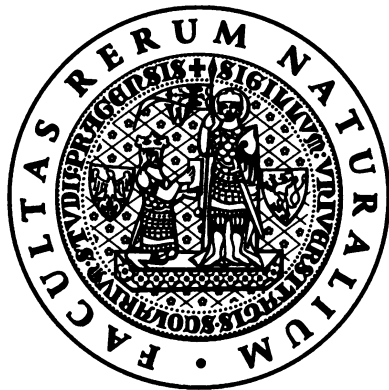


Katedra botaniky  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze



Diplomová práce

**Revize komplexu *Synura petersenii* Korshikov  
(Synurophyceae, Heterokontophyta) na základě syntézy  
molekulárních a morfologických dat**

**Anna Kynčlová**

Praha 2009

Školitel: Mgr. Pavel Škaloud, PhD.

Diplomová práce **Anny Kynčlové** byla obhájena na katedře botaniky PřF UK v Praze dne 25.5.2009 a ohodnocena klasifikačním stupněm **v ý b o r n ě**.

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

Anna Kynčlová

Handwritten signature of Anna Kynčlová in black ink.

## Abstrakt

*Synura petersenii* je velmi rozšířený druh patřící mezi heterokontní bičíkovce třídy Synurophyceae. Buňky tohoto druhu jsou pokryty křemičitými šupinami s charakteristickou jemnou strukturou, pozorovatelnou v elektronovém mikroskopu. Taxonomie druhu *S. petersenii*, a konečně i celého rodu *Synura*, je založena výlučně na morfologických znacích těchto šupin. V rámci druhu *S. petersenii* byla nalezena značná variabilita morfologie šupin, která vedla k popsání mnoha variet a forem. Zároveň se ukázalo, že je tento druh variabilní i na molekulární úrovni.

V této studii byla provedena molekulární fylogenetická analýza sekvencí ITS1-5,8S-ITS2 rDNA padesáti osmi kmenů druhu *S. petersenii*, pocházejících z různých lokalit České republiky, Skotska, Severní Ameriky a dalších oblastí. Tato analýza odhalila osm dobře podpořených větví v rámci tohoto druhu. Shodný výsledek – jednoznačné odlišení osmi větví – přinesla rekonstrukce sekundární struktury ITS2 a zjištění přítomnosti (hemi-)CBCs (compensatory base changes), která ukazuje na možnou přítomnost reprodukčních bariér mezi těmito nalezenými liniemi. Porovnání struktury křemičitých šupin jednotlivých kmenů ukázalo, že každá zjištěná linie je charakterizována unikátní kombinací morfologických znaků. Vzhledem ke shodě všech použitých druhových konceptů je možné považovat nalezené větve za samostatné druhy.

Součástí práce je také článek pro impaktivní časopis *Nova Hedwigia*, ve kterém byly zpracovány a vyhodnoceny předběžné výsledky výzkumu. Šest nalezených větví bylo popsáno jako nové druhy. Tento článek je k práci připojen jako příloha.

## Abstract

*Synura petersenii* is a wide-spread heterokont flagellate of the class Synurophyceae. Siliceous scales with a typical delicate structure, which can be observed with electron microscope, cover the cells of this species. The taxonomy of *S. petersenii* and, as a matter of fact, of the whole genus *Synura*, is based exclusively on morphological features of the scales. High variability of the scale morphology, found in this species, has led to establishment of many forms and varieties within this species. Later, molecular variability within this species was discovered as well.

In this study, molecular phylogenetic analysis of ITS1-5,8-ITS2 sequences was performed, using strains of *S. petersenii* from different localities of the Czech Republic, Scotland, North America and other regions. This analysis has discovered eight well-supported clades within this species. The same result - unambiguous delimitation of eight groups - was obtained by the detection of (hemi-)CBCs (compensatory base changes) in the secondary structure of ITS2. The presence of (hemi-)CBCs indicates possible presence of reproduction barriers among the clades. The comparison of silica-scales structure of the new-found clades has shown that each of them can be characterized by unique combination of morphological features. In the light of the perfect congruence of all the species concepts used, it is possible to consider the clades as separate species.

The presented study contains an article for the high-impact journal *Nova Hedwigia*, comprising the preliminary results of the research. In this article, six new-found clades are described as new species. The article is included as an attachment.

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>2</b>
1.1. Studium křemičitých chrysomonád třídy Synurophyceae.....	2
1.2. Stavba křemičité šupiny druhu <i>Synura petersenii</i> .....	2
1.3. Morfologická variabilita šupin a druhový koncept.....	3
1.4. Biogeografie a ekologie.....	4
1.5. Využití křemičitých šupin chrysomonád.....	5
1.6. Cíle této práce.....	6
<b>2. Materiál a metody</b> .....	<b>6</b>
2.1. Izolace a kultivace.....	6
2.2. PCR amplifikace a sekvenace ITS rDNA úseku.....	7
2.3. Fylogenetická analýza.....	7
2.4. Morfologická analýza.....	8
2.5. Biogeografie.....	9
<b>3. Výsledky</b> .....	<b>9</b>
3.1. Fylogenetická analýza sekvencí ITS rDNA.....	9
3.2. Sekundární struktura ITS2 rDNA a CBCs (compensatory base changes).....	15
3.3. Biogeografie a ekologie linií.....	15
3.4. Morfologie šupin.....	19
3.4.1. PCA.....	23
3.4.2. CDA.....	24
3.5. Článek: Molecular diversity and species concept in <i>Synura petersenii</i> complex (Synurophyceae, Heterokontophyta).....	26
3.5.1. Český abstrakt článku.....	26
<b>4. Diskuse</b> .....	<b>27</b>
4.1. Fylogenetika.....	27
4.2. Morfologie.....	28
4.3. Srovnání morfologie a fylogenetiky.....	29
4.4. Geografie a ekologie linií.....	29
4.5. Druhový koncept.....	31
4.6. Skutečné druhové bohatství v rámci komplexu <i>S. petersenii</i> sensu lato.....	32
<b>5. Poděkování</b> .....	<b>34</b>
<b>6. Literatura</b> .....	<b>35</b>
<b>Příloha:</b> .....	<b>45</b>

## 1. Úvod

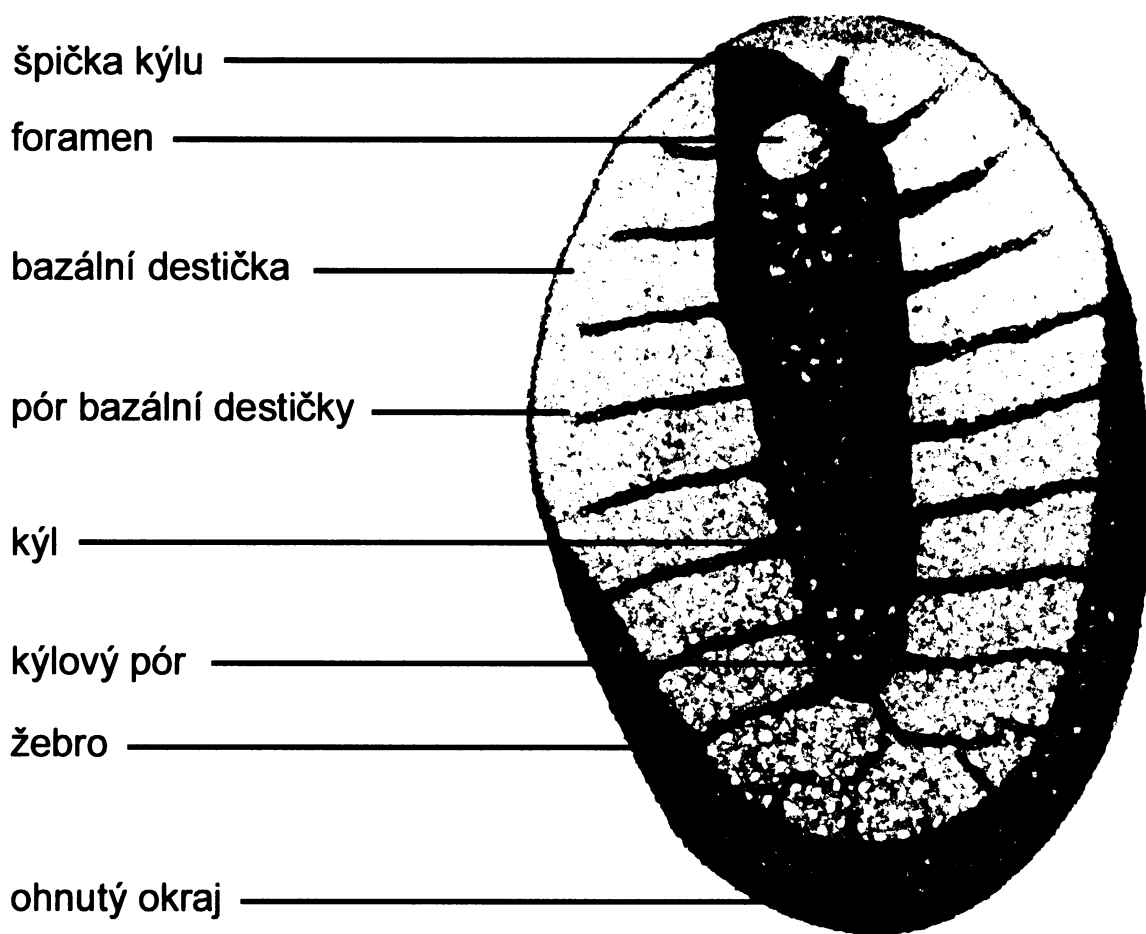
### 1.1. Studium křemičitých chrysonád třídy Synurophyceae

Výzkum křemičitých chrysonád třídy Synurophyceae (Andersen, 1987), má dlouhou tradici ve světě i u nás (Ehrenberg 1835, Pascher 1912, Andersen 1987, Fott 1955, Kalina et al. 2000, Němcová et al. 2001). Od devatenáctého století byly tyto sladkovodní organismy pozorovány pomocí světelného mikroskopu a probíhaly pokusy o jejich taxonomické zařazení (Ehrenberg 1835, Stein 1878, Klebs 1893a). Důležitým mezníkem v tomto výzkumu byl nástup elektronové mikroskopie počátkem 50. let 20. století. Ten umožnil detailní studium křemičitých šupin, kterými jsou pokryty buňky těchto organismů. V té době proto vzniklo mnoho důležitých studií o těchto organismech, a to jak ve světě (Asmund 1955, Manton, 1955, Petersen & Hansen, 1956), tak i u nás (Fott, 1955). Jemné struktury, které jsou na šupinách pomocí EM snadno pozorovatelné, se od té doby staly hlavními znaky pro vymezení vnitrorodových taxonomických jednotek (Kristiansen 1986, Cronberg & Kristiansen 1996, Asmund & Kristiansen 1986, Siver 1991).

### 1.2. Stavba křemičité šupiny druhu *Synura petersenii*

Charakteristickým rysem všech zástupců třídy Synurophyceae jsou křemičité šupiny, pokrývající povrch jejich buněk, popřípadě kolonií. Tyto šupiny jsou produkovány v silikon-depozitivním váčku diktyzomálního původu (Kristiansen, 1986).

Šupiny u rodu *Synura* poprvé pozoroval Petersen (1918) ve světelném mikroskopu. Jemné struktury těchto šupin se staly nejdůležitějšími znaky, na jejichž základě jsou charakterizovány jednotlivé druhy a formy, patřící do rodů třídy Synurophyceae, včetně druhu *S. petersenii* (Kristiansen, 1986, 1996, Asmund & Kristiansen, 1986, Siver, 1991). Šupina druhu *S. petersenii* je bilaterálně symetrická a heteropolární, to znamená, že má jednoznačně odlišitelnou proximální a distální část. Její základ tvoří bazální destička (base-plate), která přechází na proximálním konci v ohnutý okraj (rim). V centrální části šupiny vystupuje nad bazální destičku dutý podlouhlý kýl (keel), zakončený špičkou (keel tip) namířenou k distální části šupiny. V místech pod špičkou je dutina kýlu foramenem (otvorem v bazální destičce) propojena s venkovním prostředím (Kristiansen, 1986).



**Obr. 1.** Charakteristické morfologické znaky na šupině druhu *S. petersenii*.

Na posteriorním zužujícím se konci buňky, kterým jsou spojeny jednotlivé buňky v rámci kolonie, bývají šupiny menší a jejich morfologie je odlišná. Zpravidla bývají jednodušší a často u nich chybí typický kýl. To usnadňuje uspořádání buněk v rámci těsné kolonie (Wee, 1997).

### 1.3. Morfologická variabilita šupin a druhový koncept

Druh *Synura petersenii* je v současné době vymezován výhradně na základě morfologických znaků přítomných na křemičitých šupinách a pozorovatelných pomocí elektronového mikroskopu. Morfologie těchto šupin vykazuje značnou variabilitu (Kristiansen, 1986a), což vedlo v minulosti k popisu mnoha variet a forem tohoto druhu, například f. *kufferathii* (Petersen & Hansen 1958), f. *bonaerensis* (Vigna 1979), f. *bjoerkii* (Cronberg & Kristiansen 1980) nebo f. *columnata* (Siver 1988). Tyto popisy byly často provázeny diskusemi o vhod-

nosti zvolené taxonomické úrovně. Dobrým příkladem je *S. petersenii* f. *glabra*, popsána jako druh *Synura glabra*, který se od druhu *S. petersenii* liší tvarem šupiny a málo vyvinutými až chybějícími žebry (Korshikov 1925). Huber-Pestalizzi (1941) překlasifikoval druh *S. glabra* jako varietu druhu *S. petersenii*. Později byla původní *S. glabra* klasifikována jako forma druhu *S. petersenii* (Kristiansen & Preisig, 2007). Kristiansen (1986) a Sandgren et al. (1996) poukazují na nálezy šupin, které představují přechodové morfotypy mezi *S. petersenii* f. *petersenii* a *S. petersenii* f. *glabra*. Tyto šupiny není možné jednoznačně připsat ani k jednomu z těchto taxonů. I další studie poukazují na to, že se u některých dalších popsáných forem vyskytují kromě diagnosticky důležitých šupin také šupiny těžko odlišitelné od šupin *S. petersenii* f. *petersenii* (Asmund 1968, Nicholls & Gerrath 1985). Ukázalo se, že znaky, jako je přítomnost žeber a jejich příčné propojení (kterým se vyznačuje *S. petersenii* f. *kufferathii*), jsou závislé na stupni silifikace šupin. Mohou tedy být ovlivněny vnějšími podmínkami a jsou závislé zejména na dostupnosti křemíku a na pH (Wee et al 1991, Sandgren et al. 1996). V dalších laboratorních pokusech se ukázalo, že vedle těchto znaků, které jsou závislé na charakteristikách prostředí, existují na šupinách také znaky, které zůstávají i přes všechny změny vnějších podmínek neměnné. Mezi tyto znaky patří velikost pórů na bazální destičce a kýlu, velikost foramenu, a také celkový tvar šupiny (Wagenmann & Gutowski 1995, Gavrilova et al. 2005).

V současné době je tedy v rámci sekce *Peterseniae*, do které patří také *Synura petersenii*, stále používán druhový koncept, založený výlučně na zmiňovaných proměnlivých morfologických znacích křemičitých šupin. Důležitým krokem ke změně této situace bylo osekvenování několika kmenů druhu *S. petersenii* a fylogenetická analýza, která odhalila variabilitu sekvencí ITS1, 5,8 a ITS2 (Wee et al. 2001). V této analýze byly nalezeny dvě linie uvnitř druhu *S. petersenii*, ale nebylo provedeno žádné srovnání těchto molekulárních výsledků s tradiční morfologií šupin, a proto není jasné, zda se jedná o variabilitu kryptickou, či zda mají tyto linie nějakou stabilní charakteristickou morfologii.

#### **1.4. Biogeografie a ekologie**

Podle Kristiansena (2001) mají druhy křemičitých chrysomonád, zejména druhy rodů *Synura* a *Mallomonas*, své specifické geografické rozšíření. Toto rozšíření je určeno geografickými bariérami a ekologickými nároky druhů. Důležitými faktory jsou zejména teplota, pH a konduktivita. Za velmi důležitý považuje ovšem také historický vývoj a způsob distribuce druhů. O posledních dvou jmenovaných faktorech toho však příliš nevíme. Protože pohyblivá stadia těchto organismů nejsou příliš odolná, je pravděpodobné, že se šíří ve formě stomato-



cyst. Spekuluje se o souvislosti jejich šíření s migrací vodních ptáků (Wee et al. 1993, Péterfi & Momeu 1996), ovšem zatím nebyl pozorován výskyt stomatocyst na vodních ptácích nebo v jejich zažívacím traktu, a chybí tak konkrétní důkazy, které by podpořily tyto domněnky (Kristiansen 2001).

Na druhé straně stojí teorie ubikvitního rozšíření mikroorganismů, podle které by měly být v podstatě všechny organismy menší než 1 mm kosmopolitní (Finlay & Clarke 1999, Finlay 2002).

V každém případě i podle Kristiansena (2001) má nejméně polovina křemičitých chrysonád kosmopolitní distribuci. Jako příklad takto široce rozšířeného druhu uvádí Kristiansen druh *S. petersenii*. Jedná se o vůbec nejčastěji nalézáný druh třídy Synurophyceae (Wee 1982, Siver 1987, Pichrtová et al. 2007). Velká část druhů rodu *Synura* má dobře definovanou ekologii. *S. petersenii* je však druh velmi ekologicky variabilní. Původně byl považován za alkalifilní (Takahashi 1978), což bylo ovšem později vyvráceno a ukázalo se, že jsou různé kmeny tohoto druhu schopné žít ve vodách o různém pH (Kim et al. 2008) a vyskytují se v nejrůznějších typech sladkovodních lokalit (Kristiansen 2001). Tím se liší od jiných kosmopolitních druhů, jako je *S. echinulata*, jejíž distribuce je sice také celosvětová, ale je zároveň omezená na mírně kyselé oligotrofní vody (Kristiansen 1975a). Některé formy druhu *S. petersenii* však mají distribuci užší. Takovým případem je *S. petersenii* f. *taymirensis*, která je zmiňovaná jako příklad organismu s arkticko-subarktickým rozšířením (Kristiansen 1995). Kim et al. ve zmíněné studii z roku 2008 zkoumali podmínky, při kterých *S. petersenii* tvoří vodní květ, a zjistili, že tyto podmínky se dramaticky liší u různých kmenů. Bohužel se však nepokusili tyto kmeny určit do formy, a tak se nedá soudit, zda byly tyto rozdíly v ekologických nárocích kmenů spojené s jejich taxonomickou příslušností.

### 1.5. Využití křemičitých šupin chrysonád

Molekulární fylogenetické metody ukázaly na mnoha řasových skupinách, že se při definici druhů nedá spoléhat pouze na morfologii a je třeba ji kombinovat s dalšími přístupy (Wilcox 1998, Huss 2002, Krienitz et al. 2002). V některých oborech, jakým je např. paleolimnologie, však nemáme k jiným než morfologickým datům přístup.

Křemičité šupiny chrysonád třídy Synurophyceae jsou velmi odolné a snadno se zachovávají v sedimentu. Jsou proto cenným zdrojem informací pro paleolimnologické výzkumy (Smol 1995, Smol & Cumming 2000) a pro biomonitoring (Roijackers & Kessels 1986, Siver 1991, 1993, Siver & Lott 2000).

Pro tyto účely jsou vhodné druhy rodu *Synura* se známými ekologickými nároky a dobrým morfologickým vymezením, jako je *S. sphagnicola* nebo *S. echinulata* (Charles & Smol 1988). Vzhledem k tomu, že se druh *S. petersenii* ukázal být velmi tolerantní k nejrůznějším podmínkám vnějšího prostředí (Kim et al. 2008, Kristiansen 2001), je jeho výpovědní hodnota pro tyto obory jen omezená. Formy a variety tohoto druhu skrývají v tomto směru jistý potenciál. Jejich přesnější a spolehlivější taxonomické a ekologické vymezení by mohlo být přínosem pro tyto obory.

## 1.6. Cíle této práce

Základní otázkou, na kterou se tato práce pokouší najít odpověď, je problém skutečné diverzity v rámci druhu *S. petersenii*. Tento problém je řešen pomocí více nezávislých přístupů. Základním krokem má být prozkoumání a zhodnocení genetické variability druhu *S. petersenii* pomocí sekvenace markeru ITS1-5,8S-ITS2 ITS2 rDNA u několika desítek kmenů, pocházejících z různých lokalit České republiky, Skotska, severní Ameriky a dalších oblastí. Dalším krokem je zjištění přítomnosti/nepřítomnosti (hemi-)CBCs (compensatory base changes), jejichž přítomnost u příbuzných skupin organismů koreluje s existencí reprodukčních bariér (Coleman 2000, Casteleyn et al. 2007, Müller et al. 2007). Dále se tato studie zabývá otázkou, zda nalezené genetické variabilitě odpovídá variabilita morfologická, a jestli je tedy u těchto organismů použitelný i tradiční morfologický přístup. Ve druhé řadě se studie zabývá také dalšími otázkami, které s touto problematikou souvisejí, a to porovnáním fylogenetických vztahů a morfologie, biogeografií a ekologií nalezených linií. Součástí práce je také rukopis článku pro impaktní časopis *Nova Hedwigia*, ve kterém byly zpracovány a vyhodnoceny předběžné výsledky výzkumu. Tento článek je k práci připojen jako příloha.

Výsledkem této práce by měl být nový, realistický druhový koncept, založený na kombinaci několika nezávislých znaků používaných k definici druhů u protistních organismů, a jeho aplikace na druhový komplex *S. petersenii*.

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Izolace a kultivace

Vzorky byly odebírány z různých lokalit na území České republiky a Skotska, a v národním parku Abisko ve Švédsku. Pro odběry byla použita planktonní síť s šířkou ok 20  $\mu\text{m}$ . Na místech odběru bylo měřeno pH, konduktivita a teplota vody pomocí měřiče Combo pH &

EC HI 98129, Hanna instruments. Ze vzorků byly izolovány jednotlivé kolonie pomocí skleněné pipety, vytažené v kapiláru. Poté byly kultivovány v plastových kultivačních destičkách se sterilním modifikovaným médiem DYIV (Řezáčová, 2003) při teplotě 15 °C za přirozeného osvětlení. Po čtyřech týdnech byl z každé narostlé kultury sterilní pipetou odebrán vzorek o objemu 200 µl. Ten byl přemístěn do 1 ml mikrokumavky Eppendorf a zmražen (-20°C).

## 2.2. PCR amplifikace a sekvenace ITS rDNA úseku

Rozmražené vzorky byly přidávány přímo do reakční směsi pro PCR. Pro amplifikaci sekvencí ITS rDNA (ITS1, 5,8S, ITS2) byly použity primery Kn1.1 (5'-CAA GGT TTC CGT AGG TGA ACC-3'; Wee et al. 2001) a Kn4.1 (5'-TCA GCG GGT AAT CTT GAC TG-3'; Wee et al. 2001). Složení mastermixu bylo: 15.1 µl sterilní Milli-Q vody, 2 µl 10' PCR pufr (Sigma), 0.4 µl dNTP (10 µM), 0.25 µl každého z primerů (25 pmol/ml), 0.5 µl Red Taq DNA Polymeráza (Sigma) (1U/ml), 0.5 µl of MgCl<sub>2</sub>, 1 µl rozmraženého vzorku. Pro amplifikaci ITS rDNA úseku byl použit XP thermal cycler (Bioer) s cyklem: 35x denaturace – 1 min při 94°C + annealing – 1 min při 54 °C + elongace 1 min při 72 °C, následovaným prodlužovací fází 10 min při 72 °C. Detekce výsledného produktu byla provedena na agarózovém gelu s ethidium bromidem. Produkt byl přečištěn kitem JetQuick PCR Purification Kit (Genomed) a sekvenován primery použitými při PCR firmou Macrogen, Inc. (Seoul, Korea, <http://dna.macrogen.com>).

## 2.3. Fylogenetická analýza

Pro alignment byly použity sekvence kmenů uvedených v tabulce X. Při zpracování sekvencí byly použity programy MEGA verze 4.0.2 (Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007), SeqAssem (Hepperle 2004) a BioEdit (Hall 1999). Po vypuštění pozic s delecemi u většiny sekvencí měl vzniklý alignment délku 482 bází. Fylogenetické stromy byly vytvořeny metodou maximum likelihood (ML) pomocí programu PAUP\*, verze 4.0b10 (Swofford 2002), a metodou Bayesian inference (BI), MrBayes, verze 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Substituční model byl odhadnut za použití programu PAUP/MrModeltest 1.0b (Nylander 2004). Pro metodu ML byl vybrán model GTR+G na základě testu Akaike information criterion (AIC) a Hierarchical likelihood ratio tests (hLRTs). Dále byl proveden ML bootstrap (100 replikací). Metodou BI byly vytvořeny dva různé fylogenetické stromy. Při konstrukci prvního z nich byl použit model GTR + G pro celý úsek ITS rDNA (ITS, 5,8S a ITS2). Pro druhý BI strom byly použity dva různé modely vybrané na základě hLRTs pro různé části alignmen-

tu (tab. 1). Dva paralelní MCMC běžely po 2 000 000 generací. V rámci každého MCMC byl použit jeden horký a tři studené řetězce. Stromy byly zaznamenávány každou stou generací.

