

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra botaniky**

**Charles University in Prague, Faculty of Science  
Department of Botany**

Doktorský studijní program: Botanika  
Ph.D. Study Program: Botany

Autoreferát disertační práce  
Summary of the Ph.D. Thesis



Odhalování skryté druhové diverzity u krásivek  
(Desmiales, Viridiplantae)

Unveiling hidden species diversity in desmids  
(Desmiales, Viridiplantae)

**Jan Mastný**

Titul/Supervisor: Jiří Neustupa

Praha, květen 2013



*Abstrakt:* Krásivkové druhy byly tradičně vymezovány pouze na základě morfologických znaků. Ovšem častý chybný výklad morfologické variability u krásivek vedl v minulosti ke značným zmatkům v taxonomii této významné skupiny zelených řas, což komplikuje interpretace krásivkové biodiverzity v kontextu sladkovodní ekologie, biogeografie a biomonitoringu. Proto jsem se v rámci této práce zaměřil především na doposud opomíjené téma, využití polyfázického přístupu pro výzkum taxonomie krásivek na druhové úrovni. Ve většině studií byla pro zhodnocení taxonomie vybraných druhů krásivek (zejména zástupců tvarově komplexních rodů *Micrasterias* a *Xanthidium*) využita kombinace jak tradičních morfologických, tak i moderních fylogenetických a geometricko-morfometrických metod. Ve dvou částech jsem pro vyjasnění taxonomie několika tvarově méně nápadných krásivek použil kombinaci tradičních morfologických dat a dat o autekologii příslušných druhů. Obecně, výsledky této práce ukázaly, že způsob, jakým recentně nahlížíme na diverzitu a rozšíření krásivek, by měl být od základu změněn. Reálná druhová diverzita je ve většině případů zřejmě jmenovitě definovaná pouze na základě klasických morfologických přístupů, a to je na úrovni variet těchto tradičně morfologicky definovaných druhů a lze ji v této době popsat pomocí kombinace molekulárních a morfologických dat. To také ukazuje, že pravá kryptická diverzita je u krásivek zejména vzácným fenoménem. Výsledky práce dále naznačují, že skutečná druhová diverzita krásivek je v mnohem větší míře, než se doposud předpokládalo, vztažena k pattern jejich geografického rozšíření i ke klimatickým faktorům. Areály rozšíření těchto fylogeneticky definovaných druhů jsou pravděpodobně v této době podstatně menší a naopak podíl druhů vyskytujících se pouze regionálně i dokonce druhů endemických podstatně větší než se recentně soudí. To ukazuje, že Foissnerův šedý model umírněného endemismu je z hlediska rozšíření krásivek mnohem realističtější modelem než šedá teorie ubikvitního rozšíření. Metody praktického využití krásivek v biomonitoringu a dalších studiích založených na datech o druhovém složení budou vyžadovat revizi, ovšem vzhledem k prokázané monofylii velké většiny z nich v rámci práce studovaných tradičních druhů krásivek jsou tyto přístupy stále mnohem slibnější než je tomu u drtivé většiny dalších skupin mikroskopických řas. Polyfázický přístup, založený na kombinaci několika nezávislých metod, přináší novou úroveň interpretací, je-li by nebylo možné formulovat fládným způsobem tento přístup zvláště. Je ovšem zejména, že výzkum skryté druhové diverzity u krásivek je stále pouze na počátku.

*Abstract:* The delineation of desmid species was traditionally based on purely morphological features. However, a frequent misinterpretation of morphological variability in desmids has led in the past to extensive taxonomical confusion within this important group of green algae which complicates the interpretation of their biodiversity in freshwater ecology, biogeography and biomonitoring. Consequently, I focused in this thesis predominantly on a previously neglected issue, the application of polyphasic approaches in the species-level taxonomy of desmids. In the most studies, a combination of both traditional morphological and modern molecular phylogenetic and geometric morphometric methods has been used to evaluate the taxonomy of selected desmid species, particularly representatives of the morphologically complex genera *Micrasterias* and *Xanthidium*. In two papers, I used the combination of traditional morphological and autecological data to clear up the taxonomy of several morphologically less prominent desmid taxa. Generally, the results of the thesis demonstrated that the way we recently see the diversity and distribution of desmids should be thoroughly changed. The real species diversity is mostly distinctly finer than that estimated by classical morphological taxonomy, often corresponds to varieties of the traditional morphologically defined species, and is usually well determinable using combination of molecular and morphological data. Consequently, true cryptic diversity appears to be a relatively rare phenomenon in desmids. Moreover, it is likely that the actual species diversity of desmids is for a much greater part than generally supposed related to the patterns of their geographic distribution or to the climatic factors. The biogeographical areas of these phylogenetic species are probably usually much smaller and the proportion of regionally restricted or even endemic species consequently much higher than recently assumed. Herewith, the results contradict the *ö*ubiquity model<sup>ö</sup> as the possible distribution model of desmids, in favour of *ö*Foissner<sup>ö</sup> *ö*moderate endemism model<sup>ö</sup>. The practical use of desmids in biomonitoring and other studies based on species composition data will need to be revised, but still seems to be much more promising than in the absolute majority of other microalgal groups, particularly due to the revealed monophyly of most of the traditional desmid morphospecies studied. Polyphasic approach, based on combination of several methods, yields a new level of interpretations that could not be reached by the use of any of these methods alone. Nevertheless, it is obvious that the investigation of hidden species diversity in desmids is still at the beginning.

## OBSAH / CONTENTS

1 ÚVOD .....	1
1.1 Obecný úvod .....	1
1.2 Krásivky, úvod .....	1
1.3 Druhové koncepty u krásivek .....	2
1.4 Diverzita krásivek .....	4
1.5 Biogeografie krásivek .....	5
2 SEZNAM LÁNK .....	5
3 CÍLE PRÁCE .....	6
4 MATERIÁL A METODY .....	7
5 VÝSLEDKY A DISKUSE .....	7
6 ZÁV RY .....	11
7 INTRODUCTION .....	13
7.1 General introduction .....	13
7.2 Desmids, introduction .....	13
7.3 Species concepts in desmids .....	14
7.2 Diversity of desmids .....	17
7.3 Biogeography of desmids .....	17
8 LIST OF PAPERS .....	18
9 AIMS OF THE THESIS .....	19
10 MATERIAL AND METHODS.....	19
11 RESULTS AND DISCUSSION .....	20
12 CONCLUSIONS .....	23
13 POUÍITÁ LITERATURA / REFERENCES .....	25
14 CURRICULUM VITAE .....	30



# 1. ÚVOD

## 1.1. Obecný úvod

Druhy jsou základní biologické jednotky a jejich náležitá definice je nezbytnou podmínkou jak pro zhodnocení biodiverzity, tak i pro správné pochopení jejich ekologie, biogeografie, evoluční historie a speciace. Ovšem mikrobiální eukaryota často vykazují tak málo morfologických znaků, že je velmi obtížné je správně vymezit pouze na základě tvarových kritérií. Na rozdíl od makroorganismů, jednoduchá morfologie vede často ke konvergentní morfologické evoluci například rody i dokonce třídami. Například druhy morfologicky definovaného řasového rodu *Chlorella* se ukázaly být rozptýleny v rámci dvou tříd chlorofytů, Chlorophyceae a Trebouxiophyceae (Huss et al. 1999).

Také na druhové úrovni prošla taxonomie nejenžích protistů během posledních dvou desetiletí významnými změnami a to v důsledku nárůstu využití molekulárních metod, jež mnohdy prokázaly výrazný podíl skryté (kryptické i pseudokryptické) diverzity (např. Hausmann et al. 2006, Slapeta et al. 2006, Kraft et al. 2010, Poulíková et al. 2010, Trkaloud & Peksa 2010, Fučíková et al. 2011, Kucera & Saunders 2012, Moniz et al. 2012, Trkaloud et al. 2012).

Navzdory tímto snahám však představuje počet druhů doposud zkoumaných s využitím molekulárních metod pouze pomyslnou částku ledovce a rozsah genotypové a fenotypové diverzity je stále u naprosté většiny současných druhů volně žijících protistů velkou neznámou (Weisse 2008). Vzhledem k tomu, že protista zaujímají klíčové role v téměř všech ekosystémech (Cotterill et al. 2008) a jsou často využívána pro účely jak základního, tak i aplikovaného výzkumu, není divu, že problematika jejich diverzity a vymezení druhů stále zůstává jedním z centrálních témat současné protistní biologie (Weisse 2008).

## 1.2. Krásivky, úvod

Krásivky jsou jednobuněčné řasy, jež se řadí ke spájitým zeleným řasám (Zygnematophyceae, Viridiplantae). Krásivky v širším slova smyslu zahrnují dvě skupiny v rámci této třídy; jednak tzv. nepravé krásivky (zástupci ředy Mesotaeniaceae z řádu Zygnematales) a krásivky pravé, tj. zástupce monofyletického řádu Desmidiiales (McCourt et al. 2000, Denbohn et al. 2001). V této práci jsem se zaměřil na zástupce druhé skupiny, jež je dobře charakterizována specifickou stavbou buněčné stěny a považována za nejodvozenější v rámci celé třídy Zygnematophyceae (Mix 1973, Brook 1981).

Krásivky jsou výlučně sladkovodní asy, jež vykazují největší diverzitu v mesotrofních, mírně kyselých až mírně zásaditých vodách, jako jsou rašeliniště a slatiniště. V těchto biotopech patří k dominantním skupinám fyto-bentosu a to jak z hlediska druhové diverzity, tak i biomasy (Coesel & Meesters 2007). Proto byly recentně několikrát vyuffity v různých typech ekologických studií (např. Pals et al. 2006, Krasznai et al. 2008, Neustupa et al. 2009, 2011, 2012). Navíc jsou vzhledem ke svým velmi specifickým ekologickým nárokům také považovány za vynikající bioindikátory a představují jednu z významných skupin pro ekologický monitoring sladkovodních habitatů (Coesel 2001). Pochopitelně nezbytným předpokladem jejich využití pro tyto účely jsou dobré druhové koncepty a s tím spojená znalost kryptické a pseudokryptické diverzity v rámci jednotlivých taxonů.

### 1.3. Druhové koncepty u krásivek

Jak již bylo zmíněné výše, problémy týkající se druhových definic u nás významně komplikují interpretaci jejich biodiverzity v ekologických a biogeografických studiích i v biomonitoringu. Ovšem v případě dvou organismů, zvláště pak blízce příbuzných, je často velmi obtížné rozlišit, zdali patří ke stejnému druhu či ne. To je důvod, pro který je biologie uflívána řada různých druhových konceptů. V této kapitole jsou nejdelefitují a nejrelevantnější z nich diskutovány se zetelem na krásivky.

#### *Morfologický druhový koncept*

Podle tohoto druhového konceptu jsou druhy skupiny morfologicky identických i velmi podobných organismů (Futuyma 1998). Na úrovni rodu a druhu jsou krásivky, podobně jako jiné mikroasy, tradičně klasifikovány na základě morfologických znaků vegetativních buněk jako je například tvar, rozměry, počet a symetrie, ornamentace buněčné stěny a stavba chloroplastu (Brook 1981).

