

Anpassning hos kiselalgen *Skeletonema marinoi* till stigande vattentemperaturer under 1900-talet

Maximilian Gareis

Pro gradu-avhandling i miljö-och marinbiologi

Handledare: Conny Sjöqvist, Giannina Hattich

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Åbo Akademi

2021

Innehåll

1.0 Inledning	1
1.1 Frågeställning	3
1.2 Hypoteser	4
2.0 Material och metoder	4
2.1 Fältprovtagning	4
2.2 Uppväckning av <i>S. marinoi</i>	5
2.3 Isolering av <i>S. marinoi</i>	6
2.4 Datering av sedimentkärnan.....	6
2.5 Estimering av cellkoncentrationer	7
2.6 Kurvor för in vivo fluorescens av klorofyll a och cellkoncentration	8
2.7 Experimentupplägg.....	8
2.8 Mätning av cellstorlek.....	9
2.9 Statistiska analyser.....	10
2.9.1 Datering av sediment	10
2.9.2 Dagar till stationär fas	10
2.9.3 Skillnader i tillväxtrater mellan populationer och temperatur	10
2.9.4 Cellstorlek	11
3.0 Resultat	11
3.1 Datering av sediment	11
3.2 Dagar till stationär fas	12
3.3 Effekten av temperatur på tillväxt hos olika populationer	12
3.4 Cellstorlek	14
4.0 Diskussion.....	15
4.1 Dagar till stationär fas	15
4.2 Tillväxtrater.....	16
4.3 Cellstorlek.....	18
4.4 Allmän diskussion.....	18
5.0 Slutsatser	19
Referenser	20

Abstrakt

En ökad mänsklig påverkan har förändrat omständigheterna i Östersjön, vilket påverkar hela ekosystemet. Primärproduktionen som håller upp ekosystem påverkas också av dessa förändringar. *Skeletonema marinoi* är en kiselalg som dominerar vårbloomningen i de tempererade områden vilket innebär att det är en viktig primärproducent. I denna studie har jag väckt upp vilostadier av *S. marinoi* från åren 1963, 1990 och 2019 och utsatt dem för olika temperaturbehandlingar. Jag antog att isolaten från 1963 skulle prestera bäst i låga temperaturer och isolat från 2019 i höga. Det visade sig att 1963 isolaten presterade bäst i den lägre temperaturen men att inte tillräckligt höga temperaturer använts för att 2019 skulle prestera bäst. För att se ifall det skett en fenotypisk förändring sedan 1963 jämfördes cellstorleken och det visade sig att celler från 1963 var störst och celler från 2019 minst. Resultaten visar att det skett en förändring i populationen under 1900-talet och att det finns en stor genetisk variation inom en population vilket kan hjälpa populationen att anpassa sig till framtida förändring.

Nyckelord: *Skeletonema marinoi*, vilostadier, temperaturanpassning

An increased human impact has changed the conditions in the Baltic Sea, which affects the entire ecosystem. Primary production that sustains ecosystems is also affected by these changes. *Skeletonema marinoi* is a diatom that dominates the spring bloom in the temperate areas, which means that it is an important primary producer. In this study, I have resurrected resting stages of *S. marinoi* from the years 1963, 1990 and 2019 and subjected them to various temperature treatments. I assumed that the isolates from 1963 would perform best in low temperatures and isolates from 2019 in high ones. The experiment showed that the 1963 isolates performed best in the lower temperature, but that applied high temperatures were not high enough for 2019 isolates to perform best. To see if there has been a phenotypic change since 1963, the cell size was compared, and the experiment showed that cells from 1963 were the largest and cells from 2019 the smallest. The results show that there was a change in the population during the 20th century and that there is a great genetic variation within a population, which can help the population to adapt to future change.

Keywords: *Skeletonema marinoi*, resting stages, temperature adaption

1.0 Inledning

Marina ekosystem uppehålls av primärproduktionen där energin flödar från primärproducenterna upp till toppredatorerna (Doney et al., 2011). Marina mikroalger står för ungefär hälften av världens primärproduktion och de är också viktiga i andra biokemiska cykler (Schlüter et al., 2016). Under antropocenen har en allt större mänsklig påverkan orsakat allvarliga konsekvenser för detta ekosystem. Den allt större koldioxidkoncentrationen i atmosfären försurar haven, och dessutom stiger temperaturen. Högre temperaturer bidrar till en stigande havsnivå, mindre havsis, rubbningar i havsströmmar och därtill kan varmare vatten binda mindre syre (Doney et al., 2011). Det uppskattas att havstemperaturen i Östersjön kommer att stiga med ca 1-4 grader i medeltal mellan åren 2000 och 2100 (Neumann, 2010). I en studie (Räisänen, 2017) där man gjort projektioner på hur klimatet kommer att förändras har man fått varierande resultat men i allmänhet kommer temperaturen att stiga i hela världen. Då man ser på Östersjön visade det sig att vissa projektioner antyder att temperaturen kommer att sjunka över hela världen medan andra projektioner förutspår att temperaturökningen kommer att vara dubbelt så stor som världens medeltal. Det finns också skillnader i temperaturökningen beroende på årstid; under sommaren kommer temperaturökningen att vara mycket mildare än under våren (Räisänen, 2017). Det har visat sig att det redan skett en temperaturökning i Östersjön och den är en av de allvarligaste ökningarna jämfört med andra hav i världen (Reusch et al., 2018). Denna temperaturökning kan påverka mikroalgernas blomning i allmänhet; speciellt under våren kan deras biomassa påverkas av högre temperaturer (Sommer, Lengfellner, 2008). Då det gäller mikroalger har det visats att en högre temperatur påverkar cellstorleken och gör cellerna mindre. Detta kan rubba balansen i ekosystemet eftersom mikroalgernas biomassa minskar då de blir mindre och jämvikten i ekosystemets biomassa mellan populationer förvrängs (Yvon-Durocher et al., 2011).

Skeletonema marinoi är en kiselalg som potentiellt kan påverkas av dessa förändringar. *S. marinoi* är en av de vanligast förekommande mikroalgen under vårblomningen i tempererade områden vilket betyder att den är viktig för andra organismer, bland annat som födokälla för djurplankton. Då tillväxtförhållanden försämras bildar *S. marinoi* vilostadier som sjunker till botten där de kan bevaras i flera decennier (Härnström et

al., 2011). Tack vare detta kan man få reda på om arten har anpassat sig och hur den förändrat sig genetiskt (Rengefors et al., 2017). Dessa vilostadier bidrar till den genetiska mångfalden av arten då de återinförs till vattenkolumnen. Detta genetiska material kan också användas till att återspegla olika variabler såsom klimat eller mänsklig påverkan i ett område (Härnström et al. 2011).

Det finns dock skillnader i anpassning, dvs en algstam som utsätts för miljöförhållanden som är ovanliga för arten, kan anpassa sig fenotypiskt och detta skulle inte vara en genetisk förändring. För att en organism ska kunna anpassa sig genetiskt måste en gynnande mutation uppstå som sedan förs vidare till nästa generation. Populationen kan också ha en stort genetisk mångfald vilket ger en större sannolikhet att någon i populationen bär på en gen som kan underlätta en specifik stressfaktor (Bijlsma, Loeschke, 2005). Organismer kan ändra sitt beteende, fysiologi eller morfologi beroende på miljön de lever i (fenotypisk plasticitet). Dessa förändringar ökar organismens fitness och kan likna evolutionära anpassningar. Dessa anpassningar är dock helt beroende på var organismen lever och i vilka förhållanden. Först sedan då en förändring eller en mutation sker i organismens arvs massa som gynnar den i stressfyllda miljöer kan man tala om evolution (Latta, 2010).

Evolution, fitness och anpassning är uttryck som tenderar överlappa varandra. I en lokal population finns det ett urval för individer som klarar av omständigheterna i sin egen miljö bäst, oberoende av hur dessa egenskaper skulle påverka populationen i andra miljöer. Detta leder till att lokala genotyper i sin egen miljö har högre fitness än andra genotyper från en annan miljö. Denna process leder till en lokal anpassning, men kan också hindras av genetiskt flöde och drift, naturligt urval pga. en tillfällig miljövariabilitet och genom en brist på genetisk mångfald. Anpassning är generellt sett ett fenotypiskt särdrag som har uppstått via naturligt urval. För att kunna avgöra om det handlar om anpassning måste man kunna jämföra en population med dess "mindre anpassade" förfäder (Kawecki, Ebert, 2004).

Eftersom *S. marinoi* är en viktig art för ekosystemet är det betydelsefullt att veta hur den förhåller sig till de allt snabbare förändringarna i miljön. Är det möjligt för *S. marinoi* att anpassa sig till dessa förhållanden? I en studie av O'Donnell et al. (2018) visade de att kiselaglen *Thalassiosira pseudonana* kan anpassa sig olika temperaturförhållanden. Experimentet pågick i 350 generationer i en hög temperatur (31 °C) och en låg temperatur (16 °C). Efter experimentet visade det sig att

populationen från den högre temperaturen hade högre tillväxt i höga temperaturer än i den låga och att populationen från den låga temperaturen hade högre tillväxt i den låga temperaturen än i den höga (O'Donnell et al., 2018). Detta visar att det kan ske en snabb anpassning till temperatur. Denna undersökning går ut på att utsätta återuppväckta isolat av *S. marinoi* från åren 1963, 1990 och 2019 för olika temperaturer för att se vilka isolat är mer temperaturlåga. Genom att använda vilostadier använder man mikroalger som är anpassade till de förhållanden som varade då de levde. Detta gör att man kan se hur populationen förändrat sig istället för att utföra experiment på två populationer från nutiden och sedan se skillnaden mellan dem. Det har gjorts en liknande studie av Yousey et al. (2018) där de återupväcker vilostadier från en *Daphnia pulicaria* population. De utsatte populationer från tre olika tider för olika temperaturer (26-38 °C) och det visade sig att populationen som levte i nutid hade en högre överlevnad i de högre temperaturerna i jämförelse med de andra populationerna som var äldre (Yousey et al., 2018). I detta experiment undersöks om *S. marinoi* isolaten från år 2019 är mer temperaturlåga än isolaten från 1963 och 1990. Detta kan betyda att mikroalgerna har anpassat sig till de förändrade förhållandena och kan klara sig med en fortsatt exponering av stress. De olika temperaturnivåerna som används för experimenten motsvarar förhållanden under åren 1963, 1990 och 2019. För att skapa en ännu bättre uppfattning om hur stress påverkar *S. marinoi* från de olika tidsperioderna undersöks även deras cellstorlek. Detta ger information om hur de olika isolaten fenotypiskt reagerar på de olika temperaturerna. Fastän experimentet utförs under laboratorieförhållanden så är de mikroalger som används så gott som "naturliga". Kulturerna har alltså inte hållits vid liv i laboratorieförhållanden i flera år eftersom de kan anpassa sig till dessa förhållanden och antagligen förvränga resultaten.

