

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Protistologie



**Bc. Kateřina Trumhová**

**Diverzita druhového komplexu *Micrasterias papillifera/radiosa* (Desmidiiales)**

Diversity of the *Micrasterias papillifera/radiosa* (Desmidiiales) species complex

**Diplomová práce**

Školitel: Mgr. Jan Šťastný, Ph.D.

Praha, 2016

### **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 dne 10. 8. 2016

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému školiteli Honzovi Šťastnému, za trpělivou pomoc a rady, které mi během vypracování této práce a celého magisterského studia poskytl. Pavlovi Škaloudovi a Míše Klimešové děkuji za pomoc s fylogenetickými analýzami. Terce Šoljakové a Martinu Pusztaiovi děkuji za vzorky přivezené z Norska a Helče Bestové za zapůjčení jejích kultur. Zároveň děkuji i všem kamarádům a kolegům z Algologického oddělení za příjemnou atmosféru, ve které je radost pracovat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu, kterou mi poskytovala po dobu mého studia.

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá diverzitou druhového komplexu *Micrasterias papillifera*/ *M. radiosa* (Desmidiáles). Oba druhy patří mezi obyvatele ohrožených rašelinných biotopů a jsou také využívány v biomonitoringu. Záznamy v taxonomických publikacích uvádí pro oba tyto druhy velké množství variet, jejichž morfologie se ale částečně překrývá, revize tohoto komplexu byla proto nezbytná. Kmeny byly izolovány z rašelinišť a jezer v rámci Evropy. Dataset byl také doplněn o kmeny získané ze sbírek řas. Výsledky fylogenetických analýz sekvencí pro úsek ITS a *psaA* ukázaly, že reálná diverzita je v případě druhu *Micrasterias papillifera* Brébisson ex Ralfs mnohem menší, než nakolik se dalo předpokládat na základě množství popsaných variet. Ve fylogenetickém stromě sekvencí ITS sice můžeme najít malou vnitrodruhovou variabilitu linie ‚*papillifera*‘, která ale nekorresponduje s morfologií určených variet tohoto druhu. Tento druh je morfologicky velmi plastický a dokonce do jeho linie spadají i některé izoláty určené jako *Micrasterias radiosa* Ralfs. Naopak v linii ‚*radiosa*‘ se nachází pouze několik málo izolátů a půjde spíše o vzácný druh s omezeným rozšířením. Oba druhy jsou vůči sobě dobře morfologicky vymezené a jsou od sebe dobře rozpoznatelné na základě několika znaků.

**Klíčová slova:** *Micrasterias papillifera*, *Micrasterias radiosa*, krásivky, druhový komplex, fylogeneze, morfologie

## **Abstract**

This Master's thesis deals with diversity within the *Micrasterias papillifera*/ *M. radiosa* (Desmidiaceae) species complex. Both species are inhabitants of endangered biotopes, like peat-bogs and, like other desmids, are used for biomonitoring. Many described varieties for both of them can be found in taxonomic literature, but their morphology is overlapping and revision of this species complex seemed to be necessary. All strains were isolated from peat-bogs and lakes across Europe and my dataset was properly completed by strains from algal collections. Results of phylogenetic analysis of sequences for ITS and *psaA* showed, that the real intraspecific diversity of *Micrasterias papillifera* Brébisson ex Ralfs was overestimated. Although I could find a little intraspecific diversity within the '*papillifera*' lineage in the phylogenetic tree based on ITS sequences, it did not correspond with a morphology of isolates. *M. papillifera* possess unexpected morphological plasticity and also some isolates designated as *Micrasterias radiosa* Ralfs were present in this lineage. On the contrary, there were only a few isolates in the lineage '*radiosa*'. This species seems to be relatively rare and probably has limited distribution. Both species are morphologically well delimited from each other on the basis of several characters and can be relatively simply determined.

**Keywords:** *Micrasterias papillifera*, *Micrasterias radiosa*, desmids, species complex, phylogeny, morphology

# Obsah

1	Seznam zkratek.....	8
2	ÚVOD.....	9
2.1	Objevování diverzity krásivek.....	9
2.2	Rozšíření krásivek a biomonitring .....	12
2.3	Rod <i>Micrasterias</i> .....	12
2.3.1	Morfologie a rozmnožování.....	12
2.3.2	Fylogeneze a diverzita rodu <i>Micrasterias</i> .....	14
2.4	Druhový komplex <i>Micrasterias papillifera/radiosa</i> .....	19
2.4.1	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs .....	19
2.4.2	<i>Micrasterias radiosa</i> Ralfs.....	20
2.5	Cíle práce.....	22
3	METODY.....	23
3.1	Odběrové lokality a získání vzorků.....	23
3.1.1	Česká republika .....	23
3.1.2	Švédsko .....	24
3.1.3	Irsko.....	24
3.1.4	Norsko .....	24
3.1.5	Metody odběru vzorků .....	24
3.1.6	Kmeny získané ze sbírek řas .....	24
3.2	Kultivace.....	25
3.2.1	Příprava média.....	25
3.2.2	Izolace buněk a kultivace.....	25
3.3	Izolace DNA, PCR a sekvenování .....	26
3.4	Fylogenetické analýzy .....	28
3.5	Světelná mikroskopie a měření buněk.....	29
4	VÝSLEDKY .....	30
4.1	Diverzita.....	30
4.2	Morfologie .....	33

5	DISKUZE.....	43
5.1	Linie ‚ <i>papillifera</i> ‘.....	43
5.2	Linie ‚ <i>radiosa</i> ‘.....	45
5.3	Morfologická plasticita.....	46
6	ZÁVĚR.....	49
7	LITERATURA.....	50
8	Příloha.....	56

# 1 Seznam zkratek

BI – Bayesiánská inference (Bayesian inference)

cf. – odvozeno z latinského slovesa *conferre* (shromažďovat), zkratkou psanou mezi rodovým a druhovým jménem se označují druhy, jejichž určení nebylo zcela jasné

ITS - Internal transcribed spacer; spacer nacházející se mezi geny pro malou ribozomální podjednotku a velkou ribozomální podjednotku (rRNA)

GTR – model evoluce DNA (Generalised time reversible model)

JC – model evoluce DNA (Jukes-Cantor)

MES – pufr stabilizující pH 4,5 - 6,5 ( $C_6H_{13}NO_4S.H_2O$ )

ML – metoda maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood)

PP – posterior probability (posteriorní pravděpodobnost)

*psaA* – oblast chloroplastové DNA kódující P700 chl A apoprotein A1

rpm – otáčky za minutu (revolutions per minute)

TPM1uf – model evoluce DNA (3-parametrový model - K81)

TrNef – model evoluce DNA (Tamura and Nei)

var. – varieta, taxonomické označení nižší kategorie, než druh nebo poddruh, ale vyšší než forma



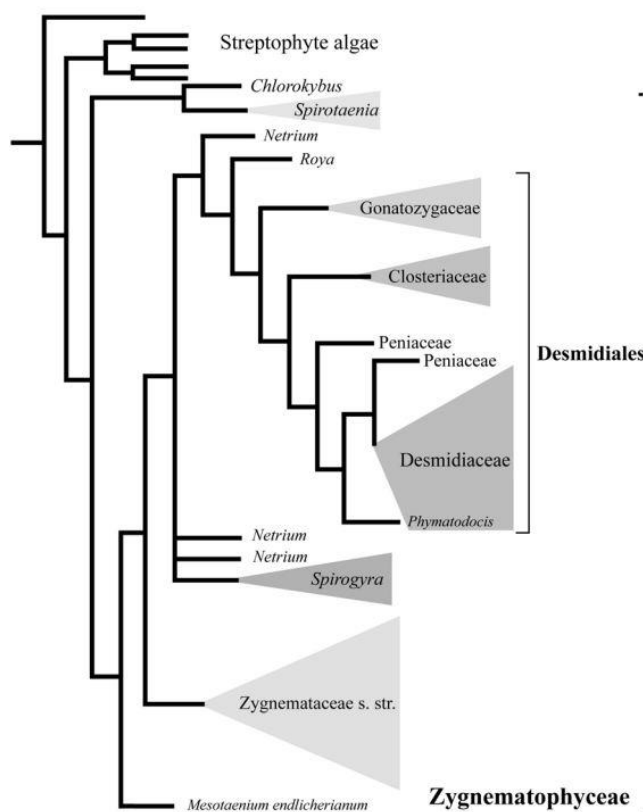
## 2 ÚVOD

Klasifikace druhů je již odedávna jedním z největších vědeckých zájmů a touha pojmenovávat organismy byla hnacím motorem mnoha taxonomických prací. Druhy jsou v biologii základními jednotkami a jejich vymezení je základní předpoklad pro odhad diverzity a pochopení jejich evoluční historie, speciace, biogeografie a ekologie. Protistní organismy je ale často obtížné identifikovat pouze na základě jejich morfologie, protože často dochází ke konvergencím a i dvě různé třídy mohou mít stejnou morfologii. Příkladem můžou být zelené řasy rodu *Chlorella*, které jsou ve skutečnosti zástupci dvou tříd; Chlorophyceae a Trebouxiophyceae (Huss et al., 1999). Díky obrovskému nárůstu v četnosti používání molekulárních metod bylo nutné provést taxonomické změny i na úrovni druhů. Většinou bývá závěrem takovýchto studií objevení skryté (kryptické nebo pseudokryptické) diverzity (Lundholm et al., 2012; Payo et al., 2012; Škaloud et al., 2012). Vzhledem k obrovskému významu protist, která jsou jak předmětem základního výzkumu, tak i aplikovaného, je problematika jejich diverzity stále jedním z hlavních zájmů protistologů (Weisse, 2008).

### 2.1 Objevování diverzity krásivek

Krásivky (Desmidiales) patří do třídy Zygnematophyceae (Streptophyta), která je monofyletická a dále se dělí na dva řády; Desmidiales a Zygnematales (Obr. 1) (Bhattacharya et al., 1994; Besendahl & Bhattacharya, 1999; Gontcharov et al., 2003, 2004). Řád Desmidiales je na rozdíl od řádu Zygnematales monofyletický (McCourt et al., 2000; Gontcharov et al., 2003; Hall et al., 2008) a zahrnuje čtyři čeledi; Gonatozygaceae, Closteriaceae, Peniaceae a Desmidiaceae. Toto dělení vyšlo z jejich morfologie (Brook, 1981) a později však bylo potvrzeno i na základě fylogenetických analýz (McCourt et al., 2000; Hall et al., 2008).

**Obr. 1:** Fylogenetický strom třídy Zygnematophyceae, podle Gontcharov (2008)



Objevování diverzity je aktuální téma i u krásivek. Vzhledem k tomu, že se jedná o velké a nápadné řasy a také obyvatele ohrožených lokalit, se popisem jejich diverzity zabývalo mnoho vědců již v minulosti (Brook, 1981; Růžička, 1981; West & West, 1905). K definování druhů se ve většině případů používal morfologický koncept druhu, který druhy definuje jako skupiny podobných nebo stejných organismů (Futuyma, 1998). Jako málo užitečný se ukázal být biologický druhový koncept, který definuje druhy jako skupiny organismů, které se spolu sexuálně rozmnožují a od ostatních takových skupin je dělí reprodukční bariéra (Mayr, 1942), což na svých experimentech ilustrovali Blackburn a Tyler (1987). U krásivek se vyskytuje mnohem složitější sexuální systém než heterothalismus a v rámci morfologicky definovaného druhu může existovat více druhů sexuálních (Blackburn & Tyler, 1987). S nástupem a rozšířením metod molekulární fylogenetiky se běžně začal používat fylogenetický koncept druhu, který druhy definuje jako skupiny organismů, které spolu sdílejí unikátní znaky, nejčastěji sekvence DNA (Nixon & Wheeler, 1990). Jako ideální pro zkoumání diverzity krásivek se jeví využití kombinace několika různých přístupů, tzv. polyfázický (multidisciplinární) přístup, například fylogenetických, morfologických, morfometrických a ekologických dat (Kouwets, 2008).

V recentních studiích, zabývajících se diverzitou druhových komplexů krásivek, lze najít různé výsledky toho, jak bylo možné od sebe druhy rozlišit (Neustupa et al., 2010; Nemjová et al., 2011; Škaloud et al., 2012; Šťastný et al., 2013; Neustupa et al., 2014). První z nich jsou druhy, které byly dobře rozlišitelné nejen molekulárně, ale i na základě morfologických znaků. Jedněmi z nich jsou druhy *Micrasterias fimbriata* a *M. compereana* (Neustupa et al., 2014). Tyto druhy se liší v několika charakteristikách. Každý z nich má jinak zakončené laloky buněk, u *M. fimbriata* jsou zakončeny kulatě s krátkým vláknitým výběžkem, zatímco u *M. compereana* vybíhají laloky buněk do vidlicovitého zakončení. *M. fimbriata* většinou nemá na povrchu buňky výběžky, zatímco *M. compereana* ano. Vyskytují se i na rozdílných stanovištích; *M. compereana* v oligotrofních mokřadech s nízkým pH a *M. fimbriata* v mírně kyselých mezotrofních habitatech (Neustupa et al., 2014). I při zkoumání izolátů tradičně náležících k *Micrasterias truncata* se ukázalo, že dvě jeho variety budou s největší pravděpodobností jiné druhy (Nemjová et al., 2011). Varieta *pusilla* má oproti jiným izolátům menší buňky se stlačenými laterálními laloky a široce eliptickým polárním lalokem a její zástupci tvoří na fylogenetickém stromě samostatnou dobře podpořenou linii (Nemjová, et al., 2011). I varieta *semiradiata* je samostatným druhem, kterým ostatně již dříve byla (Kützing, 1849). Od *M. truncata* se liší především svými široce rozevřenými laloky (Nemjová, et al., 2011). V rámci druhu *Xanthidium cristatum* byly rozlišeny tři linie, které zároveň náležely třem tradičně popsaným varietám. Ty lze od sebe rozlišit jako morfologicky, tak pomocí geometrické morfometriky (Šťastný et al., 2013).

Mnohem problematičtější je rozlišení tzv. pseudokryptických druhů, tedy takových, u nichž jsou rozlišující znaky patrné až po důkladném zkoumání (Alverson, 2008). U *Micrasterias radians* se dvě jeho variety, *M. radians* var. *evoluta* a *M. radians* var. *bogoriensis* ukázaly být pravděpodobně samostatnými druhy, ačkoliv se morfologicky rozeznávají jen s obtížemi (Neustupa et al., 2010).

Třetím možným východiskem při zkoumání druhových komplexů je objevení kryptických druhů. Ty od sebe nelze rozlišit na základě morfologie, pomocí geometrické morfometriky a neliší se asi ekologicky nebo svým rozšířením, pouze na základě drobných rozdílů v sekvencích (Alverson, 2008). Ukázalo se, že u druhu *Micrasterias truncata* existují tři linie, které od sebe nelze nijak rozlišit a jde tedy pravděpodobně o příklad recentní speciační události (Nemjová, et al., 2011).

V několika případech bylo zjištěno, že některé variety jsou pouhými ekomorfami, tedy jde o stejný druh, ale jeho morfologie je ovlivněna lokálními podmínkami. Vzhledem k citlivosti krásivek na měnící se okolní prostředí a jejich velké morfologické plasticitě (Černá & Neustupa, 2009; Neustupa et al., 2008) není překvapením, že případů, kdy byla ekomorfa považována za samostatnou taxonomickou jednotku je několik. Navíc tomu není tak dávno, kdy při zkoumání diverzity krásivek nebyl k dispozici jiný znak, než jen jejich tvar, který mohl být analyzován pouze měřením vzdáleností na buňce (Bicudo & Senna, 1975). *Micrasterias truncata* var. *neodamensis* se ukázal být pouhou ekomorfoou v rámci druhu *M. truncata* (Nemjová, et al., 2011). I dvě variety druhu *M. crux-melitensis*; *janeira* a *superflua* nemají žádný taxonomický význam (Neustupa et al., 2010). Stejně tak *Xanthidium cristatum* var. *bituberculatum* je pouhou ekomorfoou (Šťastný et al., 2013). Bicudo a Sormus (1974) při zkoumání druhu *M. pinnatifida* našli 26 morfotypů po prozkoumání téměř 500 buněk z jedné populace. Podobně u druhu *M. laticeps* bylo nalezeno 13 morfotypů u 400 buněk (Bicudo & Sormus, 1972). Autoři došli k závěru, že pouhá velikost buněk nebo rozptýl velikostí nejsou vhodným kritériem k rozlišení variet (Bicudo & Senna, 1975). Tyto práce ilustrují, jak až velká může být morfologická plasticita krásivek. Na druhou stranu postrádají závěry obou dvou starších prací důkaz, že jde opravdu o jediný druh a ne o komplex velmi podobných druhů, které se vyskytují na jedné lokalitě.

Je zřejmé, že reálný počet druhů u krásivek bude větší než odhadovaných 6000 (Brook, 1981), jak napovídají výsledky zkoumání problematických druhových komplexů (Neustupa et al., 2010; Nemjová et al., 2011; Škaloud et al., 2012; Šťastný et al., 2013; Neustupa et al., 2014). Výjimku tvoří občasné objevení ekomorf popsanych jako samostatné taxony (Šťastný et al., 2013) a některé morfologicky a i fylogeneticky konzistentní druhy, například *Micrasterias rotata* (Neustupa et al., 2011).

## 2.2 Rozšíření krásivek a biomonitoring

Podle tradiční taxonomické literatury má většina druhů krásivek kosmopolitní rozšíření (Krieger, 1939). Toto číslo bude ale pravděpodobně nižší, vzhledem k existenci problematických druhových komplexů. Pro krásivky bylo popsáno tradičně sedm biogeografických areálů (Krieger, 1939) a později bylo toto dělení upřesněno na deset areálů (Coesel, 1996).

Typicky se vyskytují na kyselějších a oligotrofních stanovištích, jako jsou rašeliniště a mokřady, kde tvoří dominantu fyto Bentosu (Coesel & Meesters, 2007; Šťastný, 2008). Pro své specifické ekologické nároky jsou krásivky často využívány jako indikátory stability ekosystému, ale i kvality vody, protože jejich druhové zastoupení odráží následky eutrofizace a acidifikace (Coesel, 1982). Na základě přítomnosti jednotlivých druhů byl vypracován systém hodnocení vzácnosti a hodnoty lokalit. Je založen na srovnání výskytu vzácných a citlivých druhů a celkové diverzity krásivek na lokalitě. Některé druhy, například *M. furcata*, *M. apiculata*, *M. brachyptera*, *M. oscitans* nebo *M. jenneri* jsou považovány za vlajkové pro obzvláště dobře zachovalé lokality, které si zaslouží pozornost a ochranu (Coesel, 2003).

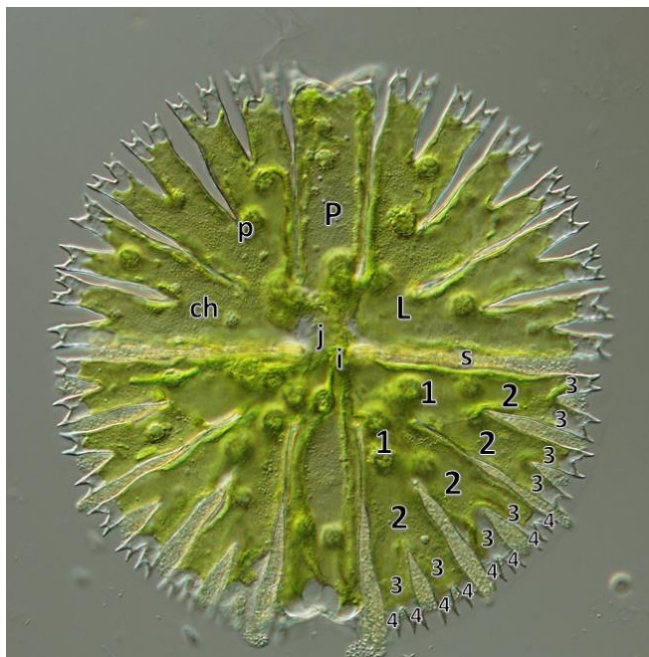
Parametry prostředí, ve kterém žijí, mohou ovlivnit i jejich morfologii. Jedním z nich je pH vody. U *Staurastrum hirsutum* dochází s rostoucím pH ke zvětšování buněk (Černá & Neustupa, 2009). U *Euastrum binale* tato změna závislá na pH pozorována nebyla, ale při změně pH u něj docházelo ke změně hloubky zářezů na buňce. Obě změny byly pozitivně korelovány s pH a vedly k zmenšování komplexity s klesající hodnotou pH (Černá & Neustupa, 2009). Zvyšování teploty okolí způsobuje u buněk *Micrasterias* zkracování zářezů mezi laloky (Neustupa et al., 2008). Prostředí bude významný faktor, který podmiňuje tvarovou evoluci u tohoto rodu. Vytvářením zářezů a prodlužováním laloků buňky zvětšují svůj poměr povrchu vůči objemu, čímž odpovídají na změny ve svém okolí (Neustupa, 2016).

