

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



**Stresová odolnost polárních hydro-terestrických
řas *Zygnema* spp. (Zygnematophyceae,
Streptophyta)**

**Stress resistance of polar hydro-terrestrial algae
Zygnema spp. (Zygnematophyceae, Streptophyta)**

Mgr. Martina Pichrtová

Školitel/Supervisor: Doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.
Školitel-konzultant/Supervisor-consultant: Doc. Ing. Josef Elster, CSc.

Praha, 2014

Abstrakt

Vláknité zelené řasy rodu *Zygnema* patří mezi nejhojnější primární producenty v polárním hydro-terestrickém prostředí. V těchto nestabilních habitatech jsou organismy vystaveny celé řadě stresových faktorů, jako například cyklickému zamrzání a tání, vysychání nebo nadměrné ozáření. Přesto existuje jen málo studií, které se zabývají výzkumem mechanismů stresové odolnosti, které těmto řasám umožňují přežít v extrémním prostředí. Předkládaná práce proto studuje polární zástupce rodu *Zygnema* v různých stresových podmínkách, a to s využitím jak přírodních vzorků, tak kultur. Kromě toho zde byly použity metody molekulární fylogenetiky, které přinášejí vůbec první poznatky o diverzitě těchto řas v polárních oblastech. Sekvenování chloroplastového genu *rbcL* odhalilo několik rozrůzněných linií v rámci rodu *Zygnema* a přineslo i překvapivý nález jednoho druhu *Zygnemopsis* sp., jehož morfologie je ve vegetativním stavu neodlišitelná od řas rodu *Zygnema*. První sada experimentů studovala vliv UV záření na vybrané polární kmeny rodu *Zygnema*. Ukázalo se, že zkoumané řasy produkují fenolické látky, které mají schopnost pohlcovat UV záření. Tyto látky jsou pravěpodobně uloženy ve vakuolách a dalších váčcích při okraji buňky, čímž chrání ostatní organely. Další studie se zabývala přírodními populacemi řas *Zygnema* spp. v Arktidě. Ke konci léta řasy postupně mění svoji morfologii od typických vakuolizovaných vegetativních buněk k tzv. pre-akinetám, které jsou charakteristické silnější buněčnou stěnou, nahromaděním zásobních látek a redukovanou strukturou chloroplastu. Všechny zkoumané populace byly tvořeny pre-akinetami, nezávisle na stupni vyschnutí lokality, významně se však lišily svojí odolností k osmotickému stresu. Tyto výsledky naznačily, že pomalé vysychání není faktorem, který spouští tvorbu pre-akinet, ale zato je důležité pro získání stresové odolnosti. Následné laboratorní experimenty ukázaly, že tvorba pre-akinet je indukována nedostatkem dusíku. Proporce přeživších buněk a rychlost obnovy fyziologického stavu po experimentálním vysušení obecně závisela na podmínkách předchozí kultivace a na rychlosti sušení. Navíc, pre-akinet, které prošly postupným, pomalým vysycháním, byly schopné přežít velmi rychlé vysušení (při 10% relativní vzdušné vlhkosti). Tato práce přináší nové poznatky o mechanismech stresové odolnosti u řas v polárním hydro-terestrickém prostředí. Získané výsledky naznačují, že „otužené“ pre-akinet, hrají klíčovou roli v přežití extrémních podmínek, kde je tvorba jiného typu specializovaných buněk (např. zygospor) velmi vzácná. Kromě toho, buňky odolné k vyschnutí hrají po rozpadu vláken důležitou roli pro šíření vzduchem.

Abstract

Filamentous green microalgae of the genus *Zygnema* belong to the most common primary producers in the polar hydro-terrestrial environment. In such unstable habitats, organisms are subject to various stress factors, e.g., freeze–thaw cycles, desiccation and high irradiation levels. However, the stress resistance mechanisms that enable *Zygnema* spp. to thrive in this extreme environment are only partially understood. Therefore, polar *Zygnema* spp. were examined under various stress conditions using both field samples and cultures. Moreover, molecular phylogeny methods were applied that provided first insights into the diversity of polar *Zygnema*. Sequencing of the chloroplast gene *rbcL* revealed several different *Zygnema* genotypes and, surprisingly, one *Zygnemopsis* sp. with vegetative *Zygnema* sp. morphology. First set of experiments examined the effects of UV exposure. It turned out that polar strains of *Zygnema* produce phenolic substances as UV screens. These substances are most likely stored in vacuoles and other vesicles at the cell periphery, providing protection for other organelles. In the next study, *Zygnema* spp. were investigated under natural conditions in the Arctic. At the end of summer, the cells gradually lose their typical vegetative appearance (with large vacuoles and stellate chloroplasts) and form pre-akinetes, which are stationary-phase-like cells filled with storage material and characterized by reduced chloroplast lobes and thickened cell walls. While all natural populations consisted of pre-akinetes regardless of their water status, significant differences were revealed in their osmotic stress tolerance. These results indicated that formation of pre-akinetes was not triggered by desiccation, but hardening during slow dehydration was required for the pre-akinetes to become stress-resistant. Subsequent laboratory experiments showed that the formation of pre-akinetes was induced by nitrogen starvation. In general, viability and recovery rate after experimental desiccation depended on pre-cultivation conditions and drying rate. Moreover, the pre-akinetes survived even rapid drying (at 10% relative air humidity) when hardened by mild dehydration stress. Presented thesis contributes to our understanding of algal stress resistance mechanisms in polar hydro-terrestrial environment. The results indicate that naturally hardened pre-akinetes play a key role in survival under extreme conditions, while the production of other types of specialized cells (e.g., zygospores) is largely suppressed. Moreover, desiccation-tolerant cells derived from disintegrated filaments can act as airborne propagules.

Obsah / Contents

1	Úvod.....	1
1.1	Stresové faktory v polárních oblastech.....	1
1.2	Polární řasy.....	1
1.3	<i>Zygnema</i>	2
2	Cíle práce.....	3
3	Původní články.....	4
3.1	Článek I.....	4
3.2	Článek II.....	5
3.3	Článek III.....	6
4	Shrnutí a závěry.....	7
5	Introduction.....	8
5.1	Stress factors in polar regions.....	8
5.2	Polar microalgae.....	8
5.3	<i>Zygnema</i>	9
6	Research objectives of the thesis.....	10
7	Original papers.....	11
7.1	Paper I.....	11
7.2	Paper II.....	12
7.3	Paper III.....	13
8	Summary and conclusions.....	14
9	Použitá literatura/References.....	15
10	Curriculum Vitae.....	18

1 Úvod

1.1 Stresové faktory v polárních oblastech

Polární oblasti jsou v posledních desetiletích poměrně intenzivně studovány, a to v rámci nejrůznějších oborů. Řada studií se například zaměřuje na speciální adaptace a strategie přežití polárních organismů. Odhalení tajemství jejich úspěchu umožňuje pochopit obecné mechanismy stresové odolnosti, což jsou poznatky, které mohou být následně využity i v dalších oblastech, např. v kryobiologii (Kang et al. 2007), astrobiologii (Vishnivetskaya et al. 2003) a nebo v pátrání po biotechnologicky využitelných látkách (Liu et al. 2013).

Polární oblasti jsou charakteristické celou řadou více či méně provázaných stresových faktorů. Jedním z nich je nízká teplota, která ovlivňuje živé organismy významným způsobem. S klesající teplotou se snižuje fluidita membrán a rovněž se zpomaluje rychlost metabolických reakcí včetně opravných mechanismů (Roos & Vincent, 1998).

Zamrznutí lze považovat za samostatný stresový faktor, jehož hlavním efektem je ztráta vody v tekutém skupenství. Kromě toho, nedostatek tekuté vody je v polárních oblastech zásadním stresovým faktorem i v období bez mrazu (Robinson et al. 2003; ACIA 2005). Voda je přitom zásadní pro zachování prostorové struktury bílkovin a jiných molekul a pouze plně hydratované buňky jsou fyziologicky funkční (Holzinger & Karsten 2013). Zamrznutí, přímé vysušení a také zasolení jsou tedy úzce provázány, protože vedou k osmotické dehydrataci a snížení vnitrobuněčného vodního potenciálu (Bisson & Kirst 1995).