1.1 Frågeställning

- 1) Har kiselalgen *Skeletonema marinoi* anpassat sig till temperaturförändringar under 1900-talet?
- 2) Finns det en skillnad i cellstorlek mellan temperatur och år?

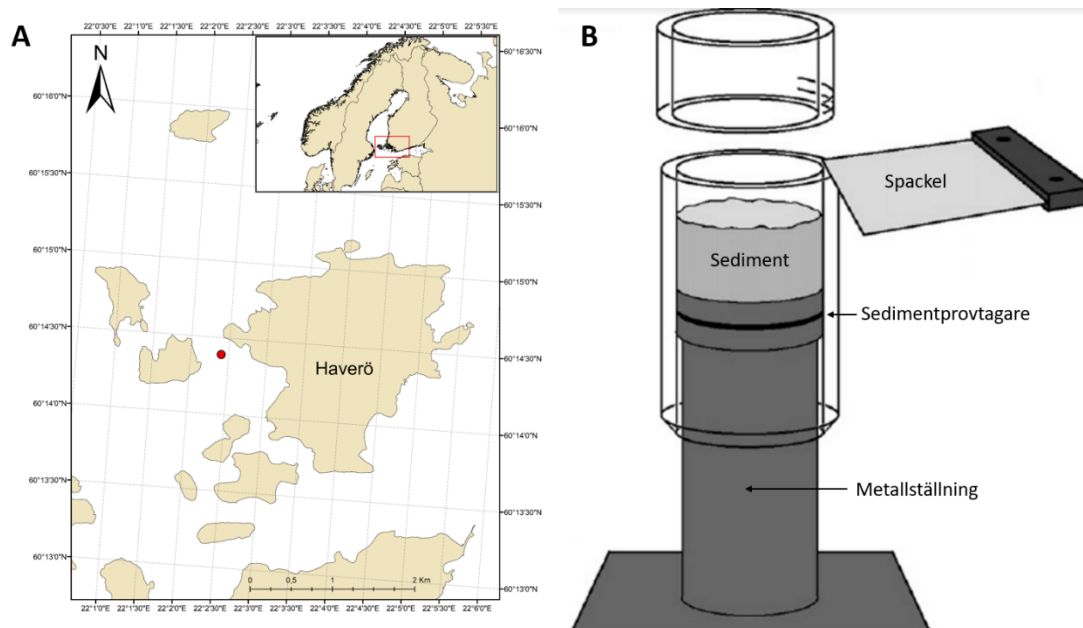
1.2 Hypoteser

- 1) Isolat från åren 1963 har en högre tillväxt än isolaten från 2019 i de lägre temperaturerna
- 2) Celler från 2019 är mindre eftersom de är anpassade till varmare temperaturer

2.0 Material och metoder

2.1 Fältprovtagning

Sedimentkärnor samlades in vid Haverö i Skärgårdshavet, Finland (60.24N, 22.04E) (Figur 1A) den 21 april 2020. Sammanlagt togs fyra sedimentkärnor (HAV1-HAV4). I detta arbete fortsatte alla analyser med HAV1-kärnan. Sedimentkärnorna samlades in med hjälp av en sedimentprovtagare (Figur 1B). Provtagaren består av ett ihåligt rör av plexiglas med tyngder upptill. Röret sänktes ner till botten så att det sjönk in i sedimentet (ungefär 50 cm) varefter ett lock slöt toppen av röret så att sedimentet togs till vara. Röret drogs upp till ytan där en propp sattes på botten av röret. Sedimentprovtagaren sattes därefter på en metallställning som möjliggjorde noggrann skivning av sedimentkärnan. Kärnan skivades i 2 cm:s lager som provtogs med en sked endast från mitten av kärnan för att undvika kontamination från andra lager i kärnan. Detta krävdes eftersom sedimentet på utsidan av kärnan kunde ha stannat på plats då sedimentet tryckts upp ur röret. Allt överlopps sediment skrapades bort från ändan av röret med en spackel varefter nästa lager provtogs. Mellan provtagningar rengjordes skeden och spackeln med etanol (70 %) och MilliQ-vatten. Sedimentproven sattes i plastpåsar som tillslöts under vatten för att få med så lite luft som möjligt. Proverna transporterades nedkylda till Biocity, Åbo där de förvarades i mörker i +8 °C.



Figur 1. A. Provtagningsplats (röd prick) i skärgårdshavet väster om Haverö (Koordinater: 60.24N, 22.04E). B. Sedimentprovtagare på metallställningen (modifierad från Schönfeld (2011)).

2.2 Uppväckning av *S. marinoi*

För att väcka upp *S. marinoi* ur sedimentet sattes ca 0,5 g (Tabell 1) av sedimentet i ett Falconrör med 50 ml tillväxtmedium f/2+Si (Guillard, 1975). Tillväxtmediet blandades med filtrerat naturligt havsvatten dit det tillsattes näring. Röret skakades om tills sedimentet var löst. Två ml av lösningen pipetterades i brunnar i en NUNC 24-hålsplatta som låg på is. Plattorna inkuberades i 4 °C, i en 12:12 ljus-mörkercykel med en ljusstyrka på 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. För att se ifall *S. marinoi* viloceller hade vaknat till liv undersöktes plattorna med mikroskop (Leica DMI3000 B) med ca två dagars mellanrum. Detta gjordes genom att pipettera sedimentlösningen i ett objektglas med brunn (Utermöhl-chamber). De första mikroalgerna som vaknade till liv var *Coscinodiscus sp.* och *Synedra ulna*. Efter ca två veckor kunde de första *S. marinoi* kedjorna observeras.

Tabell 1. Mängden sediment som användes ur de olika lagren i HAV1.

Sediment, cm	2-4	4-6	28- 30	30- 32	32- 34	34- 36	36- 38	38- 40	40- 42	42- 44	44- 46	46- 48
Massa(g)	0,55	0,51	0,54	0,55	0,51	0,47	0,50	0,62	0,69	0,59	0,57	0,53

2.3 Isolering av *S. marinoi*

Då *S. marinoi* syntes i brunnarna isolerades ca 24 cellkedjor per sedimentlager. Detta gjordes med en mikropipett under mikroskop (Nikon Diaphot TMD Inverted Tissue Culture Microscope) genom att en cellkedja överfördes från brunnen till en droppe f/2+Si medium. Från droppen flyttades cellkedjan till en ny droppe tills alla andra algceller eller rester av synligt organiskt material var borta, så att endast en cellkedja av *S. marinoi* återstod i droppen. Cellkedjan sattes i en egen brunn med 2 ml f/2+Si medium. Plattorna inkuberades i samma förhållanden som under uppväckningen. Efter ca en vecka granskades brunnarna för att följa med om *S. marinoi* hade ökat i mängd eller om det fanns kontaminationer i form av andra mikroalger. I de brunnar där det endast förekom cellkedjor av *S. marinoi* flyttades hela brunnens innehåll till 50 ml:s cellkulturflaskor med 10 ml f/2+Si för att acklimatiseras. Efter en vecka fylldes dessa flaskor upp till 40 ml med f/2+Si. Dessa klonala cellkulturer upprätthölls tills de användes för experimentet genom att överföra 5 ml cellkultur till en ny flaska med 35 ml f/2+Si ungefär var fjärde vecka.

2.4 Datering av sedimentkärnan

För datering av de olika lagren i HAV1 gjordes en Loss on Ignition-analys (LOI) vars resultat (halten av organiskt material) kunde jämföras med halten av organiskt material med tidigare LOI-analyser av en annan sedimentkärna från samma provtagningspunkt (Jokinen et al., 2018). Denna tidigare sedimentkärna hade även daterats med hjälp av ^{137}Cs som är en mer exakt dateringsmetod för t.ex. marina sediment. För att reda ut mängden organisk halt i HAV1 sattes ungefär en g av sediment per lager i en degel. Sedimentet torkades i 105 °C i ca 20 timmar varefter det sattes i en brännugn i 550 °C i två timmar och 30 minuter. Efter att proven tagits ur brännugnen kylde de ned i en torkanordning i en timme. Mellan alla dessa skeden mättes degeln för att kunna bestämma våtvikt, torrsvikt och till sist hur mycket som blivit kvar efter att det organiska materialet hade bränts bort (Tabell 2).

Tabell 2. Mängden sediment som användes för LOI- analyser ur de olika lagren i HAV1.

