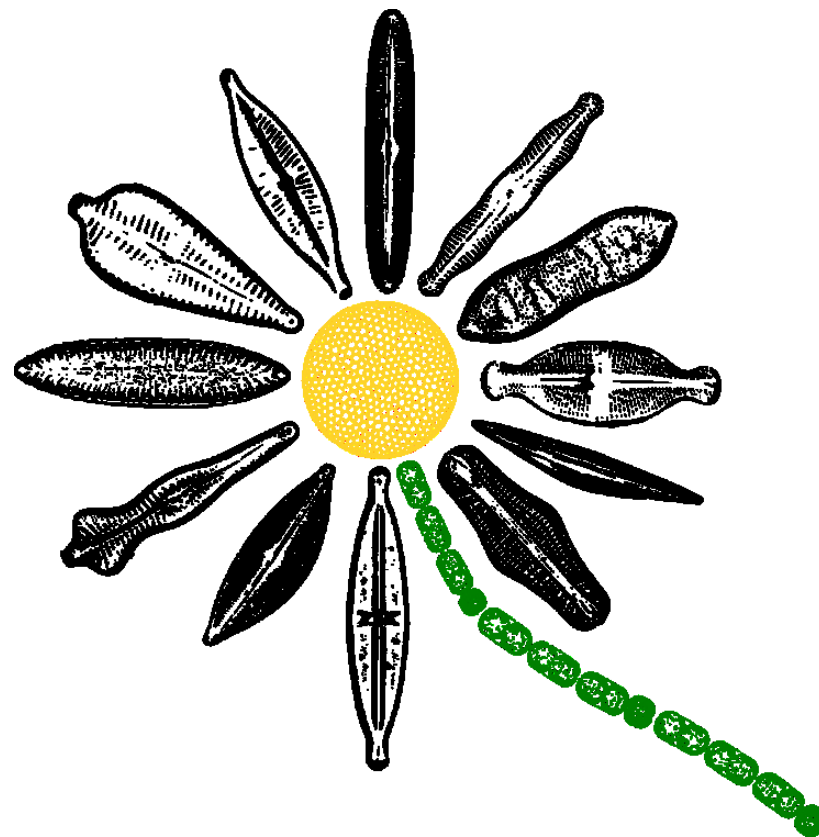
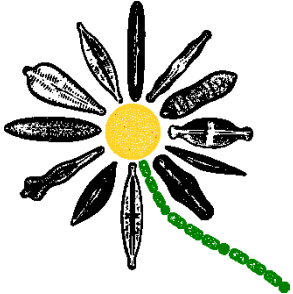


Trendy v současné diatomologii, rozsivky s raphe na obou valvách II

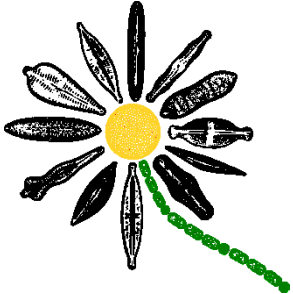
4. Přednáška



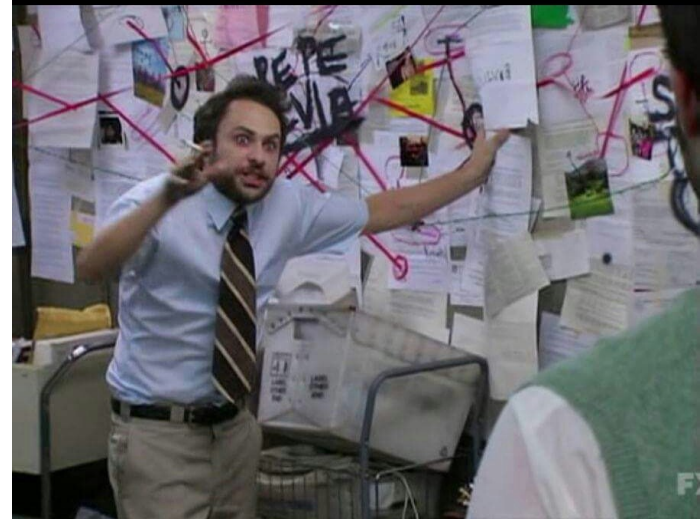


Trendy v současné diatomologii

- Druhový koncept
- Holistický přístup
- Geometrická morfometrika
- Křížící experimenty
- **Molekulární analýzy**



Definice druhu



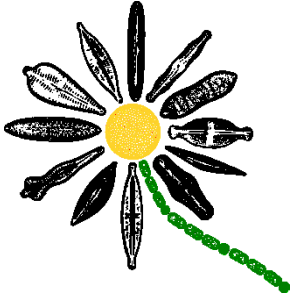
- **Biologická koncepce druhu**

Ernst Mayr (1970)

Druh je skupina jedinců, kteří se vzájemně **plodně kříží a jsou reprodukčně izolované od jiných druhů.**

Delší znění definice:

Druhy sestávají z populací a mají vnitřní genetickou soudržnost. Organismy v rámci druhu tvoří reprodukční jednotku, mohou se vzájemně křížit a vyhledávají se za účelem reprodukce. Druh také tvoří ekologickou jednotku interagující s ostatními druhy v daném prostředí. Členové druhu tvoří genetickou jednotku sdílející společný genofond. Druhy jsou skupiny navzájem se křížících přírodních populací, které jsou reprodukčně izolované od jiných podobných druhů.



Vznik druhů

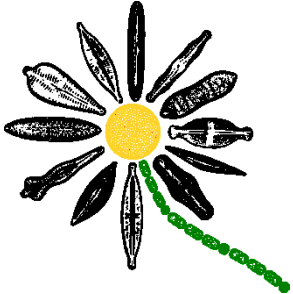
- U pohlavně se množících organismů dochází ke speciaci, když mezi populacemi vznikne reprodukční izolace (biologická koncepce druhu).

