

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Botanika



Mgr. Radka Zelená

**Ekologická a taxonomická struktura subaerických nárostů zelených řas na jehlicích
nahosemenných dřevin**

**Ecological and taxonomic structure of subaerial biofilms of green algae on the needles of
gymnospermous trees**

Rigorózní práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Neustupa, Ph.D.

Praha, 2018

Charles University

Faculty of Science

Study programme: Botany



Mgr. Radka Zelená

Ecological and taxonomic structure of subaerial biofilms of green algae on the needles of gymnospermous trees

Ekologická a taxonomická struktura subaerických nárostů zelených řas na jehlicích nahosemenných dřevin

Rigorosum thesis

Supervisor: doc. RNDr. Jiří Neustupa, Ph.D.

Prague, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem rigorózní 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, 2018

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala za dlouholetou a příjemnou spolupráci svému školiteli Jiřímu Neustupovi, který mě po celou dobu mého studia trpělivě podporoval. Poděkování patří i celé mé rodině, díky které jsem mohla svou práci dokončit.

Abstrakt

Aero-terestrické řasy tvoří zřetelné biofilmy na různých přírodních i člověkem vytvořených površích. Jejich taxonomická diverzita je značná, ale dosud zřejmě ne zcela prostudovaná, i když se jí v poslední době věnuje zvýšená pozornost. Studium diverzity těchto řas je ztíženo morfológickou podobností zástupců nejběžnější třídy Trebouxioophyceae, kteří nejčastěji tvoří kokální stélky. Proto se ke studiu těchto zástupců velmi často volí molekulárně genetické metody. Kromě druhové diverzity je studována i ekologie těchto řasových společenstev, jejich prostorová diverzita, sezonalita. Ve své práci jsem se zaměřila na dva aspekty mikrobiálních biofilmů rostoucích na jehlicích tisu červeného. V první studii jsem hodnotila množství řas vyskytujících se v biofilmech na jehlicích v rámci pražského městského ekosystému v souvislosti s kvalitou ovzduší. Jde o první studii takového typu v malém měřítku, přičemž se ukázalo, že by tyto biofilmy mohly sloužit jako bioindikátory kvality ovzduší v městských oblastech, reflektující různé koncentrace oxidů dusíku a polétavého prachu. Ve své druhé studii jsem zkoumala taxonomickou diverzitu těchto biofilmů ve dvou evropských regionech. Doposud totiž nevznikla taxonomická studie řas z tohoto specifického habitatu. Zaznamenali jsme poměrně veliké množství řasových taxonů vzhledem k tomu, o jak nepříznivé prostředí pro růst jehlice tisu představují. Tato rigorózní práce má za cíl rozšířit povědomí o řasových společenstvech rostoucích v tak specifickém prostředí jako je povrch jehlic tisu červeného. Ukázat, jak jsou tato společenstva ovlivněna antropogenní činností a také jak jsou poměrně druhově bohatá a odlišná v různých evropských regionech.

Abstract

Aero-terrestrial algae form distinct biofilms on different natural and man-made surfaces. Their taxonomic diversity is considerable, but not yet fully studied, even though recent attention has been paid to it. The study of the diversity of these algae is made more difficult by the morphological convergence of representatives of the most common class of Trebouxiophyceae, who most often form coccoid thalli. That is why molecular genetic methods are very often applied to study these algae. In addition to species diversity, the ecology of these algae communities, their spatial diversity, seasonality are also studied. In my work I focused on two aspects of microbial biofilms growing on the needles of the common yew. In the first study, I evaluated the amount of algae in biofilms on needles within the Prague urban ecosystem in relation to the air quality. This is the first study of this type on a small scale, showing that these biofilms could serve as bioindicators of air quality in urban areas, reflecting different concentrations of nitrogen oxides and particulate matter. In my second study I studied the taxonomic diversity of these biofilms in two European regions. So far no taxonomic study has been made from this specific habitat. We have recorded a relatively large amount of algal taxa despite the unfavorable environment for the algal growth on the surface of yew needles. This rigorous work aims to increase the awareness of algal communities growing in such a specific environment such as surface of the common yew needles. To show how these communities are affected by anthropogenic activity and also how they are relatively rich and diverse in different European regions.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Aero-terestrické řasy – obecný úvod	1
1.2 Subaerické řasové nárosty ve vztahu ke kvalitě ovzduší.....	2
1.3 Taxonomická diverzita subaerických řasových nárostů	3
2. Závěr.....	5
3. Seznam literatury.....	7
4. Publikovaný článek	Chyba! Záložka není definována.
5. Manuskript	11

1. Úvod

1.1 Aero-terestrické řasy – obecný úvod

Aero-terestrické řasy jsou relativně málo studovanou skupinou mikroskopických řas, ačkoli jednotlivé studie vznikají již od konce 19. století (Nägeli 1849, Brand & Stockmayer 1925, Brück 1981, Broady 1987). Vyskytují se na celé škále přírodních i umělých substrátů od půdy, kamenů, skal, borky stromů a jejich listů nebo jehlic po fasády, střešní krytiny nebo sochy. Tato skupina zahrnuje zástupce několika řasových skupin – sinice, zelené řasy, spájkivky a rozsivky. Studuje se jak jejich druhová diverzita (např. Škaloud et al. 2016, Rindi et al. 2003, Neustupa et al. 2013, Kulichová et al. 2014), ekologie (Freystein et al. 2008, Ryšánek et al. 2015, Neustupa & Štifterová 2013, Marmor & Degtjarenko 2014), tak i ekofyziologie (Gustavs et al. 2006, Donner et al. 2017).

Neustále dochází k definování nových druhů řas, především ze zelené linie, a to zvláště ve třídě Trebouxiophyceae, která je v tomto typu habitatu nejhojněji zastoupena v temperátních aero-terestrických společenstvech. V tropických oblastech jsou naopak na zmiňovaných substrátech spíše k nalezení řasy z čeledi Trentepohliales (Freystein & Reisser 2010, Rindi et al. 2010). V temperátních oblastech, na specifických substrátech nebo biotopech také občas lokálně pozorujeme převažující výskyt řas z rodu *Trentepohlia*. Jedná se zejména o borky stromů s vyšším pH, typicky např. topoly nebo jabloně (Hedenås et al. 2007). V případě lišejníkových fotobiontů lze také najít zvyšující se míru zastoupení řas tohoto rodu v závislosti na teplotě. Marini et al. (2011) ukázali, že vyšší teploty v rámci Itálie podporují hojnější výskyt lišejníků s tímto typem fotobiontu. Třída Trebouxiophyceae je u většiny zástupců typická svou velmi zjednodušenou buněčnou morfologií, což značně znesnadňuje zařazení jejích zástupců a i z tohoto důvodu byla poměrně dlouho mimo hlavní zájem studia aero-terestrických řas. Pozornost byla zaměřena spíše na výraznější řasové rody a čeledi jako např. *Klebsormidium*, *Prasiola* nebo Trentepohliales (Rindi & Guiry 2004, Hedenås et al. 2007) a po dlouhou dobu byla diverzita této řasové skupiny značně podhodnocená. S rozvojem molekulárních metod bylo ve třídě Trebouxiophyceae objeveno a popsáno mnoho nových rodů, např. *Jenufa*, *Heveochlorella*, *Chloropyrula*, *Leptochlorella*, *Kalinella* (Zhang et al. 2008, Němcová et al. 2011, Gaysina et al. 2013, Neustupa et al. 2013). Protože životní podmínky pro řasy v tomto prostředí jsou po většinu doby suboptimální (nedostatek vody, nízká vzdušná vlhkost, intenzivní sluneční záření) tyto řasy morfologicky konvergovaly směrem k jednoduché stavbě