Na základě sekvencí byly v programu MEGA vypočítány vzájemné Jukes-Cantor vzdálenosti větví.

Úsek alignmentu	Délka (bází)	Model
ITS1	169	F81 + G
5,8S	151	JC + I
ITS2	162	F81 + G

**Tab. 1.** Evoluční modely použité ve druhé BI analýze.

#### 2.4. Morfologická analýza

Z vypěstovaných kultur byly po čtyřech týdnech od jejich založení připraveny vzorky pro transmisní elektronový mikroskop (TEM). Formvarovou blankou pokryté měděné mřížky se zaschlými vzorky byly přemyty destilovanou vodou a poté prohlédnuty pomocí elektronového mikroskopu JEOL 1010. Dva reprezentativní kmeny z každé nové větve byly vybrány pro morfologickou analýzu. Pomocí TEM byly pořízeny snímky 10 různých šupin každého z vybraných kmenů. Dále proběhlo měření morfologických znaků přítomných na šupinách pomocí programu Adobe Photoshop Elements 5.0. Měřena byla délka s šířka šupiny, obsah kýlového póru, obsah póru bazální destičky, obsah foramenu, plocha šupiny a plocha kýlu (obr. 1). Obsah kýlového póru a póru bazální destičky byl získáván zprůměrováním naměřených hodnot deseti příslušných pórů z každé měřené šupiny. Dále byl vypočítán poměr délky a šířky jednotlivých šupin a poměr plochy šupiny ku ploše jejího kýlu. Ze získaných dat byly vytvořeny krabicové grafy pro jednotlivé charakteristiky. Normální rozložení hodnot měřených znaků bylo testováno Shapiro-Wilkovým testem. Signifikance meziskupinových rozdílů v těchto znacích byla testována metodou One-way ANOVA v případě normálního rozložení a Kruskal-Wallisovým testem v případě, že rozložení normální nebylo. Pro tyto metody byl použit program PAST, verze 1.83 (Hammer et al. 2001). Na získaných datech byla provedena PCA pomocí programu PAST a CDA v programu STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc. 1998). Grafy byly zobrazeny programem SigmaPlot (Systat Software, Inc. 2004).

V programu STATISTICA byla vypočítána matice Mahalanobisových vzdáleností jednotlivých větví na základě morfologických znaků. Tato matice byla porovnána s maticí Jukes-Cantor vzdáleností vypočítaných na základě sekvencí pomocí Mantelova testu shody. Test byl spočten pomocí programu Mantel 2.0 (© Adam Liedloff).

## 2.5. Biogeografie

Nadmořská výška lokalit byla zjištěna na webových stránkách Google Maps Find Altitude (<http://www.daftlogic.com/sandbox-google-maps-find-altitude.htm>). Informace o lokalitách (region a nadmořská výška lokality) byly zaneseny na ML strom pomocí programu Mesquite verze 2.6 (Maddison & Maddison 2009).

## 3. Výsledky

### 3.1. Fylogenetická analýza sekvencí ITS rDNA

Celkem bylo získáno 44 nových sekvencí ITS rDNA. Výsledkem různých typů analýz byly fylogenetické stromy se stejnou topologií, které se nelišily na úrovni hlavních větví. Obr. 2 ukazuje strom konstruovaný metodou BI za použití různých evolučních modelů pro různé části sekvence. Obr. 3 ukazuje strom vytvořený pomocí metody BI s jedním evolučním modelem pro celý alignment. Na obr. 4 je strom konstruovaný metodou ML. Pro odhad pozice kořene stromu byl zpracován další alignment zahrnující jako outgroup sekvenci patřící druhu *Synura uvella* AF308847.1. Podle této analýzy je větev 6 bazální větví stromu. Alignment je možno stáhnout na adrese:

[http://botany.natur.cuni.cz/algo/align/01\\_Synura\\_petersenii.fas](http://botany.natur.cuni.cz/algo/align/01_Synura_petersenii.fas)

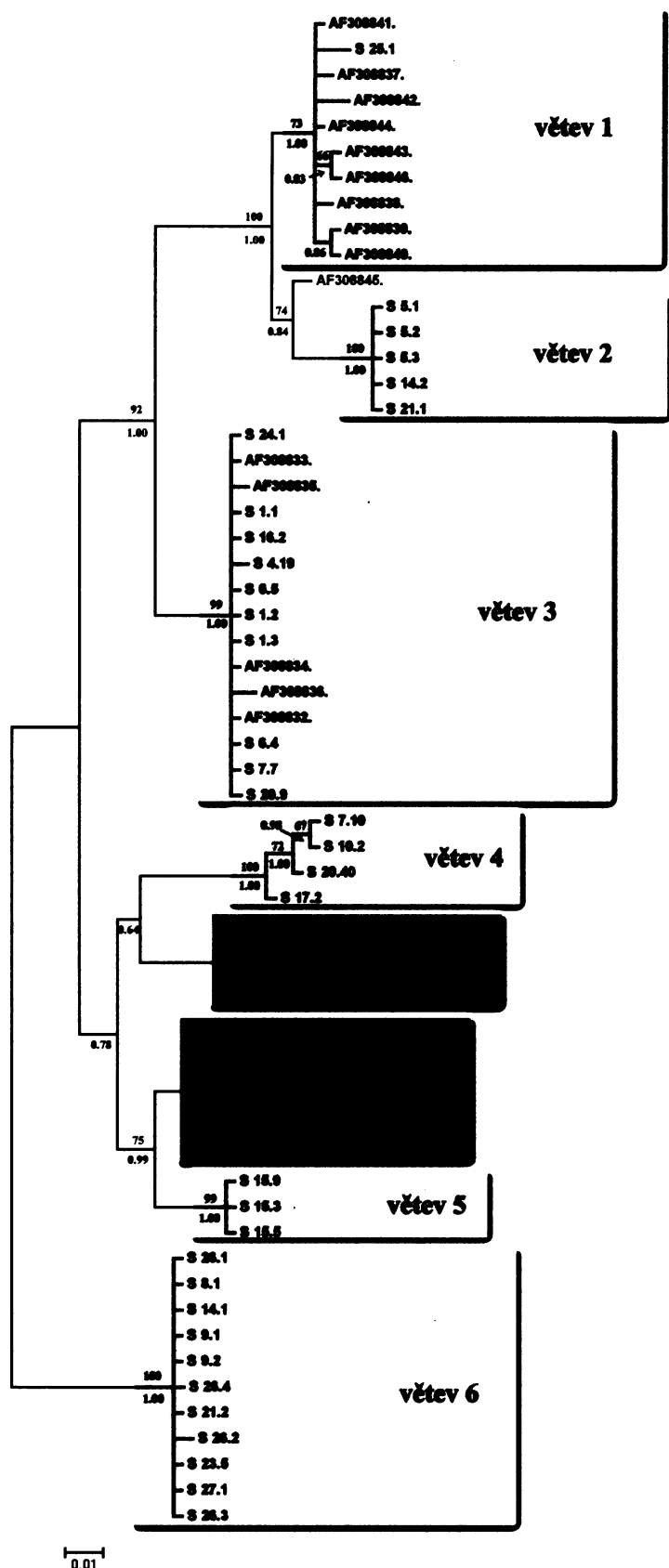
Výsledné tři fylogenetické stromy odhalují shodně 8 silně podpořených větví (rozložení kmenů v jednotlivých větvích viz též tab. 2). Sekvence z databáze GeneBank AF308845 vytvořila samostatnou větev, která se na všech stromech umístila se střední podporou jako sesterská větev 2 (podpora ML bootstrap 74, BI posterior probability 0.84). Podpora ostatních větví se pohybuje mezi 1.00 a 0.99 BI posterior probability, ML bootstrap dosahuje hodnot 100 až 99, nižší podporu má větev 1 (ML bootstrap 73) a větev 5 (ML bootstrap 93). Výsledné stromy dále ukazují příbuznost větve 1, větve 2 a sekvence AF308845 (ML bootstrap 100, BI posterior probability 1.00). Tomuto dobře podpořenému klastru je sesterská větev 3 (ML bootstrap 92, BI posterior probability 1.00). Větve 5 a 8 vytvořily klastr o podpoře ML bootstrap 75, BI posterior probability 0.99 a 1.00.

Větev	Označení kmene	Lokalita	Č. sekvence GeneBank
1	AF308837 *	Lake Itaska State Park, Itaska County, MN (CCMP 858)	AF308837
1	AF308838 *	White Springs Road Pond, Geneva, NY (Sandgren 2)	AF308838
1	AF308839 *	Fox River, McHenry County, IL (CCMP 868)	AF308839
1	AF308840 *	Newfoundland, Canada (CCMP 866)	AF308840
1	AF308841 *	Winter's Creek, Keeweenaw County, MI (CCMP 861)	AF308841
1	AF308842 *	Winter's Creek, Keeweenaw County, MI (CCMP 862)	AF308842
1	AF308843 *	Winter's Creek, Keeweenaw County, MI ("And" 2549)	AF308843
1	AF308844 *	Big Betsy Pond, MI ("And" 5482)	AF308844
1	AF308846 *	ditch near Winter's Creek, Keeweenaw County, MI (CCMP 863)	AF308846
1	S 25.1	kanál u řeky River Corrib, Galway, IE	-
2	S 5.1	aluviální tůň, Modřany, Praha, CZ	FM178494
2	S 5.2	aluviální tůň, Modřany, Praha, CZ	FM178495
2	S 5.3	aluviální tůň, Modřany, Praha, CZ	FM178496
2	S 14.2	rašeliniště, Swamp NR, severní Čechy, CZ	FM178497
2	S 21.1	řeka, Ploučnice, Horní Police, severní Čechy, CZ	-
3	AF308832 *	Bluff Lake, Lake County, IL (CCMP 873)	AF308832
3	AF308833 *	Yarra River, Melbourne, Victoria, Australia	AF308833
3	AF308834 *	Lüneburger Heide, Germany (SAG 120.79)	AF308834
3	AF308835 *	Winter's Creek, Keeweenaw County, MI (CCMP 872)	AF308835
3	AF308836 *	road ditch near Gay, MI (CCMP 864)	AF308836
3	S 1.1	kanál, Zlatá stoka, Třeboň, jižní Čechy, CZ	FM178498
3	S 1.2	kanál, Zlatá stoka, Třeboň, jižní Čechy, CZ	FM178499
3	S 1.3	kanál, Zlatá stoka, Třeboň, jižní Čechy, CZ	FM178500
3	S 6.4	aluviální tůň, Horní Lužnice NR, jižní Čechy, CZ	FM178501
3	S 6.5	aluviální tůň, Horní Lužnice NR, jižní Čechy, CZ	FM178502
3	S 4.19	Kladský rybník, západní Čechy, CZ	FM178503
3	S 7.7	rybník Babín, Žďárské vrchy PLA, CZ	FM178504
3	S 16.2	rybník Xerr, jižní Čechy, CZ	FM178505
3	S 20.9	kanál, Crinan Canal, Skotsko, GB	-
3	S 24.1	oligotrofní jezírko u cesty, Abisko, SE	-
4	S 7.10	rybník Babín, Žďárské vrchy PLA, CZ	FM178506
4	S 10.2	Huťský rybník, Novohradské hory, jižní Čechy, CZ	FM178507
4	S 17.2	rybník Babín, Žďárské vrchy PLA, CZ	-
4	S 20.44	jezero, Loch Nam Ban, Skotsko, GB	-
5	S 15.3	Úpské rašeliniště, Krkonoše NP, severní Čechy, CZ	FM178508
5	S 15.5	Úpské rašeliniště, Krkonoše NP, severní Čechy, CZ	FM178509
5	S 15.9	Úpské rašeliniště, Krkonoše NP, severní Čechy, CZ	FM178510
6	S 8.1	Kyjský rybník, Praha, CZ	FM178511
6	S 9.1	tůně u soutoku řeky Moravy a Dyje, jižní Čechy, CZ	FM178512
6	S 9.2	tůně u soutoku řeky Moravy a Dyje, jižní Čechy, CZ	FM178513
6	S 14.1	rašeliniště, Swamp NR, severní Čechy, CZ	FM178514
6	S 21.2	řeka, Ploučnice, Horní Police, severní Čechy, CZ	-
6	S 23.5	vodní nádrž, Kvilda, jižní Čechy, Šumava, CZ	-
6	S 26.1	Huťský rybník, Novohradské hory, jižní Čechy, CZ	-
6	S 26.2	Huťský rybník, Novohradské hory, jižní Čechy, CZ	-
6	S 26.3	Huťský rybník, Novohradské hory, jižní Čechy, CZ	-
6	S 26.4	Huťský rybník, Novohradské hory, jižní Čechy, CZ	-
6	S 27.1	Pohořský rybník, Novohradské hory, jižní Čechy, CZ	-

**Tab. 2.** Kmeny použité v této studii, lokality, na kterých byly nalezeny a větve, do kterých spadají podle výsledků fylogenetické analýzy. Sekvence označené hvězdičkou byly získány z databáze GeneBank a pocházejí ze studie Wee et al. 2001.

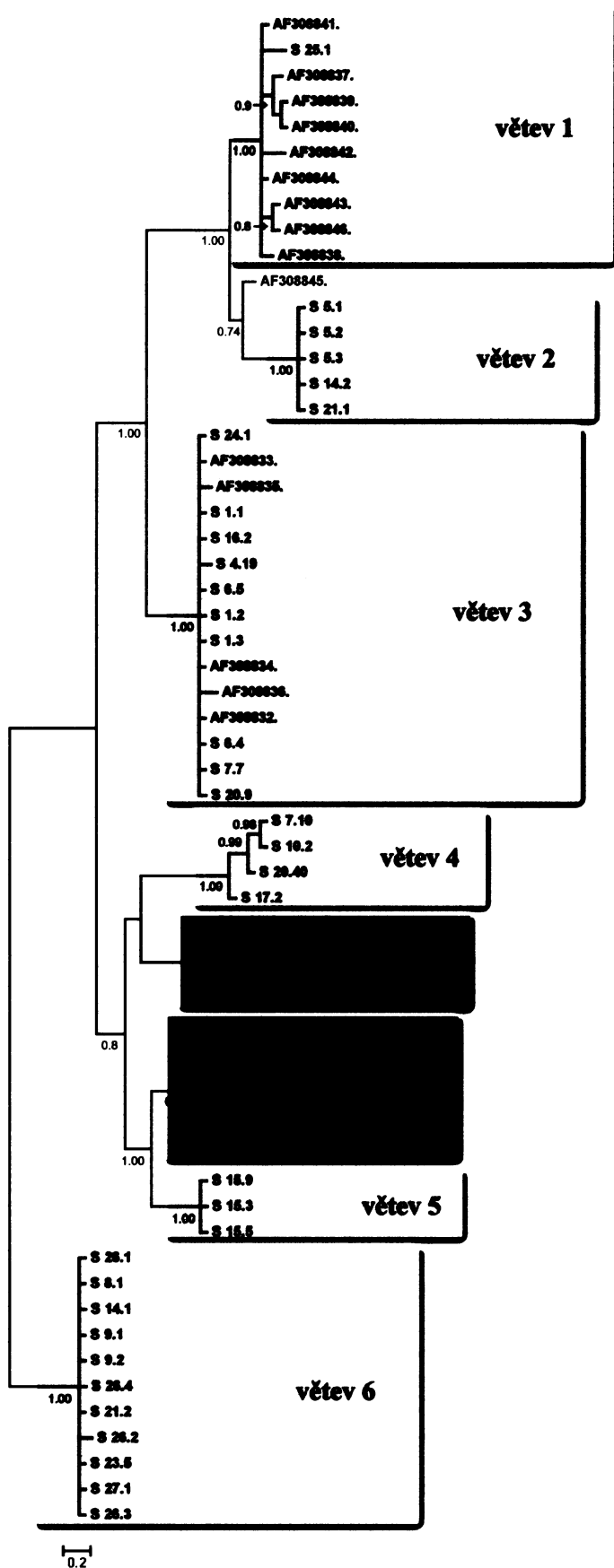
Větev	Označení kmene	Lokalita	Č. sekvence GeneBank
7	S 23.1	vodní nádrž, Kvilda, jižní Čechy, Šumava, CZ	-
7	S 23.2	vodní nádrž, Kvilda, jižní Čechy, Šumava, CZ	-
7	S 23.3	vodní nádrž, Kvilda, jižní Čechy, Šumava, CZ	-
7	S 23.4	vodní nádrž, Kvilda, jižní Čechy, Šumava, CZ	-
8	S 20.1	jezero, Lochan Add, Skotsko, GB	-
8	S 20.2	jezero, Lochan Add, Skotsko, GB	-
8	S 20.4	jezero, Lochan Add, Skotsko, GB	-
8	S 20.45	kanál, Crinan Canal, Skotsko, GB	-
8	S 20.5	jezero, Lochan Add, Skotsko, GB	-
8	S 20.8	kanál, Crinan Canal, Skotsko, GB	-
-	AF308845 *	roadside ditch, Keeweenaw County, MI ("And" 2555)	AF308845

**Tab. 2.** Kmeny použité v této studii, lokality, na kterých byly nalezeny, a větve, do kterých spadají podle výsledků fylogenetické analýzy. Sekvence označené hvězdičkou byly získány z databáze GeneBank a pocházejí ze studie Wee et al. 2001.



**Obr. 2.** Strom vytvořený BI analýzou zohledňující odlišné evoluční modely úseků použitých sekvencí. Nad větvemi jsou uvedeny hodnoty ML bootstrapu, pod větvemi jsou hodnoty posterior probability.





Obr. 3. Výsledný strom BI analýzy využívající jeden evoluční model pro celý alignment. Pod a nad větvemi jsou uvedeny hodnoty posterior probability.

### 3.2. Sekundární struktura ITS2 rDNA a CBCs (compensatory base changes)

Rekonstrukce sekundární struktury sekvencí ITS2 ukázala přítomnost CBCs (změn obou nukleotidů komplementárního páru při zachování párování) a hemi-CBCs (změn pouze jednoho nukleotidu komplementárního páru při zachování párování), a to na úseku helix II, který obsahoval 3 hemi-CBCs a 2 CBCs, a dále na úseku helix III, na kterém bylo nalezeno celkem 9 hemi-CBCs a 2 CBCs. Srovnání sekundární struktury sekvencí ITS2 jednotlivých kmenů odhalilo přítomnost (hemi-)CBCs mezi větvemi nalezenými při fylogenetické analýze. Počet těchto (hemi-)CBCs se pohyboval mezi dvěma (vzájemná odlišnost větví 5 a 8) a deseti (vzájemná odlišnost větví 2 a 4). Naproti tomu kmeny uvnitř jednotlivých větví se navzájem přítomností CBCs ani hemi-CBCs nelišily, a to ani v jednom z osmi případů.

### 3.3. Biogeografie a ekologie linií

Jak ukazuje tabulka 2 a obr. 2, většina severoamerických kmenů utvořila vlastní větev 1. Do této větve dále patří irský kmen S 25.1.

Větev 2 obsahuje kmeny ze tří českých ekologicky rozmanitých lokalit. Jedná se o pražskou tůň v Modřanech, rašeliniště Swamp a řeku Ploučnici.

Větev 3 je tvořena kmeny z různých českých lokalit, kmen z Německa, Skotska, Švédska a Austrálie.

Větev 4 obsahuje kmeny ze dvou českých lokalit a jeden skotský kmen.

Větev 5 je tvořena třemi kmeny pocházejícími z jediné lokality – z Úpského rašeliniště.

Větev 6 zahrnuje kmeny ze sedmi různých lokalit z území České republiky.

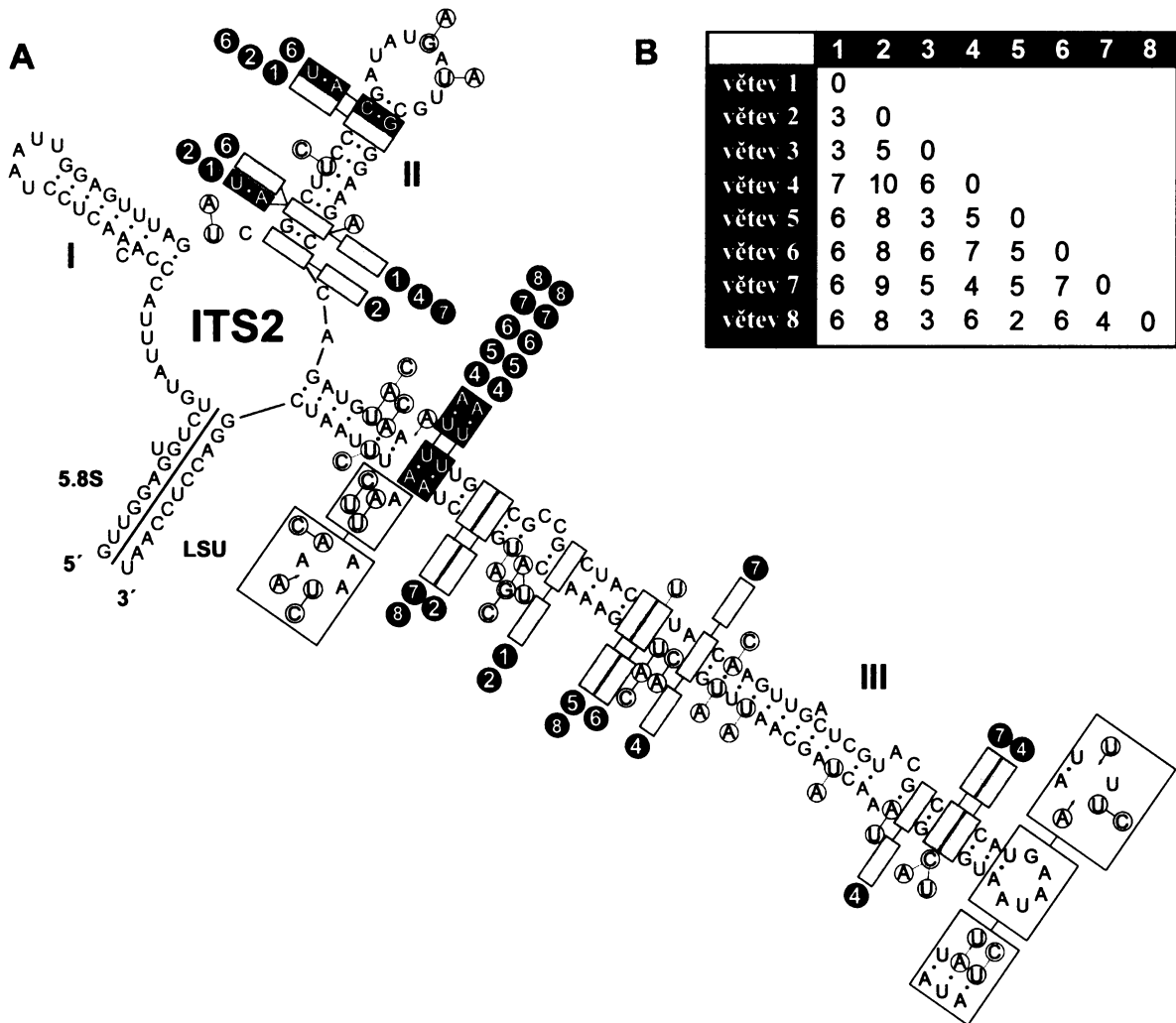
Větev 7 obsahuje pouze kmeny z české lokality Kvilda.

Větev 8 je tvořena výhradně kmeny ze dvou skotských lokalit.