Sluneční záření je přes svoji nezbytnost pro fotosyntézu také významným stresovým faktorem. Silná ozáření fotosynteticky aktivním zářením (PAR) může vést k fotoinhibici či dokonce k poškození fotosyntetického aparátu (Franklin & Forster 1997). Mnohem nebezpečnější jsou však účinky ultrafialového záření. UV záření je ve vysokých zeměpisných šířkách v principu nízké, protože Slunce nevystupuje příliš vysoko na obzor. Nicméně, díky narušení ozónové vrstvy lidskou činností zde dochází k výskytu ozónové díry, která má za následek zvýšenou ozáření UV-B (Wessel et al. 1998). UV záření poškozuje DNA a jiné biomolekuly, a to buď přímo a nebo nepřímo přes produkci reaktivních forem kyslíku (ROS).

Navíc, i další stresové faktory jsou v polárních oblastech významné, konkrétně např. dlouhé období nedostatku světla v zimě a nebo omezená dostupnost živin (Arnold et al. 2003).

1.2 Polární řasy

Jedním z nejzřetelnějších důsledků extrémních klimatických podmínek polárních oblastí je malá biodiverzita a pokryvnost cévnatých rostlin (Robinson et al. 2003; ACIA 2005). Řasy zde tedy představují hlavní primární producenty, tvoří a stabilizují půdu a podílejí se na primární sukcesi po odlednění (Elster 2002; Elster et al. 2002; Elster & Benson 2004). Jako základ potravních řetězců hrají polární řasy klíčovou roli také v globálních biogeochemických cyklech (Lyon & Mock 2014). V této práci se zaměřuji na polární suchozemské nelichenizované eukaryotické řasy a jejich odolnost k různým stresovým faktorům, především vysychání a UV záření.

Elster (2002) rozdělil polární suchozemské řasové habitaty do tří skupin podle dostupnosti vody: i) lakustrinní, s vodou v tekutém stavu dostupnou po celý rok, např. jezera; ii) hydro-terestrické, s tekutou vodou dostupnou pouze během léta a iii) terestrické, kde je voda k dispozici pouze nárazově.

Jelikož jsou řasy očividně schopné přežít extrémní abiotické podmínky polárního prostředí, lze u nich očekávat nějaké speciální adaptace. Mechanismy stresové odolnosti jsou však obvykle obecné a nejsou tedy specifické výhradně pro řasy z polárních oblastí.

Mnoho mikroorganismů se chrání sdružováním do velkých vrstevnatých makroskopických shluků, jako jsou nárosty nebo krusty. Tento způsob růstu je výhodný z hlediska ochrany proti několika stresům zároveň – vysychání, zamrzání i záření. Například u antarktické hydro-terestrické řasy *Prasiola* sp. nebylo ve spodní části 15 mm silného nárostu detekováno už žádné UV záření (Post & Larkum 1993).

Tvorba specializovaných odolných buněk je další široce rozšířenou strategií pro přežití nepříznivých období. Například sněžné řasy vytvářejí odolné cysty s nahromaděnými sekundárními karotenoidy (Remias 2012).

Dále, řasy mají schopnost syntetizovat různé látky, které efektivně pohlcují UV záření. Nejrozšířenější skupinou těchto látek jsou mykosporinu podobné aminokyseliny (MAAs); (Cockell & Knowland 1999). Kromě toho, některé skupiny řas na obranu proti UV záření produkují fenolické látky nebo látky podobné sporopolleninu (Xiong et al. 1997; Figueroa et al. 2009). Fenolické látky neobsahují dusík, a proto je jejich produkce výhodná v extrémních habitatech, jako je třeba povrch ledovců (Aigner et al. 2013).

Další běžné mechanismy stresové odolnosti zahrnují např. zhášení reaktivních forem kyslíku, hromadění osmoticky aktivních látek, které snižují buněčný osmotický potenciál a zvyšují tak schopnost vázat vodu v buňkách (Bisson & Kirst 1995), vyhnutí se stresu pomocí migrace a nebo mechanismy opravy poškozené DNA (Britt 1995).

1.3 *Zygnema*

Pro tuto práci jsem si jako modelové organismy vybrala spájkivé zelené řasy s vegetativní morfologií odpovídající rodu *Zygnema*. Tyto řasy patří k nejhojnějším eukaryotickým zástupcům řasových nárostů jak v Arktidě (Sheath et al. 1996; Kim et al. 2008; Holzinger et al. 2009), tak v Antarktidě (Hawes 1989, 1990; Davey 1991; Skácelová et al. 2013). Typicky vytvářejí velké množství slizovité biomasy v hydro-terestrickém prostředí, jako jsou například pomalu tekoucí potoky. V takových mělkých a nestabilních habitatech jsou řasy vystaveny četným stresům, především silnému záření včetně UV záření, zamrzání a vysychání.

Zygnema (Zygnematophyceae, Streptophyta) má dva hvězdicovité chloroplasty na buňku. Pohlavně se rozmnožuje spájením, které vede k vytvoření odolné zygospory. Morfologie zralých zygospor a tvar sporangií jsou klíčovými znaky pro určování druhů. Nicméně, na Svalbardu ani v Antarktidě zatím nebyl proces spájení pozorován, a proto u tamních populací nebyla možná druhová determinace.

Kromě zygospor byly u rodu *Zygnema* popsány další typy specializovaných buněk, konkrétně partenospory, aplanospory a akinety (Kadlubowska 1984; Pouličková et al. 2007; Stancheva et al. 2012). Akinety se u řas tvoří postupnou přeměnou vegetativních buněk, typicky například ve stárnoucí kultuře, a proto je lze také popsat jako “staré” buňky nebo

buňky ve stacionární fázi růstu. Akinety mají silnější buněčnou stěnu a velký obsah zásobních látek (Fritsch 1935; Pickett-Heaps 1975; Coleman 1983). Akinety nejsou dormantní (Agrawal 2009), ale jejich fyziologická aktivita je snižena, což může být doprovázeno např. redukcí struktury chloroplastů (McLean & Pessoney 1971; Morison & Sheath 1985; Fuller 2013). Akinety bývají odolné k různým stresům, např. vysychání (McLean & Pessoney 1971) nebo zamrzání (Nagao et al. 1999). U některých druhů rodu *Zygnema* je buněčná stěna zralých akinet svojí strukturou a zbarvením podobná té u zygospor (Kadlubowska 1984). V této práci je však pojem “akineta” užíván pro staré vegetativní buňky bez zvláštních buněčných stěn (McLean & Pessoney 1971). Pokud jsou tyto buňky stále součástí nerozpadlého vlákna, nazývám je “pre-akinety”.

Jen několik studií se zabývalo arktickými a antarktickými zástupci rodu *Zygnema*. Antarktická *Zygnema* sp. byla schopná přežít i teplotu -15°C a cyklické zamrzání a tání (mezi -4 a $+5^{\circ}\text{C}$) nemělo žádný vliv na její fotosyntézu a viabilitu (Hawes 1990). Arktická *Zygnema* sp. se ukázala být rezistentní k UV záření – experimentální ozáření nemělo žádný negativní efekt na fotosyntézu a ultrastrukturu (Holzinger et al. 2009) – mechanismus této rezistence však není známý. Dále, poměrně nízké (záporné) hodnoty buněčného osmotického potenciálu byly zjištěny u několika kmenů *Zygnema* spp. z polárních oblastí, což ukazuje na jistý stupeň ochrany proti ztrátě vody (Kaplan et al. 2013).

Závěrem lze říci, že mechanismy stresové odolnosti u *Zygnema* spp. v Arktidě a Antarktidě nejsou moc důkladně probádány. Na jednu stranu je *Zygnema* v tomto prostředí poměrně hojná, takže se zdá, že je životu v polárních oblastech dobře přizpůsobena. Na druhou stranu byla zaznamenána vysoká úmrtnost po vystavení různým stresovým faktorům (Hawes 1990; Davey 1991). Téměř nic se neví o tvorbě specializovaných buněk u polárních *Zygnema* spp. ani o jejich roli ve stresové odolnosti. Navíc, produkce látek chránících před UV zářením u *Zygnema* spp. nebyla dosud detailně zkoumána. V neposlední řadě není vůbec jasné, jestli arktické a antarktické nárosty řasy *Zygnema* jsou tvořené jedním nebo více druhy, což by pomohlo objasnit molekulární metody.