Ovšem velká variabilita těchto morfologických diskriminačních znaků krásivek může být extrémně variabilní a to i v rámci jediné přírodní populace (např. Bicudo & Sormus 1972, Gerrath 1979, 1983) i v závislosti na podmínkách prostředí (Raflika 1971, Neustupa et al. 2008).

Naneštěstí právě tato velká morfologická plasticita komplexních buněk krásivek byla základem souasných rozsáhlých zmatků v jejich taxonomii na druhové úrovni (Kouwets 2008). Ekomorfy byly často natolik tvarově odlišné od štypické formy (na rozdíl od jiných, morfologicky zdaleka ne tak nápadných skupin), že to krásivkové taxonomy svádlo k jejich popisu coby samostatných taxonů. Velmi často byly nové jméno a nový klasifikační



stupe p i azeny k jakékoliv nalezené morfologické odchylce (Archer 1860), což vedlo De Wildemana (1894) k ná k m, fle šDesmidiologové popisují jedince, nikoliv druhy. Navíc, protofle je snadn j-í popsát novou varietu nejl nový druh, byly tyto nové a asto chybn definované formy popisovány jako infraspecifické taxony jifl existujících, pouze vzdálen podobných a zjevn nep íbuzných druh , což v d sledku vedlo k vytvo ení mnoha takzvaných sb rných druh (Kouwets 2008) a dále komplikovalo jasné druhové definice. A nakonec, v mnoha p ípadech neexistovala fládná originální ilustrace i byla velmi nekvalitní, což asto vedlo k vytvo ení ady taxonomických synonym (viz nap . Heimans 1969, s. 56., ást o *Staurastrum echinatum*).

V-echna vý-e zmín ná fakta z eteln ilustrují problémy spojené s uflíváním tradi ního morfologického druhového konceptu u krásivek. Jeho aplikace pro druhové definice m fle být dále komplikována p ílefitostným výskytem polyploidních komplex (Kaprana 2007) a tím, fle nerozezná kryptické druhy (Behnke et al. 2004). Av-ak v minulosti publikovaná data zalofená na morfologii p edstavují uflite né zdroje o variabilit a roz-í ení p íslu-ných druh krásivek a tradi ní morfologie, je-li provád na dostate n kriticky a pe liv , m fle stále poskytnout velké množství cenných dat.

### *Biologický druhový koncept*

Tento druhový koncept je pravd podobn mezi sou asnými biology ten nej-í eji p íjmaný. Definuje druhy jako skupiny k íflících se p írodních populací, jejl jsou od dal-ích podobných skupin reproduk n izolovány (Mayr 1948). íivotní cyklus krásivek zahrnuje pohlavní rozmnofování a existuje n kolik p íklad aplikací biologického druhového konceptu zalofených na reproduk ní izolaci jako sou ásti výzkumu taxonomie krásivkových druh . Nap íklad Blackburn & Tyler (1987) testovali reproduk ní chování klon *Micrasterias thomasi* a zjistili neo ekávanou skrytou diverzitu p á ících typ [tj. populací, které vzájemn vykazují (tém ) kompletní sexuální izolaci] v rámci tohoto morfologického druhu. Takové p á ící typy je mofno považovat za biologické druhy (Coesel & Krienitz 2008). Dal-ím dob e známým p íkladem je druhový komplex *Closterium ehrenbergii*, v rámci n hofl bylo rozeznáno afl 18 r zných p á ících typ (nap . Ichimura 1981, Ichimura & Kasai 1989, Denboh et al. 2003).

Nane-t stí, pohlavní rozmnofování, jejl je nezbytným p edpokladem pro aplikace biologického druhového konceptu, je u krásivek pom rn vzácným fenoménem (Coesel 1974) a u mnoha druh nejsou pohlavní stádia v bec známa. Proto z stává íroké uplatn ní biologického druhového konceptu v taxonomii krásivek nanejvý-problematické.

### *Fylogenetický druhový koncept*

Aplikace fylogenetických analýz založených na specifických molekulárních markerech v devadesátých letech 20. století výrazně rozšířila možnosti časové systematiky. Molekulární data umožnila formulovat specifické fylogenetické hypotézy a sledovat vývojové vztahy mezi jednotlivými taxony. Proto byl do praxe zaveden fylogenetický druhový koncept, kde druh je nejmenší skupina organismů sdílející unikátní kombinaci určitých znaků (i nukleotidů; Nixon & Wheeler 1990). Může být použit prakticky pro všechny organismy, ovšem jeho striktní aplikace může někdy vést k nadhodnocení reálného počtu druhů (Wheeler & Platnick 2000, Chaloud 2008).

I taxonomie krásivek prošla recentně výrazné změny založené na fylogenetických analýzách (např. McCourt et al. 2000, Gontcharov et al. 2003, Gontcharov 2008, Hall et al. 2008, Gontcharov & Melkonian 2004, 2005, 2008, 2010, 2011). Ovšem většina těchto studií byla zaměřena na rekonstrukci hlavních linií odpovídajících větvím a řádům i na prokázání umělé povahy tradičních krásivkových rodů (Gontcharov et al. 2003, Gontcharov & Melkonian 2005, 2008, Gontcharov 2008) a řádná studie využívající molekulární data se doposud specificky nezaměřila na ověření platnosti stávajících druhových konceptů krásivek.

Z výše uvedených kapitol je zřejmé, že řádný ze zmíněných přístupů sám o sobě nemůže být pokládán za ideální pro taxonomii až na druhové úrovni. Proto bylo recentně pro druhové definice v rámci různých časových skupin (např. Mann 1999, Pröschold & Leliaert 2007, Chaloud 2008), včetně krásivek (Kouwets 2008), doporučeno použít tzv. **polyfázického** (multidisciplinárního) **přístupu**, kombinujícího morfologická, ultrastrukturní, molekulární, ekologická i biochemická data.

#### 1.4. Diverzita krásivek

Výše zmíněné problémy, týkající se aplikace morfologického druhového konceptu, jenž byl téměř výlučně používán pro definice druhů, komplikují také odhady celkové diverzity krásivek. Různorodé pojetí druhů různými autory vyústilo v poměrně odlišné odhady celkové krásivkové diverzity, pohybující se od 1500 do 12000 druhů (Cranwell et al. 1990, Hoshaw et al. 1990). Nejrecentněji a nejastěji citovaný odhad počtu šdobrýchů, doposud známých druhů, činí zhruba 3000 (Gerrath 1993). Avšak celková taxonomická diverzita

krásivek je p esto ásto považována za velmi nejistou (nap . Gontcharov 2008, Gontcharov & Melkonian 2011).

### 1.5. Biogeografie krásivek

Výzkum skryté diverzity u ás je pochopiteln úzce spjat s tématem geografického roz-í ení potenciáln rozeznáných (pseudo)kryptických druh . Dva modely, týkající se roz-í ení mikroorganism , byly recentn publikovány v n kolika láncích a rychle se staly jedním z nejkontroverzn j-ích témat mikrobiální biogeografie a ekologie. ůTeorie ubikvitního roz-í ení, navržená Finlayem a Fenchelem (Finlay 2002, Fenchel & Finlay 2004, Finlay et al. 2004, Fenchel 2005), íká, že všechny mikroorganismy se díky extrémním podmínkám jedinc a snadnému ší ení vyskytují v-ude tam, kde mají vhodné podmínky. Naopak šmodel umírn něho endemismu, navržený Foissnerem (Foissner 2004, 2006), předpokládá, že zhruba jedna třetina všech mikroorganism je z nejr zn j-ích d vod endemická a to navzdory přítomnosti vhodných habitat v jiných regionech.

O krásivkách prohlásil jifl West (1909), že fládná jiná skupina sladkovodních ás nevykazuje takové geografické zvlá-tnosti. Vskutku, existuje ada píklad dobře definovaných pattern roz-í ení u krásivek (Donat 1926, Heimans 1969) a Krieger (1933, 1937) a Coesel (1996) dokonce rozli-ili deset krásivkových biogeografických region . Ov-em vzhledem k tomu, že podobné geografické vymezení pípadá v úvahu pouze u druh , je-li nemohou být zam n ny s fládným jiným (Heimans 1969, Coesel & Krienitz 2008), všechny tyto pokusy byly založeny pouze na malém po tu morfologicky extrémn nápadných taxon s minimální pravd podobností zám ny. Je navíc možné, že celá ada údajn kosmopolitních tradi ních druh by ve skute nosti (jak nazna uje jejich v t-inou dosti íroká a vágní definice, viz nap . Prescott et al. 1981, 1982) mohly být komplexy n kolika taxon s omezeným roz-í ením.

Je proto z ejmé, že pro náleflité definice druh , které by umořl ovaly stanovení jak jejich roz-í ení, tak i celkové diverzity krásivek, je opravdu nezbytné pouflití polyfázického pístupu sjednocujícího morfologické, genetické i ekologické znaky. To byl také hlavní cíl této práce.

## 2. SEZNAM LÁNK

I. <sup>TM</sup>astný, J. (2010): Desmids (Conjugatophyceae, Viridiplantae) from the Czech Republic; new and rare taxa, distribution, ecology. *Fottea* 10(1): 1-74

- II. <sup>TM</sup>astný, J. & Neustupa, J. (2008): *Cosmarium gauthierae* sp. nov. (Conjugatophyceae, Desmidiáles) from an ephemeral pool in South-West Macedonia. *Cryptogamie Algologie* 29: 255-260
- III. <sup>TM</sup>astný, J. & Kouwets, F.A.C (2012): New and remarkable desmids (Zygnematophyceae, Streptophyta) from Europe: taxonomical notes based on LM and SEM observations. *Fottea* 12(2): 293-313
- IV. <sup>TM</sup>astný, J., <sup>TM</sup>kaloud, P., Langenbach, D., Nemjová, K. & Neustupa, J. (2013): Polyphasic evaluation of *Xanthidium antilopaeum* and *Xanthidium cristatum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) species complex. *Journal of Phycology* 49(2): 401-416
- V. <sup>TM</sup>kaloud, P., <sup>TM</sup>astný, J., Nemjová, K., Mazalová, P. & Neustupa, J. (2012): Molecular phylogeny of baculiform desmid taxa (Zygnematophyceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 1281-1292
- VI. Neustupa, J., <sup>TM</sup>astný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Goodyer, E., Poulíková, A. & <sup>TM</sup>kaloud, P. (2011): A novel, combined approach to assessing species delimitation and biogeography within the well-known desmid species *Micrasterias fimbriata* and *M. rotata* (Desmidiáles, Streptophyta). *Hydrobiologia* 667(1): 223-239
- VII. Nemjová, K., Neustupa, J., <sup>TM</sup>astný, J., <sup>TM</sup>kaloud, P. & Veselá, J. (2011): Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*. *Phycological Research* 59(3): 208-220
- VIII. Neustupa J., <sup>TM</sup>kaloud, P. & <sup>TM</sup>astný, J. (2010): The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis* / *M. radians* species complex. *Journal of Phycology* 46(4): 703-714

### 3. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce byl výzkum a taxonomická revize n kolika druhových komplex krásivek s využitím polyfázického p ístupu. Ve dvou lánkách jsem navíc využil kombinaci tradi ních morfologických dat a dat o autekologii k vyjasn ní taxonomie n kolika krásivkových taxon .