Djup, cm	Våtvikt, g	Torrsvikt, g (Efter 105°C)	Sediment, g (Efter 550°C)
0-2	0.683	0.315	0.282
2-4	1.786	0.347	0.309
4-6	1.606	0.395	0.353
6-8	1.342	0.292	0.264
8-10	1.286	0.341	0.308
10-12	1.413	0.354	0.322
12-14	1.530	0.374	0.333
14-16	1.875	0.486	0.439
16-18	1.227	0.316	0.286
18-20	1.377	0.399	0.363
20-22	1.443	0.381	0.343
22-24	1.697	0.455	0.408
24-26	1.271	0.293	0.264
26-28	1.318	0.365	0.331
28-30	1.042	0.282	0.254
30-32	1.288	0.342	0.306
32-34	1.796	0.432	0.387
34-36	1.229	0.298	0.266
36-38	1.284	0.326	0.291
38-40	1.486	0.370	0.332
40-42	1.808	0.501	0.452
42-44	1.431	0.377	0.341
44-46	1.646	0.401	0.363
46-48	1.214	0.342	0.306

2.5 Estimering av cellkoncentrationer

För att få en specifik cellkoncentration i början av ett experiment måste cellmängden i varje grundkultur räknas. Detta gjordes genom att pipettera en ml av grundkulturen till ett cellräkningsglas med 1000 rutor (sedwick rafter counting chamber). Ifall grundkulturen vuxit väl måste samplen spädas ut 1:10, medan grundkulturer som inte vuxit väl kunde pipetteras direkt till cellräkningskammaren. För att kunna uppskatta cellkoncentrationen räknades x antal rutor tills 300 celler räknats. Med hjälp av dessa värden kunde cellkoncentrationen i grundkulturen uppskattas för att kunna starta experiment med en specifik cellkoncentration.

2.6 Kurvor för in vivo fluorescens av klorofyll a och cellkoncentration

För att kunna jämföra fluorescens-värden med celler/ml-värden gjordes en standardkurva för hur mycket fluorescens en viss mängd mikroalger hade. Detta gjordes för varje isolat enskilt (Figur 6. Bilaga). Nya cellkulturer startades i 50 ml:s kulturflaskor med 5 ml av en gammal kultur och 35 ml f/2+Si. Flaskorna inkuberades i samma förhållanden som tidigare; efter två veckor räknades cellkoncentrationen för varje isolat. Fyra olika cellkoncentrationer gjordes för varje isolat: 10000, 50000, 100000 och 200000 celler/ml. Av dessa lösningar pipetterades 300 μ l i brunnar på en 96 håls platta (Corning 96 Flat Bottom black, clear bottom Polystyrol). Plattan analyserades i en Tecan infinite 200pro och inställningar specificeras i bilagan. Eftersom fluorescens-värden korrelerade med celler/ml-värden kunde analyserna utföras med fluorescens-värden .

2.7 Experimentupplägg

Till experimentet användes isolat från lagren 2-4, 28-30 och 46-48. Experimentet var upplagt så att det fanns fyra replikat av varje isolat och sju isolat från varje år (1963, 1990 och 2019). Därtill fanns det tolv kontroller som endast innehöll f/4+Si (Tabell 3). Tillsammans blev det 96 flaskor för varje temperatur (6 °C, 8 °C, 10 °C, och 14 °C). En vecka före experimentet startades nya grundkulturer (som växte i f/2+Si) som skulle användas till experimentet. Detta gjordes genom att överföra 5 ml av grundkulturen till en 50 ml:s kulturflaska med 50 ml f/4+Si. Ifall ett isolat inte hade vuxit tillräckligt överfördes 10 ml av grundkulturen. Startkulturerna sattes i f/4+Si för att aklimatisera dem till experimentförhållanden som genomfördes i f/4+Si. De nya kulturerna inkuberades i samma temperatur-och ljusförhållanden som beskrivits tidigare. Startkoncentrationen för varje isolat var 10 000 celler/ml. Vissa isolat växte sämre än andra och för att nå 10 000 celler/ml måste mer än 5 ml tillsättas i experimentflaskorna. I dessa fall (1-2 kulturer) tillsattes endast 5 ml av startkulturen för att inte få en allt för stor skillnad i mängden tillväxtmedium mellan de olika isolaten. Flaskorna sattes i ett odlingssskåp (Sanyo, MLR-352-PE Climate Chamber) med en av de bestämda temperaturerna och med en 12h ljus-mörkercykel med ljusstyrkan på 100 μ mol m⁻² s⁻¹. För att följa med tillväxten under experimentets gång

mättes in vivo fluorescens av klorofyll a i varje isolat dagligen. 300 µl av respektive isolat pipetterades till en egen brunn på en 96-hålsplatta (Corning 96 Flat Bottom black, clear bottom Polystyrol). Plattan analyserades med samma instrument som användes vid skapandet av standardkurvorna och med samma inställningar. Resultaten analyserades i Rstudio, och då en minskning i den exponentiella tillväxten kunde observeras, avslutades de isolat som följaktligen hade nått stationär fas. En ml av samtliga replikat av ifrågavarande isolat pipetterades i ett Eppendorfrör (1,5 ml). En droppe surgjord Lugol-lösning tillsattes i eppendorfröret och de förvarades i mörker (+8 °C) för senare undersökning. En del av Lugol-samplen skickades till Tallinn (Tallinn University of Technology) där deras cellstorlek mättes.

Tabell 3. Schema för mätning av in vivo fluorescens av klorofyll a på 96-hålsplattan. Algisolaten och kontroller är utsatta i slumpmässig ordning. Först nämns från vilket sedimentdjup isolaten härstammar från (ex. 28-30) och sedan nämns isolatets egna kod (t.ex. 03).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2-4 05	K	2-4 09	28-30 03	2-4 06	28-30 02	2-4 05	28-30 04	2-4 08	K	2-4 11	2-4 13
B	28-30 17	46-48 03	28-30 02	46-48 01	2-4 11	46-48 05	28-30 17	28-30 08	46-48 06	46-48 02	28-30 08	46-48 03
C	2-4 06	2-4 10	2-4 06	2-4 09	46-48 06	K	2-4 09	K	2-4 10	28-30 04	46-48 05	K
D	28-30 06	46-48 05	28-30 08	46-48 03	28-30 03	46-48 09	46-48 08	28-30 05	46-48 02	46-48 01	2-4 05	46-48 03
E	28-30 03	K	2-4 05	2-4 11	2-4 06	K	2-4 10	2-4 08	46-48 08	K	28-30 06	46-48 09
F	28-30 17	46-48 01	46-48 01	2-4 13	46-48 08	28-30 02	46-48 08	46-48 06	2-4 13	28-30 04	46-48 06	28-30 05
G	2-4 08	2-4 10	28-30 03	46-48 02	28-30 06	2-4 08	K	46-48 05	2-4 13	28-30 17	2-4 09	46-48 02
H	28-30 05	K	2-4 11	28-30 08	46-48 09	28-30 06	28-30 02	46-48 09	K	K	28-30 04	28-30 05

2.8 Mätning av cellstorlek

Lugol-samplen från experimentet blandades om med att suspendera med en pipett varefter en ml av lösningen pipetterades till ett cellräkningsglas där de lämnades för att lägga sig i 15 minuter. En förstoring på 200 användes för att ta 10 bilder från botten av cellräkningsglaset för att sedan mäta 5 celler per bild. Ifall det var nödvändigt togs fler bilder av samplet. Cellens bredd och längd mättes mha ett mikroskop (Olympus IX 51), bildanalys (Olympus cellSens Dimension imaging software) och kamera

(Olympus U-CMAD3 Digital Camera). Cellerna som mättes valdes slumpmässigt och endast en cell per kedja mättes. Membranet som binder ihop två celler räknades inte med (Karlson, Cusack & Bresnan, 2010).

2.9 Statistiska analyser

2.9.1 Datering av sediment

För att kunna datera sedimenten som användes i detta experiment gjordes en LOI-analys (Loss on ignition). Resultaten från LOI-analysen jämfördes med tidigare resultat från samma provtagningspunkt där man daterat sedimentkärnan med ^{137}Cs -metoden i kombination med LOI-analys (Jokinen et al., 2018). Resultaten från den tidigare analysen kan korreleras med resultaten som fås från den egna LOI-analysen. De två olika datamaterialen jämfördes med Pearsons korrelation.

2.9.2 Dagar till stationär fas

Datat visualiserades med en QQ-plot (quantile-quantile plot) där man kunde se att det inte var normalfördelat. Eftersom datat inte var normalfördelat analyserades det först med en GLM (General Linear Model) där man analyserade hur temperatur och kiselalgernas ålder påverkat på hur länge det tagit isolaten att nå stationär fas. Efter att GLM analysen gjordes en två-vägs ANOVA (Analysis of Variance) på resultaten.

2.9.3 Skillnader i tillväxtrater mellan populationer och temperatur

För att få en noggrannare bild på isolatens fitness räknades tillväxtraterna ut med hjälp av "growthrates" paketet i R (Petzoldt, 2019). Det räknar ut den maximala tillväxtraten genom att använda alla värden från de olika mätningarna som gjordes under experimentets gång. För att se ifall temperatur och de olika isolaten påverkar tillväxtraterna gjordes statistiska analyser. Då datat visualiserades med en QQ-plot visade det sig att det inte var normalfördelat. En GLS (Generalized Least Squares) användes för att se ifall isolat och temperatur samt interaktionen mellan dem påverkar tillväxtraterna. Genom att köra olika GLS-modeller och jämföra deras AIC (Akaike Information Criterion) värden kunde den rätta modellen som passade datat bäst väljas ut. Efter GLS-analysen gjordes en två-vägs ANOVA på GLS-resultaten.