2 Cíle práce

V průběhu řešení této práce jsem provedla řadu laboratorních i terénních pozorování a experimentů, abych našla odpovědi na tyto otázky:

- Tvoří *Zygnema* spp. v přírodním prostředí Svalbardu nějaké specializované buňky?
- Jaká je role těchto buněk ve stresové odolnosti?
- Jaké podmínky podporují tvorbu a odolnost takových buněk?
- Jaké jsou mechanismy odolnosti proti UV záření u *Zygnema* spp. z polárních oblastí?
- Skrývají polární nárosty *Zygnema* spp. dosud neodhalenou diverzitu?

3 Původní články

3.1 Článek I

PICHRTOVÁ, M., REMIAS, D., LEWIS, L. A. & HOLZINGER, A. (2013)

Changes in phenolic compounds and cellular ultrastructure of Arctic and Antarctic strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after exposure to experimentally enhanced UV to PAR ratio.

Microbial Ecology 65 (1): 68–83

V prvním článku jsme zkoumali produkci látek stínících UV záření u vybraných kmenů arktických a antarktických řas *Zygnema* spp. po experimentálním ozáření. Pracovali jsme se třemi kmeny: B a G byly mé vlastní izoláty ze Svalbardu (Arktidy) a E, který pocházel z Antarktidy, jsem získala z řasové sbírky. Všechny tři kmeny byly vystaveny experimentálnímu ozáření o zvýšeném poměru UV A a B k fotosynteticky aktivnímu záření. Obsah pigmentů, fotosyntetická aktivita a ultrastruktura byly studovány metodami vysokoúčinné kapalínové chromatografie (HPLC), fluorescence chlorofylu a transmisní elektronové mikroskopie. Navíc, fylogenetické vztahy mezi zkoumanými kmeny byly charakterizovány na základě sekvencí genu *rbcL*.

Fylogenetická analýza odhalila, že antarktický kmen (E) a jeden z arktických kmenů (B) jsou si poměrně blízce příbuzné. Druhý arktický kmen (G) naopak spadl do odlišné hlavní skupiny v rámci rodu *Zygnema* a byl tedy s ostatními jen vzdáleně příbuzný. Produkce fenolických látek byla potvrzena pomocí HPLC u všech studovaných kmenů, a to jak u vzorků vystavených UV záření, tak u vzorků kontrolních. Navíc, u kmene E obsah fenolických látek po ozáření průkazně vzrostl ($p=0.001$). Fenolické látky se vyskytují jen u několika málo skupin řas. Třída Zygnematophyceae je právě jednou z nich, což ukazuje na její blízkou příbuznost s vyššími rostlinami. Fenolické látky jsou rozpustné ve vodě, a tudíž bývají obvykle uloženy ve vakuole. Domníváme se, že u studovaných kmenů *Zygnema* spp. mohou být fenolické látky uloženy také v dalších váčcích u kraje buňky, které se v transmisním elektronovém mikroskopu jeví jako elektrondenzní. Tyto váčky totiž připomínají fysody u chaluž (Phaeophyceae), které také obsahují fenolické látky, konkrétně florotaniny.

Maximální kvantový výtěžek fotosystému II byl průkazně menší ($p<0.001$) u vzorků kmenů E a G ozářených UV, což jasně ukazuje na stresovou odpověď. Navíc, u kmene G bylo zjevné ultrastrukturální poškození, především na chloroplastech a mitochondriích. Výsledky tedy sice ukazují, že fenolické látky hrají jistou roli v ochraně *Zygnema* spp. proti UV záření, rozdílná odpověď jednotlivých kmenů však naznačuje, že i další mechanismy ochrany budou hrát roli v ochraně těchto řas.

3.2 Článek II

PICHRTOVÁ, M., HÁJEK, T. & ELSTER, J. (2014)

Osmotic stress and recovery in field populations of *Zygnema* sp. (Zygnematophyceae, Streptophyta) on Svalbard (High Arctic) subjected to natural desiccation.

FEMS Microbiology Ecology 89: 270–280

V rámci druhé studie jsme se zabývali přírodními populacemi *Zygnema* spp. v Arktidě (na Svalbardu). Odebírali jsme vzorky z různých lokalit a hledali nějaké známky tvorby specializovaných buněk. Ke konci léta všechny zkoumané přírodní populace sestávaly převážně z pre-akinet, tedy buněk připomínajících kultury ve stacionární fázi, se silnějšími buněčnými stěnami, redukovanou strukturu chloroplastů a velkým nahromaděním zásobních látek. Pre-kinety jsme pozorovali ve všech typech lokalit z hlediska dostupnosti vody – od trvalých louží až po vysušené krusty. Na základě tohoto pozorování jsme vytvořili hypotézu, že tvorba pre-akinet není indukována vysycháním, ale spíše vyhladověním, protože tyto poměrně rozsáhlé nárosty mohou na svých lokalitách snadno vyčerpat živiny, což vede k zastavení jejich růstu.

Rovněž jsme u nalezených pre-akinet studovali toleranci k osmotickému stresu v roztocích sorbitolu o různé koncentraci. Nejprve jsme po 24h inkubaci v daném roztoku s pomocí světelného mikroskopu zaznamenávali výskyt plazmolýzy (odchlípnutí protoplastu od buněčné stěny). Poté jsme studovali vliv silnějšího osmotického stresu. Vzorky byly po 4 hodiny inkubovány v 2M roztoku sorbitolu ($\Psi_{\pi} = -5.63$ MPa). Následně byly vzorky propláchnuty ve vodě, osušeny a přeneseny do vody, kde jim bylo po dalších 24 hodin umožněno obnovit své strukturální a fyziologické vlastnosti. V průběhu všech experimentů byla měřena fluorescence chlorofylu, která umožnila porovnat fyziologický stav studovaných řas.

Objevili jsme významné rozdíly v toleranci k osmotickému stresu u populací izolovaných z lokalit s různou dostupností vody. Vzorky z lokalit s dostatkem vody začaly plazmolýzovat již ve 450mM sorbitolu a inkubace v 2M sorbitolu způsobila vysokou úmrtnost buněk a jen velmi pomalou obnovu původních hodnot fluorescenčních parametrů. Na druhou stranu, vzorky z přirozeně vyschlých lokalit reagovaly srovnatelně s pravými aero-terestrickými řasami. Plazmolýza se začala objevovat až v 750 mM sorbitolu a po inkubaci v 2M sorbitolu byly původní hodnoty fluorescenčních parametrů obnoveny již po 4 hodinách ve vodě. Zdá se tedy, že arktické populace *Zygnema* spp. získávají stresovou odolnost díky pomalému přírodnímu vysychání.

3.3 Článek III

PICHRTOVÁ, M., KULICHOVÁ, J. & HOLZINGER, A.

Nitrogen limitation and slow drying induce desiccation tolerance in conjugating green algae (Zygnematophyceae) from polar habitats.

Submitted to PLoS ONE

V předchozí studii jsme vytvořili hypotézu, že pomalé přírodní vysychání nezpůsobuje vznik pre-akinet, je však důležité pro to, aby pre-akinet postupným otužením získaly stresovou odolnost. Ve třetí studii jsme se tedy rozhodli testovat tuto hypotézu v laboratorních podmínkách. Pro experimenty jsme vybrali 4 kmeny: arktické B a L a antarktické C a E. Podobně jako v případě prvního článku jsme i nyní určili fylogenetické vztahy mezi kmeny pomocí analýzy genu *rbcL*. Ukázalo se, že oba antarktické kmeny sdílejí shodnou sekvenci *rbcL*, lze je tedy považovat za dva různé izoláty téhož druhu. Velmi překvapivé výsledky však přineslo sekvenování kmene L. Ukázalo se, že se jedná o zástupce rodu *Zygnemopsis*. Tento rod má ve vegetativním stavu prakticky shodnou morfologii s rodem *Zygnema*, tyto dva rody však nejsou v rámci třídy Zygnematophyceae příliš blízce příbuzné.

Řasy byly nejprve kultivovány po 9 týdnů ve čtyřech kombinacích kultivačních podmínek: v tekutém (L) a na pevném (A) médiu a to buď s (N+) nebo bez (N-) dusičnanů. Po této pre-kultivaci byla biomasa experimentálně sušena při třech různých rychlostech. Světelná a transmisní elektronová mikroskopie a fluorescence chlorofylu byly použity ke studiu vlivu rychlosti sušení na viabilitu a rychlost obnovení fyziologické aktivity. Po devíti týdnech pre-kultivace byly kultury pěstované v běžném médiu (N+) morfologicky dost variabilní – obsahovaly celou škálu buněk od mladých vegetativních buněk po pre-akinet. Naproti tomu kultury pěstované v médiu bez dusíku (N-) sestávaly výhradně z pre-akinet, což podporuje hypotézu, že za tvorbou pre-akinet stojí nedostatek dusíku. Mírný vysychací stres, který byl v tomto experimentu simulován kultivací na agaru (A) neměl žádný vliv na výskyt pre-akinet.