## 2.3 Rod *Micrasterias*

### 2.3.1 Morfologie a rozmnožování

Rod *Micrasterias* C. Agardh ex Ralfs, 1848, česky hvězdulka, zahrnuje jedny z nejkrásnějších zelených řas, jaké vůbec známe. Jejich komplexní tvar a komplikovaná symetrie přitahovaly pozornost mnoha vědců již od jejich prvního popisu. Stalo se tak v devatenáctém století, když jej ve vzorku našel Carl Agardh (Agardh, 1827). Taxonomický popis tohoto rodu provedl poté Ralfs (1848). Stejně jako u jiných krásivek, je jejich buňka složena ze dvou půlbuněk, které nazýváme semicely. Jsou si navzájem téměř dokonalým zrcadlovým obrazem a každá je rozdílného stáří. Semicely jsou propojeny plasmatickým můstkem, istmem, uprostřed jehož je lokalizováno jádro (Brook, 1981; Růžička, 1981; Coesel & Meesters, 2007). Každou ze semicel lze považovat za samostatnou jednotku, protože se od sebe morfologicky liší prakticky stejně, jako se liší mezi

**Obr. 2:** Popis buňky rodu *Micrasterias* (*Micrasterias radiosa*): P – polární lalok, L – laterální laloky, p – pyrenoid, ch – chloroplast, j – jádro, i – istmus, s – sinus, číslice 1 – 4 označují stupně větvení laterálních laloků.



sebou semicely dvou různých buněk v populaci (Neustupa at al., 2013). Istmus je nejužší místo buňky a zářez, jež k němu vede, se nazývá sinus. Nejvýznačnějším znakem, který charakterizuje většinu zástupců tohoto rodu je ale rozdělení semicel na laloky (Coesel & Meesters, 2007; Škaloud, 2011). Ty rozeznáváme

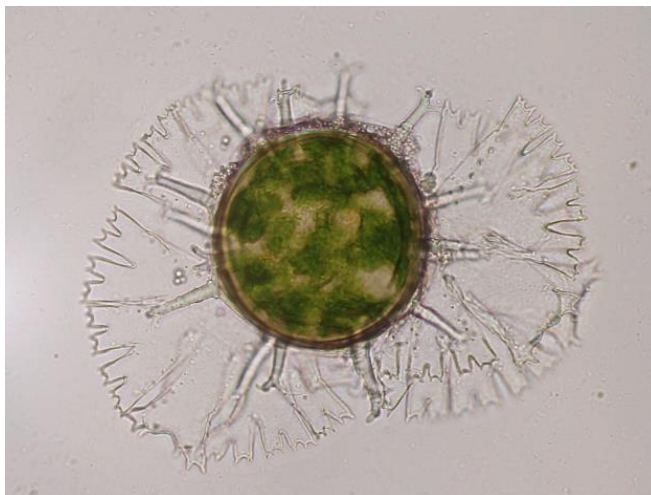
polární a laterální. Polární lalok je na každé semicely jeden, má jednoduchou morfologii a u většiny druhů bývá zakončen vidlicovitě. Laterální laloky bývají většinou dva a mohou být dále děleny na laloky nižších řádů (Brook, 1981) (Obr. 2). Naprostá většina druhů *Micrasterias* je jednobuněčná, jedinou výjimkou je *M. foliacea*. Jeho buňky tvoří dlouhé řetězkovité kolonie tvořené až stovkami buněk. Navzájem jsou propojeny výběžky na polárních lalocích, které se tvoří již během dělení buňky (Johnson, 1894; Lorch & Engels, 1979). Buněčná stěna je trojvrstevná. První a druhou vrstvou tvoří síť celulózních mikrofibril a třetí vrstva je slizová a její sekrece probíhá skrze póry.

Velké polyploidní jádro se nachází v istmu (Brook, 1981). Jednotliví zástupci rodu *Micrasterias* se mezi sebou liší počtem chromozomů a množstvím obsažené DNA. I v rámci jednoho druhu může být její obsah u různých kmenů až šestinásobný. V rámci rostlinné říše patří mezi organismy s největším obsahem DNA. Vegetativní buňky jsou haploidní (Alan J. Brook, 1981; Poulíčková et al., 2014; Škaloud et al., 2011).

U zástupců rodu *Micrasterias* známe nepohlavní i pohlavní rozmnožování. U nepohlavního rozmnožování dojde k rozdělení buňky v istmu a vytvoření nových semicel. Do nové semicely se během dělení postupně přesouvá i rozdělený chloroplast, který dále roste společně s ní a nakonec ji zcela vyplní. Je to ale způsob pohlavního rozmnožování, který dal spájivým řasám jejich jméno. Konjugace, neboli spájení, je pozoruhodný akt, během kterého dochází ke splynutí protoplastů buněk. Na úplném počátku dělení dojde ke spárování buněk. U některých druhů *Micrasterias* ještě poté dojde k vegetativnímu rozmnožení. Buňky ze vzniklé čtveřice poté vytvoří páry mezi sebou, nebo s okolními buňkami. Konjugující pár buněk kolem sebe vytvoří slizový ochranný obal. Obě buňky poté začnou v oblasti istmu formovat kulovité papily.

**Obr. 3:** Zygospora druhu *Micrasterias papillifera*.

U jednoho z konjugačních partnerů je ale větší. Můžeme proto mluvit o anizogamii, tedy spojení nestejně velkých gamet. Po spojení papil dojde k postupné fúzi protoplastů v konjugačním kanálu. Ty se na místo přesouvají amébovým pohybem. Je to jediný výskyt tohoto typu pohybu v říši Archeplastida. Oba spojené protoplasty vytvoří tlustostěnnou zygosporu a z původních buněk zůstanou pouze prázdné buněčné stěny (Obr. 3).

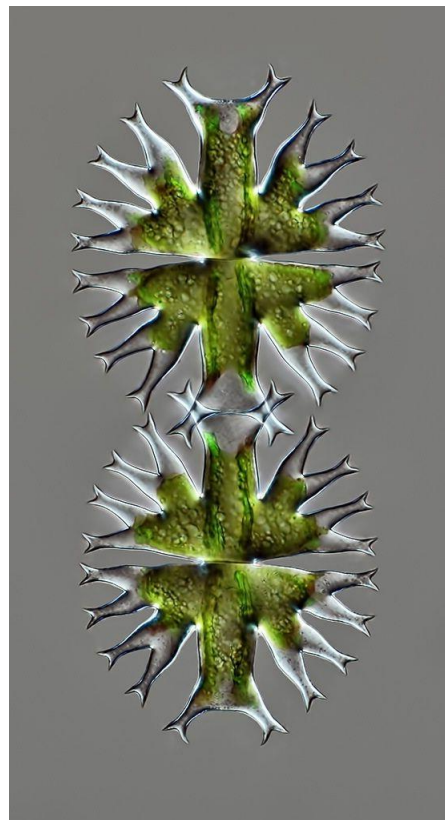


Zygospora má tři vrstvy, tenkou endosporu, tlustou mezosporu a exosporu, která na povrchu vybíhá v trny. Dokáže přežít i dlouhotrvající vyschnutí (Blackburn & Tyler, 1981).

### 2.3.2 Fylogeneze a diverzita rodu *Micrasterias*

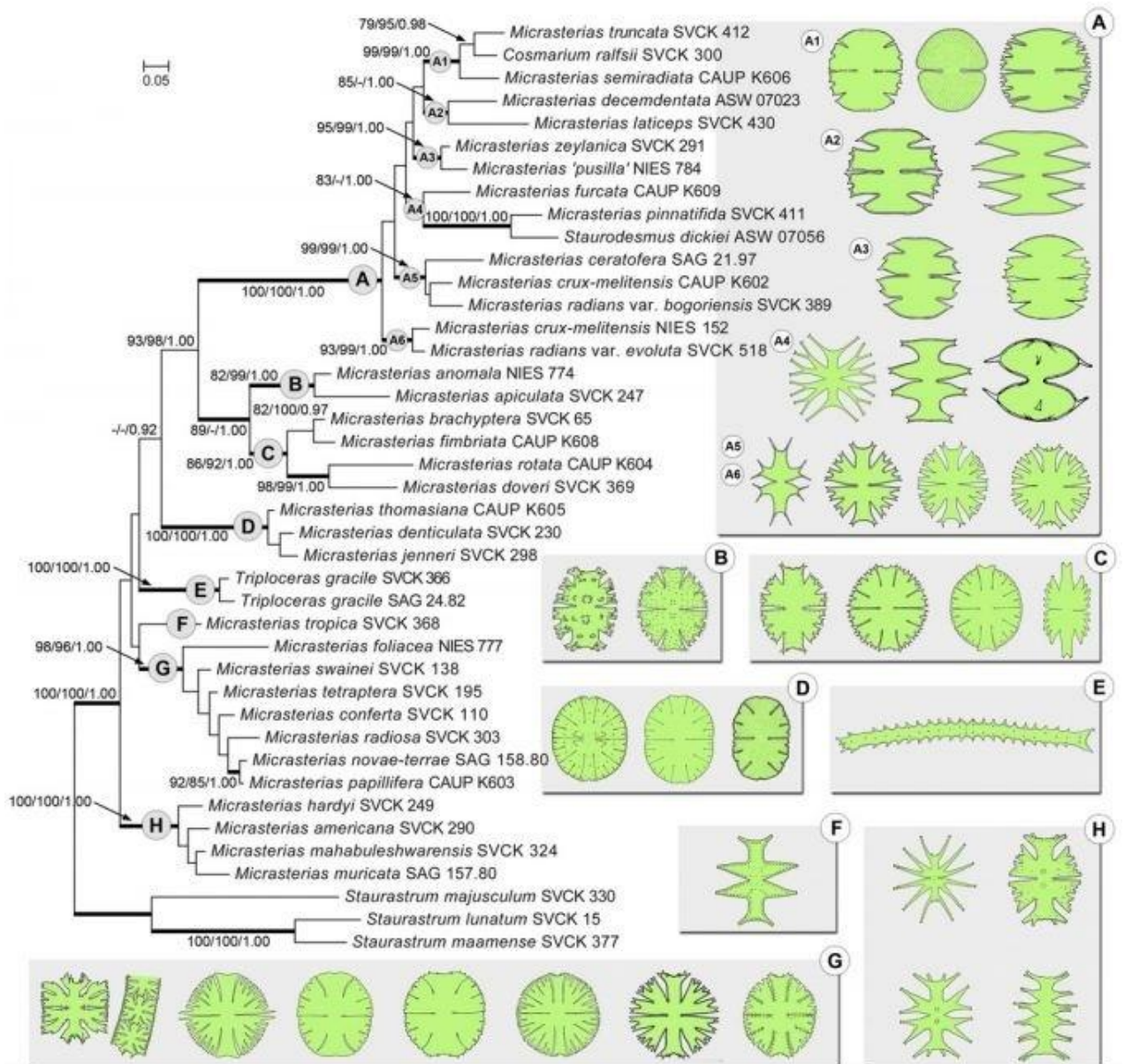
V současnosti je v taxonomické databázi Algaebase uvedeno 961 druhů a variet tohoto rodu, u nichž ale pouze 67 bylo taxonomicky uznáno (Guiry & Guiry, 2016). Jako lektotypový druh je zde uvedený *Micrasterias furcata* C.Agardh ex Ralfs (Obr. 4), který ale jako typový druh popsán nebyl (Ralfs, 1848), ačkoliv v review publikovaném autorem Gontcharov (2008) je také tak uveden, avšak bez zdroje. Gontcharov také uvádí jako celkový počet druhů 75, což je v rozporu s již zmíněným počtem v databázi (Gontcharov, 2008; Guiry & Guiry, 2016). Na základě starších studií býval rod *Micrasterias* považován buď za parafyletický nebo polyfyletický (Gontcharov et al., 2003; Gontcharov & Melkonian, 2008). Zásadní je ale studie od Škaloud et al. (2011). Byla v ní provedena fylogenetická analýza tohoto rodu na základě třech molekulárních markerů; SSU rDNA, *psaA*, a *coxIII* získaných od celkem 34 zástupců rodu *Micrasterias*. Jejím výsledkem je robustní fylogenetický strom, na kterém můžeme rozeznat osm linií A – H (Škaloud et al., 2011) (Obr. 5). Každou z nich lze také morfologicky charakterizovat.

**Obr. 4:** *Micrasterias furcata* (foto: Rogelio Moreno)



Linie A obsahuje nejvíce druhů a její zástupci tvoří dvě morfologicky odlišitelné skupiny. Část z nich má středně velké buňky s mělkými zářezy laloků a širokým polárním lalokem, zatímco ostatní mají pro tento rod typické hluboké zářezy a úzký polární lalok. Do této linie také patří dva druhy, které byly tradičně určovány jako zástupci jiných rodů až do doby jejich odhalení metodami molekulární fylogenetiky. *Micrasterias ralfsii* (dříve *Cosmarium ralfsii*) má sice morfologii tradičně náležící rodu *Cosmarium*, ale tvar jeho chloroplastu je hvězdicovitě laločnatý, což je typické pro rod *Micrasterias* (Ralfs, 1848; Šťastný, 2009). Druhým takovým

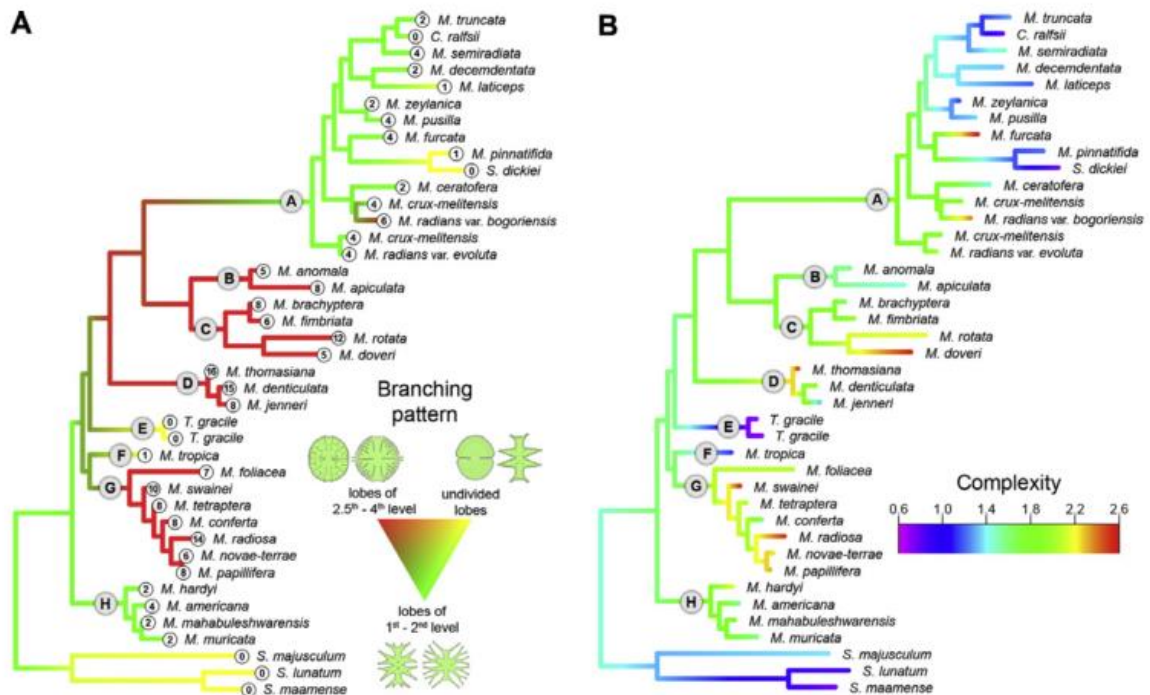
**Obr. 5:** Fylogenetický strom rodu *Micrasterias* založený na analýze sekvencí *coxIII*, *psaA* a SSU rDNA. Hodnoty na uzlech reprezentují statistickou podporu určenou třemi metodami – bootstrap maximální věrohodnosti (vlevo), bootstrap maximální parsimonie (uprostřed) a bayseánská posteriorní pravděpodobnost větvení (vpravo). Podle Škaloud et al., (2011).



druhem je *Micrasterias dickiei* (původně *Staurodesmus dickiei*). Ten se od svých příbuzných ale odlišuje podstatněji, než *Micrasterias ralfsii*. Jeho buňky jsou triradiální, což je u rodu *Staurodesmus* časté a na každém z vybíhajících laloků má osten. V linii B jsou pouze dva zástupci, oba mají v oblasti istmu tlusté výběžky na buněčné stěně. V linii C jsou laloky druhů děleny nerovnoměrně na laloky nižších řádů; vrchní jsou děleny více. Také zde najdeme největší zástupce, jako například *Micrasterias rotata* a *Micrasterias doveri*. Buňky zástupců linie D mají oválný tvar a zářezy jejich laloků jsou velmi úzké. Linii E tvoří dva zástupci druhu *Triploceras gracile*. Jde o zvláště tvarované tyčkovité buňky, jakoby o buňku *Micrasterias*, která však ztratila laterální laloky a prodloužila se. V linii F je jediný druh, *Micrasterias tropica*. Jeho laloky jsou nedělené a na polárních lalocích má dva dlouhé výběžky. Všech sedm druhů z linie G má hluboké zářezy vyšších řádů a u většiny z nich jsou nerovnoměrně dělené; vrchní laterální laloky bývají vyššího řádu. V linii H mají buňky velmi hluboké a otevřené zářezy laloků a dva výběžky na polárním laloku (Škaloud et al., 2011).

Kromě „prosté“ fylogeneze tohoto rodu se autoři zaměřili na souvislosti mezi morfologií a evolucí. Tři vybrané znaky mapovali na fylogenetický strom rodu *Micrasterias*, aby lépe porozuměli jejich evoluci. Prvním z nich je stupeň větvení laloků, který vykazuje silnou souvislost s evolucí (Obr. 6A) (Škaloud et al., 2011). Druhy z linií A a H mají buňky dělené méně, obvykle do druhého řádu. Druhy s laloky dělenými do třetího a čtvrtého řádu naopak náležejí do linií B – D a G. Druhy z linie D mají nejvíce koncových laloků; 16 u *M. thomasi* a 15 u *M. denticulata*. Zcela jiná situace byla u komplexity buněk. Ta se vyjadřuje jako odlišnost obrysu studovaného objektu od kružnice (Černá & Neustupa, 2009). V tomto případě nebyla nalezena žádná korelace tohoto znaku s evolucí (Obr. 6B). Prakticky ve všech liniích můžeme nalézt zástupce s velkou i malou komplexitou buněk. Třetím znakem byla délka buněk (Obr. 7). Tento znak je s fylogenezí korelovaný. V linii A a G jsou spíše menší druhy, s délkou nepřesahující 153  $\mu\text{m}$  v linii A a 175  $\mu\text{m}$  v linii G. Naopak v liniích B, C, a D jsou velké druhy, s délkou i více než 200  $\mu\text{m}$  (Škaloud et al., 2011). Zdá se, že velikost buňky a počet terminálních laloků mohou být korelovány s velikostí genomu, jak ukázali Poulíčková et al. (2014) (Obr. 8). Jednotlivé linie se mezi sebou liší obsahem DNA a velikost genomu vysvětluje 42,3% velikostní variability v rámci tohoto rodu. To, jak souvisí velikost buňky s velikostí genomu lze pozorovat především u větších druhů, jako je například *Micrasterias rotata*. Na druhou stranu se ale u tohoto druhu zjistilo, že může existovat značné rozpětí v obsahu DNA, aniž by to mělo nějaké taxonomické následky (Neustupa et al., 2010; Poulíčková et al., 2014). Dva izoláty se mezi sebou v jejím obsahu lišily i dvojnásobně. Podobně tomu je i u *Triploceras gracile*, zde je rozdíl mezi dvěma izoláty dokonce šestinásobný.

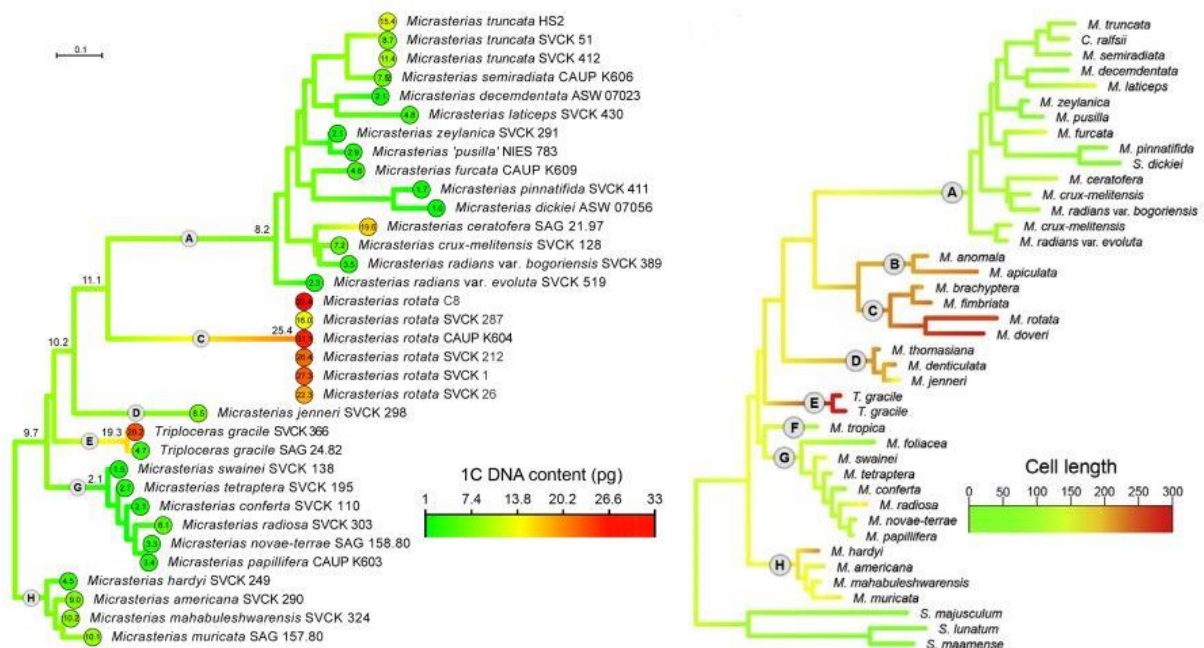




**Obr. 6:** Evoluce stupně větvení buněk (A) a komplexity (B) mapovaná na fylogenetický strom (maximum likelihood). Čísla na koncích větví jsou počty koncových laloků. Podle Škaloud et al. (2011)

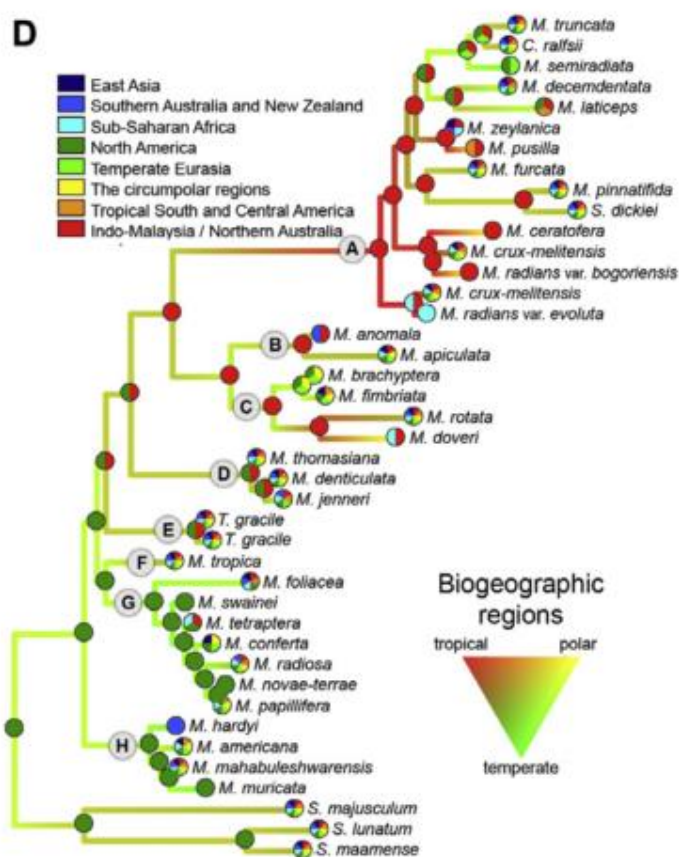
**Obr. 7:** Evoluce délky buněk rodu *Micrasterias* mapovaná na fylogenetický strom (maximum likelihood). Čísla na koncích větví jsou počty koncových laloků. Podle Škaloud et al. (2011).