buněk, a to především kokální organizaci vegetativní stélky (Krienitz & Bock 2012, Rindi et al. 2017). Kromě kokálních jednobuněčných stélek tvoří některé druhy ovšem i kratší nebo delší vlákna. Rozmnožují se převážně autosporami, jež mohou být stejně nebo různě veliké. Donedávna panovalo přesvědčení, že se tyto řasy rozmnožují pouze nepohlavně, a že tedy jde povětšinou o čistě asexuální linie. Protože dosud nebylo sexuální rozmnožování přesvědčivě pozorováno, usuzovalo se, že jej v průběhu evoluce ztratily. Nicméně Fučíková et al. (2015) ukázala, že genomy aero-terestrických rodů jako např. *Prasiola*, *Trebouxia*, *Asterochloris* a *Elliptochloris* stále obsahují i funkční geny odpovědné za průběh pohlavního rozmnožování, tudíž ho jsou stále alespoň teoreticky schopny.

Tyto řasy obsahují látky, aminokyseliny podobné mykosporinům, které zastávají důležitou funkci – absorpci UV záření (Karsten et al. 2005). Schopnost chránit své buňky proti vlivům UV záření je zejména v tomto typu habitatu pro řasy klíčová. Ačkoli by se dalo očekávat, že řasy budou tyto aminokyseliny vytvářet jako adaptaci na míru vystavení UV záření, ukázalo se, že jejich přítomnost nebo nepřítomnost buňkách spíše sleduje jejich fylogenetický vývoj.

1.2 Subaerické řasové nárosty ve vztahu ke kvalitě ovzduší

Ve své práci jsem se zabývala řasovými společenstvy vyskytujícími se na jehlicích nahosemenných dřevin, jejich taxonomickým složením a ekologií. Těmto specifickým společenstvům se dostalo zvýšené pozornosti teprve v 80. letech 20. století, kdy se jejich výskyt na jehlicích smrků rapidně zvýšil. Protože tyto epifytické řasy přijímají většinu potřebných živin z dešťové vody, jejich hojný výskyt zřejmě poukazoval na atmosférické změny, kdy byly v tomto období v Evropě poprvé zaznamenány vysoké koncentrace antropogenních oxidů dusíku a síry v ovzduší. Možná k jejich rozvoji přispěly i kyselé deště, které poškozovaly strukturu jehlic, a tím byla řasám umožněna jednodušší kolonizace jejich povrchu (Nihlgård 1985) nebo např. i vyšší koncentrace amoniaku v ovzduší v blízkosti zvířecích farem (Bäck et al. 1997). Některé studie ze zemí severní Evropy dokonce jednoznačně prokázaly souvislost s hojnějším výskytem řas na jehlicích nebo borce jehličnanů a zvýšenými koncentracemi oxidů dusíku a síry v ovzduší (Göransson 1988, Bråkenhielm & Quinghong 1995, Poikolainen et al. 1998, Grandin 2011). Abundance řas rostoucích na jehlicích smrku byla zařazena jako jeden z hodnotících faktorů do Integrovaného monitoringu efektu znečištění ovzduší na ekosystémy řízeného Švédskem a Finským institutem životního prostředí (SYKE) (Finnish environmental institute 2017). Bioindikační schopnosti jednotlivých druhů zelených řas ukázali i Freystein et

al. (2008) v urbánním prostředí aglomerace saského Lipska (Leipzig). Tito autoři zaznamenali, že některé konkrétní druhy zelených řas na borce stromů se spíše vyskytují ve znečištěných částech města, zatímco jiné v částech s nižší mírou znečištění. První publikace příkládaná k této práci (Nováková & Neustupa 2015) je zaměřena právě na tento aspekt výskytu řasových společenstev. Na příkladu městského ekosystému Prahy jsem zkoumala, zda je míra výskytu řasových společenstev na jehlicích tisu červeného (*Taxus baccata* L.) korelovaná s kvalitou ovzduší. Na rozdíl od dříve zmiňované studie jsme ale jako hodnocené parametry zvolili tloušťku (T) mikrobiálního nárostu a pokryvnost (C) (do jaké míry je jehlice nárostem porostlá) a množství řas v daném nárostu (AA). Tento originální parametr jsme využili z důvodu odlišných složení nárostů – od ryze řasových, po smíšené s houbami nebo naopak zcela prosté řas a dominované pouze houbami a případně dalšími heterotrofními mikroorganismy. Tento nový parametr se ukázal být nejlepším ukazatelem kvality ovzduší ze tří zmiňovaných. Zjistili jsme, že AA negativně koreluje s koncentrací polévatého prachu (PM₁₀) a pozitivně koreluje s oxidy dusíku (NO₂). Tyto dva protichůdné jevy vysvětlujeme tím, že zatímco oxidy dusíku jsou pro řasy zdrojem živin, vysoké koncentrace polévatého prachu v ovzduší způsobují zastiňování řas, které pak hůře rostou.

1.3 Taxonomická diverzita subaerických řasových nárostů

Taxonomická diverzita řas na jehlicích nahosemenných dřevin byla dosud spíše opomíjena, jakékoli informace o diverzitě z tohoto typu habitatu byly velmi strohé a nikdy nebyly hlavním zaměřením daných studií (Søchting 1997, Neustupa & Albrechtová 2003). Dostupné informace poukazyvaly na to, že v mikrobiálních nárostech na jehlicích se kromě vřeckovýtrusných hub a bakterií vyskytují zejména jednobuněčné zelené řasy, např. rodu *Pseudococcomyxa*. Vzhledem k tomuto stavu poznání jsme se rozhodli řasovou diverzitu těchto mikrobiálních společenstev hlouběji prozkoumat ve studii, kterou představuje přiložený manuskript. Ve dvou klimaticky odlišných evropských regionech jsme sbírali vzorky jehlic tisu červeného s nárosty a kultivovali je v laboratoři. Dané oblasti (západní Francie a ČR) jsme vybrali z toho důvodu, že jsme chtěli zachytit i případnou variabilitu taxonomického složení ovlivněnou právě klimatickými podmínkami. V návaznosti na předchozí studii jsme vzorky odebírali i v oblastech s různým stupněm znečištění ovzduší, jelikož i to by mohlo být možným zdrojem variability v taxonomickém složení řasových nárostů. Z důvodu uvedených výše, týkajících se problematického druhového zařazení jednotlivých řas, jsme se uchýlili k zařazování nalezených

řas do rodů nebo fylogeneticky definovaných linií, nikoliv do formálně stanovených druhů. Celkem jsme zaznamenali 19 OTU (operačních taxonomických jednotek). Ačkoli se nejednalo o žádné zjevně dosud neznámé řasy, valná většina z nich byla z tohoto konkrétního aeroterestrického biotopu popsána poprvé. Ve vzorcích dominovaly většinou řasy z třídy Trebouxiophyceae, ale našli jsme i vláknité řasy z tříd Klebsormidiophyceae a Trentepohliophyceae, dále pak i některé sinice a rozsivky. Z výsledků vyplynulo, že zatímco kvalita ovzduší neměla na složení nárostů měřitelný vliv, ovšem regionální klima hraje ve strukturování nárostů podstatnou roli. Skutečně se ukázalo, že v těchto dvou regionech jsou řasová společenstva na jehlicích tisů do jisté míry odlišná. Rozdílly jsme neobjevili v rámci vyšších taxonomických jednotek, ale zejména na úrovni řasových rodů. Vzhledem k tomu, že jsme v našem taxonomickém rozboru nešli až na úroveň samotných druhů, lze předpokládat, že při podrobnější analýze, např. pomocí molekulárních metod, bychom mohli objevit další jemnější rozdílly v rámci studovaných regionů. Nicméně za povšimnutí stojí, že i poměrně jednoduchými a levnými metodami, jako jsou kultivace a následné pozorování v optickém mikroskopu lze dosáhnout zajímavých výsledků.