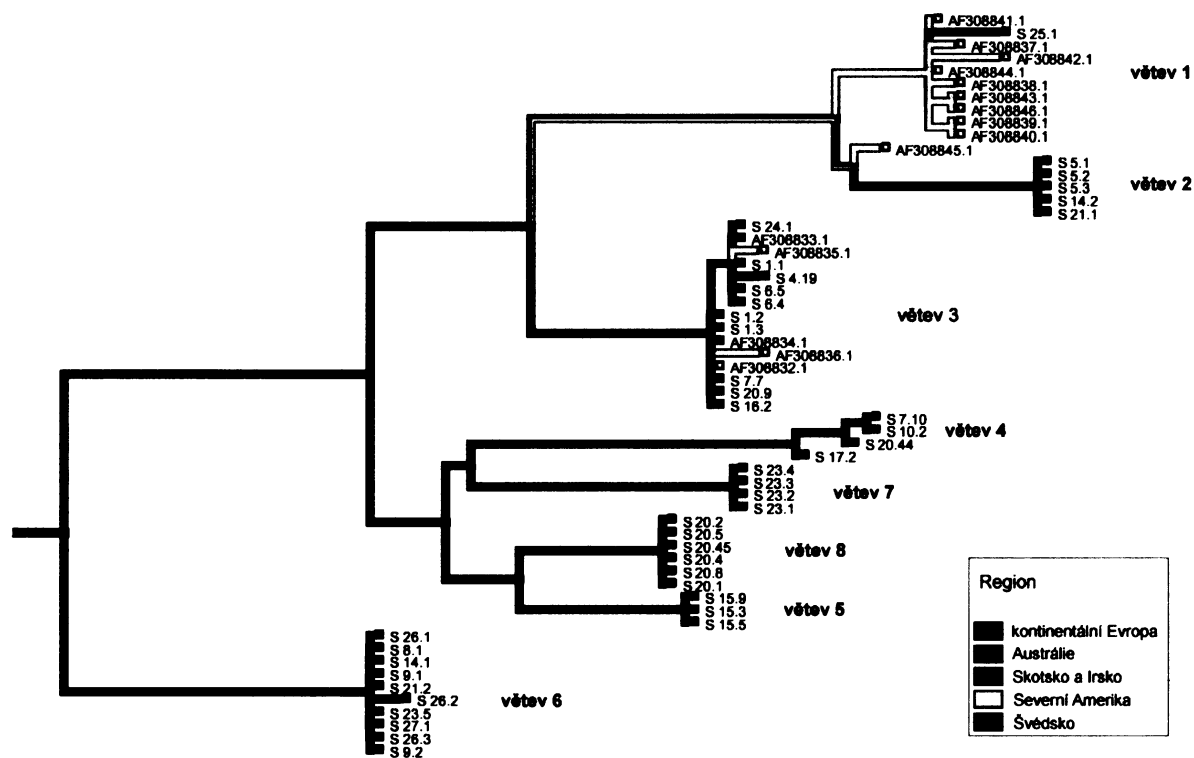
Analýzy tedy ukazují čtyři větve nalezené pouze v České republice, jednu větev sestávající pouze z kmenů ze Skotska, jednu větev s kmeny americkými a jedním kmenem z Irska, jednu větev s kmeny z České republiky i Skotska a jednu větev s kmeny z mnoha různých zemí střední i severní Evropy, severní Ameriky a Austrálie (obr. 6).

V mnoha případech byly na stejné lokalitě při stejném odběru nalezeny kmeny náležející k různým větvím. To je případ kmenů větve 6 a větve 2, nalezených při stejném odběru na lokalitě Swamp, a podobně také v řece Ploučnici. Větve 7 a 6 se vyskytovaly společně na šumavské Kvildě. Větve 6 a 4 byly nalezeny v Huťském rybníku v Novohradských horách. Větve 3 a 4 byly nalezeny v rybníku Babín. A konečně při stejném odběru byly také nalezeny větve 8 a 3 na skotské lokalitě Crinan Canal.

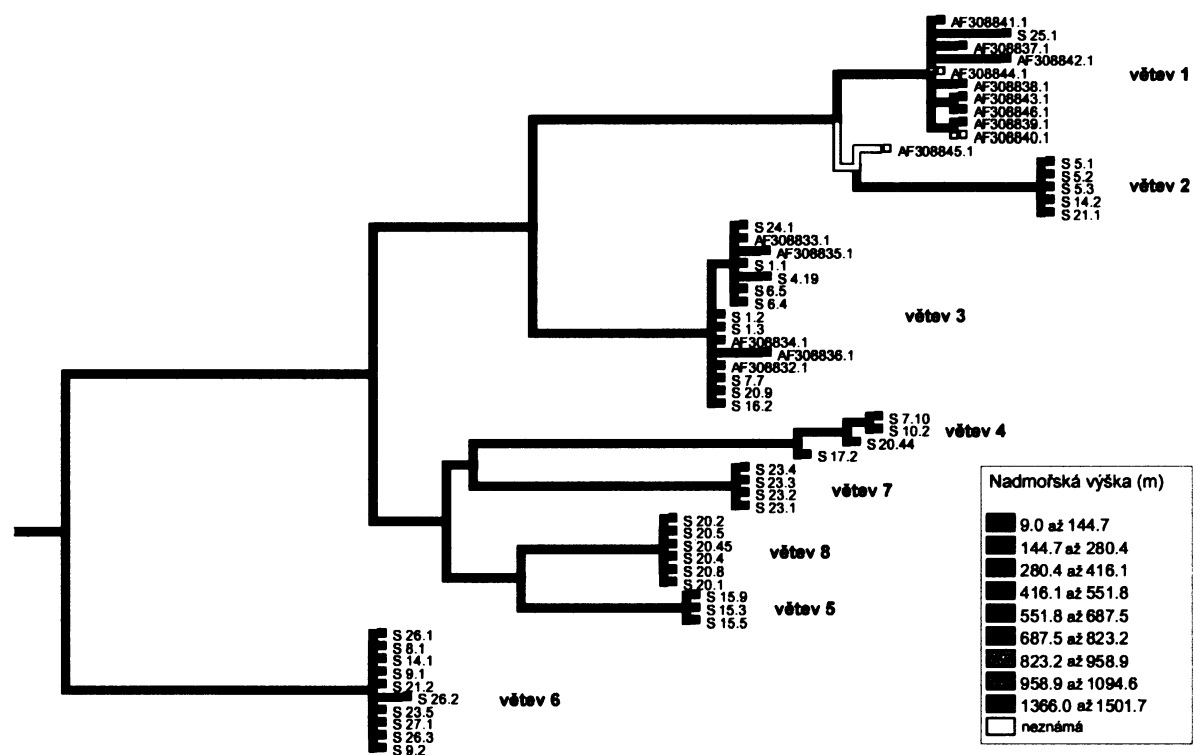
Pro většinu lokalit se podařilo stanovit nadmořskou výšku (tab. 3). Obr. 7 ukazuje nadmořskou výšku lokalit, vynesenu na strom ML. Výškové rozmezí pro jednotlivé větve shrnuje tab. 4.



**Obr. 5.** Předpokládaná sekundární struktura transkriptu sekvence ITS2 kmene S 1.3 (větev 3) s vyznačenými rozdíly bází: tmavě šedé obdélníky na pozadí párů bází označují CBCs. Světle šedé obdélníky značí hemi-CBCs. Jednotlivé změny bází jsou označeny kroužkem okolo zastupujících se nukleotidů. Změny větších částí koncových smyček jsou orámovány obdélníky bez výplně. V plných černých kroužcích sousedících s jednotlivými vyznačenými (hemi-)CBCs se nacházejí čísla větví, u kterých je daná změna přítomna. **B.** Matice počtu (hemi-)CBCs mezi jednotlivými liniemi.



Obr. 6. Informace o regionu, do kterého spadají lokality, vynesené na ML strom.



Obr. 7. Informace o nadmořské výšce lokalit vynesené na ML strom.

Lokalita	Nadmořská výška (m)
aluviální tůň, Horní Lužnice NR, jižní Čechy, CZ	416
aluviální tůň, Modřany, Praha, CZ	227
Big Betsy Pond, MI ("And" 5482)	?
Bluff Lake, Lake County, IL (CCMP 873)	117
ditch near Winter's Creek, Keeweenaw County, MI (CCMP 863)	190
Fox River, McHenry County, IL (CCMP 868)	261
Huťský rybník, Novohradské hory, jižní Čechy, CZ	816
jezero, Loch Nam Ban, Skotsko, GB	800
jezero, Lochan Add, Skotsko, GB	113
kanál u řeky River Corrib, Galway, IE	9
kanál, Crinan Canal, Skotsko, GB	70
kanál, Zlatá stoka, Třeboň, jižní Čechy, CZ	428
Kladský rybník, západní Čechy, CZ	805
Kyjský rybník, Praha, CZ	224
Lake Itaska State Park, Itaska County, MN (CCMP 858)	456
Lüneburger Heide, Germany (SAG 120.79)	10
Newfoundland, Canada (CCMP 866)	?
oligotrofní jezírko u cesty, Abisko, SE	370
Pohořský rybník, Novohradské hory, jižní Čechy, CZ	908
rašeliniště, Swamp NR, severní Čechy, CZ	250
road ditch near Gay, MI (CCMP 864)	243
roadside ditch, Keeweenaw County, MI ("And" 2555)	?
rybník Babín, Žďárské vrchy PLA, CZ	573
rybník Xerr, jižní Čechy, CZ	478
řeka, Ploučnice, Horní Police, severní Čechy, CZ	242
Úpské rašeliniště, Krkonoše NP, severní Čechy, CZ	1366
tůně u soutoku řeky Moravy a Dyje, jižní Čechy, CZ	152
vodní nádrž, Kvilda, jižní Čechy, Šumava, CZ	1055
White Springs Road Pond, Geneva, NY (Sandgren 2)	137
Winter's Creek, Keeweenaw County, MI (CCMP 872)	196
Yarra River, Melbourne, Victoria, Australia	147

**Tab. 3.** Nadmořská výška lokalit.

Větev	Nadmořská výška (m)
1	9 – 261
2	242 – 250
3	10 – 805
4	573 – 816
5	1366
6	224 – 1055
7	1055
8	70 – 133

**Tab. 4.** Rozmezí nadmořské výšky, ve kterém byly nalezeny kmeny spadající do jednotlivých větví.

### 3.4. Morfologie šupin

Obrázky 8 a 9 ukazují šupiny typické pro jednotlivé fylogenetické větve. Porovnání hodnot měřených morfologických znaků formou krabicových grafů je na obr. 10. Dvě větve byly vyhodnoceny jako signifikantně se lišící, pokud hodnota  $p$  pro tuto dvojici v analýze One-way ANOVA nebo Kruskal-Wallis byla menší než 0,001.

Poměr délky a šířky:

Liší se šupiny větve 1, 2 a 6 od ostatních, ne však navzájem.

Plocha foramenu:

Větev 5 se liší od všech ostatních.

Větev 1 se liší od větve 3.

Plocha póru bazální destičky:

Větev 2 se liší od všech ostatních.

Větev 1, 4 a 6 se liší od ostatních, ne však navzájem.

Plocha kýlového póru:

Větev 2 se liší od ostatních větví.

Větev 4 se liší od ostatních větví.

Větev 1 a 6 se liší od ostatních větví, ne však navzájem.

Poměr plochy bazální desky ku kýlu:

Větev 6 se liší od ostatních větví.

Větev 1 a 2 se liší od ostatních větví, ne však navzájem.

Větev 3 a 8 se liší od větve 7.

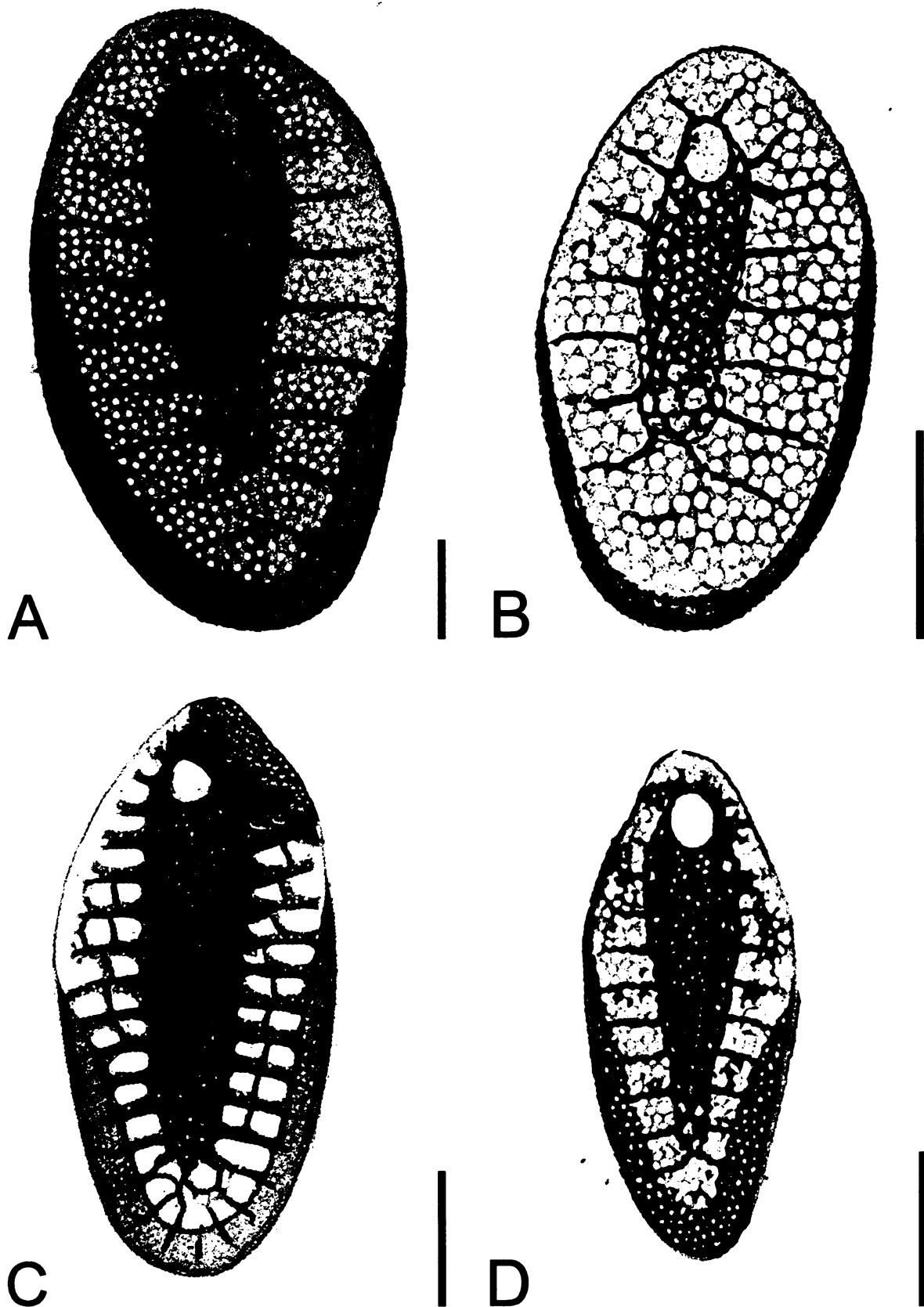
Délka šupiny:

Větev 3 se liší od všech ostatních.

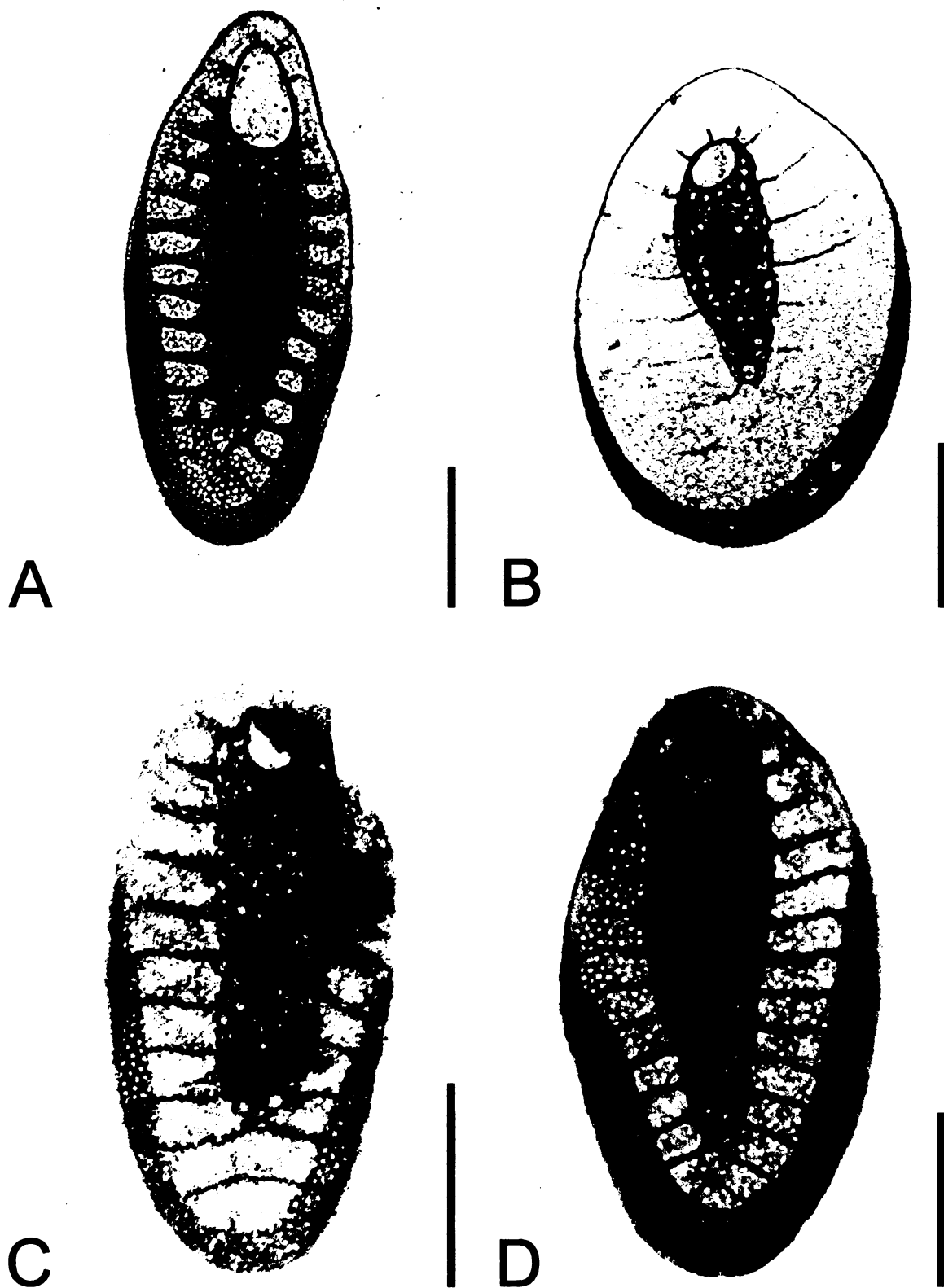
Větev 4 se liší od větve 2.

Větev 5 se liší od větví 1, 2, 5 a 7.

Větev 8 se liší od větví 2 a 7.

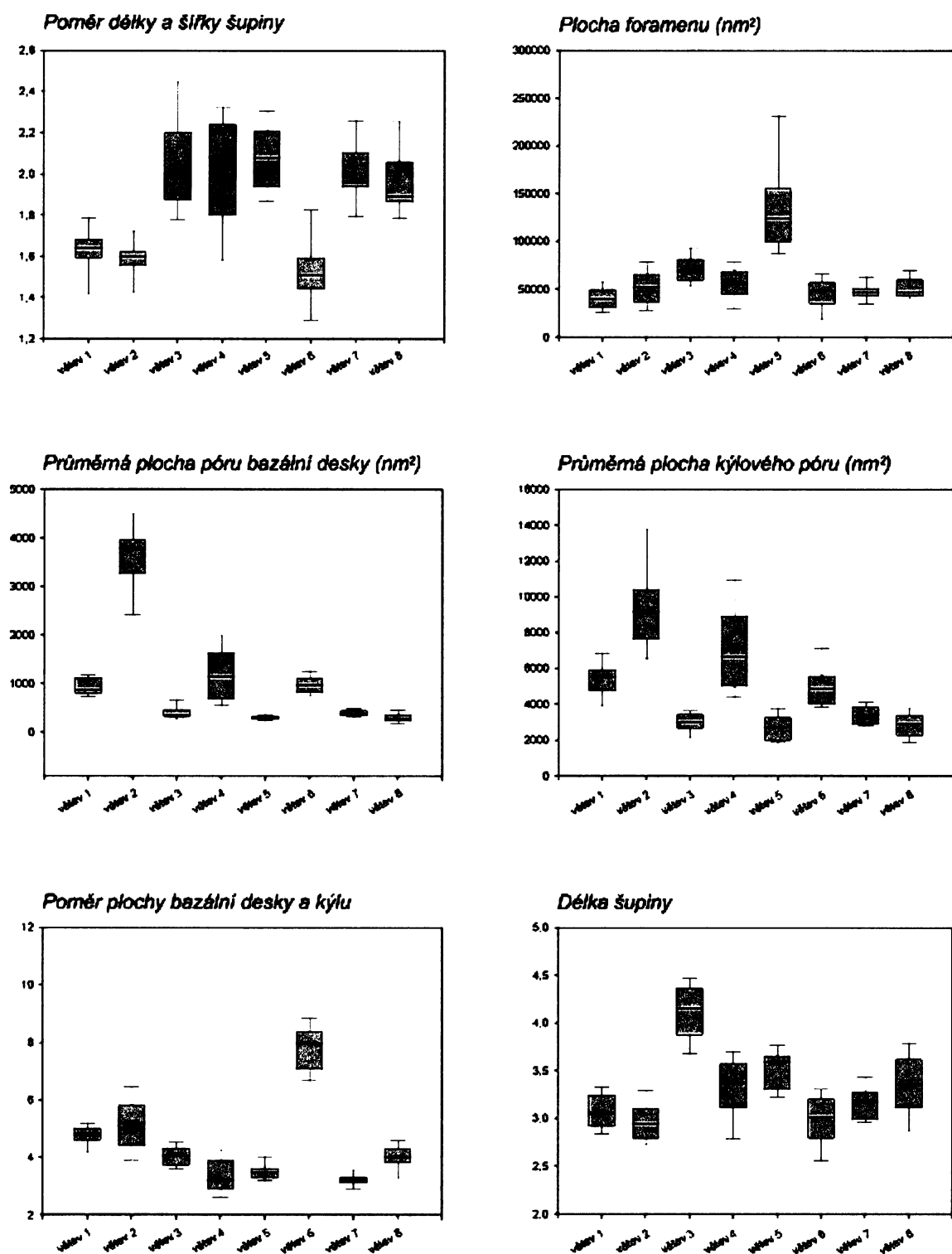


Obr. 8. TEM snímky vybraných reprezentativních šupin zástupců jednotlivých fylogenetických linií: A – větev 1, B – větev 2, C – větev 3, D – větev 4.



**Obr. 9.** TEM snímky vybraných reprezentativních šupin zástupců jednotlivých fylogenetických linií: **A** – větev 5, **B** – větev 6, **C** – větev 7, **D** – větev 8.

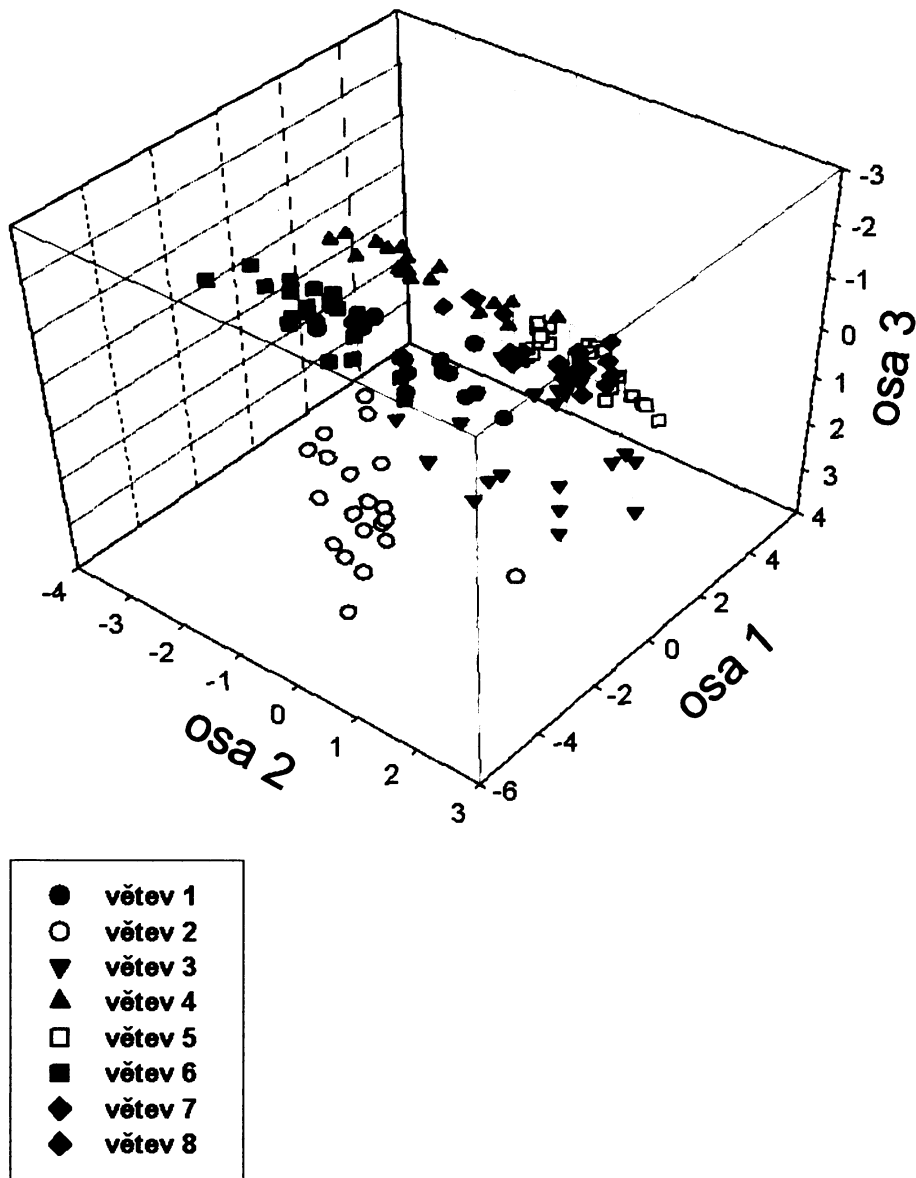




**Obr. 10.** Krabicové grafy morfologických dat pro jednotlivé znaky měřené na šupinách druhu *Synura petersenii* sensu lato. Výšku šedých sloupců vyznačují percentily 25 % a 75 %, čára uvnitř šedých ploch představuje medián. Chybové úsečky označují percentily 10 % a 90 %.