- **Alopatrická speciace**

Podmínkou je geografické oddělení populací.

V izolovaných populacích vznikají nezávislé mutace, dochází k rozrůžňování.

Po opětovném kontaktu populací se jedinci mezi populacemi už spolu nedokáží plodně křížit.



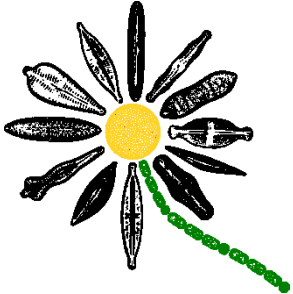
Vznik druhů

- **Sympatrická speciace (ekologická speciace)**

Bez geografické izolace

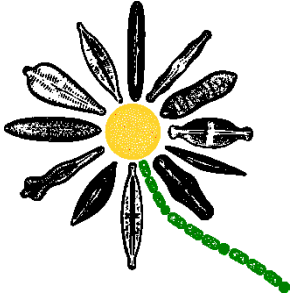
Za přítomnosti genového toku

Může k ní dojít, pokud na populaci působí disruptivní selekce (druhy např. využívají dva alternativní zdroje potravy) a jedinci s průměrným fenotypem jsou znevýhodněni.



Druhový koncept

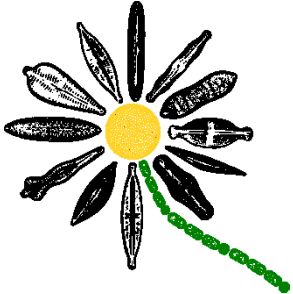
- založen na přítomnosti reprodukční izolace dvou druhů
- **kryptický druh:** populace nebo skupina populací, která je od jiných, morfologicky zcela identických populací organismů geneticky izolována (angl. sibling species), v přírodních podmínkách nedochází ke křížení. (Podle tradičních taxonomických znaků je nicméně nelze rozlišit.)
= **druhy jsou morfologicky shodné, ale geneticky oddělené**
- **semi/pseudokryptické druhy:** rozdílné genetické linie, u kterých byly nalezeny minoritní rozdíly v morfologii (druhy se odlišují jen nepatrnými morfologickými znaky, které bývají často objeveny až na základě výsledků molekulárních analýz)
- druhům, jenž sdílejí takovéto společné znaky, se někdy říká **druhové komplexy.**



Kryptická diverzita

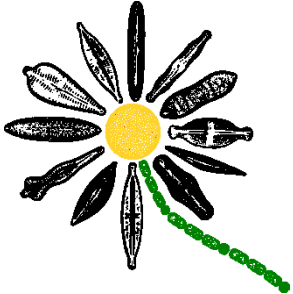
- „Odhady počtu druhů vytvořené na základě tradičních morfologických metod (především znaky na křemičité schránce pozorovaných světelným mikroskopem) značně podceňují skutečnou diverzitu rozsivek“ (Mann, 1999)

(mnoho druhů, které byly vymezeny na základě morfologických znaků, je ve skutečnosti komplexem velmi podobných, semikryptických druhů)



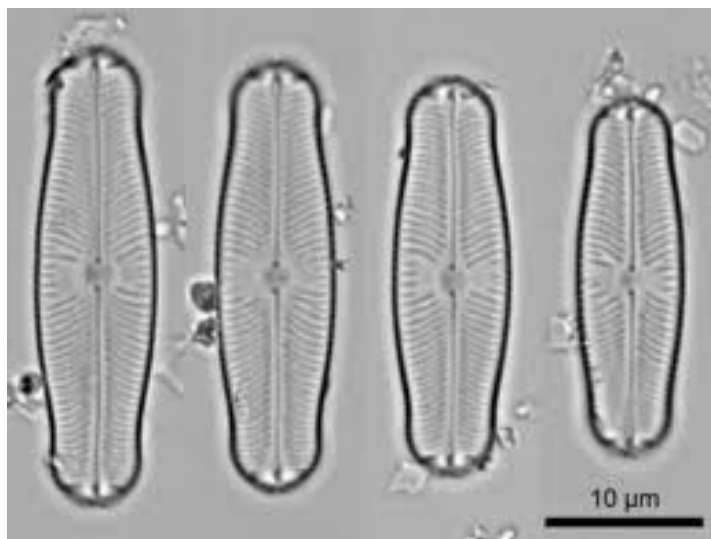
Kryptická diverzita

- Rozsivky mají **obrovskou kryptickou a pseudokryptickou diverzitu** (současné odhady skutečného počtu druhů se řádově liší)
- K odhalení diverzity slouží:
 - tradiční i moderní morfologické znaky
 - molekulární data
 - fyziologie
 - ekologie
 - životní cyklus
 - testy reprodukční kompatibility (křížící experimenty)napomáhají k nalezení hranic biologického druhu



Druhové komplexy

- Mezi hlavní modelové systémy penátních rozsivek patří sladkovodní bentický druhový komplex *Sellaphora pupula*, mořské planktonní druhy rodu *Pseudo-nitzschia* a druhový komplex *Eunotia bilunaris*



Znaky používané pro rozlišení druhů

Křížící experimenty (+reprodukčně izolační mechanismy)

- Genofond druhu je chráněn před škodlivým genovým tokem z jiných genofondů reprodukčně izolačními mechanismy
- Rozlišujeme prezygotické a postzygotické izolační mechanismy.
- Prezygotická reprodukční bariéra - neschopnost rozpoznat buňku druhého druhu jako vhodného sexuálního partnera
- Postzygotické reprodukčně-izolační mechanismy zahrnují neživotaschopnost a sterilitu F1 generace

Studium reprodukční izolace prostřednictvím křížících experimentů umožňuje odlišit mezidruhovou a vnitrodruhovou variabilitu v morfologii a v neutrálních molekulárních markerech.