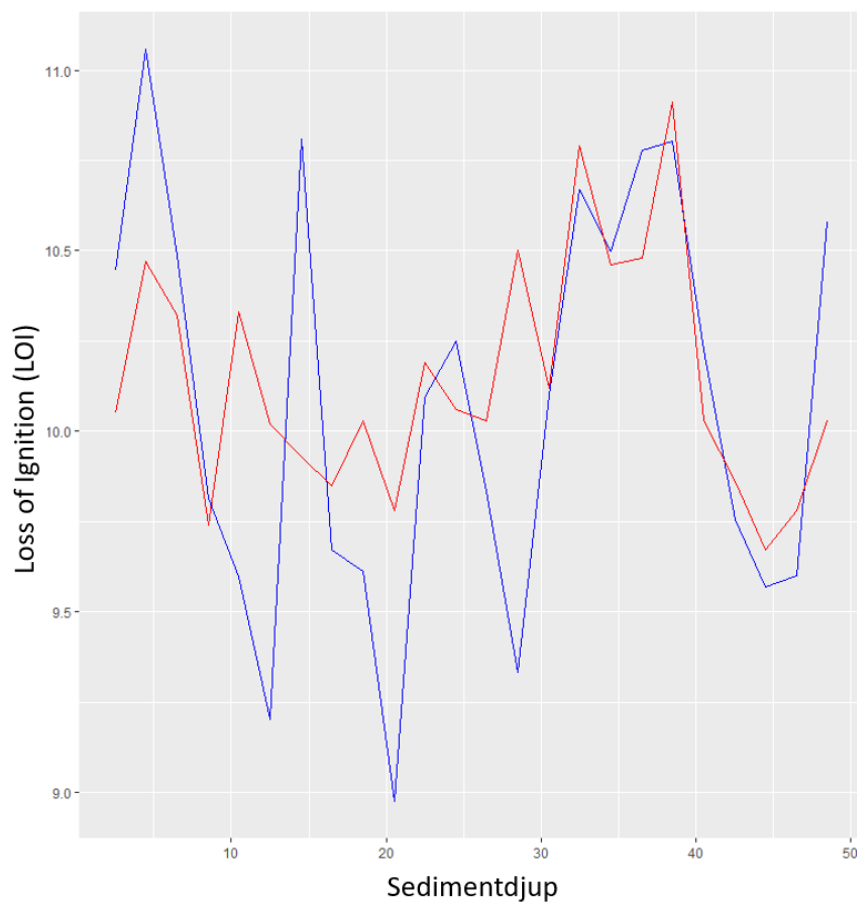
2.9.4 Cellstorlek

Cellstorleksdatat visualiserades med en QQ-plot och det visade sig att det inte var normalfördelat, dessutom gjordes ett Shapiro test som visade att datat inte godkände kraven för homogenitet. Datat analyserades med en GLM varefter det analyserades med en två-vägs ANOVA. I ANOVA:n undersöktes ifall temperatur och isolaternas ålder, samt interaktionen mellan dem påverkar cellstorleken.

3.0 Resultat

3.1 Datering av sediment

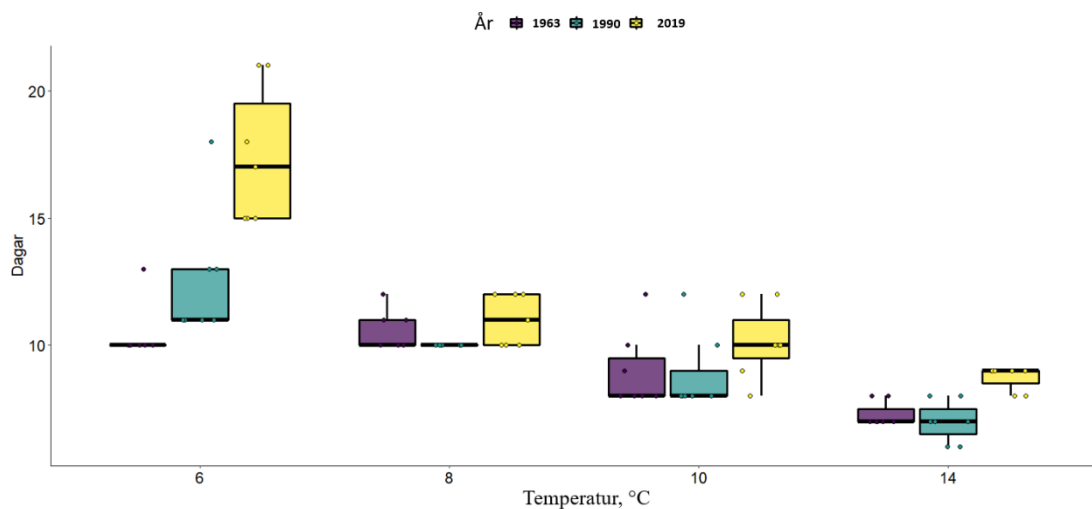
Då datat jämfördes med en Pearsons korrelation (Figur 2) visade det sig att det korrelerar med datat från tidigare undersökning ($p < 0.05$) och korrelationskoefficienten är 0,5547074.



Figur 2. Jämför LOI-värden från de olika djupen i sedimentkärnan. Den blåa linjen representerar värden från den sedimentkärna som använts i experimentet, den jämförs med den röda linjen som är värden från Turun Yliopisto (Jokinen et al., 2018).

3.2 Dagar till stationär fas

Det visade sig att både temperatur och mikroalgens ålder påverkar på hur länge det tar för mikroalgen att nå stationär fas ($p < 0,05$). Dock spelade temperaturen en större roll än mikroalgens ålder. Sambandet mellan temperatur och ålder påverkade också på hur länge det tog för isolat att nå stationär fas, men detta samband påverkade inte lika mycket ($p = 0,001786$) som variablerna påverkat enskilt (Tabell 1, bilaga). I allmänhet tog det längre tid att nå stationär fas för isolaten från 2019 då man jämför med 1990 och 1963 isolaten. Isolaten från 1990 var aningen snabbare än 2019 isolaten medan isolaten från 1963 i allmänhet var snabbast (Figur 3).

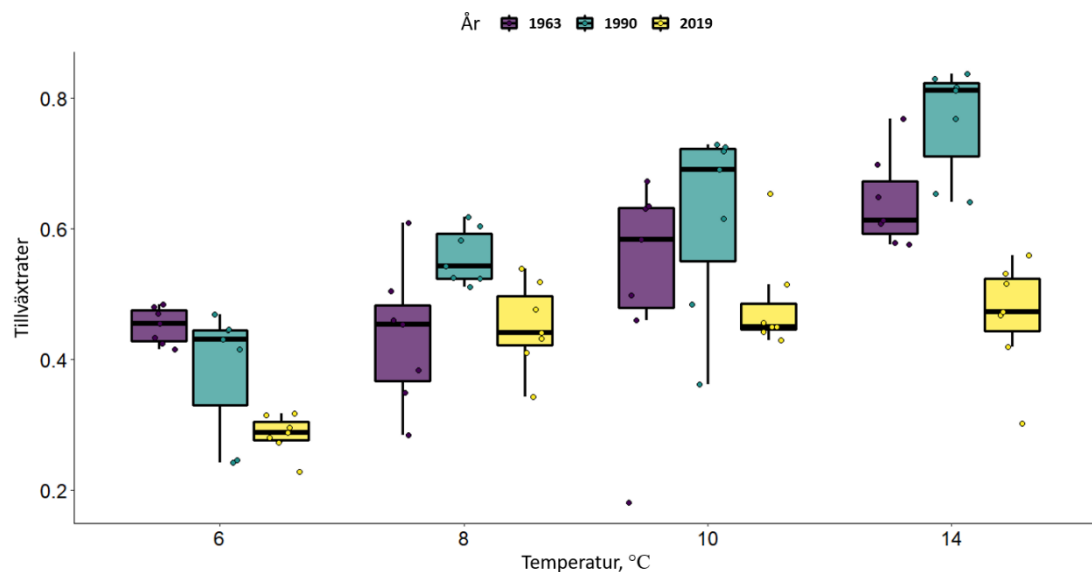


Figur 3. Visar hur länge det tagit att nå stationär fas i de olika temperaturerna (6, 8, 10 och 14 °C) för ett års isolat. Lila visar isolaten från 1963, grön från 1990 och gul från 2019.

3.3 Effekten av temperatur på tillväxt hos olika populationer

För att kunna se ifall det finns en skillnad mellan isolaten i olika temperaturer visualiserades mätvärden från experimentet. Resultaten visar att det finns en skillnad mellan fluorescens-värden i de olika temperaturerna. I allmänhet var de slutliga fluorescens-värdena från temperaturerna 6 och 14 °C liknande och så hade temperaturerna 8 och 10 °C liknande fluorescens-värden. Då man ser på skillnader mellan olika år kan man se en tydlig skillnad i tillväxtkurvan mellan åren 1963 och 2019 i 6 °C. Isolaten från 1963 har branta tillväxtkurvor medan isolaten från 2019 har en långsammare tillväxt i början (Figur 4, Bilaga).