### 3.4.1. PCA

PCA rozdělila vzorky do skupin odpovídajících jednotlivým větvím (obr. 11). Charakteristiky jednotlivých komponent jsou uvedeny v tabulce 5. První osa vysvětlila 44,55% variability, druhá osa vysvětlila 23,83% a třetí vysvětlila 13,33%. Korelace měřených znaků s prvními čtyřmi osami ukazuje obr. 12.



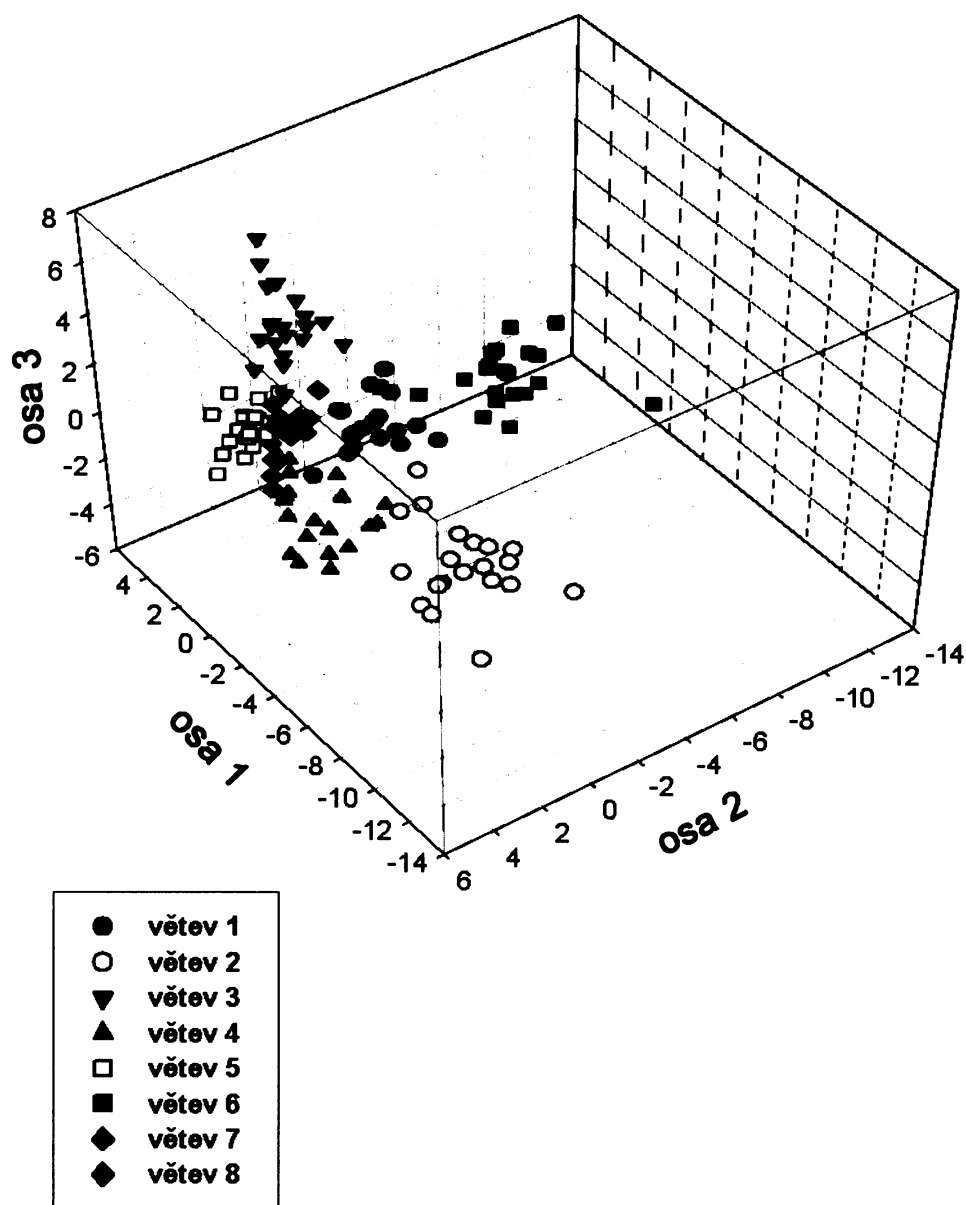
Obr. 11 PCA – ordinační diagram znázorňující rozložení objektů podél prvních tří os.

<b>komponenta</b>	<b>Eigenvalues</b>	<b>% variance</b>
1	4,0095	44,55
2	2,1444	23,83
3	1,1999	13,33
4	0,8313	9,24
5	0,5115	5,68
6	0,1737	1,93
7	0,0935	1,04
8	0,0329	0,37
9	0,0033	0,04

**Tab. 5.** Hodnoty Eigenvalues a procenta variance jednotlivých komponent nalezených metodou PCA.

### 3.4.2. CDA

Výsledkem kanonické diskriminační analýzy je ordinační diagram na obr. 13 a klasifikační matrice (tab. 6). Do skupin, odpovídajících fylogenetickým liniím, se ve většině případů podařilo správně zařadit 90 až 100 % šupin. Nejmenší úspěšnost (80 %) byla u větve 4. K nejčastějším záměnám docházelo u šupin patřících kmenům větve 7. Ty byly několikrát přiřazeny k větvi 4, 5 a 8. Srovnání Mahalanobisových vzdáleností větví, založených na morfologických znacích, a Jukes-Cantor vzdáleností vypočítaných na základě sekvencí ukazuje obr. 14. Mantelův test shody těchto dvou matic ukázal, že se od sebe významně liší.



Obr. 13. CDA – ordinační diagram znázorňující rozložení objektů podél prvních tří os.

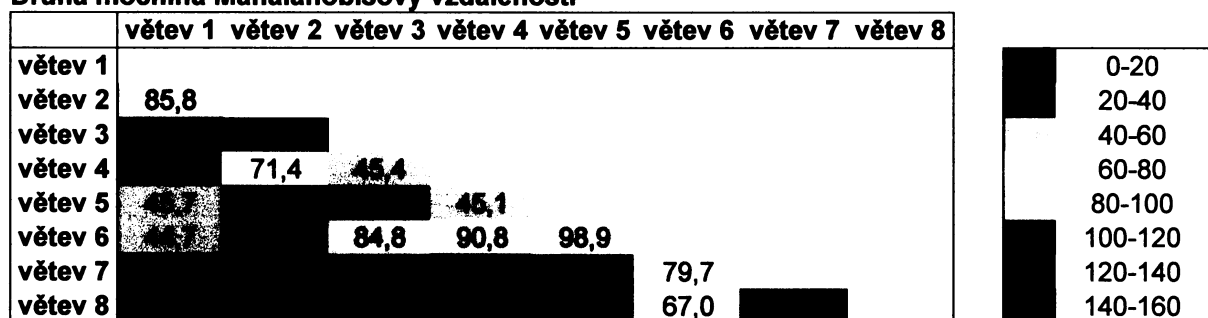
	% úspěchu	Větev 1	Větev 2	Větev 3	Větev 4	Větev 5	Větev 6	Větev 7	Větev 8
<b>Větev 1</b>	90	18	0	0	1	0	0	0	1
<b>Větev 2</b>	100	0	20	0	0	0	0	0	0
<b>Větev 3</b>	95	1	0	19	0	0	0	0	0
<b>Větev 4</b>	80	1	0	0	16	0	0	3	0
<b>Větev 5</b>	90	0	0	0	0	18	0	2	0
<b>Větev 6</b>	95	1	0	0	0	0	19	0	0
<b>Větev 7</b>	90	0	0	0	0	0	0	18	2
<b>Větev 8</b>	90	0	0	0	0	0	0	2	18
<b>Celkem</b>	91,25	21	20	19	17	18	19	25	21

Tab. 6. Klasifikační matrice získaná metodou CDA.

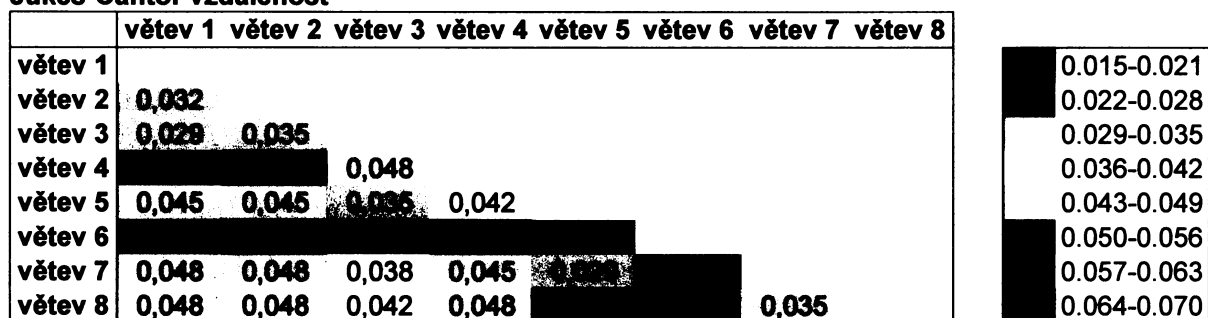
	větev 1	větev 2	větev 3	větev 4	větev 5	větev 6	větev 7	větev 8
větev 1		0	< 0,0001	< 0,0001	0	0	< 0,0001	< 0,0001
větev 2	0		0	0	0	0	0	0
větev 3	< 0,0001	0		0	0	0	< 0,0001	< 0,0001
větev 4	< 0,0001	0	0		0	0	< 0,0001	< 0,0001
větev 5	0	0	0	0		0	< 0,0001	< 0,0001
větev 6	0	0	0	0	0		0	0
větev 7	< 0,0001	0	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0		< 0,0001
větev 8	< 0,0001	0	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0	< 0,0001	

Tab. 7. Hodnoty p pro vzájemné vzdálenosti větví.

#### Druhá mocnina Mahalanobisovy vzdálenosti



#### Jukes-Cantor vzdálenost



Obr. 14. Srovnání Mahalanobisových vzdáleností větví, založených na morfologických znacích, a Jukes-Cantor vzdáleností vypočítaných na základě sekvencí. Výsledkem Mantelova testu shody těchto matic je hodnota  $p = 0,282$ . Matice se tedy od sebe významně liší.

### 3.5. Článek: Molecular diversity and species concept in *Synura petersenii* complex (Synurophyceae, Heterokontophyta)

Předběžné výsledky výzkumu byly zpracovány do článku pro impaktivní časopis *Nova Hedwigia*, který je připojen k této práci jako příloha. Na článku se mnou spolupracovali Pavel Škaloud a Magda Škaloudová.

#### 3.5.1. Český abstrakt článku

Tradiční taxonomie druhu *Synura petersenii* je založená na morfologii křemičitých šupin, které pokrývají povrch buněk těchto organismů. Klasifikace různých morfotypů tohoto

druhu se v minulosti mnohokrát změnila. Pro vyjasnění problematiky druhového konceptu druhu *S. petersenii* byl v této studii použit polyfázický přístup, který zajišťuje co největší spolehlivost výsledků. Analýza sekvencí ITS klonálních kultur *S. petersenii* z různých lokalit odhalila šest zřetelně odlišných větví. Zjištění přítomnosti CBCs (compensatory base changes) a hemi-CBCs u těchto šesti větví potvrdilo nezávisle výsledky analýzy sekvencí ITS. Morfologická analýza ukázala jednoznačné rozdíly ve struktuře šupin mezi jednotlivými větvemi. Všechny tyto tři druhové koncepty (ITS rDNA fylogenetika, CBC a morfologie šupin) přinesly zcela shodné výsledky. Za použití tohoto polyfázického přístupu byl navržen popis čtyř nových druhů (*S. americana*, *S. macropora*, *S. reticulata* and *S. oculatea*), a dále bylo navrženo stanovení *S. petersenii* a *S. glabra* jako dvou separátních druhů.

#### 4. Diskuse

Primárním cílem této práce bylo zjištění rozsahu molekulární variability druhu *Synura petersenii*. Wee et al. zjistili ve své studii z roku 2001, že druh *S. petersenii* není po molekulární stránce uniformní. Nalezli vnitrodruhovou variabilitu úseku ITS1, 5,8 a ITS2 rDNA, která zřetelně rozdělovala použité kmeny do dvou větví. Analýza mnohem většího počtu kmenů ukazuje, že molekulární variabilita druhu *S. petersenii* je daleko větší. Kromě původních dvou linií, které našel Wee se svými kolegy, se podařilo odhalit šest dalších větví, a je velmi pravděpodobné, že jejich počet by ještě vzrostl po přidání dalších kmenů.

##### 4.1. Fylogenetika

Když porovnáme ML strom vzniklý při analýze 35 sekvencí ITS (viz článek v příloze, obr. 2) s ML stromem finálním, ve kterém bylo zpracováno 58 sekvencí, nejvýznamnějším rozdílem je bezesporu nález dvou nových větví. Kromě této velké změny se ovšem topologie stromů příliš neliší. V nové analýze se trochu vyjasnila pozice kmene AF308845, který se ukazuje být sesterský větvi 2 se střední podporou. Pravděpodobně se jedná o další samostatnou linii. Pro potvrzení této domněnky a vyjasnění vztahů tohoto kmene k sousedním větvím by bylo vhodné použít další molekulární marker.

Všechny tři metody, použité pro analýzu většího počtu vzorků (ML, BI a BI s použitím partitioned analýzy), došly ke shodným výsledkům, což poukazuje na stabilitu alignmentu ITS sekvencí. Získané stromy se liší pouze drobnými odchylkami v rámci hlavních osmi linií. Tyto odchylky vesměs nejsou statisticky podpořené a jsou mimo rozlišovací

schopnost analýzy. Prozkoumání variability a vztahů uvnitř nalezených linií by vyžadovalo citlivějšího, variabilnějšího markeru. Výjimkou je větev 4, u které je určitá vnitřní variabilita zřetelná a statisticky středně až dobře podpořená i za použití stávajících metod.

Použití BI zohledňující různost úseků použitých sekvencí se ukázalo jako výhodné. Touto metodou získaný strom má o něco větší celkovou podporu než strom vzniklý metodou BI s jediným modelem pro celý alignment.

## 4.2. Morfologie

Molekulární revize původně morfologicky definovaných taxonů mají často za následek odhalení kryptických druhů, které dříve nebyly popsány právě proto, že jejich morfologie nebyla odlišitelná (např. Denboh et al. 2003, Evans et al. 2008, Vanormelingen et al. 2008). V případě druhu *S. petersenii* sensu lato se ovšem ukazuje, že nalezené molekulární variabilitě odpovídá variabilita morfologická, a nejedná se tedy o kryptické druhy. Jednotlivé nalezené linie jsou morfologicky dobře definovatelné. To umožňuje použití morfologického konceptu druhů pro jejich odlišení. Kmeny použité v této studii pro morfologickou analýzu byly všechny po určitou dobu kultivovány v laboratoři. K tomu, aby bylo možné linie na základě morfologie spolehlivěji identifikovat, by bylo jistě dobré prozkoumat také jejich variabilitu v přírodních podmínkách. Ovšem vzhledem k tomu, že pro analýzu byly vybrány znaky, které se již dříve ukázaly být na vnějších podmínkách nezávislé (Martin-Wagenmann & Gutowski 1995, Sandgren et al. 1996, Gavrilova et al. 2005), je pravděpodobné, že rozdíly morfologie šupin kultivovaných kmenů a přírodních vzorků budou minimální. Diskriminační analýza ukázala, že se zvolené morfologické znaky skutečně dají s úspěchem použít pro zařazení kmenů do příslušných fylogenetických větví. Správné a jisté zařazení však musí být založené na sledování znaků několika náhodně vybraných šupin daného kmene.

Morfologie šupin kmenů, náležejících k větvi 6, odpovídá popisu formy *glabra* druhu *S. petersenii* (Kristiansen & Preisig 2007). Větve 7 a 8 by se daly podle morfologie šupin přiřadit k taxonu *S. petersenii* f. *petersenii*. V rámci větve 3 se vyskytují morfotypy odpovídající taxonům *S. petersenii* f. *petersenii* a *S. petersenii* f. *kufferathii* (Petersen & Hansen, 1958). Morfologie šupin ostatních větví neodpovídá žádným dosud popsaným formám druhu *S. petersenii*. S některými nalezenými morfotypy se však přesto můžeme setkat v existující literatuře. Podle fotodokumentace ke studii, provedené týmem Gavrilova et al. (2005), je možné na základě morfologie identifikovat použité kmeny jako větev 3 (klon 1), větev 6 (klon 2) a větev 2 (klon 3). Podobně je i v dalších studiích možné nalézt fotografie šupin, jejichž stavba odpovídá morfologii větve 2 (Martin-Wagenmann & Gutowski 1995; obr. 17-23, Kristiansen

& Preisig 2007; obr. 233b) a také šupin odpovídajících morfotypu větve 4 (Couté & Franceschini 1998; obr. 79, Řezáčová & Škaloud 2005; obr. 34).

### 4.3. Srovnání morfologie a fylogenetiky

Srovnání topologie výsledných fylogenetických stromů a morfologie šupin kmenů, patřících do jednotlivých větví, neukazuje u měřených morfologických charakteristik žádné zřetelné evoluční trendy. Jednotlivé morfologické znaky je možné nalézt u různých od sebe více či méně vzdálených linií. Příkladem mohou být oválné šupiny zástupců větve 6. Podobný tvar nacházíme u větví 1 a 2, které jsou ovšem větví 6 dosti fylogeneticky vzdálené. U většiny morfologických shod a podobností se tedy nejspíše jedná o konvergenci. Tento závěr podporuje také porovnání vzdálenosti větví, založené na morfologických datech, se vzdáleností genetickou. Mantelův test nenalezl podobnost mezi maticemi těchto dvou typů dat (obr. 14). Ukazuje se tedy, že jednotlivé fylogenetické větve sice mají každá svou charakteristickou kombinaci morfologických znaků, která umožňuje jejich spolehlivou determinaci, ovšem vztahy mezi těmito znaky nekopírují evoluční vztahy mezi liniemi. To znamená, že morfologie šupin není vhodným podkladem pro výzkum příbuzenských vztahů těchto organismů a pro vytváření evolučních závěrů. Pokud je tento jev rozšířený i na vyšší úrovni, než jen v rámci komplexu *S. petersenii*, může silně zpochybnit mnohé studie, které se právě tímto směrem ubíraly a na základě morfologie šupin se pokoušely vytvořit teorie o vztazích a evoluci chrysomonád s křemičitými šupinami (Péterfi & Momeu 1977, Wee 1997, Lavau et al. 1997).

### 4.4. Geografie a ekologie linií

Nalezené fylogenetické větve nejsou všechny zastoupeny srovnatelným a dostatečným počtem kmenů, aby se daly na tomto základě dělat konkrétnější biogeografické závěry. Přesto ovšem nasbíraná data a analýzy některé zajímavé důsledky naznačují. Kmeny některých linií byly nalezeny pouze v jedné oblasti a na poměrně malém území (větev 5 – Krkonoše, větev 7 – Šumava, větev 8 – západní Skotsko). Ve všech třech případech se jedná o kmeny z hornatých (ač ne vždy vysoko položených), a tedy poměrně izolovaných oblastí. Zůstává otázkou, zda mají zástupci těchto větví přísněji vymezené ekologické nároky, které je odkazují právě na tyto oblasti, nebo zda je tento jev jen artefaktem způsobeným nedostatečným samplingem. Ačkoli může být i druhá jmenovaná možnost reálná, nedá se přehlédnout nápadný rozdíl ve zjištěné distribuci a hojnosti těchto tří větví a široce rozšířené větve 3. Tato větev obsahuje kmeny ze tří kontinentů, z obou polokoulí, a její zástupci se dají nalézt na ekologicky rozma-



nitých lokalitách. Kmeny větve 3 byly nalezeny na pěti různých lokalitách České republiky, dále v Německu, USA, Austrálii, a také sem patří kmen pocházející ze švédského Abiska, ležícího za polárním kruhem. O jejím širokém rozšíření a ekologickém záběru tedy nemůže být sporu. Dalším zajímavým případem je větev 1, která je tvořena pouze kmeny ze severní Ameriky, až na jednu výjimku, a to kmen S 25.1 z Irska. V severní Americe je tato větev evidentně hojně zastoupena, neboť devět ze dvanácti severoamerických kmenů použitých v této studii (tedy tři čtvrtiny) patří právě do této větve. Naproti tomu ze třiceti čtyř kmenů pocházejících z kontinentální Evropy nenáleží k této větvi ani jeden jediný. Proč se tato větev vyskytuje právě v severní Americe a Irsku a zda je možné ji nalézt ještě v jiných oblastech, to už jsou otázky přesahující tuto studii. (Vyvíjet teorii o invazi původně irské větve 1 do severní Ameriky v první polovině devatenáctého století v souvislosti s dramatickým příchodem druhu *Phytophthora infestans* do Evropy je při daných informacích asi poněkud předčasné.) Dále jsou tu větve 2, 4 a 6, které byly nalezeny pouze v Evropě, ovšem na větším množství poměrně dosti ekologicky rozmanitých lokalit. Výsledky této studie tedy naznačují, že by se biogeografie jednotlivých kmenů mohla lišit a zahrnovat různé patterny od kosmopolitnosti až po endemitismus, podobně jako je tomu u blízce příbuzného rodu *Mallomonas* nebo u některých dalších druhů rodu *Synura* (Kristiansen 2001). Definitivní odpověď však může přinést pouze další výzkum.

Větve 1, 2, 3, 4 a 6, obsahující kmeny z většího množství lokalit, pocházejí vesměs z lokalit typově dosti rozmanitých (tab. 2). Příkladem může být větev 2, do které patří kmeny z pražské tůně, z rašeliniště a z řeky. V některých případech byly kmeny, patřící do různých větví, nalezeny na stejné lokalitě během stejného odběru. Ekologické nároky těchto větví se tedy zjevně překrývají. Ve všech těchto případech je jedním ze dvou taxonů, nalezených na lokalitě, buď větev 3, nebo větev 6. To opět svědčí o jejich široké ekologické valenci.

Co se týče nadmořské výšky lokalit (tab. 3, 4 a obr. 7), na kterých byly nalezeny jednotlivé kmeny, je situace podobná jako ta týkající se typů lokalit. Větve s největším počtem kmenů a s nejrozmanitějšími typy lokalit, tedy větve 3 a 6, byly také nalezeny v největším rozpětí nadmořských výšek (rozdíl kolem 800 m). Další na kmeny nejbohatší větve (1) už má rozpětí výrazně menší, byla nalezena na lokalitách asi do výšky 250 m nad mořem. Oproti tomu větev 4 byla nalezena v o něco vyšších polohách (mezi 550 a 800 m nad mořem). Výškové rozmezí pro větve 2 a 8 už je méně než 100 m, ovšem to může být způsobeno nedostatečným samplingem. Větve 5 a 7 byly obě nalezeny pouze na jedné lokalitě, která se v obou případech nacházela ve výšce větší než 1000 m nad mořem. Je velmi zajímavé, že právě na jediných dvou takto vysoko položených lokalitách, které jsem při svých odběrech navštívila,

byly v obou případech nalezeny dvě nové větve. Opět se nabízí otázka, zda se nejedná o linie specializované na takovéto biotopy, ovšem odpověď může přinést jen podrobnější výzkum.