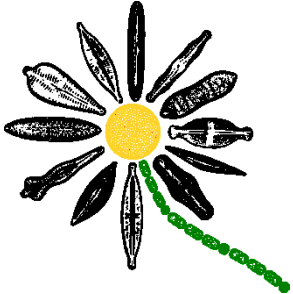
Znaky používané pro rozlišení druhů

Morfologie valvy

- délka valvy,
- šířka valvy
- tvar valvy
- počet strií na 10 μm
- počet areol na 10 μm ,
- počet fultoportul na buňku
- tvar centrálních a polárních (terminálních) zakončení raphe
- tendence vytvářet jednobuněčné nebo naopak koloniální formy
- počet buněk v kolonii

Fenotypová plasticita

- Fenotypová plasticita je schopnost organismu měnit fenotyp v závislosti na podmínkách prostředí a je to alternativa ke genetické změně
- **Morfologické znaky na valvě jsou obecně považovány za geneticky podmíněné**, vzhledem k tomu, že jejich výskyt je relativně uniformní i ve větších taxonomických jednotkách.
- Existuje ale **fenotypová plasticita**, kterou lze odhalit na základě přírodních vzorků a nikoliv klonů žijících v kultuře (závisí např. na salinitě, teplotě a dostupnosti živin)
- U bentických druhů se projevuje ve větší míře, protože jsou zde podmínky proměnlivější
- Jedním z projevů této plasticity mohou být i tzv. **Janusovy buňky** (každá valva vznikala v jiných podmínkách)



Znaky používané pro rozlišení druhů

- **Životní cyklus**

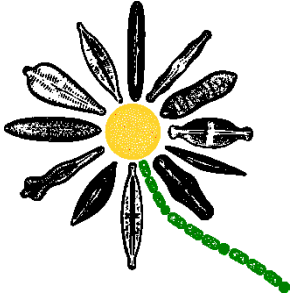
- vegetativní část cyklu: zmenšování průměrné velikosti buněk v populaci
- původní velikost populace se obnovuje auxosporulací
- zmenšování často spojeno se změnami morfologie schránky
- menší buňky jsou více eliptické a vzor na jejich valvě se zjednodušuje

Znaky používané pro rozlišení druhů

- **Fyziologické pochody**

Pseudokryptické druhy se mohou lišit:

- růstovou rychlostí v různé teplotě a salinitě
- metabolismem dusíku
- požadavky na množství křemíku a vitaminů
- citlivostí ke znečištění
- schopností produkovat toxické látky a různé sekundární metabolity (*Pseudo-nitzschia* produkuje domoikovou kyselinu-neurotoxin)



Znaky používané pro rozlišení druhů

- **Ekologie**

morfortypy rozsivek mohou korelovat s ekotypy

druhov e komplexy se mohou signifikantně liřit svou ekologií- jiné n aroxy na:

- pH

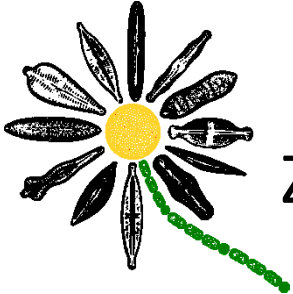
- konduktivitu

- obsah fosforu a dusíku.

+ druhov e specifické interakce hostitel-parazit - rozdílná citlivost druhů k napaden  chytridiami a oomycety

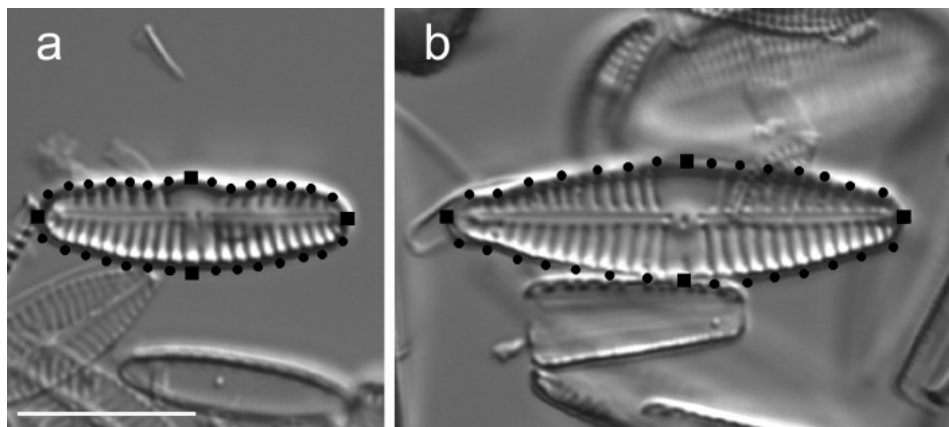
Znaky používané pro rozlišení druhů

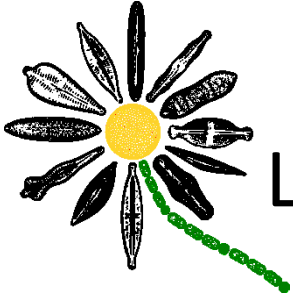
- Zvláště pro rozlišení vyšších taxonů se dají využít také **cytoplazmatické znaky**:
 - charakter a počet chloroplastů
 - znaky na Golgiho aparátu
 - pyrenoidu
 - typ auxospory



Znaky používané (nejen) pro rozlišení druhů

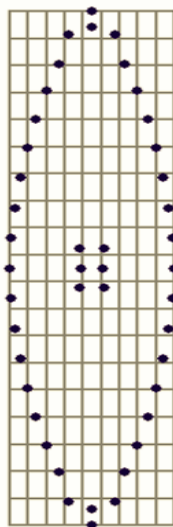
- **Landmarková geometrická morfometrika**
 - Celkový tvar valvy, který byl vždy popisován pouze kvalitativně je možné prostřednictvím metod geometrické morfometrie matematicky popsat.
 - Zkoumá morfologii a tvar organismů pomocí matematických disciplín (geometrie, statistika).
 - Obrovská tvarová diverzita mezi jedinci téhož druhu- lokální adaptace na podmínky prostředí





Landmarková geometrická morfometrika

- Na každé valvě určitý počet homologních bodů- **landmarků**
- **Landmarky** jsou přesně umístěné homologické body na struktuře, které jsou ontogeneticky, funkčně či evolučně signifikantní. Jsou zachycené jako souřadnice v dvoj, nebo trojdimenzionálním prostoru



Více informací o morfometrice: Neustupa et al.