Následné experimenty potvrdily, že vegetativní buňky nejsou schopny přežít žádný z testovaných vysoušecích režimů, zatímco pre-akinet vždy přežily alespoň velmi pomalé vysušení. Obnova fyziologické aktivity i viabilita jasně závisely na rychlosti vysušení – čím pomaleji byly řasy vysoušeny, tím lépe přežívaly. Nicméně, pouze pre-akinet, které byly nejprve otuženy mírným, pomalým vysycháním (ať už v řízeném experimentu či během pre-kultivace na agaru), byly schopné přežít velmi rychlé vyschnutí při relativní vzdušné vlhkosti 10 %. Tento výsledek potvrzuje výsledky terénní studie (článek II) a ukazuje, že pre-akinet musí být postupně otuženy, aby získaly vysokou stresovou odolnost.

4 Shrnutí a závěry

Tato práce shrnuje aktuální poznatky ohledně stresové odolnosti polárních *Zygnema* spp. a přináší odpovědi na otázky formulované v cílech práce.

Výzkum molekulární diverzity v rámci nárostů řas *Zygnema* spp. nebyl prvotním cílem této práce. Jelikož však nebylo možné určit druhy na základě morfologických znaků, museli jsme využít metody molekulární fylogenetiky, abychom zjistili, jaký je vztah studovaných kmenů mezi sebou a také jaká je jejich pozice v rámci ostatních známých zástupců rodu *Zygnema*. Tak byla získána data, která vlastně přinášejí první vhled do skryté diverzity polárních *Zygnema* spp. Tato práce ukázala, že diverzita je větší, než se očekávalo, a navíc přináší dle mého vědomí úplně první nález rodu *Zygnemopsis* z Arktidy.

Ukázala jsem, že polární kmeny rodu *Zygnema* produkují různé fenolické látky, které absorbují světlo v oblasti UV A, UV B a částečně i PAR. Tyto fenolické látky jsou produkovány konstitutivně, avšak jejich nárůst po experimentálním ozáření UV byl rovněž pozorován. Kromě toho se předpokládá, že další mechanismy hrají roli v ochraně řas *Zygnema* spp. proti UV záření. Například samotný růst ve formě několikavrstevných nárostů může mít ochranný význam podobně, jak bylo ukázáno u polární hydro-terestrické řasy *Prasiola* sp. (Post & Larkum 1993). Také se soudí, že i samotný slizový obal poskytuje jistou ochranu proti UV záření (Holzinger & Lütz 2006).

Velice zřídka jsem v arktických vzorcích pozorovala spájení a tvorbu zygospor. Pozorovaný materiál však bohužel neposkytoval znaky, které by byly dostatečné pro určení do druhu dle tradičního morfologického konceptu. Naproti tomu pre-akinety byly pozorovány velmi hojně jak v přírodních vzorcích, tak i kulturách. Pre-akinety byly charakterizovány nahromaděním tuků a jejich chloroplasty měly poměrně redukované výběžky. Na takové buňky lze nahlížet spíše jako na stresované či staré vegetativní buňky než jako na opravdu specializovaná stadia. Tvorba pre-akinet byla podpořena dusíkovým hladověním a v průběhu pomalého sušení získaly stresovou odolnost.

Zdá se tedy, že kromě rychlosti vysoušení (Gasulla et al. 2009), délky sušení (Karsten & Holzinger 2012) a světelných podmínek při vysoušení (Gray et al. 2007), hrají stáří a stav kultury rovněž důležitou roli v přežití a rychlosti obnovy původního stavu. Tento poznatek má důležitý obecný důsledek pro ekofyziologické studie. Ukázalo se totiž, že nelze dobře určit skutečnou schopnost řasy odolávat stresu, pokud experimenty provedeme s neotuženými čerstvými kulturami v růstové fázi, což je však právě případ řady publikovaných prací. Takové výsledky by měly být vždy porovnány s výsledky experimentů provedených s kulturami, které jsou ve stavu, jenž lépe vystihuje stav v přírodním prostředí.

Z výsledků popsaných výše lze vyvodit, že přirozeně otužené pre-akinety hrají klíčovou roli v přežití *Zygnema* spp. a *Zygnemopsis* sp. v polárním hydro-terestrickém prostředí. Jelikož mají zamrzání a vysychání podobný fyziologický efekt, lze předpokládat, že pre-akinety jsou důležité i pro přežití zimy. Polární *Zygnema* (a *Zygnemopsis*) jsou sice díky tvorbě slizovitých nárostů poměrně dobře chráněny proti extrémním podmínkám prostředí, avšak vysoká tolerance k vyschnutí pro ně přesto může být zásadní – např. po rozpadu vláken na jednobuněčné akinety, které už nejsou dále chráněny v rámci nárostu a slouží k šíření řas vzduchem (Marshall & Chalmers 1997).

5 Introduction

5.1 Stress factors in polar regions

In recent decades, polar regions have been a focus of much research in various scientific fields. Many investigations have focused on the special adaptations and survival strategies of polar organisms. Revealing the secrets of their success can help us understand stress resistance mechanisms in general and can be applied to other areas of research, e.g., cryobiology (Kang et al. 2007), astrobiology (Vishnivetskaya et al. 2003) and the search for potentially biotechnologically interesting compounds (Liu et al. 2013).

There are several more or less interrelated stress factors that are typical of polar regions. One of them is low temperature which has a profound impact on living organisms. With decreasing temperature, membrane fluidity also decreases, and the rate of metabolic reactions including repair processes slows down (Roos & Vincent, 1998).

Freezing can be regarded as a separate stress factor, because it leads to the loss of water in liquid form. Moreover, the lack of liquid water in the environment is an important stress factor in polar regions even in frost-free periods (Robinson et al. 2003; ACIA 2005). The presence of liquid water is essential for maintaining the three-dimensional structures of proteins and other molecules, and only fully hydrated cells can be physiologically functional (Holzinger & Karsten 2013). Thus, freezing, direct desiccation and salt stress are closely related because they all lead to osmotic dehydration and lower intracellular water potential (Bisson & Kirst 1995).

Solar radiation, despite being an essential factor for photosynthesis, can also be stressful. High photosynthetic active radiation (PAR) flux can lead to photoinhibition or even photodamage (Franklin & Forster 1997). Even more injurious are the effects of ultraviolet radiation. UV radiation is naturally low at higher latitudes due to the lower elevation of the sun. However, anthropogenic depletion of stratospheric ozone causes high UV-B events to occur regularly in the springtime in both the Arctic and Antarctic (Wessel et al. 1998). UV radiation damages DNA and other biomolecules either directly or indirectly via the production of reactive oxygen species (ROS).

In addition, several other stress factors are also characteristic of polar habitats, for example long period of darkness in winter or low nutrient availability (Arnold et al. 2003).

5.2 Polar microalgae

One of the most apparent consequences of extreme climatic conditions in polar regions is the low biodiversity and ground cover of vascular plants (Robinson et al. 2003; ACIA 2005). Consequently, microalgae represent the most important primary producers, form and stabilize the soil and participate in primary succession following deglaciation (Elster 2002; Elster et al. 2002; Elster & Benson 2004). Standing at the base of the food web, polar microalgae also play a key role in global biogeochemical cycling (Lyon & Mock 2014). In this thesis, I will focus on polar non-marine non-lichenized eukaryotic algae (microalgae) and their resistance to various stress factors, above all, desiccation and UV radiation.

Elster (2002) classified polar non-marine algal habitats into three groups with respect to the availability of water: i) lacustrine, with liquid water available year-round, such as lakes; ii) hydro-terrestrial, with liquid water available almost throughout the summer; and iii) terrestrial, which are only temporarily or periodically wetted.

As microalgae are able to survive the harsh physical conditions of the polar environment, some special adaptations can be expected. Mostly, the mechanisms of stress resistance are general and are not exclusively characteristic of polar algae.

Many microorganisms protect themselves by aggregating into extensive macroscopical multilayered structures, such as mats and crusts. Such growth patterns can protect them from multiple stresses at the same time, for example from freezing, desiccation and radiation. For example, no UV was detected at the base of 15 mm thick mats of Antarctic hydro-terrestrial alga *Prasiola* sp. (Post & Larkum 1993).