#### 4.5. Druhový koncept

Druh *Synura petersenii* je v současné době vymezován výhradně na základě morfologických znaků přítomných na křemičitých šupinách a pozorovatelných pomocí elektronového mikroskopu. Značná variabilita těchto znaků, která byla u druhu *S. petersenii* pozorována, byla v některých případech vyhodnocena jako vnitrodruhová variabilita a vedla k popisu variet a forem tohoto druhu (Kristiansen & Preisig 2007). V dnešní době je už ovšem jasné, že pouze morfologická kritéria na jasné vymezení taxonomických jednotek nestačí. Ukázkou jsou zásadní revize a úpravy systému mnoha řasových skupin, které byly původně definovány morfologicky (Wilcox 1998, Huss 2002, Krienitz et al. 2002, Pažoutová 2008).

V této práci bylo použito několik různých přístupů, které mohou sloužit jako nezávislé druhové koncepty. Prvním z nich byla fylogenetická analýza sekvencí ITS rDNA (přesněji úseku ITS1-5,8S-ITS2). Odlišnosti těchto sekvencí byly již mnohokrát použity jako podklad k popisu nových druhů řas (Kroken & Taylor 2000, Behnke et al. 2004, Lewis & Flechtner 2004, Vanormelingen et al. 2007, Amato et al. 2007, Vanormelingen et al. 2008).

Druhým použitým přístupem byla rekonstrukce sekundární struktury ITS2 rRNA a zjištění přítomnosti (hemi-)CBC. Ta u mnoha protistních skupin, v čele s blízkými příbuznými třídy Synurophyceae – rozsivkami, koreluje s přítomností reprodukčních bariér a může proto indikovat, že se jedná o biologické druhy (Coleman 2000, Casteleyn et al. 2007, Müller et al. 2007).

Posledním použitým přístupem byla tradiční morfologie. Morfologická variabilita druhu *S. petersenii*, popsána mnohými autory (Kristiansen 1986, Sandgren et al. 1996), vedla již dříve logicky k úvahám o jejím molekulárním pozadí (Kristiansen 2001), a jedním z cílů této studie bylo zjistit, zda nalezené molekulární variabilitě odpovídá variabilita morfologie šupin. Fylogenetické linie odhalené v této studii mají skutečně charakteristickou morfologii. Jejich molekulární variabilita je však ještě větší než na první pohled zřetelná variabilita morfologická. Šupiny větve 7 a 8 se při zběžném pohledu jeví jako téměř stejné, a jejich odlišnosti vyjdou najevo až po změření charakteristických znaků na několika šupinách. Přitom ani nálezy šupin s morfologií velmi výrazně odlišnou od dosud popsáných taxonů obvykle nemají žádné taxonomické důsledky (Kristiansen 1992, Řezáčová & Škaloud 2005). Je tedy vidět, že morfologické odlišnosti šupin tohoto druhu a jejich taxonomický význam jsou značně podceňovány a že morfologická variabilita tohoto druhu není ještě zdaleka kompletně prozkouma-

ná. Tato studie ukazuje, že k vymezení a determinaci taxonů mohou posloužit i mnohem jemnější rozdíly ornamentace, než jakým je dnes přikládána váha.

Všechny výše popsané přístupy měly naprosto shodný výsledek – odlišení osmi zřetelných linií v rámci druhu *S. petersenii*. Tento nový druhový koncept, vzniklý syntézou tří nezávislých a v praxi používaných druhových konceptů, by se mohl stát novým silným nástrojem pro výzkum biodiverzity třídy Synurophyceae, neboť má potenciál odhalovat skutečnou molekulární diverzitu stávajících druhů a zároveň nerezignuje na vyhledávání použitelných morfologických znaků, které jsou tolik potřebné pro budoucí aplikaci výsledků v dalších oblastech výzkumu i v praxi.

#### 4.6. Skutečné druhové bohatství v rámci komplexu *S. petersenii* sensu lato

V této studii bylo odhaleno osm linií, které je vzhledem ke shodě několika druhových konceptů možné považovat za jednotlivé druhy. Existuje však hned několik důvodů, proč si myslet, že skutečné druhové bohatství, skrývající se v rámci tohoto komplexu, je mnohem větší.

Vzorky, použité pro tuto studii, pocházely převážně z území České republiky, Skotska a severní Ameriky. Vzhledem k tomu, že některé větve obsahují pouze kmeny z jednoho území, je pravděpodobné, že při odběru vzorků na dalších, dosud v tomto směru neprozkoumaných lokalitách v jiných regionech, mohou být nalezeny další linie. Není také vyloučeno, že mohou být odhaleny další druhy i v oblastech, které jsou v této analýze zastoupeny hojně, včetně České republiky, protože ani tyto oblasti nebyly ještě zdaleka zmapovány vyčerpávajícím způsobem. Tuto myšlenku podporuje fakt, že po zvětšení počtu vzorků z původních 35 (viz článek v příloze, obr. 2) na 58 byly nalezeny dvě nové větve, z nichž jedna pocházela z území, na kterém do té doby nebyly vzorky pro studii odebírány – ze Skotska. Na druhou stranu, druhá z nových větví pocházela opět z České republiky, tedy z oblasti, ve které bylo předtím nalezeno již větví pět.

Další důvod pro smělost v odhadech skutečného druhového bohatství komplexu *S. petersenii* je nový pohled na tradiční morfologický druhový koncept, který tato studie přináší. Nalezené morfologické rozdíly mezi jednotlivými větvemi jsou sice zřetelné, ale poměrně jemné. Zároveň pouze čtyři z osmi nalezených větví morfologicky korespondovaly s již popsanými formami (větve 7 a 8 – *S. petersenii* f. *petersenii*, větev 3 – *S. petersenii* f. *petersenii*, případně *S. petersenii* f. *kufferathii*, a větev 6 – *S. petersenii* f. *glabra*). Protože formy *S. petersenii* bývají popisovány na základě poměrně výrazných morfologických odlišností, jeví se jako pravděpodobné, že i ostatní dosud popsané formy tohoto druhu jsou molekulárně odlišné.

Vzhledem k tomu, že v rámci této studie byly nalezeny čtyři nové, dosud nepopsané morfotypy, je možno soudit, že ani morfologická variabilita nebyla zatím plně prozkoumána a popsána. Dá se tedy očekávat, že druhové bohatství tohoto komplexu bude výrazně přesahovat množství popsaných forem.

Diskusi na téma druhového bohatství a druhového konceptu lze dále najít v příloženém článku.

## **5. Poděkování**

Chtěla bych touto cestou poděkovat především svému školiteli Pavlovi Škaloudovi za trpělivé vedení. Dále patří můj dík všem členům algologické skupiny katedry botaniky na PřF UK za pomoc a podporu při mé práci. Děkuji také svým rodičům a přátelům za podporu.

Tato studie byla financována Grantovou agenturou Univerzity (Grant B BIO 137/2006).

## 6. Literatura

AMATO, A., W.H.C.F. KOOISTRA, J. HEE LEVIALDI GHIRON, D.G. MANN, T. PRÖSCHOLD & M. MONTRESOR (2007): Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. – *Protist* **158**: 193-207.

ANDERSEN, R. A. (1987): Synurophyceae classis nov., a new class of algae. – *Amer. J. Bot.* **74**: 337-353.

ANDERSEN, R.A., S.L. MORTON & J.P. SEXTON (1997): Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton 1997. List of strains. – *J. Phycol.* **33** (suppl.): 1-75.

ASMUND, B. (1955): Electron microscope observations on *Mallomonas caudata* and some remarks on its occurrence in four Danish ponds. – *Bot. Tidsskr.* **52**: 163-168.

ASMUND, B. (1968): Studies on Chrysophyceae from some ponds and lakes in Alaska. VI. Occurrence of *Synura* species. – *Hydrobiologia* **31**: 497-515.

ASMUND, B. & J. KRISTIANSEN (1986): The genus *Mallomonas* (Chrysophyceae). – *Opera Botanica* **85**.

BEHNKE, A., T. FRIEDL, V.A. CHEPURNOV & D.G. MANN (2004) Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). – *J. Phycol.* **40**: 193–208.

CASTELEYN, G., V.A. CHEPURNOV, F. LELIAERT, D.G. MANN, S.S. BATES, N. LUNDHOLM, L. RHODES, K. SABBE, W. VYVERMAN (2007): *Pseudo-Nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): a cosmopolitan diatom species? – *Harmful Algae* **7**: 241-257.

CHARLES, D. F. & J. P. SMOL (1988): New methods for using diatoms and chrysophytes to infer past pH of low-alkalinity lakes. – *Limnol. Oceanogr.* **33**: 1451-1462.

COLEMAN, A.W. (2000): The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. – *Protist* **151**: 1-9.

COLEMAN, A.W. (2003): ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. – *Trends Genet.* **19**: 370–375.

COLEMAN, A.W. & J.C. MAI (1997) Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. – *J. Mol. Evol.* **45**: 168–177.

COUTÉ A. & I. M. FRANCESCHINI (1998): Scale-bearing chrysophytes from acid waters of Florianópolis, Santa Catarina Island, South Brazil. – *Algol. Stud.* **88**: 37-66.

CRONBERG, G. & J. KRISTIANSEN (1980): Synuraceae and other Chrysophyceae from central Småland, Sweden. – *Bot. Notiser* **133**: 595-618.

CRONBERG, J. G. & J. KRISTIANSEN (eds.). (1996): *Chrysophytes: Progress and New Horizons*. – *Nova Hedw. Beih.* **114**: 1-226.

DENBOH, T., T. ICHIMURA, D. HENDRAYANTI & A. W. COLEMAN (2003): The *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Charophyceae, Chlorophyta) species complex viewed from the 1506 group I intron and ITS2 of nuclear rDNA. – *J Phycol* **39**: 960–977.

DE QUEIROZ, K. (2007): Species concepts and species delimitation. – *Syst. Biol.* **56**: 879-886.

DE RIJK, P., J. WUYTS & R. DE WACHTER (2003): RnaViz2: an improved representation of RNA secondary structure. – *Bioinformatics* **19**: 299–300.

EHRENBERG, C. G. (1835): Dritter Beitrag zur ER kenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Abh. König. Akad. Wiss. Berlin* (1833): 145-336 – In: Kristiansen, J. 2005. *Golden Algae: A Biology of Chrysophytes*. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

EVANS, K. M., V. A. CHEPURNOV & D. G. MANN (2008): Ten microsatellite markers for the freshwater diatom *Sellaphora capitata*. – *Molecular Ecology Resources* **9(1)**: 216-218.

FINLAY, B. J., K. J. CLARKE (1999): Ubiquitous dispersal of microbial species. – *Nature* **400**: 828.

FINLAY, B. J. (2002): Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. – *Science* **296**: 1061-1063.

FOTT, B. (1955): Scales of *Mallomonas* observed in the electron microscope. – *Preslia* **27**: 280-282.

GAVRILOVA, O.V., N.V. NOGINA & L.N. VOLOSHKO (2005): Scale structures and growth characteristics of *Synura petersenii* (Synurophyceae) under different pH conditions. – *Nova Hedwigia Beihefte* **128**: 249-256.

HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.

HAMER, O., D. A. T. HARPER & P. D. RYAN (2001): PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4(1)**: 9.

HEPPERLE, D. (2004): SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version.

HUSS, V. A. R., C. FRANK, E. C. HARTMANN, M. HIRMER, A. KLOBOUCEK, B. M. SEIDEL, P. WENZELER & E. KESSLER (2002): Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella sensu lato* (Chlorophyta). – *J. Phycol.* **35**: 587-598.

KALINA, T., Y. NĚMCOVÁ, J. NEUSTUPA (2000): Silica-scaled chrysophytes of the Czech Republic. 1. District Česká Lípa (Northern Bohemia) and part of the Central Bohemia. – *Algological studies* **131**: 29-47.



KIM, J. H., M. O. Shin, K. L. Lee & H. S. Kim (2008): Effect of environmental conditions on the growth of *Synura petersenii* (Synurophyceae) in vitro and two eutrophic water bodies in Korea. – *Nova Hedwigia* **86**: 3-4

KLEBS, G. (1893a): Flagellatenstudien. – I. Zeitschr. Wiss. Zool. **55**: 265-351. In: KRISTIANSEN, J. (2005): *Golden Algae: A Biology of Chrysophytes*. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

KORSHIKOV, A.A. (1929): Studies on Chrysomonads. I. – *Arch. Protistenkd.* **67**: 253-290.

KRIENITZ, L., I. USTINOVA, T. FRIEDL & V. A. R. HUSS (2002): Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algae family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). – *J. Phycol.* **37**: 852-865.

KRISTIANSEN, J. (1975a): On the occurrence of the species *Synura*. – *Vehr. Internat. Verein. Limnol.* **19**: 2700-2715.

KRISTIANSEN, J. (1986): The ultrastructural basis of chrysophyte systematics and phylogeny. – *Crit. Rev. Plant. Sci.* **4**: 149-211.

KRISTIANSEN, J. (1992): Silica-scaled chrysophytes from West Greenland: Disko Island and the Søndre Strømfjord region. – *Nord. J. Bot.* **12**: 525-536.

KRISTIANSEN, J. (1995): Silica-scaled chrysophytes from Lake Thingvallavatn, Iceland. – *Algol. Stud.* **79**: 67-76.

KRISTIANSEN, J., L. DÜVEL & S. WEGEBERG (1997): Silica-scaled chrysophytes from the Taymyr Peninsula, Northern Siberia. – *Nova Hedwigia* **65**: 337-351.

KRISTIANSEN, J. (2001): Biogeography of silica-scaled chrysophytes. – *Nova Hedwigia* **122**: 23-39.

KRISTIANSEN, J. & H.R. PREISIG (2007): *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, vol 1, part 2, Synurophyceae. – Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.

- KROKEN, S. & J.W. TAYLOR (2000): Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. – *Bryologist* **103**: 645-660.
- KUMAR, S., K. TAMURA & M. NEI (2004): MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. – *Brief Bioinform.* **5**: 150–163.
- LAVAU, S., G. W. SAUNDERS & R. WETHERBEE. (1997): A phylogenetic analysis of the Synurophyceae using molecular data and scale case morphology. – *J. Phycol.* **33**: 135-151.
- LEWIS, L.A. & V.R. FLECHTNER (2004): Cryptic species of *Scenedesmus* (Chlorophyta) from desert soil communities of western North America. – *J. Phycol.* **40**: 1127-1137.
- LIEDLOFF, A., P. MAYES & D. RAMSEY (1997): Mantel Nonparametric Test Calculator for Windows. Version 1. 21 Queensland University of Technology, School of Natural Resource Sciences: Brisbane.
- LUNDHOLM, N., Ø. MOESTRUP, Y. KOTAKI, K. HOEF-EMDEN, C. SCHOLIN & P. MILLER (2006): Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima*-complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. – *J. Phycol.* **42**: 464-481.
- MADDISON, W. P. & D.R. MADDISON (2009): Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.6 <http://mesquiteproject.org>.
- MANTON, I. (1955): Observations with the electron microscope on *Synura caroliniana* Whitford. – *Proc. Leeds Philos. Soc.* **VI(V)**: 306-316. In: KRISTIANSEN, J. (2005): *Golden Algae: A Biology of Chrysophytes*. A. R. G. Gantner Verlag K. G.
- MARTIN-WAGENMANN, B. & A. GUTOWSKI (1995): Scale morphology and growth characteristics of clones of *Synura petersenii* (Synurophyceae) at different temperatures. – In: SANDGREN, C.D., J.P. SMOL & J. KRISTIANSEN (eds): *Chrysophyte algae. Ecology, phylogeny and development*: 345–360. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

MÜLLER, T., N. PHILIPPI, T. DANDEKAR, J. SCHULTZ & M. WOLF (2007): Distinguishing species. – *RNA* **13**: 1469-1472.

NĚMCOVÁ, Y., T. KALINA, J. NEUSTUPA & S. NOVÁKOVÁ (2001): Silica-scaled chrysophytes of the Krkonoše Mountains (Czech Republic). – *Algological Studies* **101**: 97-108.

NICHOLLS, K. H. & J. F. GERRATH (1985): The taxonomy of *Synura* (Chrysophyceae) in Ontario with special reference to taste and odour in water supplies. – *Canad. J. Bot.* **63**: 1482-1493.

NYLANDER, J.A.A. (2004): MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. Available from <http://www.abc.se/~nylander/>.

PASCHER, A. (1912): Über Rhizopoden und Palmellastadien bei Flagellaten (Chrysomonaden), nebst einer Übersicht über die braunen Flagellaten. *Arch. Protistenk.* **25**: 153-200. – In: Kristiansen, J. 2005. *Golden Algae: A Biology of Chrysophytes*. A. R. G. Gantner Verlag K. G.

PAŽOUTOVÁ, M. (2008): Phylogenetic diversity and generic concept in the family Radiococcaceae, Chlorophyta (Druhový koncept a molekulární diverzita čeledi Radiococcaceae, Chlorophyta). Diplomová práce, depon. in: knihovna Kat. botaniky PŘF UK, Praha.

PÉTERFI, L. S. & L. MOMEU (1977): Remarks on the taxonomy of some *Synura* species based on the fine structure of scales. – *Stud. Comun. St. Nat.* **21**: 15-23.

PETERSEN, J. B. (1918): Om *Synura uvella* Stein og nogle andre Chrysomonadiner. – *Vid. Medd. Dansk Naturh. Foren.* **69**: 345 In: KRISTIANSEN, J. (1986): The ultrastructural basis of chrysophyte systematics and phylogeny. – *Crit. Rev. Plant. Sci.* **4**: 149-211.

PETERSEN, J.B. & J.B. HANSEN (1956): On the scales of some *Synura* species. – *Biol. Medd. Kgl. Dan. Vid. Selsk.* **23(2)**: 3-27.

PETERSEN, J.B. & J.B. HANSEN (1958): On the scales of some *Synura* species. II. – Biol. Medd. Kgl. Dan. Vid. Selsk. **23**: 1-13.

PICHRTOVÁ, M., M. ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ, P. ŠKALOUD (2007): The silica-scaled chrysophytes of the Czech-Moravian Highlands. – Fottea **7**: 43-48.

RONQUIST, F. & J.P. HUELSENBECK (2003): MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. – Bioinformatics **19**: 1572–1574.

ROIJACKERS, R. M. M. & H. KESSELS (1986): Ecological characteristics of scale-bearing Chrysophyceae from the Netherlands. – Nordic Journal of Botany. **6**: 373–383.

ŘEZÁČOVÁ, M. (2003): Ekologie a rozšíření chrysoomonád s křemitými šupinami (Chrysophyceae, Synurophyceae). Bakalářská seminární práce, depon. in: knihovna Kat. botaniky PřF UK, Praha.

ŘEZÁČOVÁ, M. & P. ŠKALOUD (2005): Silica-scaled chrysophytes of Ireland. With an appendix: Geographic variation of scale shape of *Mallomonas caudata*. – Nova Hedwigia Beihefte **128**: 101-124.

SANDGREN, C.D., S.A. HALL & S.B. BARLOW (1996): Siliceous scale production in chrysophyte and synurophyte algae. I. Effects of silica-limited growth on cell silica content, scale morphology, and the construction of the scale layer of *Synura petersenii* cells. – J. Phycol. **32**: 675-692.

SIVER, P.A. (1987): The distribution and variation of *Synura* species (Chrysophyceae) in Connecticut, USA. – Nord. J. Bot. **7**: 107-116.

SIVER, P.A. (1988): A new forma of the common chrysophycean alga *Synura petersenii*. – Trans. Amer. Microsc. Soc. **107**: 380-385.

SIVER, P. A. (1991): The Biology of *Mallomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 230 pp.

SIVER, P. A. (1993): Inferring the specific conductivity of lake water with scaled chrysophytes. – *Limnology and Oceanography*. **38**: 1480–1492.

SMOL, J. P. (1995): Application of chrysophytes to problems in paleoecology.

In: *Chrysophyte algae. Ecology, phylogeny and development* (Ed. by C. D. Sandgren, J. P. Smol & J. Kristiansen), pp. 303-330. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

SMOL, J. P. & B. F. CUMMING (2000): Tracking long-term changes in climate using algal indicators in lake sediments. – *Journal of Phycology*. **36**: 986–1011.

StatSoft, Inc. (1998): STATISTICA for Windows. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>.

STEIN, F. R. Von (1878): *Der organismus der Infusionsthier* III. Abtheilung. I. Halfte. W. Engelmann, Leipzig. In: ANDERSEN, R. A. (1987): *Synurophyceae classis nov., a new class of algae*. – *Amer. J. Bot.* **74**: 337-353.

SWOFFORD, D.L. (2002): PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Systat Software, Inc. (2004): *SigmaPlot for Windows Version 9.01*.

TAKAHASHI, E. (1978): *Electron microscopical studies of the Synuraceae (Chrysophyceae) in Japan: Taxonomy and ecology*. – Tokai University Press, Tokyo.

TAMURA K., J. Dudley, M. NEI & S. Kumar (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. – *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)

VANORMELINGEN, P., E. HEGEWALD, A. BRABAND, M. KITSCHKE, T. FRIEDEL, K. SABBE & W. VYVERMAN (2007): The systematics of a small spineless *Desmodesmus* taxon, *D. costato-granulatus* (Sphaeropleales, Chlorophyceae), based on ITS2 rDNA sequence analyses and cell wall morphology. – *J. Phycol.* **43**: 378–396.

VANORMELINGEN, P., V.A. CHEPURNOV, D.G. MANN, K. SABBE & W. VYVERMAN (2008): Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyta). – *Protist* **159**: 73-90.

VIGNA, M.S. (1979): Ultraestructura de las escamas de *Synura petersenii* Korsh. f. *bonaerensis* nov. forma (Ochromonadales). – *Bol. Soc. Argent. Bot.* **18**: 47-51.

WALTER, A.E., D.H. TURNER, J. KIM, M.H. LYTTLE, P. MULLER, D.H. MATHEWS & M. ZUKER (1994): Coaxial stacking of helixes enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9218–9222.

WEE, J.L., D.J. BOOTH & M.A. BOSSIER (1993): Synurophyceae from the Southern Atlantic Coastal Plain of North America: A preliminary survey in Louisiana, USA. – *Nord. J. Bot.* **13**: 95-106.

WEE, J. L. (1997): Scale biogenesis in Synurophycean Protists: Phylogenetic Implications. *Crit. Rev. Plant Sci.* – **16**: 497-534.

WEE, J.L. (1982): Studies on the Synuraceae (Chrysophyceae) of Iowa. – *Bibliotheca Phycologica* **62**: 1-183. J. Cramer, Braunschweig, Germany.

WEE, J.L., D. F. MILLIE & S. P. WALTON (1991): A statistical characterization of growth among clones of *Synura petersenii* (Synurophyceae). – *J. Phycol.* **27**: 570-575.

WEE, J.L., L.D. FASONE, A. SATTLER, W.W. STARKS & D. L. HURLEY (2001): ITS/5.8S DNA sequence variation in 15 isolates of *Synura petersenii* Korshikov (Synurophyceae). – In SIVER, P.A & J.L. WEE (eds): *Chrysophytes and related organisms: topics and issues, Proceedings of the Fifth International Chrysophyte Symposium.* – *Nova Hedwigia Beiheft* **122**: 245-258.

WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE & J. TAYLOR (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In INNIS, M.A., D.H.

GELFAND, J.J. SNINSKY & T.J. WHITE (eds): PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications: 315-322. Academic Press, San Diego.

WILCOX, T. P. (1998): Large-Subunit Ribosomal RNA Systematics of Symbiotic Dinoflagellates\_ Morphology Does Not Recapitulate Phylogeny. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* **10**: 436-448.

ZUKER, M. (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. – *Nucleic Acids Res.* **31**: 3406–3415.

**Příloha:**

**Molecular diversity and species concept in *Synura petersenii* complex**

**(Synurophyceae, Heterokontophyta)**

by

Anna Kynčlová, Pavel Škaloud, Magda Škaloudová

Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Benátská 2, 12801, Prague 2,

Czech Republic

e-mail: levandulka@gmail.com



## Abstract

Taxonomy of the species *Synura petersenii* is traditionally based on morphology of the silica scales covering its cells. In the past, many changes were made in the classification of the various morphotypes found in this species. In this study, we used a polyphasic approach to clarify the species concept of *S. petersenii*, and to insure that the results were as reliable as possible. Utilizing ITS regions analysis of clonal cultures of *S. petersenii* from different Czech localities, strains were divided into six distinct clades. Identification of compensatory base changes (CBCs) and hemi-CBCs of the six clades unequivocally confirmed the results of our ITS analysis. Furthermore, a morphological analysis revealed unambiguous differences in features of the scale structure among the six clades. All of the three species concepts (ITS rDNA phylogeny, CBC, and scale morphology) produced clearly congruent results. By means of this polyphasic approach, *S. petersenii* and *S. glabra* were shown to be different species, and additionally, four new species (*S. americana*, *S. macropora*, *S. reticulata* and *S. oculatea*) were identified.