**Obr. 8:** Evoluce obsahu DNA u rodu *Micrasterias* mapovaná na fylogenetický strom (maximum likelihood). Písmena A - H označují příslušné linie. Odhadovaný obsah DNA je vyznačen na bázi každé linie. Obsah DNA pro jednotlivé izoláty je uveden v kolečku u jejich názvu. Podle Pouličková et al. (2014).



Bylo provedeno mnoho experimentů za účelem zjistit, jak *Micrasterias* reaguje na změny ploidie. Lze jich dosáhnout ozářením UV zářením, centrifugací nebo teplotním šokem. Se změnou ploidie většinou dochází k vytváření biradiálních, triradiálních a tetraradiálních forem. Buňky s vyšším stupněm ploidie ale také bývají zpravidla větší a mívají i vyšší stupeň větvení laloků (Kallio; 1951, 1953). Výsledky těchto pokusů tedy podporují recentní zjištění o korelaci obsahu DNA s velikostí buněk (Pouličková et al., 2014).

Zdá se, že výskyt druhů je korelovaný s evolucí tohoto rodu (Škaloud et al., 2011) (Obr. 9). Nejvíce druhů se vyskytuje v Severní Americe; 79% z analyzovaných taxonů. Tři severoamerické endemické druhy (*Micrasterias swainei*, *Micrasterias novae-terrae*, a *Micrasterias muricata*) zaujímají pozici v bazálních skupinách G a H, což ukazuje na potenciální původ rodu *Micrasterias* na tomto kontinentě. Druhá druhově nejbohatší oblast byla Indo-Malaysie/Severní Austrálie, ve které se vyskytovalo 71% analyzovaných druhů. Ke speciálním událostem docházelo především v tropech a méně pak v mírném pásu (Škaloud et al., 2011). Stejně jako další krásivky je i rod *Micrasterias* známý svojí ekologickou náročností, která jim i komplikuje šíření. Jejich velké a ploché buňky jsou navíc náchylné k vysychání při transportu (Brook, 1981).



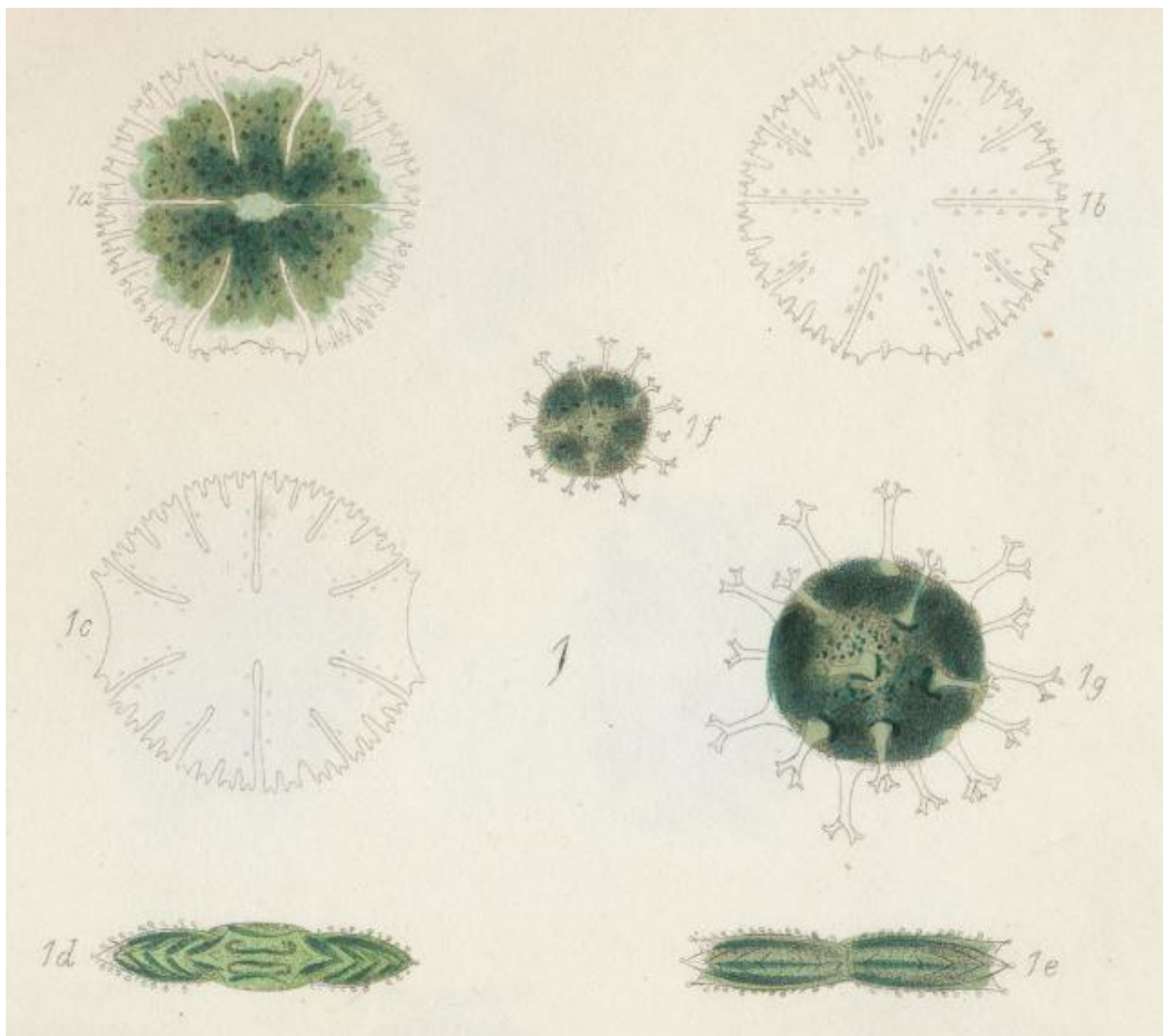
**Obr. 9:** Geografický původ jednotlivých linií a druhů rodu *Micrasterias* mapovaný na fylogenetickém stromě (ML). Příslušnost ke třem biogeografickým regionům (tropickému, temperátnímu a polárnímu) je znázorněna barevně. Koláčové grafy na koncích větví znázorňují výskyt v sedmi biogeografických regionech. Podle Škaloud et al. (2011).

## 2.4 Druhový komplex *Micrasterias papillifera/radiosa*

*Micrasterias papillifera* a *Micrasterias radiosa* jsou druhy náležící do dobře podpořené fylogenetické linie G (Škaloud et al., 2011). Kromě nich lze v této linii nalézt i jim blízké příbuzný druh *M. conferta* a dále *M. swainei*, *M. tetraptera*, *M. novae-terrae* a dále vláknitý druh *M. foliacea*. Pro všechny jsou charakteristické buňky s hlubokými zářezy a vysokým stupněm větvení laloků, které je nerovnoměrné; vrchní laterální laloky bývají větvené do vyššího řádu (Škaloud et al., 2011). V porovnání s ostatními druhy *Micrasterias* se jedná spíše o menší nebo středně velké druhy, dosahující délky 90 – 175  $\mu\text{m}$ , které ale mají díky hlubokým zářezům vyšší komplexitu (Škaloud et al., 2011). Obsah DNA v jejich buňkách je spíše nižší; 1,5 – 6,1 pg v haploidním stavu (Pouličková et al., 2014).

### 2.4.1 *Micrasterias papillifera* Brébisson ex Ralfs

**Obr. 10:** *Micrasterias papillifera* Brébisson ex Ralfs; 1a: pohled zředu; 2b: pohled zředu na prázdnou buněčnou stěnu; 1c: prázdná buněčná stěna s menším množstvím výběžků; 1d: svrchní (apikální) pohled na buňku; 1e: boční (laterální) pohled na buňku; 1f,1g:zygospora. Podle Ralfs (1848).

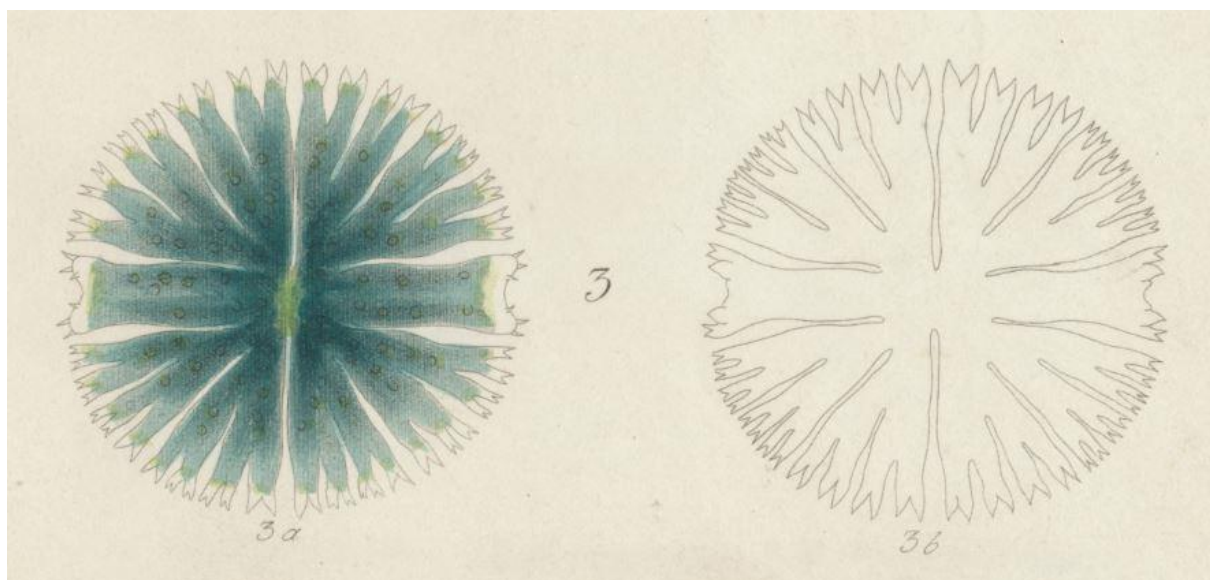


Buňky tohoto druhu mají široce eliptický, nebo kruhový tvar. Sinus je většinou uzavřený, občas úzce otevřený. Apikální lalok se směrem od báze zvětšuje, někdy má rovnou bazální část a poté se náhle rozšiřuje až ve své vrchní části. Jeho vrchol je široce rozevřený a oba konce mají vidlicovité zakončení. Laloky jsou děleny do třetího (někdy čtvrtého) řádu a zakončeny vidlicovitě, popřípadě třemi výběžky a jejich konce jsou často pokryté malými granulemi, které buňka sekretuje. Tyto malé papily daly tomuto druhu název. Buněčná stěna je pokryta variabilním množstvím malých ostnů, které jsou lokalizovány podél jednotlivých zářezů, ale tato ornamentace může v některých případech scházet. Zbytek buňky má hladký povrch (Ralfs, 1848; West & West, 1905; Růžička, 1981; Coesel & Meesters, 2007). Vnitřek buňky má hnědavě zelenou barvu a můžeme v něm vidět drobné kuličky škrobu, kterými může být buňka i velmi zaplněná (Ralfs, 1848). *Micrasterias papillifera* (Obr. 10) patří mezi ostatními zástupci tohoto rodu spíše k menším druhům. Podle originálního popisu buňky dosahují délek 115 – 124  $\mu\text{m}$  a šířek 106 – 120  $\mu\text{m}$  (Ralfs, 1848). Monografie publikované v pozdějších letech uvádějí větší rozpětí velikostí, délku (85-) 100 – 150 (-170)  $\mu\text{m}$  a šířku (85-) 100 – 140 (-165)  $\mu\text{m}$  (Coesel & Meesters, 2007). Nálezy zygospor jsou relativně časté. Zygospora je kulovitá, pokrytá dlouhými ostny s vidlicovitými zakončeními a její šířka je přibližně 44  $\mu\text{m}$  (Obr. 3; 10f,g) (Ralfs, 1848). Vyskytuje se v oligo- až mezotrofních stanovištích, jako jsou rašeliniště. Preferuje mírně kyselé a mezotrofní habitaty (Coesel & Meesters, 2007). Jeho rozšíření je považováno za kosmopolitní (Škaloud et al., 2011).

Aktuálně lze v algologické taxonomické databázi nalézt 26 forem a variet tohoto druhu, z nichž 7 je taxonomicky uznáno. Jde o *Micrasterias papillifera* var. *simplex* Uherkovich, *Micrasterias papillifera* var. *glabra* Nordstedt, *Micrasterias papillifera* f. *glabra* (Irénée-Marie) K.Förster, *Micrasterias papillifera* var. *pseudomurrayi* L.J.Laporte, *Micrasterias papillifera* var. [*papillifera*] f. *reducta* L.J.Laporte, *Micrasterias papillifera* var. *speciosa* (Wolle) Willi Krieger, *Micrasterias papillifera* f. *novae-scoticae* (W.B.Turner) H.Croasdale (Guiry & Guiry, G.M., 2016).

#### 2.4.2 *Micrasterias radiosa* Ralfs

*Micrasterias radiosa* (Obr. 11) je jeden z nejkrásnějších zástupců tohoto rodu. Má buňky téměř okrouhlého tvaru. Sinus je většinou úzce rozevřený, občas zavřený. Apikální lalok je dlouhý a úzký, prakticky rovný, ve svrchní části se široce rozevírá. Oba výběžky apikálního laloku jsou zakončeny vidlicovitě a na apikálním laloku se nachází dvě dvojice výběžků, jedna z dorzální a druhá z ventrální strany buňky. Laterální laloky jsou dělené nerovnoměrně, svrchní jsou děleny do čtvrtého řádu, spodní do řádu třetího (Ralfs, 1848). Zářez mezi laterálním a apikálním lalokem je velmi hluboký a jen úzce otevřený. Na rozdíl od jiných druhů nejsou konce výběžků laloků zakončeny tupě ale špičatě. Okraj buňky jak v sinu, tak v zářezech mezi laterální



**Obr. 11:** *Micrasterias radiosa* Ralfs: 3a: pohled zředu, 3b: prázdňá buněčná stěna. Podle Ralfs (1848).

a apikálním lalokem a i mezi jednotlivými laloky je vlnitý. Buněčná stěna může mít hladký povrch nebo být pokryta výstupky uspořádanými v přímce na okrajích laloků (Coesel & Meesters, 2007). Podle originálního popisu dosahuje délky a šířky kolem 184  $\mu\text{m}$  (Ralfs, 1848). V novější literatuře je udáván rozptyl velikostí; délka (100-) 120 – 200 (-260)  $\mu\text{m}$  a šířka (85-) 110 – 190 (-245)  $\mu\text{m}$  (Coesel & Meesters, 2007). Ve starší literatuře má podle popisu dosahovat asi o 10 - 20  $\mu\text{m}$  menší velikosti.

Jeho biotopem jsou mezotrofní a mírně kyselé lokality, jako jsou rašelinné mokřady. Lze ho nalézt i v planktonu některých britských a irských jezer (West & West, 1905; Růžička, 1981; Coesel & Meesters, 2007). Vyskytuje se kosmopolitně (Škaloud et al., 2011).

Synonymum jeho druhovému jménu je *sol* a bývá pod ním uváděn v taxonomické literatuře (West & West, 1905). Aktuálně je v algologické taxonomické databázi Algaebase uvedeno 22 variet a forem tohoto druhu, z nichž 12 je taxonomicky uznáno. Jde o *Micrasterias radiosa* f. *minuta* Compère, *Micrasterias radiosa* var. [*punctata*] f. *irregularis* Y.Thérézien, *Micrasterias radiosa* var. *taylorii* Irénée-Marie, *Micrasterias radiosa* f. *taylorii* Irénée-Marie, *Micrasterias radiosa* var. *wollei* J.A.Cushman, *Micrasterias radiosa* f. *concentrica* H.Croasdale, *Micrasterias radiosa* var. *evoluta* (Nordstedt) Grönblad, *Micrasterias radiosa* var. *ornata* Nordstedt, *Micrasterias radiosa* var. *murrayi* (West & G.S.West) Croasdale, *Micrasterias radiosa* var. *elegantior* (G.S.West) Croasdale, *Micrasterias radiosa* var. *aculeata* Willi Krieger a *Micrasterias radiosa* f. *aculeata* (Willi Krieger) Croasdale (Guiry & Guiry, 2016).

Ačkoliv se oba druhy na první pohled zdají dobře rozlišitelné, problém tkví v jejich varietách. U obou druhů je jich popsáno velké množství, jejich zařazení podle morfologie buněk ale není vždy jednoznačné a překrývá se. Jde například o *Micrasterias papillifera* var.

*pseudomurrayi* L.J.Laporte a *Micrasterias radios*a var. *murrayi* (West & G.S.West) Croasdale (Růžička, 1981).

## 2.5 Cíle práce

Je zřejmé, že druhový komplex krásivek *Micrasterias papillifera*/ *M. radios*a vyžaduje revizi, která by odhalila bližší vztahy mezi těmito druhy, především pak u jejich četných variet. Oba druhy jsou navíc i při běžně rutinní determinaci často chybně určeny a vzájemně zaměňovány. Prozkoumání tohoto druhového komplexu by mohlo prohloubit naše znalosti o míře skryté diverzity v rámci krásivek, jako jedné z důležitých skupin protist.

Tato diplomová práce si klade následující otázky:

1. Jaká je vnitřní diverzita druhového komplexu *Micrasterias papillifera/radiosa* a jakou taxonomickou hodnotu mají jednotlivé variety obou druhů?
2. Je možné nalezené fylogenetické linie nebo taxony morfologicky dobře vymežit? A pokud ano, na základě jakých znaků?

## 3 METODY

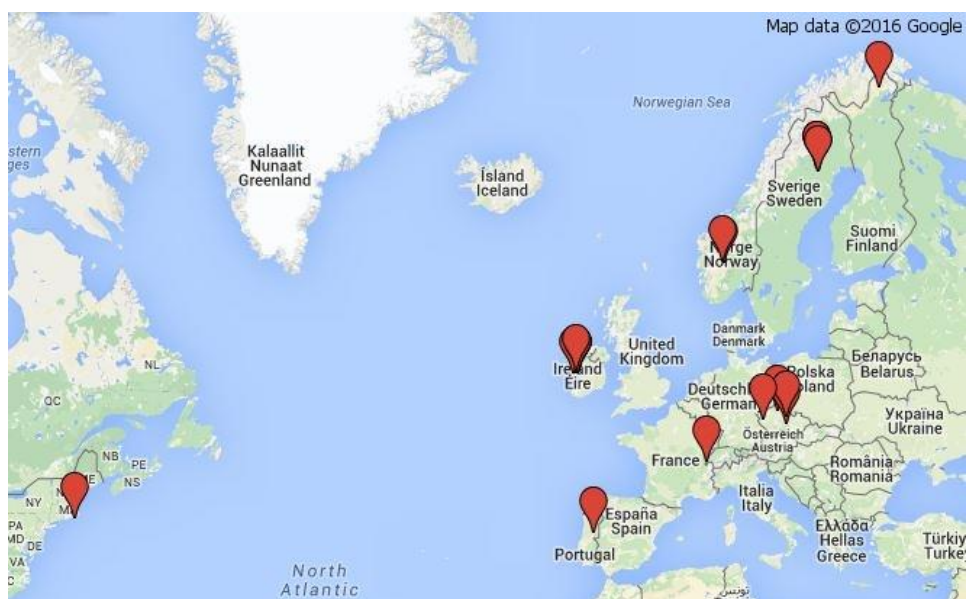
### 3.1 Odběrové lokality a získání vzorků

Odběrové lokality, na kterých byly získávány přírodní vzorky druhového komplexu *M. papillifera*/*M. radiosa* a stejně tak kmeny získané ze sbírek řas byly vybrány tak, aby svým původem pokryly co nejvíce lokalit v rámci Evropy. Většina z nich pocházela z Irska a Švédska. Dva sbírkové kmeny pak pocházely z USA. Izoláty dalších zástupců linie G poté pocházely i z dalších míst, například ze Sumatry (*M. foliacea*) nebo z Venezuely (*M. novae-terrae*).

#### 3.1.1 Česká republika

Na území České republiky byly vzorky odebrány celkem na čtyřech lokalitách. Prvním z nich byla NPR Břehyně – Pecopala v okrese Česká Lípa v Libereckém kraji. Odběr proběhnul v srpnu 2014. Lokalita se nachází severovýchodně od města Doksy. Je tvořena Břehyňským rybníkem obklopeným přilehlými rákosinami, rašeliništi a mokřadními loukami, a písčovcovou plošinou Pecopala krytou bory a bučinami Druhou lokalitou byla PR Pod Kamenným vrchem, na níž byl odběr proveden v listopadu 2014. Tato rezervace se nachází poblíž obce Polnička v okrese Žďár nad Sázavou v kraji Vysočina. Důvodem ochrany je zde vlhká louka s přírodě blízkými travními porosty s vlhkomilnými a rašeliništními druhy rostlin. Třetí vybranou odběrovou lokalitou byla PP Na Plachtě v Hradci Králové v Královéhradeckém kraji. Jedná se o bývalý vojenský prostor. Jde o významnou bezlesou lokalitu, kterou tvoří suchá vřesoviště, písčiny a slatinné louky. Avšak zároveň jsou zde podmáčená místa, na kterých jsou jak trvale, tak periodické a v nejnižším položeném místě se nachází malý, avšak trvalý rašelinný porost. Čtvrtou odběrovou lokalitou byla PR Rašeliniště U Polínek. Jedná se nížinné rašeliniště.

**Obr. 12:** Mapa odběrových míst. Znázorněny jsou jak vlastní odběry, tak kmeny získané ze sbírek řas.



### 3.1.2 Švédsko

Odběry na území severního Švédska proběhly v první polovině června 2015. Z mnoha dovezených vzorků se pro tuto práci stalo relevantních celkem pět. Odběry probíhaly v různorodých lokalitách. Část vzorků pocházela z oligotrofních jezer, konkrétně jejich bentosu a tychoplanktonu. Další vzorky pocházely ze strouhy u cesty a z řeky.

### 3.1.3 Irsko

Veškeré odběry v rámci Irska byly uskutečněny na přelomu července a srpna 2015. Naprostá většina odběrových lokalit se nacházela v okolí NP Connemara v západním Irsku. Jednalo se o oligotrofní jezera, v některých případech s rašelinným litorálem.

### 3.1.4 Norsko

Vzorky pocházející z jižního Norska jsem obdržela od Mgr. Martina Pusztai a Mgr. Terezy Šoljakové, kteří je zde odebrali v rámci práce na vlastních projektech. Jeden vzorek byl odebrán vyždímáním vegetace z litorálu oligotrofního jezera a druhý pocházel z rašeliniště.