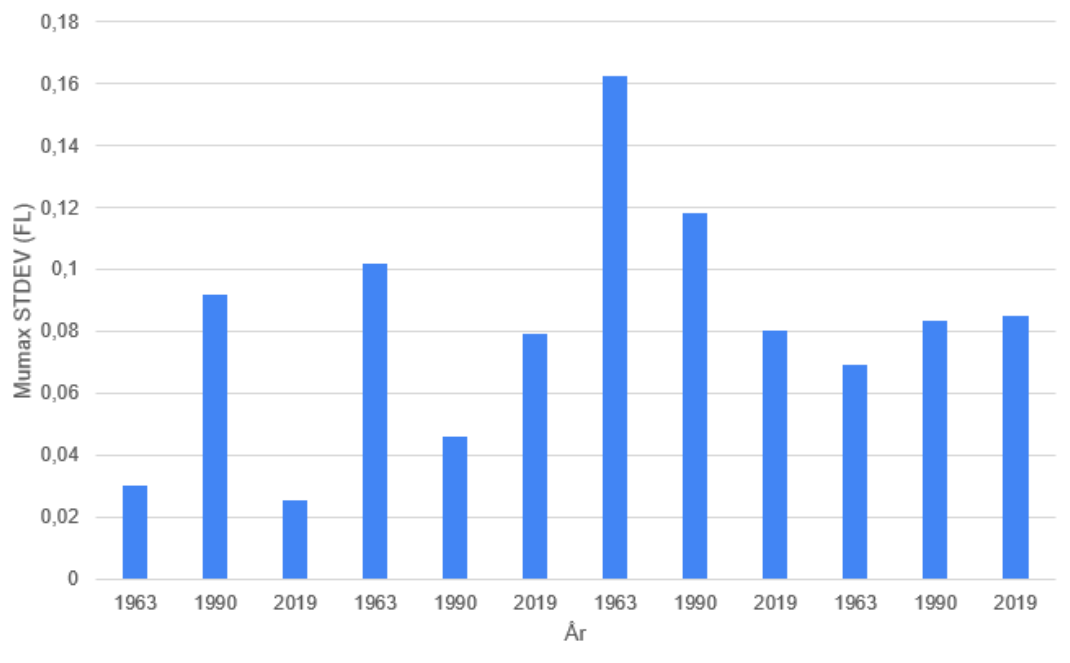
Då tillväxtraterna visualiserades kunde man se en tydlig skillnad mellan temperaturerna, ju högre temperatur desto högre tillväxtrater nåddes (Figur 4). Detta gällde för isolat från alla år. Grafen visar också att isolaten från 1963 och 1990 i allmänhet har högre tillväxtrater i lägre temperaturer vilket var väntat. Dock fortsätter denna trend även i den högsta temperaturen (14 °C) där isolaten från 1963 och 1990 fortfarande har högre tillväxtrater än isolaten från 2019. I den lägsta temperaturen nådde isolaten från 1963 den högsta tillväxtraten, de följdes av isolaten från 1990 och isolaten från 2019 som hade det lägsta värdet av de tre årtalen.



Figur 4. Tillväxtrater av fluorescence data för de olika isolaten i olika temperaturer (6, 8, 10 och 14 °C). Lila symboliserar tillväxtvärden för isolat från 1963, grön från 1990 och gul från 2019.

Anova resultaten visade starkt signifikanta resultat, dvs temperatur ($F=802,171$ $p<0.0001$) och år ($F=327,468$ $p<0.0001$) samt att interaktionen mellan dem ($F=102,064$ $p<0.0001$) har en inverkan på tillväxtraterna (Tabell 2, bilaga). Detta innebär att det finns skillnad mellan åren och att temperatur spelar en viktig roll.

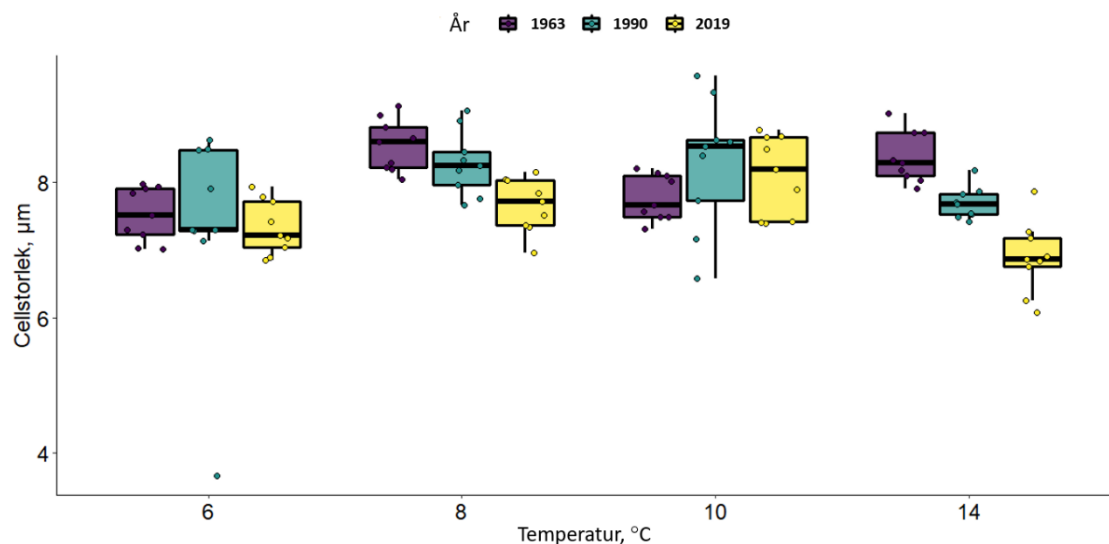
Då man ser på tillväxtraternas standardavvikelse är de relativt lika mellan åren vid 14 °C medan det inte finns mönster i de andra temperaturerna. Då man ser åren enskilt vid de olika temperaturerna finns det endast en växande trend med stigande temperatur för åren 2019 medan det inte finns ett mönster för de andra årtalen (Figur 5).



Figur 5. Mumax standardavvikelse för de olika åren (1963,1990 och 2019) i olika temperaturer (6, 8, 10 och 14 °C).

3.4 Cellstorlek

Data visualiserades för att se ifall cellerna från 2019 är minst och det visade sig att de i allmänhet var mindre än cellerna från de andra åren (Figur 6). Cellerna från 1963 var störst vid temperaturerna 6, 8 och 14 °C, cellerna från 1990 var mittemellan förutom vid 10 °C där de hade störst celler. Hypotesen stämde för alla temperaturer förutom 10 °C, där cellerna från 1990 var störst följda av cellerna från 2019 och cellerna från 1963 kom sist. Man ser en tydlig skillnad i cellstorlek mellan de olika åren men däremot har temperatur inte en tydlig påverkan på cellernas storlek.



Figur 6. Cellstorlekarna (μm) från de olika åren i olika temperaturer (6, 8, 10 och 14 $^{\circ}\text{C}$). Lila symboliserar mymaxvärden för isolat från 1963, grön från 1990 och gul från 2019.

Anovaresultaten visade att beroende på från vilket år isolaten är påverkar de signifikant cellstorleken ($p=0,002$). Detta gällde dock inte för temperatur ($p=0,735$), men däremot var interaktionen mellan temperatur och år signifikant ($p=0,029$)(Tabell 3, bilaga).

4.0 Diskussion

4.1 Dagar till stationär fas

Man kunde se att isolaten från 2019 i allmänhet behövde längre tid att nå stationärfas än isolaten från 1990 och 1963. Detta kan bero på att det alltid fanns några isolat från 2019 i varje temperaturbehandling som inte hade vuxit ordentligt innan experimentet sattes igång. Vad detta beror på är oklart men dessa isolat hade en låg tillväxt i experimentet och kan ha förvrängt resultaten så att isolaten från 2019 krävde en längre tid för att nå stationärfas. Ifall alla isolat hade vuxit på liknande sätt skulle resultaten eventuellt vara annorlunda och mer jämna. En annan orsak till att isolaten från år 2019 behövt längre tid att nå stationärfas är antagligen på grund av att inte optimala temperaturer använts i experimentet. Detta skulle innebära att isolaten från år 2019 är bättre anpassade till högre temperaturer men eftersom 14 $^{\circ}\text{C}$ var vårt experiments högsta temperatur kan man omöjligt säga att detta stämmer. Isolaten från alla år har också nått stationärfas snabbare med stigande temperatur, vilket betyder att dessa

temperaturersom använts i experimentet förmodligen inte varit tillräckligt höga. Med en högre temperatur kunde man kanske se en större skillnad mellan år och de äldre isolaten skulle eventuellt behöva mer tid att nå stationärfas eftersom de inte är anpassade för så höga temperaturer. I ett relaterat experiment som kördes samtidigt men med 26 °C dog alla isolat förutom ett från år 2019. Denna temperatur var för extrem men resultat från temperaturer mellan 14 och 26 °C skulle kunna visa större och tydligare skillnader mellan isolaten från åren 2019, 1990 och 1963. En orsak till att resultaten har samma trend i olika temperaturer kan bero på att det endast fanns en stressfaktor. I naturliga förhållanden förekommer fler variabler så som näring och ljus som kan påverka tillväxten av mikroalgen. Ifall mer naturliga förhållanden skulle ha använts skulle vissa isolat varit mer stressade än andra och man skulle eventuellt se en större variation mellan isolat eftersom det finns fler stressfaktorer.

I en studie av (Vidoudez, Pohnert, 2019) undersöktes metabolismen i olika tillväxtstadier i en stam av *S. marinoi*. De kom fram till att det finns en stor variation i metabolismen mellan tillväxtstadier (Vidoudez, Pohnert, 2019). I denna undersökning såg jag endast på hur länge det tog för ett isolat att nå stationärfas men det skulle vara intressant att se hur de olika isolatens metabolism skiljer sig och om det skett en förändring sen år 1963. Man kan nu redan se att det finns skillnad mellan år och temperatur genom att se på hur snabbt isolaten når stationärfas. Dessutom skulle det ge en insikt på metabolismen i olika temperaturer och ifall det finns tydliga trender sedan 1963 skulle man kunna förutsäga hur *S. marinoi* reagerar i framtida scenarion.