## Introduction

*Synura petersenii* Korshikov is the most frequently encountered taxon in the Synurophyceae (Wee 1982, Siver 1987, Pichrtová et al. 2007). It is a colonial freshwater golden-brown flagellate with characteristic silica scales covering its cell surface. The scales, and the features of their delicate ornamentation, have always been the most important characteristics for delimitation of this taxon, as well as for all the other *Synura* species.

The silica scales, which can be preserved in sediment for an extended period of time, together with its well known ecological preferences make *Synura* a very useful species for biomonitoring and a valuable source of information for paleolimnology. For these kinds of studies, an unambiguous species definition and clear morphological characterization is necessary.

*S. petersenii* is a member of sectio *Peterseniae*; identification of species in this section is based upon scale features such as keel shape, or presence and number of ribs and their interconnections. However, these characteristics have always been somewhat uncertain in the *Synura petersenii* complex, because a transitional morphology of scales was often recorded (Kristiansen 1986, Sandgren et al. 1996). Therefore, whether to treat the distinct morphotypes as a single species, or to what ranks they should be assigned remained ambiguous. This was the case for the *glabra* morphotype in the *S. petersenii* complex. This morphotype was first described by Korshikov (1929) as a new species, *Synura glabra*, although, Korshikov himself doubted whether he should give it the rank of species or of variety. In the same paper, Korshikov describes *Synura petersenii* as well. The main difference between these two species is the scale shape and the presence or absence of ribs, which are well developed in *S. petersenii* and much reduced or absent in *S. glabra*. In 1941, Huber-Pestalizzi united the two species under the name *S. petersenii*, and morphotype *glabra* was ranked as a variety; later, it was given the status of forma (Kristiansen & Preisig, 2007). *S. petersenii* became a species rich in formae. Besides f. *petersenii* and *glabra*, it is important to mention f. *kufferathii* (Petersen & Hansen, 1958), which is characterized by a well developed network of ribs and strong silification.

However, not even the designation of many forms was able to do sufficient justice to the rich morphological variability of *S. petersenii*, and so there were always doubts, and clues suggesting that *S. petersenii* could in fact be considered a complex of species (Řezáčová & Škaloud 2005).

The concern was that the *Synura petersenii* species concept was based exclusively on morphological data. There was no molecular analysis until the study of Wee et al. (2001) that revealed significant intraspecific variability in ITS regions of *S. petersenii*. However, the molecular data have not been compared with scale morphology, and thus, it remains impossible to interpret the role of scale morphology in the *S. petersenii* species concept. Therefore, in this study we have used three different approaches: morphological, phylogenetic, and CBC to shed light on the *S. petersenii* species concept. By means of this polyphasic method we have confirmed and elucidated the cryptic diversity of this species.

### **Materials and methods**

Samples were taken by a 25 µm mesh plankton net at different localities in the Czech Republic. Water temperature, pH and conductivity were measured in the field using Hanna Combo pH & EC meter. Unialgal cultures were obtained by the micropipetting of one *Synura* colony, and were subsequently cultivated in micro-plates in DY IV medium (Andersen et al. 1997) at a temperature of 15 °C, in daylight illumination (cooling box Helkama C5G). Apart from newly established cultures, two strains were obtained from the Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton in Maine, USA – CCMP 862, 866. The origins of investigated strains, including accession numbers of sequences, are given in Table 1.

Volumes of 200 µl of exponentially growing cultures were removed from the micro-plates by pipetting into a 1ml Eppendorf tubes, which were kept frozen (-20 °C) overnight prior to polymerase chain reaction (PCR). Thawed cultures were directly used as a template to amplify ITS rDNA region, using terminal primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'; White et al. 1990) and Kn4.1 (5'-TCA GCG GGT AAT CTT GAC TG-3'; Wee et al. 2001). All PCR were performed in 20 µl reaction volumes (15.1 µl sterile Milli-Q Water, 2 µl 10' PCR buffer (Sigma), 0.4 µl dNTP (10 µM), 0.25 µl of primers (25 pmol/ml), 0.5 µl Red Taq DNA Polymerase (Sigma) (1U/ml), 0.5 µl of MgCl<sub>2</sub>, 1 µl of DNA (not quantified). PCR was performed in a XP thermal cycler (Bioer). PCR amplification began with 35 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 54 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 1 min 30 s, with a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were quantified on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and cleaned either with the JetQuick PCR Purification Kit (Genomed) or with QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) according to the

Taxon	Strain identifier	Collection informaton	Accession No.
<i>S. macropora</i>	S 5.1	Aluvial pool, Modřany, Prague, Czech Republic	FM178494
<i>S. macropora</i>	S 5.2	Aluvial pool, Modřany, Prague, Czech Republic	FM178495
<i>S. macropora</i>	S 5.3	Aluvial pool, Modřany, Prague, Czech Republic	FM178496
<i>S. macropora</i>	S 14.2	Peatbog, Swamp NR, North Bohemia, Czech Republic	FM178497
<i>S. petersenii</i>	S 1.1	Zlatá stoka canal, Třeboň, Czech Republic	FM178498
<i>S. petersenii</i>	S 1.2	Zlatá stoka canal, Třeboň, Czech Republic	FM178499
<i>S. petersenii</i>	S 1.3	Zlatá stoka canal, Třeboň, Czech Republic	FM178500
<i>S. petersenii</i>	S 6.4	Aluvial pool, Horní Lužnice NR, South Bohemia, Czech Republic	FM178501
<i>S. petersenii</i>	S 6.5	Aluvial pool, Horní Lužnice NR, South Bohemia, Czech Republic	FM178502
<i>S. petersenii</i>	S 4.19	Kladský pond, West Bohemia, Czech Republic	FM178503
<i>S. petersenii</i>	S 7.7	Babín pool, Žďárské vrchy PLA, Czech Republic	FM178504
<i>S. petersenii</i>	S 16.2	Xerr pond, South Bohemia, Czech Republic	FM178505
<i>S. reticulata</i>	S 7.10	Babín pool, Žďárské vrchy PLA, Czech Republic	FM178506
<i>S. reticulata</i>	S 10.2	Huťský pond, Novohradské hory, South Bohemia, Czech Republic	FM178507
<i>S. oculatea</i>	S 15.3	Peatbog, Úpské rašeliniště, Krkonoše NP, Czech Republic	FM178508
<i>S. oculatea</i>	S 15.5	Peatbog, Úpské rašeliniště, Krkonoše NP, Czech Republic	FM178509
<i>S. oculatea</i>	S 15.9	Peatbog, Úpské rašeliniště, Krkonoše NP, Czech Republic	FM178510
<i>S. glabra</i>	S 8.1	Kyjský pond, Prague, Czech Republic:Prague	FM178511
<i>S. glabra</i>	S 9.1	Confluence of the Morava and Dyje rivers, South Moravia, Czech Republic	FM178512
<i>S. glabra</i>	S 9.2	Confluence of the Morava and Dyje rivers, South Moravia, Czech Republic	FM178513
<i>S. glabra</i>	S 14.1	Peatbog, Swamp NR, North Bohemia, Czech Republic	FM178514

**Table 1.** Strains included in this study with their source localities, and GenBank accession numbers of the ITS rDNA sequence data.

manufacturer's protocols. The purified amplification products were sequenced with the PCR primers at Macrogen, Inc. (Seoul, Korea, <http://dna.macrogen.com>).

ITS sequences were visually aligned on the basis of their rRNA secondary structure information (see below) with MEGA 3.1 (Kumar et al. 2004). Positions with deletions in a majority of sequences were removed from the alignment, resulting in an alignment comprising 496 base positions. The phylogenetic trees were inferred by maximum likelihood (ML) and weighted parsimony (wMP) criteria using PAUP\*, version 4.0b10 (Swofford 2002), and by Bayesian inference (BI) using MrBayes version 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). A substitution model was estimated using the Akaike Information Criterion (AIC) with PAUP/MrModeltest 1.0b (Nylander 2004). Accordingly, the GTR+ $\Gamma$  model was deemed best. Maximum likelihood analyses consisted of heuristic searches with 1,000 random sequence

addition replicates and Tree Bisection Reconnection swapping. Reliability of the resulting topology was tested using bootstrap analysis (100 replications) consisting of heuristic searches with 10 random sequence addition replicates, Tree bisection reconnection swapping, and a rearrangement limit of 5,000 for each replicate. The wMP bootstrapping was performed using heuristic searches with 100 random sequence addition replicates, tree bisection reconnection swapping, random addition of sequences (the number limited to 10,000 for each replicate), and gap characters treated as a fifth character state. In BI analysis, two parallel MCMC runs were carried out for 2 million generations, each with one cold and three heated chains employing the above-stated evolutionary model. Trees and parameters were sampled every 100 generations. Convergence of the two cold chains was checked and burn-in was determined using the "sump" command.

The secondary structures of ITS rDNA sequences were constructed using the mfold computer program (version 2.3; Walter et al. 1994; Zuker 2003), with folding temperature set to 25°C. The common secondary structure was created using RnaViz (version 2; De Rijk et al. 2003) and used to identify compensatory base changes (CBCs) and hemi-CBCs.

Preparations for TEM were made one month after the isolation of the colony. All samples were dried onto formvar coated copper grids, rinsed with distilled water and examined using a transmission electron microscope JEOL 1010. Scale morphology of all isolates corresponding to the arrangement of the clades was identified. Two representative strains from each of the clades were chosen and photographed for morphological analysis and delimitation of their discriminative features. In total, morphological characters of 120 representative scales were measured (10 scales per strain). The characteristics measured were: scale length to width ratio, keel pore area, base plate pore area, and foramen area; observations for the presence, and shape of a keel tip were also made. To obtain the area of keel pore and base plate pore, ten pores of each scale were measured and the data were averaged. All the characteristics were measured in Adobe Photoshop Elements 5.0.

All *Synura* cells used for geometric morphometric analysis were cultivated for one month under the same conditions. Altogether, 353 scales from 11 strains were photographed under the same magnification. Twenty-four landmarks were defined on each of the investigated scales using the TpsDig ver. 2.05 (Rohlf 2004a) programme to delimit outlines of the basal plate and the keel. Twenty of the semilandmarks were allowed to slide along the outline (Fig. 1). Landmark configurations were superimposed by generalized Procrustes analysis (Bookstein 1991) in tpsRelw ver.1.42 (Rohlf 2004b) and canonical variate analysis (CVA)/Manova was performed in IMP (Sheets 2002).



**Fig 1.** Position of landmarks (circles) and semilandmarks (squares).

## Results

### ITS rDNA phylogeny

The different tree construction methods produced similar trees, resolving identical, highly supported clades, as well as their relationships. The trees differed only in the organization of their inner branches within a clade. To assess the root placement of the ingroup, the second alignment, including the sequence of *Synura uvella* AF308847.1, was produced on the base of common ITS1 and ITS2 secondary structures, and analyzed separately. The analysis revealed basal positions of clades, including strains: S 8.1, S. 9.1, S 9.2 and S 14.1, with moderate support (tree not shown, alignment can be downloaded at:

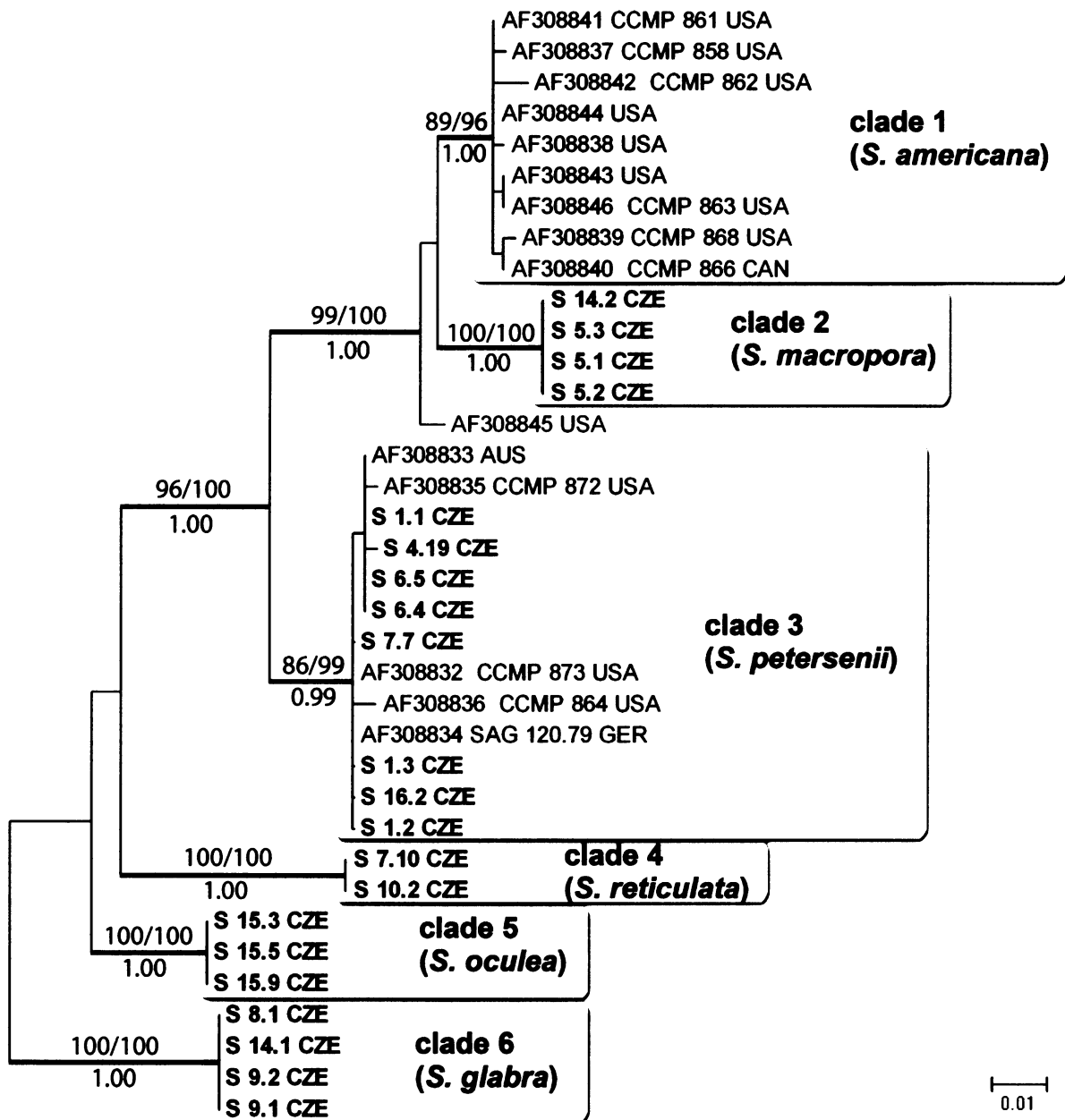
separately. The analysis revealed basal positions of clades, including strains: S 8.1, S. 9.1, S 9.2 and S 14.1, with moderate support (tree not shown, alignment can be downloaded at:

[http://botany.natur.cuni.cz/algo/align/01\\_Synura\\_petersenii.fas](http://botany.natur.cuni.cz/algo/align/01_Synura_petersenii.fas)).

The maximum likelihood (ML) phylogram, rooted with the above-mentioned clade, is presented in Fig 2. In this phylogeny, the *S. petersenii* strains clustered together into six groups: (1 – referred to further in the text as *S. americana*) GenBank sequences AF308837-AF308844, AF308846; (2 – *S. macropora*) S 5.1, S 5.2, S 5.3, and S 14.2; (3 – *S. petersenii*) S 1.1, S 1.2, S 1.3, S 4.19, S 6.4, S 6.5, S 7.7, S 16.2, and GenBank sequences AF308832-AF308836; (4 – *S. reticulata*) S 7.10 and S 10.2; (5 – *S. oculatea*) S 15.3, S 15.5, and S 15.9; and (6 – *S. glabra*) S 8.1, S 9.1, S 9.2, and S 14.1. Just a single GenBank sequence AF308845 possessed a separate position, related to clades 1 and 2. All six groups of sequences received high statistical support, with a MrBayes PP  $\geq 0.99$ , ML bootstrap  $\geq 86$ , and MP bootstrap  $\geq 96$ . Moreover, results also indicated a highly supported clustering of clades 1 and 2; as well as clades 1, 2, and 3.

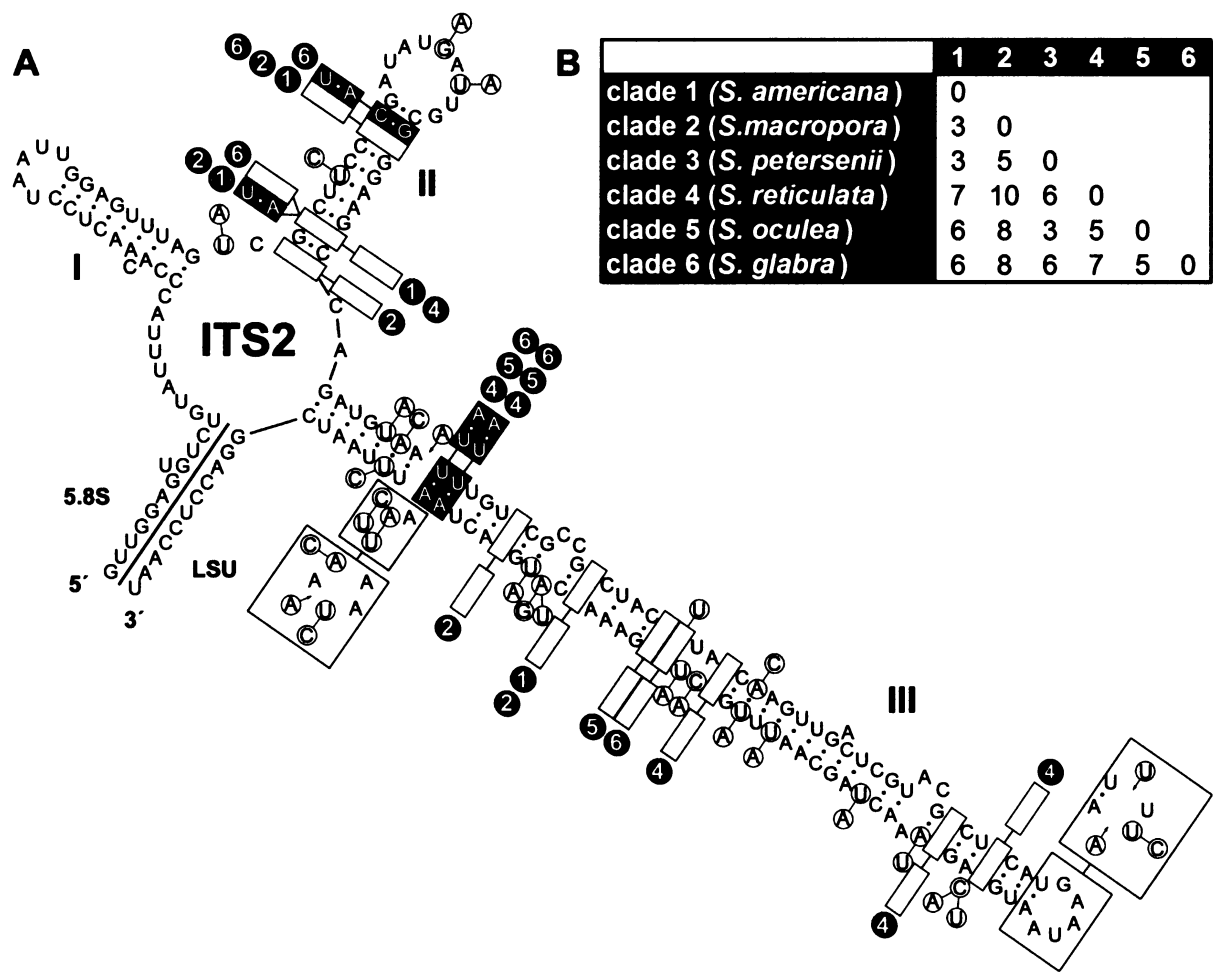
### **ITS2 rDNA secondary structure and compensatory base changes**

In all six of the *S. petersenii* clades compared, a common overall organization of the ITS2 rDNA secondary structure could be identified (Fig. 3). The secondary structure was comprised of three paired regions (helices I-III), with helix I the most conservative region having no observed nucleotide changes. In two clades (1 and 3), we detected a slight intraclade ITS2 variation (up to 4 nucleotide changes per clade). However, this variation was concentrated either on the loop region, or the nucleotide change broke a pairing between the nucleotides in the helix region. Thus, neither compensatory base changes (CBCs; nucleotide changes at both sides of paired bases) nor hemi-CBCs (change at only one side of nucleotide pair, but still preserving pairing) were present between sequences from the same clade (Coleman 2000, 2003). In contrast to absolute absence of intraclade (hemi-)CBCs, the number of (hemi-)CBCs varied from 3 to 10 among the different clades (Fig. 3B). The highest number of (hemi-)CBCs was determined between clades 2 and 4, differing by three CBCs and seven hemi-CBCs. The regions with the most extensive interclade variation, including all three CBCs observed, were helix II, and the basal region of helix III.



**Fig 2.** Maximum likelihood tree based on ITS sequences. Values at the nodes indicate statistical support estimated by three methods - ML bootstrap (top left), MP bootstrap (top right) and MrBayes posterior node probability (lower). ITS sequences determined in this study are given in bold face. Scale bar – substitutions per site.

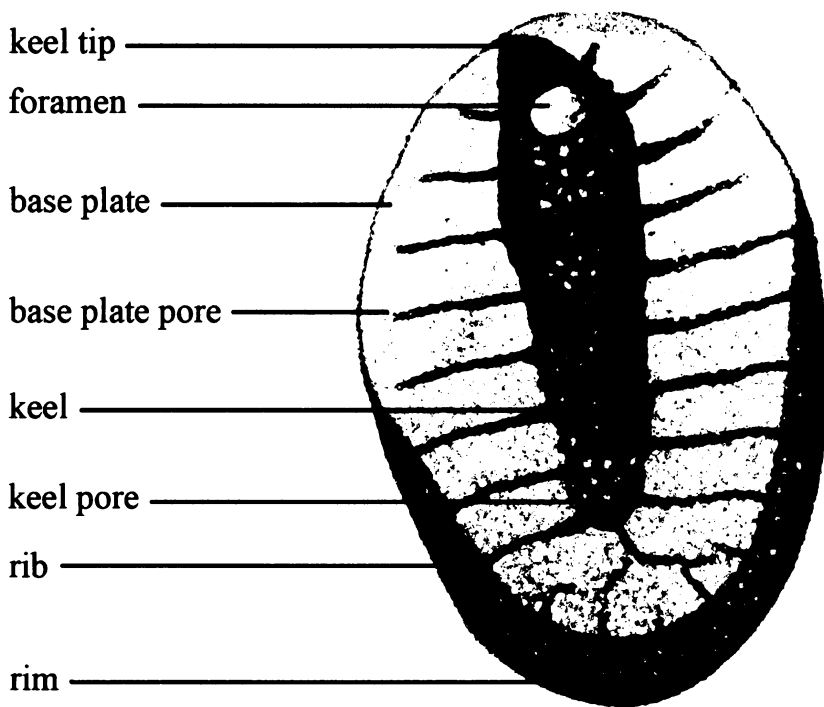




**Fig 3. A.** Predicted secondary structures of the ITS2 transcripts of *Synura petersenii* (strain S 1.3). Base changes between the different *S. petersenii* s.l. genotypes are indicated: the base pair marked in a dark-grey box indicates compensatory base changes (CBCs); base pairs marked in grey boxes indicate hemi-CBCs; single base changes are marked in circles; changes of the helix parts are indicated in large boxes. Affiliation of (hemi-)CBCs to particular clades is marked as white numbers in black spots. **B.** Numbers of (hemi-)CBCs differing each clade pair.