2. Závěr

Dlouhá léta jsem se se zájmem věnovala aero-terestrickým řasám, zejména těm rostoucím epifyticky, na jehlicích jehličnatých stromů. Zpočátku bylo mým primárním zájmem jejich využití v bioindikaci kvality ovzduší, což se ukázalo být úkolem poměrně obtížným. Jakkoli je možné zjistit dlouhodobý a krátkodobý vliv určitých látek (NO₂, SO₂, PM₁₀) na výskyt nebo absenci epifytických řas v rozsáhlých i omezených oblastech, překlenutí propasti směrem k praktickému užití v bioindikaci kvality ovzduší není jednoduchým krokem. Ačkoli se mi nepovedlo svůj záměr dotáhnout do konce, stále věřím, že celé mé snažení v tomto směru smysl mělo. Povedlo se mi najít způsob, jak poměrně jednoduše, rychle a levně hodnotit množství řas v nárostech pomocí jednoho nového parametru AA (množství řas v nárostu), který by dle mého názoru mohl mít potenciální praktické využití v hodnocení kvality ovzduší v městských oblastech. Nicméně tuto práci již přenechávám svým případným budoucím následovníkům s nadějí, že se takoví najdou.

Vlivu kvality ovzduší na epifytické řasy jsem se částečně věnovala i v další práci, jejíž hlavním zaměřením bylo prozkoumání řasové diverzity v nárostech na jehlicích tisu červeného, přičemž jsem porovnávala dva klimaticky odlišné evropské regiony. Zjistila jsem, jak jsou tato společenstva, která jsou vystavena celkem extrémním životním podmínkám, poměrně druhově bohatá. V porovnání s množstvím řas rostoucím na borce stromů sice nejde o nějaká závratná čísla, přesto výsledky našeho zkoumání přesáhly naše očekávání. To se týká jak počtu nalezených OTUs (operačních taxonomických jednotek), tak i rozmanitosti ve smyslu zastoupených řasových skupin – od sinic a zelených řas, po rozsivky a Streptophyta. Kromě tohoto zjištění se nám také podařilo ukázat, že i tento typ společenstev je klimaticky ovlivňován, v námi studovaných regionech se co do taxonomického složení společenstva poněkud lišila. Ovlivnění taxonomického složení společenstev kvalitou ovzduší jsme nepozorovali, což bylo ale velmi pravděpodobně způsobeno rozsahem naší studie.

Subaerická řasová společenstva jsou jistě možným potenciálním zdrojem dalších nových zajímavých informací o životě řas v extrémních podmínkách. V podmínkách, kde je povětšinou voda dostupná pouze v momentě, kdy dochází ke srážkám a vlhkost vzduchu je stoprocentní, kde jsou řasy vysušovány vlivem proudění vzduchu a míra dopadajícího slunečního záření

vysoká. Jak se tyto řasy s těmito podmínkami vyrovnávají, jak jsou odolné? Vzhledem k velmi podobné morfologii zde přítomných řas je stále v kurzu otázka – známe už skutečnou diverzitu řas v tomto typu habitatu? Tyto a mnohé další otázky stále čekají na odpovědi.

3. Seznam literatury

Bäck, J., Turunen, M., Ferm, A., Huttunen, S. (1997). Needle structures and epiphytic microflora of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) under heavy ammonia deposition from fur farming. *Water, air and soil pollution* 100 (1-2): 119–132.

Bråkenhielm, S., Qinghong, L. (1995): Spatial and temporal variability of algal and lichen epiphytes on trees in relation to pollutant deposition in Sweden. *Water, Air, and Soil pollution* 79: 61–74.

Brand F., Stockmayer S. (1925). Analyse der aerophilen Grünalgenanflüge, insbesondere der proto-pleurococcoiden Formen. *Archiv für Protistenkunde* 52, 265–355.

Broady, P. A. (1987). The morphology, distribution and ecology of *Pseudococcomyxa simplex* (Mainx) Fott (Chlorophyta, Chlorellaceae), a widespread terrestrial antarctic alga. *Polar Biology* 7, 25–30.

Brück, H. (1981). Der Einfluß der Großstadt auf die Verbreitung rindenbewohnender Grünalgen am Beispiel von Köln. *Decheniana (Bonn)* 136, 1–4.

Donner, A., Ryšánek, D., Mikhailyuk, T., Karsten, U. (2017): Ecophysiological traits of various genotypes of a green key alga in biological soil crusts from the semi-arid Colorado Plateau, USA. *Journal of Applied Phycology* 26 (6): 2911–2923.

Finnish environmental institute (2017), online dostupné z: http://www.syke.fi/en-US/Research_Development/Ecosystem_services/Monitoring/Integrated_Monitoring, aktualizováno 21. 11. 2017.

Freystein, K., Salisch, M., Reisser, W. (2008): Algal biofilms on tree bark to monitor airborne pollutants. *Biologia* 63: 866–872.

Freystein K., Reisser W. (2010). Green biofilms on tree barks: more than just algae. In: Seckbach J., Grube M. (eds) *Symbioses and stress*: 559–573. Heidelberg, Springer.

Fučíková, K., Pažoutová, M., Rindi, F. (2015): Meiotic genes and sexual reproduction in the green algal class Trebouxiophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 51 (3): 419–430.

Gaysina, L., Němcová, Y., Škaloud, P., Ševčíková, T., Eliáš, M. (2013). *Chloropyrula uraliensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a new green coccoid alga with a unique ultrastructure, isolated from soil in South Urals. *Journal of Systematics and Evolution* 51: 476–484.

Göransson, A. (1988): Luftalger och lavar indikerar luftföroreningar. Naturvårdsverket (Swed. Env. Prot. Agency), Rapport 3562. In Peveling, E., Burg, H., Tenberge, K.H. (1992): Epiphytic Algae and Fungi on Spruce Needles. *Symbiosis* 12: 173–187.

Gustavs, L., Eggert A., Michalik, D., Karten, U. (2010): Physiological and biochemical responses of green microalgae from different habitats to osmotic and matric stress. *Protoplasma* 243 (1–4): 3–14.

Hedenås H., Blomberg P., Ericson L. (2007). Significance of old aspen (*Populus tremula*) trees for the occurrence of lichen photobionts. *Biological Conservation* 135: 380–387.

