

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Protistologie



Diplomová práce

**Diverzita a rozšíření druhového komplexu *Euastrum humerosum* /
didelta (Desmidiáles)**

**Diversity and distribution of the *Euastrum humerosum* / *didelta* (Desmidiáles)
species complex**

Bc. Eva Kupčiková

Školitel: Mgr. Jan Šťastný, Ph.D.

Praha, 2018

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, 13.8.2018

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Janu Šťastnému, konzultantovi Pavlovi Škaloudovi a Jiřímu Neustupovi. Chtěla bych dále poděkovat Heleně Bestové, Pavlovi Škaloudovi a Pavle Urbánkové, za půjčení vzorků, a Janu Šťastnému a Katarině Nemjové za půjčení kultur. Děkuji také za příjemné prostředí v laboratoři algologické, molekulární a u skenovacího elektronového mikroskopu. Děkuji. Jsem vděčná za trpělivost a podporu od mé rodiny, mým zesnulým rodičům, své tetě Evě Kupčíkové a především děkuji svému životnímu partnerovi Vojtěchu Faltinkovi a svému synovi Tomášovi.

Abstrakt

Z 23 evropských a severoamerických kmenů druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* (Desmidiáles) jsme získali 3 evoluční linie v molekulárním markeru trnG^{unc} intronu (druhého typu). U SSU intronu jsme nezískali signifikantní a jednotné výsledky. Je pravděpodobné, že jsou linie velice mladé. Linie byly signifikantně odlišné svým tvarem a rozměry. Použili jsme geometrickou morfometriku a měření rozměrů délky a šířky semicely, isthmu a jejich poměrů. V některých kmenech byla vysoká morfologická variabilita. Různé morfy v sebe přecházely a lišily se ve vroubkování bazálního laloku. Linie se lišily především svými rozměry a tvarově variabilními polárními laloky, včetně krku. SEM odhalila jeden centrální pór, oproti *E. didelta* var. *bengalicum*, který je v literatuře uváděn s póry dvěma.

Klíčová slova: krásivky, druhy, skrytá diverzita, molekulární fylogenetika, geometrická morfometrika, *Euastrum*, skenovací elektronová mikroskopie

Abstract:

From 23 European and North American strains *Euastrum humerosum/didelta* species complex (Desmidiáles) we have obtained 3 lineages in molecular marker trnG^{unc} group II intron. We did not acquire significant and homogenous results in SSU intron. It is probable that the lineages are very young. The lineages were significantly different in their shape and dimensions. We used the geometric morphometrics with the measuring of the lengths and breath of the semicells, isthmus and their ratios. The lineages differentiated in their dimensions and shape variable polar lobes and neck. SEM revealed the one central pore in cell wall on the contrary, with variant *E. didelta* var. *bengalicum*, which has two pores according the literature records.

Key words: desmids, species, hidden diversity, molecular phylogenetics, geometric morphometrics, *Euastrum*, scanning electron microscopy

Seznam použitých zkratk

18S RNA – viz SSU

5,8S rRNA – viz LSU

A - adenin

ACOI - Coimbra Collection of Algae

C - cytosin

C. - *Cosmarium*

cox III – carboxy oxygenase III, součást dýchacího řetězce v mitochondriální membráně

CVA – Canonical Variation Analysis

dd voda – destilovaná voda

DNA - deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxynucleoside triphosphate, deoxynukleosid trifosfát

Ds – délka semicely

DY IV – jméno média, původně pro *Dinobryon sertularia* (Lehman, 1976)

E. - *Euastrum*

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid, ethylenndiamintetraoctová kyselina

fa – forma

Fig. - figure, obrázek

G - guanin

GM – Geometric Morphometrics, geometrická morfometrika

GM + M – geometrická morfometrika s měřením, včetně poměrů

GM + poměry – geometrická morfometrika, pouze s poměry

GPA – Generalized Procrustes Analysis

HEPES - 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

HKY - Hasegawa-Kishino-Yano substituční model

I – isthmus

Ipl – Isthmus polárního laloku, šířka krku

JC – Jukes-Cantor substituční model

JC+G Jukes-Cantor substituční model s gamma parametrem

JK – jackknife, LDA při vynechání jednoho jedince (Hammer, 2018)

K - Kanada

LDA – Linear Discriminant Analysis, lineární diskriminační analýza

LM – light microscopy, světelná mikroskopie
LSU – Large SubUnit, rDNA
M. - *Micrasterias*
MCMC metoda - Markov chain Monte Carlo metoda
ML – maximum likelihood, maximální pravděpodobnost
MP – maximum parsimony, maximální parsimonie
N – Norsko
Obr. - obrázek
Obr. tab. - obrazová tabule
p – hodnota, hodnota signifikance
P – Portugalsko
p. - page, stránka
palec – 1 palec je 2,54 cm
PCA – Principal Component Analysis, analýza hlavních komponent
PCR (Polymerase Chain Reaction),
Pl – polární lalok
Pl. - plate, planche, obrazová tabule
r – Pearsonův korelační koeficient
rbcL - large subunit of the ribulose-bisphosphate carboxylase gene, gen pro velkou podjednotku
ribulosa - 1,5 - bisfosfát karboxylázy/oxygenázy, zkráceně RuBisCO
rDNA – ribosomální DNA
rpm- revolutions per minute, ot/min, vedlejší jednotka soustavy SI pro frekvenci
S – Švédsko
s. - stránka
SEM – Scanning Electron Microscopy, skenovací elektronová mikroskopie
Ss – Šířka semicely
SSU – Small SubUnit, rDNA
T – thymin
Tab. - Table, tabule
tab. - tabulka
TAE pufr, směs tris(hydroxymethyl)aminomethanu, kyseliny octové EDTA
Taf. - tafel, obrazová tabule
TEM - Transmission electron microscopy, transmisní elektronová mikroskopie

trnG intron – trnG^{ucc} group II intron, intron druhé skupiny plastidového genu kódující transferovou RNA-Gly (trnG^{ucc} intron), neboli RNA nesoucí glycin při proteosyntéze

v. - verze

var.-varietà,

X. - *Xanthidium*

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract:.....	4
Seznam použitých zkratk.....	5
Obsah.....	8
1. Úvod.....	10
1.2 Druhy a druhový koncept.....	10
1.3 Krásivky.....	12
<i>Euastrum</i> Ehrenberg.....	14
Druhový komplex <i>Euastrum humerosum</i> /didelta.....	14
Smíšené formy.....	15
<i>Euastrum humerosum</i> RALFS.....	15
<i>Euastrum didelta</i> Turpin ex Ralfs.....	16
2. Cíle práce.....	21
3. Materiál a metody.....	21
3.1 Sběr materiálu, izolace kmenů, kultivace.....	21
3.1.1 Receptura média DY IV:.....	21
3.2 Extrakce DNA.....	22
3.3 PCR amplifikace.....	22
3.4 Fylogenetické analýzy.....	24
3.5 Morfologie buněk a kvantitativní metody.....	25
3.5.1 Světelná a elektronová mikroskopie (SEM).....	25
3.5.2 Geometrická morfometrika a měření.....	25
4. Výsledky:.....	28
4.1 Fylogenetické analýzy.....	28
4.1.1 trnG intron.....	28
4.1.2 SSU intron.....	29
4.2 Morfologie kmenů.....	32
4.2.1 Světelná mikroskopie (LM).....	32
4.2.2 SEM (Skenovací elektronová mikroskopie).....	33
4.3 Metrické analýzy a geometrická morfometrika.....	38
4.3.1 Metrické analýzy.....	38

4.3.2 Geometrická morfometrika (GM).....	43
Rozklad variability.....	43
LDA z literatury.....	46
Geografie.....	48
5. Diskuse.....	51
5.1 Fylogenetické analýzy.....	51
<i>E. humerosum</i> Ralfs a <i>E. affine</i> Ralfs jsou parafyletickými skupinami.....	53
5.2 Morfologie buněk.....	53
5.2.1 SEM.....	54
5.2.2 Metrické analýzy a geometrická morfometrika.....	55
5.3 – LDA dat z literatury, kam by patřily, do jaké linie.....	58
Sjednocení původně rozděleného <i>E. didelta</i> Ralfs.....	58
<i>E. didelta</i> – druh, varieta nebo morfa?.....	58
<i>E. humerosum</i> vs. <i>E. humerosum</i> var. <i>affine</i>	59
Geografie.....	60
Taxonomické poznámky.....	60
5.5 Taxonomické shrnutí důležitých znaků evolučních linií druhového komplexu <i>Euastrum humerosum/didelta</i>	61
5.6 co bychom mohli dál studovat?.....	62
6. Závěr.....	64
7. Seznam použité literatury.....	65
8. Příloha.....	77

1. Úvod

Znalost protistních druhů je klíčová např. pro zjištění diverzity a následně pro ekologické hodnocení nebo zjištění rozšíření organismů; a proto druhy potřebujeme mít dobře vymezené (Weisse, 2008). Druhy jsou určovány především na základě morfologie, ale molekulárně fylogenetické metody odhalily během posledních tří desetiletí, že protistní druhy jsou často umělé.

U protistních organismů, je obtížné druhy vymežit, protože kromě své mikroskopické velikosti, bývají tvarově variabilní a často mají synonymní pojmenování. Hranice mezi druhy protist se často překrývají. Zaměňující se druhy se seskupují do komplexů. Jejich zkoumáním se našly např. u rozsivek (Trobajo et al., 2009; Pouličková et al., 2010) nebo krásivek (pseudo-)kryptické druhy (Neustupa et al., 2010, 2011b; Nemjová et al., 2011, Škaloud et al., 2012a, Šťastný et al., 2013).

Krásivky jsou důležitými bioindikátory. Při špatném určení do druhu, jsou jiné ekologické výsledky, a pro ochranu to může mít zásadní dopad, např. na rašeliniště, ve kterých krásivky často žijí. Krásivky jsou vysoce variabilní, tzn. morfologicky plastické (Kouwets, 1984, 2008). Hranice mezi druhy krásivek byly často nejasné a docházelo k jejich časté záměně (Růžička, 1981). Proto jsme se zaměřili na jejich infraspecifickou variabilitu. Vybrali jsme si druhový komplex *Euastrum humerosum/didelta*, běžně se vyskytující v Evropě. Zjišťovali jsme u něj molekulární diverzitu v trnG^{ucc} intronu (zkráceně trnG intron, trnG) a SSU intronu, morfologické rozpoznání linií světelnou a skenovací elektronovou mikroskopií včetně kvantitativního vyhodnocení tvaru a rozměrů (geometrickou morfometrikou a měřením). Výsledný algoritmus, z lineární diskriminační analýzy (LDA) kvantitativních dat, jsme zkusili použít v praxi pro rozpoznání krásivek z literatury, a do jaké vývojové linie mohou teoreticky patřit. Jak už bylo uvedeno výše, pro znalost diverzity je třeba vědět, co jsou druhy a jak se mohou vymežovat.

1.2 Druhy a druhový koncept

Druhy jsou základní jednotkou pro určení diverzity organismů. Pouze s dobře definovanými druhy je možné správné poznání jejich biogeografie, ekologie celého společenstva nebo pochopení evoluce života. Druhový koncept je např. morfologický, biologický, fylogenetický, ekologický atd. (Manhart & McCourt, 1992; De Queiroz, 2007).

Nejčastěji se v praxi využívá koncept morfologický u makroskopických organismů. U mikroskopických druhů je třeba dalších metod. Morfologicky definovaný rod *Chlorella*, byl po zkoumání molekulárními, biochemickými, a dalšími metodami, rozdělen dokonce do dvou tříd - Trebouxiophyceae a Chlorophyceae (Chlorophyta; Huss et al., 1999).

U řady dalších organismů, včetně makroskopických, byla odhalena (pseudo-)kryptická diverzita (např. Sáez & Lozano, 2005; Kraft et al., 2010; John et al., 2014). Kryptické druhy se liší geneticky a zároveň jsou morfologicky totožné. Pseudokryptické druhy mají drobné, morfologické rozdíly, které jsou pozorovatelné pouze důkladným zkoumáním ultrastruktury (SEM, TEM) nebo statistickou analýzou tvaru (geometrickou morfometrikou; Zelditch, 2004; Mann & Evans, 2007). Pro odhalení skryté diverzity se často využívá polyfázického přístupu, který ke správnému určení mezidruhové hranice využívá informace získané na základě více tradičních přístupů. Typicky zohledňuje fylogenetický a morfologický přístup, často s využitím informací z ultrastruktury buňky a moderně i z geometricko-morfometrických dat.

Fylogenetický koncept používá molekulární markery z různých částí buňky, především z jádra nebo organel (mitochondrie nebo chloroplastu). Nejčastěji používané markery pro krásivky jsou *rbcL* z plastidu, *SSU* z jádra, nebo *cox III* z mitochondrie (Hiesel et al., 1994; Gontcharov & Melkonian, 2008; Šťastný et al., 2013). Pro infraspecifickou specifiťu je vhodné vybrat rychle se měnící markery, nejlépe s ojedinělým výskytem, jako jsou např. introny pro tRNA z plastidu. Molekulární marker *trnG* intron má unikátní výskyt v plastidu řas (Turmel et al., 2005). Další rychle mutující marker je ITS, ale jako rDNA (spolu s SSU, nebo LSU) má několik tisíc kopií a v případě, že nedošlo k homogenizaci úseků (concerted evolution), je třeba jej klonovat (Hillis & Dixon, 1991; Liao, 1999; Hall et al., 2008).

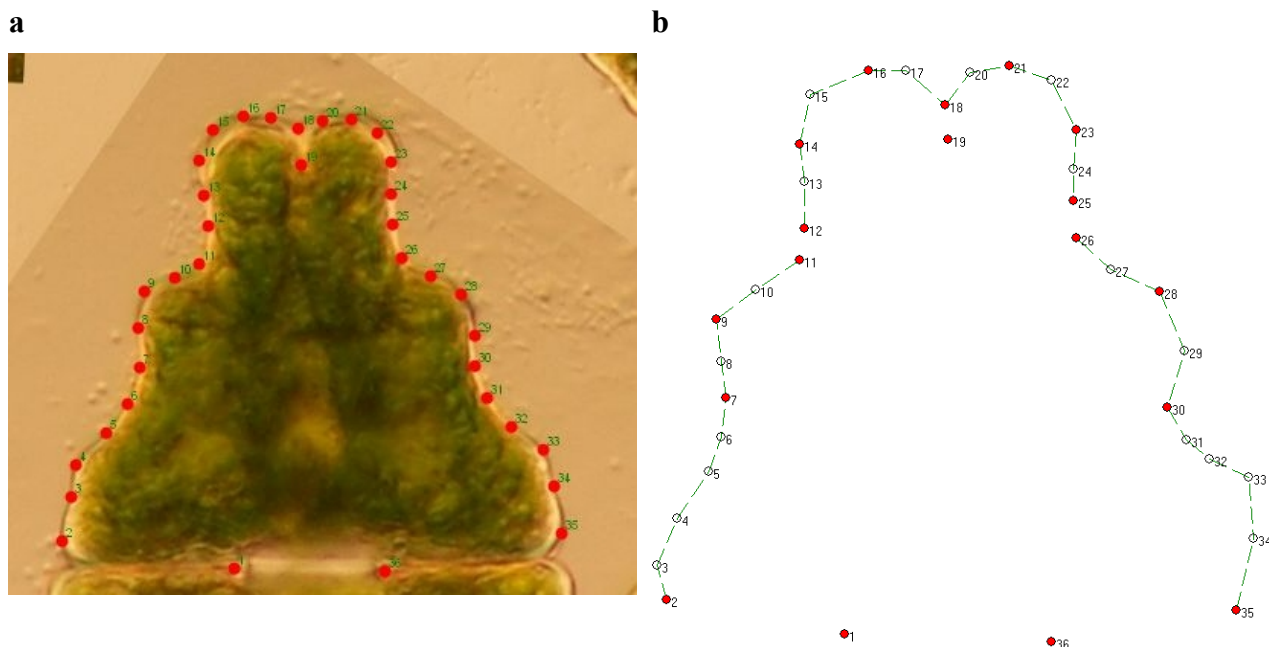
Morfologický koncept se zaměřuje na znaky, které organismy určují do taxonomických jednotek podle tzv. klíčů. Při zkoumání ultrastruktury se zkoumají vzorky pod elektronovým mikroskopem (SEM, nebo TEM). Specifickou metodou je zkoumání tvaru geometrickou morfometrikou.

Geometrická morfometrika porovnává umístění homologických bodů (landmarků, viz obr. 1.1), které mají stejné umístění nebo totožnou evoluční minulost. Důležité je, aby byly oddělené, rozpoznatelné a u všech jedinců stejně umístěné. Následuje standardizace velikosti, natočení či posunutí objektů přes sebe superimpozicí v Prokrustově analýze (Generalized Procrustes Analysis, GPA). V grafickém výstupu – třírozměrné deformované mřížce (thin plate spline) lze zobrazit rozdíly tvaru a rozhodnout ve kterých místech se nejvíc skupiny odlišují. Rozhodne se tedy až po analýze, které proměnné zahrnout a které vynechat, na rozdíl od klasické morfometrické analýzy měřených rozměrů (kde se definuje proměnná před sběrem dat). Deformace může být způsobena vnějšími nebo vnitřními vlivy. Vnitřní vlivy jsou dané genetikou, kdy buňka roste či stárne nebo má jiný evoluční základ a vnější vlivy jsou třeba environmentální podmínky (Zelditch et al., 2004; Veselá et al., 2009; Černá & Neustupa, 2010).

Geometricko-morfometrické a kvantitativní metody pro hodnocení biologických tvarů byly nedávno použity pro morfologické analýzy variability v různých skupinách mikroskopických řas

např. u rozsivek (Beszteri et al., 2005, Potapova & Hamilton, 2007, Veselá et al., 2009; Pouličková et al., 2010), u šupin Synurophyceae (Škaloud et al., 2012b) a u krásivek (Desmidiaceae, Neustupa & Šťastný, 2006, Neustupa et al., 2010, 2011b, Nemjová et al., 2011).

Obr. 1.1. Umístění (semi)landmarků na okraji buňky (**a**; vpravo plná kolečka), umístění semilandmarků (**b**, prázdná kolečka; z archivu autora).



1.3 Krásivky

Krásivky (Desmidiales, Desmidiaceae) mají dvě semicely spojené isthemem, obsahující jádro. V každé semicelle je alespoň jeden chloroplast. Pro bližší představu viz obr. 1.2. (Coesel & Meesters, 2007).

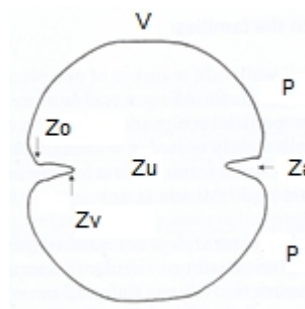
Krásivky patří mezi spájivé řasy (Zygnematophyceae), jedné z nejdiverzifikovanějších skupin streptofytních zelených řas (Gontcharov & Melkonian, 2005). Rozmnožují se konjugací a tvoří trvalá stádia – zygospor, které byly pozorovány především u krásivek z vysychajících habitatů (Coesel, 1989), ale nejčastěji se rozmnožují nepohlavně (Starr, 1955; Brook, 1981).

Jejich vysoká morfologická plasticita vedla k popsání více než 4000 druhů, z toho jen 3000 druhů mají krásivky (Desmidiales, Desmidiaceae; Gontcharov et al., 2003; Gontcharov, 2008). Podle novějších odhadů by krásivky mohly mít 9000 druhů (Šťastný & Kouwets, 2012). Krásivky patří mezi nejdůležitější skupiny fyto-bentosu s vysokou druhovou bohatostí a biomasou. Žijí na ponořených rostlinách v slabě kyselých rašelinných tůňkách, sladkovodních mokřadech nebo jezerech (Coesel & Meesters, 2007). Proto byly použity v různých ekologických a

biomonitoringových studiích. Jsou důležitými bioindikátory kvality vody (Coesel, 2001, 2003; Pals et al., 2006; Krasznai et al., 2008; Neustupa et al., 2009, 2011a). Věrohodnost studií závisí na spolehlivosti druhových konceptů. Nicméně, tradiční taxonomie krásivek založená na morfologických znacích, byla nedávno zpochybněna molekulárními daty. Pojetí rodů molekulárním výzkumem se úplně změnilo (McCourt et al., 2000; Gontcharov et al., 2003; Gontcharov & Melkonian, 2005, 2008, 2010, 2011; Gontcharov, 2008; Hall et al., 2008; Škaloud et al., 2011) a většina tradičních druhově bohatých rodů se staly polyfyletické nebo parafyletické (na základě markerů plastidového *rbcL* a jaderného SSU; Gontcharov & Melkonian, 2005, 2008; Gontcharov, 2008). Tradiční koncepty rodů jsou nevyhovující a pro druhový koncept je potřeba více dat. Jak je uvedeno výše, došlo kvůli morfologické plasticitě k popsání enormního množství poddruhových taxonů a jejich platnost je stále nejasná (Růžička, 1977; Kouwets, 2008). Několik studií založených na křížících experimentech (Blackburn & Tyler, 1987, Denboh et al., 2001, 2003) ukázaly široké pojetí některých druhových konceptů krásivek a existenci pseudokryptické nebo kryptické diverzity. Totéž bylo potvrzeno nedávnými studii založenými na molekulárních, morfologických a geometricko-morfometrických metodách a odhalila se mikroevoluční diferenciace uvnitř několika druhů krásivek.

Studie zaměřené na *Micrasterias crux-melitensis*/*M. radians* (Neustupa et al., 2010) a *M. truncata* (Nemjová et al., 2011) odhalily pseudokryptickou diverzitu uvnitř tradičních druhů krásivek. Studie na druhový komplex *M. rotata*/*M. fimbriata* (Neustupa et al., 2011b) odhalila fylogenetickou homogenitu *M. rotata*, ale ukázala, že evropské populace *M. fimbriata* patří do dvou linií. Výše zmíněné studie ukázaly, že zjištěné fylogenetické linie byly morfologicky dobře identifikovatelné podrobnou mikroskopickou analýzou a geometrickou morfometrikou. V další studii zaměřené na druhový komplex *Xanthidium cristatum*/*X. antilopaeum*, bylo u *X. cristatum* odhaleny tři variety, které mohou být samostatnými druhy. Kromě jedné výjimky jsou *X. cristatum* a *X. antilopaeum* monofyletické, tudíž se zdá rozlišení podle počtu trnů relativně spolehlivé (Šťastný et al., 2013).

Obr. 1.2: Základní morfologie krásivky z frontálního pohledu, Za-zaškrčení (*sinus*), Zo-okraj zaškrčení, Zv-vrchol zaškrčení, Zu-zúžení (*isthmus*), P- půlbuňka (*semicela*), V-vrchol (*apex*; upraveno podle Coesel & Meesters 2007, s. 10, Fig.1).



***Euastrum* Ehrenberg**

Euastrum Ehrenberg obsahuje 637 popsaných druhů, z toho 255 taxonomicky uznaných a 1307 infraspecifických taxonů (Guiry & Guiry, 2018). Typový druh je *E. ansatum* Ehrenberg ex Ralfs (Hall et al., 2008; Guiry, 2013). Buňky jsou biradiální s hlubokým zaškrcením. Semicely jsou pyramidální a často pěti-laločnaté s jedním polárním, dvěma laterálními a bazálními laloky. Na vrcholu mají hluboký apikální zářez (Růžička, 1981, Gerrath, 2003; John & Williamson, 2009). Většinou se druhy identifikují podle tvaru buňky a apikálního zářezu, popř. podle výstupků a svých rozměrů (Ralfs, 1848; Růžička, 1981; John & Williamson, 2009).

Molekulární metody rozdělili rod *Euastrum* na čtyři skupiny. Podle molekulárních markerů SSU a rbcL je tento rod polyfyletický (Gontcharov & Melkonian, 2008). Dvě skupiny leží uvnitř rodu *Euastrum* – první má hluboký apikální zářez, většinou hladkou buněčnou stěnu a buňky jsou větší než 50 µm. Patří sem např. *E. oblongum* nebo *E. affine*, které se lišily v rbcL markeru (Gontcharov & Melkonian, 2008). Druhá skupina má apikální zářez do tvaru „v“ a buňky menší než 50 µm. Třetí a čtvrtá skupina má konkávní až rovný polární lalok a povrchu buněčné stěny je granulovaný nebo trnitý, patří do dvou linií *Cosmarium* – **CO2**: *E. substellatum*, *E. verrucosum*, *E. germanicum*, *E. spinulosum* a **CO4**: *E. moebii* a *E. prowsei* (Gontcharov & Melkonian, 2008).

Protože je *Euastrum* polyfyletický rod potřeboval by zkontrolovat i zda je monofyletický na druhové úrovni, protože při zkoumání parafyletického *Micrasterias* se objevilo, že ani některé druhy nejsou monofyletické a mohou v druhových komplexech obsahovat některé morfotypy *Staurodesmus* (Škaloud et al., 2011). Rovněž se zjistilo, že některé druhy byly pseudokryptické, morfologicky se rozlišovaly na úrovni variet *M. crux-mellitensis* var. *superflua* nebo *M. crux-mellitensis* var. *janeira* (Neustupa et al., 2010). Vhodný modelový druhový komplex se zdá být *E. humerosum/didelta*, který je běžně rozšířený v Evropě, včetně České republiky.

Druhový komplex *Euastrum humerosum/didelta*

Vysoká morfologická variabilita druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* vedla k popsání velkého množství poddruhů a forem (např. West & West, 1905; Ducellier, 1915, 1918; Krieger, 1937, aj.). Hlavní morfotypy se liší především tvarem laloků a šířkou krku, a zda mají vroubkovaný bazální lalok (viz obr. 1.3-1.5). Některé druhy nebo variety se liší i svými rozměry (viz tab. 1.1). Hlavní taxony druhového komplexu mají pět laloků s apikálním zářezem, jako v první skupině *Euastrum*. Poměr délky a šířky je kolem dvou. Semicely mají pyramidální tvar a prázdná buněčná stěna je jemně tečkovaná. Podle SEM mají 5 hrbolků na svém povrchu (South, 1984; Anissimova & Terlova, 2015), tak i podle kreseb (West & West, 1905; Krieger, 1937). Mezi

centrálními hrbolky mají centrální pór. Podle Růžičky (1981) je jeho výskyt u *E. didelta* proměnlivý. Většinou u druhového komplexu bývá jeden centrální pór, u jedné variety *E. didelta* var. *bengalicum* dokonce dva (South, 1984; Wei, 1991; Anissimova & Terlova, 2015). Centrální pór je prohlubeň tzv. *scrobiculum* a byla podle něj popsána *E. humerosum* fa *scrobiculata* (Borge, 1906, Tab. 2, Fig. 13), ale nemá taxonomickou váhu, podobně jako *forma mixta* (forma smíšená, obr. 1.6; Ducellier, 1915; Kouwets, 2008).

Smišené formy

Ducellier (1915, 1918) a South (1984) pozorovali některé smíšené formy podobající se *E. humerosum* nebo *E. didelta* (viz obr. 1.6) a přechody forem mezi různými varietami *E. didelta*. Smíšené formy (*formae mixtae*) představují buňky, kde každá semicela má jiný tvar. Ducellier (1915) je považoval za následek změněných fyzikálně-chemických podmínek. Jak se prokázalo krásivky reagují na změnu pH nebo teploty změnou tvaru. Při nižším pH nebo vyšší teplotě se buňky zakulacují nebo její laloky rovnoměrně rostou Naopak při nižší teplotě mají buňky patrnější zářezy a užší isthmus mezi semicelami (Neustupa et al., 2008; Černá & Neustupa, 2010).

Záměny

Z různých důvodů docházelo k záměnám mezi *Euastrum didelta*/*E. humerosum* nebo mezi *E. affine*/*E. humerosum*; nebo i mezi dalšími druhy: *E. ansatum*, *E. everettense*, *E. pinnatum*, *E. sinuosum*, apod. *E. ansatum* je dvakrát menší než *E. humerosum*, *E. pinnatum* má výraznější laterální laloky, *E. sinuosum* má bazální lalok hluboce rozštěpený a *E. everettense* je výrazně širší se skoro neznatelnými laterálními laloky (West & West, 1905; Krieger, 1937; Prescott et al., 1977; Růžička, 1981). West & West (1905) nebo Krieger (1937) výše zmíněné druhy v literárních záznamech porůznu považovali za součást druhového komplexu, naopak některé malé varianty zařadili do *E. ansatum*, atd. Občas se ve starší literatuře objeví *E. didelta* s rozměry, které přísluší spíše *E. ansatum* (Gay, 1892).

Výskyt

Druhový komplex *Euastrum humerosum/didelta* se vyskytuje v kyselém pH, oligo- až mezotrofním prostředí bentosu jezer a rašeliníšť na vodních rostlinách rašeliníku (*Sphagnum*) a bublinatky (*Utricularia*; Coesel & Meesters, 2007).

***Euastrum humerosum* RALFS**

Morfotyp *Euastrum humerosum* Ralfs (1848, obr. 1.3) má nejširší polární lalok s krátkým krkem, s dlouhými postranními výběžky a vroubkovaným okrajem bazálního laloku; má sedm popsaných variet a dvě formy (Guiry & Guiry, 2018). Růžička (1981) uznal na evropském území *E.*

humerosum Ralfs, *E. humerosum* Ralfs var. *affine* Wallich. Morfotyp *E. humerosum* Ralfs var. *affine* (Ralfs) Wallich (1860; obr. 1.4) je podobný *E. humerosum* velikostí, ale má užší polární a bazální lalok a byl popsán v r. 1844 (Ralfs, 1844). Dále se liší v transverzálním průřezu: *E. humerosum* je třílaločnatý a *E. humerosum* var. *affine* čtyřlaločnatý (viz průřezy, obr. 1.3c, 1.4c), čili mají buď tři nebo čtyři hrbolky na proximální straně semicely. Podle West & West (1905) došlo k definování variety podle druhu *E. affine* Ralfs (1848, obr. 1.4), u Raciborskiho (1885) jen na základě rozdílného vzorce hrbolků. Došlo k nazvání variety s odkazem na Ralfse (1848), podobně jako u Wallicha (1860). Zygospory nebyly pozorovány (Růžička, 1981). Rozměry pro *E. humerosum* Ralfs (1848), jsou uvedeny v palcích a přepočteny na μm : délka buňky 1/225 palců (112,89 μm), šířka segmentu na bázi je 1/382 (66,49 μm), šířka na konci 1/727 (34,94 μm), šířka krku 1/1199 (21,18 μm), délka projekcí na straně krku 1/2314 (10,98 μm). Rozměry pro *E. affine* Ralfs (1848), jsou uvedeny v palcích a přepočteny na μm : délka buňky 1/230 palce (110,43 μm), šířka v bazálním laloku 1/458 (55,46 μm), šířka ve středních lalocích 1/659 (38,54 μm), šířka krku 1/1204 (21,1 μm), šířka na konci 1/917 (27,7 μm).