Jednotlivé cíle mohou být shrnuty následovně :

- vyhodnotit diverzitu a roz-í ení krásivek v rámci eské republiky s využitím tradi ního morfologického p ístupu a vybrat druhové komplexy s potenciální skrytou diverzitou, vhodné pro dal-í výzkum ( lánka I)

- zhodnotit taxonomii n kolika problematických taxon krásivek s využitím tradičních morfologických a autekologických dat (lánky II a III)
- zhodnotit taxonomii vybraných druh krásivek s využitím jak tradičních morfologických, tak i moderních fylogenetických a geometricko-morfometrických přístup (lánky IV-VIII)
- zjistit pattern rozíení rozeznáných (pseudo)kryptických taxon s využitím kombinace terénních a literárních dat (lánek VI)

#### 4. MATERIÁL A METODY

Materiál pro jednotlivé dílí studie pocházel převážně z vlastních izolátů, získaných na základě odběru půrodních vzorků z mokradních biotopů v různých částech Evropy. V nich kterých případech byly v terénu měřeny také vybrané parametry prostředí a to pomocí elektronických přístrojů. Pro pokud možno co nejúplnější pokrytí diverzity studovaných linií byly využity i kmeny krásivek deponované v časových sbírkách. Monoklonální kultury získané izolací z půrodních vzorků byly kultivovány v tekutém médiu. Pro identifikaci a studium tradičních morfologických znaků jednotlivých kmenů byl využit světelný mikroskop, pro detailní studium struktury jejich buněk pak skenovací elektronový mikroskop. Pro analýzy detailního tvarového rozrůznění studovaných kmenů krásivek byly využity landmarkové metody geometrické morfometrie a pro vztáhu geometricko-morfometrických analýz TPS software. Pro molekulární analýzy byly použity jak některé evolučně více konzervované geny (např. 18S rDNA) za účelem stanovení fylogenetické pozice vybraných druhů v rámci ostatních dostupných krásivkových sekvencí, tak i variabilnější markery (zejména *trnG<sup>ucc</sup>* i ITS) pro rozeznání variability uvnitř jednotlivých druhových komplexů. Samotné fylogenetické analýzy byly provedeny metodami Bayesovská inference, maximální věrohodnost a maximální parsimonie.

#### 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

##### *Diverzita a rozíení krásivek v rámci České republiky*

V **lánku I** byl použit morfologický druhový koncept pro zhodnocení diverzity, rozíení a autekologie krásivek v rámci ČR. Analýza více než 1400 vzorků ze zhruba 150 mokradních biotopů vedla k nálezům celkem 526 taxonů, z toho 80 nových pro ČR. Lánek se

zabýval zejména výskytem a autekologií vzácných druhů, ovšem obsahuje i souhrnnou tabulku, v níž jsou zhodnoceny vybrané aspekty ekologie každého taxonu.

Zmíněné rozsáhlé odborné práce také odhalily řadu problematických druhů, u nichž bylo zjevně třeba detailnějšího studia k vyjasnění jejich taxonomie. Tento článek tedy sloužil jako základ pro pozdější studie zaměřené na taxonomii jednotlivých druhů i druhových komplexů a řada objevených druhů bohatých lokalit zároveň posloužila jako zdroj materiálu pro izolaci krásivkových kmenů v rámci těchto studií. Data, týkající se výskytu vzácných taxonů v jednotlivých mokradních biotopech ČR, mohou být také využita jako základ ekologických studií sledujících vývoj těchto lokalit (např. Mastný 2009).

#### *Taxonomie vybraných taxonů krásivek využívající kombinaci morfologických a autekologických dat*

V článku II vedla pešlivá morfologická analýza populace neznámé krásivky z efemerní trávy v Makedonii k jejímu popisu jako nového druhu, *Cosmarium gauthierae*. Ukázalo se, že jiný nález tohoto druhu byl v minulosti pokládán za *C. onychonema* (Gauthier-Lièvre 1931), od níž se ovšem *C. gauthierae* odlišuje jako unikátní kombinací morfologických znaků, tak i neobvyklou ekologií. Naše výsledky tedy ukázaly dříve nerozpoznanou, pseudokryptickou diverzitu v rámci *C. onychonema*.

V článku III jsme odhalili pseudokryptickou diverzitu v rámci 4 tradičních taxonů, což vedlo k popisu čtyř nových druhů (*Cl. pseudocostatum*, *Cosmarium discrepans*, *C. hostensiense*, *Act. riethii*). Naše výsledky navíc potvrdily status *Cosmarium cataractarum* a *C. cinctutum* jako samostatných druhů (jak naznačil v případě prvního z nich již Eichler 1895) a také nutnost povýšení *C. subbroomei* var. *taylorii* na úroveň druhu.

#### *Taxonomie vybraných taxonů s využitím polyfázického přístupu*

V článku IV jsme hodnotili fylogenetickou a morfologickou diferenciaci v rámci dvou z taxonomicky nejvíce problematických tradičních druhů krásivek (Prescott et al. 1982), *Xanthidium antilopaeum* a *X. cristatum*. Molekulární data založená na sekvencích *trnG<sup>ucc</sup>* a ITS rDNA ukázala monofylii obou komplexů s jedinou výjimkou *X. antilopaeum* var. *basiornatum*, jež pravděpodobně představuje samostatný druh, jak naznačil již Förster (1983). V rámci komplexu *X. cristatum* se ukázaly být tradiční variety *X. cristatum* var. *cristatum*, *X. cristatum* var. *uncinatum* a *X. cristatum* var. *scrobiculatum* separátními druhy. Data o *X.*

*antilopaeum* ukázala rozsáhlou fylogenetickou i fenotypickou variabilitu v rámci tohoto druhového komplexu. A koliv neukázala fládný jednozna ný pattern, jenfl by dovoloval spolehlivou taxonomickou klasifikaci, je z ejmé, fle druhová diverzita v rámci tohoto komplexu, ur ovaná pouze s využitím tradi ní morfologie, byla výrazn podhodnocena a skute ná m fle být o jeden i dokonce o dva ády vy—í, jak nazna il jifl Coesel (2005). Pozoruhodné je téfl, fle fylogenetický strom zaloflený na sekvencích *trnG<sup>ucc</sup>* nazna il n kolik p ípad možného omezeného geografického roz—ení v rámci zji-t ných fylogenetických druh .

**láněk V** byl zam ěn na krásivky s ty inkovitým tvarem. Na-e fylogenetická data ukázala, fle se tento typ morfologie vyvinul v rámci Desmidiaceae nezávisle nejmén ty ikrát. Ov-em nejzajímav j-í výsledek tohoto lánku s ohledem na téma mé práce je zji-t ná polyfylie tradi ních a velmi hojných druh *Pleurotaenium ehrenbergii* a *Pl. trabecula*. Fylogenetická diverzita v rámci t chto druh zji-t ná na základ sekvencí *trnG<sup>ucc</sup>* byla mnohem vy—í nefl ta, jefl byla patrná na základ morfologických dat. To potvrzuje obecn -patný morfologický koncept n kterých druh tohoto rodu, zaloflený na relativn malém po tu asto vágn definovaných znak (R fli ka 1977, Coesel & Meesters 2007). Na-e výsledky take potvrdily monofylii rodu *Pleurotaenium*, v etn tvarov neobvyklých druh *P. nodosum* a *P. ovatum*, a ukázaly fylogenetickou pozici vzácného rodu *Triplastrum*, jenfl se ukázal být zcela nep íbuzný ostatním ty inkovitým krásivkám.

V **lánku VI** jsme prokázali fylogenetickou homogenitu 14 kmen známého tradi ního druhu *Micrasterias rotata* v rámci Evropy, zaloflenou na sekvencích *trnG<sup>ucc</sup>*. Naproti tomu 16 kmen druhého studovaného druhu, *M. fimbriata*, se ukázalo být tvo eno dv ma z eteln vymezenými liniemi, li-ícími se na základ molekulárních, morfometrických i morfologických dat. Tato zji-t ná pseudokryptická diverzita v rámci *M. fimbriata* byla o to p ekvapiv j-í vzhledem k tomu, fle tento druh pat í k nejnápadn j-ím krásivkám v bec a disponuje ádou morfologických marker (R fli ka 1981, Coesel & Meesters 2007). P esto v-ak nebyl jeho tradi ní koncept doposud zpochybn n fládným z expert na krásivky.

V **lánku VII** jsme zkoumali morfologickou a molekulární diferenciaci -iroce pojímaného tradi ního druhu *Micrasterias truncata*, jenfl zahrnuje n kolik infraspecifických taxon s nejasnou taxonomickou hodnotou (R fli ka 1981). Krom toho byly zkoumány také kmeny morfologicky velmi podobných druh *M. decemdentata* a *M. zeylanica*. Molekulárn fylogenetická analýza zaloflená na sekvencích *trnG<sup>ucc</sup>* ukázala p t dob e podpo ených clad . Dva australské izoláty *M. truncata* var. *pusilla* se ukázaly být blízce p íbuznými k *M. zeylanica* a pravd podobn p edstavují samostatný druh se z ejm tropickým roz—ením.

Podobn byly dva evropské izoláty *M. truncata* var. *semiradiata* jak fylogeneticky, tak i morfologicky z eteln odd leny od v–ech ostatních kmen . Proto jsme navrhli, aby byl tento taxon op t pojímán jako samostatný druh *M. semiradiata*, jak byl origináln popsán Kützingem (1849). V–echny ostatní kmeny tvo ily dob e podpo enou, šjádrouou skupinu *M. truncata*, jeff byla vnit n roz len na na t i clady. Nebyli jsme ov–em schopni najít fládný morfologický i biogeografický signál, který by bylo mofno vyuffit pro vymezení t chto linií. M fle to být zp sobeno jejich pom rn recentním vznikem a mofná jsou ve skute nosti sympatrickými, skute n kryptickými druhy.

V **lánku VIII** jsme studovali dal–í zástupce rodu *Micrasterias*, *M. crux-melitensis* a *M. radians*. Tradi ní hranice mezi t mito morfologicky velmi podobnými taxony jsou pom rn nez etelné. Proto byl v n kterých studiích *M. radians* pokládán za varietu *M. crux-melitensis* (Coesel & Dingley 2005) i byly dokonce oba taxony považovány za jeden morfologicky variabilní druh (Vyverman & Viane 1995). Ov–em na–e molekulární data tyto hypotézy z eteln zamítla, nebo ukázala t i z etelné fylogenetické linie. Jednu z nich tvo ily izoláty z Evropy a Severní Ameriky, jeff byly morfologicky ur eny jako *M. crux-melitensis*. V rámci této linie se ukázalo, fle tradi ní variety *M. crux-melitensis* var. *janeira* a *M. crux-melitensis* var. *superflua* nemají fládnou taxonomickou hodnotu, jak p edpokládal jiff R ffi ka (1981). Kmeny *M. radians* tvo ily dv separátní fylogenetické linie odpovídající tradi ním varietám *M. radians* var. *evoluta* a *M. radians* var. *bogoriensis*. Morfotypy odpovídající první z nich byly doposud nalezeny pouze v Africe, naproti tomu, kmen *M. radians* var. *bogoriensis* pocházel z jihovýchodní Asie. Tento z ejmý pattern omezeného geografického roz–ení v rámci na–ich t í fylogenetických linií nazna il, fle v druhové diferenciaci pom rn velkých protist jako je *Micrasterias* by mohla hrát významnou roli geografická izolace.