### 3.1.5 Metody odběru vzorků

Vzorky z rašelinišť a podobných lokalit byly získány vyždímáním vegetace do odběrové lahvičky, především mechů *Sphagnum* a *Scorpidium*, čímž byl odebrán metafyton, tedy organismy rostoucí v těsné interakci s rostlinou. Přítomnost hledaných druhů rodu *Micrasterias* byla na místě zhodnocena pomocí kapesního mikroskopu Peak (Peak Optics). Vzorky pocházející z jezer byly odebrány planktonní sítí a to tím způsobem, že po hození se síť nechala klesnout téměř ke dnu a poté byla tažena směrem ke břehu. Účelem bylo odebrat vrstvu tychoplanktonu, tedy v podstatě svrchní vrstvu bentosu, který je ale pohyby vody někdy promícháván. V případě, že se v litorálu jezera nacházela vegetace, byla planktonní síť tažena především skrze ni, aby byl odebrán metafyton. Na odběrových lokalitách byly zaznamenány GPS souřadnice pomocí GPS navigace Montana 600 (Garmin) a ve většině případů i změřeno pH a konduktivita pomocí měřiče WTW 340i (WTW GmbH, Weilheim, Germany). Jednotlivé lokality sběru izolátů zkoumaného komplexu jsou pro ilustraci zobrazeny na mapce na obrázku 12.

### 3.1.6 Kmeny získané ze sbírek řas

Kromě využití izolátů z přírodních vzorků jsem se rozhodla zařadit do mé práce i kmeny ze sbírek řas, které by mohly vhodně rozšířit můj dataset. Celkově šlo o devět kmenů ze sbírek v Göttingenu (SAG) – dva kmeny, v Kolíně nad Rýnem (CCAC) – jeden kmen, v Coimbre (ACOI) – jeden kmen a v Hamburku (SVCK) – pět kmenů. Vzhledem k tomu, že krásivky mají při dlouhodobé kultivaci tendenci měnit svou morfologii a vytvářet patologické formy, byly tyto kultury několikrát přeočkovány, aby došlo k navrácení k původnímu tvaru buněk.



## 3.2 Kultivace

### 3.2.1 Příprava média

Všechny izoláty byly kultivovány v oligotrofním DY IV médiu. Do přibližně 950 ml destilované vody bylo postupně za neustálého míchání na míchadle přidáno po 1ml ze zásobních roztoků látek uvedených v tabulce 1 a 200 mg pufru MES. Dále byl přidán jeden mililitr roztoku mikroprvků (Tab. 2). Objem média byl doplněn do 1000 ml. pH média bylo upraveno pomocí vodných roztoků HCl, či NaOH na pH = 6,2 – 6,5. Médium bylo sterilizováno v autoklávu (Tuttnauer). Po vychladnutí byl přidán ještě 1 ml vitamínového roztoku (Tab. 3).

ml	Zásobní roztok	g / 100ml H <sub>2</sub> O
1	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	5
1	KCl	0,3
1	NH <sub>4</sub> Cl	0,268
1	NaNO <sub>3</sub>	2
1	β - glycerolfosfát	0,216
1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,08
1	Na <sub>2</sub> EDTA	0,7
1	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0,6
1	FeCl <sub>3</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0,166
1	CaCl <sub>2</sub>	7,5
200 mg	MES	-

**Tab. 1:** Seznam zásobních roztoků k přípravě DY IV média. Roztoky získáme rozpuštěním množství uvedeného v pravém sloupci ve 100 ml destilované vody.

Roztok mikroprvků	
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	31,4 mg
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	4,5 mg
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	1,46 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	2,35 mg
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,13 mg
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,27 mg
Rozpuštěné ve 1000ml destilované H <sub>2</sub> O	

**Tab. 2:** Složení roztoku mikroprvků.

Roztok vitamínů	
vitamin B12	0,005 g
Thiamin HCl	10 mg
Rozpuštěné ve 1000ml destilované H <sub>2</sub> O	

**Tab. 3:** Složení roztoku vitamínů.

### 3.2.2 Izolace buněk a kultivace

Vzorky byly po přivezení z odběrových lokalit umístěny do prosklené lednice do teploty 8°C bez přídavného osvětlení. Bylo jim pootevřeno víčko, aby se k nim mohl dostat vzduch a byly zde uskladněny až do izolace. Samotná izolace probíhala pomocí skleněné pasturovy pipety,

kteřá byla nad kahanem vytažena v tenkou kapiláru. Nejdříve byl na podložní sklíčko nakápnut vzorek ve vysoké vrstvě a bez krycího skla byl pozorován pod mikroskopem na zvětšení 40x nebo 100x. V něm nalezená buňka byla posléze pomocí kapiláry přemístěna na jiné podložní sklo do malé kapky média. Na sklíčku bylo takových kapek celkem 6 – 9. Následně byla postupně přenášena mezi kapkami a to pokaždé čistou sterilizovanou kapilárou, aby byla očištěna. Nakonec byla umístěna do skleněné zkumavky s víčkem naplněné přibližně do 1/3 médiem. Tyto zkumavky byly předem sterilizovány v autoklávu (Tuttnauer) a veškeré sklo použité k izolaci pomocí sušárny (Memmert) (220°C po dobu 1,5h). Kultivace následně probíhala při konstantní teplotě 18°C a v kontinuálním osvětlení 40 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> pomocí zářivek (Philips TLD 18W/33). Kultury byly přeočkovávány každé 3 – 4 měsíce, v závislosti na jejich aktuálním stavu.

### 3.3 Izolace DNA, PCR a sekvenování

K izolaci DNA bylo možné přistoupit většinou po dvou měsících, kdy bylo množství biomasy již dostačující. Pro rekonstrukci fylogeneze byly vybrány molekulární markery ITS a *psaA*, které se v předchozích pracích ukázaly být relevantní pro rozlišení taxonů na úrovni druhů a vztahů mezi nimi (Neustupa et al., 2010; Škaloud et al., 2011; Šťastný et al., 2013). Probíhala s použitím kitu InstaGene matrix (BioRad). Nejprve bylo z kultury odebráno přiměřené množství buněk do sterilních 2 ml mikro zkumavky s víčkem (Eppendorf). Po centrifugaci bylo pipetou odsáto co největší množství média. Tekutina ale zcela odstranit nešla, buňky jsou pokryté slizovou vrstvou, která to znemožňuje. Poté bylo ke vzorku přidáno 40 – 50 µl InstaGene matrix (BioRad) a několik malých skleněných kuliček. Dobře uzavřené zkumavky byly umístěny do mlýnku na drcení rostlinného materiálu Retsch MM400 s frekvencí 30 za sekundu po dobu pěti minut. Poté byly zkumavky s řasovou suspenzí umístěny do termobloku (Thermomixer compact, Eppendorf) na 30 minut při teplotě 56 °C a s frekvencí míchání 700 rpm. Všechny zkumavky byly následně vortexovány přibližně 10 s na vortexu (Vortex Genie 2, Scientific Industries). Poté byly zkumavky vloženy zpátky do termobloku, a to na 8 minut při 100 °C, poté rychle zchlazeny v ledu a ještě 10 s vortexovány. Nakonec byly stočeny na centrifuze (Centrifuge 5415D, Eppendorf) 2 minuty při 12000 rpm. Koncentrace DNA byla změřena na nanodropu (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) a byla ještě zředěna v případě, že byla vyšší než 60 ng/µl. Vyizolovaná DNA byla uchovávána při teplotě -18 °C.

K PCR amplifikaci byly vybrány markery ITS a *psaA*. Pro ITS byly použity primery Zyg ITS\_F (vlastní; TCCGTAGGTGAACCTGCAG) a ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990) a pro úsek *psaA* primery *psaA\_IF* (TTCCTTTGCCTCATGAATTC) a 1760R (CCTCTWCCWGGWCCATCRCAWGG)(J. D. Hall et al., 2008). Složení reakční směsi (master mix) je uvedeno v tabulce 4. Použita byla polymeráza AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied biosystems). Jednotlivé složky byly postupně smíchány ve zkumavce, jako poslední byla přidána

polymeráza. Reakční směs byla poté odpipetována do mikro zkumavek. Ze vzorků byl přidán vždy 1  $\mu$ l k PCR reakční směsi. Teplotní cykly jsou popsány v tabulkách 5 a 6.

<b>Gold master mix</b>	
<b>složka</b>	<b>objem</b>
ddH <sub>2</sub> O	13,1 $\mu$ l
pufř Gold	2 $\mu$ l
dNTP	0,4 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	2,2 $\mu$ l
Gold enhancer	0,6 $\mu$ l
F primer	0,25 $\mu$ l
R primer	0,25 $\mu$ l
Gold polymeráza	0,2 $\mu$ l
DNA vzorek	1 $\mu$ l

**Tab. 4:** Složení reakční směsi pro PCR.

<b>PCR teplotní cyklus - ITS</b>			
<b>fáze cyklu</b>	<b>teplota</b>	<b>doba trvání</b>	<b>opakování</b>
iniciální denaturace	94°C	5 min	1x
denaturace	94°C	1 min	35x
annealing	50°C	1,5 min	
elongace	72°C	1 min	
finální elongace	72°C	10 min	1x

**Tab. 5:** Teplotní cyklus pro PCR úseku ITS

<b>PCR teplotní cyklus - <i>psaA</i></b>			
<b>fáze cyklu</b>	<b>teplota</b>	<b>doba trvání</b>	<b>opakování</b>
iniciální denaturace	94°C	5 min	1x
denaturace	94°C	1 min	35x
annealing	52,5°C	1 min	
elongace	72°C	1 min	
finální elongace	72°C	10 min	1x

**Tab. 6:** Teplotní cyklus pro PCR úseku *psaA*

Výsledek PCR byl zhodnocen pomocí kontroly na 1% TAE agarózovém gelu. Následně byly vzorky přečištěny pomocí octanu sodného a ethanolu. K PCR produktu byly přidány 2  $\mu$ l octanu sodného a 50  $\mu$ l 96% ethanolu. Poté bylo vše krátce vortexováno a centrifugováno. Vzorky poté stály 10 – 15 minut a následně byly vloženy do centrifugy a stočeny na 3700 rpm po dobu 30 minut. Na stěně zkumavky se díky tomu vytvořil pelet. Zbylý supernatant byl odpipetován a do zkumavek bylo napipetováno 100  $\mu$ l 70% ethanolu. Vzorky byly poté stočeny na 3700 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl znovu odsátý a otevřené zkumavky s přečištěnou DNA byly

umístěny do termobloku nastaveného na 65°C, aby se odpařil zbylý ethanol. Jakmile byl obsah zkumavky zcela suchý, byl naředěn 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, nahřáté na 65°C. Koncentrace DNA byla změřena na nanodropu. Sekvenování zajišťovala firma Macrogen Inc. (Seoul, Severní Korea).

### 3.4 Fylogenetické analýzy

Alignment byl vytvořen pomocí webového rozhraní programu MAFFT verze (Kato & Standley, 2013) s automatickým výběrem strategie. Nukleotidový alignment genu *psaA* obsahoval celkem 59 sekvencí, po ručním ořezání byl dlouhý 918 nukleotidů. Byl vytvořen přidáním mnou získaných sekvencí k alignmentu obdrženého od doc. Mgr. Pavla Škalouda Ph.D. (Škaloud et al., 2011). Alignment úseku ITS rDNA (ITS1, 5,8S a ITS2) zahrnoval celkově 36 sekvencí a po ručním ořezání byl dlouhý 824 nukleotidů. Kromě dvou sekvencí outgroup (*Micrasterias radians* var. *bogoriensis* a *Micrasterias crux-melitensis* var. *crux-melitensis*) byl složený pouze z nově získaných sekvencí.

Alignment sekvencí *psaA* byl minimalizován do masky pro první, druhou a třetí pozici kodonu v programu BioEdit (T. A. Hall, 1999). Parametry substitučních modelů byly testovány v programu jModelstest (Posada, 2008) s použitím Akaikeho informačního kritéria (AIC), v případě alignmentu *psaA* pro každou ze třech pozic kodonu zvlášť.

Fylogenetické stromy byly získány metodou Bayesiánské interference (BI) v programu MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Použity byly dva paralelní běhy Monte Carlo Markovových řetězců (MCMC), každý se třemi horkými a jedním studeným řetězcem a analýza běžela po 8 000 000 generací u obou datasetů. Stromy byly zaznamenány každých 100 generací. Na základě výsledků programu jModelstest (Posada, 2008) byly pro alignment genu *psaA* vybrány modely TrNef+I pro první, JC pro druhou a TPM1uf+  $\Gamma$  pro třetí pozici kodonu. Pro alignment úseku ITS byl zvolen model GTR+  $\Gamma$ .

Dále byly výchozí alignmenty analyzovány v programu Garli (Zwickl, 2006) pomocí metody největší věrohodnosti (Maximum likelihood – ML) při nastavené strategii max. 10 000 stromů, modelu GTR+ $\Gamma$  a 100 replikacích u obou datasetů. Bootstrapové podpory větví byly stanoveny v programu PAUP\* ze 100 opakování (Swofford, 2002). Analýza maximální parsimonie (Maximum Parsimony – MP) byla provedena v programu PAUP\* (Swofford, 2002). Počet opakování byl nastaven na 1000 a maximální počet stromů omezen na 100 u obou datasetů. Hodnota bootstrapu byla vypočítána z 1000 opakování.

Výsledné stromy získané metodou Bayesiánské interference byly zobrazeny jako zakořeněné pomocí outgroup v programu FigTree v. 1.4.2 (Rambaut, 2009). Statistická podpora větvení byla vysvětlována jako slabá (< 50 pro ML a MP, < 0,5 pro BI), střední (pro BI 0,5 – 0,94, pro ML a MP 50 – 79) a vysoká (pro BI > 0,94, pro ML a MP > 79).

### 3.5 Světelná mikroskopie a měření buněk

Veškeré použité izoláty byly pozorovány pod mikroskopem (Olympus CX31, CX22L, CX21) a určeny podle relevantní taxonomické literatury (Ralfs, 1848; West & West, 1905; Krieger, 1939; Prescott et al., 1977; Coesel & Meesters, 2007). Od každé kultury bylo pořízeno 20 snímků buněk na mikroskopu Olympus BX51 (Olympus Corporation) vybaveného kamerou Olympus DP72 (Olympus Corporation) a programem QuickPHOTO CAMERA 2.3 (Promicra s.r.o). Délka a šířka 20 buněk od každého izolátu byla změřena v programu ImageJ (Rasband, 2016).

## 4 VÝSLEDKY

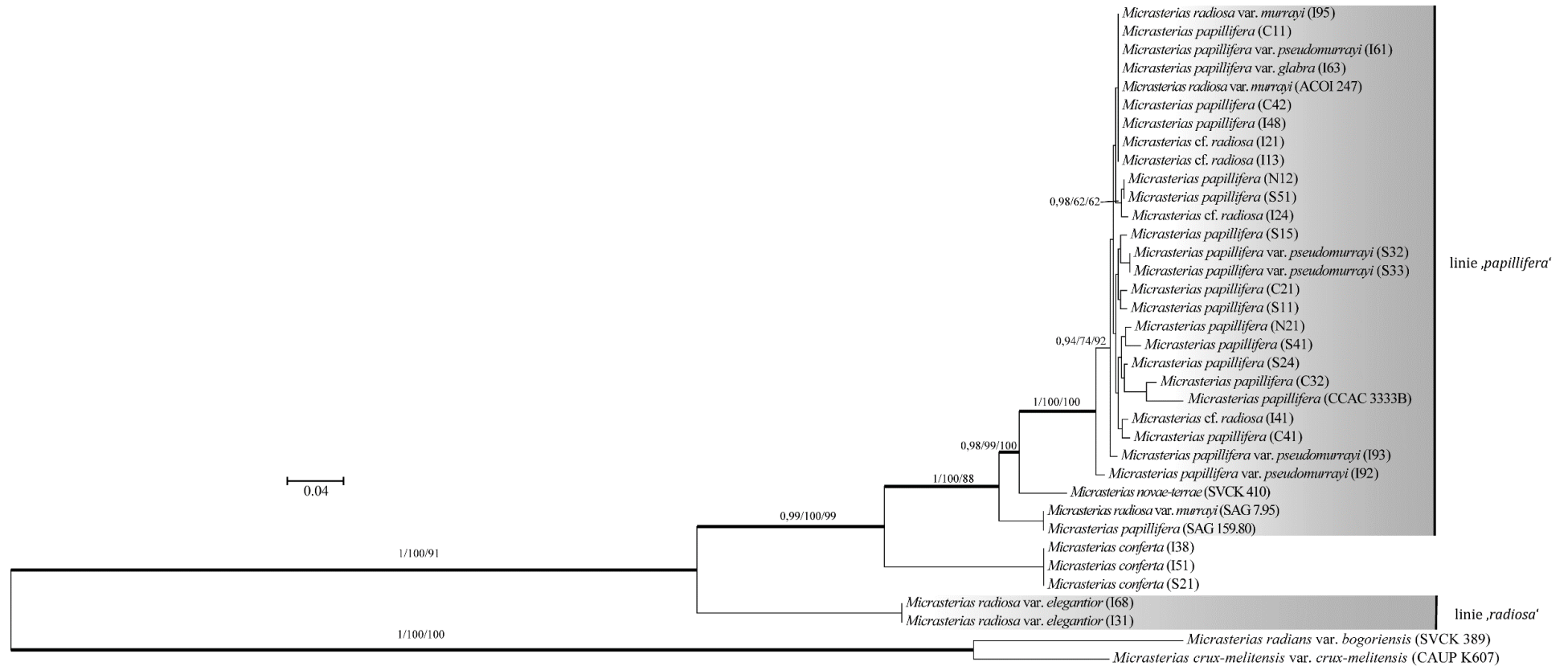
### 4.1 Diverzita

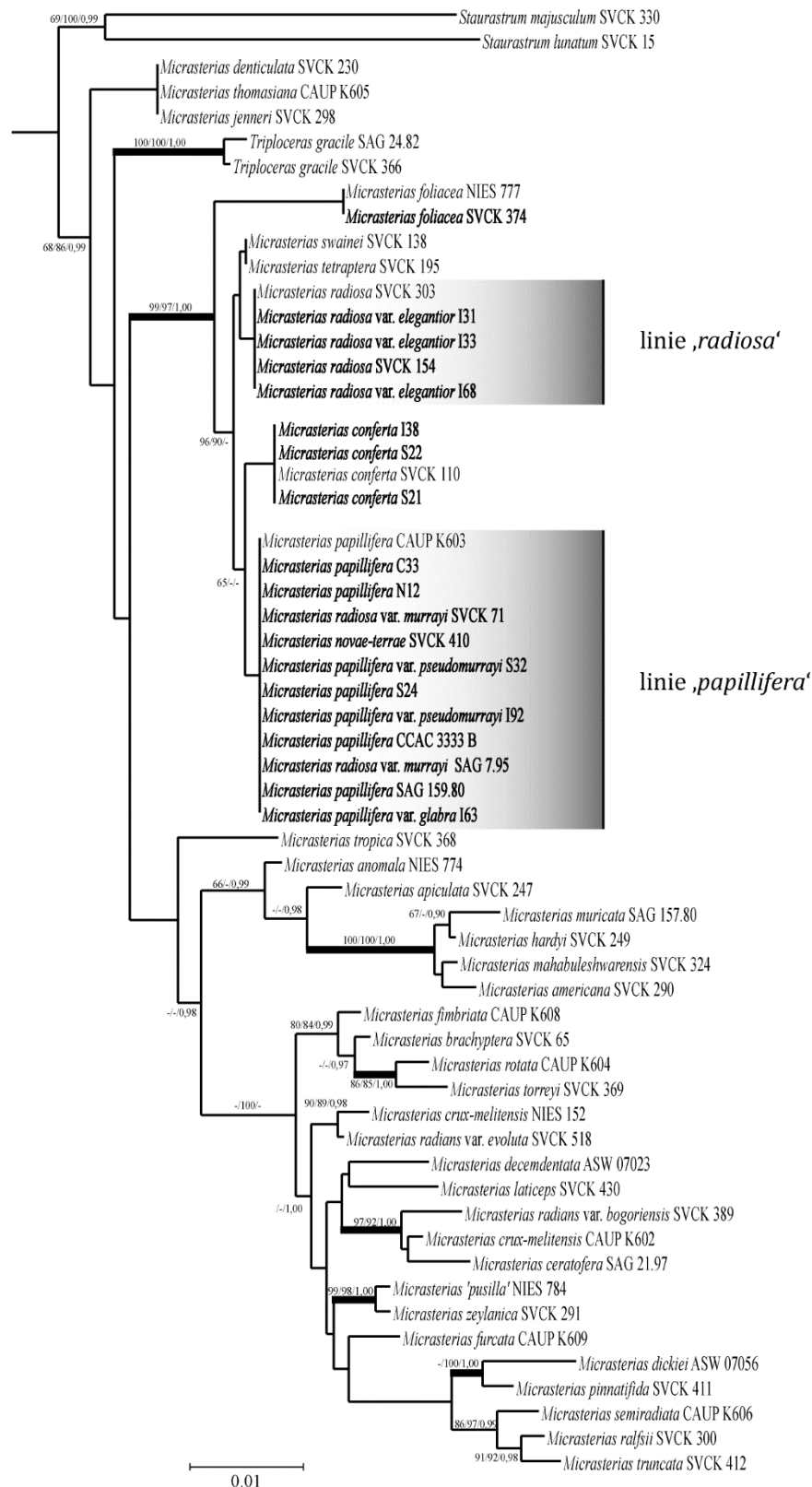
K prozkoumání diverzity druhového komplexu *Micrasterias papillifera*/ *M. radiosa* bylo použito celkem 95 sekvencí. Pro úsek ITS rDNA (ITS1, 5,8S a ITS2) to bylo 36 a kromě dvou sekvencí outgroup byly všechny získány nově. Pro *psaA* to bylo celkem 59 sekvencí, z toho 19 bylo nově získaných pro tuto práci. Sekvencí zkoumaného druhového komplexu bylo 36. Získané úseky sekvencí ITS byly dlouhé 824 nukleotidů a sekvence *psaA* 918 nukleotidů. Přístupové kódy pro získané sekvence do databáze GeneBank jsou uvedeny v tabulce 7 v příloze. Vlastní sekvence jsou v ní označeny kódem UN.