***Euastrum didelta* Turpin ex Ralfs**

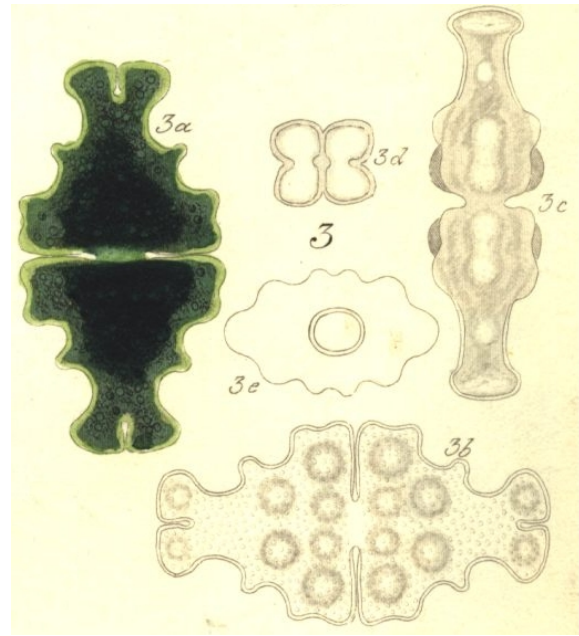
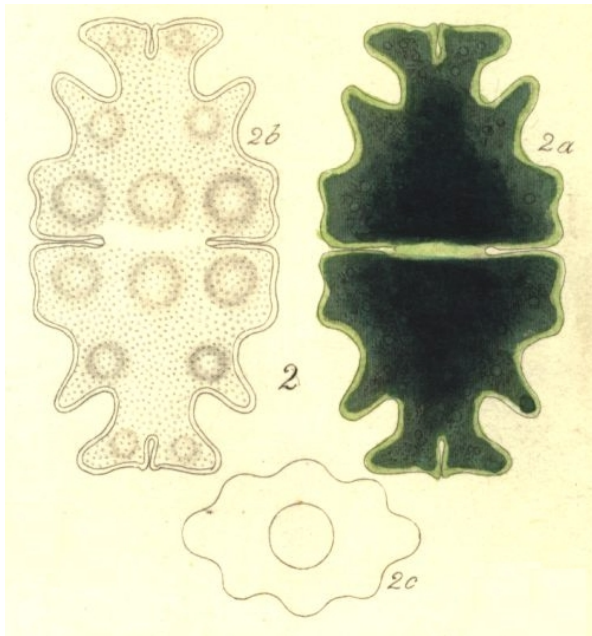
Krásivka *Euastrum didelta* Turpin ex Ralfs (1848, obr. 1.5) měla při původním popisu název *Heterocarpella Didelta* (Turpin, 1828, s. 295), nebo *Cosmarium Didelta* (Meneghini, 1840, s. 219) a má oproti předešlým dvěma morfotypům relativně široký krk a chybí jí vroubkovaný okraj u bazálních laloků a zároveň je zhruba o 17 μm delší a o více než 10 μm širší v základně (viz tab.1.1). Průřez mají *E. didelta* podobně jako *E. humerosum* var. *affine* čtyřlaločnatý (viz obr. 1.4, 1.5). *E. didelta* má dvacet osm variet a osm forem (Guiry & Guiry, 2018). Růžička (1981) uznal na evropském území *E. didelta* Turpin ex Ralfs var. *didelta* a *E. didelta* Turpin ex Ralfs var. *denticulatum* (ve švýcarských Alpách). Ve světě se vyskytují i jiné krásivky a některé se specifickým výskytem, např. *E. didelta* var. *quadriceps* (v Jižní Americe), *E. didelta* var. *bengalicum* s *E. didelta* var. *cuneatiforme* (v Indo-Malajsii a severní Austrálii), a *E. didelta* var. *truncatum* (v Laponsku a Kanadě, viz obr. 1.7-1.9). Relativně souhlasí s geografickým rozšířením krásivek podle Coesela (1996). Ten tvrdil, že je asi deset oblastí výskytu, většinou na úrovni kontinentů s endemickými krásivkami třeba na jihu Afriky nebo v jižní Americe mimo tropy. Rozšíření je většinou dáno mikroklimatem než globálním makroklimatem (Coesel, 1996).

West & West (1905) považovali oby typy *E. didelta* v Ralfsovi (1848, Tab. XIII, fig. 1a, 1b) natolik odlišné, že je od sebe oddělili, typ b označili jako součást *E. humerosum*. Zygota byla pozorována např. Archerem (1875) mezi *E. didelta* a *E. humerosum*. Tato konjugace byla

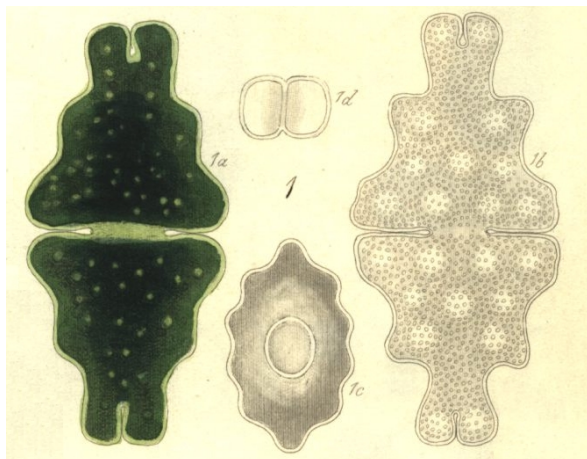
považována za hybridizaci, nebo že to jsou variety jednoho druhu. *E. didelta* var. *cuneatiforme* byla považována za nevyvinutou buňku (Ducellier, 1915).

Rozměry pro *E. didelta* Ralfs (1848), jsou uvedeny v palcích a přepočteny na μm : délka buňky 1/185 (137,3 μm); šířka v bazálním laloku 1/357 (71,15 μm); šířka na konci 1/752 (33,78 μm); šířka v isthmu 1/1250 (20,32 μm); tloušťka v postranním pohledu 1/454 (55,95 μm).

Obr. 1.3. *E. humerosum* Ralfs (Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig. 2) **Obr.1.4.** *E. affine* Ralfs (Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig.3)



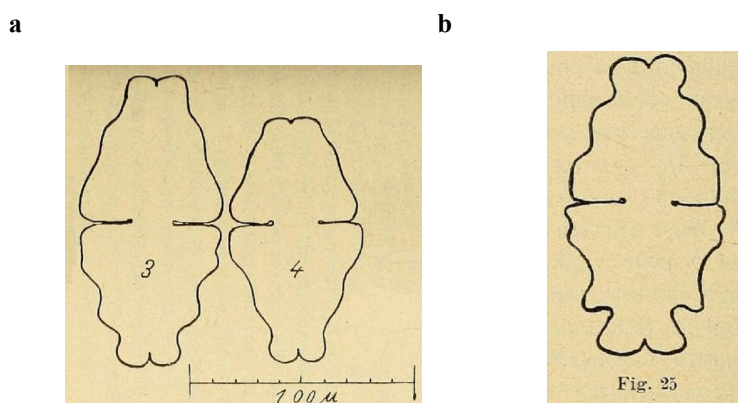
Obr. 1.5. *E. didelta* Turpin ex Ralfs (Ralfs, 1848, Tab. XIV, Fig. 1)



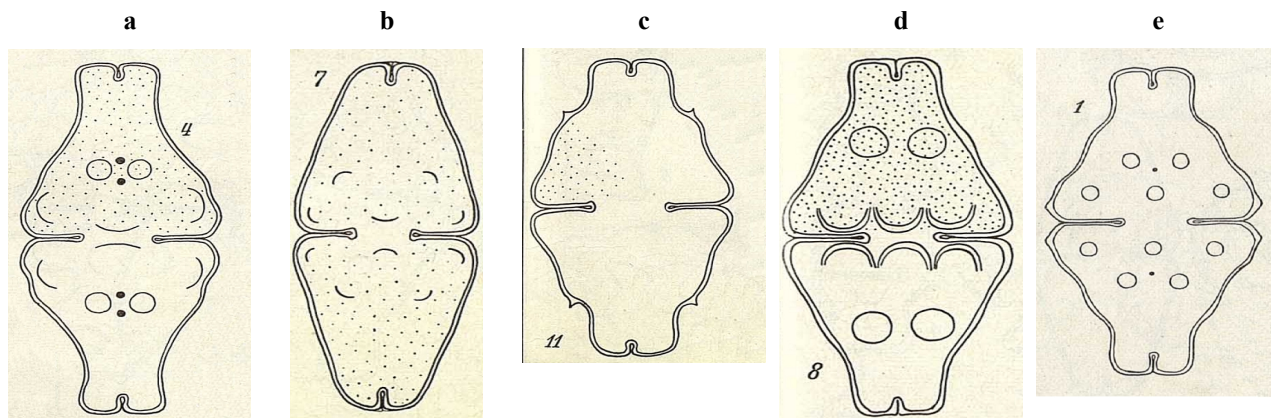
Tab. 1.1. Rozměry a pH u druhového komplexu *Euastrum humerosum /didelta* (upraveno podle Krieger, 1937; Růžička, 1981; Lopes & Bicudo, 2002; Coesel & Meesters, 2007; Aquino et al., 2017):

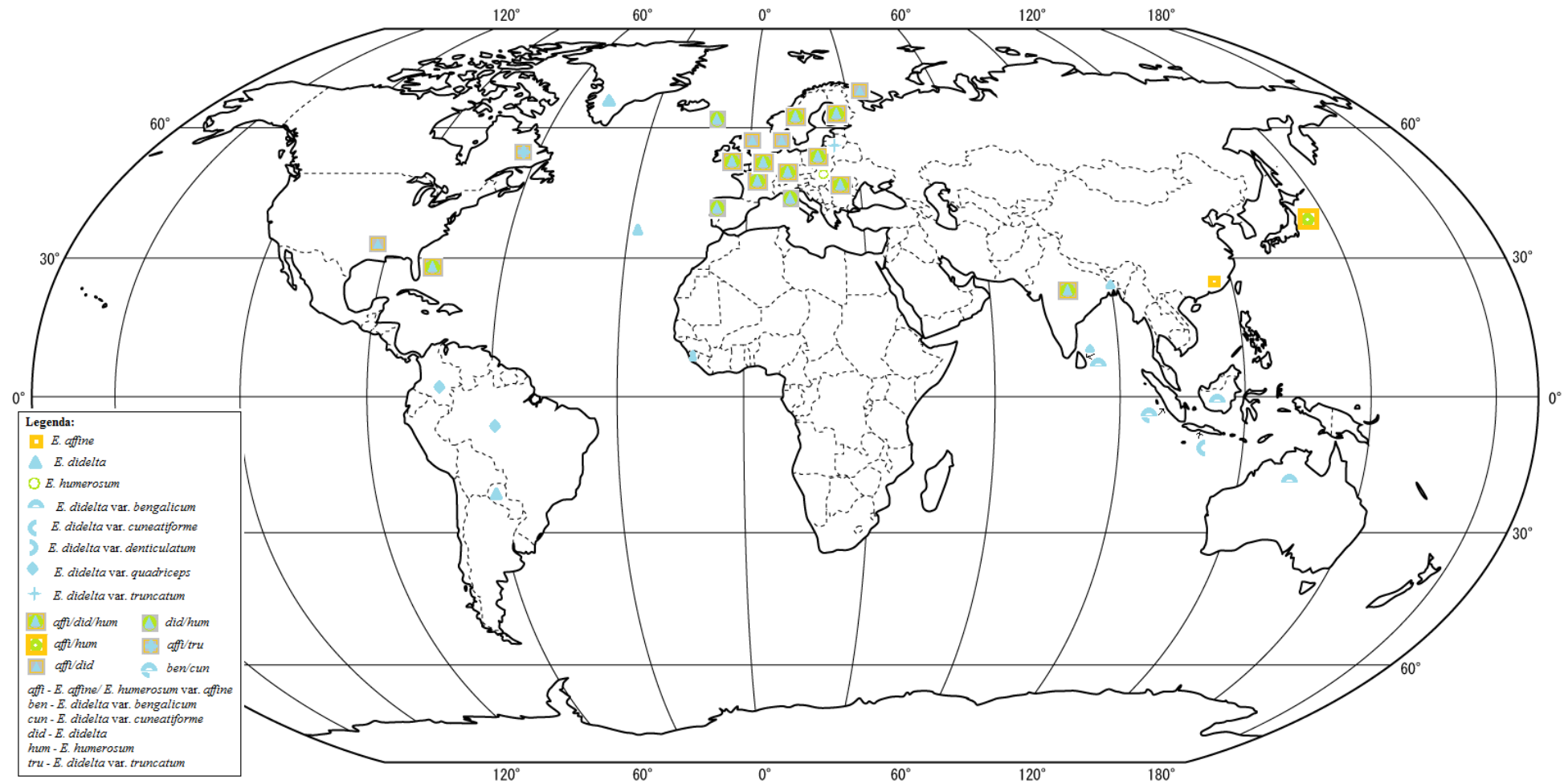
	<i>délka buňky</i> [μm]	<i>šířka buňky</i> [μm]	<i>isthmus</i> [μm]	<i>poměr délky a šířky</i>
<i>E. humerosum</i> Ralfs var. <i>humerosum</i> Ralfs	(95-) 120-140 (170)	(55-) 65-75 (96)	13-30	(1,55-) 1,7-1,9 (-2)
<i>E. humerosum</i> Ralfs var. <i>affine</i> (Ralfs) Wallich	(80-) 100-130 (140)	(32-) 55-65 (80)	12-25	(1,5-) 1,7-1,9 (-2,1)
<i>E. didelta</i> Turpin ex Ralfs var. <i>didelta</i> Ralfs ex Ralfs	(100-) 120-150 (-180)	(50-) 60-75 (-85)	(12-) 15-25 (-32)	(1,5-) 1,7-2,2 (-2,6?)
<i>E. didelta</i> Turpin ex Ralfs var. <i>bengalicum</i> Lagerh.	(90)114-176	63-86	15-25	(1,8-2)
<i>E. didelta</i> Turpin ex Ralfs var. <i>quadriceps</i> (Nordst)	(93,6)125-135	(48)60-68	15-20	(1,96-2,24)

Obr. 1.6. Smíšené formy. a: *E. didelta* fa du Val Piora f. *mixtes* (Ducellier, 1915, Pl. I, Fig. 3,4); b: *E. humerosum* (Ducellier, 1915, fig. 25).

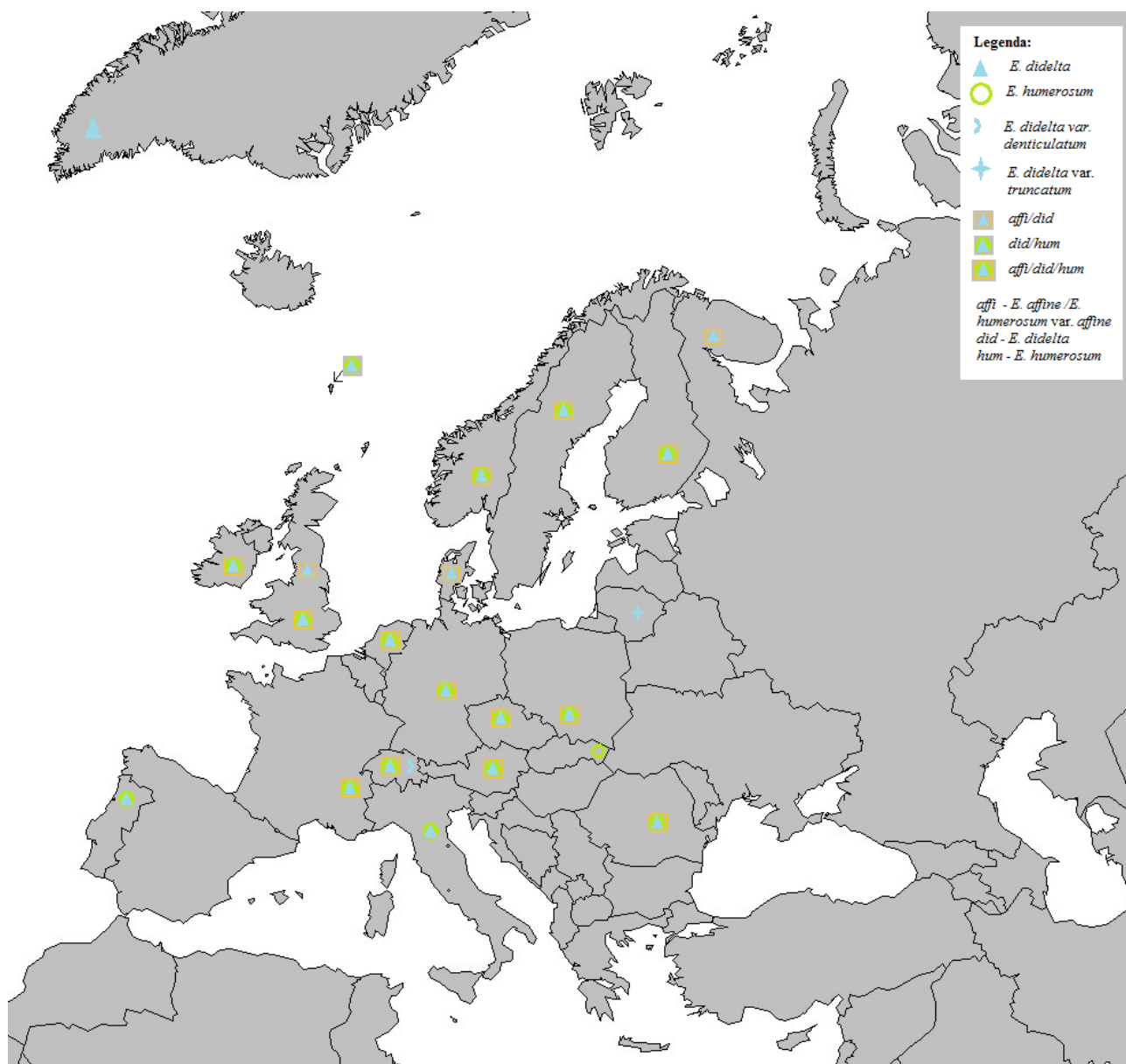


Obr. 1.7. Variety *Euastrum didelta* (Krieger, 1937, a-d: Taf. 67, e: Taf. 68): a: *E. didelta* var. *bengalicum* (Fig. 4); b: *E. didelta* var. *cuneatiforme* (Fig. 7); c: *E. didelta* var. *denticulatum* (Fig. 11); d: *E. didelta* var. *quadriceps* (Fig. 8); e: *E. didelta* var. *truncatum* (Fig. 1)





Obr. 1.8. Mapa výskytu druhového komplexu *E. humerosum/didelta* ve světě. Zdroje viz tab. 8.1, v příloze.



Obr. 1.9. Mapa výskytu druhového komplexu *E. humerosum/didelta* v Evropě. Zdroje viz tab. 8.1, v příloze.

2. Cíle práce:

V diplomové práci jsme si kladli za cíl odpovědět na tři základní otázky:

- 1) Jaká je genetická a morfologická diverzita v druhovém komplexu *Euastrum humerosum/didelta*?
- 2) Jak jsou vývojové linie druhového komplexu *E. humerosum/didelta* rozpoznatelné kvantitativními metodami použitím měření a geometrické morfometriky nebo skenovací elektronovou mikroskopií?
- 3) Do jakých linií druhového komplexu *E. humerosum/didelta* bychom zařadili krásivky z literatury, použitím lineární diskriminační analýzy geometricko-morfometrických dat s použitím rozměrů semicely a jejich poměrů?

3. Materiál a metody

3.1 Sběr materiálu, izolace kmenů, kultivace

Sběr přírodních vzorků probíhal především v lokalitách České republiky. Izolovala jsem kmeny ze vzorků Severní Evropy a Ameriky. Většinu kmenů mi poskytli školitel Mgr. Jan Šťastný, PhD. a Mgr. Katarina Nemjová. Čtyři kultury byly zakoupeny z portugalské sbírky řas ACOI (Santos, 2007). Seznam kultur je uveden v tabulce, (viz tab. 8.5, v příloze).

Izolace buněk byla provedena metodou zředování přes kapky média DY IV a následně byly řasy kultivovány ve zkumavkách se stejným médiem (viz kap. 3.1.1; tab. 8.2-8.4, v příloze). Kultivace kultur byla převážně při 24 °C a při nebo při stálém studeném osvětlení fluorescenčních trubic (5-15 mikromol · foton · m⁻² · s⁻¹, výkon 18 W; Philips TLD 18W /33; Royal Philips Electronics, Amsterdam, Nizozemí).

3.1.1 Receptura média DY IV:

Postup na přípravu média DY IV (modifikovaného podle Andersen et al., 1997; viz tab. 8.2-8.4, v příloze) je následující: k 950 ml destilované vody se přidalo po jednom ml přísad (viz tab.8.2, v příloze), 1 ml roztoku stopových prvků (viz tab. 8.3, v příloze), po autoklávování se přidalo 1 ml roztoku vitaminů (viz tab. 8.4, v příloze) a doplnilo se destilovanou vodou na celkový objem 1000 ml.

3.2 Extrakce DNA

DNA byla extrahována z narostlých kultur řas. Buňky pro rychlejší sedimentaci byly dány, v 2ml plastových zkumavkách (Eppendorf) s víčkem a kulatým dnem, do centrifugy Mini-spin na 90 s, při 120 rpm a většina supernatantu byla odebrána. Bylo přidáno 100 μl elučního pufru (Instagene) a skleněné kuličky, v poměru k řasám 1:1. Vzorky byly v mlýnku (Retsch MM200) drceny 5 min, při frekvenci $30 \cdot \text{s}^{-1}$; poté krátce zcentrifugovány (Eppendorf 5415R) a v termoblotu (Thermomixer Eppendorf) 30 min zahřívány a třepány při 50°C a 600 rpm. Vzorky byly následně zamíchány na vortexu (Genie 2) a okamžitě dány do jiného termoblotu předeřhátého na 99°C , na dobu 8 min, 0 rpm. Horké vzorky byly dány rychle do ledu (Brema Ice Flaker) a centrifugovány 2 min., 12 000 rpm. Nanodropem byly následně u vzorků změřeny koncentrace DNA, a při vyšší koncentraci než $60 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, byly zředěny vodou na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

3.3 PCR amplifikace

Pro následující fylogenetické analýzy bylo PCR metodou namnoženo dostatečné množství molekulárních markerů v Mastercycler.pro (Eppendorf, ČR). Pro PCR amplifikaci byly vybrány tyto markery: plastidový trnG^{ucc} intron (dále v textu trnG marker) a jaderný SSU intron. Pro trnG marker byly použity tyto primery $\text{trnG}^{\text{ucc}}\text{-F}$, $\text{trnG}^{\text{ucc}}\text{-R}$ (Neustupa et al., 2010), pro SSU intron HelF, HelR (Bestová, nepubl.; viz tab. 3.1). Další ingredience, které byly použity pro PCR (viz tab. 3.2). Byly použity dva teplotní cykly (viz tab. 3.3).

Finální PCR produkty byly kontrolovány elektroforézou v 1% agarózovém gelu, v TAE pufru. DNA byla čištěna kitem (Sigma Elute PCR Clean-UP KIT) nebo levnější octan-ethanolovou metodou: ke vzorkům DNA bylo přidáno 2 μl octanu a 50 μl 96% ethanolu, vzorky byly zcentrifugovány (1 min. při 450 rpm) a ponechány stát 10-15 min. Znovu byly vzorky zcentrifugovány (30 min. při 3700 rpm, a supernatant byl slit. Ke vzorkům bylo přidáno 100 μl 70% ethanolu, a opět byly vzorky zcentrifugovány (10 min při 3700 rpm), tento krok byl jednou zopakován. Vzorky byly dosušeny při 65°C po dobu 5-10 min. Před posláním na sekvenaci byla suchá DNA rozpuštěna v nahřáté sterilní vodě (při 65°C , podle intenzity proužku DNA na gelu při elektroforéze, se přidalo 20-30 μl vody) a konečná koncentrace DNA byla naměřena nanodropem. Vzorky byly zaslány na sekvenaci automatickým sekvenátorem (ABI 3730xl) do společnosti Macrogen (Applied Biosystems; Seoul, Korea).

Tab. 4.1. Seznam použitých primerů

<i>Použití</i>	<i>primer</i>	<i>směr</i>	<i>sekvence</i>	<i>citace</i>
trnG intron	trnG ^{ucc} -F	Forward	5'-AGCGGGTATAGTTTAGTGGT-3'	Neustupa et al., 2010
trnG intron	trnG ^{ucc} -R	Reverse	5'-GGTAGCGGGAATCGAACCCGC-3'	
SSU intron	HelF	Forward	5'-TGAGGCAATAACAGGTCTG-3'	Bestová, nepubl.
SSU intron	HelR	Reverse	5'-CAATGATCCTCCGCAGG-3'	

Tab. 4.2. Složení reakční směsi – Gold master mix (upraveno podle Škaloud et al., 2012a). V případě SSU intronu se použilo na vzorek 2 μ l MgCl₂ a 13 μ l vody.

<i>Složka [koncentrace]</i>	<i>Množství na vzorek [μl]</i>	<i>Složka [koncentrace]</i>	<i>Množství na vzorek [μl]</i>
pufr Gold	2	dd voda	13,1
dNTP [10mM]	0,4	enhancer	0,6
primer F [25nM]	25	polymeráza Gold [5U/ μ l]	0,2
primer R [25nM]	0,25	DNA [10ng/l]	1
MgCl ₂ [25mM]	2,2		

Tab. 4.3. PCR teplotní cyklus pro úsek trnG (upraveno podle Škaloud et al., 2012a) a SSU intron (Bestová nepubl.)

Fáze cyklu	trnG			SSU intron		
	<i>teplota</i>	<i>trvání</i>	<i>opakování</i>	<i>teplota</i>	<i>trvání</i>	<i>opakování</i>
<i>iniciální denaturace</i>	94°C	2 min.	1x	95°C	10 min.	1x
<i>denaturace</i>	94°C	1 min.		95°C	1 min.	
<i>annealing</i>	62°C	1 min.	40x	51°C	40 s	35x
<i>elongace</i>	72°C	1,5 min.		72°C	2 min.	
<i>finální elongace</i>	72°C	10 min.	1x	72°C	10 min.	1x

3.4 Fylogenetické analýzy

Pro fylogenetické analýzy bylo získáno 23 sekvencí markeru plastidového trnG (trnG^{trnG} intron) ze zkoumaného druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* a 1 sekvence *E. everettense* (outgroup). Osm sekvencí z druhového komplexu a u outgroupu bylo sekvenováno i z druhé strany a assemblováno v programu SeqAssem v. 9/2004 (Hepperle, 2002). Kvalita sekvencí byla kontrolována v programu FinchTV (verze 1.4.0; Patterson et al., 2004). Sekvence byly převedeny do formátu .fasta.

Data byla dále zpracována v programech MEGA verze 6.0 nebo 7.0 (Tamura et al., 2013; Kumar et al., 2016). Globální alignment byl vytvořen pomocí algoritmu ClustalW (Thompson et al., 1994). Byly použity výchozí parametry pro výpočet. Po úpravách bylo získáno 756 pozic v alignmentu.

Obdobně bylo zpracováno 19 sekvencí jaderného SSU intronu, které byly sekvenovány pouze z jedné strany. Pro tento marker nebyly ustálené pozice nukleotidů a pro výpočet ML stromu byl použit alignment bez dualit na pozicích. Bylo získáno 426 pozic v alignmentu.

Pro trnG marker byl vybrán Tamura-3-parametrový substituční model (Tamura, 1992) jako speciální případ HKY modelu (Hasegawa-Kishino-Yano model; Hasegawa et al., 1985), který byl použit v programu MrBayes. Pro SSU intron byl použit JC+G model (s gamma parametrem 0,1; Jukes & Cantor, 1969; Nei & Kumar, 2000; Kumar et al., 2016). Bootstrapová podpora (Efron, 1982; Felsenstein, 1985) byla spočítána z 1000 opakování v programu MEGA v. 7 (Kumar et al., 2016) společně s ML a MP analýzami. Pro zjištění posteriorních pravděpodobností v nodech stromů byla použita MCMC metoda (Markov chain Monte Carlo metoda, Metropolis et al., 1953; Hastings, 1970), za použití dvou paralelních výpočtů studených řetězců v programu MrBayes v. 3.2.1 x64 a 3.2.6 x64 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003; Ronquist et al., 2011). Při těchto výpočtech byl použit parametr (lset=2) pro HKY model a parametry (lset nst=1 prset statefreqpr=fixed(equal); Kimura, 1980; Hasegawa et al., 1984, 1985; brantfaircloth, 2015).

U molekulárního markeru SSU z genové databáze (NCBI, 2017) pro *E. pinnatum* (AJ428096.1; Gontcharov et al., 2003), *E. oblongum* (AM910435.1; Gontcharov & Melkonian, 2008) a *E. affine* (AM920342.1; Gontcharov & Melkonian, 2008) byla zjištěna jednotná DNA. Sekvence rbcL (*E. oblongum* AM911239.1), *E. affine* (AM911240.1) byly fylogeneticky již testovány (Gontcharov & Melkonian, 2008).

3.5 Morfologie buněk a kvantitativní metody

Morfologická variabilita druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* byla pozorována světelnou a skenovací elektronovou mikroskopií (LM a SEM) a testována geometrickou morfometrikou (GM). Kultury řas byly určeny podle dostupné literatury pro střední Evropu (Růžička, 1981). Pro morfometrické analýzy a SEM byly použity 5-7 týdnů staré kultury, kultivované za stejných podmínek. Byla studována pouze morfologická variabilita daná genetickými rozdíly, relativními k danému pH, teplotě, osvětlení atd.

3.5.1 Světelná a elektronová mikroskopie (SEM)

Mikrofotografie byly pořízeny digitálním fotoaparátem Olympus E30 (Tokyo, Japonsko) na světelném mikroskopu Olympus BX 51 a fotoaparátem Canon EOS 1100D (Taiwan) na světelném mikroskopu Olympus CX31 (Tokyo, Japonsko). Pro morfometrické analýzy (měření a geometrickou morfometriku) bylo nafoceno 30 buněk od každého kmenu (kromě E10 a E15; kmen E10 byl tvarově hodně odlišný a kmen E15 byl v době posledního focení amorfní a buňky byly pro další analýzy nepoužitelné).

Preparáty pro SEM byly fixované několika kapkami formalínu a ošetřené ultrazvukem, aby se odstranil slizový obal buněk. Připravené vzorky byly nakapány na krycí sklíčka s poly L-lysinem; sklíčka byla předtím umytá acetonem a pokrytá 3x poly L-lysinovým roztokem (ředěným 1:10 destilovanou vodou). Připravená sklíčka se vzorkem byla přenesena do 30% acetonu a dehydratována acetonovou sérií: po působení v 30% acetonu byly vzorky přemístěny do 50%, 70%, 90%, 95%, 99% (u všech po 10 min.) a 2x v 100% acetonu odvodněného kuličkami Nalsit. Vzorky byly po promytí od acetonu usušeny pomocí kritického bodu kapalným CO₂ v přístroji Bal-Tec CPD 030. Vzorky byly nalepeny na destičku a pozlacené v naprašovacím zařízení Bal-Tec SCD 050. Preparáty byly pozorovány ve skenovacím elektronovém mikroskopu JEOL 6380 LV (Hyliš & Nebesářová, 2008a, 2008b).

3.5.2 Geometrická morfometrika a měření

Pro geometrickou morfometriku a měření byly vybrány plně vyvinuté semicely. Většina fotografií kmenů byla pořízena fotoaparátem Olympus E30 (Tokyo, Japan) při zvětšení 20x10, a kmeny K4 a K57 byly foceny fotoaparátem Canon EOS 1100D (Taiwan) při zvětšení 40x10. Fotky byly otočeny a oříznuty v programu Zoner Photo Studio v. 17-X (Lane et al., 1995-2015). Hodnoty pro výšku semicely, její šířku a isthmus byly změřeny v programu ImageJ v.2 (Schindelin et al.,

2015). Bylo použito měřítko pro „40x“ objektiv, které bylo podle potřeby přepočítáno na objektiv „20x“ (pro dané měřítko pro „40x“ objektiv, 100 μ m, byla vybrána její polovina). Každá hodnota byla změřena třikrát a všechny rozměry byly převedeny do tabulkového editoru a spočteny poměry: Ds/Ss, 2Ds/Ss, Ds/I, Ds/Pl, Ds/Ipl, Pl/Ipl. Zkratky rozměrů uvedené v obr. 3.1. Poměr 2Ds/Ss nahrazoval poměr uváděný v literatuře (poměr délky a šířky buňky).

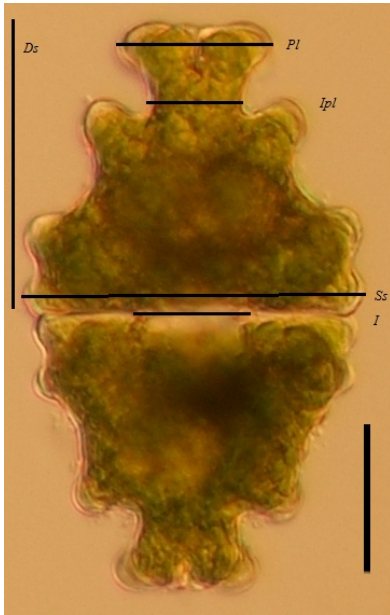
Statistiky jako 10. a 90. percentil, PCA, LDA, CVA, nebo MANOVA (Wilksova lambda; Bonferroniho korelované p-hodnoty) byly počítány v programu PAST v. 3.20 (Hammer et al., 2001).

Geometricko-morfometrická data byla analyzována v balíčku TPS - tpsUtil v. 1.60 (Rohlf, 2013-2017b); tps Dig2 v. 2.18 (Rohlf, 2015); tpsRelw v. 1.54 a v. 1.67 (Rohlf, 2014, 2017a), tps Small v. 1.33 (Rohlf, 2016a) a v programu PAST v. 3.20 (Hammer et al., 2001). Bylo použito 36 homologních bodů na semicelu z toho 18 pevných landmarků a 18 semilandmarků (viz obr. 1.1), pro 30 buněk na kmen s použitím 22 kmenů.

Hodnoty skóre na relativních warpech byly otestovány v programech tpsSmall32 (Rohlf, 2016a) a PAST v. 3.20 (Hammer et al., 2001). Hodnoty z prokrustovy analýzy a z Kendalova prostoru vykazovaly v programu tpsSmall32 lineární závislost (Rohlf, 2016b). Analýzou hlavních komponent (PCA) v programu PAST byly analyzovány hlavní rozdíly mezi trnG liniemi a jestli lze tyto linie rozlišit znaky (relativními warpy, nebo popř. rozměry semicel a jejich poměry). Při výpočtech mezi stejnými typy dat, skóre na relativních warpech, byla použita variance, při kombinaci s měřením byla použita korelace.