- Karsten, U., Friedl, T., Schumann, R., Hoyer, K., Lembcke, S.** (2005). Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae: *Prasiola* and its relatives from the Trebouxiophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 41 (3): 557–566.
- Krienitz, I., Bock, C.** (2012). Present state of the systematic of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia* 698: 295–326.
- Kulichová, J., Škaloud, P., Neustupa, J.** (2014): Molecular diversity of green corticolous microalgae from two submediterranean European localities. *European Journal of Phycology* 49: 345–355.
- Marini, L., Nascimbene, J., Nimis, P.L.** (2011). Large-scale patterns of epiphytic lichen species richness: Photobiont-dependent response to climate and forest structure. *Science of the Total Environment* 409 (20): 4381–4386.
- Marmor, L., Degtjarenko, P.** (2014): *Trentepohlia umbrina* on Scots pine as a bioindicator of alkaline dust pollution. *Ecological Indicators* 45: 717–720.
- Nägeli, C.** (1849). Gattungen einzelliger Algen. Zürich bei Friedrich Schulthess.
- Nihlgård, B.** (1985): The Amonium Hypothesis – An Additional Explanation to the Forest Dieback in Europe. *Ambio* 14: 2–8.
- Němcová, Y., Eliáš, M., Škaloud, P., Hodač, L., Neustupa, J.** (2011). *Jenufa* gen. nov.: a new genus of coccoid green algae (Chlorophyceae, incertae sedis) previously recorded by environmental sequencing. *Journal of Phycology* 47(4): 928-938.
- Neustupa, J., Albrechtová, J.** (2003). Aerial algae on spruce needles in Krušné hory Mts., Czech Republic. *Czech Phycology*, Olomouc 3: 161–167.
- Neustupa, J., Štifterová, A.** (2013): Distribution patterns of subaerial corticolous microalgae in two European regions. *Plant Ecology and Evolution* 146: 279–289.
- Neustupa, J., Němcová, Y., Veselá, J., Steinová, J., Škaloud, P.** (2013): *Leptochlorella corticola* gen. et sp. nov. and *Kalinella apyrenoidosa* sp. nov.: two novel *Chlorella*-like green microalgae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from subaerial habitats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 377–387.
- Poikolainen, J., Lippo, H., Hongisto, M., Kubin, E., Mikkola, K., Lindgren, M.** (1998): On the abundance of epiphytic green algae in relation to the nitrogen concentrations of biomonitors and nitrogen deposition in Finland. *Environmental Pollution* 102: 85–92.
- Rindi, F., Guiry, M., Critchley, A., Ar Gall, E.** (2003): The distribution of some species of Trentepohliaceae (Trentepohliales, Chlorophyta) in France. *Cryptogamie Algologie* 24 (2): 133–144.
- Rindi F., Guiry M.** (2004). Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. *Phycologia* 43: 225–235.
- Rindi F., Allali H.A., Lam D.W., López-Bautista J.M.** (2010). An overview of the biodiversity and biogeography of terrestrial green algae. In: Rescigno V., Maletta S. (eds) Biodiversity hotspots: 105–122. New York, Nova Science Publishers.

Rindi, F., Ryšánek, D., Škaloud, P. (2017). Problems of epitypification in morphologically simple green microalgae: a case study of two widespread species of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Fottea, Olomouc*, 17(1): 78–88.

Ryšánek, D., Hrková, K., Škaloud, P. (2015): Global ubiquity and local endemism of free-living terrestrial protists: phylogeographic assessment of the streptophyte alga *Klebsormidium*. *Environmental Microbiology* 17: 689–698.

Søchting, U. (1997). Epiphyllic cover on spruce needles in Denmark. *Annales Botanici Fennici* 34: 157–164.

Škaloud, P., Friedl, T., Hallmann, C., Beck, A., Dal Grande, F. (2016): Taxonomic revision and species delimitation of coccoid green algae currently assigned to the genus *Dictyochloropsis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 52: 599–617.

Zhang J., Huss, V.A.R., Sun, X., Chang, K., Pang, D. (2008). Morphology and phylogenetic position of a trebouxiophycean green alga (Chlorophyta) growing on the rubber tree, *Hevea brasiliensis*, with the description of a new genus and species. *European Journal of Phycology* 43(2): 185–193.

5. Manuskript

Radka Zelená & Jiří Neustupa

Taxonomical diversity of microalgal biofilms on common yew needles in two European regions

Taxonomical diversity of microalgal biofilms on common yew needles in two European regions

Radka Zelená & Jiří Neustupa

Department of Botany, Faculty of Science, Charles University of Prague, Benatska 2, Prague, CZ-12801, Czech Republic

Abstract

The algal biofilms growing on the needles of coniferous trees have been studied first in Northern Europe since the 80's of the 20th century which was probably caused by their excessive occurrence at this period. Their occurrence appeared to be linked to high concentration of nitrogen and sulfur oxides in the atmosphere. Although the ecology of those biofilms started to be studied more intensively, the algal diversity of those communities remained unknown. In present study we focused on the algal diversity of biofilms growing on the needles of *Taxus baccata* in two European regions. The results show that the algal community in this habitat is much more diverse as it seemed from previous studies, containing representatives from various algal classes such as Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, Klebsormidiophyceae, cyanobacteria and diatoms. However, we didn't find any taxon occurring only in this habitat, all of them were already reported from tree bark communities. By comparing the algal diversity between the two studied regions we found significant differences which confirms their non neutral distribution. We also compared the algal community compositions between urban and non-urban sites suggesting a possible influence of the air pollution on the biofilms. In this case we didn't find any significant difference between studied communities. This study sheds a new light on this particular and so far underexplored algal community, its taxonomical diversity and distribution.

Key words: biodiversity, epiphytic biofilms, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, Cyanobacteria, Bacillariophyceae, Klebsormidiophyceae, Tretephohliales, micro-algal ecology, common yew

1. Introduction

Aero-terrestrial algae occur in various habitats. They occupy natural surfaces like rock, stones, soil, tree bark, leaves, but also artificial surfaces such as facades, monuments, or roof tiles. These algae commonly live in biofilms that are also composed of protozoa, fungi and bacteria. Tree bark represents an important habitat for aero-terrestrial algae where they often create visible green or reddish biofilms (Ettl & Gärtner 1995, Rindi et al. 2009). The taxonomic diversity of biofilms growing on the tree bark was studied since the beginnings of the 20th century. They are typically dominated by algae from the division Chlorophyta (Štifterová & Neustupa 2015). Other common groups of algae present in those biofilms are Streptophytes, diatoms and Cyanobacteria. Algae from the class Trebouxiophyceae are the dominant group of Chlorophyceae that is present on the tree bark and needles of conifers that are also quite often covered by a microbial crust. The morphology of those epiphytic algae is mostly coccoid, sometimes filamentous or they create packages. The simplified coccoid morphology is very common and comprise various taxa across the whole division of Chlorophyta. The most common genera were *Stichococcus*, *Coccomyxa* and *Apatococcus* that appeared in almost every studied sample. Biofilms growing on the needles of conifers are so far underexplored in means of taxonomy which is caused partly because of their not always very obvious presence. They were given attention since the 1980's due to their spread which was showed to be connected to the pollution by the nitrogen oxides (Göransson 1988, Bråkenhielm & Qinghong 1995). Grandin (2011) showed that the the extent of the needles covered by algae positively correlates with the concentrations of nitrogen oxides in the atmosphere across Sweden. Such pattern show also phototropic biofilms growing on the tree bark (Poikolainen et al. 1998). Freystein et al. (2008) discovered a different sensibility of various algal taxa from the tree bark biofilms to the various conditions of atmospheric pollution. Some of them preferred polluted areas, possibly using a particulate matter as a source of nutrients, whereas others preferred areas with less pollution. At the most polluted areas was detected the highest algal diversity. They hypothesized that some algae from the tree bark biofilms could be used in biomonitoring of urban atmospheric pollution.