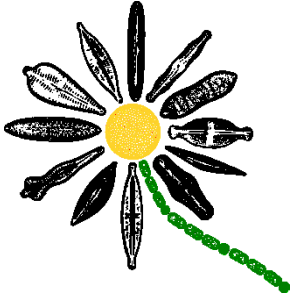
Znaky používané (nejen) pro rozlišení druhů

- **Molekulární analýzy**

- Využívání vedlo k odhalení nečekané kryptické diverzity u rozsivek
- první kompletní genomy rozsivek:
- Centrická *Thalassiosira pseudonana*
- penátní *Phaeodactylum tricornutum*

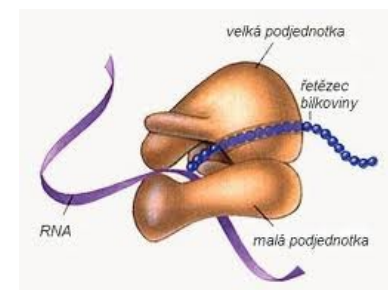
- **Využívání molekulárních dat:**

- ITS
- SSU rDNA a LSU rDNA
- plastidové geny *rbcL*
- mitochondriální gen *cox1*



Molekulární analýzy

- **SSU neboli 18S rDNA** (malá ribozómová podjednotka)
 - využití pro rekonstrukci fylogeneze celé třídy rozsivek (zařazení druhu v rámci třídy), méně variabilní
- **LSU neboli 28S rDNA** (velká ribozomální podjednotka)
- **ITS1 a ITS2** (mezerníkové oblasti oddělující ribozomální podjednotku), velmi variabilní
 - ITS2 má schopnost rozlišit reprodukčně izolované druhy
- (Fce ribozomu: tvorba proteinů, probíhá na nich translace, při níž je z řetězce RNA syntetizován polypeptid)



Molekulární analýzy

- **Mitochondriální genom**

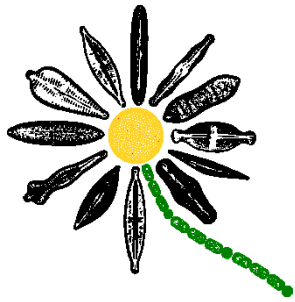
- Využívá se oblast kódující proteinovou podjednotku cytochrom oxidasy (**cox1**)

- **Plastidový genom**

- Využívá se oblast kódující proteinovou velkou podjednotku enzymu RUBISCO

- Výhody oproti rDNA: jsou obsaženy

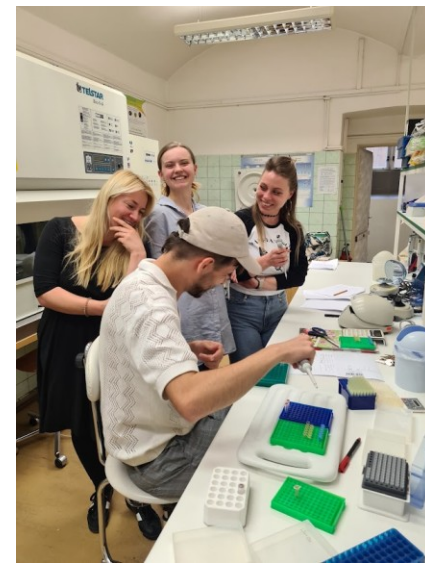
v genomu pouze v jedné kopii+ minimalizuje možnost amplifikace DNA z případné kontaminace houbami, která je poměrně běžná. Nevýhodou je nedostatečná znalost dědičnosti a dalších vlastností organelové DNA

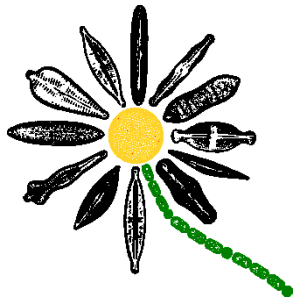


Molekulární metody

1. Izolace DNA (extrakční kity)
2. Amplifikace DNA (vybraného úseku) – PCR
3. Naklonování DNA (produktů PCR)
4. Sekvenace
5. Analýza (srovnání na www.algaterra.org)

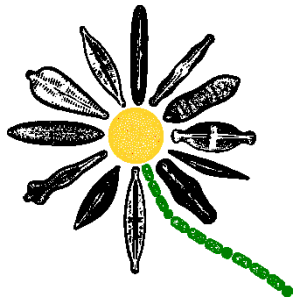
Příklad- výběr 18S SSU rRNA (ideální marker pro rozsivky, z ní výběr např 480 pb pro amplifikaci)