Tvarové tendence byly zjištěny z PCA biplotu relativních warpů v programu PAST 3.20 (Hammer et al., 2001) a porovnány s grafickými výstupy z tps Relw v. 1.54 (Rohlf, 2014).

Pro určení krásivek z literatury byla použita LDA z dat geometrické morfometriky a měření. Všechny krásivky pro toto hodnocení byly analyzovány společně s originálně nafocenými a změřenými buňkami ze zkoumaných kmenů s přiřazenými skupinami podle uvedených morfotypů z literatury (viz tab. 8.13, GM). Výjimečně se přihlíželo i k datům vyšlým LDA GM dat s nedefinovanou skupinou (definovanou jako „?“). Bylo přihlíženo k datům zjištěných pohledem a ověřených měřením a geometrickou morfometrikou.



Obr. 3.1 Atributy měření pro semicelu. Ds – délka semicely, I – isthmus, Ipl - Isthmus polárního laloku je tzv. šířka krku, Pl – polární lalok, Ss – šířka semicely. Kmen K27, archiv autora, měřítko 30 μm .

4. Výsledky:

4.1 Fylogenetické analýzy

U druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* byla odhalena genetická variabilita na úrovni obou použitých molekulárních markerů trnG intronu, a SSU intronu. Pouze u trnG intronu byly získány čisté sekvence a tři vnitrodruhové (infraspecifické) linie.

4.1.1 trnG intron

Genetická diverzita u trnG intronu byla zkoumána u 23 kmenů druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* a 1 *outgroupu* *E. everettense* (viz obr. 4.1). Konečný alignment obsahoval 848 znaků, vynecháním mezer a chybějících dat bylo v analýzách použito 756 pozic nukleotidů. Mezi třemi liniemi bylo 744 znaků bez polymorfismu a 12 parsimonně informativních míst. Z 12 polymorfních pozic v rámci druhového komplexu bylo 6 transverzí, 5 tranzic a 1 indel. Genetická vzdálenost, použitím Tamura-3-parametrového modelu, byla největší mezi liniemi A a C 0,027, středně velká mezi liniemi A a B 0,016, a nejmenší mezi liniemi B a C 0,011. Mezi *outgroupem* *E. everettense* a skupinami druhového komplexu byly genetické vzdálenosti větší než 0,05 (linie A 0,075, linie C 0,061, linie B 0,058). Získali jsme 3 dobře podpořené linie se statistickou podporou: BI/ML/MP: linii A (1.00/100/99), linii B (?/95/90, a linii C (1.00/99/100). Určené kmény jako *Euastrum humerosum* var. *affine* klastrovaly v linii C, ostatní kmény určené jako *E. humerosum* nebo *E. didelta* nikoli (viz obr. 4.1).

Příbuzné druhy *E. oblongum*, *E. pinnatum* a *E. affine* měly totožné sekvence SSU (Gontcharov et al., 2003; Gontcharov & Melkonian, 2008). Naše porovnávané sekvence SSU intronu se z první poloviny lišily pouze u *outgroupu* a kmenu K55. Druhá polovina sekvence byla natolik variabilní, že výsledky nebyly dostatečně spolehlivé, aby se linie diferencovaly s dostatečnou statistickou podporou (viz obr. 4.2).

4.1.1.1 Rozdělení krásivek do podskupin podle molekulárních dat a tvaru bazálního laloku

Pro lepší výsledky v LDA byly krásivky rozděleny podle nového morfotypu, nikoli podle určení před kultivací (jak je uvedeno v tab. 8.5 a obr. 4.1-4.2). Nechala jsem původní názvy, ale rozdělila je do pěti pracovních podskupin, kde definující faktor bylo výraznější vroubkování bazálního laloku. Do linie A (s pracovním názvem „*humerosum*“) podle markeru trnG intronu vyšly kmény

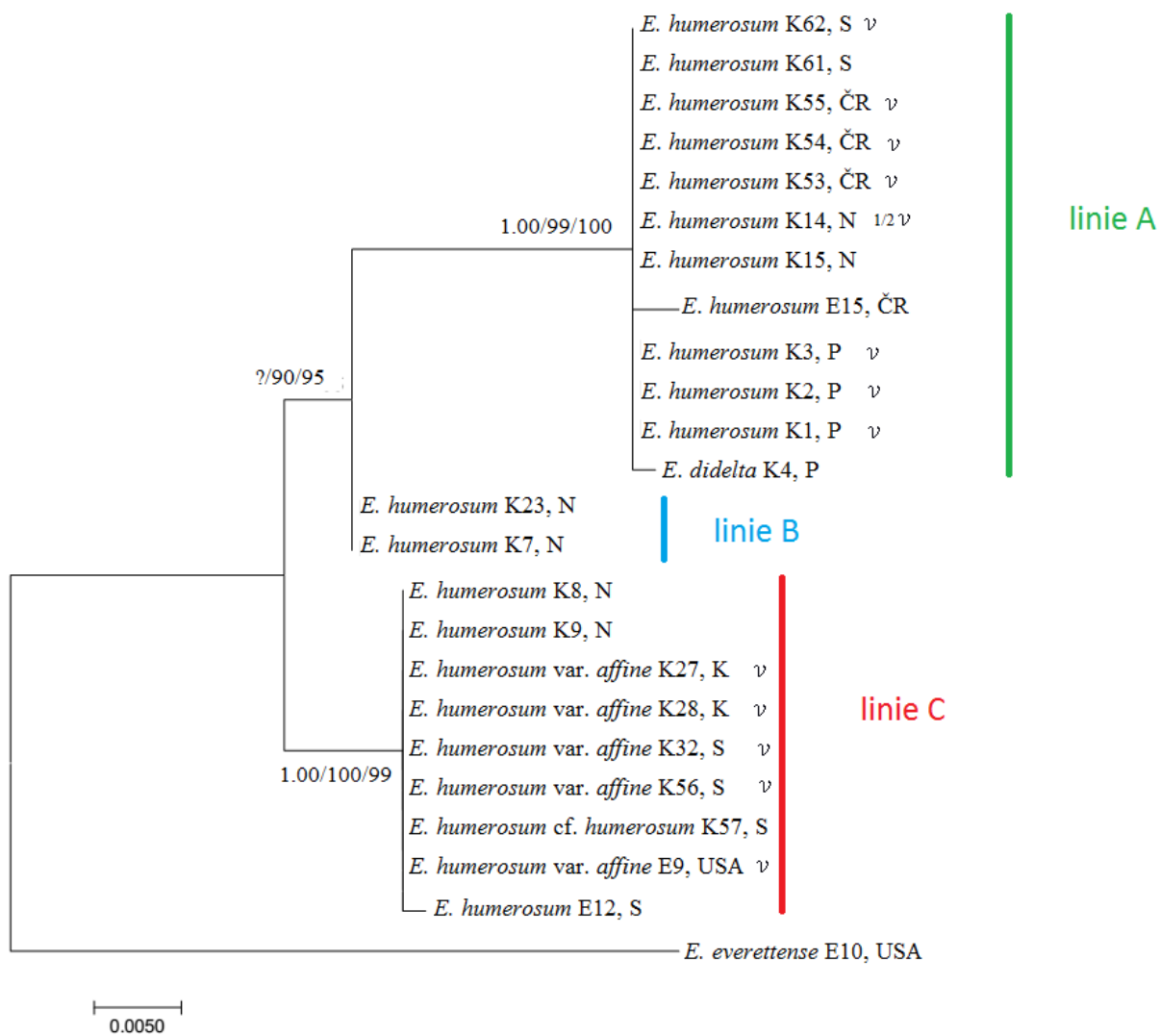
určené podle Růžičky (1981) jako morfotyp *Euastrum humerosum* (K1-K3, K53-K55 a K62; z ČR, Portugalska a Švédska; pracovní podskupina „humerosum-humerosum“, viz Obr.tab.I). Ostatní kmeny z linie A, kvůli převažující absenci vroubkování bazálního laloku, byly zařazeny do pracovní podskupiny „humerosum-didelta“ (K14, K15, a K61; z Norska a Švédska a K4, z Portugalska, viz Obr.tab.I); do linie B (kmeny K7 a K23 z oo. Lofoty a NP Rago na západě Norska, s pracovním názvem „scandinave“, viz Obr.tab.II); a do linie C patřily dva morfotypy: *E. didelta* (K8,K9,K57,E12; s pracovním názvem "affine-didelta"; z Norska a Švédska a původně určené jako *E. humerosum*, viz Obr.tab.II), a *E. humerosum* (K27, K28, K32, K56, E9; s pracovním názvem „affine-humerosum“; z Kanady, Švédska a USA a původně určené jako *E. humerosum* var. *affine*, viz Obr.tab.III). Pro podrobnější zkoumání byly odděleny na dva subsety *humerosum* a *didelta* podle vroubkování, v (viz obr. 4.1, a podkapitola 4.3.2).

4.1.2 SSU intron

Genetická variabilita SSU intronu byla zkoumán u 18 kmenů. Z původních 528 pozic alignmentu po vynechání dualit, byl spočítán strom z 426 pozic. SSU intron byl uvnitř druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* velice variabilní. Jeho spolehlivé odlišení bylo jen u dvou kmenů, které nebyly ve stejné linii trnG (*E. humerosum* v trnG linii A, K55, a *E. everettense* a dva kmeny *E. humerosum* var. *affine* uvnitř jedné trnG linie C: E9, K56 (viz obr. 4.1-4.2). Kmen K55 ležel zcela mimo druhový komplex.

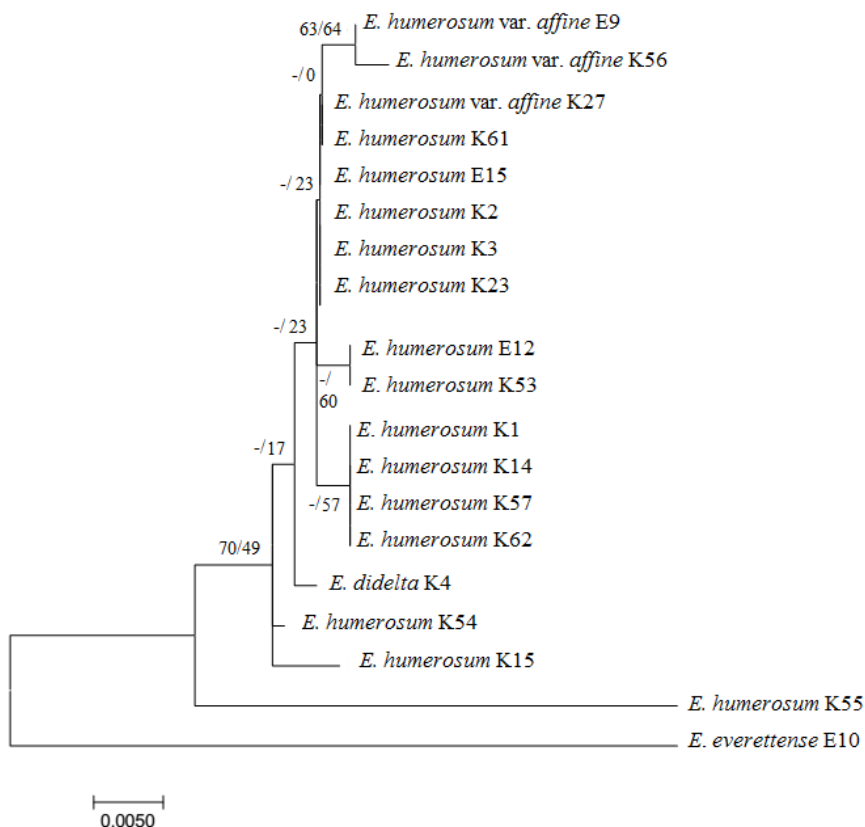
Spolehlivé rozdělení ML/MP stromu (Obr. 4.2a) bylo jen pro 2 kmeny. S použitím i druhé poloviny sekvencí byly výsledky velmi málo spolehlivé. S vynecháním víceznačných nukleotidů spolehlivost výsledků stoupla jen nepatrně. Bayesův fylogenetický strom nekoreloval s výsledky ML/MP stromu pro SSU intron (Obr. 4.2b).

Obr. 4.1. Fylogenetický zakořeněný ML strom pro trnG intron. Na uzlech stromu jsou statistické podpory (BI/MP/ML). Měřítko ukazuje odhadovaný počet substitucí na nukleotid. ČR- Česká republika, K- Kanada, N – Norsko, P – Portugalsko, S – Švédsko, USA-Spojené státy americké, v - vroubkování bazálního laloku 1/2v – polovina buněk s vroubkováním.

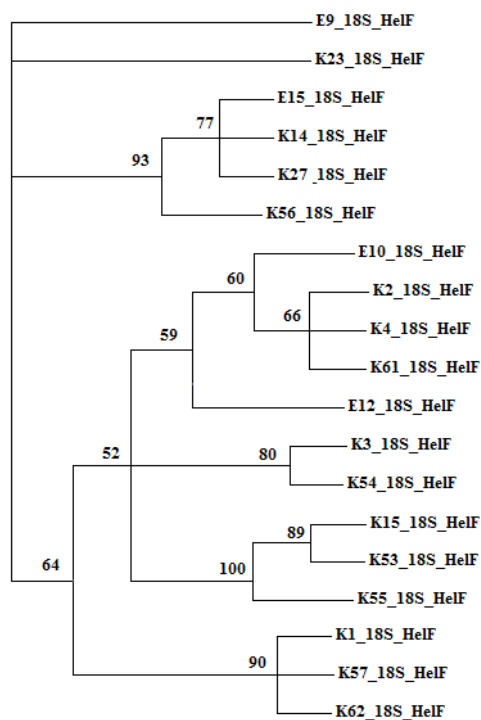


Obr. 4.2. Fylogenetický strom pro SSU intron **a**: ML strom (hodnoty MP/ML nad uzly); měřítko zobrazuje odhadovaný počet substitucí na nukleotid; **b**: strom vyšlý z programu MrBayes s BI statistickou podporou nad uzly.

a



b



4.2 Morfologie kmenů

Kmeny *Euastrum* byly identifikované jako *E. didelta*, *E. humerosum* nebo *E. humerosum* var. *affine*. Před kultivací byly určované podle klíče pro střední Evropu (Růžička, 1981). Kmeny byly porovnány podle vzhledu s ilustracemi z dostupných monografií. Buňky z linie A a B se převážně podobaly *Euastrum didelta* Ralfs (Ralfs, 1848) nebo *E. humerosum* podle Coesel & Meesters (2007). Kmeny *E. humerosum* var. *affine* se podobaly *E. humerosum* Ralfs (Ralfs, 1848).

4.2.1 Světelná mikroskopie (LM)

Nafocené mikrofotografie 22 kmenů byly porovnány a rozříděny podle evolučních linií do několika obrazových tabulí, a byly vybrány ty nejčastěji se vyskytující buňky, popř. neobvyklé morfy podobající se jinému druhu (např. E9; viz Obr. tab. I-III). Některé kmeny měly relativně ustálený tvar buněk, např. K23 (z linie B, z národního parku Rago) nebo K56 (z linie C, ze Švédska). Naopak kmeny K14 (z linie A), K7 (z linie B) a E9 (z linie C) měly vzhled podobající se dvěma morfotypům *Euastrum didelta/humerosum* nebo *E. didelta/humerosum* var. *affine*.

Linie A (viz Obr. tab. I, tab. 4.1). V linii A byly zjištěny 2 morfotypy *Euastrum didelta* (polovina kmenu K14, K15, K61, K4) a *E. humerosum* (K1-3, K53-55, K62). Hlavní rozdíl byl u nich ve vroubkování bazálního laloku definující tzv. morfotyp *E. humerosum*. U kmenu K14 se buňky podobaly oběma morfotypům. K61 měl rozšířenější bazální lalok oproti ostatním kmenům v linii. Velikosti laterálních laloků byly poměrově menší (u morfotypu *E. didelta*) nebo stejně velké (morfotypu *E. humerosum*). Polární lalok měly buňky rovný s oblým zakončením (Obr. tab. I: c, d) nebo lehce srdcovitě rozšířený (Obr. tab. I: a, f-i). V literatuře se podobné buňky linii A určovaly různě.

Obrázky podobající se linii A, které vyšly i v geometrické morfometrice byly zvýrazněné tučně: *E. didelta*: Krieger, 1937, Taf. 67, Fig. 1; Croasdale & Grönblad, 1964, Pl. VI, Fig. 3; Lenzenweger, 1981, Taf. 2, Fig. 6; Lenzenweger, 1993, Taf. 2, Fig. 13; Coesel & Meesters, 2007, Pl. 41, Fig. 1; John & Williamson, 2009, Pl. 20, obr. E; *E. didelta* fa *didelta*: South, 1984, Fig. 4b; *E. didelta* fa *latior*: South, 1984, 4a; *E. didelta* var. *quadriceps*: Krieger, 1937, Taf. 67, Fig. 8; *E. humerosum*: Růžička, 1981, Taf. 63, Fig. 1,4; Lenzenweger, 1996, Taf. 9, obr. 12; Coesel & Meesters, 2007, Pl. 41, Fig. 3, 4; *E. humerosum* var. *affine*: Růžička, 1981, Taf. 63, obr. 7; Lenzenweger, 1996, Taf. 9, obr. 14.

Linie B (viz Obr. tab. II, tab. 4.1). Kmeny K7 a K23 se tvarově lišily. Kmen K23 měl jednotný tvar (bez plasticity), a připomínal kmen K4 z linie A, lišil se v polárním laloku, který končil buď rovně nebo srdčitě, podobně jako u jiných kmenů *Euastrum* v linii A. Kmen K7 měl srdčitě rozšířený polární lalok a ostatní laloky rovnoměrně rozmístěné a zaoblené.

Obrázky, které se linii B podobaly. *Euastrum didelta*: Brown, 1930, Pl. XIII, Fig. 50; Krieger, 1937, Taf. 67, Fig. 1; Lenzenweger, 1981, Taf. 2, Fig. 6; Lenzenweger, 1993, Taf. 2, Fig. 13; John & Williamson, 2009, Pl. 20, Fig. E; *E.*

didelta fa *truncatum*: Croasdale & Grönblad, 1964, Pl. VI, Fig. 5. *E. humerosum*: Růžička, Taf. 63, Fig. 1, jehož ilustrace byla původně od Kriegera (1937).

Linie C (viz Obr.tab. II-III, tab. 4.1). V linii C byly zahrnuté dva morfotypy *Euastrum didelta*, *E. humerosum* var. *affine*.

Morfotyp *E. didelta* (viz Obr. tab. II). Pro morfotyp *E. didelta* byl většinou bazální lalok zaoblený, a polární lalok zakončený srdčitě (E12, K9, K57, Obr.tab.II, h-l), laterálními obloučky (K8, Obr.tab.II, a-c) nebo obdélníkovitě s rovným krkem (K8, Obr.tab.II, b, kmen K8). Kmen E12 dosti připomínal kmen K23 z linie B, měl pravidelné laloky a jeho polární lalok se srdčitě rozšiřoval (Obr.tab.II, e).

Obrázky, které se tomuto morfotypu podobaly a zároveň vyšly i v geometrické morfometrice byly zvýrazněny tučně: *Euastrum didelta*: **Brown, 1930, 1930, Pl. XIII, Fig. 50**; Croasdale & Grönblad, 1964, Pl. VI, Fig. 3; Lenzenweger, 1981, Taf. 2, Fig. 6; Coesel & Meesters, 2007 Pl. 41, Fig. 1; *E. humerosum* var. *affine*: Coesel & Meesters, 2007, Pl. 42, Fig. 1.

Morfotyp *E. humerosum* var. *affine* (viz Obr.tab. III). Pro morfotyp *E. humerosum* var. *affine* bylo typické, že polární lalok byl na konci rozšířený, bazální lalok rozdvojený, laterální lalok byl výrazněji prominující se zaobleným či s globulárním zakončením. Kmeny se lišily v zakončení polárního laloku: buď byl i) výrazně rozšířený (K27, K28, K56; Obr.tab.III, a-c), nebo byl ii) široce srdcovitý (E9 a K32; Obr.tab.III,d). U kmenu E9 se polární lalok měnil ze srdčitého až na pouze obloukovité zakončení a mohl se tak podobat i morfotypu *E. didelta* (zobrazena jeho hraniční forma, nicméně jeho obvyklá forma se podobala kmenu K32, viz Obr.tab. III, e).

Obrázky, které se tomuto morfotypu podobaly a zároveň vyšly i v geometrické morfometrice byly zvýrazněny tučně: *Euastrum affine*: Brown, 1930, Pl. XIII, Fig. 52. *E. humerosum*: Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig. 2a-b. *E. humerosum* var. *affine*: Růžička, 1981, Taf. 63, Fig. 5, 6; **Lenzenweger, 1996, Taf. 9, Fig.13**. *E. humerosum* var. *affine* fa: Růžička 1981, Taf. 63, Fig. 7.

4.2.2 SEM (Skenovací elektronová mikroskopie)

Pomocí SEM byly odhaleny drobné rozdíly v ultrastruktuře buněčné stěny (viz Obr.tab. III). Buňka byla tvořena polárním lalokem s apikálním zářezem, a laloky laterálními a bazálními. Na frontálním pohledu byly 3 centrálně a 2 laterálně umístěné hrbolky, v úrovni bazálních laloků. Uprostřed centrálních hrbolků ležel jeden centrální pór. Povrch buněčné stěny pokrývaly jemné důlky, tzv. tečky, které byly většinou nahloučeny v místech růstu buňky (v lalocích a v hrbolcích). Vzorkování teček se v rámci linií nepatrně lišilo. Okolo centrálních hrbolků byly tečky pouze u linie A (K61); okolo ostatních hrbolků a všech laloků byly tečky u linie A a B (K23). Jediná linie C (K8) kolem všech hrbolků a laloků tečky neměla. Všechny kmeny měly důlky, tzv. tečky na konci laloků a hrbolků, ale neměly je okolo centrálního póru (viz Obr.tab. III, viz tab. 4.2).

Porovnáme-li přítomnost centrálního póru i s obrázky z literatury, nebyl zakreslen u ilustrací *E. affine*, *E. didelta* a *E. humerosum* (Ralfs, 1848, citace u obr. 1.3-1.5). U jiných ilustrací a mikrofotografií druhového komplexu centrální pór zobrazen byl (např. Lenzenweger, 1981, 1996; Růžička, 1981; South, 1984; Coesel & Meesters, 2007; John & Williamson, 2009; Anissimova & Terlova, 2015; přesné citace ilustrací byly zvýrazněny tučně v kap. 4.2.1; citace mikrofotografií ze SEM jsou v následujícím odstavci). Při porovnávání variet *E. didelta* var. *bengalicum* byla zjištěna přítomnost dvou centrálních pórů (Wei, 1991, Pl. I, Fig. 4).

Krásivka *E. didelta* (SEM od South, 1984, Fig. 2) se podobala linii A, morfě *E. didelta*. Mikrofotografie ze SEM *E. humerosum* a *E. humerosum* var. *affine* (Anissimova & Terlova, 2015, Рис.2, Fig. 2-3) se podobaly podskupině *affine-humerosum*, která byla původně určená jako *E. humerosum* var. *affine*.

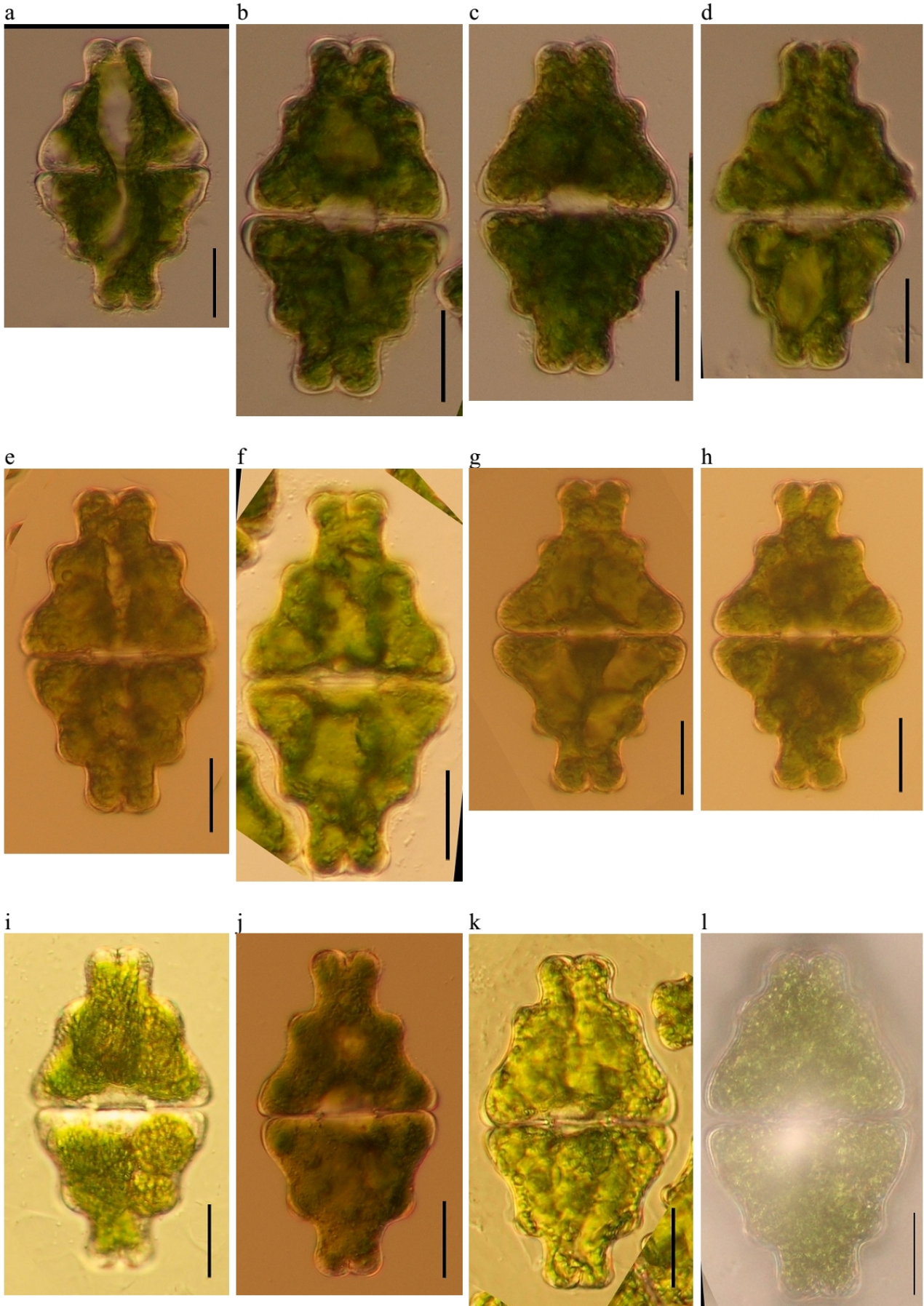
Tab. 4.1. Porovnání tvaru a rozměrů buněk jednotlivých linií.

	<i>tvar bazálního laloku</i>	<i>tvar polárního laloku</i>
linie A	nepatrné rozdvojení, častěji u starších buněk	vyšší variabilita
linie B	nerozdvojen	áčkový tvar se širokou základnou
linie C	U <i>E. humerosum</i> byly rozdvojené; u <i>E. didelta</i> byly výrazně větší než ostatní laloky	Převažovalo distální rozšíření, u morfotypu <i>E. humerosum</i> připomínal lalok tvar kladiva nebo zátky od karafy

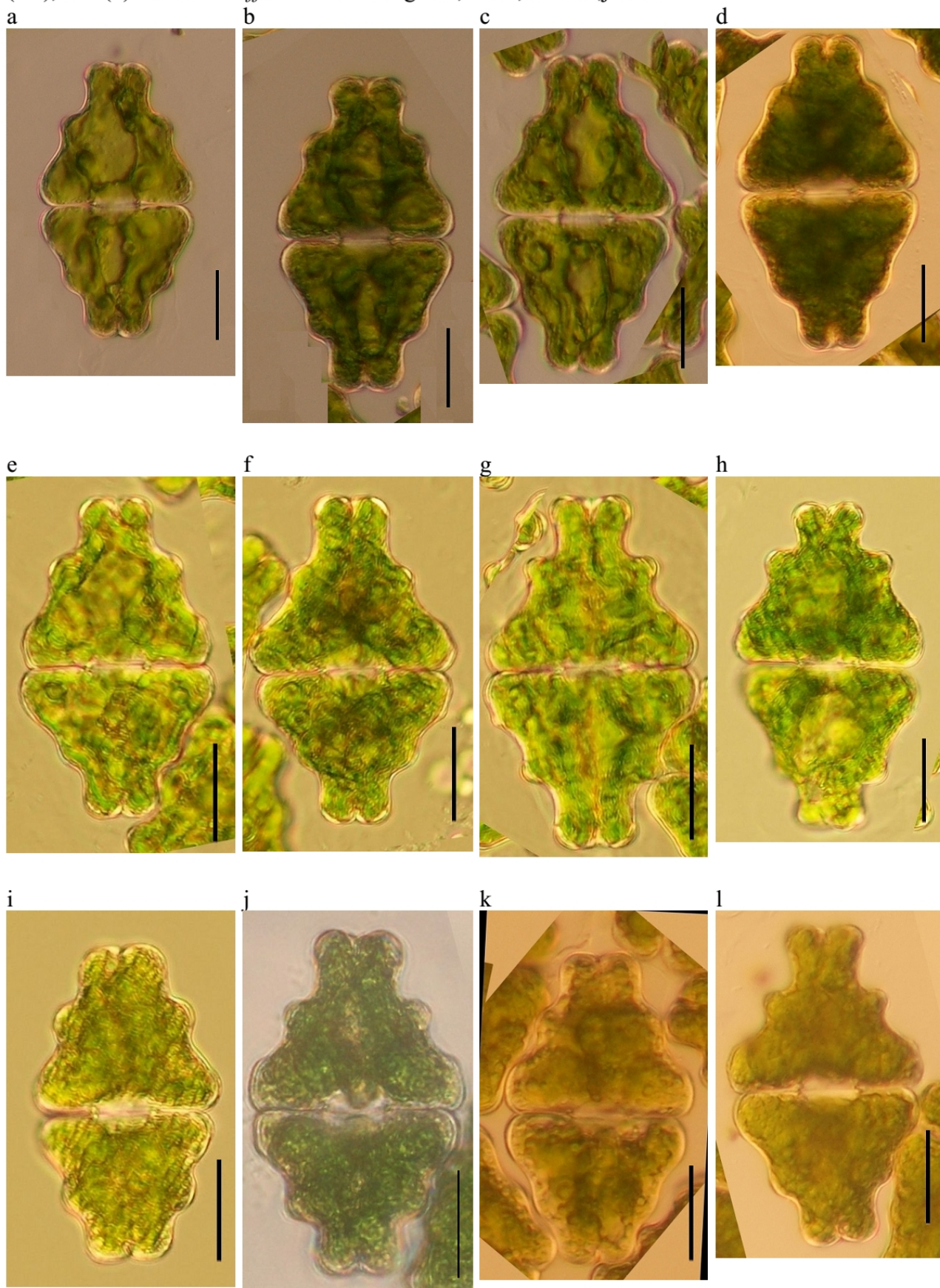
Tab. 4.2. Vzorkování teček v ultrastruktuře buněčné stěny.