In the present study we focused on the taxonomic composition of phototropic biofilms growing on the needles of *Taxus baccata* L. in two European regions where this tree naturally occurs. Until now there has been no study presenting the taxonomic diversity of biofilms from this particular habitat. For the purpose of our study we decided to examine algal biofilms with the aid of optical microscopy after previous cultivation. We chose to cultivate the entire biofilm population growing on the needles in order to grow the maximum of present algae. We

hypothesized that the diversity might be very similar to tree bark biofilms, maybe hosting more limited range of algal taxons because of extreme conditions that needles of conifers assuredly provide. We also aimed to find out whether there is any difference in the taxonomic composition of biofilms between the two examined regions as previous studies of corticolous algae showed that particular groups of algae prefer more humid and warmer conditions than those in the Central Europe (Marini et al. 2011, Neustupa & Štifterová 2013). In the light of findings of Freystein et al. (2008) we also asked whether there is a detectable difference in the taxonomic composition of phototropic biofilms on the needles between urban and rural areas within studied regions.

2. Materials and methods

2.1 Sampling and localities

For the purposes of this study we chose two regions with differing climatic conditions. First, the Central Europe with humid continental climate (Dfb category according to Köppen-Geiger classification). The mean annual temperature within this region is 7.9°C and the mean annual precipitation amounts 686 mm (ČHMÚ, 2018). Second, Western Europe with pronounced oceanic climate (Cfb according to K-G classification) with the mean annual temperature 11.5°C and the mean annual precipitation 974 mm (Météo France, 2018). In each of these regions four localities were chosen, two of which were situated in urban areas and two outside of urban areas. At each locality two sampling sites were chosen (Tab. 1). At each locality two common yew (*Taxus baccata*) individuals were chosen and their needles were sampled. At each tree we sampled five needles of the same age from five different north-facing twigs that were visually covered with microalgal biofilms. Thus, altogether there were sixteen trees from eight localities from two European regions entering the analyses of the biofilms. The sampling was conducted October to December 2014.

2.2 Cultivation of samples

In the laboratory, the samples were submerged into the Petri dishes with liquid Bold's Basal Medium (BBM; Bischoff & Bold, 1963). All needles from one tree were placed together in one Petri dish. The samples were cultured for 120 days in room temperature (23°C) and under daylight illumination. After the cultivation period, the biomass that developed in the medium

was put onto a microscopic slide with the aid of a glass pipette and examined under Olympus BX51 light microscope equipped with Olympus Z5060 camera (Olympus, Tokyo, Japan).

Table 1. List of localities, codes of sampling sites, GPS coordinates.

	locality	code	GPS coordinates
Central Europe	Praha	Kar	50° 4'30.69"S, 14°25'9.74"V
		Kin	50° 4'43.79"S, 14°24'11.51"V
	Brno	Brn2	49°12'0.08"S, 16°36'29.75"V
		Brn4	49°11'58.78"S, 16°35'51.94"V
	Štěchovice	St1, St3	49°50'41.99"S, 14°25'15.71"V
	Tisy u Chrobol	Ch1, Ch2	48°57'36.43"S, 14° 3'44.44"V
Western Europe	Brest	Bre1	48°24'46.78"S, 4°29'26.63"Z
		Bre2	48°23'37.71"S, 4°28'37.06"Z
	Caen	Ca1	49°11'11.03"S, 0°22'1.59"Z
		Ca2	49°11'10.40"S, 0°21'55.88"Z
	Fôret de Beffou	FB1, FB2	48°29'26.71"S, 3°29'10.76"Z
	Crozon	Cr1, Cr2	48°11'22.00"S, 4°32'18.69"Z

2.3 Identification of OTUs

Identification of OTUs was based on microscopic examination of cells and filaments. In most cases, this only allowed determination of individual OTUs into genera or suprageneric units. Individual OTUs were often present only in small quantities and, therefore, their more precise identification was usually only possible in very distinctive taxons, such as *Chloroidium ellipsoideum*, *Coelastrella*, *Interfilum*, *Klebsormidium*. Majority of the algae forming the biofilms belonged to the class Trebouxiophyceae with relatively uniform coccoid morphology of cells. Therefore, these algae were generally determined onto the genus level or as members of a single aggregate phylogenetic group belonging to the *Watanabea* clade.

2.4 Data analysis

The crossed effects of region (continental vs. oceanic) and habitat type (urban area vs. outside of urban area) were evaluated using two-way non-parametric MANOVA and two-way ANOSIM (Hammer 1999–2018, Clarke 1993). Both analyses tested hypothesis that the composition of the biofilms is related to either of these factors, or to their interaction.

The analyses were conducted using two parallel datasets. First, the factors were evaluated using the dataset involving OTUs identified into the lowest possible taxonomic level based on the

microscopic analysis. Second, the OTUs were merged into units corresponding to their respective phylogenetically defined class-level taxa.

Jaccard index was used in all analyses for computation of the similarity matrix among the samples (Hammer 1999–2018). Significance testing was based on permutation tests randomizing the assignment of the samples into different groups. The random distributions were based on 999 repetitions. The analyses were conducted in PAST, ver. 2.15 (Hammer et al. 2001).

3. Results

All together we identified 19 OTUs, mostly referring to distinct algal and cyanobacterial genera with the exception of *Watanabea* clade. Members of 6 algal classes were included in studied samples. Coccoid green algae dominated in most samples (Tab. 2).

Most of them belonged to the Trebouxiophyceae (Fig 1a-c, e-g, i, 2j, k). The genera, such as *Stichococcus* and *Coccomyxa* (Fig 1c, f), occurring as unicells or as unbranched filaments, were present in all but one sample. In many samples, a number of chlorelloid cells were also observed. However, these taxa were notoriously difficult to identify by microscopic observation. Those chlorelloid specimens with typical features of the *Watanabea* clade, such as, ellipsoidal or spherical cells with parietal chloroplast, reproducing only by autosporegenesis, were classified into this monophyletic OTU. Members of the genera *Apatococcus* (Fig.1a) with its characteristic sarcinoid colonies and *Dictyochloropsis* (Fig 1e) were also very common in the samples. Conversely, *Chloroidium ellipsoideum* (Fig. 1i) and members of the genera *Diplosphaera*, *Parietochloris* and *Asterochloris* were considerably less frequent (Fig 1b, g, j).

Table 2. List of recorded OTUs. Localities in Central Europe - Kin, Kar, Brn2, Brn4, Ch1, Ch2, St1, St3, localities in Western Europe - Bre1, Bre2, Ca1, Ca2, Cr1, Cr2, FB1, FB2.