Forming specialized resistant stages is another widely used strategy for surviving periods of unfavorable conditions. For example, snow algae form resistant cysts with accumulated secondary carotenoids (Remias 2012).

In addition, algae are able to synthesize various substances that effectively screen UV radiation. Most widespread among various algal classes are mycosporine-like amino acids (MAAs); (Cockell & Knowland 1999). Moreover, some groups of algae produce phenolics or sporopollenin-like substances to screen UV (Xiong et al. 1997; Figueroa et al. 2009). Phenolics do not contain nitrogen, which makes their synthesis advantageous in extreme habitats with nutrient deficiency such as glacier surface (Aigner et al. 2013)

Other common stress resistance mechanisms include scavenging of reactive oxygen species, accumulation of osmotically active compounds that reduce cellular osmotic potential and increase the water-holding capacity (Bisson & Kirst 1995), avoidance via migration, or DNA repair mechanisms (Britt 1995).

5.3 *Zygnema*

For this Ph.D. thesis, I selected conjugating green microalgae with vegetative *Zygnema* sp. morphology as model organisms. These microalgae belong to the most common eukaryotic components of microalgal mats in both the Arctic (Sheath et al. 1996; Kim et al. 2008; Holzinger et al. 2009) and Antarctic (Hawes 1989, 1990; Davey 1991; Skácelová et al. 2013). They typically produce high amounts of mucilaginous biomass in hydro-terrestrial environments, such as slow-flowing meltwater streamlets. In such shallow and unstable habitats the microalgae are exposed to multiple stress conditions, above all, high solar irradiance including UV, freezing and desiccation.

Zygnema (Zygnematophyceae, Streptophyta) is a genus of filamentous green microalgae with two stellate chloroplasts per cell. They sexually reproduce by the process of conjugation, which leads to the formation of resistant zygospores. The morphology of mature zygospores and sporangial shape are essential for species determination. Nevertheless, the conjugation process in *Zygnema* has never been observed in Svalbard or Antarctica and, therefore, species determination is not possible.

In addition to zygospores, other specialized cell types have been described in *Zygnema*, namely parthenospores, aplanospores and akinetes (Kadlubowska 1984; Pouličková et al.

2007; Stancheva et al. 2012). Akinetes in microalgae are formed from vegetative cells during the gradual process that usually accompanies prolonged cultivation, and thus, they can also be described as “senescent” or “stationary-phase” cells. Akinetes possess thickened cell walls and large accumulations of storage products (Fritsch 1935; Pickett-Heaps 1975; Coleman 1983). Akinetes are not dormant (Agrawal 2009), but their physiological activity is diminished, which can be accompanied by structural reductions in their chloroplasts (McLean & Pessoney 1971; Morison & Sheath 1985; Fuller 2013). Akinetes are markedly resistant to various stresses, e.g., desiccation (McLean & Pessoney 1971) or freezing (Nagao et al. 1999). In some species of *Zygnema*, the cell walls of mature akinetes can have a similar structure, ornamentation and coloration to that of zygospores (Kadlubowska 1984). However, in this thesis, the term “akinetete” is used for the stationary-phase-like vegetative cells without distinctive cell wall characteristics (McLean & Pessoney 1971). If such cells still form a filament that has not yet disintegrated, they are referred to as “pre-akinetetes”.

Only few studies have investigated Arctic or Antarctic *Zygnema*. The Antarctic *Zygnema* sp. was able to survive freezing down to -15 °C and cyclic freezing and thawing (between -4 and +5) had no effect on photosynthesis or viability (Hawes 1990). Arctic *Zygnema* sp. was found to be UV resistant, as experimental UV exposure had no negative effect on its photosynthesis or ultrastructure (Holzinger et al. 2009). However, the mechanism of resistance remains unknown. Recently, quite low (negative) values of cellular osmotic potentials were detected in *Zygnema* spp. from polar habitats, revealing certain levels of protection against water loss (Kaplan et al. 2013).

In summary, there is only limited knowledge of the stress resistance mechanisms of *Zygnema* spp. in the Arctic and Antarctic. On one hand, *Zygnema* is very common in these regions, which indicates that this alga is well-adapted to life under extreme conditions. On the other hand, high mortality after exposure to various stress factors was also reported (Hawes 1990; Davey 1991). Almost nothing is known about the formation of specialized cells in polar *Zygnema* spp. and their role in stress resistance. Moreover, the production of UV-screening substances in *Zygnema* spp. has never been studied in detail. Finally, it is unknown whether Arctic and Antarctic mats are formed by one or multiple species, and analyses based on molecular data are urgently needed.

6 Research objectives of the thesis

In the present thesis, I performed both field and laboratory observations and experiments to answer the following questions:

- Do *Zygnema* spp. under natural conditions in Svalbard form any specialized cells?
- What is the role of these cells in stress resistance?
- What conditions induce the formation and resistance of such cells?
- What are the mechanisms of UV resistance of *Zygnema* spp. from polar regions?
- Is there a hidden diversity in polar *Zygnema* spp. mats?

7 Original papers

7.1 Paper I

PICHRTOVÁ, M., REMIAS, D., LEWIS, L. A. & HOLZINGER, A. (2013)

Changes in phenolic compounds and cellular ultrastructure of Arctic and Antarctic strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after exposure to experimentally enhanced UV to PAR ratio.

Microbial Ecology 65 (1): 68–83

In the first paper, we investigated the production of UV-screening compounds in selected strains of Arctic and Antarctic *Zygnema* after experimental UV exposure. We worked with three strains: B and G were my own isolates from Svalbard (High Arctic) and E originating in Antarctica was obtained from a culture collection. Isolates of *Zygnema* were exposed to experimentally enhanced UV A and B to photosynthetic active radiation (PAR) ratio. The pigment content, photosynthetic performance and ultrastructure were studied by means of high-performance liquid chromatography (HPLC), chlorophyll *a* fluorescence and transmission electron microscopy (TEM). In addition, phylogenetic relationships of the investigated strains were characterized using *rbcL* sequences.

The phylogenetic analysis revealed that the Antarctic isolate (E) and one of the Arctic isolates (B) were closely related, while G belongs to a different main clade of the genus and is thus only distantly related. The production of phenolic compounds was confirmed in all of the tested strains by HPLC analysis for both controls and UV-exposed samples. Moreover, in strain E, the content of phenolics increased significantly ($p=0.001$) after UV treatment. Phenolics are found only in few groups of algae, one of them being the class Zygnematophyceae, which supports their close relationship to higher plants. As water-soluble substances, phenolics are usually stored in vacuoles. We speculate that in *Zygnema* the phenolics are most probably also stored at the cell periphery in cytoplasmic bodies that appear as electron dense particles when observed by TEM after high-pressure freeze fixation. These vesicles resemble physodes of brown algae (Phaeophyceae) that also contain phenolics – phlorotannins.

The maximum quantum yield of photosystem II photochemistry significantly decreased in UV-exposed strains E and G ($p<0.001$), showing a clear stress response. Moreover, in strain G, ultrastructural damage was found in chloroplasts and mitochondria after UV exposure. The results indicate that phenolics are involved in UV protection of *Zygnema*, but also revealed different responses to UV stress across the three strains, suggesting that other protection mechanisms may be involved in these organisms.

7.2 Paper II

PICHRTOVÁ, M., HÁJEK, T. & ELSTER, J. (2014)

Osmotic stress and recovery in field populations of *Zygnema* sp. (Zygnematophyceae, Streptophyta) on Svalbard (High Arctic) subjected to natural desiccation.

FEMS Microbiology Ecology 89: 270–280

In the second study, we aimed at natural populations of *Zygnema* spp. in the Arctic (Svalbard). We sampled various localities and looked for specialized cells. At the end of the summer, all natural *Zygnema* spp. mats in the Arctic consisted predominantly of pre-akinetes which are stationary-phase-like vegetative cells with thickened cell walls, reduced chloroplast lobes and accumulations of storage material. Pre-kinetes were observed in all sampled sites from pools with biomass floating in water to dried paper-like crusts. Based on this observation we hypothesized that formation of pre-akinetes is not induced by slow natural dehydration, but possibly by nutrient starvation because their extensive growth in relatively small water bodies may lead to the depletion of nutrients and the cessation of growth.