Linie (kmen)	<i>Okolo centrálního póru</i>	<i>Okolo centrálních hrbolků</i>	<i>Okolo polárního laloku</i>	<i>Okolo ostatních laloků a hrbolků</i>
A (K61)	-	+	+, méně výrazné	+, méně výrazné
B (K23)	-	-	+, méně výrazné	+, méně výrazné
C (K8)	-	-	-	-

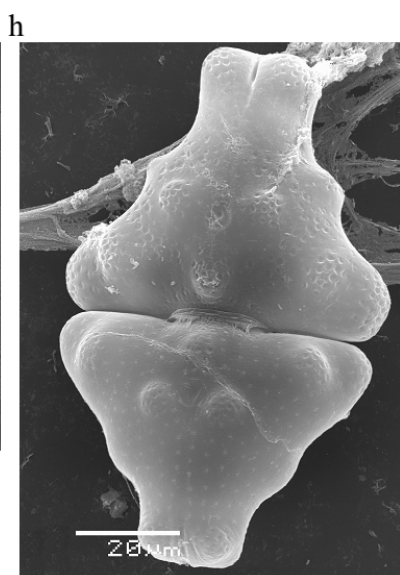
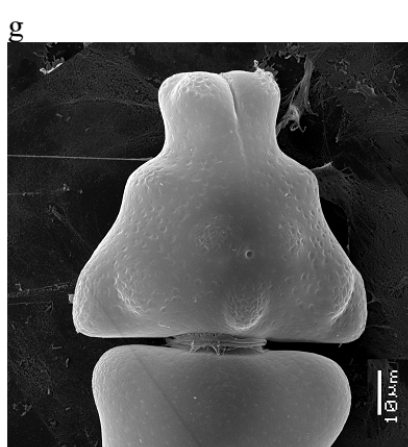
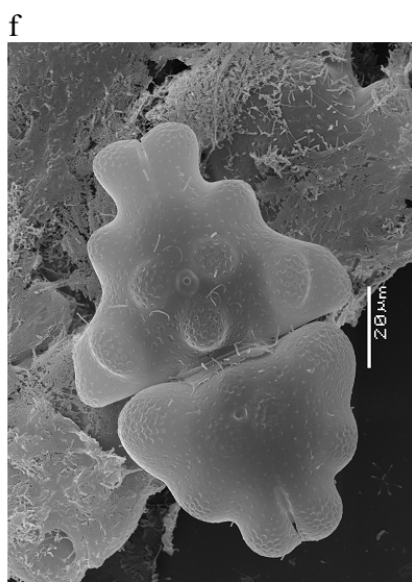
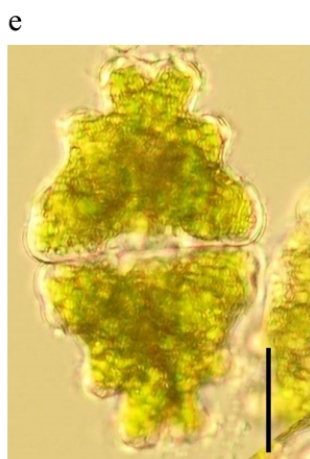
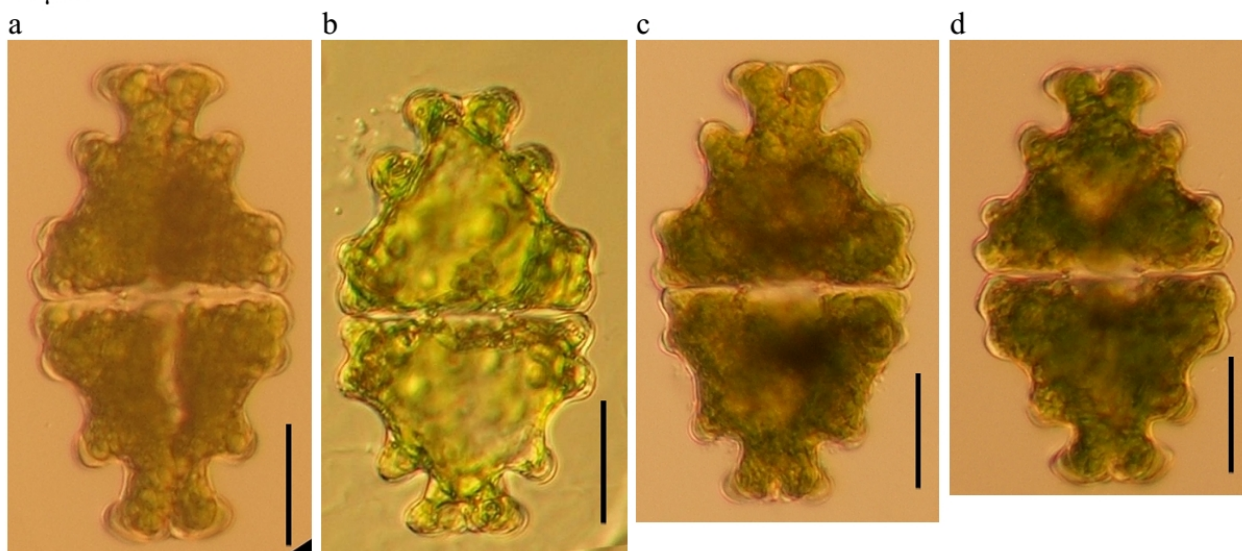
Obr. tab. I - Linie A, měřítko 30 μ m: kmeny a-k: *Euastrum humerosum*, a – K1, b-d – K3, e – K55, f-K53, g-h – K61, i – j – K14, k – K15, l – *E. didelta* (K4). a-k: zvětšeno: 200x; l: zvětšeno 400x.



Obr. tab. II. Linie B – zvětšení 200x, měřítko 30 μm . Zobrazeny jsou mikrofotografie kmenů K7 (a-c), K23(d). Linie C – *affine* – *didelta* e-g: K8, h-K9, i – E12,j-l: K57



Obr. tab. III. Linie C - *affine-humerosum* : a – K56, b – K28, c – K27, d – K32, e- E9. Fotografie ze SEM: f - linie A – kmen K61, g - linie B - kmen K23, h - linie C – kmen K8. Měřítka pro a-e: 30 μ m.



4.3 Metrické analýzy a geometrická morfometrika

4.3.1 Metrické analýzy

Metrické analýzy byly zjištěny z rozměrů semicely (délky, Ds; šířky, Ss; isthmu, I; polárního laloku, Pl; isthmu polárního laloku, Ipl - tzv. šířky krku) a poměrů: 2Ds/Ss, Ds/Ss, Ds/I, Ds/Pl, Ds/Ipl, Pl/Ipl (viz tab. 4.3). Vztah mezi metrickými hodnotami tří molekulárních linií vyšel relativně diferencovaný (graf 4.1). Hodnoty délky a šířky semicely se částečně překrývaly. Největší buňky byly z linie A, a nejmenší z linie C. Kmen E12 byl ze všech nejmenší a rozmezí délky u linie C byl tak větší. Nejdůležitější hodnoty, pro určení řas do linií, byly rozměry délky a šířky semicely (viz grafy pro jednotlivé kmeny, graf 4.3-4.4). Kmeny linie C měly nejužší šířku krku (Ipl, viz tab. 4.3), ale zároveň měly podobnou šířku polárního laloku jako ostatní linie. Rozměry polárního laloku v linii C se lišily oproti šířce krku 1-2 μm u morfotypu *E. didelta*, ale u morfotypu *E. humerosum* byl dokonce rozdíl 10-15 μm , a krk byl u skupiny *affine-humerosum* nejužší (viz tab. 8.6).

Měřením semicel byly získány signifikantně oddělené 3 linie, kde šířka byla závislou proměnnou na délce semicely (viz graf 4.2), Bonferroniho korelovaná p-hodnota: $p < 10^{-12}$. Wilksova lambda pro 3 skupiny (linie A, B, C) vyšla 0,21. **Nevysvětlená variabilita** byla pro 3 skupiny 21%. Metrické hodnoty (Pl, Ipl; poměry Ds/Pl, Ds/Ipl a Pl/Ipl, viz tab. 8.7) vysvětlily asi 19% variability (bez nich by bylo vysvětleno 41, 25%). Kmeny se navzájem lišily svou délkou i šířkou. Kmen K61 byl signifikantně odlišný svými rozměry od všech ostatních.

Porovnání s literárními záznamy rozměrů

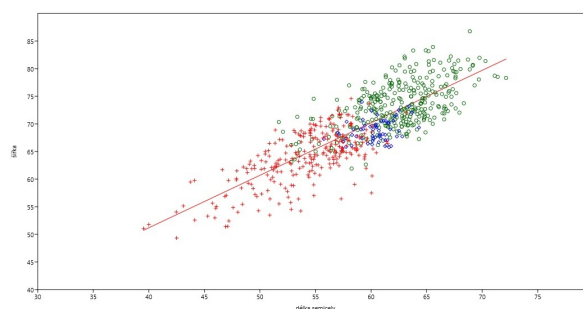
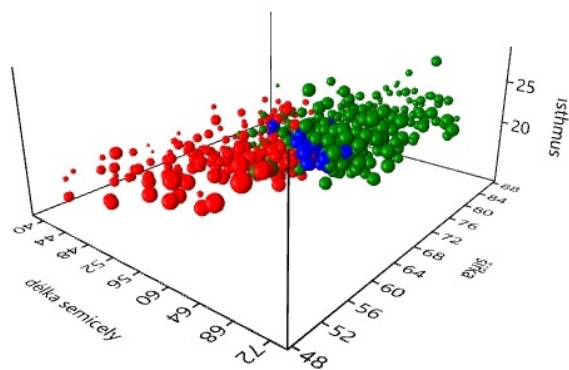
Zjištěné rozměry u molekulárních trnG linií byly porovnány s rozměry uvedenými v literatuře. U rozměru Ds (délka semicely) se porovnávala poloviční hodnota délky buňky z literatury. Byly uvedeny obvyklé hodnoty, a méně časté v kratším/delším nebo užším/širším rozmezí, které byly v tab. 1.1 uvedené v závorkách, neboli hodnoty mezi obvyklým rozmezím a krajními hodnotami.

Při porovnání rozmezí hodnot délky semicely morfotypu *Euastrum humerosum* (Růžička, 1981; s obvyklými hodnotami 60-70 μm), sem patřila většina kmenů z linie A, do kratšího rozmezí (47,5-60) patřily kmeny K2, K3, linie B a C. Do šířky (tohoto morfotypu ((55)65-75(96) μm) se řadily linie A, B a kmeny K56 a K9. Do širšího rozmezí (75-96 μm) patřily kmeny K1, K4, K55, K61. Do užšího rozmezí (55-65 μm) byly zařazeny všechny kmeny z linie C kromě kmenu E12.

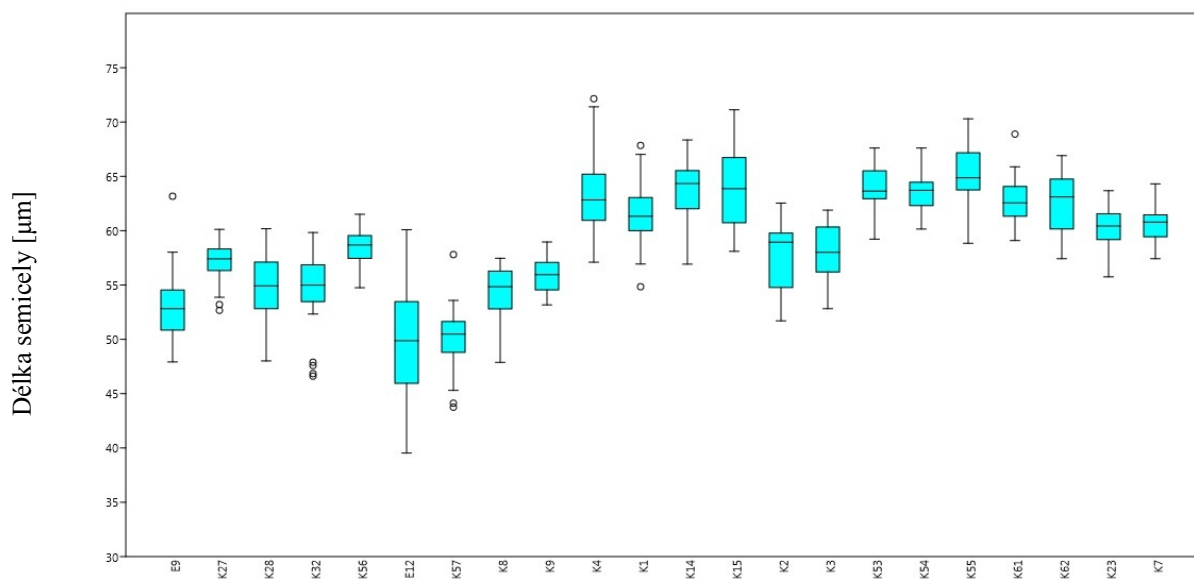
Tab. 4.3. Hodnoty měření pro 3 skupiny; v závorce jsou uvedena maxima a minima, nejčastější hodnoty jsou uvedeny v rozmezí mezi 10. a 90. percentilem; Ds – délka semicely, Ss – šířka semicely.

	<i>Délka semicely</i>	<i>Šířka semicely</i>	<i>Isthmus</i>
<i>Linie A (humerosum)</i>	(51,7)57,65-66,91(72,15)	(61,91)67,72-79,47(86,77)	(15,34)- 18,06-23,08-(28,38)
<i>Linie B (scandinave)</i>	(55,75)57,72-62,5(64,31)	(65,56)66,08-71,65(73,99)	(17,63)- 18,36- 20,79-(22,25)
<i>Linie C (affine)</i>	(39,53)48,42-58,68(63,17)	(49,34)56,72-69,73(74,57)	(13,07)- 16,64-20,99 -(23,81)
	<i>Polární lalok</i>	<i>Isthmus polárního.laloku</i>	<i>2Ds/Ss</i>
<i>Linie A (humerosum)</i>	(23,47)- 27,01-32,28 -(35,47)	(22,47) -25,13-30,75- (37,39)	(1,47) - 1,59-1,82 - (1,91)
<i>Linie B (scandinave)</i>	(26,61)- 27,64-30,09 -(30,51)	(25,93) -27,63-30,47- (33,21)	(1,6) - 1,67-1,84 - (1,87)
<i>Linie C (affine)</i>	(19,23)- 24,23-33,27 -(37,4)	(16,17)-19,39-26,18 - (30,34)	(1,47) - 1,57-1,8 - (2,09)

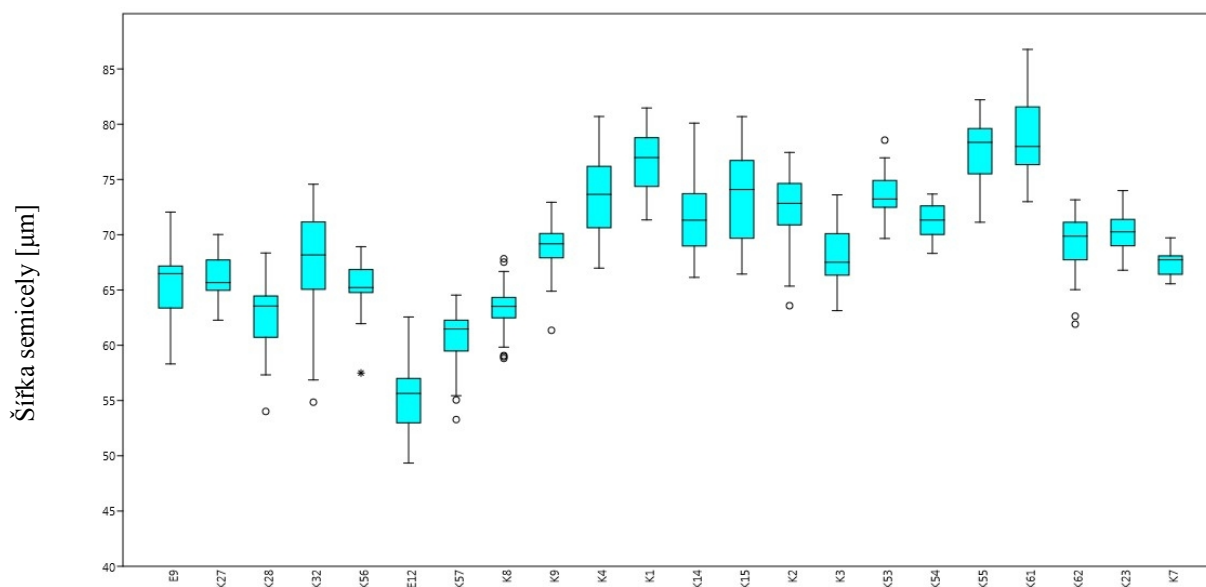
Graf 4.1. 3D graf závislosti hodnot rozměrů semicely **Graf 4.2.** Lineární model závislosti šířky na délce v μm (délky a šířky semicely, a jejím isthmem) pro linie semicely pro 3 skupiny. Model: $y = 0,95 + 13,18 x$, kde x je A, B, a C. Legenda: zeleně – linie A, modře – linie B, délka semicely, y je šířka (semicely). Statistika; $r = 0,819$; červeně – linie C. $p = 6,926E^{-161}$. Legenda viz graf 4.1.



Graf 4.3. Rozmezí délek semicely u zkoumaných kmenů.



Graf 4.4. Rozmezí šířek semicely u zkoumaných kmenů.



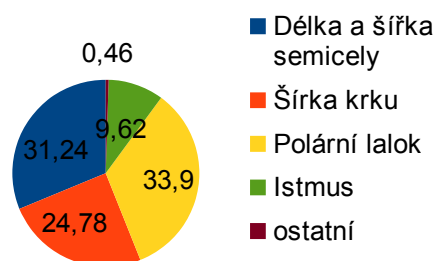
Do rozmezí hodnot morfotypu *E. humerosum* var. *affine* (Růžička, 1981) byly zařazeny podle délky (32)50-65(80) μm téměř všechny kmeny, do kratšího rozmezí (40-50 μm) byly zařazeny kmeny E12 a K57. Podle šířky byly zařazeny kmeny linie C, i) do užšího rozmezí (32-55 μm) kmen E12 a ii) do širšího rozmezí (65-80 μm) kmeny E9, K27, K32, K56, K9 společně s liniemi A a B.

Do morfotypu *E. didelta* byly zařazeny kmeny podle hodnot Růžičky (1981) víceméně stejné jako u *E. humerosum*, ale do delšího rozmezí nebyly zařazeny žádné. Podle šířky tam patřily téměř všechny kmeny kromě E12.

Vícerozměrné metody pro měření

V PCA analýze hodnot měření a poměrů bylo získáno 11 nenulových PC os. První PC osa zobrazila 31,24 % z celkové variability. Vysvětlila největší rozdíl v rozměrech semicely (délce, Ds a šířce, Ss). V kladné části osy byla linie A s linií B, a v zápornějších hodnotách byla linie C. Linie se navzájem překrývaly – (viz graf 4.6). Druhá PC osa zobrazila 24,78 % z celkové variability a podle výše zmíněného grafu zobrazovala Isthmus polárního laloku (Ipl). Třetí a čtvrtá PC osa zobrazila 21,2 % a 12,7 % z celkové variability.

Vysvětlovaly společně, alespoň částečně rozdíl v polárním laloku (Pl, 33,9 %). Pátá PC osa zobrazovala 9,62 % variability a vysvětlovala rozdíl v isthmu. Procentuální zastoupení variability rozměrů zobrazených PC osami je v grafu 4.5.



Graf 4.5 Variabilita metrických hodnot pro 3 skupiny

První CV osa rozdělila linii C od dvou dalších (A,B) z 95,72 %, především v délce, šířce semicely a krku (Ipl), a druhá CV osa rozdělila z 4,28 %. LDA správně diskriminovala 3 skupiny z **85,15** %, kdy se zaměňovaly buňky z linie A za linií B (20,3 %, 67 buněk) nebo s linií C (2,42 %, 8 buněk). Linie B se zaměňovala s linií A z 10 %, u 6 bb. Linie C se zaměňovala s linií A z 4,07 % (11buněk) nebo s linií B (1,48 %, 4bb). Nejvíce se zaměňovaly linie A a B (viz graf 4.6).

4.3.2 Geometrická morfometrika (GM)

Geometrická morfometrika odlišila signifikantně tři trnG linie. Pro zkoumání geometrickou morfometrikou bylo použito 22 kmenů, 18 landmarků a 18 semilandmarků. Byly zahrnuty rozměry semicely (Ds, Ss, I, Pl, Ipl, viz obr. 3.1) a poměry rozměrů 2Ds/Ss, Ds/Ss, Ds/I, Ds/Pl, Ds/Ipl, Pl/Ipl.

Diskriminační metodou (LDA geometricko-morfometrických dat, GM dat) byly skupiny odlišeny z cca **88,79 %** a použitím metrických hodnot (rozměrů a poměrů, GM+MP) byly skupiny rozlišeny z cca **95,3 %** (95,15 % pouze s rozměry) s 9% nevysvětlenou variabilitou (Wilksova lambda 0,09) a signifikancí $p < 10^{-16}$ (viz tab. 8.8, v příloze). Lepší výsledky z LDA tvaru (dat geometrické morfometricky) byly dosaženy rozdělením kmenů na dva subsety podle vroubkování bazálního laloku: *humerosum* (s) a *didelta* (bez; viz obr. 4.1). V subsetu ***humerosum*** byly podskupiny *humerosum-humerosum* a *affine-humerosum*, v subsetu ***didelta*** byly podskupiny: *humerosum-didelta*, *scandinave*, *affine-didelta* (viz tab. 8.9- 8.11, v příloze).

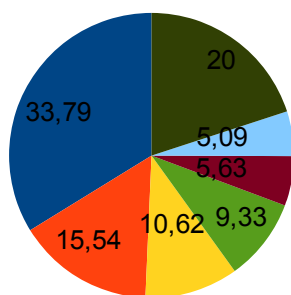
Výsledky pro GM byly bez rozdělení na subsety (v 5 podskupinách) byly: LDA **86,67 %**, Wilksova lambda 0,01807 a signifikance na úrovni $p < 10^{-5}$. Výsledky pro GM s měřením byly: LDA 93,03 %, Wilksova lambda 0,0063 (nevysvětlená variabilita 0,63%) se signifikancí $p < 10^{-5}$ (tab. 8.9- 8.11, v příloze). LDA výsledky, ale vycházely relativně horší příčinou kmenu K14, který přecházel v oba morfotypy *E. didelta*/*E. humerosum*, lišící se vroubkováním bazálního laloku.

Graf 4.7 Procentuální zastoupení tvarových odlišností v PCA osách.

Vzhled: hum – morfotyp *E. humerosum*, did – morfotyp *E. didelta*

Variabilita geometricko-morfometrických dat (%)

- 1.PC: hum/did,délka
- 2. PC: šířka krku
- 3. PC: vykrojení laloků
- 4. PC: pravidelnost laloků
- 5. PC: náklon buňky
- ostatní PC osy (6-68)
- nevysvětlená variabilita



Rozklad variability

Nesymetrisovanou analýzou PCA geometricko-morfometrických dat (relativních warpů, neboli po superimpozici landmarků; GPA) bylo získáno 68 nenulových PC os. První PC osa zobrazila

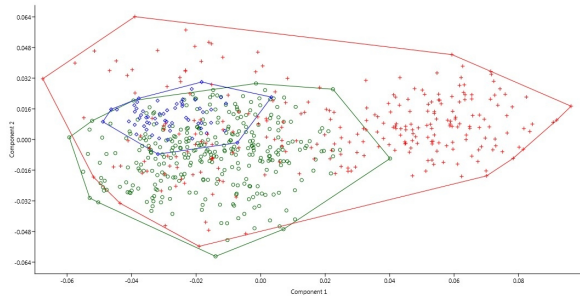
33,79 % z celkové variability, v záporné části osy měly buňky zářezy mělké (jako morfotyp *E. didelta*) a v kladné části naopak zářezy hlubší a krátký krk (jako morfotyp *E. humerosum*). Druhá PC osa zobrazila 15,54 % z celkové variability, v záporné části zářezy mělké, v kladné části hluboké. Třetí PC osa zobrazila 10,62 % z celkové variability, v záporné části zářezy hluboké a delší krk, v kladné byly zářezy mělké. Čtvrtá PC osa zobrazila 9,33 % z celkové variability, v záporné části osy byly buňky rovnoměrně laločnaté a v kladné části byl široký bazální a úzký polární lalok, celkový tvar buňky byl trojúhelníkový. Pátá PC osa zobrazila 5,63 % variability (viz tab. 8.12, v příloze). Tyto hodnoty platí jak pro tři skupiny (grafy 4.7, 4.8), tak pro pět (viz tab 8.9-8.10). Diskriminace tří skupin vyšla pro GM data z 88,79%, se signifikancí $p < 10^{-14}$ a nevysvětlenou variabilitou 20 % (Wilksova lambda 0,20, tab. 8.8). S přidáním rozměrů a poměrů vyšla diskriminace lépe z 95,3 %, se signifikancí $p < 10^{-16}$ a nevysvětlenou variabilitou 9 % (Wilksova lambda 0,09). Rozdělením na dva subsety *humerosum* a *didelta* podle vroubkování, (viz obr. 4.1, tab. 8.11) jsme získali velice dobré rozdělení, v subsetu *humerosum* dokonce 100% rozdělení mezi liniemi A a C, v subsetu *didelta* jsme získali pouze 97% spolehlivost diskriminace.

U tzv. *Confusion matrix* geometrická morfometrika pomohla rozlišit linii A a její morfy podobající se jiným liniím. Buňky linie A podobající se linii B, připodobňovaly linii i rozměry, jak je patrné z tab. 4.5. Nejlépe byly odlišeny linie A a C pomocí geometrické morfometrie a měření (GM+MP), a nejhůře linie A a B, podobně jak je vidět na grafu PCA a CVA (graf 4.6). Rozdělením skupin na dva základní morfotypy *E. humerosum/didelta* se podařilo rozlišit podskupinu *affine-humerosum* od obou linií A a B se 100% spolehlivostí, jak je vidět i v tab. 8.9 a 8.11, v příloze.

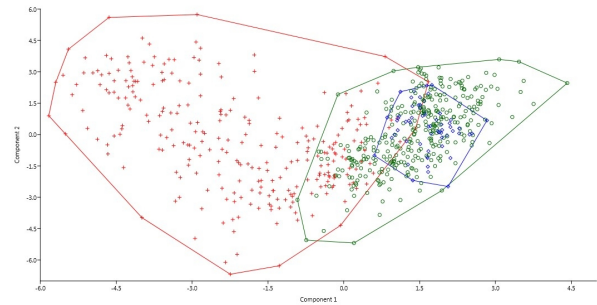
Linie se podle tvaru zaměňovaly. Výjimečně některé kmeny měly 100% integritu. Nejvíce polymorfní kmeny byly K14, K4, K8 (viz graf 4.9). Kmeny s relativně jednotným tvarem, kde se max. 2 buňky podobaly jiné skupině: K15, K23, K27, K28, K32, K56, K62.

Graf 4.8. A-B: PCA pro 3 skupiny – graf rozkladu variability GM dat mezi skupinami; C-D: CVA – rozdělení 3 skupin. Legenda: + affine; O humerosum; ◇ scandinave. GM – geometrická morfometrika

A: GM

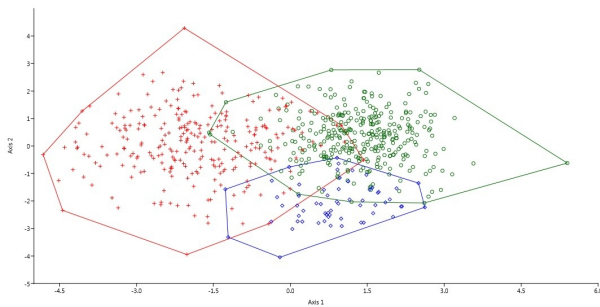


B: GM s měřením a poměry

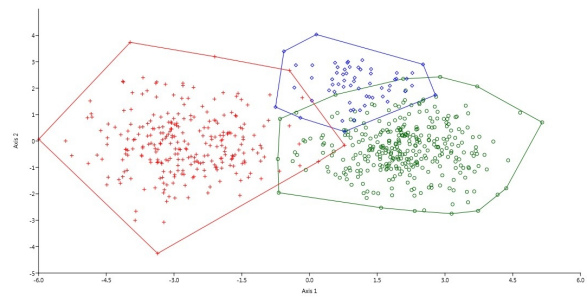


C-D: CVA grafy pro 3 skupiny.

C: GM

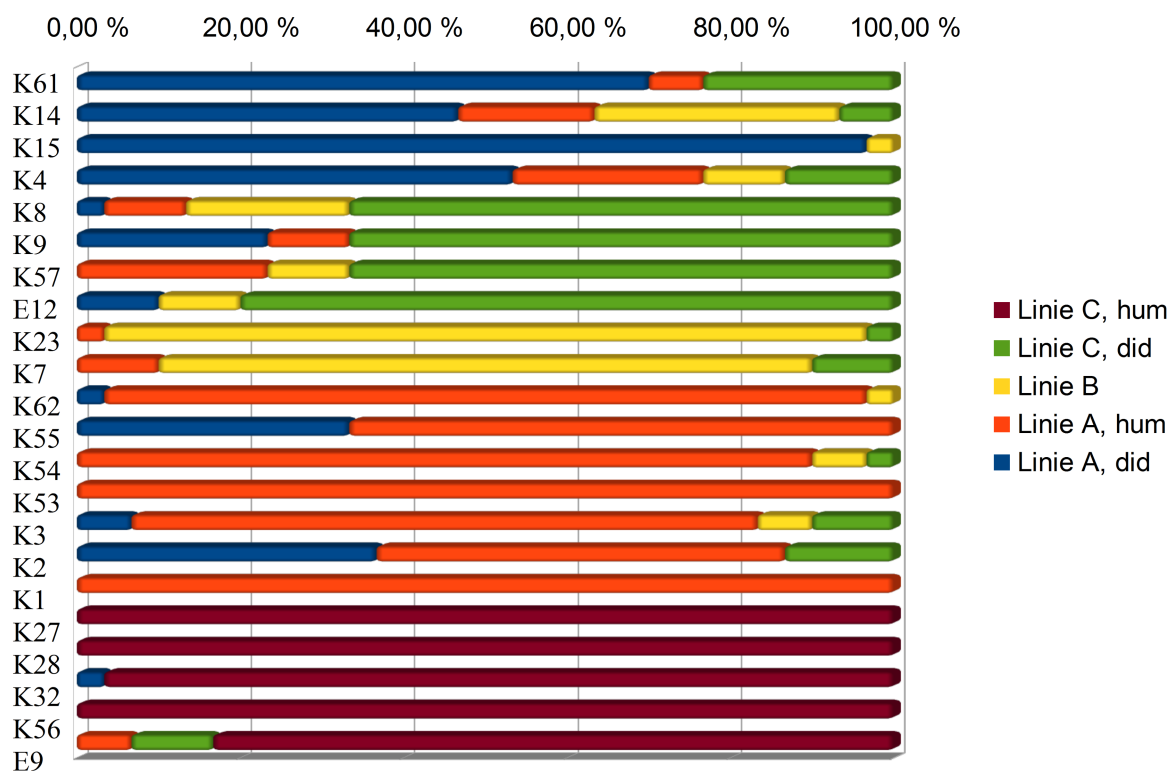


D: GM s měřením a poměry



Tab. 4.5. Procentuální zastoupení správně diskriminovaných molekulárních skupin mezi sebou, v horním trojúhelníku pouze s geometricko-morfometrickými daty, v dolním trojúhelníku tato data spojené s měřením.

	<i>humerosum</i> , linie A	<i>scandinave</i> , linie B	<i>affine</i> , linie C
<i>humerosum</i> , linie A	-	91,54	95,16
<i>scandinave</i> , linie B	93,59	-	95,15
<i>affine</i> , linie C	99,5	99,1	-



Graf 4.9. LDA pěti podskupin. Procentuální zastoupení klasifikovaných kmenů lineární diskriminační analýzou geometricko-morfometrických dat v programu PAST 3.20, graf vytvořený v LibreOffice, z archivu autora. hum – morfotyp *Euastrum humerosum*, did – morfotyp *E. didelta*.

LDA z literatury

Diskriminační analýzou bylo potvrzeno, že by obrázky z literatury mohly patřit do následujících skupin.

Do podskupiny *humerosum-didelta* (Linie A, morfotyp *E. didelta*, tab. 8.13, skupina 1) byly, podle tvaru (dat geometrické morfometrie, GM dat) i spojením s poměry (GM, GM+P), zařazeni pouze dva zástupci: *Euastrum didelta* (South, 1984, Fig. 7b; z Newfoundlandu v Kanadě) a *E.*

didelta/ampullaceum (Ducellier, 1915, s. 91, Fig. 27; ze Savojských Alp ve Francii). Ikonotyp *E. didelta* Ralfs (1848, Tab. XIV, Fig. 1a; z Britských oo.) se zařadil pouze geometrickou morfometrikou s měřením (GM+MP). Buňky podskupiny *humerosum-didelta* byly ikonotypu dost podobné, ale byly změřeny kratší než byly uvedené v literatuře.

Do podskupiny *humerosum-humerosum* (Linie A, tab. 8.13, skupina 2) byli zařazeni zástupci jak podle tvaru (GM dat), tak spojením s poměry (GM, GM+P): *E. didelta* (West & West, 1905, Pl. XXXV, Fig. 4), *E. humerosum* (Ells, 1998; Škaloud, 2006, z Postávky na Slovensku; Fromm, 2014, Abb. 135, z Berlína v Německu), kde u posledního *E. humerosum* souhlasilo i měření (GM+MP). Nicméně *E. didelta* (West & West, 1905) byla podle záznamů delší než linie A; a varieta *E. humerosum* var. *parralelum* (Krieger, 1937, Taf. 69, Fig. 9) byla zařazená pouze geometrickou morfometrikou (GM), protože byla v literatuře uvedená bez rozměrů.

Do skupiny *scandinave* (linie B, tab. 8.13, skupina 3) LDA GM dat zařadila společně se svými poměry včetně rozměrů zástupce (GM, GM+MP, GM+P): *E. didelta* a *E. didelta fa latior* (South, 1984, Fig. 4a, 8c, z Newfoundlandu v Kanadě), *E. didelta fa val Piora* (Ducellier, 1915, Pl. I, Fig. 2, ze Savojských Alp ve Francii) a *E. humerosum* (Fromm, 2014, Abb. 133, z Berlína v Německu).