Molekulární metody

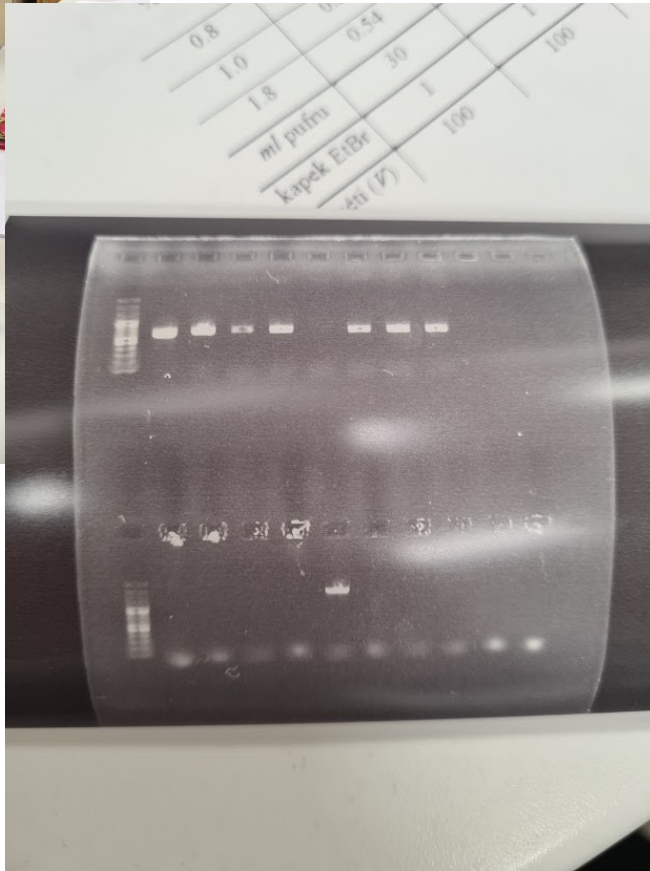
- **Extrakce** probíhá podle návodu výrobce vybraného extrakčního kitu (pro rozsivky se používají např. Dneasy Mini Plant kit a Dynabeads DNA Direct Universal Kit)
- **Amplifikace** pomocí primerů (denaturace vlákna, navázání primerů)
- **Klonování** pomocí klonovacích kitů (TOPO TA Cloning™ Kit, klonování často v buňkách E-coli)
- **Sekvenování** (rekombinantních plazmidů E-coli)



Molekulární metody

Důležité nalézt vhodný marker (měla by to být krátká sekvence DNA, která půjde lehce naamplifikovat)

Část DNA pro analýzu by však měla být dostatečně variabilní aby odlišila jednotlivé druhy



Rozsivky s raphe na obou valvách II

- Zbytek řádu Naviculales:

Pleurosigma

Brachysira

Gyrosigma

Diploneis

Stauroneis

Amphipleura

Pinnularia

Frustulia

Caloneis

Phaeodactylum

Neidium

Capartogramma

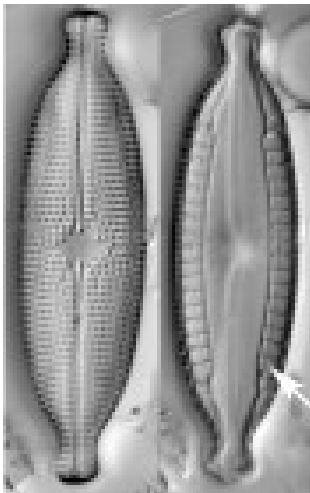
- Řád Mastogloiales

Mastogloia

+(*Aneumastus*)

Morfologické pojmy

- **Valvocopula:** první boční pás
- U rodu *Mastogloia* je valvocopula tvořena několika vnitřními komorami, které se nazývají partectum
- **Partectum** má funkci vylučování slizu (mukopolysacharidy)

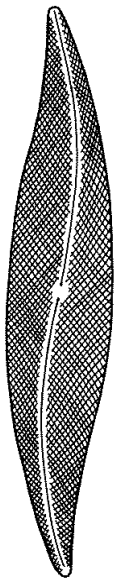


Gyrosigma

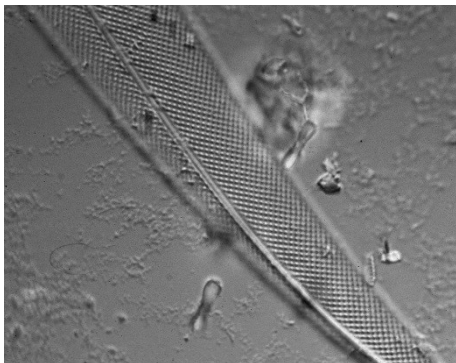
- Valvy, osová oblast i raphe tvaru S (sigmoidní)
- Striae viditelné, areoly v podélných řadách
- Centrální oblast kulatá až eliptická
- Hlavně epipelon



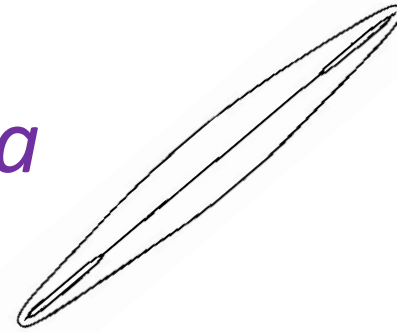
Pleurosigma



- Valvy, osová oblast i raphe tvaru S (**sigmoidní**)
- Areoly tvořící strie uspořádány křížovitě (strie decusátní)
- Epipelon
- Brakické a mořské vody
- Morfologické odlišení – potkávání strií, poloha osově oblasti