Fylogenetický strom sekvencí ITS obsahoval tři linie izolátů náležících do linie G (Obr. 13). Izoláty druhového komplexu *Micrasterias papillifera*/ *M. radiosa* vytvořily dvě linie. Všechny měly vysoké hodnoty posteriorní pravděpodobnosti (PP; < 0,94) i hodnoty bootstrapu (ML a MP; > 79). První a zároveň největší linií je linie ‚*papillifera*‘, ve které je 21 izolátů. V rámci této linie lze rozeznat ještě několik dalších menších linií s vysokou podporou. S maximální podporou vyšla linie, ve které najdeme všechny evropské izoláty. V rámci této linie lze najít mnoho dílčích menších linií, z nich ale většina nemá dostatečnou podporu, kromě dvou výjimek. První z nich tvoří tři izoláty; N12, S51 a I24. Druhou takovou linií je linie zahrnující naprostou většinu izolátů linie ‚*papillifera*‘, kromě čtyř dalších izolátů. Samostatné linie dále tvoří *Micrasterias novae-terrae* a dva izoláty, z nichž jeden pochází z USA. Druhou velkou linií tvoří tři izoláty *M. conferta* a v třetí linii ‚*radiosa*‘ jsou dva izoláty.

Ve stromě sekvencí *psaA* (Obr. 14) můžeme jasně vidět pozici linie G (podle Škaloud et al. 2011) v rámci fylogeneze rodu *Micrasterias*, do které náležely všechny nově získané sekvence druhového komplexu *M. papillifera*/ *M. radiosa*. Její podpora byla vysoká. Lze v ní rozeznat pět dalších menších linií a ve dvou z nich se nachází izoláty zkoumaného druhového komplexu. První z nich tvoří dva izoláty *M. foliacea*. Ve druhé najdeme *M. swainei* a *M. tetraptera*. Třetí je linie ‚*radiosa*‘, která obsahuje pět izolátů, z nich dva se nacházejí ve stejnojmenné linii ve stromě ITS. Čtyři z pěti sekvencí byly získány nově. Další je linie čtyř izolátů *M. conferta*. Sekvence tří izolátů v ní byly získány nově. Pátá z nich je linie ‚*papillifera*‘, ve které najdeme 12 izolátů, jejichž sekvence byly kromě jedné nově získány. Devět izolátů této linie se vyskytuje ve stejnojmenné linii ve fylogenetickém stromě ITS, zbylé tři se v tomto stromě nenacházejí.

**Obr. 13:** Fylogenetická analýza sekvencí úseku ITS rDNA od zástupců druhového komplexu *Micrasterias papillifera*/*M. radiosa* a příbuzných druhů. Šedé boxy zvýrazňují linie zkoumaného druhového komplexu. Čísla na uzlech znázorňují statistické podpory (BPP/ML/MP). Zvýrazněné jsou větve s posteriorní pravděpodobností 1,00 nebo bootstrapem 100. Zobrazeny jsou pouze podpory větší než 50, respektive 0,5 (BPP/ML/MP).





**Obr. 14:** Fylogenetická analýza sekvencí *psA* pro 59 zástupců rodu *Micrasterias*. Čísla na uzlech znázorňují statistické podpory (ML/MP/BPP). Šedé boxy zvýrazňují linie zkoumaného druhového komplexu. Zvýrazněné jsou větve s posteriorní pravděpodobností 1,00 nebo bootstrapem 100. Zobrazeny jsou pouze podpory větší než 50, respektive 0,5 (ML/MP/BPP).



## 4.2 Morfologie

V této práci bylo celkově pracováno s 34 monoklonálními kulturami druhového komplexu *Micrasterias papillifera*/ *M. radiosa*. Všechny byly vyfotografovány, změřeny a určeny podle relevantní taxonomické literatury. Z toho 28 bylo izolováno pro tuto práci a dalších 6 získáno ze sbírek řas. Izoláty reprezentovaly oba dva druhy zkoumaného komplexu a jejich pět variet. Dále byly prozkoumány 4 izoláty blíže příbuzného druhu *M. conferta*.

Prvním byl *M. papillifera* Brébisson ex Ralfs, jehož morfologii odpovídalo celkem 16 izolátů (Obr. 15, 16 a 17a – e). Ty pocházely z Evropy; z České republiky (6 izolátů), Švédska (5 izolátů), Irska (1 izolát), Norska (2 izoláty), Švýcarska (1 izolát) a jeden izolát byl bez přesného zařazení. Rozsah jejich průměrných velikostí byl 100 – 145  $\mu\text{m}$  na délku a šířku měly průměrně 110 – 145  $\mu\text{m}$ . Na všech buňkách se vyskytovaly dva malé výběžky na polárním laloku (Obr. 17b). Na většině buněk byly přítomné ostny (Obr. 17d), ačkoliv jejich počet a byl variabilní a lišil se i mezi buňkami v jedné kultuře. Výjimečně nebyly ostny přítomny vůbec. Izoláty pocházely z různorodých podmínek, 7 z nich z rašelinišť (Česká republika a Norsko), 6 z jezer (Švédsko, Irsko, Norsko), u dvou sbírkových kmenů byla přesná lokalita odběru neznámá a jeden izolát byl nalezen v rašelinné strouze u cesty (Švédsko).

Morfologii popsanou jako *Micrasterias papillifera* var. *glabra* (Irénée-Marie) K.Förster měl jeden jezerní izolát z Irska (Obr. 19e). Povrch jeho buňky je vždy bez ostnů (obr. 19f), přítomny jsou pouze dva výběžky na polárním laloku, charakteristické pro tento druh. Průměrná délka buněk této variety byla 123  $\mu\text{m}$  a šířka 128  $\mu\text{m}$ .

Dalších 5 izolátů bylo určeno jako *Micrasterias papillifera* var. *pseudomurrayi* L.J.Laporte a pocházely ze Švédska (2 izoláty) a z Irska (3 izoláty) (Obr. 18). Jejich průměrná délka byla 146 – 176  $\mu\text{m}$  a šířka 154 – 173  $\mu\text{m}$ . Povrch jejich buněk byl většinou s malým počtem ostnů nebo bez nich a na všech buňkách byly přítomny dva výběžky na polárních lalocích (Obr. 18f). Dva švédské izoláty pocházely z pomalu proudící části doširoka rozlité řeky a tři irské izoláty z jezer.

Jako *Micrasterias* cf. *radiosa* Ralfs byly podle publikace Desmids of the Lowlands (Coesel & Meesters, 2007) určeny celkem 4 izoláty z Irska (19a – d). Jejich průměrná délka byla 148 – 153  $\mu\text{m}$  a šířka 150 – 156  $\mu\text{m}$ . U všech se vyskytovaly na polárních lalocích dva výběžky a všechny pocházely z jezer.

*Micrasterias radiosa* var. *elegantior* (G.S.West) Croasdale byl zastoupen třemi izoláty (Obr. 20a – d). Průměrná délka buněk v jejich kulturách byla 161 – 182  $\mu\text{m}$  a šířka 170 – 191  $\mu\text{m}$ . Všechny pocházely výhradně z irských jezer a jejich buněčná stěna byla hladká, pouze na polárním laloku se nacházely dva velké výběžky (Obr. 20b). Tato varieta měla jasnou tendenci ke změně morfologie během kultivace. Oproti buňkám v přírodních vzorcích docházelo

k „mohutnění“ laloků buněk. Jedna z charakteristik této variety je její „křehký“ vzhled (Obr. 22b), který u kultur již nebyl tolik patrný. Vlnitost laloků ale přetrvala i v kulturách (Obr. 20a-d, 22a).

Čtyři izoláty byly určeny jako *Micrasterias radiosa* var. *murrayi* (West & G.S.West) Croasdale (Obr. 21). Měly průměrnou délku 111 – 168  $\mu\text{m}$  a šířku 130 – 176  $\mu\text{m}$ . Pocházely z Irska, Finska, Portugalska a USA a kromě izolátu z Irska šlo o sbírkové kmeny. Buněčnou stěnu měla většina buněk pokrytou jen malým počtem ostnů nebo zcela scházely. Na polárních lalocích byly přítomny dva ostny (Obr. 21b, d). Lokality sběru těchto izolátů byly různorodé; dva pocházeli z jezer (Irsko a Portugalsko), jeden z rašeliniště (USA) a u jednoho nebyl původ známý. U izolátu SVCK 71 nebylo určení do této variety zcela jasné.

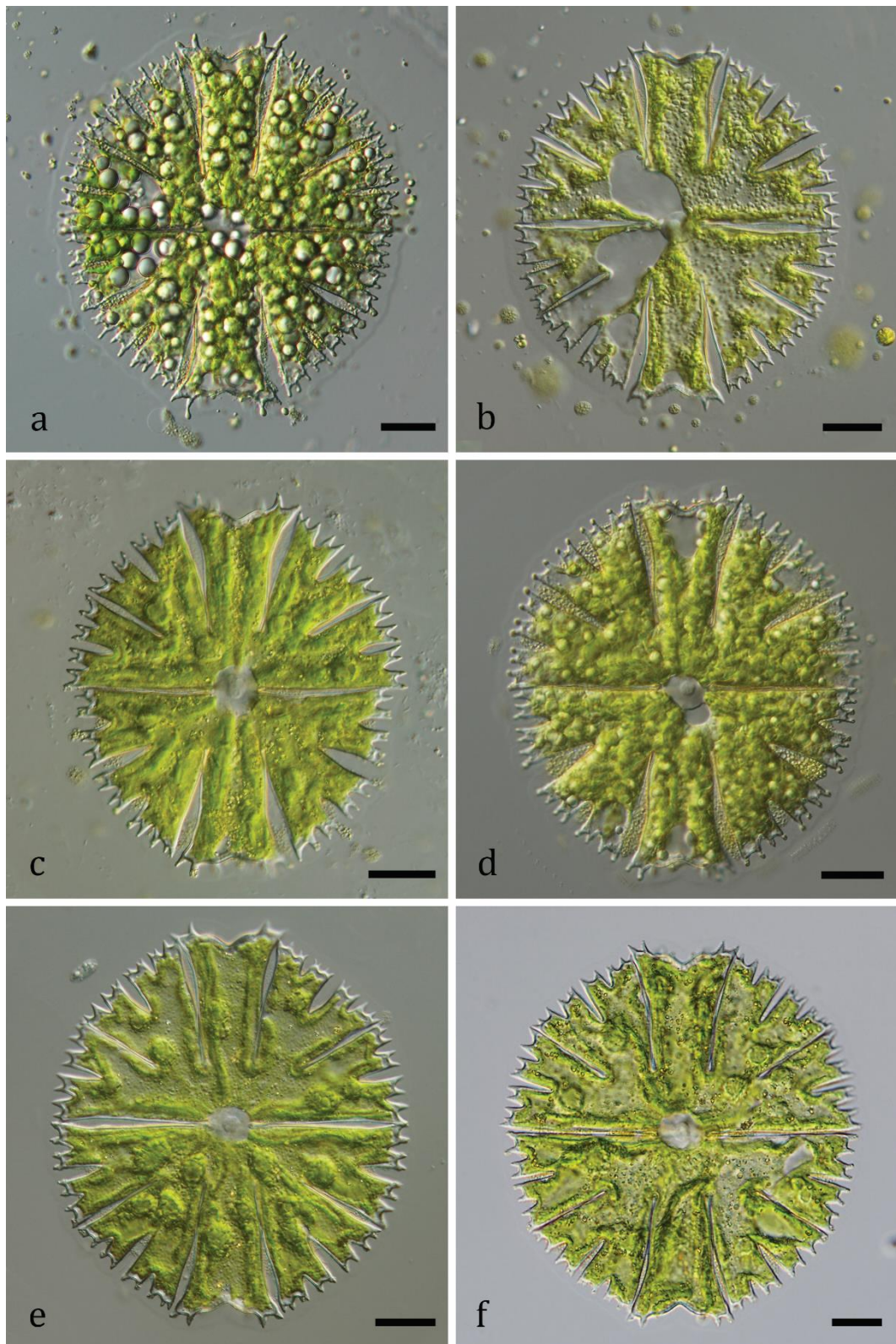
Celkem bylo jako *M. papillifera* nebo jeho varieta určeno 22 izolátů a jako varieta druhu *M. radiosa* 11 izolátů. U sbírkového kmene SVCK 154 se nepodařilo získat relevantní fotografii vzhledem ke špatnému stavu kultury. Určení u něj bylo velmi problematické vzhledem k morfologickým změnám, které byly způsobeny kultivací.

Izoláty z velké linie ‚*papillifera*‘ byly určeny jako pět ze šesti nalezených druhů a jejich variet. Šlo o *M. papillifera*, *M. papillifera* var. *glabra*, *M. papillifera* var. *pseudomurrayi*, *M. cf. radiosa* a *M. radiosa* var. *murrayi*, které pocházely z mnoha odběrových míst napříč Evropou a všech druhů stanovišť. Jejich průměrná délka byla 100 – 176  $\mu\text{m}$  a šířka 104 – 176  $\mu\text{m}$ . Do této linie patřil i sbírkový kmen SVCK 410, tedy *Micrasterias novae-terrae* (J.A.Cushman) Willi Krieger (Obr. 20e), který je popsán jako samostatný druh a od *M. papillifera* se liší tvarem laterálních laloků a šířkou zářezu, který je odděluje od polárního laloku. *Micrasterias conferta* (Obr. 17f), blízký příbuzný *M. papillifera*, naproti tomu tvoří samostatnou a dobře podpořenou linii. Jeho izoláty byly i morfologicky velmi uniformní.

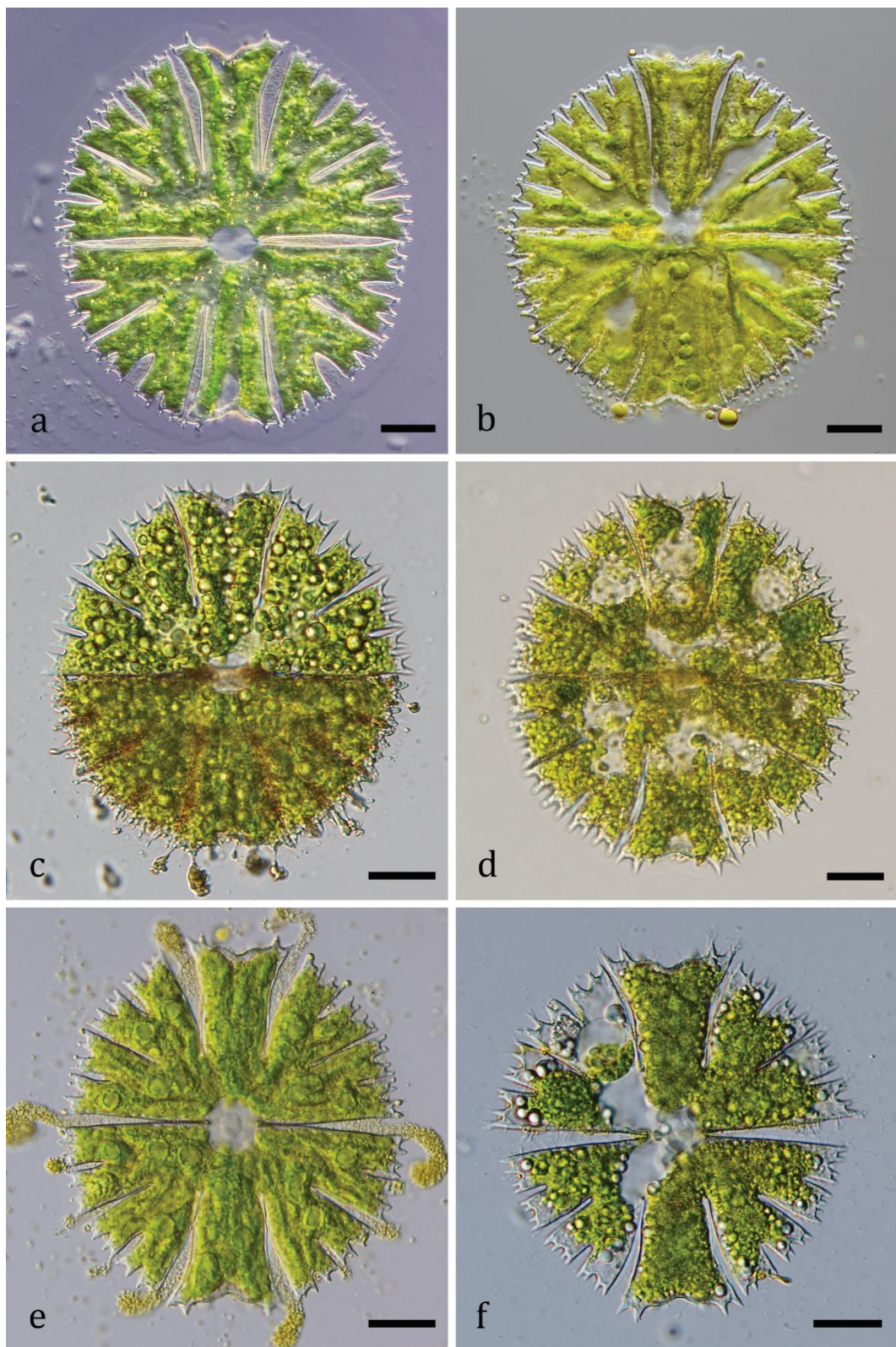
Linie ‚*radiosa*‘ tvořena pouze jednou varietou, a to *M. radiosa* var. *elegantior*. Všechny tři jeho izoláty pocházejí z irských jezer. Jejich průměrná délka byla 161 – 182  $\mu\text{m}$  a šířka 170 – 191  $\mu\text{m}$ .

Laloky izolátů komplexu *M. papillifera*/ *M. radiosa* byly většinou děleny do 3–4 řádu. Většina izolátů *M. papillifera sensu lato* měla na první pohled laloky dělené pouze do třetího řádu. Čtvrtého řádu byly pak pouze laterální laloky nejbliže polárnímu laloku. Podobně tomu bylo i u *M. radiosa* var. *murrayi* a *M. cf. radiosa*. Pouze u *M. radiosa* var. *elegantior* byly laterální laloky děleny na první pohled nerovnoměrně. Ty blíže sinu měly nižší stupeň větvení. Tabulka všech určených izolátů, včetně jejich geografického původu, odběrové lokality a rozměrů je uvedena v příloze této práce (Tab. 7).

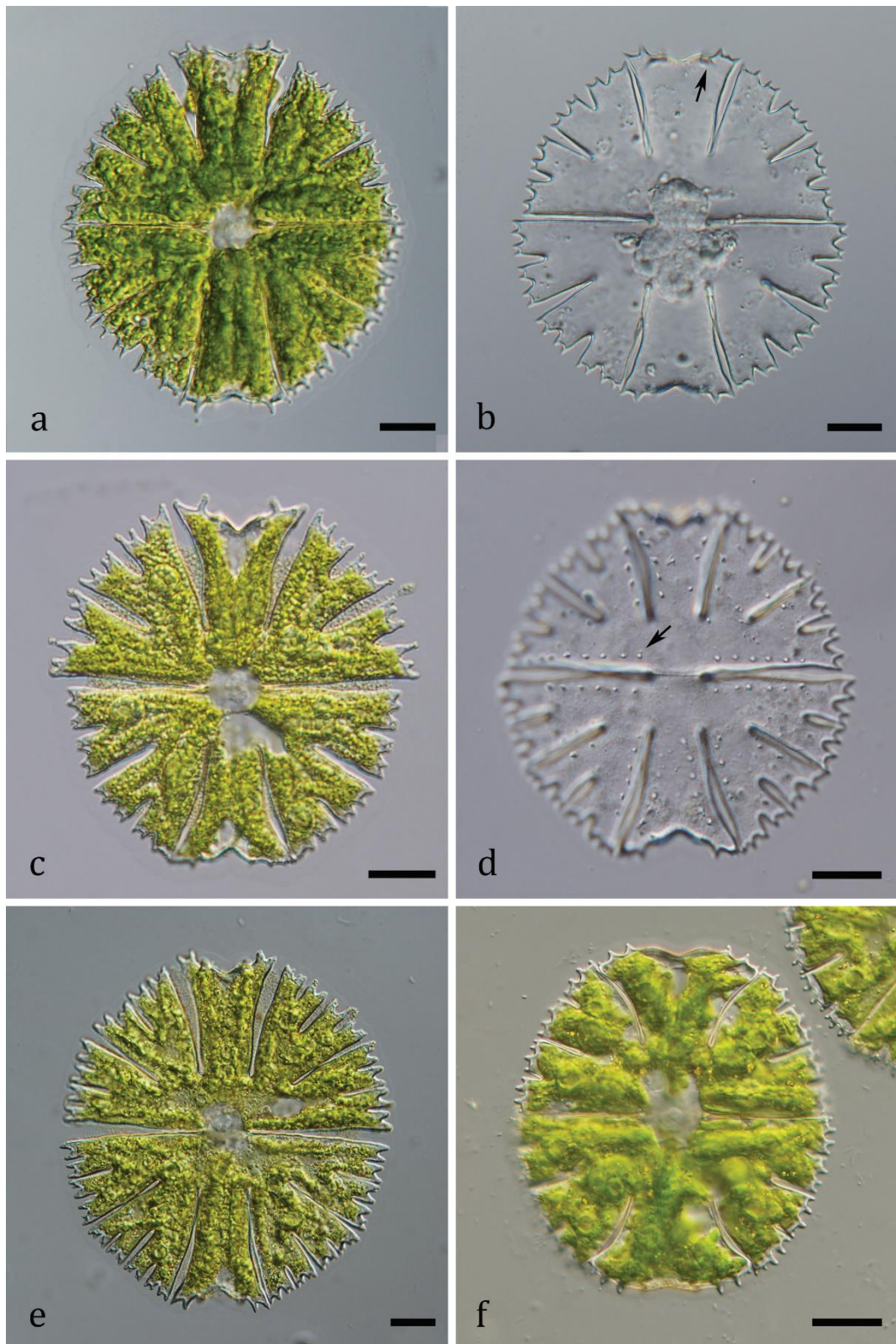
Tomuto komplexu blízce příbuzný druh *Micrasterias conferta* se ukázal být morfologicky uniformní (Obr. 17e).