4.2 Tillväxtrater

Som redan tidigare nämnts ser man även här att isolaten från 1963 och 1990 har högre tillväxtrater i alla temperaturer vilket inte var väntat. Detta kan tyda på att *S. marinoi* har en bred temperaturlöslighet och att inte tillräckligt höga temperaturer användes i experimentet för att kunna bevisa att isolaten från år 2019 är mer temperaturlösliga än de äldre isolaten. I en studie av Anderson och Ryneason (2020) visar de att *S. marinoi*'s optimala temperatur ligger vid ca 22 grader, vid denna temperatur är tillväxtraten som högst och då temperaturen ökar sjunker tillväxtraten drastiskt (Anderson, Ryneason, 2020). Ett problem kan vara att 14 °C inte är tillräckligt högt för att isolaten från 2019 skall kunna växa snabbare än de äldre isolaten. För att få svar på detta borde experimentet utföras i ett antal högre temperaturer eller så skulle man tillsätta en annan

stressfaktor. I en studie av Suzuki och Takahashi (1995) undersöktes tillväxten av olika kiselalger i olika temperaturer varav *S. marinoi* var en av dem. Alla kiselalger hade en ökad tillväxt med en ökad temperatur ända tills de nådde sin toleransgräns varefter tillväxten minskade drastiskt. Optimala temperaturen för *S. marinoi* i detta experiment var 25 grader (Suzuki, Takahashi, 1995). Detta innebär att för att få veta de olika isolatens temperaturgräns och kunna se ifall det finns en skillnad mellan år måste man se en tydlig minskning i tillväxtrater. För att få reda på de olika isolatens temperaturnisch behövs undersökningar i flera olika temperaturer så att man kan bestämma den optimala temperaturen och den nedre samt övre toleransgränsen. För isolaten från 2019 var tillväxtraterna i temperatur 10 och 14 °C ganska liknande men man kunde inte se en minskning. Ifall man vill veta isolatens toleransgräns krävs experiment med högre temperaturer.

Då man ser på den lägsta temperaturen (6 °C) så har de äldsta isolaten högsta tillväxtraten, de yngsta isolaten den lägsta och isolaten från 1990 är mittemellan. Dessa resultat var förväntade oss och tyder på att äldre isolat är bättre anpassade till lägre temperaturer. Detta mönster fortsätter dock inte i de högre temperaturerna. I de andra temperaturerna byter isolaten från 1990 plats med isolaten från 1963. Detta skulle betyda att 6 °C och lägre gynnar de äldsta isolaten men redan vid 8 grader är isolaten från 1990 bättre anpassade och isolaten från 1963 har en lägre tillväxtrat.

En annan sak som är intressant är att fastän isolaten från 2019 växer sämst i alla temperaturer så växer de fortfarande, vilket kunde tyda på att de kan ha en väldigt bred tolerans. Detta skulle dock också kunna vara ett faktum för isolaten från 1963 och 1990 men på grund av att inte tillräckligt höga temperaturer använts så är det svårt att säga. Sist och slutligen är skillnaderna i tillväxtrater mellan de olika åren inte så stora och då temperaturen ändras så ökar tillväxtraterna för isolaten från de olika åren ganska liknande. Detta innebär att man kan se att det finns skillnader mellan åren men att de beter sig ganska liknande i de olika temperaturerna

Det är också intressant att se på isolaten enskilt från de olika åren (Figur 5. Bilaga), alla har lite olika tillväxtrater. Detta kan innebära att även inom en population finns det individer som har sin egen temperaturnisch, vilket tyder på att det finns en stor genetisk diversitet. En stor genetisk diversitet ger populationen en större motståndskraft och en bättre förmåga att anpassa sig (Godhe, Ryneason, 2017).

4.3 Cellstorlek

I figuren kunde man tydligt se att det fanns ett mönster i cellstorleken på olika isolat, vilket också var en hypotes, dvs att celler från 2019 var minst och celler från 1963 var störst. Detta gällde i temperaturerna 6, 8 och 14 °C men inte för 10 grader. Samplen från 10 °C behandlingen var svåra att analysera eftersom de var delvis nedbrutna, detta gav resultat som inte stämde överens med de andra resultaten. I studien av Svensson, Norberg och Snoeijs (2014) undersöktes hur temperatur och andra stressfaktorer påverkar kiselalgers cellstorlek. Ett av deras resultat visade att cellstorleken i en population minskade med 2,9% och 3,3% per ökande °C (Svensson, Norberg & Snoeijs, 2014). Dessa resultat liknade inte resultaten från denna undersökning eftersom cellstorleken inte minskade med en temperaturökning.

En annan studie av Yvon et al. (2011) visade det sig att på grund av höga temperaturer minskar kiselalgers biomassa, detta kan rubba balansen i näringskedjor (Yvon-Durocher et al., 2011). Fastän studien gjordes med kiselalger i en sötvattenmiljö kan det relateras till Östersjön. I resultaten kan man se att dagens celler är i allmänhet mindre än de celler som existerade i vattenpelaren för 60 år sedan. Dock kan det vara svårt att veta hur näringsväven har anpassat sig till kiselalger som är mindre och ifall detta kan vara ett problem i framtiden.

4.4 Allmän diskussion

Mikroalgers fitness mäts i form av in vivo fluorescence av klorofyll a som sedan omvandlas till tillväxtrat. In vivo fluorescensen motsvarar mängden celler och ifall ett isolat har högre fluorescens-värde än ett annat isolat skulle det innebära att det har högre fitness. Problemet med denna metod är att man inte vet ifall förändringen är genetisk eller fenotypisk. Man vet att isolaten skiljer sig men det kan vara svårt att säga vad det beror på. I en undersökning av Bestion et al. (2018) undersöktes sötvattensfytoplankton angående deras värmeterolerans i olika näringskoncentrationer. De kom fram till att en stor mängd näring kan orsaka en högre tolerans mot höga temperaturer (Bestion, Schaum & Yvon-Durocher, 2018). Eftersom f/4+Si näringsmedium användes i våra experiment, vilket är en onaturligt hög näringskoncentration kan det vara att våra isolat är mycket mer temperaturtåliga. Med en lägre näringskoncentration skulle man eventuellt få tydligare skillnader mellan år och eventuellt skulle vissa isolat visa en större stressrespons. I Bestions artikel

undersöktes sötvattensfytoplankton men liknande resultat visades i den marina kiselalgen *Thalassiosira pseudonana* i en undersökning av Thomas et al. (2017). I denna undersökning använde man sig av kulturer från en kulturbank (Thomas et al., 2017) vilket inte helt motsvarar en naturlig stam. I detta experiment användes naturliga isolat, men resultaten var ändå liknande som i Bestions undersökning. Detta kan betyda att *S. marinoi* populationen i Östersjön kan klara sig bättre på grund av den höga näringskoncentrationen (Rönnerberg, Bonsdorff, 2004), dock vet man inte hur detta kommer att utvecklas och det är många fler faktorer i spel än temperatur och näring. Fenomenet att organismer blir mindre tåliga till höga och låga temperaturer med en mindre mängd näring förekommer även inom andra organismer såsom koraller (Wiedenmann et al., 2013), trädplantor (DeHayes, Ingle & Waite, 1989) och lax (Brett, 1971).

5.0 Slutsatser

Då man ser på resultaten från dessa experiment ser man att det finns skillnader mellan de olika åren, dvs att tillväxtraterna var högst i isolaten från 1963 i den lägsta temperaturen, vilket var förväntat. I den varmaste behandlingen hade isolaten från 2019 inte den högsta tillväxtraten. Cellstorlek resultaten visar också att det finns en skillnad mellan åren, dvs att celler från 2019 i allmänhet var minst. Temperatur påverkar cellstorleken i lika mån för alla år. Dessa resultat visar att det finns en skillnad mellan år men också mellan olika isolat inom ett år och att det skett en förändring i *S. marinoi* populationen de senaste 60 åren. Skillnaderna inom en population från ett specifikt år innebär att det finns genetiskt mångfald inom populationen som gör att den lättare kan anpassa sig till framtida förändringar. För att få en ännu klarare bild på dessa skillnader och hypoteser som lagts upp skulle det behövas liknande experiment med högre temperaturer. Det är inte endast temperaturen som har ändrats de senaste åren utan andra variabler som näringskoncentrationer och ljus. För att komma så nära naturliga förhållanden innebär det att använda sig av fler variabler och då kunna se hur de olika isolaten reagerar i naturliga förhållanden.

Referenser

- Anderson, S.I. & Rynearson, T.A. 2020, "Variability approaching the thermal limits can drive diatom community dynamics", *Limnology and Oceanography*, vol. 65, no. 9, pp. 1961-1973.
- Bestion, E., Schaum, C. & Yvon-Durocher, G. 2018, "Nutrient limitation constrains thermal tolerance in freshwater phytoplankton", *Limnology and Oceanography Letters*, vol. 3, no. 6, pp. 436-443.
- Bijlsma, R. & Loeschcke, V. 2005, "Environmental stress, adaptation and evolution: an overview", *Journal of Evolutionary Biology*, vol. 18, no. 4, pp. 744-749.
- Brett, J.R. 1971, "Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*)", *American Zoologist*, vol. 11, no. 1, pp. 99-113.
- DeHayes, D.H., Ingle, M.A. & Waite, C.E. 1989, "Nitrogen fertilization enhances cold tolerance of red spruce seedlings", *Canadian journal of forest research*, vol. 19, no. 8, pp. 1037-1043.
- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Duffy, J.E., Barry, J.P., Chan, F., English, C.A., Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, A.B. & Knowlton, N. 2011, "Climate change impacts on marine ecosystems", .
- Godhe, A. & Rynearson, T. 2017, "The role of intraspecific variation in the ecological and evolutionary success of diatoms in changing environments", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 372, no. 1728, pp. 20160399.
- Guillard, R.R. 1975, "Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates" in *Culture of marine invertebrate animals* Springer, , pp. 29-60.
- Härnström, K., Ellegaard, M., Andersen, T.J. & Godhe, A. 2011, "Hundred years of genetic structure in a sediment revived diatom population", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 10, pp. 4252-4257.
- Jokinen, S.A., Virtasalo, J.J., Jilbert, T., Kaiser, J., Dellwig, O., Arz, H.W., Hänninen, J., Arppe, L., Collander, M. & Saarinen, T. 2018, "A 1500-year multiproxy record of coastal hypoxia from the northern Baltic Sea indicates unprecedented deoxygenation over the 20th century", *Biogeosciences*, vol. 15, no. 13, pp. 3975-4001.