We also studied osmotic stress tolerance of pre-akinetes using sorbitol solutions of different concentrations. First, after 24 h of incubation, the presence/absence of plasmolysis was determined by observing a retraction of protoplast from the cell wall in a light microscope. Then, the effect of a stronger osmotic stress was studied: The samples were incubated in a hypertonic solution of 2 M sorbitol ($\Psi_{\pi} = -5.63$ MPa) for 4 h. Then, the samples were rinsed in water, blotted, and transferred into water for 24 h where they were allowed to recover their structural and physiological characteristics. Chlorophyll fluorescence was measured during the experiments to estimate physiological performance of the algae.

We revealed that there are significant differences in osmotic stress tolerance among populations isolated from localities with different water status. The wet-collected samples started to plasmolyze in 450 mM sorbitol and incubation in 2 M sorbitol led to high mortality and the recovery after this treatment was very slow. On the other hand, the performance of the naturally dried samples was comparable to that of true aeroterrestrial algae. Plasmolysis first occurred in 750 mM sorbitol and following the incubation in 2 M sorbitol, initial values of fluorescence parameters recovered already after 4 hours in water. It appears that Arctic populations of *Zygnema* acclimate well to natural desiccation via hardening that is mediated by slow drying.

7.3 Paper III

PICHRTOVÁ, M., KULICHOVÁ, J. & HOLZINGER, A.

Nitrogen limitation and slow drying induce desiccation tolerance in conjugating green algae (Zygnematophyceae) from polar habitats.

Submitted to PLoS ONE

In the previous study, we hypothesized that slow natural dehydration does not trigger the formation of akinetes, but is required for the pre-akinetes to become stress-resistant. In the third study we tested this hypothesis in laboratory conditions. Four strains were selected for the experiments: Arctic B and L and Antarctic C and E. Similarly to the first paper, phylogenetic relationships of the investigated strains were characterized using *rbcL* sequences. Both Antarctic strains share identical *rbcL* sequences and can be regarded as different isolates of the same species. Surprisingly, molecular analysis revealed that the strain L belongs to a different genus – *Zygnemopsis*. The two genera have similar vegetative morphology, even though they are not very closely related among the Zygnematophyceae.

First, the algae were grown for 9 weeks in four different combinations of culture conditions: in liquid (L) or on solidified (A) medium, with (N+) or without (N-) nitrate. After this pre-cultivation, the biomass was desiccated at three different drying rates. Light and transmission electron microscopy (TEM) and chlorophyll fluorescence were used to determine the effect of drying rate on viability and recovery of physiological activity. After 9 weeks of pre-cultivation, the cultures grown on full medium (N+) showed high morphological variation from vegetative cells to pre-akinetes. By contrast, the starved cultures (N-) consisted of pre-akinetes only, supporting the hypothesis that pre-akinetes formation is induced by nitrogen starvation. Mild dehydration stress simulated by cultivation on agar plates had no effect on the incidence of pre-akinetes.

Subsequent experiments confirmed that vegetative cells that were still present in N+ cultures were not able to survive any of the desiccation treatments, whereas the pre-akinetes survived at least some of the regimes. Both recovery and viability were clearly dependent on drying rate: slower desiccation led to higher levels of survival. However, only after previous acclimation by slow desiccation (induced either by controlled desiccation at high relative humidity or by pre-cultivation on agar), the pre-akinetes were able to survive rapid desiccation in air at a relative humidity of 10%. This result confirms the conclusions of the field study (paper II) and shows that pre-akinetes need to be hardened by slow desiccation to become stress tolerant.

8 Summary and conclusions

This thesis summarizes recent findings about the stress resistance of polar *Zygnema* spp. and provides new insights into the questions presented in the Objectives.

The investigation of molecular diversity within *Zygnema* mats was not a primary aim of this thesis. Nevertheless, as species could not be determined according to morphological traits, molecular phylogenetic analysis was performed to assess the positions and relationships of the isolated strains used in the experiments. Thus, data were gathered that provided the first insights into the hidden diversity of polar *Zygnema* spp. This thesis demonstrates that the diversity of *Zygnema* mats is greater than expected and to my knowledge, this is the first report of *Zygnemopsis* from the Arctic.

I showed that polar strains of *Zygnema* produce several phenolic substances with wide absorption maxima that screen UV-A, UV-B and (partially) PAR irradiation. These phenolics are produced constitutively, but their increase after experimental UV exposure was also observed. In addition, other mechanisms of stress resistance are probably involved. For example, mat-forming growth could play a role as it provides good protection of the lower layers of another polar hydro-terrestrial alga, *Prasiola* sp. (Post & Larkum 1993). Moreover, mucilage is also believed to provide protection against UV (Holzinger & Lütz 2006).

Very rarely, zygospores or traces of conjugation were observed in samples from Svalbard, but unfortunately, the material did not provide sufficient information for species determination. On the contrary, pre-akinetes were observed in all natural samples and cultures. Pre-akinetes were characterized by large accumulation of lipids, and their chloroplasts had reduced lobes. They can be perceived as simply stressed or old vegetative cells, rather than specialized stages. We showed that pre-akinetete formation was induced by nitrogen starvation and that hardening during slow desiccation was required for the pre-akinetes to become stress-resistant.

It turned out that in addition to the drying rate (Gasulla et al. 2009), duration of desiccation (Karsten & Holzinger 2012) and light conditions during desiccation (Gray et al. 2007), the age and state of the culture also play an important role in survival and recovery after desiccation. This finding has an important consequence for ecophysiological experiments. We showed that it may be insufficient to assess an alga's stress tolerance capacity from experiments performed only with log-phase, non-hardened cultures, which is actually the case of many published studies. Such results should always be compared with the results of experiments employing cultures that better resemble the state of the microalgae under natural conditions.

From the results described above, I can conclude that naturally hardened pre-akinetes play a key role in the survival of *Zygnema* spp. and *Zygnemopsis* sp. in the hydro-terrestrial environment of polar regions. As desiccation and freezing have similar physiological effects, I assume that hardened akinetes are also important for survival in the winter. Due to their mat-forming growth and mucilage production, polar *Zygnema* (and *Zygnemopsis*) species are well-protected from harsh environmental conditions. Nevertheless, high desiccation tolerance is very important for the survival of short fragments or single-celled akinetes that are no longer protected within mats but instead serve as airborne propagules (Marshall & Chalmers 1997).

9 Použitá literatura/References

- ACIA (2005) *Arctic Climate Impact Assessment*. Cambridge University Press.
- Agrawal SC (2009) Factors affecting spore germination in algae - review. *Folia Microbiol.* 54: 273–302.
- Aigner S, Remias D, Karsten U & Holzinger A (2013) Unusual phenolic compounds contribute to ecophysiological performance in the purple-colored green alga *Zygonium ericetorum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) from a high-alpine habitat. *J. Phycol.* 49: 648–660.
- Arnold RJ, Convey P, Hughes KA & Wynn-Williams DD (2003) Seasonal periodicity of physical factors, inorganic nutrients and microalgae in Antarctic fellfields. *Polar Biol.* 26: 396–403.
- Bisson MA & Kirst GO (1995) Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae. *Naturwissenschaften* 82: 461–471.
- Britt A (1995) Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiol.* 108: 891–896.
- Cockell CS & Knowland J (1999) Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* 74: 311–345.
- Coleman AW (1983) The roles of resting spores and akinetes in chlorophyte survival. *Survival Strategies of the Algae*, (Fryxell, GA, ed), pp. 1–21. Cambridge University Press, Cambridge.
- Davey MC (1991) The seasonal periodicity of algae on Antarctic fellfield soils. *Holarct. Ecol.* 14: 112–120.
- Elster J (2002) Ecological classification of terrestrial algal communities in polar environments. *Geoecology of Antarctic ice-free coastal landscapes, Ecological Studies, Vol. 154*, (Beyer, L & Bölter, M, eds), pp. 303–326. Springer.
- Elster J & Benson EE (2004) Life in the polar environment with a focus on algae and Cyanobacteria. *Life in the frozen state*, (Fuller, B, Lane, N, & Benson, E, eds), pp. 109–150. Taylor and Francis, London.
- Elster J, Svoboda J, Ohtani S & Kanda H (2002) Feasibility studies on future phycological research in polar regions. *Polar Biosci.* 15: 114–122.
- Figueroa FL, Korbee N, Carrillo P, Medina-Sánchez JM, Mata M, Bonomi J & Sánchez-Castillo PM (2009) The effects of UV radiation on photosynthesis estimated as chlorophyll fluorescence in *Zygnemopsis decussata* (Chlorophyta) growing in a high mountain lake (Sierra Nevada, Southern Spain). *J. Limnol.* 68: 206–216.
- Franklin LA & Forster RM (1997) The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Eur. J. Phycol.* 32: 207–232.
- Fritsch FE (1935) *The structure and reproduction of the algae, Vol. I*. Cambridge University Press, London.
- Fuller C (2013) Examining morphological and physiological changes in *Zygnema irregulare* during a desiccation and recovery period, MSc Thesis, California State University San Marcos.
- Gasulla F, de Nova PG, Esteban-Carrasco A, Zapata JM, Barreno E & Guéra A (2009) Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichen alga *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 231: 195–208.
- Gray DW, Lewis LA & Cardon ZG (2007) Photosynthetic recovery following desiccation of desert green algae (Chlorophyta) and their aquatic relatives. *Plant. Cell Environ.* 30: 1240–1255.