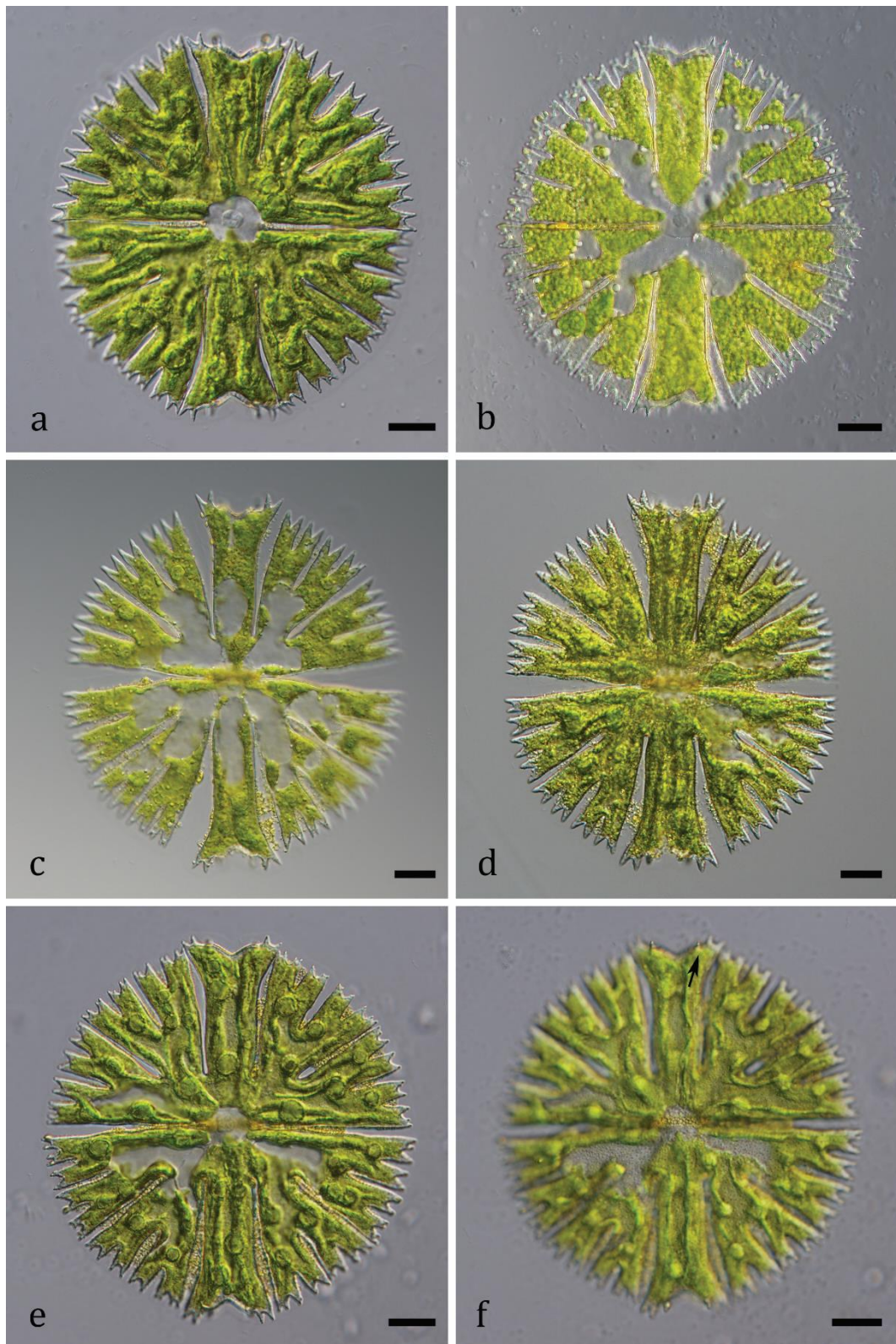
**Obr. 15:** Izoláty druhu *Micrasterias papillifera*: a: C11; b: C21; c: C32; d: C33; e: C41; f: C42. Měřítko = 20  $\mu\text{m}$ .



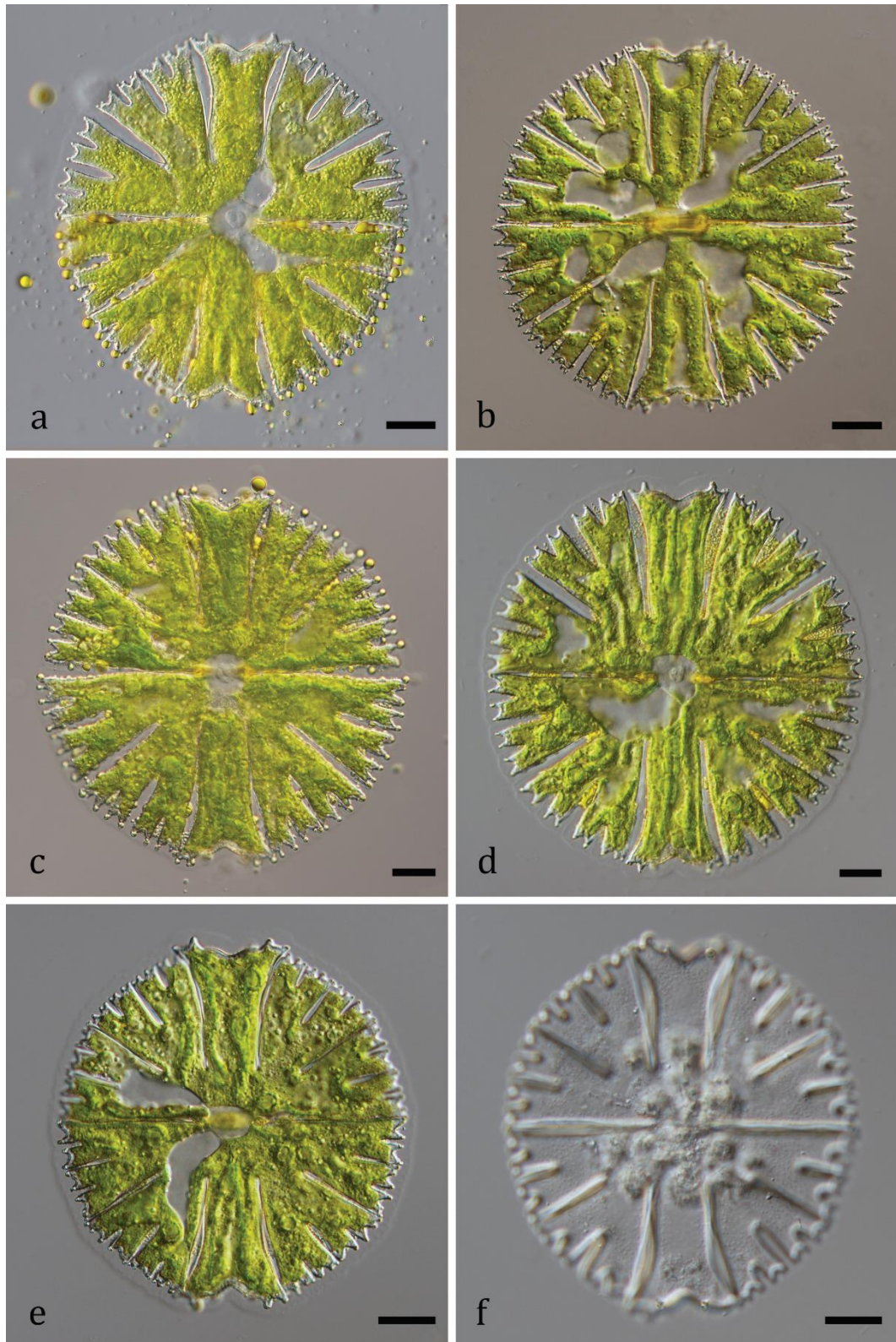
**Obr. 16:** Izoláty druhu *Micrasterias papillifera*: a: CCAC 3333; b: I48; c: N12; d: N21; e: S11; f: S15.  
Měřítko = 20  $\mu$ m.



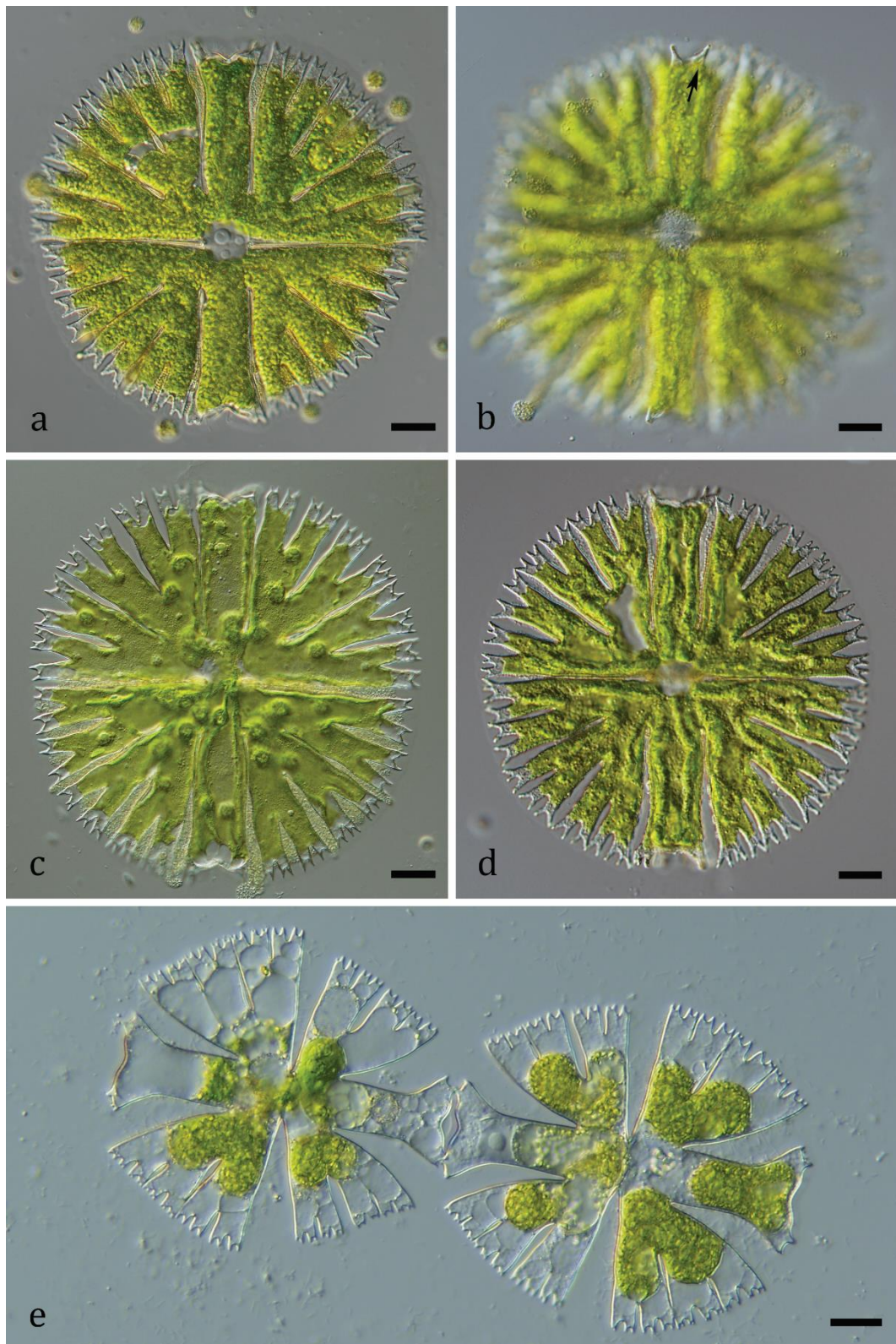
**Obr. 17:** Izoláty druhu *Micrasterias papillifera*: a: S24; b: S41 – prázdná buněčná stěna, šipka označuje výběžek na polárním laloku; c: SAG 159.80; d: SAG 159.80 – prázdná buněčná stěna s viditelnými ostny, označeno šipkou; e: S51; *M.conferta*: f: S22. Měřítko = 20  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 18:** Izoláty druhu *Micrasterias papillifera* var. *pseudomurrayi*: a: I92; b: I61; c: S32; d: S33; e: I93; f: I93 – zaostřeno na výběžky na polárním laloku, které jsou označeny šipkou. Měřítko = 20  $\mu\text{m}$ .

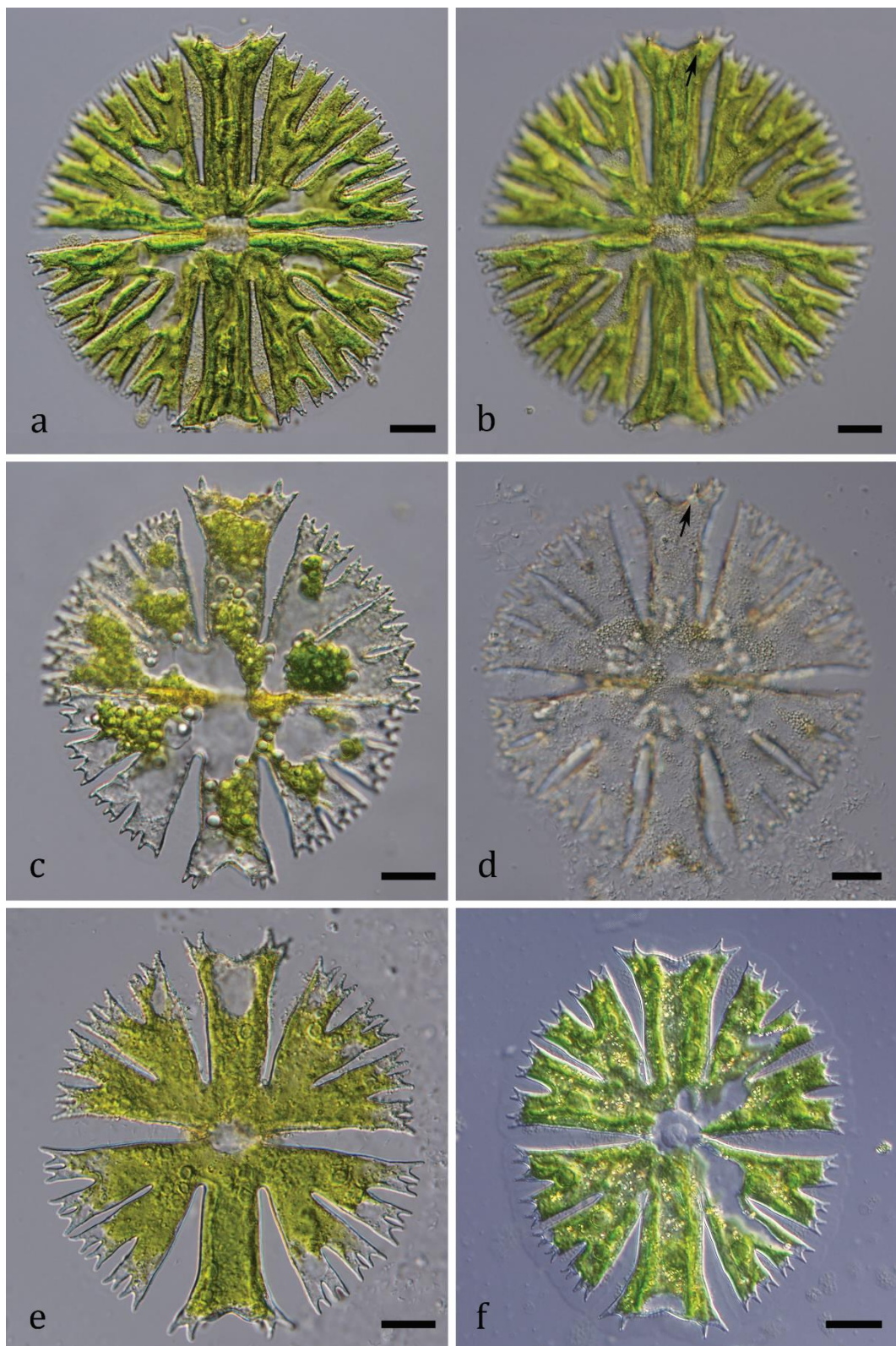


**Obr. 19:** Izoláty druhu *Micrasterias* cf. *radiosa*: a: I13; b: I21; c: I24; d: I41; *M. papillifera* var. *glabra*: e: I63; f: I63 – prázdná buněčná stěna, měřítko = 20  $\mu\text{m}$ .

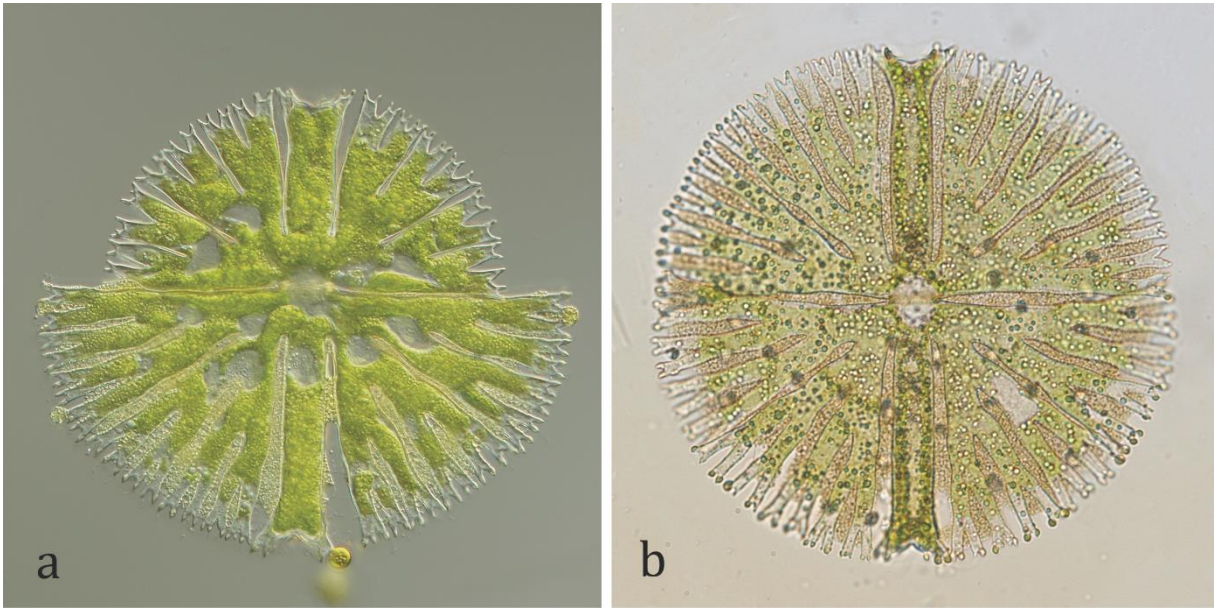


**Obr. 20:** Izoláty druhu *Micrasterias radiosa* var. *elegantior*: a: I31; b: I31 - zaostřeno na výběžky na polárním laloku označené šipkou; c: I33; d: I68; *M. novae-terrae*: e: SVCK 410. Měřítko = 20  $\mu\text{m}$ .





**Obr. 21:** Izoláty druhu *Micrasterias radiososa* var. *murrayi*: a: I95; b: I95 - zaostřeno na výběžky na polárním laloku označené šipkou; c: SVCK 71; d: SVCK 71 - zaostřeno na výběžky na polárním laloku označené šipkou; e: SAG 7.95. Měřítka = 20  $\mu$ m.



**Obr. 22:** *Micrasterias radiosa* var. *elegantior*; a: 168, dělící se buňka v kultuře, na spodní polovině fotografie je půlbuňka s morfológií blízkou přírodní populaci, b: vzhled buněk v přírodních vzorcích, foto: Jan Šťastný.

## 5 DISKUZE

Diverzita druhového komplexu *M. papillifera*/*M. radiosa* byla zhodnocena pomocí rekonstrukce fylogeneze úseku ITS a genu *psaA*. V případě analýzy genu *psaA* jsem měla kromě vlastních sekvencí z nalezených izolátů z přírody k dispozici i sekvence použité k rekonstrukci fylogeneze rodu *Micrasterias* ve studii od Škaloud et al. (2011). Na stromě můžeme vidět pozici dobře podpořené linie G v rámci fylogeneze celého rodu. Tato linie má vysokou podporu a spadají do ní všechny nově získané sekvence. Jednu z linií tvoří tři izoláty *M. conferta*, které jsou morfologicky velmi uniformní, a o jejich taxonomickém zařazení není pochyb. Jde o blízké příbuzné *M. papillifera* a vyskytují se na stejných stanovištích, ačkoliv jde o vzácnější druh, který se vyskytuje hlavně v severní Evropě a nálezy ze střední Evropy jsou výjimečné (Růžička, 1981). Již při letném pohledu na zastoupení druhů v liniích obou fylogenetických stromů je zřejmé, že morfologie izolátů nekoresponduje s jejich pozicí v rámci linií. V případě obou stromů můžeme v linii ‚*papillifera*‘ najít i izoláty určené jako variety *M. radiosa sensu lato*. Topologie obou stromů není zcela shodná. V rámci linie ‚*papillifera*‘ lze ve stromě sekvencí ITS nalézt vnitřní variabilitu. Vzhledem k tomu, že rozdíl mezi izoláty této linie byl pouze maximálně čtyři nukleotidové záměny, lze ji vysvětlovat spíše jako populační variabilitu nebo případně náznak recentní speciace. Podobně tomu bylo například u druhu *M. truncata*, který vykazoval kryptickou diverzitu (Nemjová et al., 2011).

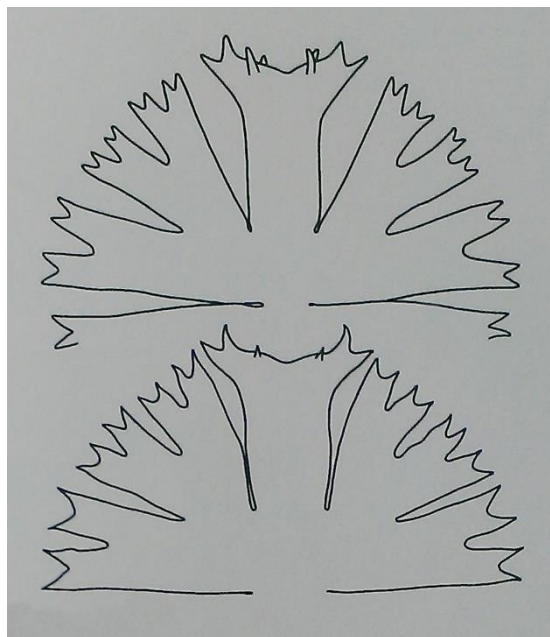
### 5.1 Linie ‚*papillifera*‘

Linie ‚*papillifera*‘ ve stromě ITS byla zastoupena největším počtem izolátů. Ale z těchto 29 kmenů bylo jako tento druh určeno pouze 21 izolátů, dalších 7 jako *M. radiosa* a jeden izolát byl druh *M. novae-terrae*. V rámci této velké linie bylo možno rozlišit několik dalších menších linií. První z nich obsahuje dva izoláty, z nichž jeden je původem z USA (SAG 7.95) a byl určen jako *M. radiosa* var. *murrayi*. Podle sbírky se však jednalo o druh *M. papillifera*. U druhého (SAG 159.80) nebyl znám původ a šlo o *M. papillifera*. Pokud by i on pocházel z Ameriky, bylo by pravděpodobné, že tato linie je populací z tohoto kontinentu. Takto geograficky oddělená populace po čase může speciovat v samostatný druh. Příkladem může být africký *M. radians* var. *evoluta* a *M. radians* var. *bogoriensis* z Malaisie, které jsou geograficky oddělené a jde o pseudokryptické druhy (Neustupa et al., 2010).