Amphipleura



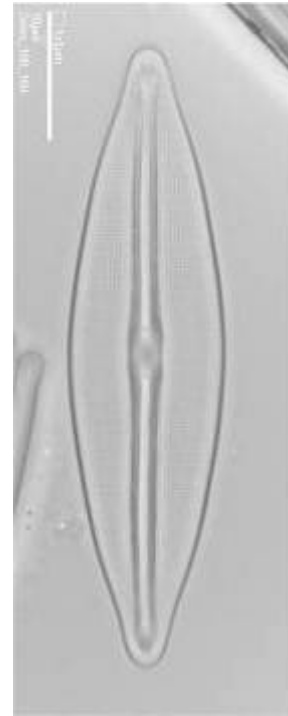
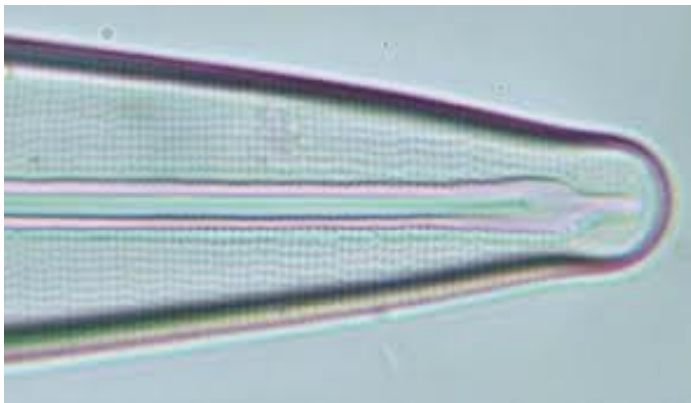
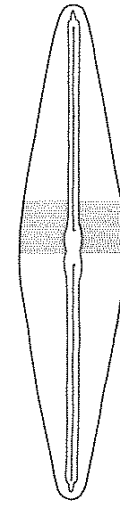
- Raphe redukováno – krátké oproti ostatním naviculoidním rodům
- Středové žebro, konce ve tvaru jehlového ouška- tam je umístěno raphe
- Tvar lineární nebo vřetenovitý
- Podobné rodu *Frustulia*
- Chloroplast ve tvaru H
- Striae jsou 0.25 μm od sebe, limitní pro rozlišovací schopnost světelného mikroskopu

Amphipleura pellucida



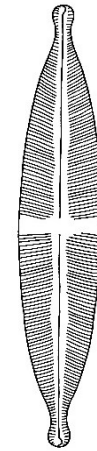
Frustulia

- Raphe ohraničeno podélnými žebry
- Tvar lineárně lanceolátní až kosočtverečný
- Striae velmi jemné, pravidelného tvaru
- Konce žeber „pastelkovitého tvaru“
- Acidofilní, výhradně sladkovodní

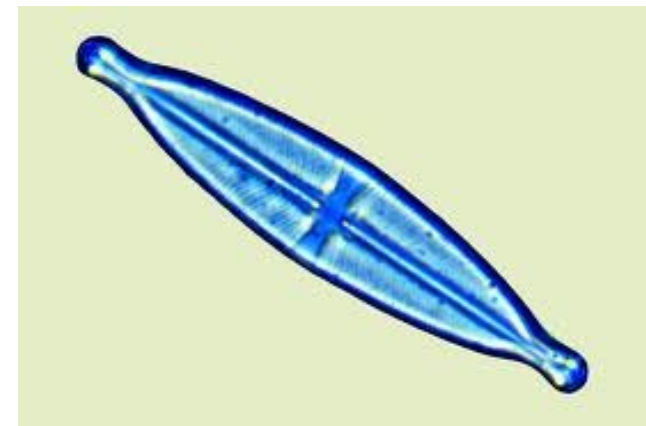


Frustulia saxonica

Stauroneis

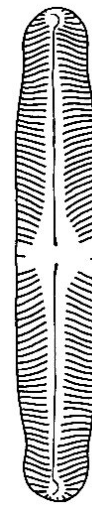


- **Stauros** (zesílená oblast bez strií) v centru valvy
- Valvy lineárně lanceolátní až lanceolátní
- Ve striích občas patrné areoly
- Bentos (rybníky, jezera, méně řeky), vlhké půdy a mechy

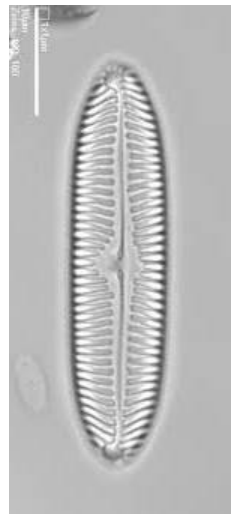


Stauroneis anceps

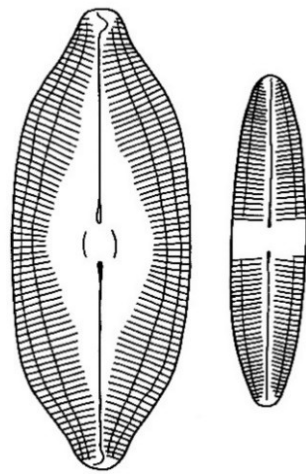
Pinnularia



- Striae komůrkové, vyústění komůrek může tvořit longitudinální rýhy
- Centrální konce raphe rozšířené, nejčastěji kapkovité, lehce zahnuté na jednu stranu
- Frustuly mohou být velkých rozměrů- až 300 μm na délku
- Terminální konce raphe zahnuté, nejčastěji tvar **otazníku**
- Centrální oblast může být expandovaná na jednu nebo obě strany.
- Blízce příbuzná rodu *Caloneis*
- Většina druhů je acidofilních

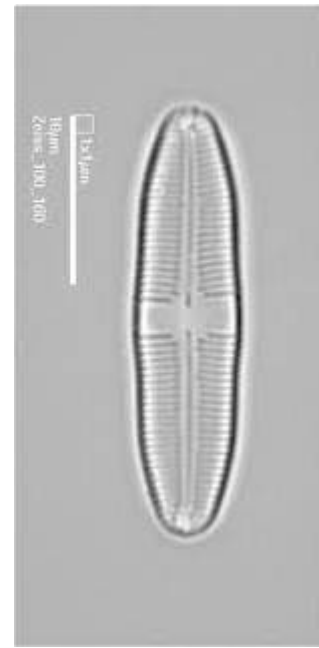


Pinnularia rupestris



Caloneis

- Striae podobné jako u rodu *Pinnularia* ale mnohem jemnější
- Občas longitudinální rýhy
- Často široká fascie
- Alkalifilní