*Výzkum roz–ení rozeznáných pseudokryptických druh s vyuffitím kombinace terénních a literárních dat*

V **lánku VI** byl vyuffit unikátní p ístup, který umofnil zahrnout mnoho publikovaných nález do analýzy roz–ení dvou rozeznáných pseudokryptických druh v rámci tradi ního druhu *M. fimbriata*. Jeho publikované kresby i mikrofotografie byly zahrnuty do klasifika ní diskrimina ní analýzy a p i azeny k jedné i druhé z obou identifikovaných linií na základ porovnání s morfometrickými daty ze flivého materiálu. To ve výsledku ukázalo na velmi odli–ný pattern roz–ení obou linií v rámci tohoto tradi ního druhu, jenfl je v rámci Evropy p ekvapiv nápadn podobný pattern roz–ení cévnatých rostlin (nap . Cox & Moore 2005).



Jeden fylogenetický druh je hojný ve střední a východní Evropě, ale vyskytuje se i na Britských ostrovech. Druhý fylogenetický druh byl zaznamenán v Severní Americe a v západní Evropě, kde je jeho rozšíření zřejmě omezeno západním břehem eky Rýn. Morfometrické analýzy publikovaných dat také ukázaly, že tyto geografické rozdíly zůstaly v podstatě nezměněné od roku 1850, což ukazuje na doposud neznámou stabilitu rozšíření v rámci mikroskopických řas jako jsou krásivky.

## 6. ZÁVĚRY

V rámci této práce jsem se zaměřil především na doposud opomíjené téma, využití polyfázického přístupu, založeného na kombinaci několika metod, pro výzkum taxonomie krásivek na druhové úrovni. Avšak, jak bylo ukázáno v lánkách II a III, také tradiční morfologie, je-li prováděna pečlivě a kriticky a podpořena například daty o autekologii, může stále poskytnout cenná taxonomická data. Nicméně pro vyřešení taxonomie blízce příbuzných druhů se zdají být přístupy zahrnující molekulární fylogenetické analýzy nezbytné.

Výsledky hlavní části práce (lánky IV-VIII), kde byl použit polyfázický přístup pro výzkum skryté diverzity v rámci některých modelových druhových komplexů krásivek, mohou být shrnuty následovně:

Použití polyfázického přístupu ve většině případů prokázalo značný podíl skryté diverzity. V rámci studovaných taxonů, za předpokladu, že byly studovány etné izoláty, pouze *Micrasterias rotata* a *M. crux-melitensis* se ukázaly být fylogeneticky homogenní. Naopak, počet tradičních morfologických druhů, jež se ukázaly být tvořeny několika fylogenetickými druhy, byl mnohem vyšší. V rámci *X. antilopaeum* se zdá být dokonce reálná druhová diverzita o jeden až dva řády vyšší než ta určená pouze na základě tradiční morfologie. Navíc se ukázalo, že počet tradičních infraspecifických taxonů, jež se ukázaly být pouze ekomorfami a nemají tudíž žádnou taxonomickou hodnotu byl poměrně nízký.

Proto lze usuzovat, že skutečná diverzita Desmidiáles, jež byla někdy (například Coesel & Krienitz 2008) kvůli velkému množství synonym považována za spíše nižší než jsou recentně uznávané odhady (cca 3000 druhů), bude ve skutečnosti naopak znatelně vyšší. Vzhledem k tomu, že v rámci morfologicky jednoduchých druhů s málo diskriminačními znaky lze očekávat spíše vyšší podíl skryté diverzity než tomu bylo u morfologicky komplexních druhů, jež jsme studovali doposud, očekávám, že budoucí široká aplikace molekulárních metod v taxonomii krásivek by pravděpodobně vedla k odhalení několikrát vyšší diverzity než je oněch zhruba 3000 recentně akceptovaných šedobřích řas.

Jednotlivé druhové linie byly ve většině případů morfologicky identifikovatelné a to jak pomocí mikroskopickou analýzou, tak s využitím kvantitativních metod geometrické morfometrie. To ukazuje, že pravá kryptická diverzita je pravděpodobně v rámci krásivek poměrně vzácným fenoménem.

Výsledky práce dále naznačují, že skutečná druhová diverzita krásivek je v mnohem větší míře, než se doposud předpokládalo, vztažena k pattern jejich geografického rozšíření i ke klimatickým faktorům. To popírá teorii ubikvitního rozšíření jako možný model rozšíření krásivek ve prospěch Foissnerova šmodelu umírněného endemismu. Je ovšem sporné, zda jsou mezi krásivkami vůbec nějaké kosmopolitní druhy. Nález jakýchkoli údajů kosmopolitních druhů jsou hlášených z různých částí světa ze zcela odlišných biotopů. Ovšem ve světle našich výsledků a vezmeme-li v potaz obecně velmi úzkou ekologickou amplitudu krásivek, se zdá být docela dobře možné, že tyto údajně široce ekologicky tolerantní druhy mohou být ve skutečnosti komplexem několika druhů s omezeným rozšířením a specifickými ekologickými nároky.

Co se týká praktického využití krásivek v biomonitoringu a ekologických studiích založených na datech o druhovém složení; je zřejmé, že metody jejich využití v tomto směru budou vyžadovat revizi a měly by být založeny na nově objevených fylogenetických druzích. Ovšem vzhledem k prokázané monofylii v většině doposud studovaných tradičních druhů a pravděpodobně nízké míře skutečné kryptické diverzity u krásivek jsou tyto přístupy stále mnohem slibnější než je tomu u drtivě většiny dalších skupin mikroskopických řas. Výsledky této práce také v neposlední řadě poskytly data o fylogenetické a taxonomické identitě několika velmi vzácných a morfologicky pozoruhodných taxonů (např. *Triplastrum simplex*, *Pleurotaenium nodosum* i *Staurastrum tumidum*).

Ve stručnosti: Ukázalo se, že způsob, jakým recentně nahlížíme na diverzitu a rozšíření krásivek, by měl být od základu změněn. Reálná fylogenetická druhová diverzita je ve většině případů zřejmě jmenší než ta, definovaná pouze na základě klasických morfologických přístupů, a to je na úrovni variet těchto tradičních morfologicky definovaných druhů a lze ji v této době popsat pomocí kombinace molekulárních a morfologických dat. Areály rozšíření těchto fylogeneticky definovaných druhů jsou pravděpodobně v této době podstatně menší a naopak podíl druhů vyskytujících se pouze regionálně i dokonce druhů endemických podstatně větší než se recentně soudí. To dává krásivky, jež jsou dobře známy svojí citlivostí vůči většině druhů změně a disturbance, jež náchylnější k možnému úbytku biodiverzity a zdá se, že to nutnost ochrany jejich habitatů. Polyfázický přístup, založený na kombinaci několika nezávislých metod, přinesl novou úroveň interpretací, jež by nebylo možné

formulovat řádným způsobem, zvláště. Je ovšem zřejmé, že výzkum skryté druhové diverzity u krásivek je stále pouze na počátku.

## 7. INTRODUCTION

### 7.1. General introduction

Species are fundamental natural units and their proper circumscription is an essential requirement for both biodiversity assessments and correct understanding of their ecology, biogeography, evolutionary history, and speciation. However, microbial eukaryotes often reveal so few morphological characters that it is very difficult to delimit them correctly using morphological criteria alone. Contrary to macroorganisms, simple morphology often leads to the convergent morphological evolution across different genera or even classes. For example, species of the morphologically defined algal genus *Chlorella* were revealed to be dispersed over two classes of chlorophytes, the Chlorophyceae and the Trebouxiophyceae (Huss et al. 1999).

Also at species level, the taxonomy of various protists has been turned upside down over the past two decades with the increasing use of molecular methods, revealing an apparent rate of hidden (cryptic or pseudocryptic) diversity (e.g. Hausmann et al. 2006, Slapeta et al. 2006, Kraft et al. 2010, Poulíková et al. 2010, Trkaloud & Pekař 2010, Fučíková et al. 2011, Kucera & Saunders 2012, Moniz et al. 2012, Trkaloud et al. 2012).

In spite of these increased efforts, the number of species investigated by molecular phylogenetics methods represent just the tip of the iceberg and the range and extent of the genotypic and phenotypic diversity are still unknown for the vast majority of extant, free-living protist species (Weisse 2008). Given that protists hold key roles in nearly all ecosystems (Cotterill et al. 2008) and are frequently used for the purposes of both basic and applied research, it is obvious that the matters of their diversity and species delineation still remains one of the central issues of contemporary protistan biology (Weisse 2008).

### 7.2. Desmids, introduction

Desmids are unicellular algae that belong to conjugating green algae (Zygnematophyceae, Viridiplantae). Desmids *sensu lato* traditionally involve two groups within this class; the so called saccoderm (řfalseö) desmids (members of family

Mesotaeniaceae from order Zygnematales) and the placoderm (ötrueö) desmids, members of the monophyletic order Desmidiales (McCourt et al. 2000, Denboh et al. 2001). In this thesis, I have focused on the representatives of the latter group, which is well characterized by a specific cell wall architecture and regarded as the most derived in the whole class Zygnematophyceae (Mix 1973, Brook 1981).

Desmids occur exclusively in freshwaters and the highest desmid diversity is found in mesotrophic, slightly acidic to slightly alkaline water bodies like moorland pools, peat pits or fen hollows. They belong to the dominant phytobenthos groups in these habitats, both in terms of species richness and biomass (Coesel & Meesters 2007). Therefore, they have recently been several times used in various kinds of ecological studies (e.g. Pals et al. 2006, Krasznai et al. 2008, Neustupa et al. 2009, 2011, 2012). Moreover, due to their highly specific ecological demands, they are considered excellent indicator organisms and represent one of the most important groups in the ecological monitoring of freshwater habitats (Coesel 2001). Logically, their use and reliability for the above mentioned purposes essentially require reliable species concepts and related knowledge on distributional patterns and extent of cryptic and pseudocryptic diversity in the particular taxa.

### 7.3. Species concepts in desmids

As already mentioned above, problems concerning species definition in microalgae complicate interpretation of their biodiversity in ecological, biogeographical or biomonitoring studies. However, given two organisms, it is often very difficult to distinguish, whether they belong to the same species or not, particularly in closely related ones. That is the reason why many different species concepts are used by biologists. In this chapter, the most important and relevant ones are briefly characterized and discussed with respect to the desmids.

#### *The morphological species concept*

According to this species concept, species are groups of morphologically identical or similar organisms (Futuyma 1998). At the generic and species levels, desmids, similarly to other microalgae, are traditionally classified according to morphological characters of vegetative cells, such as shape, dimensions, number of symmetry planes, cell wall ornamentation or chloroplast configuration (Brook 1981).

However, most of these morphological discriminative characters of desmids may be extremely variable even within one natural population (e.g. Bicudo & Sormus 1972, Gerrath

1979, 1983) or depending on environmental conditions (e.g. R fli ka 1971, Neustupa et al. 2008).