Do podskupiny *affine-didelta* (linie C, tab. 8.13, skupina 4) byly podle, jak LDA GM dat, tak GM s měřením (GM, GM+MP), zařazeni zástupci: *E. didelta* (Ducellier, 1915, s. 89, Fig. 21a, ze Savojských Alp ve Francii; Ducellier, 1918, s. 127, Fig. 112 ze Švýcarska) a *E. didelta* var. *inermiforme* Nob (Ducellier, 1915, s. 86, Fig. 14; ze Savojských Alp ve Francii). Podle tvaru, i s kombinací s poměry (GM, GM+P) byli zařazeni zástupci: *E. didelta* (Lenzenweger, 2002, Taf. II, Fig. 9) a *E. sinuosum* (West & West, 1905, Pl. XXXVI, Fig. 1), u kterého nebyly patrné centrální póry, pouze pět hrbolků, které byly typické i pro druhový komplex *E. humerosum/didelta*, ale krásivka byla kratší než linie C.

Do podskupiny *affine-humerosum* (Linie C, tab. 8.13, skupina 5) byl, podle LDA GM dat a podpořené i GM s měřením (GM, GM+MP), zařazen pouze zástupce: *E. humerosum* (Ducellier, 1918, s. 133, Fig. 121; ze Švýcarska). Jiné *E. affine* si byly podobné a shodovaly se měřením (GM+MP): *E. affine* (Brown, 1930, Pl. XIII, Fig. 52, z Floridy, USA; Lenzenweger, 1976, Taf. 1, Fig. 6; z Finska, Joensuu). Další zástupci podobní této skupině se shodovaly s LDA GM dat s poměry a GM s měřením (GM+P, GM+MP): *E. humerosum* (Mout, 2012, z Nizozemí) a *E. humerosum* var. *affine* (Coesel & Meesters 2007, Pl. 42, Fig. 2, z Nizozemí). Ikonotyp *E. affine* (Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig. 3a, z Britských oo., v tab. 8.13 neuveden) se geometrickou morfometrikou zařadil pouze při nedefinování skupiny, a hodnotami z textu se shodovaly s linií C. Zástupci *E. humerosum* (Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig. 2a, z Britských oo.; Ducellier, 1918, s. 92, Fig.

63 B, ze Švýcarska, Col du Grimsel) a *E. humerosum* var. *affine* (Lenzenweger, 1996, Taf. 9, Fig.13, z Rakouska) se zařadili jen spojením GM dat s měřením (GM+MP).

Odhalili jsme, že existují zástupci *E. didelta* s delšími buňkami, než jsme měli v datasetu (viz tab. 1.1, Ralfs, 1848; West & West, 1905). Delší krásivky než naše linie byli někteří zástupci *E. humerosum* (104-160 μ m, Krieger, 1937; 148 μ m, Coesel & Meesters, 2007, Pl. 41, Fig. 4; 190 μ m, Wagner, 2014) a *E. humerosum* var. *affine* (160 μ m, Scipion, 2017, podskupina *affine-didelta*, tab. 8.13). Nepřekvapivě byli delší zástupci variet *Euastrum didelta*: *E. didelta* var. *truncatum* (do 148 μ m, Krieger, 1937), *E. didelta* var. *quadriceps* (144 μ m, de Oliveira et al., 2011, s. 65, Fig. 12) nebo *E. didelta* var. *bengalicum* (do 160 μ m, Krieger, 1937). Delší byly zaznamenány druhy *E. pinnatum* (130-153 μ m, West & West, 1905) nebo *E. oblongum* (144-205 μ m, West & West, 1905). Stejně dlouhý zástupce jako zkoumaný druhový komplex byla krásivka *E. didelta* var. *denticulatum* (110 μ m, Růžička, 1981, Taf. 62, Fig. 8).

Kratší zástupci bývali v příbuzných druzích nebo varietách studovaného druhového komplexu: *E. ansatum* var. *dideltiforme* (73-87 μ m, Prescott & Scott, 1945), *E. sinuosum* (56-78 μ m, West & West, 1905) nebo *E. didelta* var. *bengalicum* fa *minus* (90 μ m, Scott & Prescott, 1958) a užší zástupci byli *E. cuneatum* (96 – 128 μ m, West & West, 1905), *E. didelta* var. *cuneatiforme* (97 x 39 μ m, Scott & Prescott, 1961).

Geografie

Objevili jsme, že se geograficky střetávají linie druhového komplexu *E. humerosum/didelta* v Severní Evropě (v Norsku, viz obr. 4.3), a podle LDA geometricko-morfometrických dat i ve střední Evropě (v Savojských Alpách ve Francii) a v Kanadě (viz tab. 8.13).

Naše nálezy druhového komplexu *E. humerosum/didelta* ze střední Evropy se podobaly krásivkám z tamější literatury. Biogeograficky souhlasily nálezy morfotypů: *E. didelta* a *E. humerosum* patřící do linie A (Fromm, 2014, z Německa). LDA výsledky nasvědčují, že byly krásivky z literatury s morfotypem *E. didelta* zařazené do všech tří linií ve Švýcarských a Francouzských (Savojských) Alpách na západním břehu Rýna (Ducellier, 1915, 1918) a v Rakouských Alpách (na východním břehu Rýna) se zařadily krásivky z literatury jen do linie A (*E. didelta*, Lenzenweger, 1967, Taf. VIII, Fig. 2). Ve Francii se pravděpodobně vyskytovala krásivka *E. humerosum* var. *affine* z oblasti Belledone, podle LDA GM dat zařazená do linie A (Scipion, 2017), a *E. didelta* z oblasti Vosges, západně od Alp, do linie C (*E. didelta*, André, 2017). Byly na stejném západním břehu Rýna.

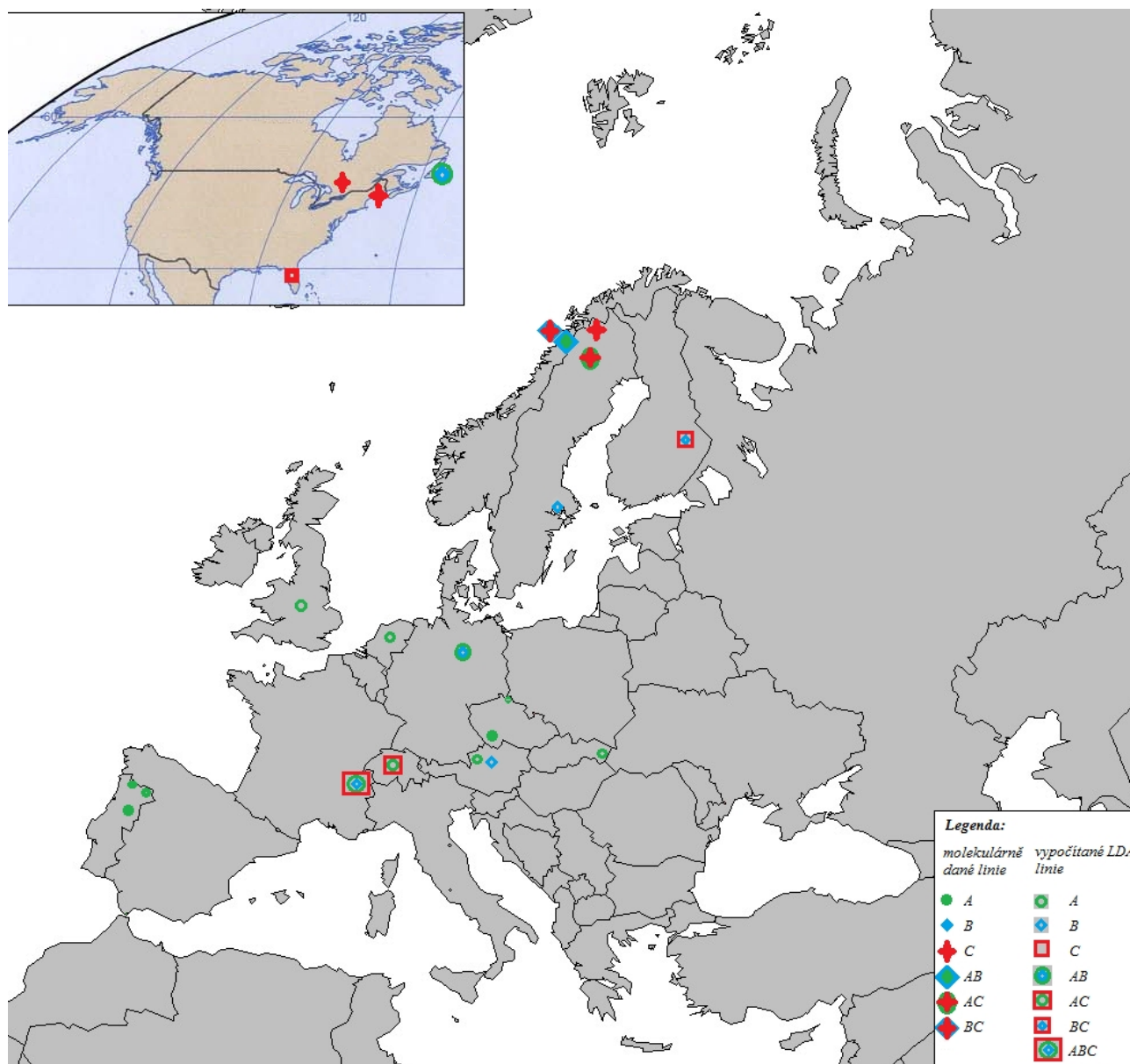
V Čechách byl výskyt *E. didelta* potvrzen na konci 19 století v severních Čechách v oblasti Šluknova, Liberce a Krkonoš (s uvedenými rozměry 70-140 x 45-70 μ m, Hansgirg, 1886), nicméně

tyto hodnoty mohou patřit všem třem liniím. O sto let později byl potvrzený výskyt v severních Čechách (v Jizerských horách; Štěpánková, 2008) a také i jinde v ČR *E. humerosum* a *E. humerosum* var. *affine* (Šťastný, 2010; v horách Jeseníky, Štěpánková et al. 2012). Jednalo se o všechny základní morfotypy.

Ve Švédsku a Finsku se podařilo najít shodu s liniemi A a C: krásivku *E. humerosum* var. *parralelum* (Krieger, 1937, ze Švédska), která by teoreticky patřila do linie A a *E. affine* (Lenzenweger, 1976, z Finska) by patřila do linie C.

Teoretický výskyt linie C je možný po celé Evropě (viz tab. 8.13; Ralfs, 1848; Krieger, 1937; Coesel & Meesters, 2007; Fromm, 2014) nebo v Severní Americe (Brown, 1930).

Obr.4.3 Mapa zkoumaných krásivek, legenda v ilustraci, LDA vypočítané linie krásivek z literatury (viz tab. 8.13; upraveno CIA, 2001; Google & INEGI, 2008).



5. Diskuse

V této diplomové práci jsme zjišťovali diverzitu druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta*. Analyzovali jsme genetickou diverzitu (5.1) a pozorovali krásivky světelným a skenovacím elektronovým mikroskopem (5.2), evoluční linie jsme testovali diskriminací dat z měření a geometrické morfometriky (5.3), a zkusili jsme tato data použít v LDA s krásivkami z literatury a teoreticky je zařadit do linií (5.4). Shrnuli jsme znaky v taxonomickém shrnutí (5.5) a nakonec jsme se zamysleli nad možným dalším studiem (5.6).

5.1 Fylogenetické analýzy

Studie molekulárního markeru trnG byly často spojené s kvantitativními metodami geometrické morfometriky nebo byly testovány s dalšími molekulárními markery, aby se vyhodnotila monofylie vůči ostatním druhům (Neustupa et al., 2010, 2011b; Nemjová et al., 2011; Šťastný et al., 2013).

V našem případě byla testována diverzita druhového komplexu, jako outgroup bylo použito *Euastrum everettense*, vůči němuž byly testované krásivky monofyletické. Zkusili jsme použít dostupné sekvence z genové banky (NCBI, 2017), které byly pouze molekulárních markerů SSU nebo rbcL. *E. affine* se shodovalo v markeru SSU s *E. pinnatum* i *E. oblongum*. V této práci jsme používali SSU intron, který pro porovnání s těmito druhy nebyl dostatečný, protože byl na konci genu SSU a při vkládání sekvencí do genové databáze tyto variabilní části byly zřejmě vynechány. V databázi byly většinou jen parciální SSU, a jelikož je tento marker velice dlouhý, lze nalézt SSU intron pouze u sekvencí, kde je uvedeno SSU, ITS a LSU (18S rRNA, Internal Transcribed Spacer, 5,8S rRNA). Ale podle rbcL se druhy signifikantně lišily, krásivky si byly příbuzné (Gontcharov & Melkonian, 2008). Další testování přesahovalo zaměření diplomové práce.

Všechny tři morfotypy (*E. affine*, *E. pinnatum*, *E. oblongum*) jsou si velice podobné a lišily se pouze svým latelárním lalokem, a s větší složitostí se zvyšovala i velikost celé buňky (West & West, 1905). U našeho druhového komplexu naopak s větší složitostí polárního laloku se velikost buňky zmenšovala. V budoucnosti by se měla ověřit jejich fylogenetická příbuznost, hlavně mezi *E. humerosum/affine* a *E. pinnatum*, protože jejich buňky jsou velmi podobné. U *E. oblongum* pravděpodobně existují infraspecifické linie, jelikož existují dvě rozmezí rozměrů (West & West, 1905; Prescott & Scott, 1945).

Fylogenetickou analýzou trnG intronu jsme našli signifikantní rozdíl ve všech liniích (A, B a C), ale v SSU intronu už ne. Na rozdíl od SSU (intronu) je trnG (intron) plastidovým markerem s unikátním výskytem (Turmel et al., 2005). SSU je součástí ribozomální DNA v tisíci kopiích v jádře. Jelikož obecně dochází k mutacím v různých částech DNA (Sousa & Hey, 2013) je rozhodnutí, zda už jsou novými druhy nebo ne, složitější, protože u repetitivních kopií dochází

časem k homogenizaci (Liao, 1999), proto v repeticích probíhá speciace pomaleji a proto signifikantně odlišné linie v repetitivních markerech (SSU nebo LSU) jsou starší) a u unikátních markerů lze odlišit linie dříve. Proto se domníváme, že jsou zjištěné linie trnG mladé.

K homogenizaci repetitivních sekvencí je potřeba pohlavní rozmnožování s velkými počty jedinců v populaci a s vyšší ploidií (Hurst & Smith, 1998). Jelikož je u Desmidiaceae pohlavní rozmnožování vzácné (podobně jako u jiných spájivých řas; Starr, 1955; Blackburn & Tyler, 1981, 1987; Brook, 1981; Hoshaw & McCourt, 1988, Coesel & Meesters, 2007), je to asi z hlavních důvodů, proč u krásivek homogenizují repetitivní sekvence rDNA pomalu i když mají vysokou ploidií (King, 1960), a také asi proto, že jsme je nacházeli ve vzorcích s malým počtem jedinců.

Pro jejich případné testování bychom potřebovali klonovat SSU intron (Lodish et al., 2000; Schwarzott & Schübler, 2001) nebo použít i jiný rychle se měnící molekulární marker – např. ITS nebo naopak konzervovaný a pomalu se vyvíjející se gen pro protein cox III (gen pro jednotku cytochrom oxidázy, vyskytující se v mitochondrii; Hiesel et al., 1994; Hall et al., 2008). ITS byl u našeho druhového komplexu vyzkoušený, ale byl natolik mnohoznačný, asi tím že jeho genetické varianty nebyly sjednocené, proto nebyl ve výsledcích zmíněn.

Pro své výhody unikátního výskytu se trnG intron, podobně jako všechny introny, nepodléhá selekčnímu tlaku, a může se rychle měnit, se perfektně hodí na genetické vyhodnocení pseudokryptických druhů krásivek. Marker trnG se osvědčil nejen zde, ale i v jiné studii, kde koreloval s morfologickými druhy *Micrasterias rotata*, *M. apiculata* a pseudokryptickými liniemi *M. fimbriata* (Neustupa et al., 2011b). Byl kombinován i s jinými markery, protože se mj. zjišťovala i monofylie vůči ostatním druhům (s ITS, Neustupa et al. 2010; nebo s SSU, Nemjová et al., 2011). Při zkoumání druhů *Xanthidium* bylo použito více markerů (ITS, rbcL, trnG a cox III; Šťastný et al., 2013). Dokonce se fylogeneze trnG shodovala s fylogenezí cox III a rbcL krásivek *Pleurotaenium* (Škaloud et al., 2012a). Vyplývá z toho, že je pro krásivky fylogeneze trnG intronu celkem důvěryhodná. Tento marker koreluje se základní tvarovou specifitou, a je pravděpodobně spojený s některými odpovědnými geny pro tvar (krku) nebo velikost v úzké vazbě, podobně jako rbcL, taktéž chloroplastového původu. Tím, že u chloroplastu dochází málokdy k rekombinaci (Rédei, 2008), budou pravděpodobně ve vazbě všechny plastidové geny. Je otázka zda je spojený vývoj buňky i s vývojem chloroplastu.

ITS je marker pravděpodobně spojený s pohlavní specifitou (Denboh et al. 2001, 2003) a u převážně nepohlavně rozmnožujících krásivek, není jeho vývoj tak selektován, jako u ostatních, proto se pravděpodobně u našich „mladých“ linií vyskytovalo tolik variant markeru, že se překrývaly natolik, že nešly jednodušší sekvenací DNA (bez klonování markeru) ITS přečíst.

***E. humerosum* Ralfs a *E. affine* Ralfs jsou parafyletickými skupinami**

Fylogenetické linie (A, B a C, viz obr. 4.1) zjištěné na základě molekulárního markeru trnG u druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* se relativně dobře rozlišovaly svými rozměry (viz graf 4.1, tab. 4.3) a tvořily signifikantně rozdělené skupiny v kvantitativně analyzovaných datech z geometrické morfometriky (viz graf 4.8). Morfotyp *E. humerosum* Ralfs (1848, Tab. XIII, Fig. 2a) nebo *E. affine* Ralfs (1848, Tab. XIII, Fig. 3a) z britských ostrovů, tvořily parafyletické skupiny v linii C, v rámci podskupiny *affine-humerosum*.

Zástupci linie C, krásivky z podskupiny *affine-humerosum* byly zjištěné i v Norsku a Švédsku. Nicméně se podle literatury vyskytují také v Severní Americe, a po celé Evropě i když řasy podobné tomuto morfotypu byly popsány jako *E. affine* nebo *E. humerosum* var. *affine* (viz obr. 4.7; Brown, 1930; Croasdale & Grönblad, 1964, Lenzenweger, 1981, Růžička, 1981; Coesel & Meesters, 2007).

5.2 Morfologie buněk

U zkoumaných krásivek se objevovala morfologická plasticita, jak v liniích, tak někdy i v kmenech, přestože byly kmeny pěstovány za stejných podmínek. Rozdělili jsme kmeny do dvou hlavních morfotypů: *E. humerosum* s vroubkovaným bazálním lalokem a morfotypu *E. didelta*, s celokrajným bazálním lalokem (viz obr. 4.1; kap. 4.1.1.1). V liniích A a C byl alespoň jeden kmen, který měl, jak vroubkovaný, tak celokrajný bazální lalok a nebylo úplně jasné do jakého morfotypu patří. Některé buňky v kmenu musely mít smíšené formy, kde každá semicela vypadalo jako jiný morfotyp.

Smíšené formy *E. humerosum/didelta*, byly spatřeny již Ducellierem (1915, 1918). Archer (1875) si všiml dokonce křížení mezi *E. humerosum* x *E. didelta*, nebo se mohlo se jednat o morfologickou plasticitu, že pozoroval různé formy, kde *E. didelta* byla pravděpodobněji nedovyvinutou buňkou druhého morfotypu, než že by došlo k hybridizaci.

Jelikož Ralfs (1848) zobrazil původní druh *E. didelta* Ralfs, jak s celokrajným, tak vroubkovaným bazálním lalokem, jako typ *a*, a *b*; který později West & West (1905) rozdělili na dva druhy, mohli bychom díky zjištěné morfologické plasticitě v bazálním laloku tyto dva morfotypy zase sjednotit do jednoho druhu. Pro jistotu by se, ale měly nasbírat další kmeny v Evropě a znovu otestovat, zda jsou jednotným druhem.

Pozorovali jsme velice morfologicky variabilní kmeny, výjimečně s ustálenou formou, podobně jako Ducellier (1915), který místo kmenů pozoroval populace. Je možné, že u kmenů s jednou formou došlo ke genetickému driftu. Většina kmenů ze skupiny *affine-humerosum* měla ustálený tvar. U některých kmenů z linie A a B s max. 2 bb. (viz graf 4.9) měly asi recesivní geny, odlišné

od základního tvaru kmenu. Tyto hypotézy by se musely potvrdit křížením nebo environmentálními testy, což přesahovalo rozsah diplomové práce.

Některé kmeny se naopak podobaly jiné linii. Nejvíce patrné to bylo u linie B, kde ze dvou kmenů se jeden podobal linii A a druhý linii C. Pravděpodobné vysvětlení napodobování ostatním liniím, by byla zachovalá genetická variabilita původního druhu. Tyto formy, které se podobaly jiným liniím, Růžička (1981) nazýval jako hraniční formy, protože v těchto místech se druhy navzájem překrývaly, podobně jako u testů geometrické morfometriky (viz tab. 8.9, příloze).

Jeden z kmenů K61 linie A byl signifikantně odlišný svým širokým bazálním lalokem že je možná variabilní v jiném genu než je *trnG* a zůstala mu variabilita příbuzného *E. everettense* nebo jiné příbuzné široké krásivky.

Linie se lišily nejvíce v polárním laloku, podobně jako v jiné studii o *Micrasterias cruxmellitensis/M.radians* (Neustupa et al., 2011b).

5.2.1 SEM

Při porovnání mikrofotografií SEM u druhového komplexu *Euastum humerosum/didelta* se objevovaly z frontálního stejné znaky – pětice hrbolků, jeden centrální pór, a tečkovaná buněčná stěna.

Pětice hrbolků byly viditelné, jak u našich krásivek v komplexu, tak u jiných zobrazení v literatuře. Výjimku tvořily originální ilustrace (Ralfs, 1848), kde se počet hrbolků lišil. Počet těchto hrbolků zkritizovali West & West (1905), protože si všimli popsání nové variety *E. humerosum* var. *affine* Raciborski (1885) a předpokládali, že se to stalo jen díky chybě zobrazení hrbolků v monografii od autora Ralfs (1848).

Centrální pór byl popisován jako prohlubeň (*scrobiculation*) a byla podle něj popsána forma *scrobiculata* (West & West, 1905; Borge, 1906, Tab. 2, Fig. 13), ale neměla taxonomickou váhu, podobně jako forma *mixtae* (Ducellier, 1915; Kouwets, 2008). Jediný centrální pór se vyskytoval i u ilustrací příbuzných druhového komplexu - *E. oblongum* nebo *E. pinnatum* (Prescott & Scott, 1945; pl. 4, fig. 1; pl. 7, fig. 7-10). Zda to má souvislost i s jejich totožnými sekvencemi SSU, se možná dozvíme, až bude víc otestovaných druhů *Euastrum*, včetně druhových komplexů obsahujících různý počet centrálních pórů. Důležitý znak mi připadá počet centrálních pórů (nebo výskyt bradavic, trnů, apod.

Výskyt jediného centrálního póru byl pozorován SEM u příbuzných druhového komplexu *E. humerosum/didelta* u *E. oblongum* (Anissimova & Terlova, 2015, Рис.3, Fig. 1; nikoli však u ilustrací Ralfs, 1848) nebo *E. ansatum* (Anissimova & Terlova, 2015, Рис.1, Fig. 1), který je

o polovinu menší než klasický morfotyp *E. didelta* s delším krkem u polárního laloku (West & West, 1905; Krieger, 1937).

U podobných morfotypů se počet centrálních pórů lišil. U variety *E. didelta* var. *bengalicum* byly spatřeny dva (Wei, 1991), u *E. ampullaceum* tři (West & West, 1905) a u *E. obesum* var. *crassum* dokonce centrální pór chyběl (Prescott & Scott, 1945, Pl. 3, fig. 5). Podle mě je přítomnost různého počtu centrálních pórů důležitá, i když jim Růžička (1981) u *E. didelta* nepřikládal váhu. Patrně se domníval, že u *E. didelta* var. *bengalicum* přítomnost dvou centrálních pórů byla vlivem morfologické variability. Jelikož se lišilo i velikostí buňky, myslím si, že by mohly být tyto krásivky odlišného druhu. Bylo by jej potřeba testovat i molekulárními markery, např. by šlo použít trnG intron a ověřit monofylii i pomocí SSU.

Centrální pór a pětice hrbolků byly pozorovány i v ilustracích z první poloviny 20. století (West & West, 1905; Krieger, 1937). Patrně byly buňky pozorovány při větším kontrastu nebo prázdné. SEM potvrdila znaky na buněčné stěně. Podobně byly pozorovány tečky.

Tečky se vyskytovaly kolem vyvýšenin (laloků, hrbolků) a naopak kolem centrálního póru chyběly (tab. 4.2). Zda je signifikantní vzorkování teček, by bylo potřeba pozorovat více buněk v liniích. Existuje riziko, že krásivky, s tak velikou morfologickou plasticitou, mohou mít variabilitu i v drobných rozdílech skulptury buněčné stěny. Takže podobnost ve vzorci teček i v jiných SEM mikrofotografiích druhového komplexu *E. humerosum/didelta* (South, 1984, Fig. 2; Anissimova & Terlova, 2015, Рис.2, Fig. 2, 3) by mohla být čistě náhodná a nebyly by nalezeny prokazatelné rozdíly ve stavbě buněčné stěny pomocí SEM, podobně jako v práci u *Micrasterias truncata* (Nemjová et al, 2011). Důležitější rozdíly jsou např. trny nebo bradavice než tečky, jako např. řady trnů u *M. fimbriata* (Neustupa et al., 2011b) nebo uspořádání velkých prohlubní nebo bradavic u druhů *Cosmarium* (Šťastný & Kouwets, 2012).

5.2.2 Metrické analýzy a geometrická morfometrika

Základní rozměry buněk trnG linií korelovaly s molekulárními daty (viz graf 4.6), ale nekorelovaly s údaji z literatury pro střední Evropu (Růžička, 1981; tab.1.1, 4.7).

Zjistili jsme, že nejdůležitějším rozměrem je délka buňky (semicely) podobně jako u některých linií *Micrasterias* (Škaloud, et al., 2011). Dále je důležitý poměr polárního laloku s jeho isthemem (Pl/Ipl). Použijeme-li všechny rozměry: délku, šířku, isthmus, polární lalok a krku (isthmus polárního laloku), včetně celkového vzhledu buňky, můžeme krásivky v tomto druhovém komplexu určit s více než 95% přesností.

Rozdílné šířky krku si možná všiml i Ralfs (1848), která se lišila mezi *E. didelta* Ralfs a *E. humerosum/E. affine* Ralfs, ale jisté to není, protože na to neupozornil a šířku krku u *E. didelta*

nespecifikoval, jen šířku konce buňky, která byla odpovídající k našim největším šířkám polárního laloku. Krk u typu *a*, měl téměř stejnou šířku jako polární lalok, podobně jako u některých našich kmenů v linii A, takže se *E. didelta* s *E. humerosum* (Ralfs, 1848) lišily podobně jako naše linie A a C. Zjistili jsme, že oba morfotypy v linii C se lišily v krku ještě markantněji, tudíž morfotyp *E. humerosum* (z podskupiny *affine-humerosum*) měl nejužší krk ze všech a zároveň relativně nejširší polární lalok. Zjišťování fyziologických důvodů proč se lišila především šířka krku byla nad rozsah diplomové práce, ale pravděpodobně je to zapříčiněné variantou genu, která je většinou aktivní a proto se většina kmenů v této skupině nezaměňovala s ostatními skupinami a u E9 byly funkční i recesivní varianty (graf 4.9). Příčiny bychom mohli získat, že bychom u každé tvarové varianty udělali sekvenaci SSU intronu (nebo ITS) z jediné buňky, jejím klonováním DNA. Je ale možné, že tuto tvarovou variabilitu zapříčinila i jiná část DNA. Jelikož je obtížné provádět křížící pokusy, těžko zjistíme, zda má klasický poměr fenotypů jako v Mendelových zákonech. Je dost možné, že geny ovlivňující vzhled jsou ve vazbě a nebo jsou na různých chromozomech či částech buňky. Jediné, co můžeme říct s relativní jistotou, že morfologická plasticita byla zapříčiněná jinou částí DNA než byl trnG intron.

V literatuře se nejčastěji uvádí délka buňky, která může odhalit např. největší rozdíl mezi *E. humerosum/didelta* a *E. ansatum*, kde je druhý druh zhruba dvakrát menší než zkoumaný druhový komplex, ale důležité jsou i šířka semicely a krku (Isthmus polárního laloku, Ipl, viz graf 4.5), které pomohou určit i variety lišící se velikostí a někdy se lišící i na molekulární úrovni, jako v našem případě tři linie, A>B>C. Nejmladší se podle fylogenetického stromu zdá být linie A (obr.4.1).

Objevil se tu pattern, že mladší linie měly nejdelší buňky (obr.4.1,tab.4.3). Totéž nastalo i u jedné skupiny *Micrasterias* (Škaloud et al., 2011).

Z hlediska **geometrické morfometriky** se zdá nejvariabilnější polární lalok. Variety (morfotypy) v linii se lišily vroubkováním bazálního laloku, ale důležitým tvarem se zdá být tvar navázání krku a polárního laloku na zbytek semicely. Podobně jako u *Micrasterias fimbriata* (Neustupa et al., 2011b) se nám podařilo rozlišit skupiny podle vykrojení polárního laloku a tvaru jeho krku.

Rozdělením na dva subsety *humerosum* a *didelta* podle vroubkování, (viz obr. 4.1, tab. 8.11) jsme získali velice dobrou diskriminaci, kdy se od sebe odlišily spolehlivě linie A a C v morfotypu *humerosum*, ale u morfotypu *E. didelta* v linii A (*humerosum-didelta*) bylo možné zaměnit s linií B, kde LDA byla pouze 97%. Spolehlivé rozdělení linie A a C geometrickou morfometrikou korelovalo s větší genetickou vzdáleností mezi oběma liniemi.

U příbuznějších linií (A,B nebo B,C) jsme pozorovali hraniční formy, minimálně po jednom kmenu z každé linie. Čím menší byla genetická vzdálenost, tím se více sobě linie podobaly a mohli

mít více podobných buněk (graf.4.9). Je pravděpodobné, že zde zůstalo hodně genetické variability ovlivňující tvar z původního druhu, protože se stále mohou podobat i vzdálenější linie (A,C). Proto Archer možná pozoroval mezi hraničními formami konjugaci. Mohly být vlivem pH rozdílné, nebo se to událo v místě setkání dvou linií a byl tak udržen genový tok s určitým zachováním původní genetické variability a tím i vysoké morfologické plasticity (jako bylo v kmenech K14, nebo E9) a pravděpodobně byly i lépe přizpůsobené na prostředí.

Z naměřených údajů jsme předpokládali, že budou i delší krásivky s morfotypem *E. didelta*. Podle literatury byly určitě některé variety: *E. didelta* var. *bengalicum*, někteří zástupci *E. didelta* var. *quadriceps* a *E. didelta* var. *truncatum*. Nicméně byly delší i někteří zástupci morfotypu *E. humerosum* (Wagner, 2014), u kterého mohlo jít o špatné měřítko, nebo o nedovyvinutou krásivku *E. oblongum*. Podobně mohlo dojít k zakreslení špatného měřítka u *E. didelta* (John&Williamson, 2009), protože v textu byly uvedeny dvakrát delší rozměry než naměřené z obrázku.

Nicméně, existují užší variety než druhový komplex *E. humerosum/didelta* *E. didelta* var. *cuneatiforme* nebo kratší druhy: *E. cuneatum*, *E. sinuosum* nebo *E. ansatum* var. *dideltiforme*, podobné tvarem, ale lišící se rozměry (West & West, 1905; Prescott & Scott, 1945). Zda je *E. didelta* var. *cuneatiforme* nedovyvinutou formou druhovému komplexu, musely by se provést fyziologické zkoumání vývoje buněk, po celou dobu jejího dorůstání.

Vyplývá z toho, že je možné, že má linie A daleko více morfotypů nebo dokonce existují další linie, odlišné jak svým tvarem, tak rozměry než zkoumané populace v rámci druhového komplexu. A pro lepší diferenciaci bude dobré buňky i změřit, aby se předešlo záměně s jinými morfotypy.

Molekulární linie trnG byly odlišené svým tvarem polárního laloku méně spolehlivěji než pseudokryptické linie *Micrasterias fimbriata* (Neustupa et al., 2011b), protože byla rozlišitelná jen linie C oproti dalším dvěma (viz tab. 8.9).