V další z menších linií nacházíme druh *M. novae-terrae*. I v rámci stromu pro *psaA* je součástí linie ‚*papillifera*‘. Ačkoliv se o něm v taxonomické literatuře objevují záznamy jako o samostatném druhu (Prescott et al., 1977), aktuálně tak není uznán (Guiry & Guiry, 2016). Morfologie kmenu SVCK 410 (Obr. 20e) byla odlišná od izolátů *M. papillifera* i *M. radiosa* a

**Obr. 23:** *Micrasterias novae-terrae* podle Prescott et al. (1977).

neodpovídala jeho popisu v literatuře (Prescott et al., 1977; Obr. 23). Tento konkrétní izolát je ze sbírky SVCK a pochází ze Jižní Ameriky, z Venezuely. Vzhledem k faktu, že krásivky mají tendenci měnit při dlouhodobé kultivaci svoji morfologii, se nemůžeme dozvědět, jak jeho buňky vypadaly původně a nakolik bylo určení přesné. Pokud by bylo, pak lze říct, že druh *M. novae-terrae* je pouhou ekomorfou *M. papillifera*, případně jeho populací. Je ale možné, že byl tento sbírkový kmen pouze nesprávně určen a jde opravdu o izolát druhu *M. papillifera*, jehož morfologie je ale poznamenána dlouhodobou kultivací.



V dalších dvou menších liniích se v rámci velké linie ‚*papillifera*‘ nachází dva izoláty určené jako *M. papillifera* var. *pseudomurrayi*; I92 a I93. Obě pochází ze stejné lokality v Irsku. Zástupci této variety jsou ale roztroušeni v rámci celé linie ‚*papillifera*‘. Tyto dva izoláty se nijak morfologicky neliší od ostatních izolátů této variety. Rozdíl mezi touto varietou a *M. papillifera* spočívá především ve větší otevřenosti zářezů mezi laloky a výraznějším a větším polárním lalokem (Růžička, 1981). Varieta *pseudomurrayi* má i větší buňky. I ty v průměru nejmenší izoláty měly buňky větší, než jaké byly u největších z izolátů *M. papillifera*. Tyto rozdíly byly při pozorování patrné na první pohled. Jeden izolát byl určen jako *M. papillifera* var. *glabra*. Od *M. papillifera* se odlišuje především absencí trnů na buněčné stěně. Velikostně se však neodlišuje.

V linii ‚*papillifera*‘ ale nacházíme i izoláty určené jako *M. cf. radiosa*. Určení u nich nebylo zcela jednoznačné. Morfologicky velmi podobné nálezy byly v literatuře zpravidla určovány právě jako *M. radiosa*, například v publikaci *Desmids of the Lowlands* (Coesel & Meesters, 2007). Charakteristický pro ně byl především celkově okrouhlejší tvar a měly v průměru větší buňky než u *M. papillifera*. I *M. radiosa* var. *murrayi* byla zástupcem v této linii. Charakteristické pro ni jsou otevřený sinus a výrazný polární lalok. I zářezy mezi laterálními laloky a mezi laterálním a polárním lalokem jsou otevřenější než u *M. papillifera*. Je ale menší než mají být buňky jiných variet *M. radiosa* (Růžička, 1981).

I přes relativně velké morfologické rozdíly jsou tyto izoláty variet *M. papillifera* a *M. radiosa*, společně s *M. novae-terrae*, zástupci jedné linie. Jedná se o izoláty z lokalit napříč Evropou a zastoupen je i kmen z USA a Venezuely. Zároveň pocházejí z různých biotopů; z rašelinišť, jezer i

řeky. Nejvíce jich pochází z Irska a na jedné lokalitě se zde často nacházeli zástupci různých druhů a variet. Například ze vzorku z jezera Derrylare Lough byly izolovány *M. papillifera* var. *pseudomurrayi* (I61) a *M. papillifera* var. *glabra* (I63) a z jezera Lough Knockaunawaddy pak *M. cf. radiosa* (I41) a *M. papillifera* (I48).

Najdeme u nich nějaké znaky, které je všechny spojují? Lze zpozorovat, že všechny izoláty linie ‚*papillifera*‘, ačkoliv jsou určeny jako různé variety a druhy, mají podobný tvar polárního laloku. Ve většině případů vůči laterálním lalokům nápadně velký a často je i delší než laterální laloky a přesahuje tak obrys buňky. Směrem od istmu k jeho apikálnímu konci se rozšiřuje a jeho tvar je podobný tvaru zvonu. Na apikálním konci má pak dva výběžky, které jsou přítomny u všech izolátů. Jejich velikost je ale variabilní. Protoplast má většinou hnědavě zelenou barvu. Tu způsobuje ukládání zlatavé látky neznámého charakteru a olejovitého vzhledu, což je dobře pozorovatelné na Obr. 19c. Hromadění lipidů v buňkách spájkivky *Mesotaenium* popsal Boney (1981) jako jednu z charakteristik buněk, které ve stavu určité „hibernace“ přečkávaly léto. Tato látka, popřípadě jiná totožného vzhledu, je buňkami sekretována do okolí. Po vyloučení vytváří krůpěje na výběžcích laloků, tzv. papily, což dává buňkám mírně „chlupatý“ vzhled a zároveň se jedná o etymologický původ druhového jména *papillifera* (Ralfs, 1848). Jde ale o látku odlišnou od polysacharidového slizu (patrné na Obr. 19a). Ten tvoří vnější vrstvu buněčné stěny krásivek (Brook, 1981). Laloky izolátů této linie jsou větveny až na vzácné výjimky (N21 a S24) do třetího až čtvrtého řádu. Na první pohled však vypadá větvení pouze jako třetího řádu a čtvrtého bývají pouze některé části laterálního laloku nejbliže polárnímu laloku.

Ve stejné linii ‚*papillifera*‘ ve stromě *psaA* však žádná vnitřní variabilita nebyla a všechny izoláty, které se v ní nacházely, měly stejné sekvence tohoto úseku DNA. Na základě všech těchto výsledků a charakteristik, které spolu izoláty sdílí, se lze domnívat, že všechny izoláty, které se nachází v linii ‚*papillifera*‘, jsou druhem *M. papillifera*, ať již mají morfologii jako nominální *M. papillifera* nebo některá z jejích variet. I izoláty určené jako *M. cf. radiosa* a *M. radiosa* var. *pseudomurrayi* budou také druhem *M. papillifera*.

## 5.2 Linie ‚*radiosa*‘

Linie ‚*radiosa*‘ byla na obou fylogenetických stromech zastoupena celkem pěti izoláty, čtyři z nich jsem měla k dispozici jako monoklonální kulturu a od jednoho pouze sekvenci *psaA*. Tři ze čtyř morfologicky zkoumaných izolátů byly odebrány v irských jezerech, na dvou lokalitách. Tyto tři izoláty byly určeny jako *M. radiosa* var. *elegantior*. I ve stromě sekvencí ITS tvořily dva izoláty této variety jednu linii. Všechny tři si byly morfologicky velmi podobné a měly i podobné rozměry. Čtvrtý izolát byl obdržen ze sbírky řas (SVCK 154). Svou morfologií ale vybočoval vůči ostatním izolátům a také částečně vůči popisu tohoto druhu. Především měl laloky větvené

pouze do třetího řádu, zatímco u ostatních izolátů to bylo do třetího až čtvrtého řádu v rámci jedné pľbuňky.

Tři izoláty *M. radiosa* var. *elegantior* získaly v kulturách morfologii, která úplně neodpovídala jejich popisu. Tato varieta se vyznačuje svým „jemným“ vzhledem, který je dán úzkými laloky, které jsou navíc zvlňné a dělené do čtvrtého až pátého řádu (Obr. 22b; Ralfs, 1848). Do vyššího řádu bývají dělené laloky blíže polárnímu laloku. U buněk v kulturách došlo ke „zmohutnění“ laloků (Obr. 22a). Jejich morfologie připomíná spíše nominální *M. radiosa*. Mají redukovaný i stupeň větvení na třetí až čtvrtý řád. Zvlňnění laloků ale přetrvává i u buněk v kulturách, což je dobře viditelné na Obr. 20c.

Na základě mých nálezů nelze vyloučit, že se druh *M. radiosa* vyskytuje v rámci Evropy pouze v Irsku a to pouze jako jedna z jeho variet. I kmen SVCK 303, z nějž pochází poslední z pěti sekvencí v linii ‚*radiosa*‘, byl nalezen v Irsku. Její výskyt je však hlášen i ve Velké Británii (Whitton et al., 2007). Pouze kmen SVCK 154 je z Ameriky, ze státu Massachusetts. V literatuře je ale výskyt *M. radiosa* popsán i z jiných evropských států mimo Irsko a Velké Británie (Brook & Johnson, 2002), například z Rakouska (Lenzenweger, 1996) nebo Španělska (Sánchez et al., 1998). Izoláty z těchto zemí jsem však neměla k dispozici. Podle literatury lze usuzovat, že větší zastoupení variet a forem tohoto druhu lze nalézt v Severní Americe (Prescott et al., 1977). Pokud by tomu tak opravdu bylo, tak tento fakt podporuje zjištění Škaloud et al. (2011), že je Severní Amerika kontinentem s největší diverzitou tohoto rodu, který zde má pravděpodobně svůj původ (Škaloud et al., 2011). Otázkou zůstává, do jaké míry je tato morfologická diverzita podpořena i fylogeneticky.

Všechny nové izoláty tohoto druhu lze ale morfologicky jednoduše odlišit od izolátů linie ‚*papillifera*‘. Tvar jejich buněk je spíše okrouhlý, na rozdíl od více oválných buněk druhé linie. Polární lalok mají dlouhý a úzký, ve své délce se může mírně rozšiřovat. Je zakončen vidlicovitě a na svém povrchu má dva výstupky, které jsou ale vždy znatelně větší než u buněk z linie ‚*papillifera*‘. Stejně jako v druhé linii jsou na každém laloku celkem čtyři, dva z dorzální a dva z ventrální strany. Laterální laloky jsou v linii ‚*radiosa*‘ již na první pohled děleny nestejně a vrchní z nich jsou vyššího řádu. Na základě těchto charakteristik lze poměrně dobře rozlišit buňky druhu *M. radiosa*, který se zdá být konzistentním druhem jak fylogeneticky, tak morfologicky.

### 5.3 Morfologická plasticita

Je zřejmé, že žádná z variet náležící do linie ‚*papillifera*‘ tedy nemá v taxonomii význam. Pak je ale na místě zamyslet se nad tím, co u druhu *Micrasterias papillifera* vede k této velké morfologické plasticitě.

Významným faktorem, který ovlivňuje tvar buněk a struktur živých organismů, jsou abiotické parametry prostředí, jako například pH nebo teplota vody (Neustupa et al., 2008; Černá & Neustupa, 2009). Příkladem může být plasticita křemičitých šupin protist *Mallomonas striata* a *Synura echinulata*. Jejich šupiny mění tvar v závislosti na změnách pH, které je zároveň jeden z klíčových faktorů ovlivňujících jejich výskyt (Němcová & Pichrtová, 2012). Teplota také významně ovlivňuje tvar šupin, ale neovlivňuje možnost determinace druhu (Němcová et al., 2010) Jedním z dalších environmentálních faktorů může být dostupnost živin v prostředí, která ovlivňuje velikost buněk. V místech s nedostatkem živin se typicky vyskytují druhy, které mají velký povrch vůči svému objemu, což jim umožňuje efektivněji přijímat živiny z okolí (Irwin et al., 2006). Vzorke v této práci pocházejí z velké části z oligotrofních jezer, ve kterých se konduktivita pohybovala v rozmezí 10 – 98  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Na těchto lokalitách, především pak v irských jezerech, se vyskytovaly hlavně izoláty určené jako variety druhu *Micrasterias papillifera*; *glabra* a *pseudomurrayi*, a dále *M. radiosa* var. *murrayi* a *M. cf. radiosa*. Většina z nich se vyznačuje buňkami většími, než je tomu u *M. papillifera* a zářezy mezi jejich laloky jsou u nich také větší. Mohli bychom se proto domnívat, že tyto morfotypy vznikly jako reakce na nedostatek živin a buňky prohloubením zářezů zvětšily svůj povrch vůči objemu, což jim umožňuje efektivněji přijímat živiny. Toto vysvětlení ale nepodporují nálezy izolátů odpovídající nominální *M. papillifera*. Ten se také v několika případech vyskytoval na lokalitách s nízkou konduktivitou.

Buňky izolované ze vzorků z jezer byly na rozdíl od izolátů z rašelinišť vystaveny pohybům vodního sloupce a i když se jedná o druh žijící v bentosu, není pochyb, že se často dostávají i mimo něj jako tzv. tychoplankton. Jako další z možných vysvětlení morfologické diverzity buněk *M. papillifera* se proto nabízí to, že se svým tvarem přizpůsobily částečnému životu v planktonu. Zvětšování komplexity buněk pomocí výběžků a jejich prodlužování vede ke snížení rychlosti klesání ve vodním sloupci (Padisák et al., 2003).

Dalším z možných vysvětlení morfologické diverzity *M. papillifera* by mohla být změna tvaru závislá na změně obsahu DNA. Ten se může u zástupců tohoto rodu velmi lišit i v rámci jednoho druhu, jak bylo zjištěno u *M. rotata*. V rámci tohoto druhu to ovšem nemělo vliv na jeho morfologii. Buňky s vyšším obsahem DNA ale mívají větší buňky (Pouličková et al., 2014). U experimentálně vytvořených polyploidů se objevuje i vyšší stupeň větvení laloků (Kallio; 1951, 1953).

V rámci mé práce se ukázalo, že dlouhou dobu kultivované kmeny mají pravděpodobně tendenci měnit svou morfologii. Byly většinou určeny jako jedna z variet a jejich určení bylo náročnější a ne vždy na první pohled jednoznačné, na rozdíl od kmenů izolovaných z přírodních vzorků. Je proto při práci s takovými kmeny vždy na místě opatrnost. K větším a nevratným změnám však pravděpodobně dochází až při dlouhodobé kultivaci v rámci desítek let. Mé

kultury *M. radiosa* var. *elegantior* prošly také evidentně díky kultivaci změnou morfologie. Ta však neovlivnila jejich určení, pouze ho poněkud ztížila.

Je zřejmé, že v rámci linie ‚*papillifera*‘ mají různé morfotypy tendenci reflektovat měnící se podmínky prostředí. Pak by nemělo cenu nadále rozeznávat jednotlivé variety, ale přistupovat k nim spíše jako k ekotypům, které mají odlišnou morfologii díky životu v rozdílných podmínkách (Begon et al., 2005).

V navazující práci by bylo zajímavé zaměřit se právě na výzkum faktorů, které mohou morfologii těchto druhů ovlivňovat. Je jím například reakce na nedostatek živin. Tato teorie je stejně jako možnost ovlivnění tvaru buněk pohyby vodního sloupce testovatelná například kultivačním pokusem, během kterého by byla kultura míchána, což by simulovalo pohyb buněk ve vodě. Bylo by také zajímavé zaměřit se na možnost vlivu změn obsahu DNA v buňkách na morfologii, především u plastické linie ‚*papillifera*‘.



## 6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala diverzitou druhového komplexu *Micrasterias papillifera* / *M. radiosa*. Vzhledem k velkému množství popsaných variet bez jasného taxonomického zařazení byla jeho revize nezbytná. Fylogenetické analýzy sekvencí úseků *psaA* a ITS odhalily, že izoláty zařazené do tohoto komplexu tvoří dvě oddělené monofyletické linie. V první z nich, linii ‚*papillifera*‘ se nacházela většina izolátů tohoto druhového komplexu. Ve fylogenetickém stromě sekvencí ITS měla tato linie další vnitřní diverzitu, která ale nekorespondovala s morfologií jednotlivých variet. U druhu *Micrasterias papillifera* tedy nebude mít rozeznávání variet taxonomický význam. Lze spekulovat, že jejich morfologie odráží spíše podmínky prostředí, ve kterém žijí, jako například množství dostupných živin nebo to, zda pochází z bentosu rašelinišť, nebo z jezer. Pro potvrzení této teorie však doposud chybí experimentální ověření. Dokonce i některé izoláty určené tradičními metodami jako *Micrasterias radiosa* nebo jeho varieta *murrayi* jsou zástupci druhu *M. papillifera*.

Do linie ‚*radiosa*‘ patřilo překvapivě málo izolátů a tento druh bude pravděpodobně v Evropě relativně vzácný. Všechny nově izolované kmeny pocházely výhradně z Irska a byly určeny jako *M. radiosa* var. *elegantior*. Tento druh bude pravděpodobně fylogeneticky uniformní, ale bez prozkoumání více izolátů nejde udělat přesný závěr. Většina jeho morfologické diverzity se nachází spíše v Severní Americe (Prescott et al., 1977). Může jít o morfologicky variabilní druh. V kulturách vykazuje velkou plasticitu, která by mohla naznačovat, že dokáže svůj tvar měnit opravdu specificky podle podmínek prostředí. Izolát, podle kterého byl poprvé taxonomicky popsán (Ralfs, 1848), pocházel z jezera, ale není jasné, zda spíše z planktonu nebo jeho bentosu. Navíc byl u původního popisu uveden pouze jeden obrázek (Ralfs, 1848), což nemůže nijak reflektovat případnou morfologickou plasticitu druhu.

Oba druhy, jak *M. papillifera* tak *M. radiosa* jsou od sebe dobře morfologicky rozlišitelné. Jejich původní popis je zjevně i nadále platný. Taxonomickou hodnotu však nemají variety druhu *M. papillifera*. Jeho vnitřní diverzita je pravděpodobně spíše odrazem recentní speciace, případně populační struktury.

Na základě těchto výsledků, stejně tak několika dalších prací zabývajících se diverzitou druhových komplexů rodu *Micrasterias* (Nemjová et al., 2011; Neustupa et al., 2010, 2011, 2014) lze usoudit, že reálná diverzita tohoto rodu stále nebyla z větší části prozkoumána. Na rozdíl od předchozích prací je však závěrem této práce nalezení menší diverzity, než jaká byla popsána pouze na základě morfologie nalézaných druhů.

## 7 LITERATURA

- Agardh, C. A. (1827). Neue Gattungen und Arten von Algen. *Flora*, 41, 641 – 646.
- Alverson, A. J. (2008). Molecular systematics and the diatom species. *Protist*, 159(3), 339–353. doi:10.1016/j.protis.2008.04.001
- Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2005). *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. Wiley-Blackwell.
- Besendahl, A., & Bhattacharya, D. (1999). Evolutionary analyses of small-subunit rDNA coding regions and the 1506 Group I Introns of the Zygnematales (Charophyceae, Streptophyta). *Journal of Phycology*, 569(1), 560–569.
- Bhattacharya, D., Surek, B., Rüsing, M., Damberger, S., & Melkonian, M. (1994). Group I introns are inherited through common ancestry in the nuclear-encoded rRNA of Zygnematales (Charophyceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 9916–20.
- Bicudo, C. E. de M., & Senna, P. A. C. (1975). Use of measurements for differentiation of infraspecific taxa in *Micrasterias laticeps*. *British Phycological Journal*, 10(1), 43–47.
- Bicudo, C. E. de M., & Sormus, L. (1972). Polymorphism in the desmid *Micrasterias laticeps* and its taxonomical implications. *Journal of Phycology*, 8, 237–242.
- Blackburn, S. I., & Tyler, P. A. (1981). Sexual reproduction in desmids with special reference to *Micrasterias thomasiana* var. *notata* (Nordst.) Grönblad. *British Phycological Journal*, 16, 217–229.
- Blackburn, S. I., & Tyler, P. A. (1987). On the nature of eclectic species—a tiered approach to genetic compatibility in the desmid *Micrasterias thomasiana*. *British Phycological Journal*, 22(3), 277–298.
- Boney, A. D. (1981). Mucilage: The ubiquitous algal attribute. *British Phycological Journal*, 16, 115–132. doi:10.1080/00071618100650101
- Brook, A. J. (1981). *The Biology of Desmids*. University of California Press.
- Brook, A. J., & Johnson, L. R. (2002). Order Zygnematales. In *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. (John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. Eds) (pp. 479–593). Cambridge University Press.
- Coesel, P. F. M. (1982). Structural characteristics and adaptations of desmid communities. *The*

*Journal of Ecology*, 70(1), 163–177.