- Karlson, B., Cusack, C. & Bresnan, E. 2010, "Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis.",
- Kawecki, T.J. & Ebert, D. 2004, "Conceptual issues in local adaptation", *Ecology Letters*, vol. 7, no. 12, pp. 1225-1241.
- Latta, R.G. 2010, "Natural selection, variation, adaptation, and evolution: a primer of interrelated concepts", *International journal of plant sciences*, vol. 171, no. 9, pp. 930-944.
- Neumann, T. 2010, "Climate-change effects on the Baltic Sea ecosystem: A model study", *Journal of Marine Systems*, vol. 81, no. 3, pp. 213-224.
- O'Donnell, D.R., Hamman, C.R., Johnson, E.C., Kremer, C.T., Klausmeier, C.A. & Litchman, E. 2018, "Rapid thermal adaptation in a marine diatom reveals constraints and trade-offs", *Global Change Biology*, vol. 24, no. 10, pp. 4554-4565.
- Petzoldt, T. 2019, "No title", *Estimation of Growth Rates with Package Growthrates*, .
- Räisänen, J.A. 2017, "Future climate change in the Baltic Sea Region and environmental impacts", *Oxford Research Encyclopedias Climate Science*, .
- Rengefors, K., Kremp, A., Reusch, T.B. & Wood, A.M. 2017, "Genetic diversity and evolution in eukaryotic phytoplankton: revelations from population genetic studies", *Journal of Plankton Research*, vol. 39, no. 2, pp. 165-179.
- Reusch, T.B., Dierking, J., Andersson, H.C., Bonsdorff, E., Carstensen, J., Casini, M., Czajkowski, M., Hasler, B., Hinsby, K. & Hyytiäinen, K. 2018, "The Baltic Sea as a time machine for the future coastal ocean", *Science Advances*, vol. 4, no. 5, pp. eaar8195.
- Rönnerberg, C. & Bonsdorff, E. 2004, "Baltic Sea eutrophication: area-specific ecological consequences", *Hydrobiologia*, vol. 514, no. 1-3, pp. 227-241.
- Schlüter, L., Lohbeck, K.T., Gröger, J.P., Riebesell, U. & Reusch, T.B. 2016, "Long-term dynamics of adaptive evolution in a globally important phytoplankton species to ocean acidification", *Science advances*, vol. 2, no. 7, pp. e1501660.
- Schönfeld, J. 2011, "The use of foraminifera for bio-monitoring of marine environments- results and recommendations from the FOBIMO Workshop", .
- Sommer, U. & Lengfellner, K. 2008, "Climate change and the timing, magnitude, and composition of the phytoplankton spring bloom", *Global Change Biology*, vol. 14, no. 6, pp. 1199-1208.

- Suzuki, Y. & Takahashi, M. 1995, "Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature", *Journal of Phycology*, vol. 31, no. 6, pp. 880-888.
- Svensson, F., Norberg, J. & Snoeijs, P. 2014, "Diatom cell size, coloniality and motility: trade-offs between temperature, salinity and nutrient supply with climate change", *PloS one*, vol. 9, no. 10, pp. e109993.
- Thomas, M.K., Aranguren-Gassis, M., Kremer, C.T., Gould, M.R., Anderson, K., Klausmeier, C.A. & Litchman, E. 2017, "Temperature–nutrient interactions exacerbate sensitivity to warming in phytoplankton", *Global Change Biology*, vol. 23, no. 8, pp. 3269-3280.
- Vidoudez, C. & Pohnert, G. 2019, "Comparative metabolomics of the diatom *Skeletonema marinoi* in different growth phases", *Metabolomics*, vol. 8, no. 4, pp. 654-669.
- Wiedenmann, J., D'Angelo, C., Smith, E.G., Hunt, A.N., Legiret, F., Postle, A.D. & Achterberg, E.P. 2013, "Nutrient enrichment can increase the susceptibility of reef corals to bleaching", *Nature Climate Change*, vol. 3, no. 2, pp. 160-164.
- Yousey, A.M., Chowdhury, P.R., Biddinger, N., Shaw, J.H., Jeyasingh, P.D. & Weider, L.J. 2018, "Resurrected 'ancient' *Daphnia* genotypes show reduced thermal stress tolerance compared to modern descendants", *Royal Society open science*, vol. 5, no. 3, pp. 172193.
- YVON-DUROCHER, G., Montoya, J.M., Trimmer, M. & Woodward, G. 2011, "Warming alters the size spectrum and shifts the distribution of biomass in freshwater ecosystems", *Global Change Biology*, vol. 17, no. 4, pp. 1681-1694.

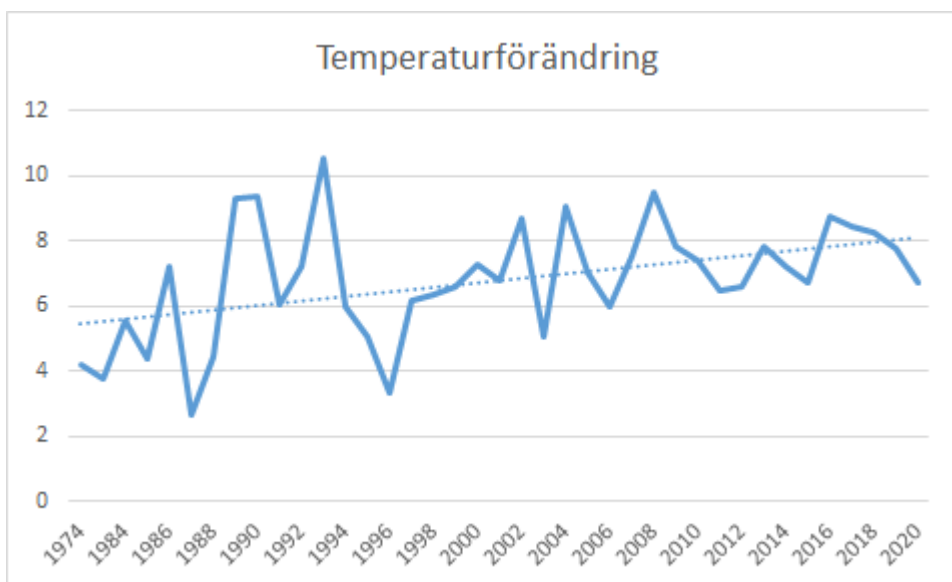
Bilaga

Anpassning hos kiselalgen *Skeletonema marinoi* till stigande vattentemperaturer under 1900-talet

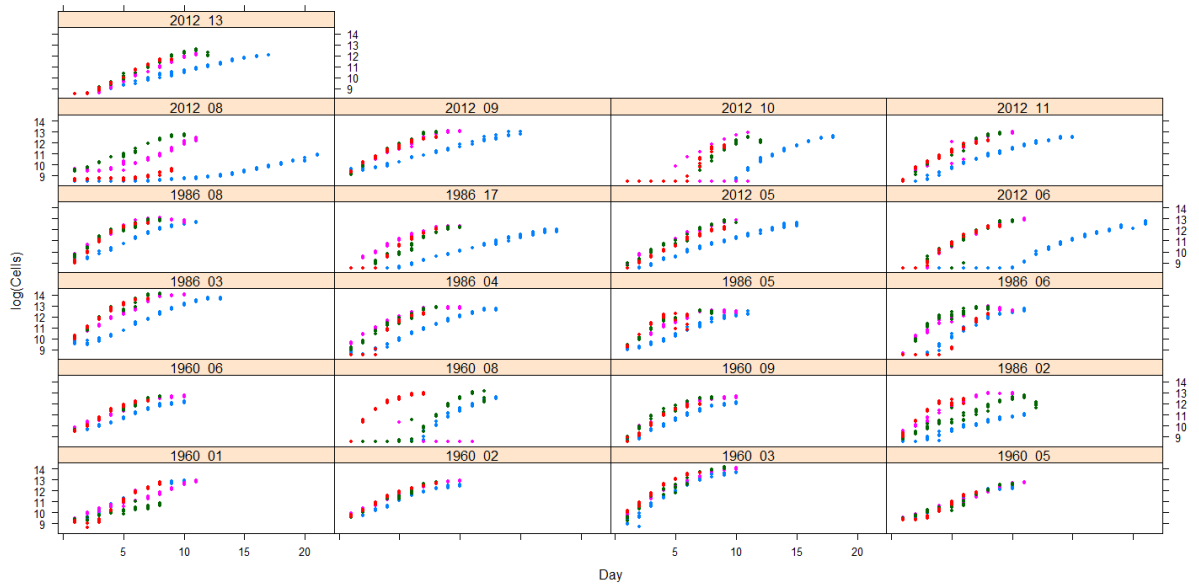
Maximilian Gareis

Inställningar för Tecan infinite 200pro

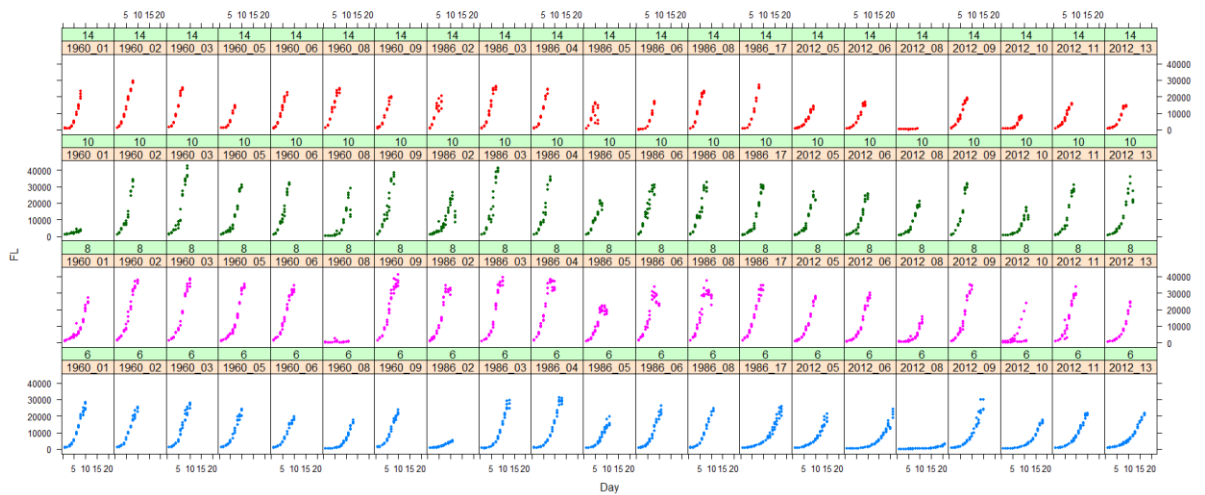
Fluorescence Top Reading Mode, Multiple Reads per Well (Square (filled)) 3x3, Multiple Reads per Well (Border) 750 μm , Excitation Wavelength 425 nm, Emission Wavelength 680 nm, Excitation Bandwidth 9 nm, Emission Bandwidth 20 nm, Gain 145, Number of Flashes 25, Integration Time 20 μs , Lag Time 0 μs , Settle Time 0 μs , Z-Position (Manual) 20471 μm .