Taxon name	Kin	Kar	Brn2	Brn4	Ch1	Ch2	St1	St3	Bre1	Bre2	Ca1	Ca2	Cr1	Cr2	FB1	FB2
<i>Leptolyngbya</i> sp.									x							
<i>Nostoc</i> sp.					x											
<i>Chloroidium ellipsoideum</i>	x										x	x	x		x	x
<i>Mychonastes</i> sp.		x			x	x	x	x			x	x			x	x
<i>Diplosphaera</i> sp.	x							x		x		x		x	x	x
<i>Stichococcus</i> sp.	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Coccomyxa</i> sp.	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Apatococcus</i> sp.	x		x	x			x	x	x	x				x		x
<i>Coelastrella</i> sp.									x		x					
<i>Parietochloris</i> sp.										x	x		x		x	
<i>Dictyochloropsis</i> sp.		x	x		x	x	x	x		x					x	x
<i>Asterochloris/</i>																
<i>Trebouxia</i> sp.				x										x		
<i>Watanabea</i> clade					x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Interfilum</i> sp.				x		x										
<i>Klebsormidium</i> sp.									x						x	x
<i>Trentepohlia</i> sp.								x		x	x				x	x
<i>Navicula</i> sp.															x	
<i>Diatoma</i> sp.															x	
<i>Cocconeis</i> sp.															x	

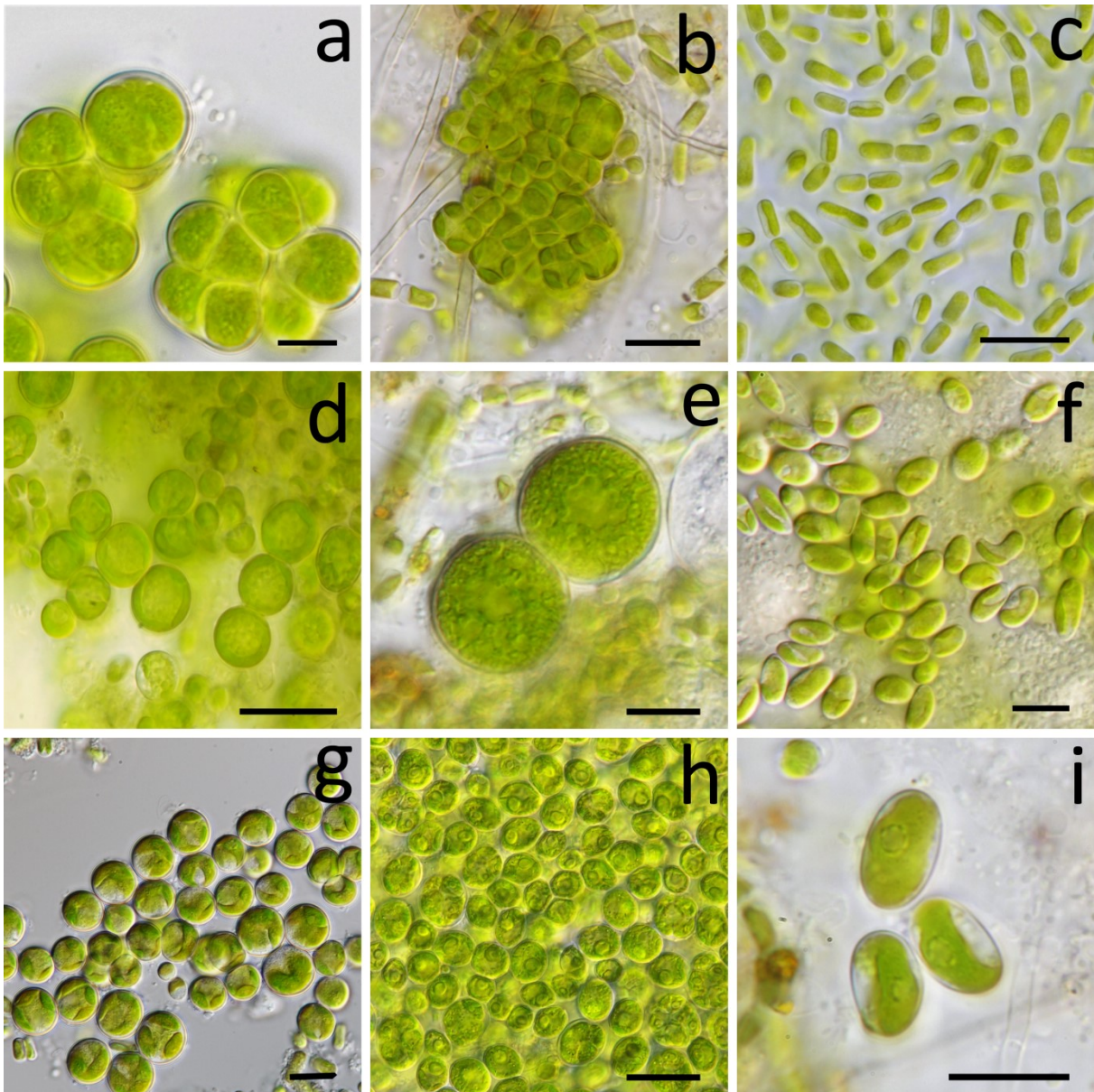


Fig 1. Micrographs of selected microalgae occurring in biofilms on the needles of common yew: a, *Apatococcus* sp.; b, *Diplosphaera* sp.; c, *Stichococcus* sp.; d, *Mychonastes* sp.; e, *Dictyochloropsis* sp.; f, *Coccomyxa* sp.; g, *Parietochloris* sp.; h, *Coelastrella* sp.; i, *Chloroidium ellipsoideum*. Scale bars represent 5 μm .