- Coesel, P. F. M. (1996). 5. Biogeography of desmids. *Hydrobiologia*, 336(1-3), 41–53.
- Coesel, P. F. M. (2003). Desmid flora data as a tool in conservation management of Dutch freshwater wetlands. *Biologia*, 58(4), 717–722.
- Coesel, P. F. M., & Meesters, K. (2007). *Desmids of the Lowlands: Mesotaeniaceae and Desmidiaceae of the European Lowlands*. KNNV Publishing, The Netherlands.
- Černá, K., & Neustupa, J. (2009). The pH-related morphological variations of two acidophilic species of Desmidiales (Viridiplantae) isolated from a lowland peat bog, Czech Republic. *Aquatic Ecology*, 44(2), 409–419.
- Futuyma, D. J. (1998). *Evolutionary biology (3rd ed.)*. Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts.
- Gontcharov, A. A. (2008). Phylogeny and classification of Zygnematophyceae (Streptophyta): current state of affairs. *Fottea*, 8(2), 87–104.
- Gontcharov, A. A., Marin, B., & Melkonian, M. (2003). Molecular phylogeny of conjugating green algae (Zygnemophyceae, Streptophyta) inferred from SSU rDNA sequence comparisons. *Journal of Molecular Evolution*, 56(1), 89–104.
- Gontcharov, A. A., Marin, B., & Melkonian, M. (2004). Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using SSU rDNA and rbcL sequence comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta). *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), 612–24.
- Gontcharov, A. A., & Melkonian, M. (2008). In search of monophyletic taxa in the family Desmidiaceae (Zygnematophyceae, Viridiplantae): the genus *Cosmarium*. *American Journal of Botany*, 95(9), 1079–95.
- Hall, J. D., Karol, K. G., McCourt, R. M., & Delwiche, C. F. (2008). Phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data. *Journal of Phycology*, 44(2), 467–477.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.
- Huss, V. R. A., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., ... Kessler, E. (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 35, 587–598.
- Irwin, A. J., Finkel, Z. V., Schofield, O. M. E., & Falkowski, P. G. (2006). Scaling-up from nutrient physiology to the size-structure of phytoplankton communities. *Journal of Plankton*

*Research*, 28(5), 459–471. doi:10.1093/plankt/fbi148

- Johnson, L. N. (1894). On some species of *Micrasterias*. *Botanical Gazzete*, 19(2), 56–60.
- Kallio, P. (1951). *The Significance of Nuclear Quantity in the Genus Micrasterias*. Societas zoologica botanica Fennia Vanamo.
- Kallio, P. (1953). On the morphogenetics of the desmids. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 80(4), 247–263.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–80.
- Kouwets, F. a. C. (2008). The species concept in desmids: the problem of variability, infraspecific taxa and the monothetic species definition. *Biologia*, 63(6), 881–887.
- Krieger, W. (1939). *Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der aussereuropäischen Arten. Band 13. Abteilung 1, Teil 2, Lieferung 1 of Dr. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland. Österreich und der Schweiz*. Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H., Leipzig.
- Kützing, F. T. (1849). *Species algarum*. F. A. Brockhaus, Leipzig.
- Lenzenweger, R. (1996). *Desmidiaceenflora von Österreich Teil 1. Bibliotheca Phycologica*.
- Lorch, D., & Engels, M. (1979). Observations on filament formation in *Micrasterias foliacea* (Desmidiaceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 15, 322–325.
- Lundholm, N., Bates, S. S., Baugh, K. A., Bill, B. D., Connell, L. B., Léger, C., & Trainer, V. L. (2012). Cryptic and pseudocryptic diversity in diatoms - with descriptions of *Pseudo-Nitzschia hasleana* sp. nov. and *P. fryxelliana* sp. nov. *Journal of Phycology*, 48(2), 436–454. doi:10.1111/j.1529-8817.2012.01132.x
- M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M.2016. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. (2016), <http://www.algaebase.org>; searched on 27 June 2016.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. Columbia Univ Press, New York.
- McCourt, R. M., Karol, K. G., Bell, J., Helm-Bychowski, K. M., Grajewska, A., Wojciechowski, M. F., & Hoshaw, R. W. (2000). Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnematophyceae) based on rbcL sequences. *Journal of Phycology*, 758, 747–758.
- Němcová, Y., Neustupa, J., Kvíderová, J., & Řezačová-Škaloudová, M. (2010). Morphological

- plasticity of silica scales of *Synura echinulata* (Synurophyceae) in crossed gradients of light and temperature - a geometric morphometric approach. *Nova Hedwigia*, (May), 21–32. doi:10.1127/1438-9134/2010/0136-0021
- Němcová, Y., & Pichrtová, M. (2012). Shape dynamics of silica scales (Chrysophyceae, Stramenopiles) associated with pH. *Fottea*, 12(2), 281–291.
- Nemjová, K., Neustupa, J., Šťastný, J., Škaloud, P., & Veselá, J. (2011). Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*. *Phycological Research*, 59(3), 208–220.
- Neustupa, J. (2016). Static allometry of unicellular green algae: scaling of cellular surface area and volume in the genus *Micrasterias* (Desmidiiales). *Journal of Evolutionary Biology*, 29(2), 292–305. doi:10.1111/jeb.12781
- Neustupa, J., Škaloud, P., & Šťastný, J. (2010). The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis*/*M. radians* species complex. *Journal of Phycology*, 46(4), 703–714.
- Neustupa, J., Šťastný, J., & Hodač, L. (2008). Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. *Aquatic Microbial Ecology*, 51, 77–86.
- Neustupa, J., Šťastný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Goodyer, E., Pouličková, A., & Škaloud, P. (2011). A novel, combined approach to assessing species delimitation and biogeography within the well-known desmid species *Micrasterias fimbriata* and *M. rotata* (Desmidiiales, Steptophyta). *Hydrobiologia*, 667(1), 223–239.
- Neustupa, J., Šťastný, J., & Škaloud, P. (2014). Splitting of *Micrasterias fimbriata* (Desmidiiales, Viridiplantae) into two monophyletic species and description of *Micrasterias compereana* sp. nov. *Plant Ecology and Evolution*, 147(3), 405–411.
- Neustupa, J., Veselá, J., & Šťastný, J. (2013). Differential cell size structure of desmids and diatoms in the phytobenthos of peatlands. *Hydrobiologia*, 709(1), 159–171. doi:10.1007/s10750-013-1446-4
- Nixon, K. C., & Wheeler, Q. D. (1990). An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics*, 6(3), 211–223.
- Padisák, J., Soróczki-Pintér, É., & Rezner, Z. (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. doi:10.1023/A:1024613001147

- Payo, D. A., Leliaert, F., Verbruggen, H., D'hondt, S., Calumpong, H. P., & De Clerck, O. (2012). Extensive cryptic species diversity and fine-scale endemism in the marine red alga *Portieria* in the Philippines. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1753). doi:10.1098/rspb.2012.2660
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256. doi:10.1093/molbev/msn083
- Pouličková, A., Mazalová, P., Vašut, R. J., Šarhanová, P., Neustupa, J., & Škaloud, P. (2014). DNA content variation and its significance in the evolution of the genus *Micrasterias* (Desmidiaceae, Streptophyta). *PloS One*, 9(1), e86247.
- Prescott, G. W., Croasdale, H. T., & Vinyard, W. C. (1977). *A Synopsis of North American Desmids, Part II. Desmidiaceae: Placodermae*. University of Nebraska Press, Lincoln.
- Ralfs, J. (1848). *British Desmidae*. Reeve, Benham, and Reeve.
- Rambaut, A. (2009). FigTree. Tree figure drawing tool. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Rasband, W. S. (2016). ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997 - 2016.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574.
- Růžička J. (1981). *Die Desmidiaceen Mitteleuropas. Band 1(2)*. Lieferung. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Sánchez, C. J., Cobelas, A. M., & Sanjurjo, A. M. (1998). *Lista florística y bibliográfica de los clorófitos (Chlorophyta) de la Península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias*. Asociación Española de Limnología.
- Sormus, L., & Bicudo, C. E. de M. (1974). Polymorphism in the desmid *Micrasterias pinnatifida* and its taxonomical implications. *Journal of Phycology*, 10(3), 274–279.
- Swofford, D. (2002). PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). *Sinauer Associates, Sunderland MA*.
- Škaloud, P., Kynčlová, A., Benada, O., Kofroňová, O., & Škaloudová, M. (2012). Toward a revision of the genus *Synura*, section Petersenianae (Synurophyceae, Heterokontophyta): morphological characterization of six pseudo-cryptic species. *Phycologia*, 51(3), 303–329. doi:10.2216/11-20.1

- Škaloud, P., Nemjová, K., Veselá, J., Černá, K., & Neustupa, J. (2011). A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): evidence for the accelerated rate of morphological evolution in protists. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *61*(3), 933–943.
- Škaloud, P., Šťastný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Poulíčková, A., & Neustupa, J. (2012). Molecular phylogeny of baculiform desmid taxa (Zygnematophyceae). *Plant Systematics and Evolution*, *298*(7), 1281–1292.
- Šťastný, J. (2008). Desmids from ephemeral pools and aerophytic habitats from the Czech Republic. *Biologia*, *63*(6), 888–894.
- Šťastný, J. (2009). Desmids of the Swamp Nature Reserve (North Bohemia, Czech Republic) and a small neighbouring bog: species composition and ecological condition of both. *Fottea*, *9*(1), 135–148.
- Šťastný, J., Škaloud, P., Langenbach, D., Nemjová, K., & Neustupa, J. (2013). Polyphasic evaluation of *Xanthidium antilopaeum* and *Xanthidium cristatum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) species complex. *Journal of Phycology*, *49*(2), 401–416.
- Weisse, T. (2008). Distribution and diversity of aquatic protists: an evolutionary and ecological perspective. *Biodiversity and Conservation*, *17*(2), 243–259.
- West, W., & West, G. S. (1905). *A Monograph of the British Desmidiaceae, vol. 2*. Ray Society, London.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, *18*(1), 315 – 322.
- Whitton, B. A., John, D. M., Kelly, M. G., & Haworth, E. Y. (2007). A coded list of freshwater algae of the British Isles. Second Edition. Retrieved from <http://www.nhm.ac.uk/our-science/data/uk-species/checklists/NHMSYS0000591449/version1.html>
- 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.

### Internetové zdroje k převzatým obrázkům

Obr. 4: *Micrasterias furcata* <https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/originals/92/8a/b0/928ab046f23c945301abd5aad52f0ebb.jpg>

## 8 Příloha

**Tab. 7:** Seznam všech získaných a použitých kmenů a jejich sekvencí. Geografický původ je uvedený pouze u izolátů z linie G podle Škaloud et al. (2011), pokud byl známý. Zkratka UN označuje nově získané sekvence. Hvězdičkou označené délky buněk jsou převzaty ze studie Škaloud et al. (2011)

Identifikátor	Taxonomický název	Lokalita	Souřadnice	Délka (μm)	Šířka (μm)	Stupeň větvení	pH	kond. (μS/cm)	Přístupové kódy v Genebank	
									psaA	ITS
SVCK 290	<i>Micrasterias americana</i> Ehrenberg ex Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852626	-
NIES 774	<i>Micrasterias anomala</i> W.B. Turner	-	-	-	-	-	-	-	FR852627	-
SVCK 247	<i>Micrasterias apiculata</i> Meneghini ex Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852628	-
SVCK 65	<i>Micrasterias brachyptera</i> P. Lundell	-	-	-	-	-	-	-	FR852629	-
SAG 21.97	<i>Micrasterias ceratofera</i> Joshua	-	-	-	-	-	-	-	FR852630	-
I13	<i>Micrasterias cf. radiosa</i> Ralfs (sensu Coesel - Desmids of the Lowlands)	Irsko, bezejmenné jezero poblíž Maan Cross	53°27'01.6920", -009°32'38.3640"	150	150	3 - 4	6	98	-	UN
I21	<i>Micrasterias cf. radiosa</i> Ralfs (sensu Coesel - Desmids of the Lowlands)	Irsko, Lough Nahaslean	53°26'17.1960", -009°32'35.6640"	148	151	3 - 4	-	-	-	UN
I24	<i>Micrasterias cf. radiosa</i> Ralfs (sensu Coesel - Desmids of the Lowlands)	Irsko, Lough Nahaslean	53°26'17.1960", -009°32'35.6640"	153	156	3 - 4	-	-	-	UN
I41	<i>Micrasterias cf. radiosa</i> Ralfs (sensu Coesel - Desmids of the Lowlands)	Irsko, Lough Knockaunawaddy	53°23'40.2000", -009°32'44.0880"	151	154	3 - 4	7,3	84	-	UN
S21	<i>Micrasterias conferta</i> P. Lundell	Švédsko, strouha u cesty	65°46'43.9000", 019°28'50.9000"	94	86	-	6,5	46	UN	UN
S22	<i>Micrasterias conferta</i> P. Lundell	Švédsko, strouha u cesty	65°46'43.9000", 019°28'50.9000"	94	85	-	6,5	46	UN	-
I38	<i>Micrasterias conferta</i> P. Lundell	Irsko, jezero Loughauntiee	53°25'36.2640", -009°33'01.3680"	92	82	-	6,5	86	UN	UN



<b>I51</b>	<i>Micrasterias conferta</i> P. Lundell	Irsko, Lough Bofin	53°26'24.9000", -009°27'23.2200"	93	86	-	6,8	75	-	UN
<b>SVCK 110</b>	<i>Micrasterias conferta</i> P. Lundell	Finsko, Korvanen (Moore bei Korvanen)	67°58'04.0224", 027°48'07.2756"	92	83,6	-	-	-	FR852632	-
<b>CAUP K602</b>	<i>Micrasterias crux-melitensis</i> Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852633	-
<b>NIES 152</b>	<i>Micrasterias crux-melitensis</i> Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852634	-
<b>CAUP K607</b>	<i>Micrasterias crux-melitensis</i> Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	-	FN424420
<b>ASW 07023</b>	<i>Micrasterias decedentata</i> (Nägeli) W.Archer	-	-	-	-	-	-	-	FR852635	-
<b>SVCK 230</b>	<i>Micrasterias denticulata</i> Brébisson ex Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852636	-
<b>ASW 07056</b>	<i>Micrasterias dickiei</i> (Ralfs) Skaloud, Nemjova, Vesela, Cerna et Neustupa	-	-	-	-	-	-	-	FR852661	-
<b>CAUP K608</b>	<i>Micrasterias fimbriata</i> Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852637	-
<b>SVCK 374</b>	<i>Micrasterias foliacea</i> Bailey ex Ralfs	Indonesie, Sumatra	00°10'33.0000", 100°50'50.0000"	64	70	-	-	-	UN	-
<b>NIES 777</b>	<i>Micrasterias foliacea</i> Bailey ex Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852638	-
<b>CAUP K609</b>	<i>Micrasterias furcata</i> C. Agardh ex Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852639	-
<b>SVCK 249</b>	<i>Micrasterias hardyi</i> G.S. West	-	-	-	-	-	-	-	FR852640	-
<b>SVCK 298</b>	<i>Micrasterias jenneri</i> Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852641	-
<b>SVCK 430</b>	<i>Micrasterias laticeps</i> Nordstedt	-	-	-	-	-	-	-	FR852642	-
<b>SVCK 324</b>	<i>Micrasterias mahabuleshwariensis</i> J. Hobson	-	-	-	-	-	-	-	FR852643	-
<b>SAG 157.80</b>	<i>Micrasterias muricata</i> Bailey ex Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852644	-

<b>SVCK 410</b>	<i>Micrasterias novae-terrae</i> (J.A.Cushman) Willi Krieger	Venezuela, Laguna de Mucubaji, Merid	08°47'48.0000", 070°49'45.0000"	135	130	3 - 4	-	-	UN	UN
<b>C11</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	CZ, NPR Břehyně - Pecopala	50°35'03.2190", 014°42'25.8548"	132	133	3 - 4	6,1	183	-	UN
<b>C21</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	CZ, PR Pod Kamenným vrchem	49°36'58.6091", 015°53'54.3509"	125	132	3 - 4	-	-	-	UN
<b>C32</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	CZ, PP Na Plachtě	50°11'17.7590", 015°51'40.2300"	129	126	3 - 4	-	-	-	UN
<b>C33</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	CZ, PP Na Plachtě	50°11'17.7590", 015°51'40.2300"	130	129	3 - 4	-	-	UN	-
<b>C41</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	CZ, PR Rašeliniště U Políněk	49°56'19.0000", 013°04'22.0000"	136	132	3 - 4	-	-	-	UN
<b>C42</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	CZ, PR Rašeliniště U Políněk	49°56'19.0000", 013°04'22.0000"	123	127	3 - 4	-	-	-	UN
<b>S11</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	Švédsko, jezero Vuotnersjön	65°39'01.8000", 019°42'18.3000"	130	130	3 - 4	6,4	52	-	UN
<b>S15</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	Švédsko, jezero Vuotnersjön	65°39'01.8000", 019°42'18.3000"	117	127	3	6,4	52	-	UN
<b>S24</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	Švédsko, strouha u cesty	65°46'43.9000", 019°28'50.9000"	120	116	3 - 4	6,5	46	UN	UN
<b>S41</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	Švédsko, jezero Stentjärnen	65°52'48.9000", 019°35'22.5000"	112	112	3 - 4	6,5	-	-	UN
<b>S51</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	Švédsko, bezejmenné jezero	65°38'22.7000", 019°40'15.9000"	141	145	3 - 4	6	-	-	UN
<b>I48</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	Irsko, Lough Knockaunawaddy	53°23'40.2000", -009°32'44.0880"	145	143	3 - 4	7,3	84	-	UN
<b>N12</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	Norsko, mokřad u jezera Rødungen	60°42'14.5800", 008°15'47.5920"	118	128	3 - 4	7	30	UN	UN
<b>N21</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	Norsko, jezero Olsennvatnet	60°42'59.2920", 008°05'59.7120"	130	131	3	7,2	10	-	UN
<b>CAUP K603</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	CZ, Borkovická Blata	neznámé	130*	-	-	-	-	FR852646	-
<b>SAG 159.80</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs	neznámá	neznámé	100	110	3 - 4	-	-	UN	UN

<b>CCAC 3333 B</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> Brébisson ex Ralfs (podle sbírky var. <i>speciosa</i> )	Švýcarsko, Rylle	neznámé	123	124	3 - 4	-	-	UN	UN
<b>I63</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> var. <i>glabra</i> (Irénée-Marie) K.Förster	Irsko, Derrylare Lough	53°27'46.8720", -009°48'03.4200"	123	128	3 - 4	6,4	69	UN	UN
<b>S32</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> var. <i>pseudomurrayi</i> L.J.Laporte	Švédsko, bezejmenná řeka	65°52'35.8000", 019°35'16.6000"	176	172	3 - 4	6,5	-	UN	UN
<b>S33</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> var. <i>pseudomurrayi</i> L.J.Laporte	Švédsko, bezejmenná řeka	65°52'35.8000", 019°35'16.6000"	168	168	3 - 4	6,5	-	-	UN
<b>I61</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> var. <i>pseudomurrayi</i> L.J.Laporte	Irsko, Derrylare Lough	53°27'46.8720", -009°48'03.4200"	158	156	3 - 4	6,4	69	-	UN
<b>I92</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> var. <i>pseudomurrayi</i> L.J.Laporte	Irsko, Tawnyard Lough	53°38'47.1120", -009°39'07.1640"	146	154	3 - 4	7,1	55	UN	UN
<b>I93</b>	<i>Micrasterias papillifera</i> var. <i>pseudomurrayi</i> L.J.Laporte	Irsko, Tawnyard Lough	53°38'47.1120", -009°39'07.1640"	156	173	3 - 4	7,1	55	-	UN
<b>SVCK 411</b>	<i>Micrasterias pinnatifida</i> Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852647	-
<b>NIES 784</b>	<i>Micrasterias pusilla</i> G.C. Wallich	-	-	-	-	-	-	-	FR852658	-
<b>SVCK 389</b>	<i>Micrasterias radians</i> var. <i>bogoriensis</i> (Bernard) Krieger	-	-	-	-	-	-	-	FR852648	FN424423
<b>SVCK 518</b>	<i>Micrasterias radians</i> var. <i>evoluta</i> (W.B. Turner) Krieger	-	-	-	-	-	-	-	FR852649	-
<b>SVCK 71</b>	<i>Micrasterias radiosa</i> cf. var. <i>murrayi</i> (West & G.S.West) Croasdale (podle sbírky <i>Micrasterias papillifera</i> )	Finnland, Utsjoki (3ter kl. Moor oberh. Biol.Stat. Am Klojärvi)	69°54'30.1788", 027°01'35.9076"	134	138	3 - 4	-	-	UN	-
<b>SVCK 154</b>	<i>Micrasterias radiosa</i> Ralfs	USA, Falmouth, Massachusetts, Long Pond	41°34'40.0000", 070°36'51.0000"	160	170	3	-	-	UN	-
<b>SVCK 303</b>	<i>Micrasterias radiosa</i> Ralfs	Irsko, jezero východně od Clifdenu	-	175*	-	-	-	-	FR852650	-
<b>I31</b>	<i>Micrasterias radiosa</i> var. <i>elegantior</i> (G.S.West) Croasdale	Irsko, jezero Laughauntiee	53°25'36.2640", -009°33'01.3680"	161	170	3 - 4	6,5	86	UN	UN
<b>I33</b>	<i>Micrasterias radiosa</i> var. <i>elegantior</i> (G.S.West) Croasdale	Irsko, jezero Laughauntiee	53°25'36.2640", -009°33'01.3680"	182	191	3 - 4	6,5	86	UN	-
<b>I68</b>	<i>Micrasterias radiosa</i> var. <i>elegantior</i> (G.S.West) Croasdale	Irsko, Derrylare Lough	53°27'46.8720", -009°48'03.4200"	159	172	3 - 4	6,4	69	UN	UN

<b>I95</b>	<i>Micrasterias radiosa</i> var. <i>murrayi</i> (West & G.S.West) Croasdale	Irsko, Tawnyard Lough	53°38'47.1120", -009°39'07.1640"	168	176	3- 4	7,1	55	-	UN
<b>SAG 7.95</b>	<i>Micrasterias radiosa</i> var. <i>murrayi</i> (West & G.S.West) Croasdale (podle sbírky <i>Micrasterias papillifera</i> )	USA, MA, soil from Burnham´s Swamp near Falmouth	41°37'25.1400", -070°33'15.0840"	111	104	3 - 4	-	-	UN	UN
<b>ACOI 247</b>	<i>Micrasterias radiosa</i> var. <i>murrayi</i> (West & G.S.West) Croasdale (podle sbírky <i>Micrasterias radiosa</i> )	Portugalsko, Serra da Estrela, Barragem do Covão do Curral	40°20'14.0136", -007°36'41.4396"	121	130	3 - 4	-	-	-	UN
<b>SVCK 300</b>	<i>Micrasterias ralfsii</i> (Brébisson ex Ralfs) Skaloud, Nemjova, Ves-ela, Cerna et Neustupa	-	-	-	-	-	-	-	FR852660	-
<b>CAUP K604</b>	<i>Micrasterias rotata</i> Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852651	-
<b>CAUP K606</b>	<i>Micrasterias semiradiata</i> Brébisson ex Kützing	-	-	-	-	-	-	-	FR852659	-
<b>SVCK 138</b>	<i>Micrasterias swainei</i> W.N. Hastings	-	-	-	-	-	-	-	FR852652	-
<b>SVCK 195</b>	<i>Micrasterias tetraptera</i> West et G.S. West	-	-	-	-	-	-	-	FR852653	-
<b>CAUP K605</b>	<i>Micrasterias thomasiana</i> W. Archer	-	-	-	-	-	-	-	FR852654	-
<b>SVCK 369</b>	<i>Micrasterias torreyi</i> Bailey ex Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852655	-
<b>SVCK 368</b>	<i>Micrasterias tropica</i> Nordstedt	-	-	-	-	-	-	-	FR852656	-
<b>SVCK 412</b>	<i>Micrasterias truncata</i> Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852657	-
<b>SVCK 291</b>	<i>Micrasterias zeylanica</i> F.E.Fritsch	-	-	-	-	-	-	-	FR852631	-
<b>SVCK 15</b>	<i>Staurastrum lunatum</i> Ralfs	-	-	-	-	-	-	-	FR852663	-
<b>SVCK 330</b>	<i>Staurastrum majusculum</i> F. Wolle	-	-	-	-	-	-	-	FR852664	-
<b>SAG 24.82</b>	<i>Triploceras gracile</i> Bailey	-	-	-	-	-	-	-	EF371259	-

<b>SVCK 366</b>	<i>Triploceras gracile</i> Bailey	-	-	-	-	-	-	-	FR852662	-
-----------------	-----------------------------------	---	---	---	---	---	---	---	----------	---