Unfortunately, it was just this extensive morphological plasticity of complex desmid cells what built the basis for the existing huge confusion in their traditional morphological species-level taxonomy (Kouwets 2008). The ecomorphae were often so much different from the 'typical' form (contrary to other, usually morphologically much less prominent algal groups) that the desmid taxonomists were put up to describe them as separate taxa. Very often a new name and specific rank have been given to almost every variation encountered (Archer 1860), inducing De Wildeman (1894) to the lament that 'Desmidiologists describe specimens not species'. Moreover, since it is easier to describe a new variety than a new species, these newly described and often ill-defined forms were frequently described as infraspecific taxa of apparently unrelated, only superficially similar species, in this way creating a large number of so-called collective species (Kouwets 2008) and further obscuring clear species definitions. Finally, in many cases no original figure or authentic material existed or the figures were very poor, what often led to the creation of a large series of taxonomic synonyms (e.g. Heimans 1969, p. 56., part about *Staurastrum echinatum*).

All the above mentioned facts clearly illustrate the problems of using the traditional morphological species concept in desmids. Its application for species delineations may further be complicated by the occasional occurrence of polyploid complexes (see Kapraun 2007) and by the fact that it does not recognize cryptic or sibling species (Behnke et al. 2004). However, previously published morphological investigations represent valuable information sources about morphological variability and distribution of particular desmid species, and the traditional morphology, if performed carefully and critically, may still provide a lot of useful information.

### *The biological species concept*

This species concept is probably the most widely accepted among contemporary biologists. It defines species as groups of interbreeding natural populations that are reproductively isolated from other such groups (Mayr 1948). The life cycle of *Desmidiiales* involves the sexual process and there are several examples of application of the biological species concept criteria based on reproductive isolation as a part of taxonomic evaluation of desmid species. For instance, Blackburn & Tyler (1987) tested the reproductive behaviour in clones of *Micrasterias thomasiana* and revealed an unexpected hidden diversity of mating types [i.e. populations which mutually show (almost) complete sexual isolation; Ichimura

1981] within this traditional morphospecies. Such mating types can be considered syngens or biological species (Coesel & Krienitz 2008). Another well-known example is the *Closterium ehrenbergii* species complex where up to 18 mating types have been recognized (e.g. Ichimura 1981, Ichimura & Kasai 1989, Denboh et al. 2003).

Unfortunately, sexual reproduction, which is essential for applying the biologic species concept, is a relatively rare phenomenon in desmids (Coesel 1974) and of many species no sexual stages are known at all. Thus, a wide application of the biological species concept in desmid taxonomy remains highly problematic.

### *The phylogenetic species concept*

The application of phylogenetic analyses based on specific molecular markers in the 1990s considerably extended the scope of algal systematics and taxonomy. Molecular data allowed to formulate specific phylogenetic hypotheses and to trace the phylogenetic relationships between individual taxa. Consequently, the phylogenetic species concept has been put into practice, in which a species is the smallest group of organisms that shares unique combination of character states (nucleotide states as well; Nixon & Wheeler 1990). It can be applied practically for to organisms, but its strict application could result in overestimating of the real species number (Wheeler & Platnick 2000, Tkaloud 2008).

The taxonomy of desmids has recently undergone major changes based on molecular phylogenetic analyses (e.g. McCourt et al. 2000, Gontcharov et al. 2003, Gontcharov 2008, Hall et al. 2008, Gontcharov & Melkonian 2004, 2005, 2008, 2010, 2011). However, most of these studies were concentrated on reconstruction of major lineages corresponding to families and orders or on the demonstration of the artificial nature of the traditional desmid genera (Gontcharov et al. 2003, Gontcharov & Melkonian 2005, 2008, Gontcharov 2008) and no study using molecular data specifically focused on the validity of traditional desmid species concepts yet.

From the above chapters it is clear that no from the mentioned approaches alone can be considered a gold standard for species level taxonomy of algae. Therefore, the usage of **polyphasic** (multidisciplinary) **approach** (i.e. combining morphological, ultrastructural, molecular, ecological or biochemical data) has been recently recommended for species delimitation in various algal groups (e.g. Mann 1999, Pröschold & Leliaert 2007, Tkaloud 2008), including desmids (Kouwets 2008).

#### 7.4. Diversity of desmids

The above-mentioned problems concerning the application of the morphological species concept in desmids, which has almost exclusively been used for species delineations, significantly hamper also the diversity estimates of the group. Differently broad species definitions by various authors resulted in rather dissimilar assessments of the desmid species richness, ranging from 1 500 to 12 000 spp (Cranwell et al. 1990, Hoshaw et al. 1990). The most recent and usually cited estimate of the total number of *ögoodö* species known so far amounts to approximately 3 000 (Gerrath 1993). However, the real taxonomic diversity of the group is often considered very uncertain (e.g. Gontcharov 2008, Gontcharov & Melkonian 2011).

#### 7.5. Biogeography of desmids

The research of hidden diversity in microalgae is obviously closely associated with the issue of the geographical distribution of the potentially recognized (pseudo)cryptic taxa. Two models concerning the distribution patterns of microorganisms have recently appeared in series of papers and became promptly one of the most contentious issues of microbial biogeography and ecology. The *öbiquity modelö*, proposed by Finlay and Fenchel (Finlay 2002, Fenchel & Finlay 2004, Finlay et al. 2004, Fenchel 2005), says that all microorganisms occur everywhere the environment is suitable due to high dispersal ability and high individual numbers. On the other hand, the *ömoderate endemicity modelö*, raised by Foissner (Foissner 2004, 2006), estimates that about one third of the taxa are due to various reasons endemic, in spite of suitable habitats in other regions.

In desmids, already West (1909) stated that no group of freshwater algae exhibits such marked geographical peculiarities as the desmids. Indeed, there are several examples of well-defined desmid distribution patterns (Donat 1926, Heimans 1969) and Krieger (1933, 1937) and Coesel (1996) even distinguished ten desmid floral regions. However, since a reliable knowledge of geographical distribution patterns is confined only to taxa that can not be confused with any other ones (Heimans 1969, Coesel & Krienitz 2008), all these attempts were based only on a relatively small number of morphologically most conspicuous, clearcut taxa with a low confusion likelihood. Moreover, it appears possible that a large number of putatively cosmopolitan traditional morphospecies may in fact (as indicated by their usually broad and vague definition, e.g. Prescott et al. 1981, 1982) be a complex of several taxa with restricted distribution.

Thus, it is obvious that for proper species delimitation allowing subsequent correct assessment of both the distribution patterns and diversity of desmids it is indeed crucial to use a polyphasic approach reconciling morphologic, genetic, and ecological features. This was also the main aim of this thesis.

## 8. LIST OF PAPERS

- I. <sup>TM</sup>astný, J. (2010): Desmids (Conjugatophyceae, Viridiplantae) from the Czech Republic; new and rare taxa, distribution, ecology. *Fottea* 10(1): 1-74
- II. <sup>TM</sup>astný, J. & Neustupa, J. (2008): *Cosmarium gauthierae* sp. nov. (Conjugatophyceae, Desmidiales) from an ephemeral pool in South-West Macedonia. *Cryptogamie Algologie* 29: 255-260
- III. <sup>TM</sup>astný, J. & Kouwets, F.A.C (2012): New and remarkable desmids (Zygnematophyceae, Streptophyta) from Europe: taxonomical notes based on LM and SEM observations. *Fottea* 12(2): 293-313
- IV. <sup>TM</sup>astný, J., <sup>TM</sup>kaloud, P., Langenbach, D., Nemjová, K. & Neustupa, J. (2013): Polyphasic evaluation of *Xanthidium antilopaeum* and *Xanthidium cristatum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) species complex. *Journal of Phycology* 49(2): 401-416
- V. <sup>TM</sup>kaloud, P., <sup>TM</sup>astný, J., Nemjová, K., Mazalová, P. & Neustupa, J. (2012): Molecular phylogeny of baculiform desmid taxa (Zygnematophyceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 1281-1292
- VI. Neustupa, J., <sup>TM</sup>astný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Goodyer, E., Poulíková, A. & <sup>TM</sup>kaloud, P. (2011): A novel, combined approach to assessing species delimitation and biogeography within the well-known desmid species *Micrasterias fimbriata* and *M. rotata* (Desmidiales, Streptophyta). *Hydrobiologia* 667(1): 223-239
- VII. Nemjová, K., Neustupa, J., <sup>TM</sup>astný, J., <sup>TM</sup>kaloud, P. & Veselá, J. (2011): Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*. *Phycological Research* 59(3): 208-220
- VIII. Neustupa, J., <sup>TM</sup>kaloud, P. & <sup>TM</sup>astný, J. (2010): The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis* / *M. radians* species complex. *Journal of Phycology* 46(4): 703-714



## 9. AIMS OF THE THESIS

The general objective of this thesis was the taxonomical investigation and revision of several desmid species complexes using polyphasic approach. Moreover, in two papers, I used the combination of traditional morphological and autecological data to clear up the taxonomy of several desmid taxa.

The particular aims can be summarized as follows:

- to evaluate the diversity and distribution of desmids within the Czech Republic using the traditional morphological approach, and to select desmid species complexes with a potential hidden diversity suitable for further research (paper I)
- to evaluate the taxonomy of several problematic desmid taxa using the combination of traditional morphological and ecological data (papers II and III)
- to evaluate the taxonomy of selected desmid species using both traditional morphological and modern molecular phylogenetic and geometric morphometric approaches (papers IV-VIII)
- to investigate the distribution patterns of the recognized (pseudo)cryptic taxa using the combination of field and literature data (paper VI)

## 10. MATERIAL AND METHODS

Strains for the particular studies were isolated from natural samples originating from various European wetlands. In some studies, selected environmental variables were measured in the field using electronic devices. In addition, to maximally cover the diversity of the studied lineages, strains deposited in public culture collections were also acquired. Monoclonal cultures obtained by isolation from natural samples were cultivated in a liquid medium. Light microscope was used for identification and traditional morphological investigation of the particular strains and the scanning electron microscope was used for detailed study of their cell wall sculpture. The morphological differentiation of strains was analyzed using landmark-based geometric morphometrics. For most geometric morphometric analyses, the TPS-series software was used. Within the frame of molecular analyses, several evolutionary more conserved genes (e.g. 18S rDNA) were used for establishing the position of individual species among other available desmid sequences, whereas some more variable markers (particularly *trnG*<sup>ucc</sup> or ITS) were used for recognizing individual microspecies within the investigated complexes. Phylogenetic analyses were performed with Bayesian inference methods, maximum likelihood and maximum parsimony.

## 11. RESULTS AND DISCUSSION

### *Diversity and distribution of desmids within the Czech Republic*

In **paper I**, the morphological species concept was adopted to assess the diversity, distribution and autecology of desmids within the Czech Republic. The examination of more than 1400 samples from about 150 various wetland habitats revealed altogether 526 desmid taxa, 80 of them being new for the Czech Republic. The paper focused particularly on the occurrence and autecology of rare taxa, however, a comprehensive, notated table, where several aspects of the ecology of every taxon are evaluated, was also included.