- Hawes I (1989) Filamentous green algae in freshwater streams on Signy Island, Antarctica. *Hydrobiologia* 172: 1–18.
- Hawes I (1990) Effects of freezing and thawing on a species of *Zygnema* (Chlorophyta) from the Antarctic. *Phycologia* 29: 326–331.
- Holzinger A & Karsten U (2013) Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Front. Plant Sci.* 4: 327.
- Holzinger A & Lütz C (2006) Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* 37: 190–207.
- Holzinger A, Roleda MY & Lütz C (2009) The vegetative arctic freshwater green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. *Micron* 40: 831–838.
- Kadlubowska JZ (1984) Conjugatophyceae I: Chlorophyta VIII: Zygnematales. *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 16.*, (Ettl, H, Gerloff, J, Heynig, H, & Mollenhauer, D, eds), pp. 1–532. Gustav Fisher, Jena.
- Kang SH, Joo HM, Park S, Jung W, Hong SS, Seo K-W, Jeon MS, Choi H-G & Kim HJ (2007) Cryobiological perspectives on the cold adaptation of polar organisms. *Ocean Polar Res.* 29: 263–271.
- Kaplan F, Lewis LA, Herburger K & Holzinger A (2013) Osmotic stress in Arctic and Antarctic strains of the green alga *Zygnema* (Zygnematales, Streptophyta): Effects on photosynthesis and ultrastructure. *Micron* 44: 317–330.
- Karsten U & Holzinger A (2012) Light, temperature, and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a high alpine soil crust. *Microb. Ecol.* 63: 51–63.
- Kim GH, Klochkova TA & Kang SH (2008) Notes on freshwater and terrestrial algae from Ny-Ålesund, Svalbard (high Arctic sea area). *J. Environ. Biol.* 29: 485–491.
- Liu LT, Lu XL, Liu XY, Gao Y, Hu B, Jiao BH & H Z (2013) Bioactive natural products from the antarctic and arctic organisms. *Mini Rev. Med. Chem.* 13: 617–626.
- Lyon BR & Mock T (2014) Polar microalgae: New approaches towards understanding adaptations to an extreme and changing Environment. *Biology* 3: 56–80.
- Marshall WA & Chalmers MO (1997) Airborne dispersal of antarctic terrestrial algae and Cyanobacteria. *Ecography* 20: 585–594.
- McLean RJ & Pessoney GF (1971) Formation and resistance of akinetes of *Zygnema*. *Contributions in phycology*, (Parker, BC & Brown Jr, RM, eds), pp. 145–152. Allen.
- Morison MO & Sheath RG (1985) Response to desiccation stress by *Klebsormidium rivulare* (Ulotrichales, Chlorophyta) from a Rhode Island stream. *Phycologia* 24: 129–145.
- Nagao M, Arakawa K, Takezawa D, Yoshida S & Fujikawa S (1999) Akinete formation in *Tribonema bombycinum* Derbes et Solier (Xanthophyceae) in relation to freezing tolerance. *J. Plant Res.* 112: 163–174.
- Pickett-Heaps JD (1975) *Green algae: Structure, reproduction and evolution in selected genera*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Post A & Larkum AWD (1993) UV-absorbing pigments, photosynthesis and UV exposure in Antarctica: comparison of terrestrial and marine algae. *Aquat. Bot.* 45: 231–243.
- Pouličková A, Žižka Z, Hašler P & Benada O (2007) Zygnematalean zygospores: morphological features and use in species identification. *Folia Microbiol.* 52: 135–145.
- Remias D (2012) Cell structure and physiology of alpine snow and ice algae. *Plants in alpine regions. Cell physiology of adaption and survival strategies.*, (Lütz, C, ed), pp. 175–186. Springer, Vienna.
- Robinson SA, Wasley J & Tobin AK (2003) Living on the edge – plants and global change in continental and maritime Antarctica. *Glob. Chang. Biol.* 9: 1681–1717.

- Sheath RG, Vis ML, Hambrook JA & Cole, Kathleen M (1996) Tundra stream macroalgae of North America: composition, distribution and physiological adaptations. *Hydrobiologia* 336: 67–82.
- Skácelová K, Barták M, Coufalík P, Nývlt D & Trnková K (2013) Biodiversity of freshwater algae and cyanobacteria on deglaciated northern part of James Ross Island, Antarctica. A preliminary study. *Czech Polar Reports* 3: 93–106
- Stancheva R, Sheath RG & Hall JD (2012) Systematics of the genus *Zygnema* (Zygnematophyceae, Charophyta) from Californian watersheds. *J. Phycol.* 48: 409–422.
- Vishnivetskaya TA, Spirina EV, Shatilovich AV, Erokhina LG, Vorobyova EA & Gilichinsky DA (2003) The resistance of viable permafrost algae to simulated environmental stresses: implications for astrobiology. *Int. J. Astrobiol.* 2: 171–177.
- Wessel S, Aoki S, Winkler P, Weller R, Herber A & Gernandt H (1998) Tropospheric ozone depletion in polar regions A comparison of observations in the Arctic and Antarctic. *Tellus* 50B: 34–50.
- Xiong F, Komenda J, Kopecký J & Nedbal L (1997) Strategies of ultraviolet-B protection in microscopic algae. *Physiol. Plant.* 100: 378–388.

10 Curriculum Vitae

Martina Pichrtová

Born: Prague, 1985

e-mail: pichrtov@natur.cuni.cz

Addresses: Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Botany
Benátská 2, 12801, Praha 2, Czech Republic

Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Botany
Dukelská 135, 37982, Třeboň, Czech Republic

Study and practice

Since 2010: Research assistant at the Charles University in Prague, Faculty of Science,
Department of Botany – part time position

Since 2010: Doctoral student at the Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute
of Botany, Třeboň – part time position

Since 2009: PhD study in Botany: Charles University in Prague, Faculty of Science,
Department of Botany

2007–2009: Master study in Botany: Charles University in Prague, Faculty of Science,
Department of Botany

Thesis topic: Shape dynamics of silica structures in synurophytes

2004–2007: Bachelor study in Biology: Charles University in Prague, Faculty of Science
Thesis topic: The impact of environmental factors on morphological variation
of silica structures in chryophytes (Synurophyceae)

Stays abroad

University of Innsbruck, Austria: **May 2013** (1 month)
(Dr. Andreas Holzinger) **March-June 2011** (4 months)

Field research (Svalbard, Norway): **April 2012** (1 week)
August 2011 (3 weeks)
June-July 2010 (4 weeks)

British Antarctic Survey, Cambridge, United Kingdom: **May 2010** (2 weeks)
(Dr. Roger Worland)

Publications in SCI journals

PICHRTOVÁ, M., HÁJEK, T. & ELSTER, J. (2014): Osmotic stress and recovery in field populations of *Zygnema* sp. (Zygnematophyceae, Streptophyta) on Svalbard (High Arctic) subjected to natural desiccation. – FEMS Microbiology Ecology 89(2): 270–280.

PICHRTOVÁ, M., NĚMCOVÁ, Y., ŠKALOUD, P. & ROTT, E. (2013): Silica-scaled chrysophytes from North Tyrol (Austria) including a description of *Mallomonas tirolensis* sp nov. – Nova Hedwigia Beiheft 142: 69–85.