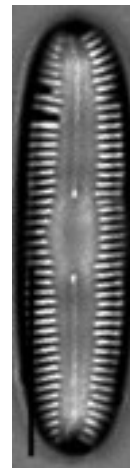


Caloneis bacillum

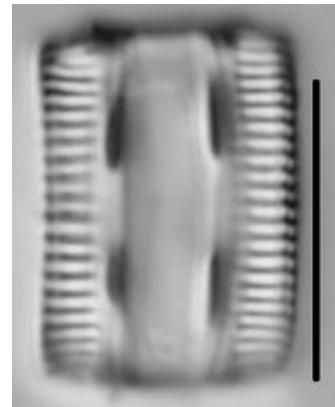
Diatomella



- Valvy mají septa
- **Striae zkrácené**
- Centrální konce raphe daleko od sebe
- Valvy lineárně-eliptické
- Aerofitické, na živiny chudé habitaty
- Vzácná

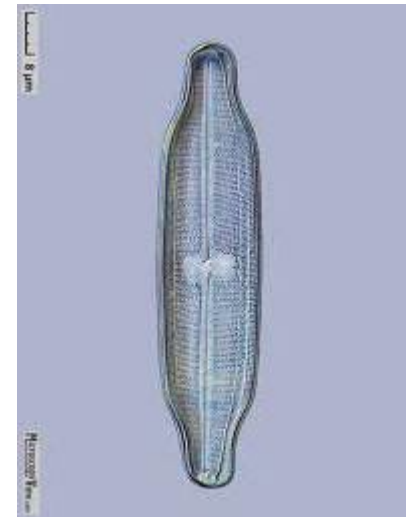
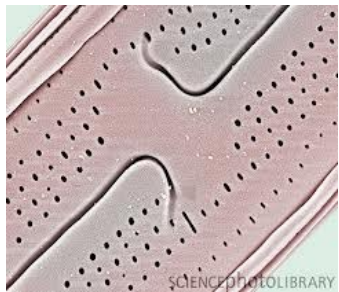
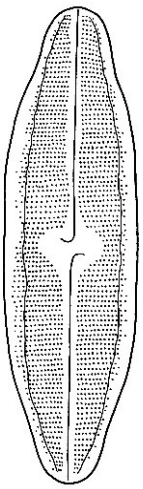


Diatomella balfouriana



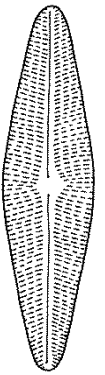
Neidium

- Centrální konce raphe zahnuté na opačnou stranu
- Longitudinální rýha na okraji valvy (přítomnost vnitřního kanálu)
- Konce velmi variabilní (zakulacené, rostrátní, kapitátní, protažené)
- Terminální konce raphe mohou být bifurkátní
- Pouze sladkovodní, nejčastěji mírně kyselé vody

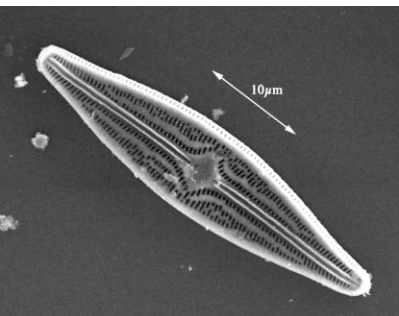


Neidium affine

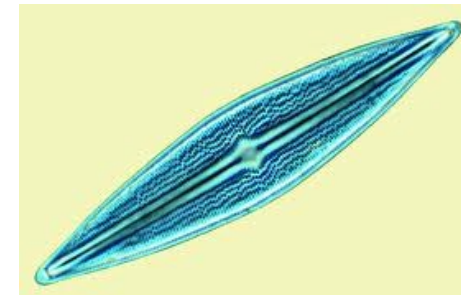
Brachysira



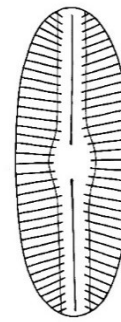
- Valvy lineární až lineárně - lanceolátní, někdy uprostřed rozšířené
- Areoly tvoří zvláštní cik-cak uspořádané podélné řady (vlnitý vzor)
- Konce zakulacené nebo protažené
- Raphe je rovné, osová oblast také
- 1 chloroplast
- Může tvořit slizové stopky
- Bentos oligotrofních vod, často na rašeliništích



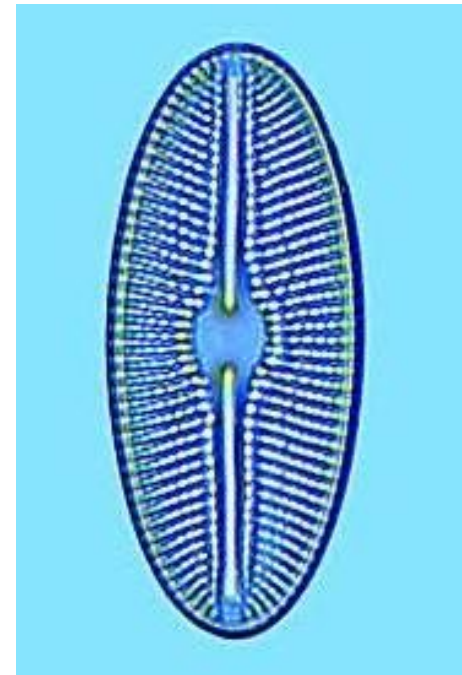
Brachysira serians



Diploneis

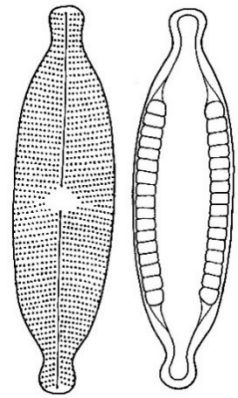


- Tvar lineární až eliptický
- Raphe ohraničeno dvěma longitudinálními kanály
- Konce zaoblené
- Frustuly velmi vyztužené křemíkem
- Mořské i sladkovodní druhy