The extensive sampling also revealed a number of problematic taxa that apparently needed a more detailed study to clear up their taxonomy. Therefore, this paper served as a basis for further studies focused on the taxonomy of particular species (complexes) and also revealed a number of desmid-rich localities that served as a source of material for the isolation of desmid strains within these studies. Finally, the data concerning the occurrence of rare taxa in the particular Czech wetland habitats may also be used as a basis for ecological studies tracing the development of these sites (e.g. <sup>TM</sup>astný 2009).

### *Taxonomy of selected desmid taxa using the combination of morphological and autecological data*

In **paper II**, careful morphological analysis of a population of an unknown desmid from an ephemeral pool in Macedonia led to its description as a new species, *Cosmarium gauthierae*. Another finding of this species has been previously attributed to *C. onychonema* (Gauthier-Lièvre 1931), from which, however, *C. gauthierae* clearly differs by a unique combination of typical morphological features as well as by its unusual ecology, so that our results illustrated a previously unrecognized, pseudocryptic diversity in *C. onychonema*.

In **paper III**, we found pseudocryptic diversity in four traditional desmid taxa what resulted in the description of four species new to science (*Cl. pseudocostatum*, *Cosmarium discrepans*, *C. hostensiense*, *Act. riethii*). In addition, our results confirmed the status of *Cosmarium cataractarum* and *C. cinctutum* as independent species (in case of the former species suggested already by Eichler 1895) and stressed the need for the raise of *C. subbroomei* var. *taylorii* to the rank of a separate species.

In **paper IV**, we evaluated the patterns of the phylogenetic and morphological differentiation in two of the taxonomically most problematic (Prescott et al. 1982) traditional species *Xanthidium antilopaeum* and *X. cristatum*. The molecular data based on *trnG<sup>ucc</sup>* and ITS rDNA sequences illustrated the monophyly of both the complexes, with a single exception of *X. antilopaeum* var. *basiornatum*, which probably represents a separate species, as suggested already by Förster (1983). Within *X. cristatum* complex, the traditional varieties *X. cristatum* var. *cristatum*, *X. cristatum* var. *uncinatum*, and *X. cristatum* var. *scrobiculatum* turned out to be separate species. Our data on *X. antilopaeum* illustrated extensive phylogenetic as well as phenotypic variability within this species complex. Although they did not result in any unambiguous pattern that would allow sound taxonomic classification, it is obvious that the real species diversity within this complex, as estimated by classical morphological taxonomy, has been largely underestimated and may actually be one or even two orders of magnitude higher, as proposed already by Coesel (2005). Interestingly, the phylogenetic tree based on the *trnG<sup>ucc</sup>* data set also indicated several examples of possible geographical restriction among *Xanthidium* phylogenetic taxa.

**Paper V** focused on baculiform desmids, i.e. those with a rod-like morphology. Our phylogenetical data illustrated that this morphotype has evolved independently at least four times within Desmidiaceae. However, the most interesting result of this paper with respect to the subject of this thesis was the ascertained polyphyly of the traditional, very common taxa *Pleurotaenium ehrenbergii* and *P. trabecula*. There was clearly higher diversity within these taxa indicated by the *trnG<sup>ucc</sup>* based phylogenetic tree than it was apparent on the basis of morphological data. This confirmed the generally poor morphological concept of some species of this genus, based on relatively few and often rather vague discriminating features (R fli ka 1977, Coesel & Meesters 2007). Moreover, our results confirmed the monophyly of *Pleurotaenium*, including the morphologically peculiar taxa *P. nodosum* and *P. ovatum*, and illustrated the phylogenetical position of the rare genus *Triplastrum*, which proved to be completely unrelated to other baculiform taxa.

In **paper VI**, we proved the homogeneity of 14 strains of the well-known desmid species *Micrasterias rotata* across Europe, based on *trnG<sup>ucc</sup>* phylogeny. On the other hand, 16 strains of the other species studied, *M. fimbriata*, turned out to be composed of two clearly delimited lineages, differing by molecular as well as by morphometric and morphological data. This detected pseudocryptic diversity within *M. fimbriata* was all the more surprising in

the light of the fact, that it belongs to the most conspicuous desmids at all and possesses quite a lot of morphological markers (R fli ka 1981, Coesel & Meesters 2007). Despite this, its traditional species concept has not been questioned by any desmid expert so far.

In **paper VII**, we investigated the morphological and molecular differentiation of the broadly perceived traditional species *Micrasterias truncata* which includes several infraspecific taxa with an unclear taxonomical value (R fli ka 1981). In addition, we also studied strains of the morphologically similar species *M. decemdentata* and *M. zeylanica*. Molecular phylogenetic analysis based on *trnG*<sup>ucc</sup> intron sequences revealed five well supported clades. Two Australian isolates of *M. truncata* var. *pusilla* turned to be closely related to *M. zeylanica* and probably represent a separate species with a presumably tropical distribution. Similarly, two European strains of *M. truncata* var. *semiradiata* were phylogenetically as well as morphologically separated from all other strains. Thus, we proposed that this taxon should again be considered a separate species *M. semiradiata*, as it was originally described by Kützing (1849). All the other strains formed a firmly supported group of the core *M. truncata* which was subdivided into three clades. However, we were not able to find any morphological or biogeographical pattern that could be used for the taxonomic delimitation of these lineages. This may be caused by their relatively recent origin and they possibly represent a sympatric, truly cryptic species.

In **paper VIII**, we examined another representatives of the genus *Micrasterias*, *M. crux-melitensis* and *M. radians*. The traditional species boundaries in these morphologically closely similar taxa are rather indistinct. Consequently, in some studies, *M. radians* has been considered variety of *M. crux-melitensis* (Coesel & Dingley 2005) or both taxa have even been regarded as one morphologically variable species (Vyverman & Viane 1995). However, our molecular data clearly rejected the hypothesis of possible conspecificity of these taxa as they revealed three distinct phylogenetical lineages. One of them comprised the European and North American strains that were morphologically identified as *M. crux-melitensis*. Within these lineage, the traditional varieties *M. crux-melitensis* var. *janeira* and *M. crux-melitensis* var. *superflua* turned out to have no taxonomical value, as proposed already by R fli ka (1981). The strains of *M. radians* formed two separate phylogenetic lineages corresponding to traditional varieties *M. radians* var. *evoluta* and *M. radians* var. *bogoriensis*. The morphotypes corresponding to the former variety have, so far, only been reported from Africa, on the other hand, the single strain of *M. radians* var. *bogoriensis* originated from Southeast Asia. This apparent pattern of biogeographical restriction among our three

phylogenetical lineages indicated that geographic isolation may play an important role in species differentiation of relatively large freshwater protists, such as *Micrasterias*.

*Investigation of distribution patterns of the recognized pseudocryptic taxa using the combination of field and literature data*

In **paper VI**, we used a unique approach that allowed to include many published records into the analysis of the distribution patterns of the two recognized pseudocryptic taxa in traditional *M. fimbriata*. The published drawings and microphotographs of this species were included in a classification discrimination analysis and placed into the newly identified lineages upon comparison to the morphometric data collected from living material. This revealed largely disparate geographic patterns within traditional *M. fimbriata*, being within Europe most interestingly strikingly similar to phytogeographic pattern of vascular plants taxa (e.g. Cox & Moore 2005). One phylogenetic species is frequent in central and eastern Europe, but occurs also in the British Isles. The second species has been recorded in North America and in Western Europe, where its distribution is possibly limited to the west of the Rhine River. Interestingly, the morphometric analyses of the published records illustrated that the geographic differences have remained largely unchanged since the 1850s indicating a previously unknown distributional stability among microalgal species groups such as the desmids.

## 12. CONCLUSIONS

I focused in this thesis predominantly on a previously completely neglected issue, the application of polyphasic approaches, based on combination of various methods, in the species-level taxonomy of desmids. Though, as demonstrated in Papers II and III, also the traditional morphology, if performed carefully and critically and supported for instance by ecological data, may still provide valuable taxonomical data. Generally, however, for resolving the taxonomy of closely related species, approaches involving molecular phylogenetic analyses seem to be essential.

The results of the core part of thesis (papers IV-VIII), where polyphasic approaches were used to reveal the hidden diversity within several model desmid species complexes, can be summarized as follows:

The use of polyphasic approach mostly revealed a considerable rate of hidden diversity. Among the target taxa, given that numerous strains were studied, only *Micrasterias rotata* and

*M. crux-melitensis* turned out to be phylogenetically homogenous. On the other hand, the number of traditional morphospecies that were found to be composed of several phylogenetic species was much higher. Within *X. antilopaeum* species complex, the real species diversity appears to be even one or two orders of magnitude higher than that estimated by classical morphological taxonomy. Moreover, the number of traditional infraspecific taxa that turned out to have no taxonomical value was relatively low.

Therefore, it can be assumed that the real species diversity of Desmiales which has sometimes been (e.g. Coesel & Krienitz 2008) considered rather lower than the recently accepted estimates (ca 3 000 spp.) due to the high number of current synonyms, will actually be considerably higher. Since the potential rate of hidden diversity within morphospecies with simple morphology and less discriminative characters would likely be even higher than that of morphologically complex taxa that we mostly studied so far, I believe that a future wide employment of molecular methods in the species-level taxonomy of Desmiales would probably lead to revealing several times higher diversity than those about 3 000 recently accepted *ögoodö* species.

The individual species-level phylogenetic lineages were mostly found to be morphologically identifiable, both by careful microscopic analysis, as well as by quantitative geometric morphometric methods. This indicates that a true cryptic diversity is probably a relatively rare phenomenon in desmids.

The results of the thesis also indicate that the species differentiation and actual species diversity of desmids may for a much greater part than generally supposed be related to the patterns of their geographic distribution or to the climatic factors.

Herewith, they contradict the *öbiquity modelö* as the possible distribution model of desmids, in favour of *Foissner's ömoderate endemicity modelö*. However, it is questionable whether there are any cosmopolitan species at all among desmids. Many supposedly cosmopolitan taxa are reported from various parts of the world to occur in ecologically profoundly different habitats. But, in the light of our data and considering the generally very narrow ecological amplitude of desmids, it appears possible that these putative *öecologically tolerantö* taxa may in fact be a complex of several species with restricted distribution and specific ecological demands.

As for the issue of the practical use of desmids in biomonitoring and ecological studies based on species composition data; it is obvious that the methods of their use in such a way will need to be revised and should be based on the newly encountered phylogenetic taxa. On the other hand, these attempts still seem to be much more promising than in the most other

groups of microscopic algae. Firstly due to the supposedly low rate of true cryptic diversity in desmids and secondly since their traditional species concepts are, in spite of frequent inner differentiation, still much more robust than in the absolute majority of other microalgal groups, because of the predominant monophyly of the particular species. Last but not least, the results of this thesis provided data about the phylogenetic and taxonomic identity of several very rare and morphologically peculiar taxa (e.g. *Triplastrum simplex*, *Pleurotaenium nodosum* or *Staurastrum tumidum*).