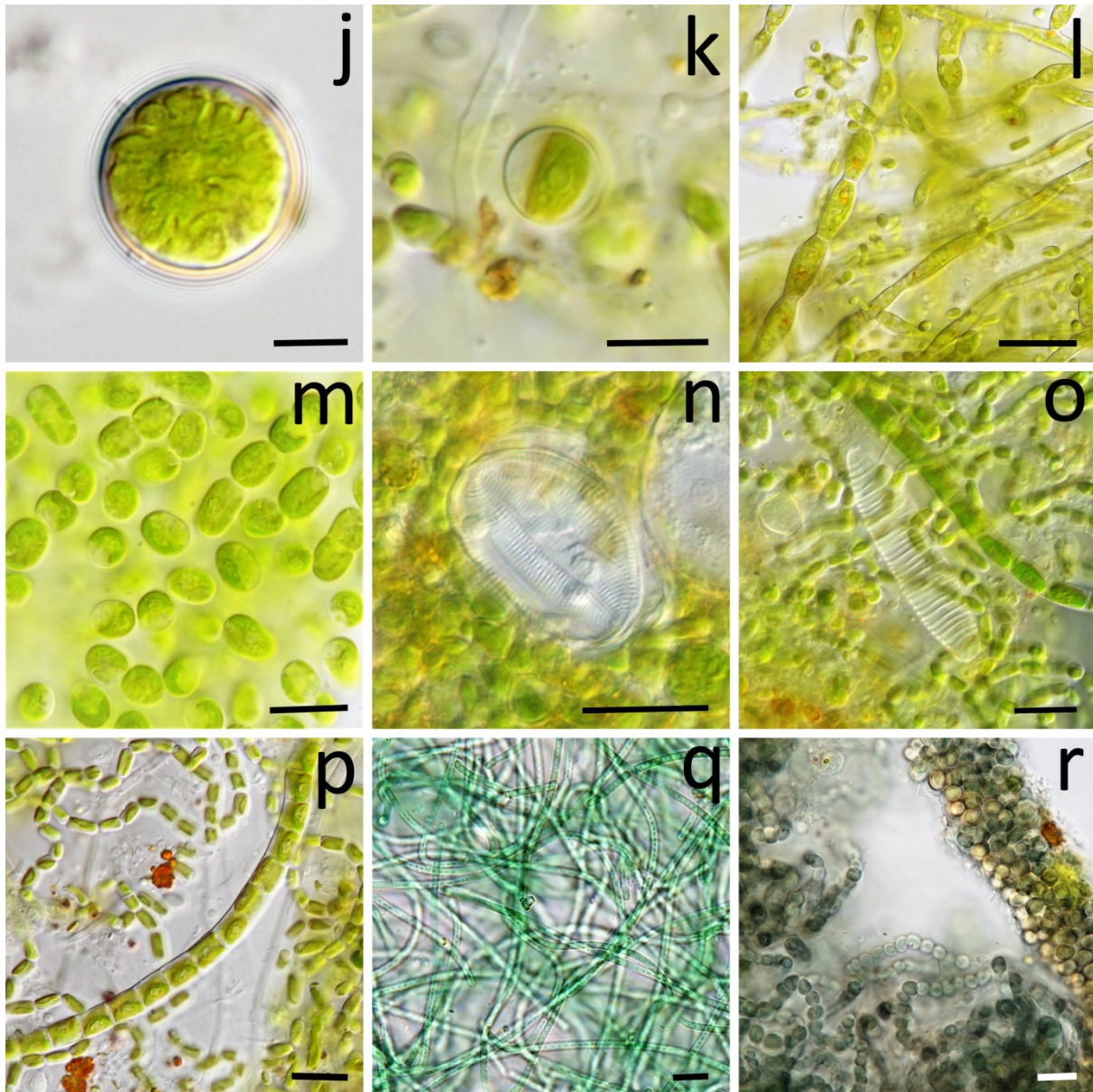


Fig 2. Micrographs of selected microalgae occurring in biofilms on the needles of common yew: j, *Asterochloris* sp.; k, *Heterochlorella* sp.; l, *Trentepohlia* sp.; m, *Interfilum* sp.; n, *Cocconeis* sp.; o, *Diatoma* sp.; p, *Klebsormidium* sp.; q, *Leptolyngbya* sp.; r, *Nostoc* sp. Scale bars represent 5 μ m.

The class Chlorophyceae was chiefly represented by members of *Mychonastes* (Fig. 1d) and, somewhat less frequently, also by specimens of the genus *Coelastrella* (Fig. 1h). A few specimens of filamentous thalli belonging to the ulvophycean genus *Trentepohlia* (Fig. 2l) were also found. These algae were chiefly observed in the samples from oceanic climate. The Streptophyta were represented by the related genera *Interfilum* and *Klebsormidium* (Fig. 2m, p). At two localities, the cyanobacterial genera *Leptolyngbya* and *Nostoc* (Fig. 2q, r) were also recorded. Diatoms were also encountered, but they were always very rare and usually occurred only as single cells among considerably more frequent members of other groups. Members of

the genera *Diatoma* (Fig. 2o), *Navicula* and *Cocconeis* (Fig. 2n) were observed in a single sample from one locality in Western Europe (Tab. 2). Several OTUs, such as *Leptolyngbya*, *Coelastrrella*, *Parietochloris*, *Klebsormidium* and all the diatoms, were reported only from localities in Western Europe. Conversely, the OTUs such as *Nostoc* and *Interfilum* were only found in the samples from the Central Europe (Tab. 2). The NMDS diagram (Fig. 3) shows differences in algal community compositions between the two studied regions.

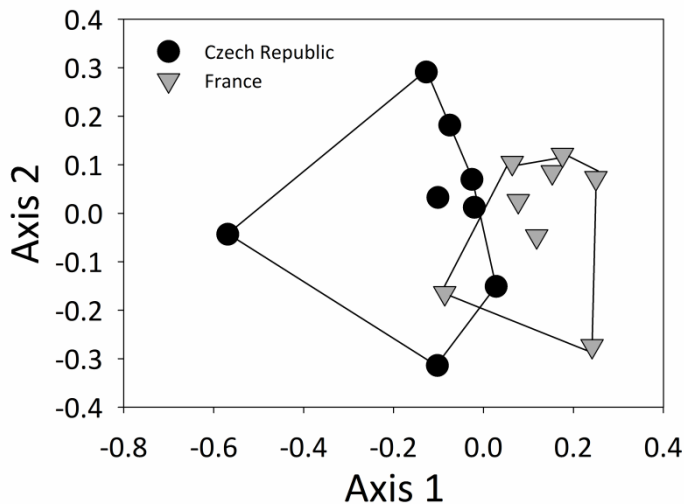


Fig 3. NMDS diagram shows differences in algal community compositions between the two studied regions.

The two-way npMANOVA and two-way ANOSIM test showed virtually the same results. The tests that were using the full dataset revealed significant differences in algal composition between two studied, but no significant difference between urban and rural areas within these regions. In addition, interaction between both terms also did not prove to be significantly explaining the data structure (Tab. 3). The tests with reduced dataset showed significant difference neither between regions, nor between landscape types (Tab. 4).

Table 3. Results of two way non parametric multivariate analysis evaluating spatial factors influencing the the community structure of epiphytic microalgae.

Region: Central and Western Europe, $p < 0.05$; n.s., $p > 0.05$.

Full dataset						Reduced dataset					
Factor	Sum of squares	Df	Mean Squares	F	p -value	Factor	Sum of squares	Df	Mean Squares	F	p -value
Region	0.465	1	0.465	2.384	0.0093	Region	0.089	1	0.089	0.845	0.5200
Urban area/ rural area	0.096	1	0.096	0.492	0.8986	Urban area/ rural area	0.043	1	0.043	0.404	0.8037
Interaction	0.277	1	0.277	1.418	0.1859	Interaction	0.041	1	0.041	0.388	0.8038
Residual	2.343	12	0.195			Residual	1.265	12	0.105		
Total	3.181	15				Total	1.438	15			

Table 4. Results of two way analysis of similarities. Region: Central and Western Europe, $p < 0.05$; n.s., $p > 0.05$.

Full dataset			Reduced dataset		
Factor	R	p -value	Factor	R	p -value
Region	0.263	0.0074	Region	-0.109	0.8293
Urban area/ rural area	-0.076	0.7243	Urban area/ rural area	-0.156	0.9730

4. Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first one showing species richness of the microalgal biofilms on coniferous needles. Until now, only the members of the Trebouxiophyceae were known from these microhabitats (Søchting 1997, Neustupa & Albrechtová 2003). However, our data demonstrated that Cyanobacteria, Chlorophyceae and Streptophyta were also represented in the biofilms. It should be noted that diversity of the microalgae on coniferous needles was, so far, not been studied in detail. Previous studies either included the lists of OTUs rather as a side effect of differently focused research (Tenberge & Peveling 1991), or they documented only a very limited number of taxa (Göransson 1988, Peveling et al. 1992, Søchting 1997, Neustupa & Albrechtová 2003). Surely, one of the reasons for this lack of published detailed data is that unveiling the spectrum of present subaerial algae requires previous cultivation. Direct microscopy of natural samples usually only recovers the dominant members of the community but those that are present in smaller quantities remain undetected. However, it should be stressed that microscopic analysis of cultured samples also

cannot lead to exhausting enumeration of the species diversity within the community. This is due to morphological convergence of most these algae that have simplified their morphology in order to be better able to cope with unfavourable living conditions (Rindi 2011). This means that prevailing morphology of the chlorelloid microalgae in the biofilms resembles the "little green balls" with few distinctive morphological characters available for easy identification. However, even with this limitation, microscopy of cultured samples provides cheap and relatively rapid method of diversity assessment yielding data comparable to molecular analyses (Neustupa & Škaloud 2010, Neustupa & Štifterová 2013, Kulichová et al. 2014).