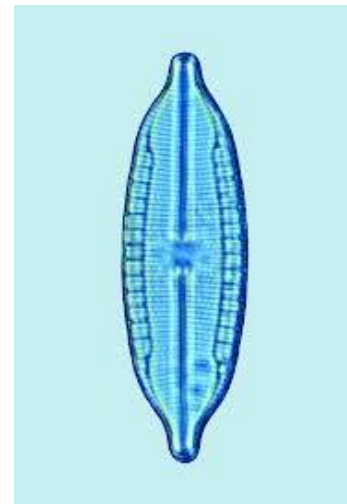
Diploneis ovalis

Mastogloia



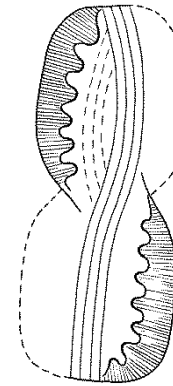
- Valvocopula s partectem (viditelné při různých rovinách proostření)
- Valvy eliptické až lanceolátní, konce zaoblené nebo kapitátní
- Areoly zřetelné
- Raphe může být zvlněné
- Největší diverzita v mořích, ve sladkých vodách se vyskytuje tam, kde je vyšší obsah solí a vápníku

Mastogloia smithii

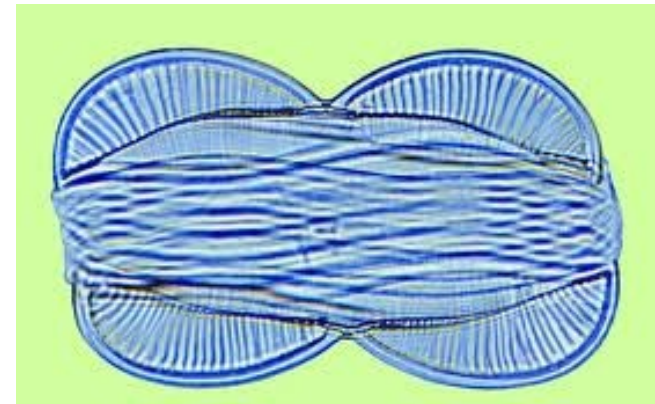


Entomoneis

- Valvy prohnuté až přetočené
- Raphe v kýlu
- Ve vzorku většinou jen pleurální pohledy
- Mořský, pár sladkovodních druhů



Entomoneis costata

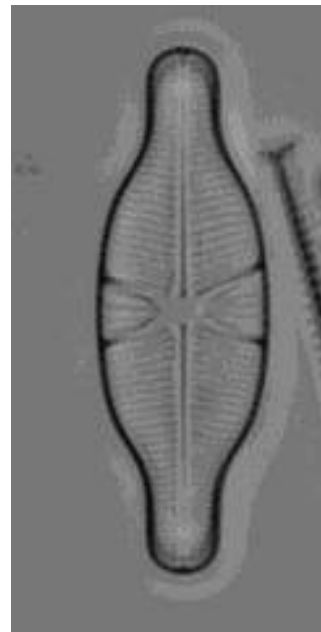


Capartogramma



- Nazaměnitelný rod: stauros ve tvaru X
- Především subtropy

Capartogramma crucicula

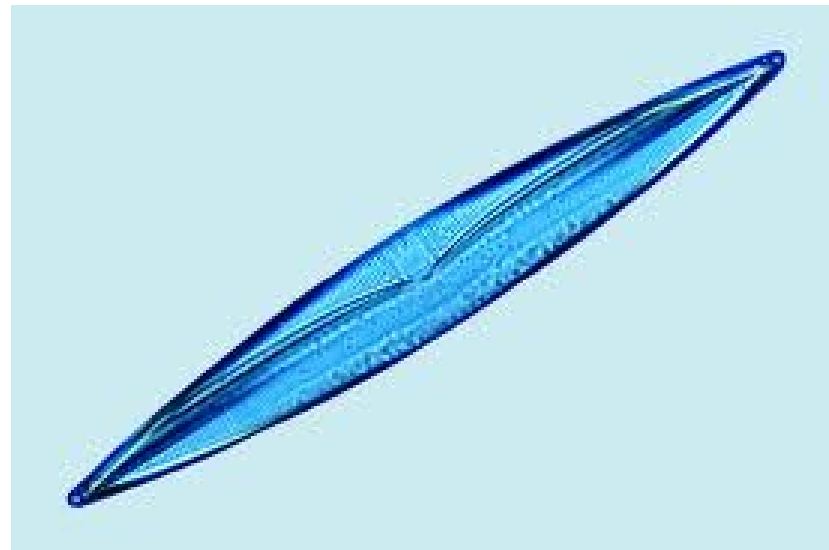


Plagiotropis



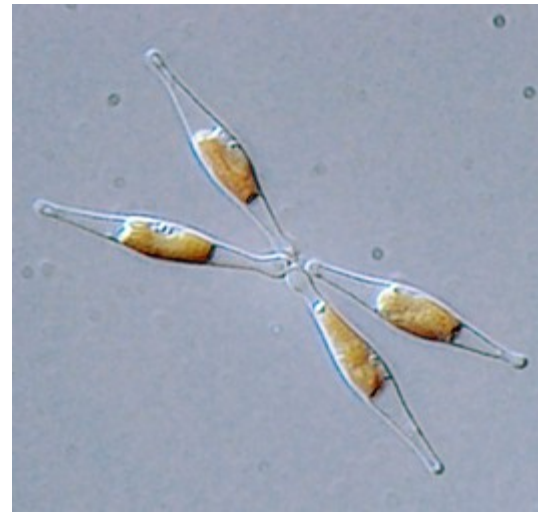
- Valvy zvláštním způsobem „přeložené“, na epivalvě zřetelný kýl (uvnitř kýlu je uloženo raphe)
- Ve velmi alkalických vodách- epipelon brakických vod

Plagiotropis lepidoptera



Phaeodactylum

- 3 různé morfotypy
- V některých fázích chybí frustula
- Modelový organismus
- První rozsivka s plně nasekvenovaným genomem
- Moře



Phaeodactylum tricornutum