To sum up: Obviously, the way we recently see the diversity and distribution of desmids should be thoroughly changed. The real phylogenetic species diversity is mostly finer, often corresponds to varieties of the traditional morphologically defined species and is usually well determinable using combination of molecular and morphological data. The biogeographical areas of these phylogenetic species are probably usually much narrower and the proportion of regionally restricted or even endemic species consequently much higher than generally supposed. This makes desmids, that are already well known for their vulnerability to all kinds of pollution and disturbance, even more susceptible to losses in biodiversity and further stresses the need for conservational strategies of their habitats. Polyphasic approach, based on combination of several methods, yields a new level of interpretations that could not be reached by the use of any of these methods alone. Nevertheless, it is obvious that the investigation of hidden species diversity in desmids is still at the beginning.

### 13. POUĚITÁ LITERATURA / REFERENCES

- Archer, W. (1860): Description of two new species of *Staurastrum*. *Quart. J. Microsc. Sci.* 8:75679.
- Behnke, A., Friedl, T., Chepurnov, V.A. & Mann, D.G. (2004): Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *J. Phycol.* 40:1936208.
- Bicudo, C.E.M. & Sormus, L. (1972): Polymorphism in the desmid *Micrasterias laticeps* and its taxonomical implications. *J. Phycol.* 8:237-242
- Blackburn, S.I. & Tyler, P.A. (1987): On the nature of eclectic species ó a tiered approach to genetic compatibility in the desmid *Micrasterias thomasiana*. *Br. Phycol. J.* 22:277-298.
- Brook, A.J. (1981): *The biology of desmids*. Blackwell, Oxford, 287 pp.
- Coesel, P.F.M. (1974): Notes on sexual reproduction in desmids I. Zygospore formation in nature (with special reference to some unusual records of zygotes). *Acta Bot. Neerl.* 23:361-368
- Coesel, P.F.M. (1996): Biogeography of desmids. *Hydrobiologia* 336:41-53
- Coesel, P.F.M. (2001): A method for quantifying conservation value in lentic freshwater habitats using desmids as indicator organisms. *Biodiv. Conserv.* 10:177-187.
- Coesel, P.F.M. (2005): Desmids in the Netherlands. Desmid of the month, October 2005. *Xanthidium antilopaeum*. Available at

- [http://www.desmids.nl/maand/english/0510\\_octeng.html](http://www.desmids.nl/maand/english/0510_octeng.html).
- Coesel, P.F.M. & Dingley, M. (2005): Taxonomic and biogeographical notes on North Australian desmids. *Syst. Geogr. Pl.* 75:35-50
- Coesel, P.F.M. & Meesters, J. (2007): *Desmids of the Lowlands. Mesotaeniaceae and Desmidiaceae of the European Lowlands*. KNNV Publishing, Zeist, The Netherlands, 351 pp.
- Coesel, P.F.M & Krienitz, L. (2008): Diversity and geographic distribution of desmids and other coccoid green algae. *Biodivers. Conserv.* 17:381-392
- Cotterill, F.P.D., Al-Rasheid, K. & Foissner, W. (2008): Conservation of protists: is it needed et all?. *Biodivers. Conserv.* 17:427-443
- Cox, C. B. & Moore, P.D. (2005): *Biogeography. An Ecological And Evolutionary Approach*. John Willey & Sons, NewYork.
- Cranwell, P.A.G., Jaworski, H. & Bickley, H.M. (1990): Hydrocarbons, sterols, esters and fatty acids in six freshwater chlorophytes. *Phytochemistry* 29:145-151.
- De Wildeman, E. (1894): Observations critiques sur quelques espèces de la famille des Desmidées. *Anns. Soc. Belg. Microsc.* 18:57-132
- Denboh, T., Hendrayanti, D. & Ichimura, T. (2001): Monophyly of the genus *Closterium* and the order Desmidiales (Charophyceae, Chlorophyta) inferred from nuclear small subunit rDNA data. *J. Phycol.* 37:1063-1072
- Denboh, T., Ichimura, T., Hendrayanti, D. & Coleman, A.D. (2003): *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Charophyceae, Chlorophyta) species complex viewed from the 1506 group I intron and ITS2 of nuclear rDNA. *J. Phycol.* 39:960-977.
- Donat, A. (1926): *Zur Kenntnis der Desmidiaceen des norddeutschen Flachlandes; eine soziologisch-geographische Studie*. Pflanzenforschung 5. G. Fischer, Jena, 51 pp.
- Eichler, B. (1895): Materya do flory wodorostów okolic Miedzyrzecza. *Pamiętnik Fizyograficzny* 14:53-63.
- Fawley, M.W., Dean, M.L., Dimmer, S.K. & Fawley, K.P. (2006): Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 42:142-154
- Fenchel, T. (2005): Cosmopolitan microbes and their cryptic species. *Aquat. Microb. Ecol.* 41: 496-54.
- Fenchel, T. & Finlay, B.J. (2004): The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *BioScience* 54:777-784.
- Finlay, B.J. (2002): Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061.
- Finlay, B.J., Esteban, G.F. & Fenchel, T. (2004): Protist diversity is different? *Protist* 155:15-22.
- Foissner, W. (2004): Ubiquity and cosmopolitan of protists questioned. *SIL News* 43:6-7.
- Foissner, W. (2006): Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozool.* 45:111-136.
- Förster, K. (1983): Revision und Validierung von Desmidiaceen-Namen aus früheren Publikationen. 3. *Algol. Studies* 33:375-687.
- Fott, B. (1967): *Sinice a asy* (2<sup>nd</sup> ed.). Academia, Praha, 517 pp.
- Fuřková, K., Rada, J.C., Lukešová, A. & Lewis, L.A. (2011): Cryptic diversity within the genus *Pseudomuriella* Hanagata (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales) assessed using four Barcode markers. *Nova Hedwigia* 93:29-46
- Futuyma, D.J. (1998): *Evolutionary biology* (3<sup>rd</sup> ed.). Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts, 751 pp.
- Gauthier-Lièvre, L. (1931): *Recherches sur la flore des eaux continentales de l'Algérie et de la Tunisie*. Alger, 299 p.



- Gerrath, J.F. (1979): Polymorphism in the desmid *Cosmarium taxichondrum* Lundell. *Eur. J. Phycol.* 14:211-217
- Gerrath, J.F. (1983): Polymorphism in the desmid *Staurastrum pentacerum* (Wolle) G.M.Smith. *Eur. J. Phycol.* 18:141-150
- Gerrath, J.F. (1993): The biology of desmids: a decade of progress. *Progress in Phycol. Res.* 9:79-192.
- Gontcharov, A.A. (2008): Phylogeny and classification of Zygnematophyceae (Streptophyta): current state of affairs. *Fottea* 8:87-104.
- Gontcharov, A.A., Marin, B. & Melkonian, M. (2003): Molecular phylogeny of conjugating green algae (Zygnemophyceae, Streptophyta) inferred from SSU rDNA sequence comparisons. *J. Mol. Evol.* 56:896-104.
- Gontcharov, A.A. & Melkonian, M. (2004): Unusual position of the genus *Spirotaenia* (Zygnematophyceae) among streptophytes revealed by SSU rDNA and *rbcL* sequence comparisons. *Phycologia* 43: 105-113
- Gontcharov, A.A. & Melkonian, M. (2005): Molecular phylogeny of *Staurastrum* Meyen ex Ralfs and related genera (Zygnematophyceae, Streptophyta) based on coding and noncoding rDNA sequence comparisons. *J. Phycol.* 41:887-899.
- Gontcharov, A.A. & Melkonian, M. (2008): In search of monophyletic taxa in the family Desmidiaceae (Zygnematophyceae, Viridiplantae): the genus *Cosmarium*. *Am. J. Bot.* 95:1079-1095.
- Gontcharov, A. A. & Melkonian, M. (2010): Molecular phylogeny and revision of the genus *Netrium* (Zygnematophyceae, Streptophyta): *Nucleotaenium* gen. nov. *J. Phycol.* 46:346-362.
- Gontcharov, A.A. & Melkonian, M. (2011): A study of conflict between molecular phylogeny and taxonomy in the Desmidiaceae (Streptophyta, Viridiplantae): Analyses of 291 *rbcL* sequences. *Protist* 162:253-267.
- Hall, J.D., Karol, K.G., McCourt, R.M. & Delwiche, C.F. (2008): Phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data. *J. Phycol.* 44:467-477.
- Hall, J.D., Fu íková, K., Lo, C., Lewis, L.A. & Karol, K.G. (2010): An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogam. Algal.* 31:529-555.
- Hausmann, K., Selchow, P., Scheckenbach F., Weitere, M. & Arndt, H. (2006): Cryptic species in a morphospecies complex of heterotrophic Flagellates: the case study of *Caecitellus* spp. *Acta Protozool.* 45:415-431
- Heimans, J. (1969): Ecological, phytogeographical and taxonomic problems with desmids. *Vegetatio* 17:50-82
- Hoshaw, R.W., McCourt, R.M. & Wang, J.C. (1990): Phylum Conjugatophyta. ó In: Margulis, L., Carliss, J. O. & Melkonian, M. [Eds.]: *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett, Boston, USA, pp. 119-131.
- Huss, V.A.R., Frank, C., Hartmann, E.C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B.M., Wenzler, P. & Kessler, E. (1999): Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *J. Phycol.* 35:587-598.
- Ichimura, T. (1981): Mating types and reproductive isolation in *Closterium ehrenbergii* Meneghini. *Bot. Mag. Tokyo* 94:325-334.
- Ichimura, T. & Kasai, F. (1989): Genome differentiation in speciation of desmids (Chlorophyta). *Jpn. J. Phycol. (Sorui)* 37:305-319.
- Kapraun, D.F. (2007): Nuclear DNA Content Estimates in Green Algal Lineages: Chlorophyta and Streptophyta. *Ann. Bot.* 99:677-701.
- Kouwets, F.A.C. (2008): The species concepts in desmids: the problem of variability, infraspecific taxa and the monothetic species definition. *Biologia* 63:877-883.