Nebyla zde molekulárně oddělená varieta *E. humerosum* var. *affine*. Díky svým dvěma centrálním pórům předpokládáme, že *E. didelta* var. *bengalicum* patřila do jiného druhu (a možná dokonce do dvou linií, vzhledem k tomu, že má formu *minus*, téměř dvakrát menší, Scott & Prescott, 1958; Wei, 1991). Pokud by byly oddělené, byly by oddělené podobně jako skupiny variet: *M. crux-mellitensis* var. *crux-mellitensis* spolu s *M. crux-mellitensis* var. *superflua* od 2) *M. crux-mellitensis* var. *janeira* (Neustupa et al., 2010) nebo pseudokryptické taxony *Xanthidium antilopaeum* (Šťastný et al., 2013).

Pravděpodobně je celý tvar buňky (polární lalok, vroubkování bazálního laloku) včetně jejich výrůstků plastický s omezením. Zachovalo se zřejmě hodně genů zapříčiňující tyto vlastnosti. Jelikož je zachovaná morfologická plasticita, dá se předpokládat, že se mohou dále vyvíjet a tvořit nové linie v budoucnosti. Díky této schopnosti bylo popsáno u Desmidiáles 3000 druhů, i když

někdy umělých. A jelikož se objevila pseudokryptická variabilita je možné, že by mohlo být 2-3 krát více druhů, podobně jak předpovídali Šťastný & Kouwets (2012).

5.3 – LDA dat z literatury, kam by patřily, do jaké linie

Lineární diskriminační metodou jsme zjistili shodu se všemi zkoumanými podskupinami. Ikonotypy pro určování druhů *E. didelta* Ralfs, *E. affine* Ralfs se oba shodovaly v geometrické morfometrice v kombinaci s měřením, *E. humerosum* Ralfs bylo velice podobná skupině *affine-humerosum*, ale ne zcela, jeho ikonotyp se zařadil pouze, když nebyla definována skupina. Takže si byly tvarem velice podobné, nikoli totožné.

Byla zaznamenána shoda s některými dalšími varietami (details v tab. 8.13) v linii A: s *E. didelta* var. *ampullaceum* Duc., *E. humerosum* var. *parallellum* Borge, v linii B: *E. didelta* formy *latior* (South, 1984) a *val Piora* (Ducellier, 1915) nebo v linii C: *E. didelta* var. *inermiforme* (Ducellier, 1915) a *E. humerosum* var. *affine* (Coesel & Meesters, 2007). Vyplývá z toho, že došlo, alespoň k částečnému oddělení variet, ale tvoří pouze parafyletické skupiny, oproti *Micrasterias truncata* var. *pusilla*, která byla oddělena i molekulárně (Nemjová et al, 2011).

Některé kmeny se podobaly *E. didelta* var. *ampullaceum* a jelikož má *E. ampullaceum* 3 póry (West & West, 1905), nejsou si pravděpodobně příbuzné, výjimku můžou tvořit exempláře *E. ampullaceum* se zobrazeným jediným pórem v Ducellierovi (1918, s. 133, fig. 120 A,B, patřící do linie A) nebo v Lenzenwegerovi (1976, Taf. 1, Fig. 4, patřící do linie B, viz tab. 8.13, v příloze). Outgroup *E. everettense* měl podobně jako K61 širokou základnu, ale podle fylogeneze si byly krásivky geneticky vzdálenější, pouze v Bayesově stromě SSU intronu (obr. 4.2b) byl určitý náznak příbuznosti, ale to by znamenalo, že podle SSU intronu by druhový komplex *E. humerosum/didelta* nebyl monofyletický. Přikládala bych větší váhu ML stromu.

Sjednocení původně rozděleného *E. didelta* Ralfs

Enormní překrývání rozměrů v literatuře pro střední Evropu (tab.1.1; Růžička, 1981) bylo pravděpodobně způsobeno rozdělením typů *E. didelta* Ralfs. Objevili jsme morfotypy s rozdílnými bazálními laloky v linii A. Podobaly se ikonotypům *E. didelta* Ralfs (1848, typ *a,b*, viz obr. 1.5), které West & West (1905) rozdělili, a typ *b* (Ralfs, 1848, Tab. XIV, fig. 1b) byl pojmenován jako *E. humerosum*. Znovu spojení obou ikonotypů *E. didelta* by možná pak korelovalo s původní délkou buňky druhů *E. didelta* a *E. humerosum* (Ralfs, 1848), který měl rozměry podobné linii C.

E. didelta – druh, varieta nebo morfa?

U morfotypů *E. didelta* a *E. humerosum* byly zaznamenány rozdílné hodnoty pH, někdy bylo *E. didelta* v kyselejších prostředí (Růžička, 1981) nebo naopak v zásaditějším (Krieger, 1937). Podle

Štěpánkové (2008), bylo pH pro oba morfotypy totožné, na stejném místě, takže důvod jiného vzhledu by mohl být také jiný než rozdílné pH, jak jsme potvrdili pěstováním krásivek ve stejných podmínkách. Nicméně se tu jeví pattern, že v teplejším prostředí se vyskytuje morfotyp *E. didelta* (viz obr. 1.8), podobně jako u krásivek, které při vyšší teplotě měly tendenci vyrovnávat velikost všech lalůček (Neustupa et al., 2008). Proto byla možná některých *E. didelta* var. *quadriceps* z Brazílie s téměř nezatelným laterálním lalokem (Ramos et al., 2011). Zda je výskyt *E. didelta* vlivem i kyselejšího pH, ve kterém měly krásivky tendenci se zakulacovat (Černá & Neustupa, 2010), by se muselo otestovat v laboratorních podmínkách.

E. humerosum* vs. *E. humerosum* var. *affine

Po rozdělení *E. didelta* Turpin ex Ralfs připadlo označení *E. humerosum* krásivce s méně dilatovaným polárním lalokem, než bylo původně a došlo občas k záměně označení s jeho varietou *E. humerosum* var. *affine*. Ikonotyp *E. affine* Ralfs měl méně dilatovaný polární lalok. Oba ikonotypy *E. affine* Ralfs a *E. humerosum* se sice zařadily do stejné podskupiny *affine-humerosum*, ale méně spolehlivě. Podle Wallicha (1860) a Raciborskiho (1885) byly příbuzné. Podle Ralfse se krásivky lišily nejen tvarem buňky, ale i počtem hrbolků, které podle autorů West&West (1905) byly špatně zakresleny. Jelikož se kmeny, v podskupině *affine-humerosum*, lišily nepatrně polárním lalokem od *E. affine* Ralfs. Nedošlo k záměně, ale spíše rozšířením morfotypu *E. humerosum* a zúžení smyslu morfotypu *E. didelta*. Vzhledem k tomu, že jsme netestovali britské krásivky, je pochopitelné, že všechny ikonotypy *E. didelta*, *E. affine* a *E. humerosum* (Ralfs, 1848) nebyly tvarově zcela shodné se zkoumanými krásivkami z jiných krajů Evropy.

Bohužel se často pouze odkazuje na původní literaturu a méně často se zobrazují rozšířené a dlouho známé krásivky. Díky překrývajícím se rozměrům a velké morfologické plasticitě může být obtížné správně stanovit výpis druhů bez molekulární podpory nebo pomocí geometrické morfometriky. A jelikož typové variety *E. affine* Ralfs a *E. humerosum* Ralfs se zcela neshodovaly ani se zkoumanými krásivkami polyfázickým způsobem, byla by potřeba další zkoumání - další odběry zástupců, a zjištění správné taxonomie. Popřípadě by se krásivky mohly použít v dalším testování molekulárními markery nebo testováním environmentálních podmínek, protože jejich proměnné tvary v bazálním laloku Duce (1915) přičítal právě environmentálním faktorům, ale tím, že jsme je testovali pěstováním za stejných podmínek, měli jsme těmto proměnným předejít. Přesto se morfologická plasticita vyskytla, podobně jako v jiných studiích u *Micrasterias* (Neustupa et al., 2010, 2011b; Nemjová et al., 2011).

Geografie

Objevili jsme, že se geograficky střetávají linie druhového komplexu *E. humerosum/didelta* nejen v Severní Evropě (v Norsku), tak i ve střední Evropě (v Savojských Alpách ve Francii) a v Kanadě. Možným důvodem mohlo být, že v těchto místech je velké množství vhodných lokalit pro krásivky. Nicméně se zdá, že byly většinou ve větších nadmořských výškách nebo za polárním kruhem (s vlivem Golského proudu) či pod vlivem studeného Labradorského proudu (srovnej obr. 1.8 s 4.3; U.S. Army, 1949). Ve Francii blízko Alp na západním břehu Rýna byl výskyt linií A a C, na stejném břehu jako jsou Savojské Alpy a Švýcarsko. Ale na východním břehu Rýna v Rakousku, Německu, Slovensku, Polsku a Čechách byl zaznamenán nebo byl teoreticky podle LDA GM dat vypočítán, výskyt pouze linie A (obr. 4.3).

Další překryv byl ve Skandinávii (v Norsku, Švédsku), a to linií A a C, a v Norsku všech linií. Ve střední Evropě se zdá výskyt výhradně pro linii A na východním břehu Rýna nebo v Itálii a Portugalsku. Je to ovšem neprůkazné bez podrobnějšího odběru vzorků a potvrzení molekulárními analýzami. Nemůžeme posoudit ani zda došlo k umělému rozšíření. Pravděpodobně zde neplatí totéž jako u *Micrasterias fimbriata* (Neustupa et al., 2011b), kde pseudokryptické linie byly odděleny řekou Rýn. Pravděpodobně řeka Rýn pouze omezuje šíření linie C.

Na rozdíl od jiných variet *E. didelta* se zdá, že krásivky *E. humerosum/didelta* nemají jasně ohraničený výskyt, střetávají se v severní a střední Evropě a na americkém kontinentu. Variety *E. didelta* var. *quadriceps/ cuneatiforme* měly omezené rozšíření a lišily se nejen vzhledem, tak rozměry oproti zkoumanému druhového komplexu. *E. didelta* var. *bengalicum* se lišilo, jak vlastnictvím dvou centrálních pórů v buněčné stěně, tak výskytem v Indomalajii a Austrálii.

Vyplývá z toho, že je pravděpodobné omezení šíření přes velké vzdálenosti díky slané vodě. Dalším vývojovým omezením u krásivek se zdá jejich citlivost na vyschnutí oproti ciliátům, kteří tvoří často trvalá stádia. Trvalá stádia se tvoří zejména v místech častého vysychání, jak u krásivek, tak i u jiných protist (Corliss and Esser, 1974; Coesel, 1989; Foissner, 2006). Při stáležších podmínkách tuto schopnost mohou protista ztrácet (Foissner, 1997).

Taxonomické poznámky

Jelikož došlo k taxonomickému rozdělení *E. didelta* začátkem 20. století (West & West, 1905), a naopak rozšíření pojetí *E. humerosum*, můžou se hodně lišit seznamy druhů před rokem 1905 a v průběhu století dvacátého. Určování řas je dosti subjektivní a určuje se podle největší podobnosti krásivky v klíči. Často se v seznamu druhů uvádí pouze typová varieta, a jak bylo řečeno, jsou velice rozdílné podle své geografie. Takže asi existují faktory určující vzhled na určitém místě (environmentální nebo genetické). Proto je důležité uvést podle jaké sady ikonotypů (ilustrací); a

nebo podle jakého klíče byly krásivky určovány. V případě, že by se krásivky lišily od obrázků nebo uvedených rozměrů, bylo by dobré je ilustrovat a uvést jejich rozměry. Často se bohužel stává, že v seznamu druhů autoři popíšu řasu a uvedou rozměry nebo taky ne (např. v Caraus, 2012; v Rumunsku). Často ilustrují krásivky milovníci přírody (Ells, 1998; Kinross, 2002; Wagner, 2008; Plewka, 2011; Mout, 2012; Fučíková, 2015; André, 2017; Scipion, 2017; Opitz, 2018).

5.5 Taxonomické shrnutí důležitých znaků evolučních linií druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta*

Linie A – *Euastrum humerosum/didelta*

Buňky linie A byly nejdelší a nejširší, většinou s obloukovitě zakončeným polárním lalokem a ± výraznými laterálními laloky. Krk býval úzký. U kmenů z NP Rago (K14,K15) a *E. didelta* (K4) byly laterální laloky méně prominující. Kmen K61 měl velmi rozšířený bazální lalok a byl signifikantně odlišný od ostatních skupin. Linie se velice podobala nebo v sobě zahrnovala *E. didelta* (typ a/b), ostatní kmeny měly vzhled podobající se *E. humerosum* svým vroubkováním bazálního laloku. Buňky měly rozměry v 10.-90. percentilu následující: 57,7-66,9 μm x 67,7-79,5 μm (v délce semicely x šířce semicely), 18,1-23,1 μm v isthmu, 27,01-32,28 μm v polárním laloku a 25,13-30,75 μm v tzv. šířce krku, a měly poměr 2*Ds/Ss (tzv. poměr délky a šířky buňky) 1,6-1,8. Linie A byla rozšířená po celé Evropě – v Portugalsku, ČR, Švédsku, Norsku a pravděpodobně podle LDA by mohly být v Nizozemí, Slovensku, Rakousku, Francii, Německu a Švýcarsku, a možná v Itálii. Zda byly i na britských ostrovech, není jisté. Možné tvary viz Obr.tab.I.

Linie B (*scandinave*)

Buňky linie B měly široký krk s málo prominujícími laterálními laloky a buď obloukovitě zakončeným nebo jemně srdcovitě zakončeným polárním lalokem. Krásivky v této linii se zaměňovaly s *Euastrum didelta*, a s krásivkami z linií A a C. Buňky měly rozměry v 10.-90. percentilu následující: 57,7-62,5 x 66,1-71,7 μm (v délce semicely x šířce semicely), 18,4-20,8 μm v isthmu, 27,64-30,09 μm v polárním laloku a 27,63-30,47 μm v tzv. šířce krku a měly poměr délky a šířky buňky (2*Ds/Ss) 1,7-1,8.

Linie C

V linii C byly zahrnuté dva morfotypy *Euastrum didelta*, a *E. humerosum* var. *affine*. Morfotyp *E. didelta*: Buňky měly pravidelné laloky a úzký krk, polární lalok se srdíčkovitě rozšiřoval, nebo laterálně obloukovitě zakončoval. Bazální lalok všech kmenů byl zaoblený. Morfotyp *E. humerosum*. Polární lalok byl na konci srdíčkovitě rozšířený nebo byl široce laterálně obloukovitě zakončený. Laterální lalok byl výraznější se zaobleným či s globulárnějším zakončením. Bazální lalok byl rozdvojený.

Buňky měřily v 10.-90.percentilu: 48,4-58,7 x 56,7-69,7 μm (v délce semicely x šířce semicely), 16,6-21 μm v isthmu, 24,23-33,27 μm v polárním laloku a 19,39-26,18 μm v tzv. šířce krku a měly poměr délky a šířky buňky ($2 \cdot D_s/S_s$) 1,6-1,8.

5.6 co bychom mohli dál studovat?

Podobné odhalení pseudokryptické diverzity jako u našeho komplexu se událo u druhového komplexu *Micrasterias crux-melitensis/radians* (Neustupa et al., 2010), kde byla použita kombinace markerů trnG intron, ITS a SSU, podobně jako zde, ale marker ITS nevyšel a byl využit SSU intron, který by se musel naklonovat, abychom dostali jednotnější výsledky. Molekulární markery byly použity v kombinaci s geometrickou morfometrikou a SEM. Nicméně podobně jako u *Xanthidium* (Šťastný et al., 2013), by bylo potřeba dalších molekulárních markerů pro odhalení dalších možných linií.

Další výzkum by mohl pokročit rychleji při vyhodnocování řas v terénu pomocí barcodingu (Hall et al., 2010) nebo molekulárně fylogenetickou analýzou z jedné buňky podobně jako ve studii *Micrasterias truncata* (Nemjová et al., 2011). Na rozdíl od obecných markerů pro ribosomální DNA, bylo užitečné použít pro krásivky intron pro tRNA Gly, který je blízko rrs (16S ribosomal DNA, Turmel, 2005).

Navíc by se měly přehodnotit některé biomonitringové studie. Měly by být doplněny pro větší přesnost fotografiemi a rozměry. Jakmile by se objevila skupina podobná, ale rozměrově jiná o více než 10 μm , mohlo by se jednat o jiný druh nebo varietu a podobně jako v této práci, kdy se některé kmeny podobaly jiným kmenům v jiném linii, lišily se feneticky především svými rozměry a tvarově se lišily až po zkoumání geometrickou morfometrikou.

Jelikož se *E. didelta* var. *denticulatum* nenalezlo jinde než ve Švýcarsku, je možné, že tato krásivka by mohla mít endemitní výskyt, nebo byly trny specifickou odpovědí na okolní prostředí. Ostny bývají obvykle odpovědí na predátory (Pröschold et al., 2010). Mohlo by se studovat, zda-li patří do některé z trnG vývojových linií nebo kultivovat a ekologicky zkoumat (focení před a po kultivaci). Jelikož obranné mechanismy u některých řas – ostny u *Micractinium pusilla* (Pröschold et al., 2010), při kultivaci bez přítomnosti predátorů mizely, je možné že bychom u *E. didelta* var. *denticulatum* pozorovali totéž.

Je důležité upozornit, že se krásivky komplexu liší od *E. didelta* var. *bengalicum*, který má póry dva a předpokládám, že by se mohlo jednat i o jiný druh. Velikosti uvedené v literatuře dosahovaly větších rozměrů než zkoumané krásivky, takže by se krásivky lišily ultrastrukturou buněčné stěny, svými rozměry a dalším zkoumáním je možné, že by se našla i molekulární odlišnost.

Dalším bodem zkoumání by bylo možné rozšířit odebírané lokality v Evropě, např. ve Francii, Švýcarsku, Rakousku a Německu, zda je opravdu rozdíl na různých březích řeky Rýna, podobně jako ve studii o *Micrasterias fimbriata* (Neustupa et al., 2011b) nebo zda je linie A na obou březích a linie C pouze na západním. Nebo lze studovat krásivky v Irsku, kde je vysoký počet druhů krásivek (a mohla by se případně otestovat, např. ostrovní biogeografie).

Další možností by mohla být ekologická studie tvarových rozdílů v různých laboratorních podmínkách, zda by se podobaly různým druhům, podobně jako ve studiích na *E. didelta* (Ducellier, 1915; South, 1984), a zda by mohl být důvod různých morfotypů v linii A vlivem odlišného pH, teploty nebo jiných faktorů.

Budoucnost má zobrazení krásivek milovníky přírody, kteří mají k dispozici techniku pro zobrazení krásivek a mohou okamžitě publikovat na internetových stránkách.

6. Závěr

Tato práce nám umožnila vhléd do pseudokryptické diverzity fylogenetickou analýzou odhalením tří linií v Evropě a jejich částečné diskriminování geometrickou morfometrikou. *Euastrum humerosum* Ralfs var. *affine* Wallich (*E. affine* Ralfs) je parafyletickou skupinou v linii C, nepodařilo se nám ji odlišit na molekulární úrovni.

Podařilo se nám rozdělit, alespoň částečně druhový komplex *E. humerosum/didelta* podle variet. Některé morfologicky definované poddruhy jsou umělé neboli bez taxonomické hodnoty, naopak jiné variety jsou pravděpodobně nezávislými druhy, jak jsme zjistili u *E. didelta* var. *inermiforme* v linii B.

Pěstováním ve stejných podmínkách jsme získali morfologicky variabilní kmeny. Je možné, že je to zapříčiněné jiným(i) genem/geny než je trnG^{unc} intron. Mohli bychom, tak testovat další rychle se měnící se markery, zda bychom objevili nějaký signifikantní rozdíl.

E. didelta Turpin ex Ralfs, *E. humerosum* Ralfs a *E. affine* Ralfs jsou si blízce příbuzné a pravděpodobně pouhými varietami. Jsou velice morfologicky variabilní s navzájem se podobajícími kmeny jiné linie. Liší se především relativní šířkou krku a jeho posazením na ostatní tělo buňky a svými rozměry délky a šířky buňky.

Linie A je rozšířená pravděpodobně po celé Evropě a linie C je v severní Evropě, severní Americe a pravděpodobně podle LDA i ve střední Evropě v oblasti Alp, na západním břehu Rýna.

7. Seznam použité literatury

- Andersen, R.A., Morton, S.L., Sexton, J.P., 1997. Provasoli-Guillard national center for culture of marine phytoplankton 1997 List of strains. - *J. Phycol.* 33, 1–75. doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00001.x
- André, 2008 [cit. 10.7.2018]. *Euastrum humerosum* Ralfs var. *affine* (Ralfs) Wallich. - Le Naturaliste Forum. De la Loupe au microscope... Vos observations macro et microscopiques! [online]. Dostupné na: <<http://www.lenaturaliste.net/forum/viewtopic.php?f=91&t=1520&p=6162&hilit=humerosum>>.
- André, 2017 [cit. 10.7.2018]. *Euastrum didelta* Ralfs. - Le Naturaliste Forum. De la loupe au microscope... Vos observations macro et microscopiques! [online]. Dostupné na: <<http://www.lenaturaliste.net/forum/viewtopic.php?f=91&t=20444&p=112976&hilit=euastrum+humerosum#p112976>>.
- Anissimova, O., Terlova, E., 2015[cit. 13.8.2018]. *Euastrum* Ehrenberg (Conjugatophyceae) in bogs of the Moscow region. - *Issues of modern algology* 8. Dostupné na: <<http://algology.ru/665>>.
- Aquino, C.A.N., Bueno, N.C., Servat, L.C., Bortolini, J.C., 2017. The genus *Euastrum* Ehrenberg ex Ralfs (Desmidiaceae) in a subtropical stream adjacent to the Parque Nacional do Iguaçu, Paraná State, Brazil. - *Hoehnea* 44, 1–9. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-55/2016>
- Archer, W., 1875. PROCEEDINGS OF SOCIETIES: Dublin Microscopical Club: Singular and unprecedented Case of Conjugation between two distinct, but allied, Desmidian Species. - *Q. J. Microsci Sci* 15, 414–415.
- Beszteri, B., Ács, É., Medlin, L., 2005. Conventional and geometric morphometric studies of valve ultrastructural variation in two closely related *Cyclotella* species (Bacillariophyta). - *Eur. J. Phycol.* 40, 89–103.
- Blackburn, S.I., Tyler, P.A., 1981. Sexual reproduction in desmids with special reference to *Micrasterias thomasiana* var. *notata* (Nordst.) Grönblad. - *Br. phycol. J.* 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*. - *Br. phycol. J.* 22, 277–298.
- Borge, 1906. Beiträge zur Algenflora von Schweden. - *Ark. Bot.* 6.
- brantfaircloth, 2015[cit.12.8.2018]. Substitution models in mrbayes. - GitHubGist[online]. Dostupné na: <<https://gist.github.com/brantfaircloth/895282>>.
- Briskaite, R., Kostkeviciene, J., Naujalis, J., 2008. Desmids (Chlorophyta, Zygnematophyceae) from the Girutiskis mire complex reserve (East Lithuania). - *Biologia* 63.
- Brook, A.J., 1981. - *The Biology of Desmids*, Botanical Monographs 16. ed. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, 276 pp.
- Brown, H.J., 1930. The Desmids of the Southeastern Coastal Plain Region of United States. - *T. Am. Microsc. Soc.* 49, 97.
- Caraus, I., 2012. Algae of Romania. A distributional checklist of actual algae. Studii si Cercetari - *Biologie* 7, 1–809.

- CIA, 2001 [cit. 12.8.2018]. Political World Map. Central Intelligence Agency [online]. Dostupné na: < <http://hdl.loc.gov/loc.gmd/g3200.ct002066>>.
- Coesel, P.F.M., 1989. Biosystematic studies on the *Closterium moniliferum* / *ehrenbergii* complex (Chlorophyta, Conjugatophyceae) in western Europe. IV. Distributional aspects. *Cryptogam.*: - *Algol.* 10, 133–141.
- Coesel, P.F.M., 1996. Biogeography of desmids. - *Hydrobiologia* 336, 41–53.
- Coesel, P.F.M., 2001. A method for quantifying conservation value in lentic freshwater habitats using desmids as indicator organisms. - *Biodivers. Conserv.* 10, 177–187.
- Coesel, P.F.M., 2003. Desmid flora data as a tool in conservation management of Dutch freshwater wetlands. - *Biologia* 58, 717–722.
- Coesel, P.F.M., Meesters, K.J., 2007. *Desmids of the Lowlands: Mesotaeniaceae and Desmidiaceae of the European Lowlands*. KNNV Publishing, Zeist, the Netherlands, (8-15pp.), 351 pp.
- Cooke, M.A., 1887. *British Desmids: a supplement to british fresh-water algae*. Williams and Norgate, London.
- Corliss, J.O., Esser, S.C., 1974. Comments on the Role of the Cyst in the Life Cycle and Survival of Free-Living Protozoa, in: Symposium: Perspectives on the Biology of Dormancy, Transactions of the American Microscopical Society. - *Wiley on behalf of American Microscopical Society*, pp. 578–593.
- Croasdale, H., Grönblad, R., 1964. Desmids of Labrador 1. Desmids of the Southeastern Coastal Area. - *T. Am. Microsc. Soc.* 83, 142.
- Černá, K., Neustupa, J., 2010. The pH-related morphological variations of two acidophilic species of Desmidiales (Viridiplantae) isolated from a lowland peat bog, Czech Republic. - *Aquat. Ecol.* 44, 409–419.
- de Oliveira, I.B., Bicudo, C.E. de M., Moura, C.W. do N., 2011. *Euastrum* (Desmidiaceae, Zygnematophyceae) na planície litorânea do norte da Bahia, Brasil. - *SITIENIBUS série Ciências Biológicas* 11, 62–73.
- De Queiroz, K., 2007. Species Concepts and Species Delimitation. - *Systematic Biol.* 56, 879–886.
- Deflandre, G., 1926. Contributions à la flore algologique de France—I. Confolentais. - *B. Soc. Bot. FR.* 73, 987–999.
- Denboh, T., Hendrayanti, D., Ichimura, T., 2001. Monophyly of the genus *Closterium* and the order Desmidiales (Charophyceae, Chlorophyta) inferred from nuclear small subunit rDNA data. - *J. Phycol.* 37, 1063–1072.
- Denboh, T., Ichimura, T., Hendrayanti, D., Coleman, A.W., 2003. *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Charophyceae, Chlorophyta) species complex viewed from the 1506 group I intron and ITS2 of nuclear rDNA. - *J. Phycol.* 39, 960–977.
- Ducellier, F., 1915. Contribution a l'étude du Polymorphisme et des Monstruosités chez les Desmidiacées. - *Bulletin de la Société Botanique de Genève*, 2 VII, 75–118.
- Ducellier, F., 1918. Contribution a l'étude de la Flore Desmidiologique de la Suisse (Suite*) Deuxième partie. - *Bulletin de la Société Botanique de Genève* 10, 85–154.

- Efron, B., 1982. The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. - *Society for Industrial and Applied Mathematics*. Doi:10.1137/1.9781611970319
- Ells, W., 1998 [cit 11.4.2018]. Optical and SEM examination of some species of the desmid genus *Euastrum*. - *Micscape Magazine* [online]. Dostupné na: <<http://www.microscopy-uk.net/mag/art98/semdes.html>>.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. - *Evolution* 39, 783–791.
- Florin, M.-B., 1957. Plancton of Fresh and Brackish Waters in the Södertälje Area. - *Acta Phytogeographica Suecica* 37, 0–144.
- Foissner, W., 1997. Soil ciliates (Protozoa: Ciliophora) from evergreen rain forests of Australia, South America and Costa Rica: diversity and description of new species. - *Biol. Fert. Soils* 25, 317–339.
- Foissner, W., 2006. Biogeography and Dispersal of Micro-organisms: A Review Emphasizing Protists. - *Acta protozool.* 45, 111–136.
- Fromm, T., 2014. Zur Situation der Desmidiaceen in Berlin in den Jahren 2009 bis 2014. - *Verh. Bot. Ver. Berlin Brandenburg* 147, 185–249.
- Fučíková, K., 2015 [cit.10.7.2018]. *Euastrum humerosum*. - *iNaturalist* [online]. Dostupné na: <<https://www.inaturalist.org/observations/1880403>>.
- Gay, M.F., 1884. Essai d'une Monographie locale des Conjugées. Deuxième partie. Étude de la flore de Montpellier et des Cévennes. - *Revue des sciences naturelles*, Mémoires originaux 3, 285–335.
- Gerrath, J.F., 2003. Conjugating Green Algae and Desmids, - in: Wehr, J.D., Sheath, R.G. (Eds.), *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Academic Press, Boston, pp. 353–381.
- Gontcharov, A.A., 2008. Phylogeny and classification of Zygnematophyceae (Streptophyta): current state of affairs. - *Fottea* 8, 87–104.
- Gontcharov, A.A., Marin, B., Melkonian, M., 2003. Molecular Phylogeny of Conjugating Green Algae (Zygnemophyceae, Streptophyta) Inferred from SSU rDNA Sequence Comparisons. - *J. Mol. Evol.* 56, 89–104.
- Gontcharov, A.A., Melkonian, M., 2005. Molecular phylogeny of *Staurastrum* Meyen ex Ralfs and related genera (Zygnematophyceae, Streptophyta) based on coding and noncoding rDNA sequence comparisons. - *J. Phycol.* 41, 887–899.
- Gontcharov, A.A., Melkonian, M., 2008. In search of monophyletic taxa in the family Desmidiaceae (Zygnematophyceae, Viridiplantae): the genus *Cosmarium*. - *Am. J. Bot.* 95, 1079–1095.
- Gontcharov, A.A., Melkonian, M., 2010. Molecular phylogeny and revision of the genus *Netrium* (Zygnematophyceae, Streptophyta): *Nucleotaenium* Gen. Nov. - *J. Phycol.* 46, 346–362.
- Gontcharov, A.A., Melkonian, M., 2011. A Study of Conflict between Molecular Phylogeny and Taxonomy in the Desmidiaceae (Streptophyta, Viridiplantae): Analyses of 291 *rbcL* Sequences. - *Protist* 162, 253–267.
- Google, INEGI, 2018[cit. 9.7.2018]. Slepá mapa Evropy. Mapa Evropy[online]. Dostupné na: <<http://www.mapaevropy.com/img/slepa-mapa.jpg>>.

- Grabowska, M., Hindák, F., Hindáková, A., 2014. Phototrophic microflora of dystrophic Lake Sęczek, Masuria, Poland. - *Oceanol. Hydrobiol. St.* 43, 337–345.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2018 [cit. 8.7.2018]. AlgaeBase [online]. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Dostupné na: <<http://www.algaebase.org>>.
- Guiry, M.D., 2013. Taxonomy and nomenclature of the Conjugatophyceae (= Zygnematophyceae). - *Algae* 28, 1–29.
- Gysels, J., Vanhoof, A., Vaes, L., Luts, R., Wouters, P., Horemans, M., Loos, G., 2015[cit. 8.7.2018]. *Praktische gids voor de sieraalgen van Vlaanderen* [online], Natuurpunt Educatie. Natuurpunt.Mechelen, Belgium. Dostupné na: <https://issuu.com/natuurpunt/docs/gids_sieraalgen_16april2015>.
- Hall, J.D., Fučíková, K., Lo, C., Lewis, L.A., Karol, K.G., 2010. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. - *Cryptogam.: Algol.* 31, 529–555.
- 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. - *J. Phycol.* 44, 467–477.
- Hammer, O., 2018. *PAST*. PAleontological STatistics. Version 3.20. Reference manual.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. - *Palaeontol. Electron.* 4, 9.
- Hansgirg, A., 1886. Prodrömus der Algenflora von Böhmen. Erster Theil. enthaltend die Rhodophyceen, Phaeophyceen und einen Theil der Chlorophyceen. *Das Archiv für die naturwissenschaftliche Landesdurchforschung von Böhmen* V, 5–279.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the Human - Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA. - *J. Mol. Evol.* 22, 160–174.
- Hasegawa, M., Yano, T., Kishino, H., 1984. A new molecular clock of mitochondrial DNA and the evolution of Hominoids. - *Proc. Japan Acad. Ser. B* 60, 95–98.
- Hastings, W.K., 1970. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. - *Biometrika* 57, 97–109.
- Hepperle, D., 2002. *SeqAssem*. SequentiX - Digital DNA Processing, Warnow - Klein Raden, Germany.
- Hiesel, R., von Haeseler, A., Brennicke, A., 1994. Plant mitochondrial nucleic acid sequences as a tool for phylogenetic analysis. - *P. Natl. A. of Sci.* 91, 634–638.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. - *Q. Rev. Biol.* 66, 411–453.
- Hoshaw, R.W., McCourt, R.M., 1988. The Zygnemataceae (Chlorophyta): a twenty-year update of research. - *Phycologia* 27, 511–548.
- Hurst, L.D., Smith, N.G.C., 1998. The evolution of concerted evolution. - *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 265, 121–127.
- Huss, V.A.R., Frank, C., Hartmann, E.C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B.M., Wenzeler, P., Kessler, E., 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). - *J. Phycol.* 35, 587–598.