### Morphology of the scales

The important scale characters can be seen in Fig 4. Results of the morphological comparison are given in Fig. 5. The length to width ratio divides the clades into two distinct groups, one of them consisting of the clades with rounded scales: length to width ratio = 1.3-1.8 (clade 1, 2 and 6), and the second one including the clades with long and narrow scales: length to width ratio = 1.8-2.4 (clade 3, 4 and 5). Compared to the other clades, clade 5 has a notably large foramen (77,650-243,550 nm<sup>2</sup>). Base plate pores of clade 3 and 5 are rather small (250-697 nm<sup>2</sup>), while in clade 2 they are quite large (2,235-4,618 nm<sup>2</sup>), and in the case of the other clades (1, 4 and 6) they are medium-sized (174-2,027 nm<sup>2</sup>). Clade 2 has a large

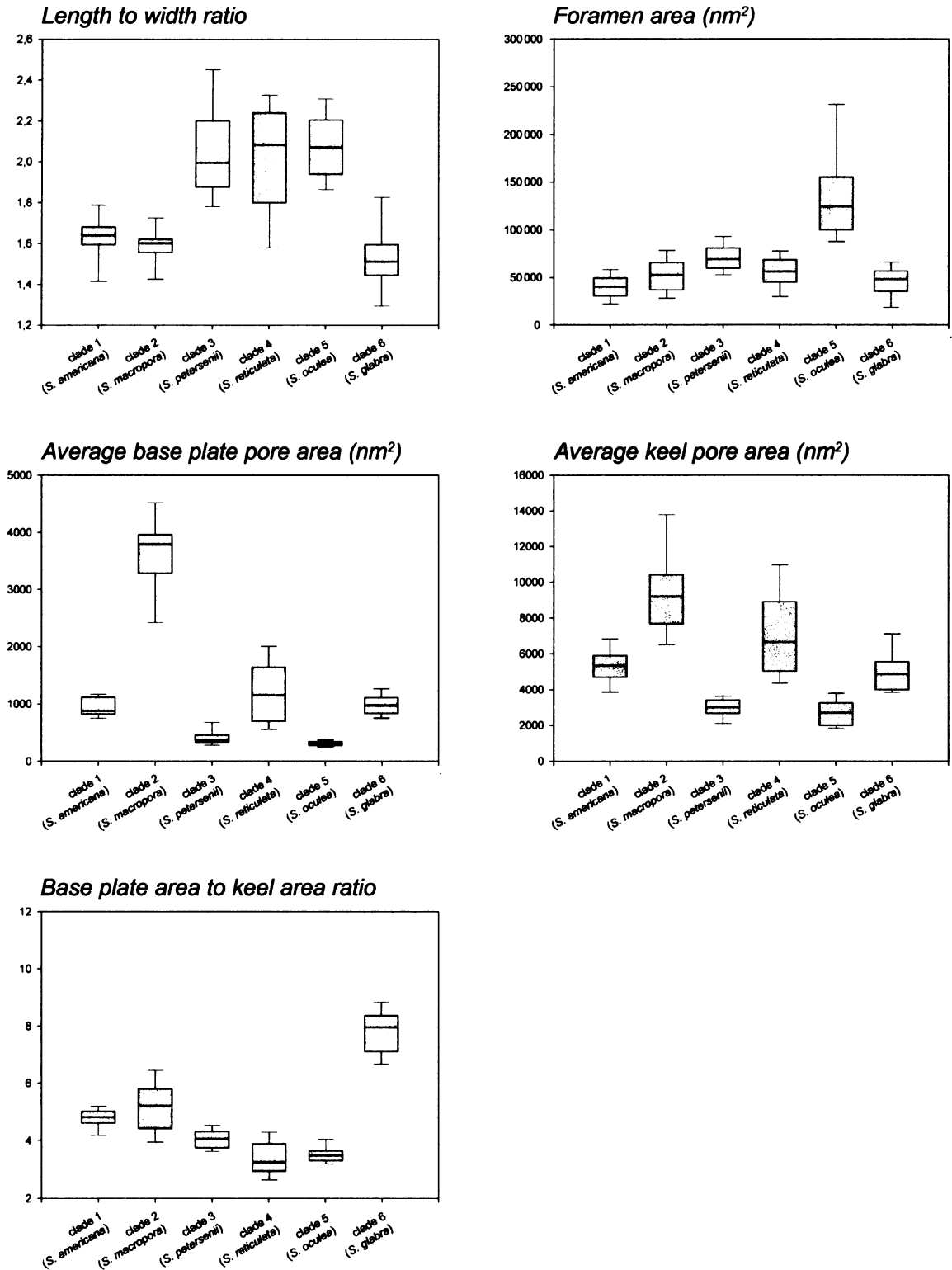


**Fig 4.** Characteristic features of *S. petersenii* s.l. scale.

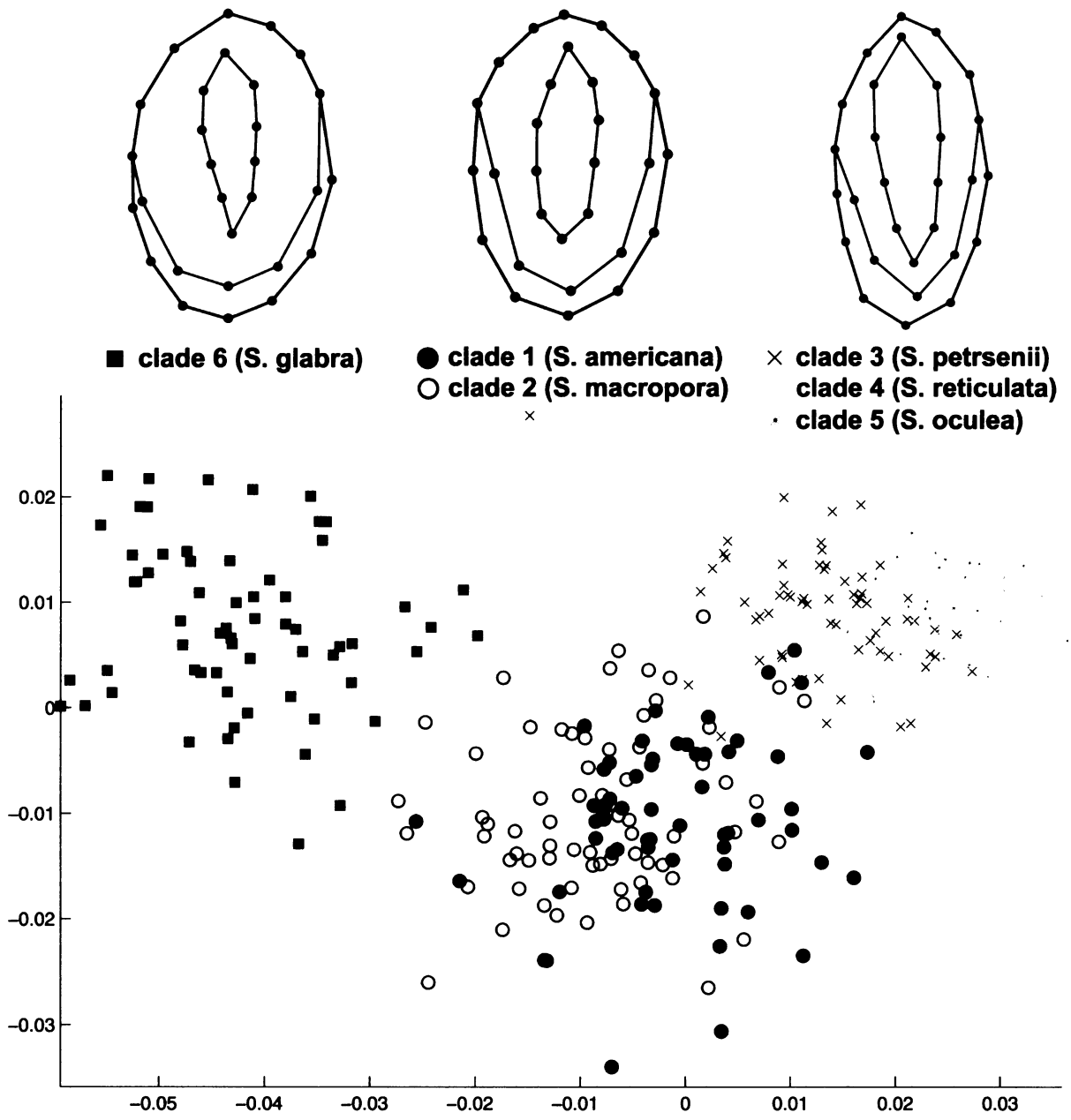
average keel pore area (5,658-14,685 nm<sup>2</sup>), while keel pores of clade 1 and 6 are medium-sized (1,163-7,792 nm<sup>2</sup>), and keel pores of clade 3 are small (1,587-3,985 nm<sup>2</sup>). Size of the keel pores of clade 4 varied from medium-sized to large (4,287-9,690 nm<sup>2</sup>). The keel tip of most of the clades is acute. Clade 5 has a rounded keel tip, sometimes with a very thin tip or teeth on top. The morphological comparison revealed distinct characteristic combinations of features for each of the clades (see Discussion, Table 2).

### **Geometric morphometrics**

All six genetically delimited clades were found to be distinguishable on the bases of morphological characters. Our analysis of 353 *S. petersenii* scales from 11 strains was based on geometric morphometric data. Statistically significant differences among all analyzed strains were revealed by Manova/CVA analysis (five significant canonical variates:  $\lambda = 0.0122$ ;  $p < 0.0001$ ;  $\lambda = 0.1276$ ;  $p < 0.0001$ ;  $\lambda = 0.3143$ ;  $p < 0.0001$ ;  $\lambda = 0.5305$ ;  $p < 0.0001$ ;  $\lambda = 0.8095$ ;  $p = 0.0029$ ). Along the first CV axis there are three groups separated from each other by the shape of their outline and keel (Fig. 6). *S. glabra* clade has more rounded scales with a less developed keel. Basal plates of clades 1 and 2 are similarly rounded, but have an



**Fig 5.** Box plots of morphometric data of *Synura petersenii* s.l. scales. The morphometric data comprise length to width ratio of the scales, foramen area, average base plate pore are, average keel pore area and base plate to keel area ratio. The grey areas indicate 25% and 75% percentiles, the line within the fields is the median. The error bars indicate the 10% and 90% percentiles.



**Fig. 6.** The scatter plot of Manova/CVA analysis of 353 *S. petersenii* scales. Individual clades are grouped along the first CV axis and mean landmark configurations of three distinct groups are depicted.

augmented keel and the rim of the scales is typically longer. The last group has more prolonged and rather lanceolate scales, with a wide and well-developed keel.

## Taxonomic conclusions

The phylogeny presented in Fig. 2 is in accordance with the distribution of (hemi-)CBCs in the ITS2 rDNA secondary structure, and the morphological, as well as morphometric, data. Thus, three independent species concepts (namely: phylogenetic, CBC, and morphological) corroborate each other and validate the splitting of *Synura petersenii* into six species.

***Synura americana*** Kynčlová, Škaloud & Řezáčová-Škaloudová sp. nov. (Figs 7A-D)

LATIN DIAGNOSIS: Squamae ovatae, 1.4-3.6  $\mu\text{m}$  longae et 0.8-2.1  $\mu\text{m}$  latae. Carina cum cuspidе acuta. Multae costae praesentes. Pori tabellae basalis medii (diameter 15-34 nm), pori carinae etiam medii (diameter 38-86 nm). Foramen parvus (diameter 83-274 nm). Squamae posteriores longae, angustae et simpliores.

HOLOTYPE: *Synura americana* strain CCMP 862, frozen material deposited at the Culture Collection of Algae of Charles University in Prague (CAUP, Department of Botany, Charles University in Prague, Benátská 2, 12801 Prague 2, Czech Republic). Figure 7A is an illustration of the holotype.

TYPE LOCALITY: Winter's Creek, Keeweenaw County, Michigan, USA (47.2917N 88.0721W, 189 m asl).

ETYMOLOGY: (Latin) americana, American; so far this species has only been found in the North American continent.

DIAGNOSIS: Scales are oval (1.9 x 1.2  $\mu\text{m}$ ). Keel terminates in an acute keel tip, especially in the apical scales. Numerous struts connect the keel with scale edge. Base plate pores are medium-sized (diameter 15-34 nm), as are the keel pores (diameter 38-86 nm). Foramen is small (diameter 83-274 nm). Rear scales are long and narrow with somewhat reduced structure.

***Synura macropora*** Kynčlová, Škaloud & Řezáčová-Škaloudová sp. nov. (Figs 7E-I)

LATIN DIAGNOSIS: Squamae ovatae, 2.6-3.3  $\mu\text{m}$  longae et 1.5-2.1  $\mu\text{m}$  latae. Carina cum cuspidе parva acuta. Costae parvae aut absentes. Pori tabellae basalis magni (diameter 53-77 nm), pori carinae etiam magni (diameter 85-137 nm). Foramen parvus (diameter 156-330 nm). Squamae posteriores parviores et rotundae.

HOLOTYPE: *Synura macropora* strain S 14.2, frozen material deposited at the Culture Collection of Algae of Charles University in Prague (CAUP, Department of Botany, Charles

University in Prague, Benátská 2, 12801 Prague 2, Czech Republic). Figure 7E is an illustration of the holotype.

TYPE LOCALITY: Peat bog, Swamp NR, North Bohemia, Czech Republic (50.5760N 14.6700E, 267 m asl).

ETYMOLOGY: (Latin) macropora, with large pores; remarkably large keel pores and base plate pores are typical for this species.

DIAGNOSIS: Scales are oval ( $3 \times 1.8 \mu\text{m}$ ), keel without keel tip or ending with a small acute keel tip. Both the base plate pores and keel pores are large (diameter 53-77 nm and 85-137 nm, respectively). Foramen is small (diameter 156-330 nm). Ribs are reduced or nearly absent. Rear scales are smaller and rounded.

*Synura petersenii* Korshikov 1929; Arch. Protistenk. 67, pp. 283-5, figs 37-38 (iconotype) emend. Kynčlová, Škaloud & Řezáčová-Škaloudová (Figs 8A-D)

SYNONYM: *Synura petersenii* Korshikov f. *kufferathii* Petersen & Hansen 1958; Biol. Medd. Kgl. Dan. Vid. Selsk. 23, p. 10, fig. 5.

EPITYPE: *Synura petersenii* strain S 6.4, frozen material deposited at the Culture Collection of Algae of Charles University in Prague (CAUP, Department of Botany, Charles University in Prague, Benátská 2, 12801 Prague 2, Czech Republic). Figure 8A is an illustration of the epitype.

EMENDED DIAGNOSIS: Body scales are oblong ( $4.1 \times 2 \mu\text{m}$ ), keel ending with an acute keel tip, especially in the apical scales. Pores of the base plate are small (diameter 19-30 nm), keel pores are relatively small as well (diameter 45-71 nm). Foramen is relatively small (diameter 244-358 nm). Numerous ribs, which are often interconnected, extend from the keel to the edge of the scale. Number of the interconnecting ribs is highly variable. Rear scales are much smaller and narrow with somewhat reduced structure.

*Synura reticulata* Kynčlová, Škaloud & Řezáčová-Škaloudová sp. nov. (Figs 8E-I)

LATIN DIAGNOSIS: Squamae lanceolatae, 2.6-3.7  $\mu\text{m}$  longae et 1.4-1.9  $\mu\text{m}$  latae. Carina cum cuspidate acuta. Multae costae praesentes. Pori tabellae basalis medii (diameter 25-51 nm), pori carinae medii vel magni (diameter 66-100 nm). Foramen parvus (diameter 190-319 nm). Squamae posteriores multo parviores, angustae et simpliores.

HOLOTYPE: *Synura reticulata* strain S 7.10, frozen material deposited at the Culture Collection of Algae of Charles University in Prague (CAUP, Department of Botany, Charles University

in Prague, Benátská 2, 12801 Prague 2, Czech Republic). Figure 8E is an illustration of the holotype.

TYPE LOCALITY: Babín pool, Žďárské vrchy PLA, Czech Republic (49.5422N 15.8969E, 568 m asl).

ETYMOLOGY: (Latin) *reticulata*, *reticulose*; keel pores of this species are so large and closely arranged that it appears as if the keel was formed from a reticulate structure.

DIAGNOSIS: Body scales are oblong-lanceolate (3.3 x 1.6  $\mu\text{m}$ ). Keel with an acute keel tip, especially in the apical scales. Base plate pores are medium-sized (diameter 25-51 nm), keel pores are medium to large-sized (diameter 66-100 nm). Foramen is small (diameter 190-319 nm). Numerous ribs extend from the keel to the edge of the scale. Rear scales are much smaller and narrow with somewhat reduced structure.

***Synura oculea*** Kynčlová, Škaloud & Řezáčová-Škaloudová sp. nov. (Figs 9A-D)

LATIN DIAGNOSIS: Squamae ovatae vel lanceolatae, 3.0-3.9  $\mu\text{m}$  longae et 1.6-1.9  $\mu\text{m}$  latae. Carina squamarum corporearum sine cuspidate aut cum cuspidate parva, carina squamarum anteriorum cum cuspidate tereti, nonnumquam cum denti angusto. Multae costae praesentes. Pori tabellae basalis parvi (diameter 18-22 nm), pori carinae etiam parvi (diameter 47-70 nm). Foramen squamarum corporearum magnopere grandis (diameter 315-557 nm). Squamae posteriores multo parviores, angustae et simpliciores.

HOLOTYPE: *Synura oculea* strain S 15.3, frozen material deposited at the Culture Collection of Algae of Charles University in Prague (CAUP, Department of Botany, Charles University in Prague, Benátská 2, 12801 Prague 2, Czech Republic). Figure 9A is an illustration of the holotype.

TYPE LOCALITY: Peat bog, Úpské rašeliniště, Krkonoše NP, Czech Republic (50.7362N 15.7091E, 1450 m asl).

ETYMOLOGY: (Latin) *oculea*, goggle-eyed; scale foramens of this species are notably large.

DIAGNOSIS: Body scales are oblong-lanceolate (3.5 x 1.8  $\mu\text{m}$ ), keel of the body scales without keel tip or with a very reduced one, keel tips on apical scales are rounded, sometimes with a very thin tip or teeth on top. Foramen of the body scales is remarkably large (diameter 315-557 nm). Both base plate and keel pores are small (diameter 18-22 nm and 47-70 nm, respectively). Numerous ribs extend from the keel to the edge of the scale. Rear scales are much smaller and narrow with somewhat reduced structure.

*Synura glabra* Korshikov 1929; Arch. Protistenk. 67, p. 285, figs 59-65 (iconotype) emend. Kynčlová, Škaloud & Řezáčová-Škaloudová (Figs 9E-I)

SYNONYMS: *Synura petersenii* Korshikov var. *glabra* Huber-Pestalozzi non. Prov. 1941; Phytoplankton Süßw. 2, p. 144; *Synura petersenii* Korshikov f. *glabra* Kristiansen & Preisig 2007; Süßwasserflora von Mitteleuropa, vol 1, part 2, Synurophyceae, p.118.

EPITYPE: *Synura glabra* strain S 14.1, frozen material deposited at the Culture Collection of Algae of Charles University in Prague (CAUP, Department of Botany, Charles University in Prague, Benátská 2, 12801 Prague 2, Czech Republic). Figure 9E is an illustration of the epitype.

EMENDED DIAGNOSIS: Scales are oval (3 x 2 µm), less silicified. Keel is less developed, usually without keel tip or ending with a small acute keel tip. Ribs are somewhat reduced or often absent. Base plate pores are medium-sized (diameter 29-40 nm), keel pores are medium-sized (diameter 66-100 nm). Foramen is small (diameter 144-322 nm). Rear scales are smaller and oval.

### Key to the taxa

1a Scales oval, length to width ratio about 1.5

2a Base plate pores large (diameter 53-77 nm) ..... *macropora*

2b Base plate pores medium-sized (diameter 15-40 nm)

3a Keel and ribs more developed, ratio of base plate and keel area 3.6-5.2 .. *americana*

3b Keel and ribs less developed, ratio of base plate and keel area 5.7-9.8 ..... *glabra*

1b Scales oblong-lanceolate, keel well developed, length to width ratio approximately 2

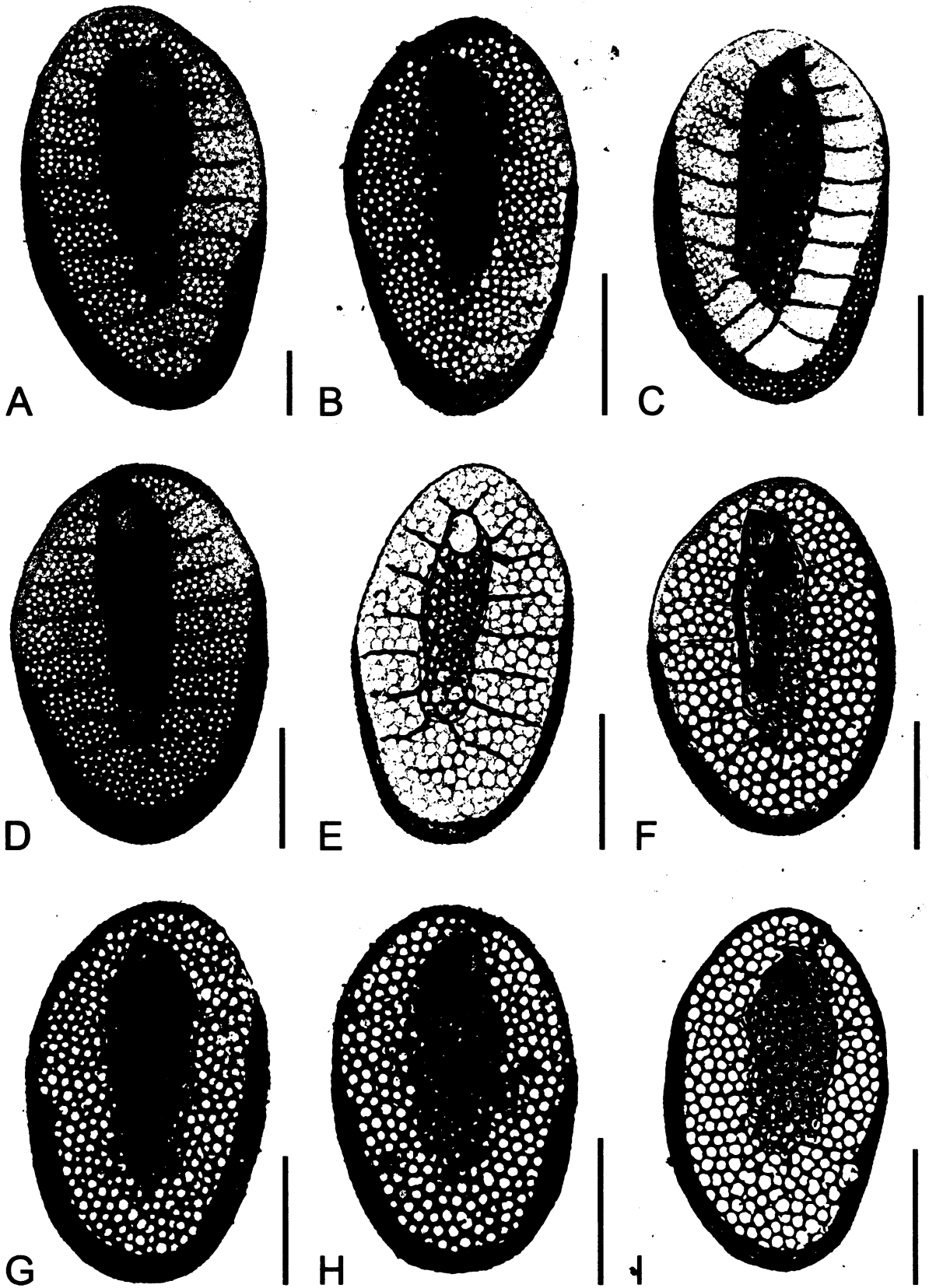
2a Small foramen (diameter 144-322 nm), body and especially apical scales with an acute spine