Two studied regions differed considerably in mean annual precipitation amount and mean annual temperature and therefore it has been hypothesised that the composition biofilms may reflect these environmental differences. Marini et al. (2011) reported that more humid and warmer regions of Italy included more trentepohlialean photobionts in corticolous lichens. Similar results were reported by Neustupa & Štifterová (2013) who showed that Trentepohliales, Cyanobacteria and some streptophytan taxa were more prevalent in corticolous biofilms taken in sub-Mediterranean habitats than in comparable temperate habitats. Probably, distribution of taxa from these groups was driven by regional climatic factors, which determined higher diversity in warmer and more humid sub-Mediterranean conditions. Likewise, the results of the present study corroborate these patterns. The localities with oceanic climate had higher richness of observed OTUs, which was probably caused by less desiccation stress in these localities with considerably higher precipitation in comparison to Central European localities. Lüttge & Büdel (2010) showed that terrestrial microalgae need relatively high humidity of the environment for active cell growth and biomass production. Thus, prolonged periods of drought in continental temperate biofilms necessarily lead to conditions in which the microalgae in the biofilms are only capable of active cell reproduction for limited time spans, which may limit distribution of more sensitive taxa.

Interestingly, we did not detect any differences between biofilms sampled in rural and urban areas. Conversely, Freystein et al. (2008) showed that urban air pollution significantly influenced the species composition of microalgae growing on tree bark. Likewise, Marmor & Degtjarenko (2014) showed that alkaline dust pollution leads to a significant increase of trentepohlialean biofilms on bark of *Pinus sylvestris*, which is too acidic for these organisms in non-polluted areas. The lack of any signal related to supposed air pollution gradient in our data might have either been caused by insufficient taxonomic resolution of microscopic identification of OTUs, or by lack of sufficiently strong environmental differences among our sampling plots. Alternatively, it is possible that the biofilms on needles do not reflect the air

pollution gradient in a way comparable to those growing on tree bark. This might be caused by their generally shorter life span on needles in comparison to bark microhabitats, or more extreme conditions, leading to generally lower diversity and communities composed of stress-tolerant generalists that do not reflect the air pollution like the members of the corticolous biofilms.

Acknowledgment

This study was supported by grants from the Czech Science Foundation (no. P506/12/0955) and the Grant Agency of the Charles University (no. 386214).

References

- Bråkenhielm, S., Qinghong, L.** (1995). Spatial and temporal variability of algal and lichen epiphytes on trees in relation to pollutant deposition in Sweden. *Water Air Soil Pollut* 79: 61–74. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01100430>.
- Burg, H.** (1990): Der Einfluß von Epibionten auf die Photosyntetischeleistung von *Picea abies* (L.) Karst. nach Untersuchungen im Freiland', Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster. In: Tenberge, K. B. and Peveling, E. (1991): Strukturelle Veränderungen an Epidermiszellen von Fichtennadeln bei Besiedlung bei Epibionten. *Allgemeine Forst Zeitschrift* 46, 762–765.
- Clarke, K. R.** (1993). Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18:117-143.
- Český hydrometeorologický ústav.** (2018). ČHMÚ. Historická data – meteorologie a klimatologie. Available from: <http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/zakladni-informace>.
- Ettl H., Gärtner G.** (1995). Syllabus der Boden-, Luft- und Flechten- algen. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Freystein, K., Salisch, M., Reisser, W.** (2008). Algal biofilms on tree bark to monitor airborne pollutants. *Biologia* 63:866–72. <http://dx.doi.org/10.2478/s11756-008-0114-z>.
- Göransson, A.** (1988). Luftalger och lavar indikerar luftöroreningar. Summary: Airborne algae and lichens indicate air pollutants, Statens naturvårdsverket Rapport 3562, Swedish Environmental Protection Agency, Laboratory of Environmental Control, Uppsala, 1–17. In: Tenberge, K. B. & Peveling, E. (1991), Strukturelle Veränderungen an Epidermiszellen von Fichtennadeln bei Besiedlung bei Epibionten, *Allgemeine Forst Zeitschrift* 46: 762–765.
- Grandin, U.** (2011). Epiphytic algae and lichen cover in boreal forests—a long-term study along a N and S deposition gradient in Sweden. *Ambio* 40:857–66. <http://dx.doi.org/10.1007/s13280-011-0205-x>.

- Hammer, Ø.** (1999–2018). PAST Reference manual ver. 3.20. Available from: <https://folk.uio.no/ohammer/past/past3manual.pdf>.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., and P. D. Ryan.** (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
- Marini, L., Nascimbene, J., Nimis, P. L.** (2011). Large-scale patterns of epiphytic lichen species richness: Photobiont-dependent response to climate and forest structure. *Science of the Total Environment* 409: 4381–4386. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.07.010.
- Marmor, L., Degtjarenko, P.** (2014). *Trentepohlia umbrina* on Scots pine as a bioindicator of alkaline dust pollution. *Ecological Indicators* 45: 717–720.
- Météo France.** (2018). Météo et climat. Available from: <http://www.meteofrance.com/climat/france>.
- Neustupa, J., Albrechtová, J.** (2003). Aerial algae on spruce needles in the Krušné Hory Mts., Czech Republic. *Czech Phycol* 3:161–168.
- Neustupa, J., Škaloud, P.** (2010). Diversity of subaerial algae and cyanobacteria growing on bark and wood in the lowland tropical forests of Singapore. *Plant Ecology and Evolution* 143 (1): 51–62. doi:10.5091/plecevo.2010.417.
- Neustupa, J., Štifterová, A.** (2013). Distribution patterns of subaerial corticolous microalgae in two European regions. *Plant Ecology and Evolution* 146 (3): 279–289. <http://dx.doi.org/10.5091/plecevo.2013.862>.
- Peveling, E., Burg, H. and Tenberge, K. B.** (1992). Epiphytic algae and fungi on spruce needles. *Symbiosis* 12, 173–187.
- Poikolainen, J., Lippo, H., Hongisto, M., Kubin, E., Mikkola, K., Lindgren, M.** (1998). On the abundance of epiphytic green algae in relation to the nitrogen concentrations of biomonitors and nitrogen deposition in Finland. *Environ Pollut* 102:85–92. [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)80019-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(98)80019-5).
- Rindi, F., Allali, H. A., Lam, D. W., López-Bautista, J. M.** (2009). An overview of the biodiversity and biogeography of terrestrial green algae. *Biodiversity Hotspots*, Chapter 3. Nova Science Publishers, Inc.
- Štifterová, A., Neustupa, J.** (2015). Community structure of corticolous microalgae within a single forest stand: evaluating the effects of bark surface pH and tree species. *Fottea* 15: 113–122.
- Rindi, F.** (2011). Terrestrial green algae: Systematics, biogeography and expected responses to climate change. In T. Hodkinson, M. Jones, S. Waldren, & J. Parnell (Eds.), *Climate Change, Ecology and Systematics* (Systematics Association Special Volume Series, pp. 201–228). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511974540.010.
- Søchting, U.** (1997): Epiphyllic cover on spruce needles in Denmark', *Annales Botanici Fennici* 34, 157–164.
- Tenberge, K. B., Peveling, E.** (1991), Strukturelle Veränderungen an Epidermiszellen von Fichtennadeln bei Besiedlung bei Epibionten, *Allgemeine Forst Zeitschrift* 46: 762–765.