- Hyliš, M., Nebesářová, J., 2008a [cit. 9.7.2018]. Metody přípravy biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii aplikované LEM. LEM, Laboratoř elektronové mikroskopie [online]. Dostupné na: <<https://web.natur.cuni.cz/~lem/index.php?p=metody>>.
- Hyliš, M., Nebesářová, J., 2008b [cit. 9.7.2018]. Vybavení. LEM, Laboratoř elektronové mikroskopie [online]. Dostupné na: <<https://web.natur.cuni.cz/~lem/index.php?p=vybaveni>>.
- Islam, A.N., Irfanullah, H.M., 2006. Hydrobiological studies within the tea gardens at Srimangal, Bangladesh. V. Desmids (*Euastrum*, *micrasterias*, *actinotaenium* and *cosmarium*). - *Bangl. J. Plant Taxon.* 13, 1–20.
- John, D.M., Wiliamson, D.B., 2009. *A practical guide to the desmids of the West of Ireland*. Martin Ryan Institute, National University of Ireland, Galway.
- John, U., Litaker, R.W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M.L., Anderson, D.M., 2014. Formal Revision of the *Alexandrium tamarensis* Species Complex (Dinophyceae) Taxonomy: The Introduction of Five Species with Emphasis on Molecular-based (rDNA) Classification. - *Protist* 165, 779–804.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules,- in: Munro, H.N. (Ed.), *Mammalian Protein Metabolism* III. Academic Press, pp. 21–132.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. - *J. Mol.Evol.* 16, 111–120.
- King, G.C., 1960. The Cytology of the Desmids: The Chromosomes*. - *New Phytologist* 59, 65–72.
- Kinross, J., 2002 [cit. 10.7.2018]. Freshwater Algae from Loch Skeen, 26th May 2002. Loch Skeen Plankton[online]. Dostupné na:<<http://algalweb.net/skeen.htm>>.
- Kouwets, F.A.C., 1984. The Taxonomy, Morphology and Ecology of Some Smaller *Euastrum* Species (Conjugatophyceae, Desmidiaceae). - *Br. phycol. J.* 19, 333–347.
- Kouwets, F.A.C., 2008. The species concept in desmids: the problem of variability, infraspecific taxa and the monothetic species definition. - *Biologia* 63, 881–887.
- Kraft, L.G.K., Kraft, G.T., Waller, R.F., 2010. Investigations into southern Australian *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) taxonomy and molecular phylogeny indicate both cosmopolitanism and endemic cryptic species. - *J. Phycol.* 46, 1257–1277.
- Krasznai, E., Fehér, G., Borics, G., Várbíró, G., Grigorszky, I., Tóthmérész, B., 2008. Use of desmids to assess the natural conservation value of a Hungarian oxbow (Malom-Tisza, NE-Hungary).- *Biologia, Section Botany* 63, 928–935.
- Krieger, W., 1937. Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außereuropäischen Arten, - in: *Rabenhorst's Kryptogamen - Flora, Band 13, Abteilung 1, Teil 1*. Akademische Verlagsgesellschaft M. B. H., Leipzig, pp. 1–712.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. - *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Lakshminarayana, J.S.S., 1976. Studies on a series of small freshwater pools near St. John's, Newfoundland II. Algae. - *Hydrobiologia* 49, 129–135.

Lane, T. G., Independent JPEG Group, Vollbeding, G., Randers-Pehrson, G., Leffler, S., Silicon Graphics, Inc., Gailly, J.-L., Adler, M., Coffin, D., Microsoft corporation, Adams, M. D., Elonen, J., ITU-T/ISO/IEC, Porter, M., Volland, G., Maddock, J., Intel Corporation, SpiderMonkey JavaScript Engine, Druckmüller, M., Maria, M., Adobe Systems Incorporated, National Institute of Technology, USA, Terra Informatica Software, Inc., and SQLite 3.8.3.1, 1995-2015, Zoner Photo Studio v. 17 (Sestavení 12). ZONER software, a. s. Dostupné na: <<https://www.zoner.cz/download>>.

Lehman, J.T., 1976. Ecological and nutritional studies on Dinobryon Ehrenb.: Seasonal periodicity and the phosphate toxicity problem. - *Limnol. Oceanogr.* 21, 646–658.

Lenarczyk, J., Lenzenweger, R., Jacuńska, U., 2015. Spatial and temporal variations in the genera *Euastrum* Ralfs and *Micrasterias* Ralfs (Desmidiaceae) assemblages of high altitude lakes (Western Carpathians). - *Nova Hedwigia* 101, 233–250.

Lenzenweger, R., 1967. Beiträge zur Desmidiaceenflora des Ibmer Moores (2. Fortsetzung). - *Jahrbuch des Oberösterreichischen Musealvereines* 112a, 173–184.

Lenzenweger, R., 1971. Beiträge zur Desmidiaceenflora des Ibmer Moores, 5. und letzte Fortsetzung. - *Jahrbuch des Oberösterreichischen Musealvereines* 116, 293–303.

Lenzenweger, R., 1976. Einige Desmidiaceen aus Mooren Nordkareliens nebst Beobachtungen an Doppelzygoten. - *Linzer biol. Beitr* 8, 63–78.

Lenzenweger, R., 1981. Zieralgen aus dem hornspitzgebiet bei Gosau - Teil I: Desmids from the “Hornspitz” - region near Gosau (upper Austria) - Part I. - *Naturk. Jb. d. Stadt Linz* 27, 25–82.

Lenzenweger, R., 1993. Beitrag zur Kenntnis der Desmidiaceenflora des Lunzer Obersees. - *Linzer biol. Beitr.* 25, 283–320.

Lenzenweger, R., 1995[cit. 14.7.2018]. *Ein Blick ins Unsichtbare - Algen aus dem Alm- und Laudachsee. Naturwissenschaftliche Sammlungen Kremsmünster; Berichte des Anselm Desing vereins*[online] 4–13. Dostupné na: <http://www.zobodat.at/pdf/ADV_28_0001-0032.pdf>.

Lenzenweger, R., 1996. *Desmidiaceenflora von Österreich* Teil 1, Bibliotheca Phycologica. J. CRAMER, Berlin, Stuttgart.

Lenzenweger, R., 2002 [cit. 19.7.2018]. *Euastrum* (Tafel II). Zieralgen, Schmuckalgen – Desmidiaceen [online]. Dostupné na: <<http://www.hydro-kosmos.de/desmids/tf2800.htm>>.

Liao, D., 1999. Concerted Evolution: Molecular Mechanism and Biological Implications. - *The American Journal of Human Genetics* 64, 24–30.

Lodish, H., Berk, A., Zipurski, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000[cit. 1.8.2018]. Section 7.1 DNA Cloning with Plasmid Vectors.,- in: *Molecular Cell Biology*. 4th Edition . W. H. Freeman, New York [online]. Dostupné na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/#_ncbi_dlg_citbx_NBK21498>.

Lopes, M.R.M., Bicudo, C.E. de M., 2002. Desmidioflórula de um lago da planície de inundação do rio Acre, estado do Amazonas, Brasil. Desmid Flora of the Flood Plain Lake, Acre River, Amazonas State, - *Brazil. Acta Amazonica* 33, 167–212.

- Manhart, J.R., McCourt, R.M., 1992. Molecular data and species concepts in the algae. - *J. Phycol.* 28, 730–737.
- Mann, D.G., Evans, K.M., 2007. Molecular genetics and the neglected art of diatomics, - in: Brodie, J., Lewis, J. (Eds.), *Unravelling the Algae, the Past, Present, and Future of Algal Systematics*. CRC Press, Boca Raton, pp. 231–265.
- Martello, G.V., 2006. Alcune desmidiacee della zona di Caldenave e della Val d'Inferno - Massiccio montuoso dei Lagorai (Trento). - *Informatore Botanico Italiano* 38, 513–536.
- 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. - *J. Phycol.* 36, 747–758.
- Medvedova, L.A., 2001. Biodiversity of aquatic algal communities in the Sikhote-Alin biosphere reserve (Russia). - *Cryptogamie: Algologie* 22, 65–100.
- Meneghini, J., 1840. Synopsis Desmidiarum hucusque cognitarum. - *Linnaea: Ein Journal für die Botanik in ihrem ganzen Umfange* 14, 201–240.8.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A.W., Rosenbluth, M.N., Teller, A.H., Teller, E., 1953. Equations of state calculations by fast computing machines. - *J. Chem. Phys.* 21, 1087–1091.
- Mout, J., 2012-2015[cit. 19.7.2018]. Sieralgen. BIOLOGIE en GEOLOGIE [online]. Dostupné na: <<http://www.sieralgen.nl/>>
- na:<http://dbmuseblade.colorado.edu/DiatomTwo/sbsac_site/species.php?g=Euastrum&s=didelta>.
- NCBI, 2017 [cit.1.8.2018].GenBank. National Center for Biotechnology Information[online].Dostupné na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>.
- NCBI, 2017[cit.12.8.2018]. GenBank. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [online]. Dostupné na:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Nemjová, K., Neustupa, J., Šťastný, J., Škaloud, P., Veselá, J., 2011. Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*. - *Phycol. Res.* 59, 208–220.
- Neustupa, J., Černá, K., Šťastný, J., 2011a. The effects of aperiodic desiccation on the diversity of benthic desmid assemblages in a lowland peat bog. - *Biodivers. Conserv.* 20, 1695–1711.
- Neustupa, J., Černá, K., Šťastný, J., 2009. Diversity and morphological disparity of desmid assemblages in Central European peatlands. - *Hydrobiologia* 630, 243–256.
- Neustupa, J., Škaloud, P., Šťastný, J., 2010. The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis*/ *M. radians* species complex. - *J. Phycol.* 46, 703–714. doi:10.1111/j.1529-8817.2010.00863.x
- Neustupa, J., Šťastný, J., 2006. The geometric morphometric study of Central European species of the genus *Micrasterias* (Zygnematophyceae, Viridiplantae). - *Preslia* 78, 253–263.

- Neustupa, J., Šťastný, J., Hodač, L., 2008. Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. - *Aquat. Microb. Ecol.* 51, 77–86.
- Neustupa, J., Šťastný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Goodyer, E., Pouličková, A., Škaloud, P., 2011b. A novel, combined approach to assessing species delimitation and biogeography within the well-known desmid species *Micrasterias fimbriata* and *M. rotata* (Desmidiaceae, Streptophyta). - *Hydrobiologia* 667, 223–239.
- Opitz, A. 2018 [cit. 19.7.2018]. *Euastrum didelta* Ralfs. Die Moore im Tiroler Bezirk Kitzbühel. Galerien [online]. Dostupné na: <<https://www.moor-impressionen.at/galerien/pic-1001799.htm>>.
- Pals, A., Elst, D., Muylaert, K., Van Assche, J., 2006. Substrate specificity of periphytic desmids in shallow softwater lakes in Belgium. - *Hydrobiologia* 568, 159–168.
- Patterson, A.J., Chamberlain, B., Thayer, D., 2004. *FinchTV*. Geospiza Research Team.
- Plewka, M., 2011 [cit. 19.7.2018]. *Euastrum humerosum*. Pling [online]. Dostupné na: <http://www.plingfactory.de/Science/Atlas/Kennkarten%20Algen/01_e-algae/Conjugaphyceae/e-source/Euastrum%20humerosum.html>.
- Potapova, M., Hamilton, P.B., 2007. Morphological and Ecological Variation within the *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex. - *J. Phycol.* 43, 561–575.
- Pouličková, A., Veselá, J., Neustupa, J., Škaloud, P., 2010. Pseudocryptic Diversity versus Cosmopolitanism in Diatoms: a Case Study on *Navicula cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and Morphologically Similar Taxa. - *Protist* 161, 353–369.
- Prescott, G.W., Croasdale, H.T., Vinyard, W.C., 1977. *A synopsis of North American desmids*. 2,2: Desmidiaceae: Placodermata, Section 2. University of Nebraska Press, Lincoln.
- Prescott, G.W., Scott, A.M., 1942. The Fresh-Water Algae of Southern United States I. Desmids from Mississippi, with Descriptions of New Species and Varieties. - *T. Am. Microsc. Soc.* 61, 1.
- Prescott, G.W., Scott, A.M., 1945. The Fresh-Water Algae of Southern United States III, The Desmid Genus *Euastrum*, with Descriptions of Some New Varieties. - *Am. Midl. Nat.* 34, 231.
- Pröschold, T., Bock, C., Luo, W., Krienitz, L., 2010. Polyphyletic distribution of bristle formation in Chlorellaceae: *Micractinium*, *Diacanthos*, *Didymogenes* and *Hegewaldia* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). - *Phycol. Res.* 58, 1–8.
- Protist Information Server, 1995-2018 [cit. 11.7.2018]. *Euastrum humerosum*. Chlorophyta. Protist Information Server [online]. Dostupné na: <<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Euastrum/humerosum/index.html>>.
- Protist Information Server, 1995-2018 [cit. 11.7.2018]. *Euastrum affine*. Chlorophyta. Protist Information Server [online]. Dostupné na: <<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Euastrum/affine/index.html>>.
- Protist Information Server, 1995-2018 [cit. 11.7.2018]. *Euastrum didelta*. Chlorophyta. Protist Information Server [online]. Dostupné na: <<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Euastrum/didelta/index.html>>.

- Protist Information Server, 1995-2018[cit. 11.7.2018]. *Euastrum*. Chlorophyta. Protist Information Server[online]. Dostupné na: <<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Euastrum/index.html>>.
- Raciborski, M., 1885. Opisy nowych Desmidiów polskich (Tablica X-XIV). De Nonnullis Desmidiaceis novis vel minus cognitis, quae in Polonia inventae sunt. Cum tabulis V. - *Pamiętnik Wydz. III. Akad. Umiej. w Krakowie* 10, 57–100.
- Ralfs, J., 1844. XXV. - On the British Desmidiaceae. - *Ann. mag. nat. hist.* 14, 187–194.
- Ralfs, J., 1848. *The British Desmidiaceae*. Reeve, Benham and Reeve, London.
- Ramos, G.J.P., de Oliveira, I.B., Moura, C.W. do N., 2011. Desmídias de ambiente fitotelmata bromelicola da Serra da Jiboia, Bahia, - *Brasil. R. bras. Bioci* 9, 103–113.
- Rédei, G.P., 2008. Chloroplast Genetics, - in: *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 335–338.
- Rohlf, F.J., 2013. tpsUtil ver.1.60, tps Utility program. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2014. tpsRelw ver. 1.54, tps Relative warps. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2015. tpsDig2 Version 2.18, tps. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2016a. tps Small32, tps. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2017a. Tpsrelww32 v. 1.67, tps Relative warps. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2017b. tps Utilw32, tps Utility program. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2016b [cit. 12.8.2018]. A glossary for Geometric Morphometrics. Morphometrics at SUNY Stony Brook[online]. Dostupné na: <<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>>.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. - *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayers, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. - *Systematic Biol.* 61, 539–542.
- Růžička, J., 1977. *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*, Band 1. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 2 seš., 736 pp.
- Růžička, J., 1981. *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*, Band 1, 2. Lieferung. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele un. Obermiller), Stuttgart.
- Sáez, A.G., Lozano, E., 2005. Body doubles. - *Nature* 433, 111–111.
- Salisbury, R.K., 1936. The Desmids of Florida. Ohio - *Jour. Sci* 36, 55–61.

- Santos, L. 2007[cit. 9.7.2018]. ACOI Cultures. ACOI. Coimbra Collection of Algae [online]. Dostupné na: <http://acoi.ci.uc.pt/acoi_list.php>.
- Scipion, 2017 [cit. 10.7.2018]. Quelques desmidiées. Le Naturaliste Forum. De la loupe au microscope... Vos observations macro et microscopiques! [online]. Dostupné na: <<http://www.lenaturaliste.net/forum/viewtopic.php?f=135&t=20075&p=110942&hilit=euastrum+humerosum#p110942>>.
- Scott, A.M., Prescott, G.W., 1958. Some freshwater algae from Arnhem land - in the *Northern Territory of Australie. Records of the American-Australian scientific expedition to Arnhem Land* 3 3, 9–136.
- Scott, A.M., Prescott, G.W., 1961. Indonesian Desmids. - *Hydrobiologia* 17, 1–259.
- Schindelin, J., Rueden, C.T., Hiner, M.C., Eliceiri, K.W., 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. - *Mol. Reprod. Dev.* 82, 518–529. doi:10.1002/mrd.22489
- Schwarzott, D., Schüßler, A., 2001. A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. - *Mycorrhiza* 10, 203–207.
- Sousa, V., Hey, J., 2013. Understanding the origin of species with genome-scale data: modelling gene flow. - *Nat. Rev. Genet.* 14, 404–414.
- South, G.R., 1984. Taxonomic implications of morphometric variation in a bloom population of *Euastrum didelta* (Chlorophyta: Desmidiaceae). - *Phycologia* 23, 47–52.
- Stancheva, R., Sheath, R., Kociolek, P., Fetscher, B., and Fuller, C. [cit.10.7.2018]. *Euastrum didelta* Turpin ex Ralfs. Soft-Bodied Stream Algae of California [online]. Dostupné na: <http://dbmuseblade.colorado.edu/DiatomTwo/sbsac_site/species.php?g=Euastrum&s=didelta>.
- Starr, R.C., 1955. Isolation of sexual strains of placoderm desmids. - *Bull. Torrey Bot. Club* 82, 261–265.
- Škaloud, P., 2006 [cit. 9.7.2018]. *Euastrum*. Sinice a řasy.cz – galerie [online]. Dostupné na: <<http://galerie.sinicearasy.cz/galerie/streptophyta/zygnemophyceae/euastrum>>.
- Škaloud, P., 2010 [cit. 9.7.2018]. Media recipes. CAUP. Culture Collection of Algae of Charles University in Prague [online]. Dostupné na: <<https://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media.html>>
- Škaloud, P., Kynčlová, A., Benada, O., Kofroňová, O., Škaloudová, M., 2012b. Toward a revision of the genus *Synura*, section Petersenianae (Synurophyceae, Heterokontophyta): morphological characterization of six pseudo-cryptic species. - *Phycologia* 51, 303–329.
- 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. - *Mol. Phylogenet. Evol.* 61, 933–943.
- Škaloud, P., Šťastný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Poulíčková, A., Neustupa, J., 2012a. Molecular phylogeny of baculiform desmid taxa (Zygnematophyceae). - *Plant Syst. Evol.* 298, 1281–1292.
- Šťastný, J., 2007. Die Desmidiaceenflora von Piskovny Cep (Südböhmen). - *Novit. Bot. Univ. Carol.* 18, 53–62.
- Šťastný, J., 2010. Desmids (Conjugatophyceae, Viridiplantae) from the Czech Republic; new and rare taxa, distribution, ecology. - *Fottea* 10, 1–74.

- Šťastný, J., Kouwets, F.A.C., 2012. New and remarkable desmids (Zygnematophyceae, Streptophyta) from Europe: taxonomical notes based on LM and SEM observations. - *Fottea* 12, 293–313.
- Šťastný, J., Škaloud, P., Langenbach, D., Nemjová, K., Neustupa, J., 2013. Polyphasic evaluation of *Xanthidium antilopaeum* and *Xanthidium cristatum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) species complex. - *J. Phycol.* 49, 401–416.
- Štěpánková, J., Hašler, P., Hladká, M., Pouličková, A., 2012. Diversity and ecology of desmids of peat bogs in the Jeseníky Mts: spatial distribution, remarkable finds. - *Fottea* 111–126.
- Štěpánková, J., Vavrušková, J., Hašler, P., Mazalová, P., Pouličková, A., 2008. Diversity and ecology of desmids of peat bogs in the Jizerské hory Mts. - *Biologia, Section Botany* 63, 895–900.
- Tamura, K., 1992. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases. - *Mol. Biol. Evol.* 9, 678–687.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. - *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Tangen, K., Haworth, E.Y., Brettrum, P., Müller, C., 1978. An annotated check-list of microalgae from Ovre Hemdalsvatn and its tributaries. - *Holarctic. Ecol.* 1, 155–161.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. - *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Trobajo, R., Clavero, E., Chepurinov, V.A., Sabbe, K., Mann, D.G., Ishihara, S., Cox, E.J., 2009. Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae). - *Phycologia* 48, 443–459.
- Turmel, M., Otis, C., Lemieux, C., 2005 [cit. 2013-05-13]. The complete chloroplast DNA sequences of the charophycean green algae *Staurastrum* and *Zygnema* reveal that the chloroplast genome underwent extensive changes during the evolution of the Zygnematales [online]. - *BMC Biol.* 3. Dostupné na: <<http://www.biomedcentral.com/1741-7007/3/22>>.
- Turpin, P.J.F., 1828. 3. Aperçu organographique sur le nombre deux. - *Mus. Hist. Nat. Mém.* XIV, 295–344.
- U.S. Army (United States Army Service Forces), 1949 [cit. 12.8.2018]. Ocean Currents and Sea Ice from Atlas of World Maps, United States Army Service Forces, Army Specialized Training Division. Army Service Forces Manual M-101 [online]. Dostupné na: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ocean_currents_1943.jpg>.
- Veselá, J., Neustupa, J., Pichrtová, M., Pouličková, A., 2009. Morphometric study of *Navicula* morphospecies (Bacillariophyta) with respect to diatom life cycle. - *Fottea* 9, 307–316.
- Wagner, R., 2005-2014 [cit. 20.7.2018]. Zygnematales. Dr. Ralph Wagner [online]. Dostupné na: <<http://www.dr-ralf-wagner.de/index-englisch.htm>>.
- Wallich, G.C., 1860. XXI. - Descriptions of Desmidiaceae from Lower Bengal. - *Ann. & Mag. Nat. Hist.* S3., V., 184–197.

- Wei, Y., 1991. SEM study of cell walls of 24 desmids (Desmidiaceae, Chlorophyta) from China. - *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 9, 263–276.
- Weisse, T., 2008. Distribution and diversity of aquatic protists: an evolutionary and ecological perspective.- *Biodivers. Conserv.* 17, 243–259.
- West, W., West, G.S., 1905. *A monograph of the British Desmidiaceae*. Ray Society, London.
- Wolle, F., 1892. New and Enlarged Edition. *Desmids of the United States and List of American Pediastrums With Nearly Fourteen Hundred Illustrations on Sixty-Four Colored Plates*. Moravian Publication Office, Bethlehem, PA.
- Woodhead, N., Tweed, R.D., 1958. A check list of tropical West African algae: (Fresh- and Brackish- water). - *Hydrobiologia* 11, 299–396.
- Zelditch, M. (Ed.), 2004. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston.

8. Příloha

Tab. 8.1. Geografické rozšíření druhového komplexu *Euastrum humerosum didelta* (affi-*E. affine*/*E. humerosum* var. *affine*, ben- *E. didelta* var. *bengalicum*, cun - *E. didelta* var. *cuneatiforme*, den - *E. didelta* var. *denticulatum*, did – *E. didelta*, hum - *E. humerosum*, par - *E. humerosum* var. *parralelum*, qua - *E. didelta* var. *quadriceps*, scr - *E. humerosum* var. *scrobiculata*, tru - *E. didelta* var. *truncata*, při neuvedení morfotypu, byly přítomny všechny vyznačené morfotypy).

Lokalita výskytu	affi	did	hum	zdroj
<i>Západní Evropa</i>				
- Anglie	x	x	x	Ralfs, 1848; Cooke, 1887; West & West, 1905
- Irsko	x	x	x	Ralfs, 1848, West & West, 1905; John & Wiliamson, 2009 (did)
- Skotsko	x	x		Ralfs, 1848; Cooke, 1887 (affi,did); West & West, 1905
- Wales	x	x	x	Ralfs, 1848; Cooke, 1887; West & West, 1905
- Faerské ostrovy		x	x	West & West, 1905
- Francie	x	x	x	Cooke 1887; West & West 1905; Ducellier, 1915 (did); Deflandre, 1926 (did,hum); André, 2008 (affi),2017 (did); Scipion,2017(affi)
- Nizozemí	x	x	x	Coesel & Meesters, 2007; Wagner,2008(hum); Mout,2012(hum)
<i>Severní Evropa</i>				
- Dánsko	x	x		Cooke, 1887; West & West, 1905;
- Finsko	x	x	x	West & West, 1905 (did, hum); Krieger, 1937 (tru); Lenzenweger, 1976 (affi)
- Norsko	x	x	x	Cooke, 1887; West & West, 1905; Tangen, 1978 (did)
- Švédsko	x	x	x	Cooke, 1887; West & West, 1905; Borge, 1906 (affi, scr); Krieger, 1937 (par); Florin, 1957 (did)
<i>střední Evropa</i>				
	x	x	x	Růžička, 1981
- Česká republika	x	x	x	Šťastný, 2007 (did, hum), 2010 (affi, hum; pískovna Cep, jižní Čechy); Štěpánková et al., 2008 (did, hum; Na Kneipě, Quarre, Jizerské hory)
- Německo	x	x	x	Cooke, 1887 (did); West & West, 1905; Fromm, 2014 (hum); Plewka, 2011 (hum)
- Polsko	x	x	x	Raciborski,1885; West & West, 1905; (hum): Grabowska, 2014 (hum) ; Lenarczyk et al., 2015, did,hum, Z. Karpaty)
- Rakousko	x	x	x	West & West, 1905 (did,hum); Lenzenweger, 1996
- Slovensko			x	Škaloud, 2006 (hum, CHKO Vihorlat, přírodní rezervace Postávka)
- Švýcarsko		x		Ducellier, 1918 (did, hum); Krieger, 1937 (den)
<i>Východní Evropa</i>				
- Litva		x		Briskaite et al., 2008 (tru)
- Rumunsko	x	x	x	Caraus, 2012
- Rusko	x	x		Cooke, 1887 (did, Laponsko); West & West, 1905

Tab. 8.1 - pokračování

<i>Lokalita výskytu</i>	<i>affi</i>	<i>did</i>	<i>hum</i>	<i>zdroj</i>
<i>jižní Evropa</i>				
-Azorské oo.		<i>x</i>		West & West, 1905
- Itálie		<i>x</i>	<i>x</i>	Cooke, 1887; West & West, 1905; Martello, 2006 (did)
- Portugalsko		<i>x</i>	<i>x</i>	Santos, 2007
- Španělsko (Galicie)		<i>x</i>	<i>x</i>	West & West, 1905
<i>Severní Amerika</i>				
- Grónsko		<i>x</i>		West & West, 1905
- Kanada, Labrador	<i>x</i>	<i>x</i>		Croasdale & Grönblad, 1964 (tru);
- Kanada,		<i>x</i>		Lakshminarayana, 1976; South,1984
New Foundland				
- USA		<i>x</i>	<i>x</i>	Wolle, 1892 (did - rozšířený, affi, od Pensylvánie po Georgii); Prescott & Scott, 1942 (did, Mississippi)
-Florida, Pensylvánie	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	Cooke, 1887; Wolle (1892, Pensylvánie); West & West, 1905; Brown, 1930 (affi,did, Florida); Salisbury, 1936 (hum)
<i>Jižní Amerika</i>				
- Brazílie		<i>x</i>		Krieger, 1937 (qua); Lopes & Bicudo, 2002 (qua); de Oliveira et al., 2011 (qua)
- Kolumbie		<i>x</i>		Krieger, 1937 (qua)
- Paraguay		<i>x</i>		West & West, 1905
<i>Asie</i>				
- Bangladěš		<i>x</i>		Islam & Irfanullah, 2006
- Srí Lanka		<i>x</i>		West & West, 1905; Krieger, 1937 (ben)
- Indie	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	West & West, 1905 Krieger, 1937 (ben)
- Japonsko	<i>x</i>		<i>x</i>	Protist Information Server, 1995-2018
- východní Čína	<i>x</i>			Wei, 1991; Medvedova, 2001
<i>Afrika</i>				
- Sierra Leone	<i>x</i>			Woodhead & Tweed, 1958
<i>Austrálie a Indonésie</i>				
- Austrálie		<i>x</i>		Scott & Prescott, 1958 (ben)
- Borneo		<i>x</i>		Scott & Prescott, 1961 (ben)
- Jáva		<i>x</i>		Krieger, 1937 (cun)
- Sumatra		<i>x</i>		Scott & Prescott, 1961 (ben, cun)

Tab. 8.2. Receptura pro modifikované médium DY IV (upraveno podle Škalouda, 2010).

<i>objem</i>	<i>zásobní roztok</i>	<i>koncentrace [g/100ml H₂O]</i>
1 ml	MgSO ₄ · 7H ₂ O	5
1 ml	KCl	0,3
1 ml	NH ₄ Cl	0,268
1 ml	NaNO ₃	2
1 ml	β – glycerolfosfát	0,216
1 ml	H ₃ BO ₃	0,08
1 ml	Na ₂ EDTA	0,7
1 ml	Na ₂ SiO ₃	0,6
1 ml	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,166
1 ml	CaCl ₂	7,5
243 mg	HEPES (CaH _{17,5} N ₂ O ₄ S · 0,5Na)	-

Tab. 8.3. Roztok stopových prvků (upraveno podle Škalouda, 2010).

<i>složka</i>	<i>koncentrace [mg/1000 ml vody]</i>
MnCl ₂ ·4H ₂ O	31,4
MnSO ₄ ·H ₂ O	4,5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,46
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2,35
NH ₄ VO ₃	0,13
Na ₂ SeO ₃	0,27

Tab. 8.4. Roztok vitaminů (upraveno podle Škalouda, 2010)

<i>složka</i>	<i>koncentrace [mg/1000 ml vody]</i>
vitamin B12	5
thiaminHCl	10

Tab. 8.5. Seznam kultur (ACOI kultury; Santos, 2007; kultivace kmenů E9-E15 autorem; ident.-identifikace).

<i>jméno</i>	<i>kód kmenu</i>	<i>lokality</i>	<i>odběr vzorku</i>	<i>jméno vzorku</i>
<i>E. humerosum</i> var. <i>affine</i>	E9	Maine, USA	Pavla Urbánková	Maine, mech
<i>E. everettense</i>	E10	Maine, USA	Pavla Urbánková	Maine, mech
<i>E. humerosum</i>	E12	Abisko, Švédsko	Helena Bestová	SA8
<i>E. humerosum</i>	E15	Quarre, ČR	Eva Kupčíková	Quarre 3
<i>E. humerosum</i>	K1	Serra da Estrela, Portugalsko	1988 odběr O. Lourenço, ident. M. F. Santos 1989	ACOI 351
<i>E. humerosum</i>	K2	Serra da Estrela, Portugalsko	1996 odběr a ident. L. Santos	ACOI 947
<i>E. humerosum</i>	K3	Montesinho, Portugalsko	1995 odběr M. F. Santos a ident. 1996	ACOI 934
<i>E. didelta</i>	K4	Serra do Gerês, Portugalsko	1987 odběr J. Montezuma de Carvalho , ident. M. F. Santos 1988	ACOI 305
<i>E. humerosum</i>	K7	oo. Lofoty, Norsko	Katarina Nemjová	
<i>E. humerosum</i>	K8	oo. Lofoty, Norsko	Katarina Nemjová	
<i>E. humerosum</i>	K9	oo. Lofoty, Norsko	Katarina Nemjová	
<i>E. humerosum</i>	K14	NP Rago, Norsko	Katarina Nemjová	
<i>E. humerosum</i>	K15	NP Rago, Norsko	Katarina Nemjová	
<i>E. humerosum</i>	K23	NP Rago, Norsko	Katarina Nemjová	
<i>E. humerosum</i> var. <i>affine</i>	K27	Kanada	Jan Šťastný	PS7
<i>E. humerosum</i> var. <i>affine</i>	K28	Kanada	Jan Šťastný	PS7
<i>E. humerosum</i> var. <i>affine</i>	K27	Kanada	Jan Šťastný	PS7
<i>E. humerosum</i> var. <i>affine</i>	K28	Kanada	Jan Šťastný	PS7
<i>E. humerosum</i> var. <i>affine</i>	K32	Švédsko	Jan Šťastný	SWE SJ15

Tab. 8.5 - pokračování.

<i>jméno</i>	<i>kód kmenu</i>	<i>lokality</i>	<i>odběr vzorku</i>	<i>jméno vzorku</i>
<i>E. humerosum</i>	K53	Pískovna u Borkovických Blat, ČR	Jan Šťastný	Pískovna u BB
<i>E. humerosum</i>	K54	Pískovny, Cep, ČR	Jan Šťastný	Pískovny, Cep
<i>E. humerosum</i>	K55	Rod, ČR	Eva Kupčíková odběr, kultivace Jan Šťastný	Rod
<i>E. humerosum</i> var. <i>affine</i>	K56	Švédsko	Jan Šťastný	SWE 12
<i>E. humerosum</i> cf <i>humerosum</i>	K57	Švédsko	Jan Šťastný	SWE 34
<i>E. humerosum</i>	K61	Švédsko	Jan Šťastný	SWE 21
<i>E. humerosum</i>	K62	Švédsko	Jan Šťastný	SWE SJ15

Tab. 8.6. Rozměry semicely pro pět podskupin (z linie A: humerosum-didelta/humerosum, B: scandinave, C: affine-didelta/humerosum).