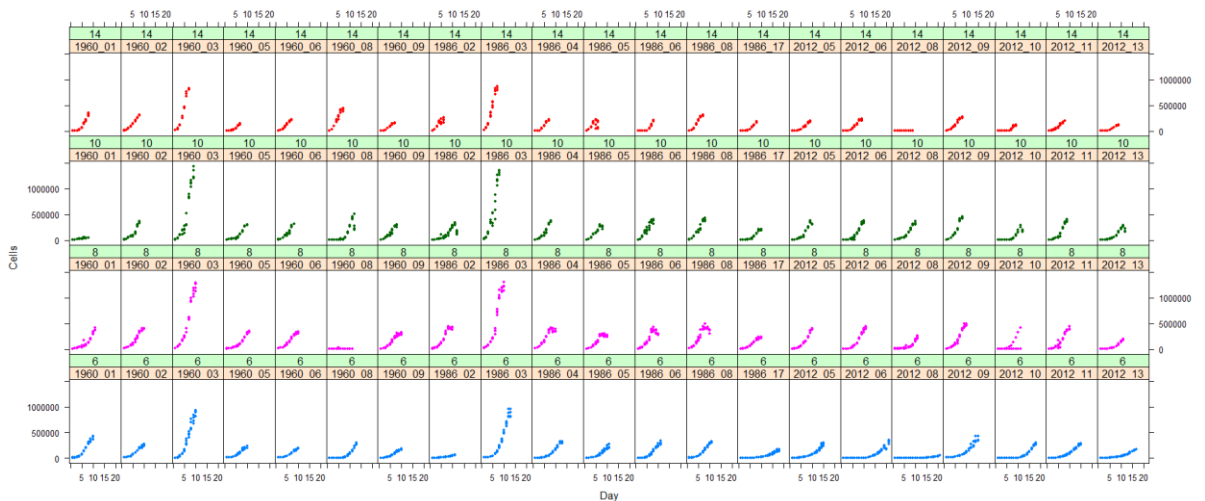
Figur 1. Temperaturförändringen i Seili, Åbo skärgård. Vattentemperaturen för maj 1-5 meters djup.



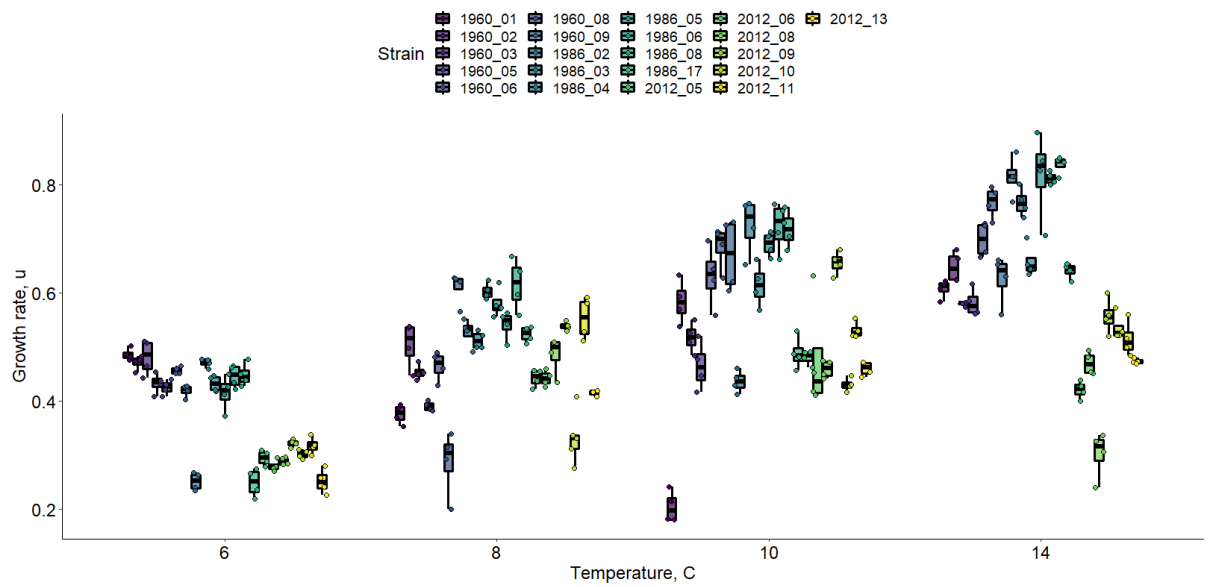
Figur 2. Logtransformerade FL-värden för de olika algisolaten i olika temperaturer. De olika färgerna symboliserar de olika temperaturbehandlingarna.



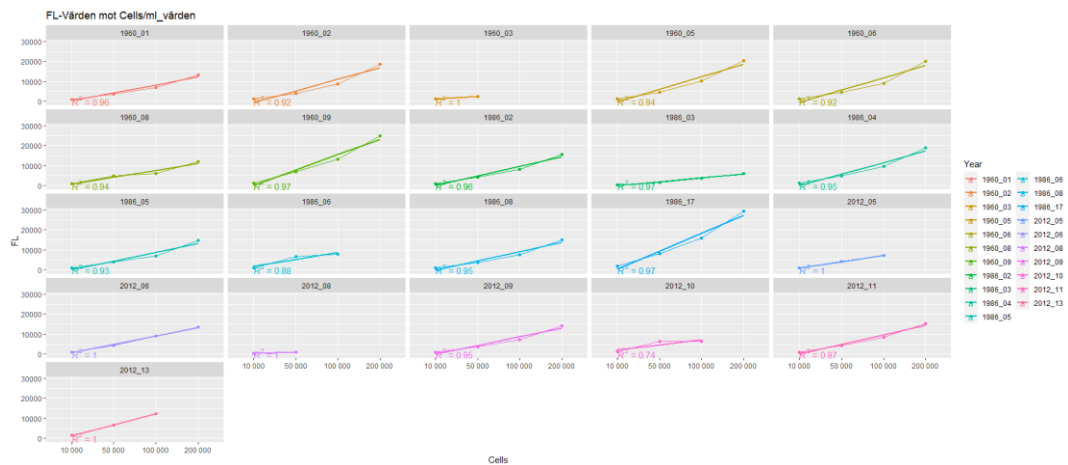
Figur 3. FL-värden för de olika algisolaten i de olika temperaturbehandlingarna.



Figur 4. Celler/ml värden för de olika algisolaten i de olika temperaturbehandlingarna



Figur 5. Plottade tillväxtrater av de olika algisolaten i de olika temperaturbehandlingarna



Figur 6. FL-värden till celler/ml

Pearson's product-moment correlation

```

data: LOI$LOI_UTU and LOI$LOI_AA
t = 3.127, df = 22, p-value = 0.004905
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.1949295 0.7829137
sample estimates:
cor
0.5547074
    
```

Figur 7. Resultat från korrelationsanalysen där LOI-värden (Loss of Ignition) jämfördes med referenskärnans LOI-värden.

Tabell 1. Statistiska resultaten från hur länge det tog för ett isolat att nå stationärfas.

```
Response: Days
          LR Chisq Df Pr(>Chisq)
Year          25.938  1  3.526e-07 ***
Temperature  100.625  1  < 2.2e-16 ***
Year:Temperature  9.757  1  0.001786 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Tabell 2. AIC-värden för olika GLS-modeller och anovaresultat för tillväxtrater.

```
Model df      AIC      BIC  logLik  Test  L.Ratio p-value
m1     1  5 -447.0491 -428.0234 228.5245
m2     2  6 -789.2968 -766.4660 400.6484 1 vs 2 344.2477 <.0001
m4     3 89 -924.1253 -585.4683 551.0626 2 vs 3 300.8285 <.0001
m3     4 26 -829.8225 -730.8889 440.9112 3 vs 4 220.3028 <.0001
m5     5 88 -612.3721 -277.5202 394.1860 4 vs 5 93.4504 0.006
> anova(m4) # significant interaction - no further model selection
Denom. DF: 332
      numDF  F-value p-value
(Intercept)      1 14784.136 <.0001
Year              1  327.468 <.0001
Temperature       1  802.171 <.0001
Year:Temperature  1  102.064 <.0001
```

Tabell 3. Statistiska resultat från cellstorlekanalysen.

```
Response: Size_ave
          LR Chisq Df Pr(>Chisq)
Year          10.2258  1  0.001385 **
Temperature    0.1144  1  0.735200
Year:Temperature  4.7579  1  0.029165 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```