- Kraft, L.G.K., Kraft, G.T. & Waller, R.F. (2010): Investigations into southern Australian *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) taxonomy and molecular phylogeny indicate both cosmopolitanism and endemic cryptic species. *J. Phycol.* 46:1257-1277
- Krasznai, E., Feher, G., Borics, G., Varbiro, G., Grigorszky, I. & Tothmeresz, B. (2008): Use of desmids to assess the natural conservation value of a Hungarian oxbow (Malom-Tisza, NE-Hungary. *Biologia* 63:928-935.
- Krieger, W. (1933): Die Desmidiaceen der Deutschen limnologischen Sunda-Expedition. *Arch. Hydrobiol.*, Suppl. 11:129-230.
- Krieger, W. (1937): *Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der aussereuropäischen Arten*. Rabenhorst's Kryptogamenflora 13:1, Akad. Verlagsges. Leipzig, 712 pp.
- Kucera, H. & Saunders, G.W. (2012): A survey of Bangiales (Rhodophyta) based on multiple molecular markers reveals cryptic diversity. *J. Phycol.* 48:869-882
- Kützing, F. T. (1849): *Species Algarum*. F. A. Brockhaus, Leipzig, 922 pp..
- Kynlová, A., Tkaloud, P. & Tkaloudová, M. (2010): Unveiling hidden diversity in the *Synura petersenii* species complex (Synurophyceae, Heterokontophyta). *Nova Hedwigia, Beiheft* 136:283-298.
- Mann, D.G. (1999): The species concept in diatoms. *Phycologia* 38:437-495
- Mayr, E. (1948): The bearing of the New Systematics on genetical problems; the nature of species. *Advances in Genetics* 2:205-237.
- McCourt, R.M., Karol, K.G., Bell, J., Helm-Bychowski K.M., Grajewska, A., Wojciechowski, M.F. & Hoshaw, R.W. (2000): Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnemophyceae) based on rbcL sequences. *J. Phycol.* 36:747-758.
- Mix, M. (1973): Die Feinstruktur der Zellwände der Conjugaten und ihre systematische Bedeutung. *Beih. Nova Hedwigia* 42:179-194.
- Moniz, M.B.J., Rindi, F., Novis, P.M., Broady, P.A. & Guiry, M.D. (2012): Molecular phylogeny of Antarctic *Prasiola* (Prasiolales, Trebouxiophyceae) reveals extensive cryptic diversity. *J. Phycol.* 48:940-955
- Nelsen, M.P.; Gargas, A. (2006): Actin type intron sequences increase phylogenetic resolution: An example from *Asterochloris* (Chlorophyta: Trebouxiophyceae). *Lichenologist* 38:435-440.
- Nemjová, K., Neustupa, J., Mastný, J., Tkaloud, P. & Veselá, J. (2011): Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*. *Phycol. Res.* 59(3):208-220.
- Neustupa, J., Mastný, J. & Hoda, L. (2008): Temperature-related phenotypic plasticity in the green alga *Micrasterias rotata*. *Aquatic Microbial Ecology* 51:77-86
- Neustupa, J., Černá, K. & Mastný, J. (2009): Diversity and morphological disparity of desmid assemblages in Central European peatlands. *Hydrobiologia* 630:243-256.
- Neustupa, J., Černá, K. & Mastný, J. (2011): The effect of aperiodic desiccation on the diversity of benthic desmid assemblages in a lowland peat bog. *Biodiv. Conserv.* 20:1695-1711.
- Neustupa, J., Černá, K. & Mastný, J. (2012). Spatio-temporal community structure of peat bog benthic desmids on a microscale. *Aquatic Ecology* 46:229-239
- Nixon, K.C. & Wheeler, Q.D. (1990): An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6:211-223.
- Pals, A., Elst, D., Muylaert, K & Van Assche, J. (2006): Substrate specificity of periphytic desmids in shallow softwater lakes in Belgium. *Hydrobiologia* 568:159-168.
- Pouliková, A., Veselá, J., Neustupa, J. & Tkaloud, P. (2010): Pseudocryptic diversity versus cosmopolitanism in diatoms: a case study on *Navicula cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and morphologically similar taxa. *Protist* 161:353-369.

- Prescott, G.W., Croasdale, H.T., Vinyard, W.C. & Bicudo, C.E.M. (1981): *A Synopsis of North American Desmids. Part II. Desmidiaceae: Placodermae. Section 3.* University of Nebraska Press, Lincoln, 720 pp.
- Prescott, G.W., Bicudo, C.E.M. & Vinyard, W.C. (1982): *A Synopsis of North American Desmids. Part II. Desmidiaceae: Placodermae. Section 4.* University of Nebraska Press, Lincoln, 700 pp.
- Pröschold, T. & Leliaert, F. (2007): Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In: Brodie J., Lewis J.M. (Eds.): *Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics.* CRC Press, Taylor & Francis group, Boca Raton, pp. 123-153.
- Růžička, J. (1971): Morphologische Variabilität der Algen, hervorgerufen durch Kultivierungsbedingungen. *Arch. Hydrobiol. / Algal. Stud.*, Suppl. Vol. 4:146-177
- Růžička, J. (1977): *Die Desmidiaceen Mitteleuropas, Band 1, 1. Lieferung.* Schweizerbart, Stuttgart, 292 pp.
- Růžička, J. (1981): *Die Desmidiaceen Mitteleuropas, Band 1, 2. Lieferung.* Schweizerbart, Stuttgart, 444 pp.
- Slapeta, J., López-García, P. & Moreira, D. (2006): Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 23:23629
- Škaloud, P. (2008): *Polyphasic approaches in the taxonomy of green aerophytic algae.* Ph.D. Thesis, Charles University in Prague, Faculty of Science, Prague, 113 pp.
- Škaloud, P. & Peksa, O. (2010): Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Mol. Phyl. Evol.* 54:36-46.
- Škaloud, P., Nemjová, K., Veselá, J., Černá, K. & Neustupa, J. (2011): A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): Evidence for the accelerated rate of molecular evolution in protists. *Mol. Phylog. Evol.* 61:933-943.
- Škaloud, P., Kynčlová, A., Benada, O., Kofroňová, O. & Škaloudová, M. (2012): Toward a revision of the genus *Synura*, section Petersenianae (Synurophyceae, Heterokontophyta): morphological characterization of six pseudo-cryptic species. *Phycologia* 51:303-329.
- Štátný, J. (2009): The desmids of the Swamp Nature Reserve (North Bohemia, Czech Republic) and a small neighbouring bog: species composition and ecological condition of both sites. *Fottea* 9:135-148.
- Vyverman, W. & Viane, R. (1995): Morphological variation along an altitudinal gradient in the *Micrasterias crux-melitensis*-*M. radians* complex (Zygnemaphyceae, Desmiales) from Papua New Guinea. *Nova Hedwigia* 60:187-197.
- Weisse, T. (2008): Distribution and diversity of aquatic protists: an evolutionary and ecological perspective. *Biodiv. Conserv.* 17:2436-259.
- West, G.S. (1909): The algae of the Yan Yean Reservoir, Victoria: a biological and ecological study. *J. Linn. Soc. Bot.* 39:1-88
- Wheeler, Q.D. & Platnick, N.I. (2000): The phylogenetic species concept (*sensu* Wheeler and Platnick). In: Wheeler, Q.D. & Meier, R. [Eds.] *Species Concepts and Phylogenetic Theory.* Columbia University Press, pp. 55-69.

## 14. CURRICULUM VITAE

Jan Mastný (1979)

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky, Benátská 2, Praha 2, 128 01

e-mail: stastny.jan@centrum.cz

Vzdělání a praxe:

- od října 2005 o pozice vdeckého pracovníka, Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.
- od února 2009 - pozice vdeckého pracovníka, Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka, v.v.i.
- 1999 - 2005 - magisterské studium biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze; Téma diplomové práce: Diverzita a ekologie krásivek ve vybraných oblastech České republiky.
- od 2005 - doktorské studium botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Zahraní stáfle:

- 30. září - 8. listopadu 2007: Laborato Dr. Franse Kouwetse, RWS Centre for Water Management, Lelystad, Nizozemí.

Jan Mastný (1979)

Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of Botany, Benátská 2, Prague 2, CZ-128 01

e-mail: stastny.jan@centrum.cz

Study and practice:

- since October 2005 o position of a research worker at the Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague
- since February 2009 - position of a research worker at the T.G.Masaryk Water Research Institute, p.r.i.

- 1999 - 2005 - M.Sc. study of Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague; Title of the M.Sc. thesis: Diversity and ecology of desmids in selected areas of the Czech Republic.
- since 2005 ó PhD. study in Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague

#### Study abroad:

- 30<sup>th</sup> September ó 8<sup>th</sup> November 2007: Laboratory of Dr. Frans Kouwets, RWS Centre for Water Management, Lelystad, The Netherlands

#### Seznam publikací / Selected publications

- Neustupa, J., Veselá, J. & <sup>TM</sup>astný J. (2013): Differential cell size structure of desmids and diatoms in the phytobenthos of peatlands. *Hydrobiologia* 709: 159-171
- <sup>TM</sup>astný, J., <sup>TK</sup>aloud, P., Langenbach, D., Nemjová, K. & Neustupa, J. (2013): Polyphasic Evaluation of *Xanthidium antilopaeum* and *Xanthidium cristatum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) species complex. *Journal of Phycology* 49: 401-416
- <sup>TM</sup>astný, J. & Kouwets, F.A.C. (2012): New and remarkable desmids (Zygnematophyceae, Streptophyta) from Europe: taxonomical notes based on LM and SEM observations. *Fottea* 12: 293-313
- Neustupa, J., erná, K. & <sup>TM</sup>astný, J. (2012): Spatio-temporal community structure of peat bog benthic desmids on a microscale. *Aquatic Ecology* 46:229-239
- <sup>TK</sup>aloud, P., <sup>TM</sup>astný, J., Nemjová, K., Mazalová, P. & Neustupa, J. (2012): Molecular phylogeny of baculiform desmid taxa. *Plant Systematics and Evolution* 298: 1281-1292
- Neustupa J, <sup>TM</sup>astný J., Nemjová K., Mazalová P., Goodyer E., Poulíková A. & <sup>TK</sup>aloud P. (2011): A novel, combined approach to assessing species delimitation and biogeography within the well-known desmid species *Micrasterias fimbriata* and *M. rotata* (Desmidiales, Streptophyta). *Hydrobiologia* 667(1): 223-239
- Neustupa, J., erná, K. & <sup>TM</sup>astný, J. (2011): The effect of aperiodic desiccation on the diversity of benthic desmid assemblages in a lowland peat bog. *Biodiversity and Conservation* 20: 1695-1711
- Nemjová, K., Neustupa, J., <sup>TM</sup>astný, J., <sup>TK</sup>aloud, P. & Veselá, J. (2011): Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*. *Phycological Research* 59(3): 208-220

- TMastný, J. (2010): Desmids (Conjugatophyceae, Viridiplantae) from the Czech Republic; new and rare taxa, distribution, ecology. *Fottea* 10(1): 1-74
- Neustupa, J., TMkaloud, P. & TMastný, J. (2010): The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis* / *M. radians* species complex. *Journal of Phycology* 46: 703-714
- TMastný, J. (2009): The desmids of the Swamp Nature Reserve (North Bohemia, Czech Republic) and a small neighbouring bog; species composition and ecological condition of both sites. *Fottea* 9(1): 135-148
- Neustupa, J., erná, K. & TMastný, J. (2009): Diversity and morphological disparity of desmids assemblages in Central European peatlands. *ó Hydrobiologia* 630: 243-256
- TMastný, J. (2008): Desmids from ephemeral pools and aerophytic habitats from the Czech Republic. *Biologia* 63: 884-890
- TMastný, J. & Lenzenweger, R. (2008): Ein Nachtrag zur Zieralgenflora (Desmidiales, Zygnematophyceae) der Schwemm bei Walchsee in Nordtirol (Österreich). *Phyton (Horn, Austria)* 48: 37-49
- TMastný, J. & Neustupa, J. (2008): *Cosmarium gauthierae* sp. nov. (Conjugatophyceae, Desmidiales) from an ephemeral pool in South-West Macedonia. *Cryptogamie Algologie* 29: 255-260
- Neustupa, J., TMastný, J. & Hoda , L. (2008): Temperature-related phynotypic plasticity in the green alga *Micrasterias rotata*. *Aquatic Microbial Ecology* 51: 77-86
- Neustupa, J. & TMastný, J. (2006): The geometric morphometric study of Central European species of the genus *Micrasterias* (Zygnematophyceae, Viridiplantae). *Preslia* 78: 253-263