3a Keel pores small (diameter 45-71 nm) ..... *petersenii*

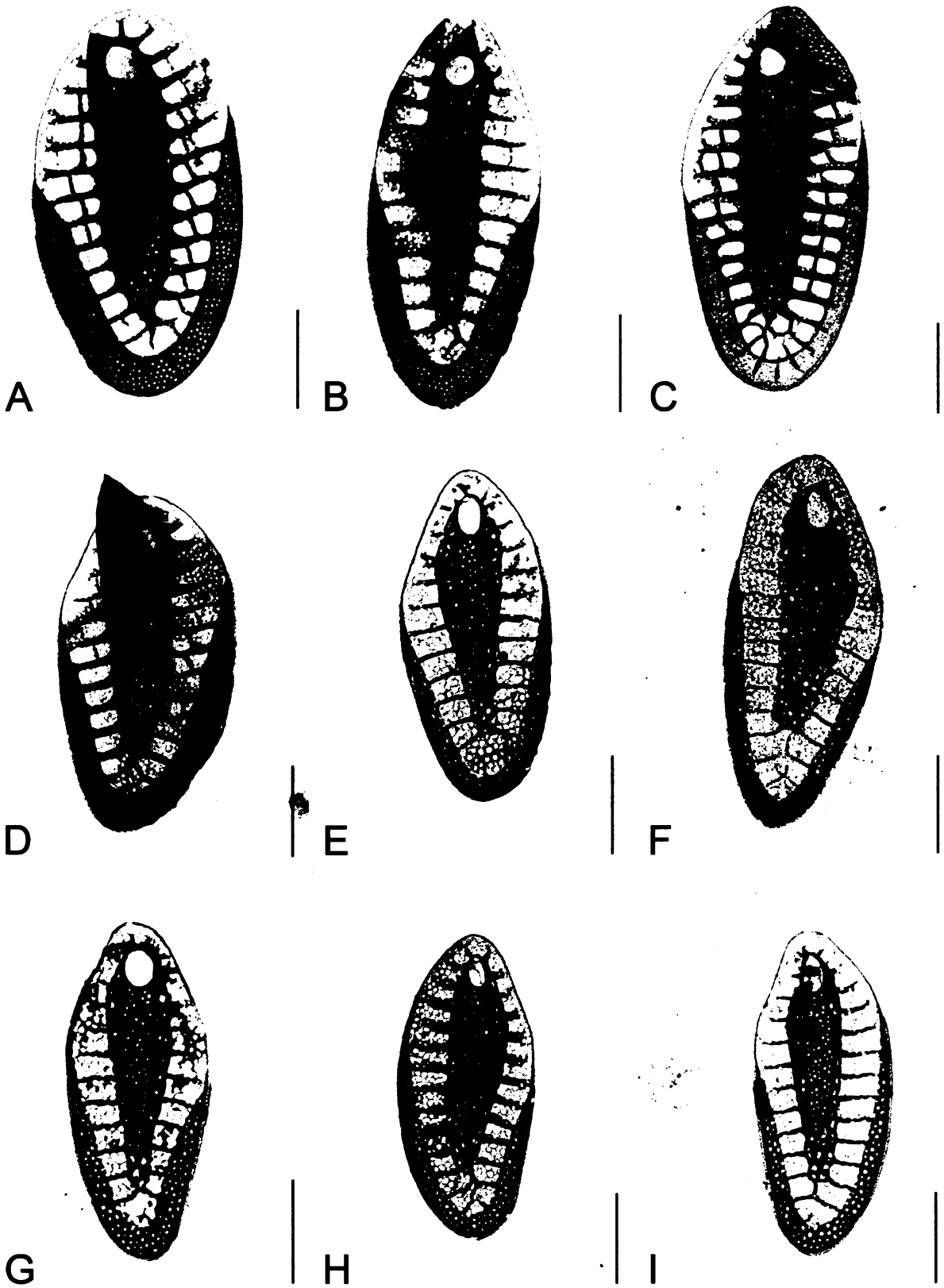
3b Keel pores medium-sized to large (diameter 74-111 nm) ..... *reticulata*

2b Large foramen, (diameter 315-557 nm), body scales with a very reduced or absent spine, apical scales with rounded spine ..... *oculea*

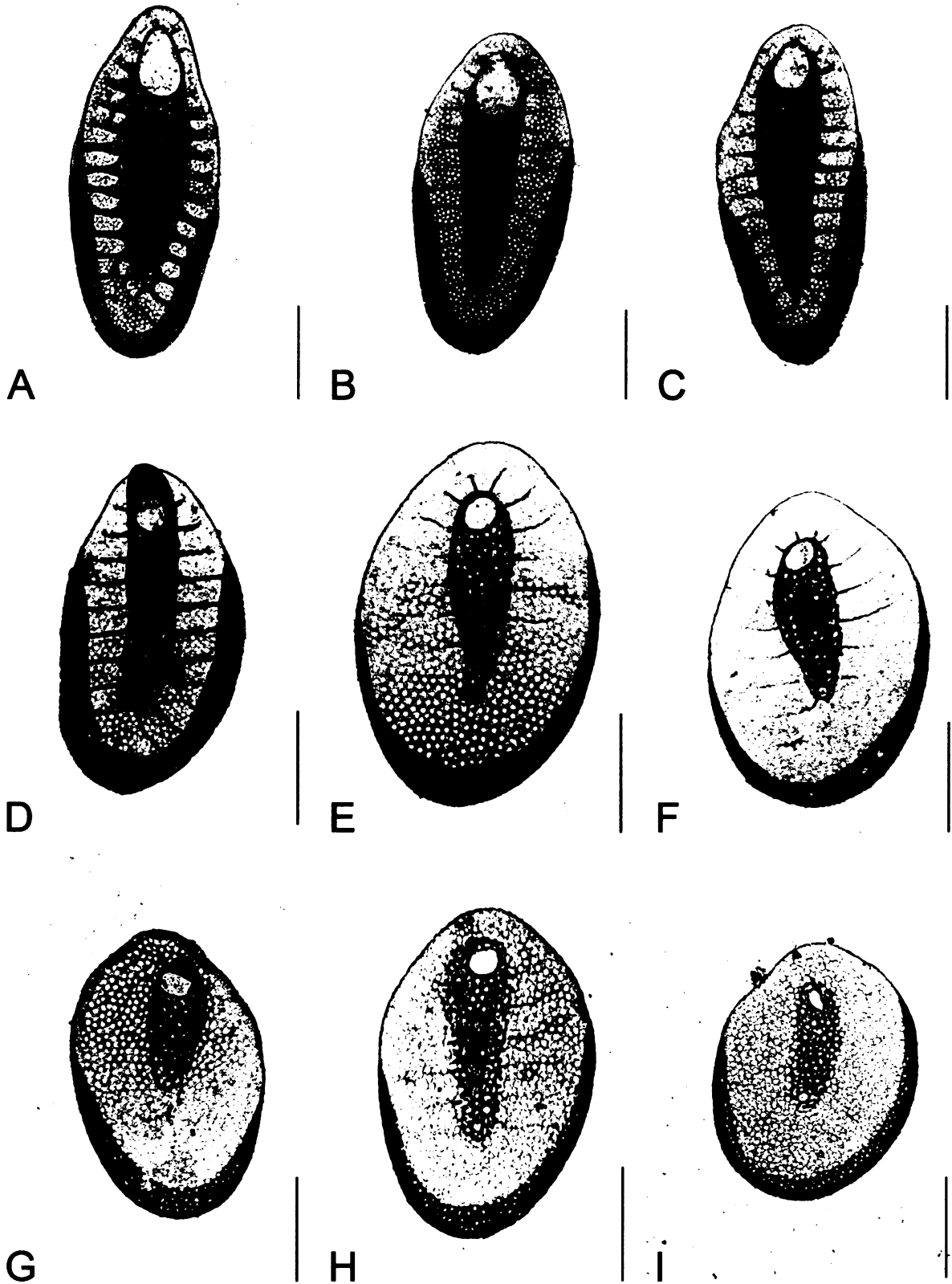




**Fig. 7.** TEM of the scales of clades 1 and 2. (A - D) clade 1 (*S. americana*). (E - I) clade 2 (*S. macropora*).



**Fig. 8.** TEM of the scales of clades 3 and 4. (A - D) clade 3 (*S. petersenii*). (E - I) clade 4 (*S. reticulata*).



**Fig. 9.** TEM of the scales of clades 5 and 6. (A - D) clade 5 (*S. oculatea*). (E - I) clade 6 (*S. glabra*).

## Discussion

*Synura petersenii*, as well as most other silica-scaled chrysophytes, is identified based exclusively on the morphology of its silica scales as observed under electron microscopy. Even if the slight morphological differences led several authors to establish new varieties and formae within *S. petersenii*, these are presently regarded as attributes of intraspecific variability, rather than separate species (Kristiansen & Preisig 2007). However, the congruence of ITS rDNA sequence divergence, distribution of (hemi-)CBCs in the ITS2 rDNA secondary structure, geometric morphometric data, and morphological separation of *S. petersenii* clones used in this study points to the presence of several species in *Synura petersenii* sensu lato. Generally, three independent species concepts concur to divide the studied clones into species.

Firstly, according to the phylogenetic species concept, each species is defined by the unique combination of character states in their ITS sequences. In fact, the ITS rDNA region has now become the single most frequently utilized DNA region in taxonomic studies of protists, due to its ability to discriminate accurately between biological species. For example, ITS sequences were recently used in discovery of genetic variability and hidden diversity within several genera of green algae (Kroken & Taylor 2000, Lewis & Flechtner 2004, Vanormelingen et al. 2007) or diatoms (Behnke et al. 2004, Lundholm et al. 2006, Amato et al. 2007, Vanormelingen et al. 2008). As compared to the above-mentioned reports, the comparable differences in ITS rDNA sequences led authors either to describe separate clades as new species, or at least to consider them as separate species entities. Secondly, the presence of at least one compensatory base change (CBC) or hemi-CBC in the secondary structure of a spacer region ITS2 has been correlated with the occurrence of two different species in the sense of a biological species concept, i.e. the presence of reproductive barriers between the organisms (Coleman 2000). Recently, this hypothesis has been supported in various groups of protists, especially in diatoms (e.g. Coleman & Mai 1997, Behnke et al. 2004, Amato et al. 2007, Casteleyn et al. 2007, Müller et al. 2007). Comparing the secondary structures of ITS2 rRNA molecules, we always found at least 3 (hemi-)CBCs between strains of different species, and no (hemi-)CBC between any pair of strains belonging to the same species, without exception. According to the above-mentioned CBC calculations, all described species should be sexually incompatible, and thus represent distinct biological species. It will be interesting to perform crossing experiments among the strains of the same and different *Synura* species to test Coleman's hypothesis in Synurophyceae, and conclusively confirm the

biological nature of the described species. Thirdly, there is an incontrovertible congruence between the morphology of the clones and their position in the ITS rDNA phylogeny. Members of different species are distinguished by both conventional morphological characters and modern geometric morphometric analyses (Table 2; Fig. 6). Thus, the newly delimited *Synura* species are not cryptic, and could be distinguished by a detailed comparison of the discriminative features presented, i.e. using a morphological species concept.

To objectively determine the morphological differences among the species, we have cultivated all clones under the same conditions. However, because we studied only those populations growing in culture, we have no information about morphological variability, which may occur in nature. Indeed, in a natural sample the differences could be less distinctive due to ecomorphic variability. The dependence of scale variability on environmental conditions was studied by Martin-Wagenmann & Gutowski (1995) and

Clade number	Len- gth/wid h	Foramen diamater (nm)	Average base plate pore diameter (nm)	Average keel pore diameter (nm)	Scale/keel area ratio	Keel tip
clade 1 ( <i>S. americana</i> )	< 1.8	< 180	13 - 25	36 - 44	< 6	acute
clade 2 ( <i>S. macropora</i> )	< 1.8	< 180	> 25	> 44	< 6	acute
clade 3 ( <i>S. petersenii</i> )	> 1.8	< 180	< 13	< 36	< 6	acute
clade 4 ( <i>S. reticulata</i> )	> 1.8	< 180	13 - 25	40 - 56	< 6	acute
clade 5 ( <i>S. oculatea</i> )	> 1.8	> 180	< 13	< 36	< 6	rounded
clade 6 ( <i>S. glabra</i> )	< 1.8	< 180	13 - 25	36 - 44	> 6	acute

**Table 2.** Summary of characteristic combinations of morphological features for each of the 6 clades.

Gavrilova et al. (2005). In the latter study, the morphology of silica scales was investigated in different pH conditions. Although some scale characteristics differed significantly in various conditions, the length/width ratio of the scales remained the same. Similarly, the base foramen diameter, as well as both base plate pore and keel pore areas were stable under all conditions studied. Considerable variation was observed in the silicification of scales, shape of central ridge, and scale rim size. Sandgren et al. (1996) found out that the basic ornamentation pattern of *Synura* scales cannot be influenced by manipulating silica availability. Martin-Wagenmann & Gutowski (1995) investigated the changes in scale morphology related to temperature and culture age in three *S. petersenii* clones. Concurring with the findings of Gavrilova et al. (2005), the areas of base foramen, basal plate pores and keel pores were not influenced by various experimental conditions. Moreover, they found significant morphological differences between individual strains allowing them to be distinguished from one another regardless of

experimental conditions. By comparing the presented microphotographs of silica scales with our morphological data, we were able to unambiguously assign all three investigated clones to *S. petersenii* (clone I), *S. glabra* (clone II) or *S. macropora* (clone III). All measured morphological data (i.e. scale dimension, length/width ratio, the area of base foramen, base plate pore and keel pore size) fit well into our species descriptions.

Summarizing, our investigations, as well as data in the literature, demonstrate the stability of the proposed morphological features for species recognition, and thus, the applicability and validity of a morphological species concept. However, due to the fact that our morphological comparisons were of a high number of scales retrieved from clonal culture, species determination based on single scale morphology of a natural sample could be misleading. For example, according to Wagenmann & Gutowski's investigations (1995), some scales of *S. petersenii* growing at 5 °C have an oblong to oval shape and could resemble *S. americana*. Therefore, for the morphological determination of species, we recommend comparing the morphology of several randomly chosen silica scales per population, instead of examining only a single scale.

In the present study, the *Synura* clones investigated were isolated from localities situated only in the Czech Republic. Despite this narrow geographical range, we discovered four new species previously unknown as individual species or as formae within *S. petersenii* s.l. Further, we verified the existence of *S. glabra*, first described by Korshikov (1929), as a separate species. According to scale variability and morphological similarities with *S. petersenii*, this species was considered to be a variety (Huber-Pestalozii 1941) or even a forma (Kristiansen & Preisig 2007). The most formidable attempt to abolish *S. glabra* was presented by Hällfors & Hällfors (1988), who described *S. petersenii* var. *glabra* as a weakly silicified ecomorph of *S. petersenii*, having no taxonomic status. However, our data, both morphological as well molecular is in agreement with the observations of Wagenmann & Gutowski (1995), and strongly supports the specific status of *S. glabra*. In addition to *S. petersenii* s.s. and *S. glabra*, whose scales' description and pictures can be frequently found in the literature, we can now confidently review certain previously published reports on *S. petersenii* single scales and assign them to one of the newly described species. For example, *S. reticulata* was found by Couté & Franceschini (1998; Fig. 79) or Řezáčová & Škaloud (2005; Fig. 34); reports of silica scales of *S. macropora* were published by Martin-Wagenmann & Gutowski (1995; Figs 17-23) or Kristiansen & Preisig (2007; Fig. 233b). Hence, several authors previously published reports based on the scales of newly described species, however, these were considered as pure intraspecific variability within *S. petersenii* s.l.

Our results underscore the large hidden diversity in the *S. petersenii* species complex. How many species we can expect to exist in nature that, by general morphology of silica scales, resemble *S. petersenii* s.l.? Because our data originated in a limited geographical area, we suppose that many additional species will be found and described on the basis of molecular and morphological investigation of clones isolated from diverse geographical areas. The morphological data retrieved from a number of floristic studies confirm the highly probable existence of a large number of hidden species that differ slightly in the morphology of their silica scales. Some of these organisms were described as different formae (Asmund 1968, Vigna 1979, Cronberg & Kristiansen 1980, Siver 1987, 1988, Kristiansen et al. 1997), and some morphologically unique scales were simply reported, without any taxonomic conclusions drawn (Kristiansen 1992, Řezáčová & Škaloud 2005). According to our results, only small morphological differences in silica scale structure can be found among these particular species. Thus, we can assume that all above-mentioned formae probably represent separate species, and in fact, have the same taxonomic rank, such as: *S. petersenii*, *S. glabra*, *S. macracantha* or *S. australiensis*. However, we do not consider it appropriate at present to confer upon them the rank of species on the basis of single, i.e. morphological, species concept. Only the combination of morphological and molecular data obtained from the clonal cultures could accurately discriminate between morphological variability and the existence of unique species. For example, we found the silica scales that morphologically correspond to *S. petersenii* f. *kufferathii* (Petersen & Hansen 1958) in several clonal cultures of *S. petersenii* s.str. Measurement of scale dimensions and pore diameters of *S. petersenii* f. *kufferathii* iconotypus confirmed that this forma represent only a morphological variability within *S. petersenii*.

### Conclusions and prospects

Using a combination of morphological and molecular data, *Synura petersenii* clones could be divided into six groups, representing separate species – *S. petersenii* s.str., *S. glabra*, *S. americana* spec. nov., *S. macropora* spec. nov., *S. reticulata* spec. nov. and *S. oculatea* spec. nov. In contrast to using the single species concept, multiple congruent lines of evidence provide stronger support for lineage separation, and will lead to the establishment of more robust species boundaries (de Queiroz 2007). In this paper, we present the taxonomic conclusions based on the absolute congruence of three independent species concepts:

morphological, phylogenetic, and CBC. According to our investigations, divergence in ITS rDNA generally correlate with the occurrence of at least three hemi(-CBCs) in the ITS2 secondary structure, and with slight, but clearly defined morphological differences in the silica scales. We suggest that future studies on *S. petersenii* s.l. clones will discover more hidden species and reveal the actual species diversity within the *S. petersenii* complex. The delimitation and morphological differentiation of these species will highly increase the value of *S. petersenii* as an ecological indicator in biomonitoring and paleolimnological studies. Further investigation of dispersal potencies could clarify obvious differences in biogeography of newly established species (e.g. *S. americana* restricted to the North America). Detailed investigation of niche preferences or seasonal fluctuation could explain the sympatric occurrence of particular species (e.g., *S. petersenii* and *S. reticulata* were isolated from the same sample taken from a Babín pool). Finally, further studies of molecular diversity in Synurophyceae will be able to determine whether similar hidden diversity is also present in other *Synura* species, or if it is restricted to *S. petersenii*.

### Acknowledgements

This study was supported by the Grant Agency of Charles University (Grant B BIO 137/2006).

### References

- ASMUND, B. (1968): Studies on Chrysophyceae from some ponds and lakes in Alaska. VI. Occurrence of *Synura* species. – *Hydrobiologia* **31**: 497-515.
- AMATO, A., W.H.C.F. KOOISTRA, J. HEE LEVIALDI GHIRON, D.G. MANN, T. PRÖSCHOLD & M. MONTRESOR (2007): Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. - *Protist* **158**: 193-207.
- ANDERSEN, R.A., S.L. MORTON & J.P. SEXTON (1997): Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton 1997. List of strains. - *J. Phycol.* **33** (suppl.): 1-75.



- BEHNKE, A., T. FRIEDL, V.A. CHEPURNOV & D.G. MANN (2004) Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). – J. Phycol. **40**: 193–208.
- BOOKSTEIN, F.L. (1991): Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. - Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- CASTELEYN, G., V.A. CHEPURNOV, F. LELIAERT, D.G. MANN, S.S. BATES, N. LUNDHOLM, L. RHODES, K. SABBE, W. VYVERMAN (2007): *Pseudo-Nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): a cosmopolitan diatom species? - Harmful Algae **7**: 241-257.
- COLEMAN, A.W. (2000): The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. - Protist **151**: 1–9.
- COLEMAN, A.W. (2003): ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. - Trends Genet. **19**: 370–375.
- COLEMAN, A.W. & J.C. MAI (1997) Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. - J. Mol. Evol. **45**: 168–177.
- COUTÉ A. & I. M. FRANCESCHINI (1998): Scale-bearing chrysophytes from acid waters of Florianópolis, Santa Catarina Island, South Brazil. – Algal. Stud. **88**: 37-66.
- CRONBERG, G. & J. KRISTIANSEN (1980): Synuraceae and other Chrysophyceae from central Småland, Sweden. - Bot. Notiser **133**: 595-618.
- DE QUEIROZ, K. (2007): Species concepts and species delimitation. - Syst. Biol. **56**: 879-886.
- DE RIJK, P., J. WUYTS & R. DE WACHTER (2003): RnaViz2: an improved representation of RNA secondary structure. - Bioinformatics **19**: 299–300.
- GAVRILOVA, O.V., N.V. NOGINA & L.N. VOLOSHKO (2005): Scale structures and growth characteristics of *Synura petersenii* (Synurophyceae) under different pH conditions. - Nova Hedwigia Beihefte **128**: 249-256.
- KORSHIKOV, A.A. (1929): Studies on Chrysomonads. I. - Arch. Protistenkd. **67**: 253-290.
- KRISTIANSEN, J. (1992): Silica-scaled chrysophytes from West Greenland: Disko Island and the Søndre Strømfjord region. - Nord. J. Bot. **12**: 525-536.
- KRISTIANSEN, J., L. DÜVEL & S. WEGEBERG (1997): Silica-scaled chrysophytes from the Taymyr Peninsula, Northern Siberia. - Nova Hedwigia **65**: 337-351.
- KRISTIANSEN, J. & H.R. PREISIG (2007): Süßwasserflora von Mitteleuropa, vol 1, part 2, Synurophyceae. - Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.

- KROKEN, S. & J.W. TAYLOR (2000): Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. - *Bryologist* **103**: 645-660.
- KUMAR, S., K. TAMURA & M. NEI (2004): MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. - *Brief Bioinform.* **5**: 150–163.
- LEWIS, L.A. & V.R. FLECHTNER (2004): Cryptic species of *Scenedesmus* (Chlorophyta) from desert soil communities of western North America. - *J. Phycol.* **40**: 1127-1137.
- LUNDHOLM, N., Ø. MOESTRUP, Y. KOTAKI, K. HOEF-EMDEN, C. SCHOLIN & P. MILLER (2006): Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima*-complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. - *J. Phycol.* **42**: 464-481.
- MARTIN-WAGENMANN, B. & A. GUTOWSKI (1995): Scale morphology and growth characteristics of clones of *Synura petersenii* (Synurophyceae) at different temperatures. In SANDGREN, C.D., J.P. SMOL & J. KRISTIANSEN (eds): *Chrysophyte algae. Ecology, phylogeny and development*: 345–360. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- MÜLLER, T., N. PHILIPPI, T. DANDEKAR, J. SCHULTZ & M. WOLF (2007): Distinguishing species. - *RNA* **13**: 1469-1472.
- NYLANDER, J.A.A. (2004): MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. Available from <http://www.abc.se/~nylander/>.
- PETERSEN, J.B. & J.B. HANSEN (1958): On the scales of some *Synura* species. II. *Biol. - Medd. Kgl. Dan. Vid. Selsk.* **23**: 1-13.
- PICHRTOVÁ, M., M. ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ, P. ŠKALOUD (2007): The silica-scaled chrysophytes of the Czech-Moravian Highlands. - *Fottea* **7**: 43-48.
- ROHLF, F.J. (2004a): TpsDig Version 1.40. - Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- ROHLF, F.J. (2004b): TpsRelw Version 1.39. - Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- RONQUIST, F. & J.P. HUELSENBECK (2003): MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. - *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- ŘEZÁČOVÁ, M. & P. ŠKALOUD (2005): Silica-scaled chrysophytes of Ireland. With an appendix: Geographic variation of scale shape of *Mallomonas caudata*. - *Nova Hedwigia Beihefte* **128**: 101-124.
- SANDGREN, C.D., S.A. HALL & S.B. BARLOW (1996): Siliceous scale production in chrysophyte and synurophyte algae. I. Effects of silica-limited growth on cell silica content,

- scale morphology, and the construction of the scale layer of *Synura petersenii* cells. - J. Phycol. **32**: 675-692.
- SHEETS, D.H. (2002): IMP-Integrated Morphometrics Package. - Department of Physics, Canisius College, Buffalo.
- SIVER, P.A. (1987): The distribution and variation of *Synura* species (Chrysophyceae) in Connecticut, USA. - Nord. J. Bot. **7**: 107-116.
- SIVER, P.A. (1988): A new forma of the common chrysophycean alga *Synura petersenii*. - Trans. Amer. Microsc. Soc. **107**: 380-385.
- SWOFFORD, D.L. (2002): PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- VANORMELINGEN, P., E. HEGEWALD, A. BRABAND, M. KITSCHKE, T. FRIEDEL, K. SABBE & W. VYVERMAN (2007): The systematics of a small spineless *Desmodesmus* taxon, *D. costato-granulatus* (Sphaeropleales, Chlorophyceae), based on ITS2 rDNA sequence analyses and cell wall morphology. - J. Phycol. **43**: 378–396.
- VANORMELINGEN, P., V.A. CHEPURNOV, D.G. MANN, K. SABBE & W. VYVERMAN (2008): Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyta). - Protist **159**: 73-90.
- VIGNA, M.S. (1979): Ultraestructura de las escamas de *Synura petersenii* Korsh. f. *bonaerensis* nov. forma (Ochromonadales). - Bol. Soc. Argent. Bot. **18**: 47-51.
- WALTER, A.E., D.H. TURNER, J. KIM, M.H. LYTTLE, P. MULLER, D.H. MATHEWS & M. ZUKER (1994): Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 9218–9222.
- WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE & J. TAYLOR (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. - In INNIS, M.A., D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY & T.J. WHITE (eds): PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications: 315-322. Academic Press, San Diego.
- WEE, J.L. (1982): Studies on the Synuraceae (Chrysophyceae) of Iowa. – Bibliotheca Phycologica **62**: 1-183. J. Cramer, Braunschweig, Germany.
- WEE, J.L., L.D. FASONE, A. SATTLER, W.W. STARKS & D. L. HURLEY (2001): ITS/5.8S DNA sequence variation in 15 isolates of *Synura petersenii* Korshikov (Synurophyceae). - In SIVER, P.A & J.L. WEE (eds): Chrysophytes and related organisms: topics and issues, Proceedings of the Fifth International Chrysophyte Symposium. Nova Hedwigia Beiheft **122**: 245-258.

ZUKER, M. (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. -  
Nucleic Acids Res. **31**: 3406–3415.