	-0.216
ostny po celé buňce	0.102	0.076	0.013	-0.461	-0.461	0.246	0.271	0.266
délka ostnů [μm]	0.072	0.487	0.033	-0.188	-0.188	-0.062	-0.408	0.121
délka křemičité schránky [μm]	-0.216	0.523	0.144	0.171	0.171	0.305	-0.186	0.036
bunka.sirka	-0.014	0.447	0.226	0.146	0.146	0.549	0.041	-0.010

silicifikace šupiny	0.068	-	-	-	-	-	-	-
obvod š. [μm]	0.068	0.931	-	-	-	-	-	-
cirkularita š.	0.026	0.267	0.008	-	-	-	-	-
kruhovitost š.	-0.026	0.510	0.483	0.294	-	-	-	-
V-žebro dosahující až k okr. š.	0.144	0.069	0.120	-0.101	-0.025	-	-	-
ostny jen na okr. buňky	-0.147	-0.254	-0.175	-0.031	0.147	-0.041	-	-
ostny po celé buňce	-0.033	0.213	0.106	0.119	-0.223	-0.207	-0.810	-
délka ostnů [μm]	-0.261	0.367	0.404	0.009	0.259	-0.417	0.000	0.274
délka křemičité schránky [μm]	-0.009	0.651	0.645	0.183	0.350	-0.016	0.124	-0.078
bunka.sirka	0.060	0.678	0.666	0.124	0.371	0.073	-0.288	0.218

Spearman (ρ)	délka ostnů [μm]	délka křemičité schránky [μm]
délka křemičité schránky [μm]	0.523	-
bunka.sirka	0.369	0.595