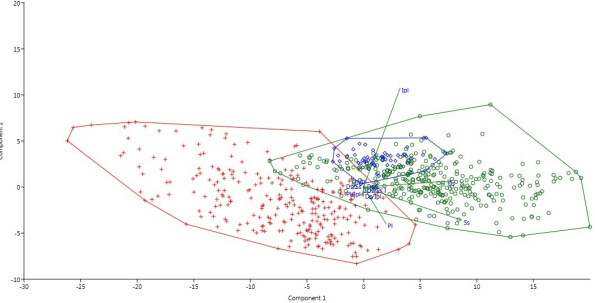
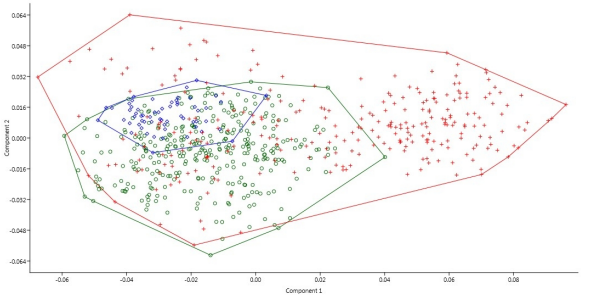
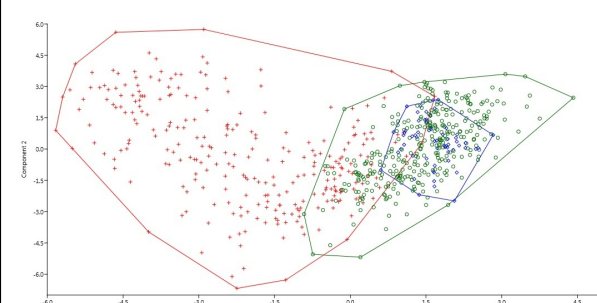
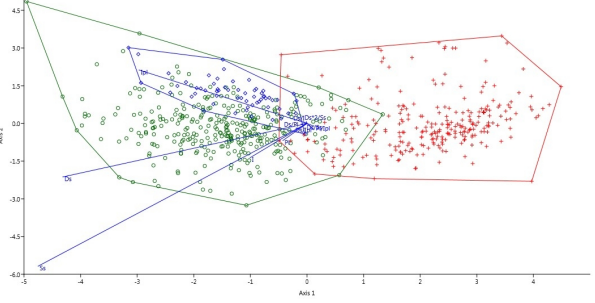
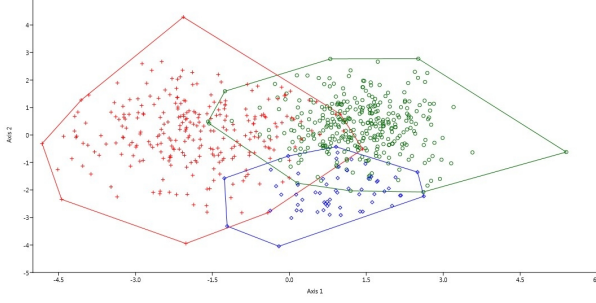
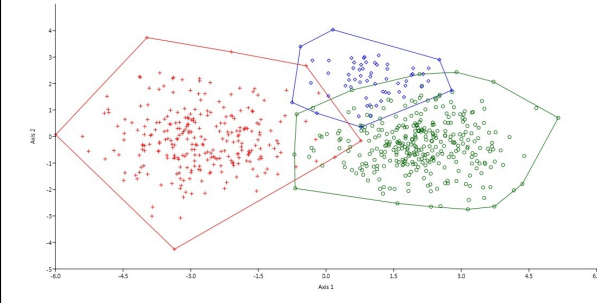
	délka semicely	šířka	isthmus
<i>humerosum-didelta</i>	(56,92)-59,72-67,95-(72,15)	(66,14)-68,16-80,69-(86,77)	(17,26)-19,91-24,1-(28,38)
<i>humerosum-humerosum</i>	(51,7)-56,5-66,56-(70,3)	(61,91)-67,23-78,63-(82,21)	(15,34)-17,72-22,38-(24,68)
<i>scandinave</i>	(55,75) - 57,72-62,5 - (64,31)	(65,56) - 66,08-71,65 - (73,99)	(17,63) - 18,36-20,79 - (22,25)
<i>affine-didelta</i>	(39,53)-46,02-57,15-(60,09)	(49,34)-54,23-69,62-(72,94)	(14,9)-16,45-22,24-(23,81)
<i>affine-affine</i>	(46,61)-50,85-59,42-(63,17)	(54,01)-61,31-69,78-(74,57)	(13,07)-16,92-20,18-(23,14)
	poměr délka/šířka	polární lalok	isthmus polárního laloku
<i>humerosum-didelta</i>	(1,53)-1,59-1,84-(1,9)	(24,66)-27,32-32,18-(34,88)	(23,35)-25,13-30,55-(33,1)
<i>humerosum-humerosum</i>	(1,47)-1,59-1,82-(1,91)	(23,47)-26,77-32,28-(35,47)	(22,47)-25,1-30,89-(37,39)
<i>scandinave</i>	(1,6) - 1,67-1,84 - (1,87)	(26,61) - 27,64-30,09 - (30,51)	(25,93) - 27,63-30,47 - (33,21)
<i>affine-didelta</i>	(1,47)-1,57-1,85-(2,03)	(19,23)-21,13-28,61-(30,99)	(16,17)-20,17-27,47-(30,34)
<i>affine-affine</i>	(1,49)-1,57-1,79-(2,09)	(23,52)-28,01-33,81-(37,4)	(17,66)-19,26-23,98-(26,43)

Tab. 8.7. Poměry rozměrů semicely pro molekulární linie trnG intronu. Ds – délka semicely, I- isthmus, Ipl – isthmus polárního laloku, Pl – polární lalok, Ss – šířka semicely (viz obr. 4.1).

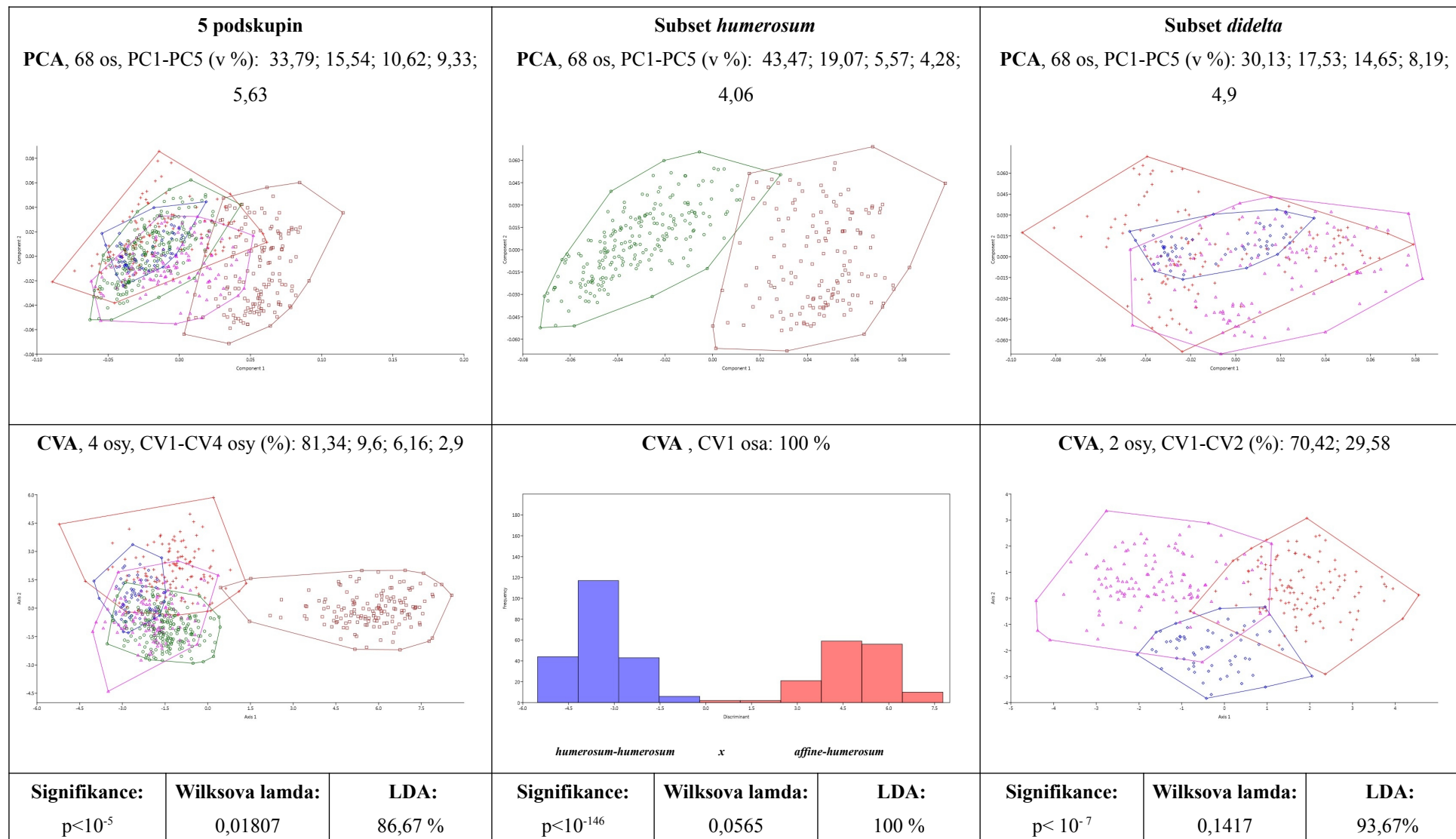
	<i>Ds/Ss</i>	<i>Ds/I</i>	<i>Ds/Pl</i>
<i>Linie A</i>	(0,74) - 0,79-0,91 - (0,96)	(2,16) - 2,65-3,45 - (4,08)	(1,8) - 1,94-2,35 - (2,52)
<i>Linie B</i>	(0,8) - 0,84-0,92 - (0,94)	(2,58) - 2,81-3,3 - (3,53)	(1,93) - 2-2,18 - (2,23)
<i>Linie C</i>	(0,74) - 0,78-0,91 - (1,04)	(2,15) - 2,49-3,25 - (3,79)	(1,49) - 1,68-2,22 - (2,64)
	<i>Ds/Ipl</i>	<i>Pl/Ipl</i>	
<i>Linie A</i>	(1,8) - 2,01-2,51 - (2,83)	(0,84) - 0,98-1,15 - (1,29)	
<i>Linie B</i>	(1,78) - 1,94-2,23 - (2,33)	(0,86) - 0,92-1,08 - (1,1)	
<i>Linie C</i>	(1,44) - 1,97-2,9 - (3,22)	(0,92) - 1,03-1,62 - (1,84)	

Tab. 8.8-8.11. Přehledové tabulky pro grafy PCA a CVA s nejdůležitějšími hodnotami.

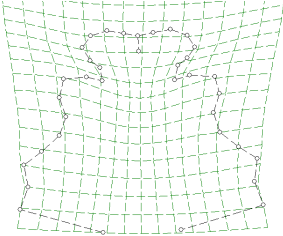
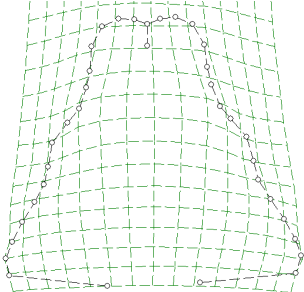
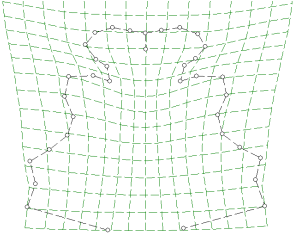
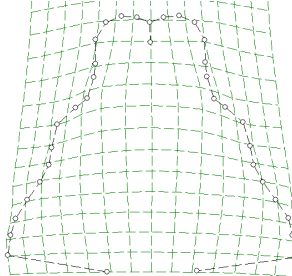
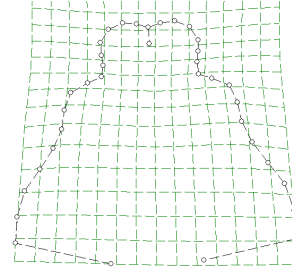
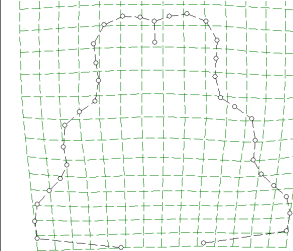
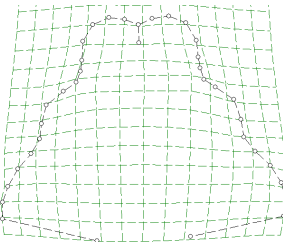
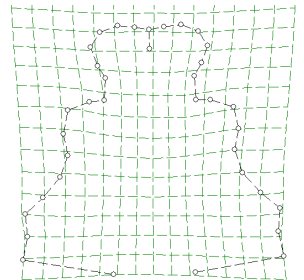
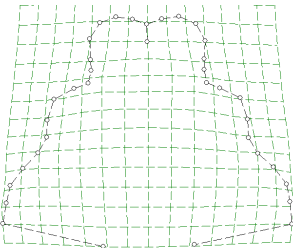
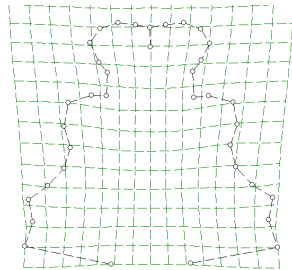
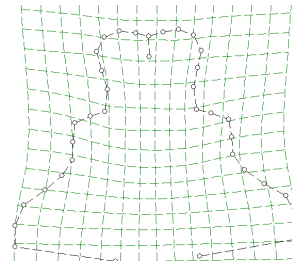
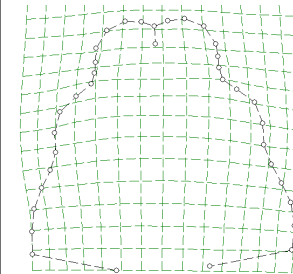
Tab. 8.8: PCA a CVA grafy pro tři linie s hodnotami. Legenda: **zeleně O** – linie A, **modře ◇** – linie B, **červeně +** – linie C. M – měření (rozměry a poměry), GM – geometrická morfometrika, Ds - Délka semicely, Ss – Šířka semicely, I – Isthmus, Pl – Polární lalok, Ipl – Isthmus polárního laloku; signifikance je Bonferroniho korelovaná p-hodnota

<p>M- PCA, 11 os, PC1-PC5 (v %): 31,24; 24,78;21,2;12,7;9,62, korelace</p>  <p>PC1 – Ds, S; PC2 -Ipl; PC3,4 -Pl; PC5 -I</p>			<p>GM - PCA, 68 os, PC1-PC5 (v %): 33,79; 15,54; 10,62; 9,33; 5,63</p> 			<p>GM+ M – PCA, 79 os, PC1-PC5 (v %): 5,96; 4,84; 3,93;2,83;2,37; korelace</p> 		
<p>M- CVA, 2 osy, CV1-CV2 (%): 95,72, 4,28</p> 			<p>GM – CVA, 2 osy, CV1 -CV2 (%): 84,51; 15,49</p> 			<p>GM+M – CVA, 2 osy, CV1-CV2 (%): 92,04 %; CV2 7,97</p> 		
Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:	Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:	Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:
$p < 10^{-12}$	0,21	85,15 %	$p < 10^{-14}$	0,20	88,79 %	$p < 10^{-16}$	0,09	95,3%

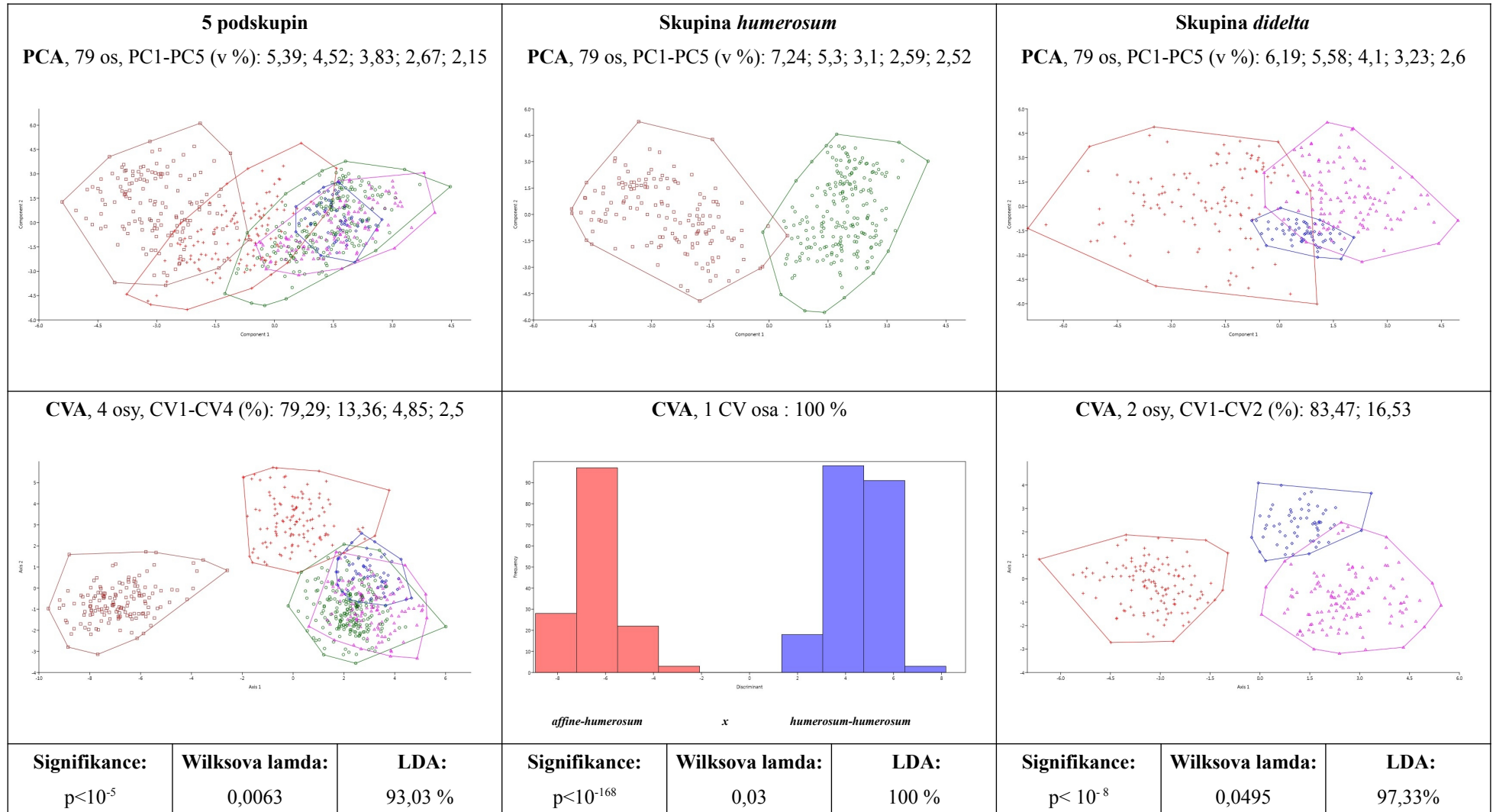
Tab.8.9. PCA a CVA grafy pro 5 podskupin, a subtedy humerosum a didelta s geometricko-morfometrickými daty: □ - *affine-humerosum*; + *affine-didelta*; △ *humerosum-didelta*; ○ *humerosum-humerosum*; ◇ *scandinave*



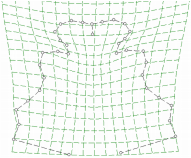
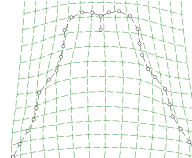
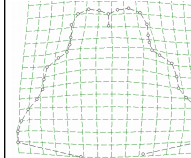
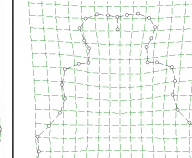
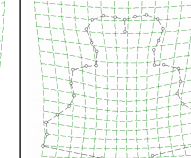
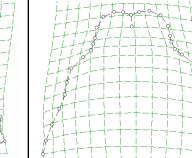
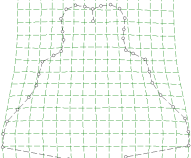
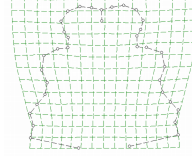
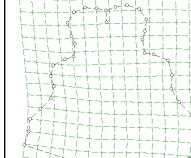
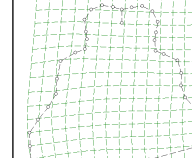
Tab. 8.10. Význam PC os pro 5 podskupin a dva subsety *humerosum* a *didelta* s geometricko-morfometrickými daty (hum - morfotyp *E. humerosum*, did – morfotyp *E. didelta*)

5 podskupin:		Subset <i>humerosum</i>		Subset <i>didelta</i>	
<p>Jako pro 3 skupiny pro GM (viz graf 4.5): PC1 + hum, - didelta, PC2 + široký krk, - úzký krk, PC3 + vykrojené laloky, PC4 + široká báze, -úzká báze, PC5 náklon bazálního laloku</p>		<p>PC1 + hum, - did, PC2 + šířka krku, - úzký krk a další laloky, vroubkování bazálního laloku</p>		<p>PC1 + široce zvonovitý tvar s krátkým krkem a širokou bází, - pravidelné laloky s delším krkem; PC2 + úzký zvonovitý tvar s úzkým polárním lalokem, - vyboulený tvar se širokým krkem a laloky</p>	
PC1 kladná	PC1 záporná	PC1 kladná	PC1 záporná	PC1 kladná	PC1 záporná
					
PC2 kladná	PC2 záporná	PC2 kladná	PC2 záporná	PC2 kladná	PC2 záporná
					

Tab.8.11. PCA (korelovaná) a CVA grafy pro 5 podskupin, a subsety *humerosum* a *didelta* s geometricko-morfometrickými daty a měřením (rozměry a poměry): □ - *affine-humerosum*; + *affine-didelta*; Δ *humerosum-didelta*; O *humerosum-humerosum*; ◇ *scandinave*; k - korelace.



Tab. 8.12. Rozklad variability pro celý druhový komplex *Euastrum humerosum/didelta*, pro kladnou a zápornou část osy (grafický výstup tps.Relw, použito z archivu autora)

<i>Euastrum humerosum/didelta</i>					
PC1; 33,79 %		PC2; 15,54 %		PC3; 10,62 %	
+	-	+	-	+	-
					
<i>Euastrum humerosum/didelta</i>					
PC4; 9,33 %		PC5; 5,63 %			
+	-	+	-		
					

Tab.8.13. LDA výsledky krásivek z literatury. GM – geometrická morfometrika, GM+MP – GM v kombinaci rozměrů a jejich poměrů, GM+P - GM s poměry- Class. - klasifikováno, JK – Jackknife. Pracovní skupiny: Linie A: 1 – *humerosum-didelta*, 2 – *humerosum-humerosum*, 3 Linie B Linie C: 4 – *affine-didelta*, 5-*affine-humerosum*. Rozměry: Ds – délka semicely, Ss – šířka semicely, Ipl – istrhmus polárního laloku (šířka krku)

Jméno	Zdroj	Místo	GM		GM+P		GM+MP		Linie. rozměry
			Class.	JK	Class.	JK	Class.	JK	
<i>Euastrum. affine</i>	Brown, 1930, Pl. XIII, Fig. 52	USA, Florida	0	0	0	0	5	5	Ipl<C
<i>dto</i>	Lenzenweger, 1976, Taf. 1, Fig. 6	Finsko, Joensuu	0	0	0	0	0	5	C,?
<i>E. ampullaceum</i>	Lenzenweger, 1976, Taf. 1, Fig. 4	dto	0	3	0	3	0	3	Ds,Ss< B
<i>E. ampullaceum/ didelta</i>	Ducellier, 1918, s.133, Fig. 120 A	Švýcarsko, Zugerberg	0	0	0	2	0	2	A
<i>E. ampullaceum/ humerosum</i>	Ducellier, 1918, s.133, Fig. 120 B	dto	0	0	0	2	0	1	A
<i>E. didelta</i>	André, 2017	Francie, Vosges	0	0	0	4	0	0	?
<i>dto</i>	Brown, 1930, Pl. XIII, Fig. 50	USA, Florida	4	4	0	0	0	0	?,A
<i>dto</i>	Coesel & Meesters, 2007, Pl. 41, Fig. 1	Nizozemí	2	2	0	0	2	2	A
<i>dto</i>	Ducellier, 1915, s. 88, Fig. 18α	Francie, Savojské Alpy, Bisanne	0	0	0	0	0	4	C
<i>dto</i>	Ducellier, 1915, s. 88, Fig. 18β	dto	0	0	4	4	4	4	C
<i>dto</i>	Ducellier, 1915, s. 89, Fig. 21a	dto	4	4	0	0	0	4	C
<i>dto</i>	Ducellier, 1918, Pl. II, 1. řada, 2. zleva	Švýcarsko, Galvernord	0	0	0	3	3	3	A
<i>dto</i>	Ducellier, 1918, Pl. II, 1. řada, 4. zleva	dto	1	1	0	0	0	1	A
<i>dto</i>	Ducellier, 1918, Pl. II, 2. řada, vlevo	dto	1	1	0	0	0	0	> A
<i>dto</i>	Ducellier, 1918, s. 127, Fig. 112	Švýcarsko, túň Luy Sottoz	0	4	0	0	0	4	C
<i>dto</i>	Ducellier, 1918, s. 132, Fig. 119	Švýcarsko, močál Hudelmoos	0	0	0	0	0	1	A
<i>dto</i>	Florin, 1957, Pl. 19, Fig. 17	Švédsko, Södertälje	3	3	0	0	0	0	?
<i>dto</i>	Fromm, 2014, Abb. 134	Německo, Berlín	1	1	0	0	0	0	A
<i>dto</i>	John & Wiliamson, 2009, Pl. 20, Fig. E	Irsko	0	3	0	0	4	4	<C
<i>dto</i>	Lenzenweger, 1967, Taf. VIII, Fig. 2	Rakousko, Ibmer Moor, Horní Rakousy	2	2	0	0	0	0	?A

Tab. 8.13 - pokračování

Jméno	Zdroj	Místo	GM		GM+P		GM+MP		Linie. rozměry
			Class.	JK	Class.	JK	Class.	JK	
<i>E. didelta</i>	Lenzenweger, 1971, Taf. XXXII, Fig. 21	Rakousko, Ibmer Moor, Horní Rakousy	2	2	0	0	0	0	?
<i>dto</i>	Lenzenweger, 1995, Abb. 7, vpravo	Rakousko, Štýrsko,	3	3	0	0	0	0	?
<i>dto</i>	Lenzenweger, 2002, Taf. II, Fig. 9	-	0	4	4	4	3	3	?
<i>dto</i>	Martello, 2006, Fig. 25	Itálie, Val d'Inferno, Monti Lagorai	0	0	0	0	2	2	A
<i>dto</i>	Ralfs, 1848, Tab. XIV, Fig. 1a	Britské oo.	0	0	0	0	0	1	Ds> A
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 4c	Kanada, Fairhaven, Newfoundland	3	3	0	0	0	0	A
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 4f	<i>dto</i>	3	3	0	3	0	0	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 5c	<i>dto</i>	0	0	0	0	0	3	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 5f	<i>dto</i>	3	3	0	0	0	0	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 6a	<i>dto</i>	3	3	0	0	0	0	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 6e	<i>dto</i>	0	2	0	0	0	0	C
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 7b	<i>dto</i>	1	1	1	1	3	3	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 7c	<i>dto</i>	0	0	0	0	0	3	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 8c	<i>dto</i>	3	3	3	3	0	3	C?
<i>dto</i>	Stancheva et al., nepubl.	-	0	0	0	3	3	3	A
<i>dto</i>	West & West, 1905, Pl. XXXV, Fig. 4	-	2	2	2	2	0	0	?, Ds> A
<i>E. didelta fa didelta</i>	South, 1984, Fig. 4b	Kanada, Fairhaven, Newfoundland	0	0	0	3	3	3	A
<i>E. didelta fa intermediae</i>	Ducellier, 1915, Pl. I, Fig. 6	Francie, Savojské Alpy, Bisanne	2	2	0	0	0	0	C
<i>E. didelta fa latior</i>	South, 1984, Fig. 4a	Kanada, Fairhaven, Newfoundland	3	3	0	3	0	3	?
<i>E. didelta fa val Piora</i>	Ducellier, 1915, Pl. I, Fig. 2	Francie, Savojské Alpy, Bisanne	3	3	3	3	0	3	?

Tab. 8.13 - pokračování

Jméno	Zdroj	Místo	GM		GM+P		GM+MP		Linie. rozměry
			Class.	JK	Class.	JK	Class.	JK	
<i>E. didelta</i> var. <i>crassum</i>	South, 1984, Fig. 4h	Kanada, Fairhaven, Newfoundland	0	3	0	0	0	0	C
<i>E. didelta</i> var. <i>everettensiforme</i>	Ducellier, 1915, s. 87, Fig. 16	Francie, Savojské Alpy, Bisanne	0	1	0	0	0	0	C
<i>E. didelta</i> var. <i>inemiforme</i>	Ducellier, 1915, s. 86, Fig. 14	<i>dto</i>	0	4	0	0	0	4	C
<i>E. didelta</i> var. <i>quadriceps</i>	de Oliveira et al., 2011, s. 65, Fig. 11	Brazílie	0	2	0	2	0	2	C
<i>dto</i>	Krieger, 1937, Taf. 67, Fig. 8	-	1	1	0	0	0	0	A
<i>E. didelta</i> var. <i>tatricum</i>	Raciborski, 1885, Tab. XIII, Fig. 3	Polsko, Tatry	0	0	0	2	0	0	
<i>E. didelta</i> var. <i>truncatum</i>	South, 1984, Fig. 9d	Kanada, Fairhaven, Newfoundland	3	2	0	2	0	2	?
<i>E.</i> <i>didelta/ampullaceum</i>	Ducellier, 1915, s. 91, Fig. 27	Francie, Savojské Alpy, Bisanne	1	2	1	1	4	4	C
<i>E. humerosum</i>	Ducellier, 1918, s. 133, Fig. 121	Švýcarsko, močál Hudelmoos	5	5	0	0	0	5	C?
<i>dto</i>	Ducellier, 1918, s. 92, Fig. 63 B	Švýcarsko, Col du Grimsel	0	0	0	0	5	5	C
<i>dto</i>	Ducellier, 1918, s. 92, Fig. 63 C	<i>dto</i>	0	0	4	4	4	4	C
<i>dto</i>	Ells, 1998	-	2	2	2	2	0	0	?
<i>dto</i>	Fromm, 2014, Abb. 133	Německo, Berlín	3	3	3	3	3	3	A
<i>dto</i>	Fromm, 2014, Abb. 135	<i>dto</i>	2	2	2	2	2	2	A?
<i>dto</i>	Mout, 2012	Nizozemí, jezero van Esschenven	0	0	5	5	5	5	?
<i>dto</i>	Plewka, 2011	Německo, Köln	0	0	0	3	0	3	?
<i>dto</i>	Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig. 2a	Britské oo.	0	0	0	0	0	5	?
<i>dto</i>	Škaloud, 2006	Slovensko, Postávka, Vihorlat	2	2	2	2	0	0	?
<i>dto</i>	Wagner, 2008	Nizozemí, Elfenmeer	0	0	0	0	0	2	?

Tab. 8.13 - pokračování

Jméno	Zdroj	Místo	GM		GM+P		GM+MP		Linie. rozměry
			Class.	JK	Class.	JK	Class.	JK	
<i>E. humerosum</i>	Wolle, 1892, Pl. XXXII, Fig. 12	USA.	0	0	0	5	0	0	A
<i>E. humerosum</i> var. <i>affine</i>	André, 2008	Francie, Vosges	0	0	0	0	4	4	C
<i>dto</i>	Coesel & Meesters 2007, Pl. 42, Fig. 2	Nizozemí	0	0	0	5	5	5	C
<i>dto</i>	Gysels et al., 2015, s. 44, Fig. 8, vpravo	<i>dto</i>	0	0	2	2	0	0	Ss<A
<i>dto</i>	Lenzenweger, 1996, Taf. 9, Fig. 13	Rakousko	0	0	0	0	0	5	C
<i>dto</i>	Lenzenweger, 2002, Taf. II, Fig. 10	-	0	0	0	2	4	4	?
<i>dto</i>	Scipion, 2017	Francie, Belledone	0	0	0	0	1	1	Ds>A
<i>E. humerosum</i> var. <i>parralelum</i>	Krieger, 1937, Taf. 69, Fig. 9	-	0	2	0	0	0	0	?
<i>E. sinuosum</i>	West & West, 1905, Pl. XXXVI, Fig. 1	-	0	4	0	4	0	0	Ds<C