ŠKALOUD, P., ŠKALOUDOVIČOVÁ, M., **PICHRTOVÁ, M.**, NĚMCOVÁ, Y., KREIDLOVÁ, J. & PUSZTAI, M. (2013): www.chrysophytes.eu – a database on distribution and ecology of silica-scaled chrysophytes in Europe. – Nova Hedwigia Beiheft 142: 141–146.

PICHRTOVÁ, M., REMIAS, D., LEWIS, L. A. & HOLZINGER, A. (2012): Changes in phenolic compounds and cellular ultrastructure of Arctic and Antarctic strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after exposure to experimentally enhanced UV to PAR ratio. – Microbial Ecology 65 (1): 68–83.

NĚMCOVÁ, Y. & **PICHRTOVÁ, M.** (2012): Shape dynamics of silica scales (Chrysophyceae, Stramenopiles) associated with pH. – Fottea 12 (2): 281–291.

PICHRTOVÁ, M. & NĚMCOVÁ, Y. (2011): Effect of temperature on size and shape of silica scales in *Synura petersenii* and *Mallomonas tonsurata* (Stramenopiles). – Hydrobiologia 673 (1): 1–11.

PICHRTOVÁ, M., JANATKOVÁ, K. & NĚMCOVÁ, Y. (2011): Silica-scaled chrysophytes from Abisko (Swedish Lapland). – Nordic Journal of Botany 29: 112–118.

NĚMCOVÁ, Y. & **PICHRTOVÁ, M.** (2009): The rare species *Synura lapponica* Skuja (Synurophyceae) new to the Czech Republic, local vs. global diversity in colonial synurophytes. – Biologia 64: 1070–1075.

VESELÁ, J., NEUSTUPA, J., **PICHRTOVÁ, M.** & POULÍČKOVÁ, A. (2009): Morphometric study of *Navicula* morphospecies (Bacillariophyta) with respect to diatom life cycle. – Fottea 9 (2), 307–316.

PICHRTOVÁ, M. & VESELÁ, J. (2009): Silica-scaled chrysophytes of the Elbe Sandstone Region, Czech Republic. – Fottea 9 (1):101–106.

FRÁNKOVÁ, M., POULÍČKOVÁ, A., NEUSTUPA, J., **PICHRTOVÁ, M.** & MARVAN, P. (2009): Geometric morphometrics - a sensitive method to distinguish diatom morphospecies: a case study on the sympatric populations of *Reimeria sinuata* and *Gomphonema tergestinum* (Bacillariophyceae) from the River Bečva, Czech Republic. – Nova Hedwigia 88: 81–95.

PICHRTOVÁ, M. & NĚMCOVÁ, Y (2008): Geometric morphometric analyses of silica-scale variation in four *Mallomonas* species (Synurophyceae, Stramenopiles). – Nordic Journal of Botany 26: 77–82.

PICHRTOVÁ, M., ŘEZÁČOVÁ-ŠKALOUDOVÁ, M. & ŠKALOUD, P. (2007): The silica-scaled chrysophytes of the Czech-Moravian Highlands. – Fottea 7 (1): 43–48.

Abstracts, posters and presentations

PICHRTOVÁ, M., HÁJEK, T., KULICHOVÁ, J. & ELSTER, J. (2014): Stress resistance of filamentous conjugating green algae (Zygnematophyceae) from polar regions. – 62nd Annual Meeting of the British Phycological Society, Galway, Ireland, 25. – 27.6.2014.

PICHRTOVÁ, M., KULICHOVÁ, J., HÁJEK, T., HOLZINGER, A. & ELSTER, J. (2013): Diversity and stress resistance of *Zygnema* and *Zygnemopsis* in polar regions. – 54. Conference of the Czech Phycological Society, Třeboň, Czech Republic, 16. – 18.9.2012.

PICHRTOVÁ, M., VESELÁ, J., HOLZINGER, A. & HÁJEK, T. (2013): Diversity and desiccation tolerance of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) on Svalbard (High Arctic). Phycologia 52: 87. – 10th International Phycological Congress, Orlando, Florida, USA, 4. – 10.8.2013

PICHRTOVÁ, M., HÁJEK, T. & ELSTER, J. (2012): Desiccation tolerance and osmotic potential of *Zygnema* on Svalbard. – Polar Ecology Conference, České Budějovice, Czech Republic, 30.9. – 3.10.2012.

PICHRTOVÁ, M. & NĚMCOVÁ, Y. (2012): Effect of temperature on shape and size of synurophyte silica scales - a geometric morphometric approach. - 8th International Chrysophyte Symposium, Prague, Czech Republic, 12. – 17. 8. 2012.

PICHRTOVÁ, M., NĚMCOVÁ, Y., ŠKALOUD, P. & ROTT, E. (2012): Scale bearing planktonic chrysophytes from North Tyrol, Austria. – 8th International Chrysophyte Symposium, Prague, Czech Republic, 12. – 17. 8. 2012.

ŠKALOUD, P., ŠKALOUDOVÁ, M., **PICHRTOVÁ, M.**, NĚMCOVÁ, Y., KREIDLOVÁ, J. & PUZSTAL, M. (2012): WWW.CHRYSOPHYTES.EU - Distribution and ecology of silica-scaled chrysophytes in Europe. - 8th International Chrysophyte Symposium, Prague, Czech Republic, 12. – 17. 8. 2012.

PROCHÁZKOVÁ, K., GAYSINA, L. A., **PICHRTOVÁ, M.**, NĚMCOVÁ, K., LUKEŠOVÁ, A. & ELIÁŠ, M. (2012): The diversity in the *Vischeria/Eustigmatos* complex (Eustigmatophyceae: morphological and molecular perspectives). – Protist 2012, Oslo, Norway, 29.7. – 3.8. 2012.

HOLZINGER, A., KAPLAN, F., **PICHRTOVÁ, M.**, BUCHNER, O. (2012): Desiccation induced physiological and ultrastructural changes in the aeroterrestrial green algae *Klebsormidium* sp. and *Zygnema* sp. (Streptophyta). - 19. ATSPB Tagung, Lienz, Austria, 7. – 10.6.2012.

PICHRTOVÁ, M., ČERNÁ, K., ŠKALOUDOVÁ, M., VESELÁ, J., NĚMCOVÁ, Y., NEUSTUPA, J. & ŠKALOUD, P. (2012): An assessment of optimal growth conditions for microalgal strains using crossed gradients of light and temperature – a prerequisite for toxicity tests. - 9th European Workshop Biotechnology of Microalgae, Nuthetal, Germany, 4. – 5. 6. 2012.

PICHRTOVÁ, M., REMIAS, D. & HOLZINGER, A. (2012): The effect of an enhanced UV AB : PAR ratio on pigmentation and ultrastructure of *Zygnema* from polar regions. – 60th Annual Winter Meeting of the British Phycological Society, Newcastle upon Tyne, United Kingdom, 4. – 6. 1. 2012.

PICHRTOVÁ, M., HÁJEK, T. & ELSTER, J. (2011): The effect of desiccation stress on the filamentous green alga *Zygnema*. – European Journal of Phycology 46 (Supplement 1): 152. – 5th European Phycological Congress, Rhodos, Greece, 4. – 9. 9. 2011.

PROCHÁZKOVÁ, K., GAYSINA, L. A., **PICHRTOVÁ, M.**, LUKEŠOVÁ, A. & ELIÁŠ, M. (2011): Reassessing the diversity and taxonomy of the eustigmatophyte algae of the genera *Vischeria* Pascher and *Eustigmatos* Vischer. – VI. European Congress of Protistology, Berlin, Germany, 25. – 29.7. 2011.

PICHRTOVÁ, M. & NĚMCOVÁ, Y. (2009): Temperature dependent shape plasticity in silica scales of synurophytes (Stramenopila, Chromalveolata). - 6th Symposium "Morphométrie et Evolution des Formes", Montpellier, France, 27. – 28.5. 2009.

NĚMCOVÁ, Y., **PICHRTOVÁ, M.** & ŠKALOUDOVÁ, M. (2009): Ecologically related shape change of the subcellular structures, silica scales, forming the scale-case in synurophytes (Stramenopila, Chromalveolata). - 6th Symposium "Morphométrie et Evolution des Formes", Montpellier, France, 27. – 28.5. 2009.

VESELÁ, J., NEUSTUPA, J., **PICHRTOVÁ, M.** & POULÍČKOVÁ, A. (2009): Shape variation and allometry of unicellular pennate diatoms. - 6th Symposium "Morphométrie et Evolution des Formes", Montpellier, France, 27. – 28.5. 2009.