

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Protistologie



Diplomová práce

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

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

Bc. Eva Kupčiková

Školitel: Mgr. Jan Šťastný, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.8.2019

Podpis

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Janu Šťastnému za pomoc při výběru tématu diplomové práce a její metodiky, za půjčení kultur a cenné poznámky k samotné práci. Děkuji svému konzultantovi Pavlu Škaloudovi za pomoc při metodice zpracování genetického materiálu řas a fylogenetických analýz, a za půjčení přírodních vzorků ze Švédska. Děkuji svému konzultantovi Jiřímu Neustupovi za pomoc při výběru tématu a zvládnutí metodiky geometrické morfometriky. Děkuji dále Heleně Bestové za půjčení přírodních vzorků ze Švédska a primerů, včetně návodu na jejich použití v praxi. Děkuji Pavle Urbánkové za půjčení vzorků z Maine. Děkuji Kataríně Jurdíkové (Nemjové) za půjčení kultur. Děkuji Kateřině Trumhové, Tereze Šoljakové a Ivě Jadrné za cenné poznámky. Děkuji také za příjemné prostředí v algologické a molekulární laboratoři a u skenovacího elektronového mikroskopu. Jsem vděčná svému partnerovi Vojtěchu Faltinkovi za trpělivost a podporu ve studiu. Děkuji své tetě Evě Kupčíkové za cenné připomínky. Věnuji tuto práci mému synu Tomáši a mým zesnulým rodičům.

Abstrakt

Z 23 evropských a severoamerických kmenů druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* (Desmidiales) jsem získala 3 evoluční linie v molekulárním markeru trnG^{ucc} intronu (druhého typu). U SSU intronu jsem nezískala signifikantní a jednotné výsledky. Je pravděpodobné, že jsou linie trnG^{ucc} intronu velice mladé. SEM odhalila jeden centrální pór a pětici hrbolků. Linie byly signifikantně odlišné svým tvarem a rozměry. V některých kmenech byla vysoká morfologická variabilita. Linie se lišily především délkou a šířkou buněk. Uvnitř morfotypu *E. humerosum* se linie lišily tvarem a rozměry polárního laloku. Uvnitř morfotypu *E. didelta* se linie lišily tvarem a rozměry krku. To bylo zjištěné geometrickou morfometrikou a měřením. Lineární diskriminační analýza krásivek z literatury odhalila, že je možné částečně odlišit skupiny variet (*E. humerosum* var. *parallelum* a *E. didelta* v linii A; dvě formy *E. didelta* f. *val Piora* a *E. didelta* f. *latior* v linii B; *E. didelta* var. *inermiforme* a *E. humerosum* var. *affine* v linii C).

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

Abstract

From 23 European and North American strains *Euastrum humerosum/didelta* species complex (Desmidiales) I have obtained 3 lineages in molecular marker trnG^{ucc} group II intron. I did not acquire significant and homogenous results in SSU intron. It is probable that the lineages of trnG^{ucc} intron are very young. SEM revealed one central pore in cell wall and five bulges. The lineages were significantly different in their shape and dimensions. The lineages differentiated mainly in their length and breadth of the cells. The lineages inside morphotype *E. humerosum* differentiated in shape and dimensions of the polar lobe. The lineages inside morphotype *E. didelta* differentiated in shape and dimensions of the neck. That was ascertained using the geometric morphometrics with the measuring. Linear discriminant analysis of the desmids from literature revealed that is possible to partly discriminate groups of the varieties (*E. humerosum* var. *parallelum* and *E. didelta* in lineage A; two formae *E. didelta* f. *val Piora* and *E. didelta* f. *latior* in lineage B; *E. didelta* var. *inermiforme* and *E. humerosum* var. *affine* in lineage C).

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

Seznam použitých zkratek

.fasta – textový formát zápisu sekvence DNA/proteinu

½ v – polovina buněk s vroubkováním bazálního laloku

16S rDNA – gen pro rRNA, která je součástí SSU u prokaryot

18S rDNA – gen pro rRNA, která je součástí SSU u eukaryot, někdy zaměňováno 18S a SSU

26S rDNA – gen pro rRNA která je součástí LSU

5.8S rDNA – gen pro rRNA která je součástí LSU

A – adenin, purinová báze uvnitř nukleové kyseliny DNA nebo RNA

Abb. - něm. *Abbildung*, ilustrace

angl. - anglicky

BIC – angl. *Bayesian Information Criterion*, Bayesovo informační kritérium

BI – angl. *Bayesian Inference*, Bayesova statistická podpora, statistika u fylogenetického stromu
vyšlá v programu MrBayes

C - cytosin, pyrimidinová báze uvnitř nukleové kyseliny DNA nebo RNA

cox III – angl. *Cytochrom c Oxidase subunit III*, cytochrom c oxidáza – podjednotka III, součástí dýchacího řetězce v mitochondriální membráně

CV osa – *Canonical Variation*, osa CVA analýzy

CVA – angl. *Canonical Variation Analysis*, analýza kanonické variability, graf vyšlý v LDA

DNA – angl. *Deoxyribonucleic Acid*, deoxyribonukleová kyselina

dNTP – angl. *deoxynucleoside Triphosphate*, deoxynukleosid trifosfát

Ds – délka semicely, zkratka rozměru buňky, viz obr. 3.1

EDTA – angl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ethylenndiamintetraoctová kyselina

f. - forma, taxonomicky neuznaná jednotka

Fig. - angl. *Figure*, obrázek

franc. - francouzsky

G - guanin, purinová báze uvnitř nukleové kyseliny DNA nebo RNA

GM – angl. *Geometric Morphometrics*, geometrická morfometrika

GM + MP – geometrická morfometrika s měřením, včetně poměrů

GM + P – geometrická morfometrika, pouze s poměry

GPA – angl. *Generalized Procrustes Analysis*, Prokrustova analýza

HelF – primer pro SSU intron, *forward*, pojmenovaný podle autora (Helena Bestová), ve směru přepisu genu, včetně daného intronu

HelR – primer pro SSU intron, *reverse*, pojmenovaný podle autora (Helena Bestová), proti směru přepisu genu, včetně daného intronu

HEPES - 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid, N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina

HKY - Hasegawa-Kishino-Yanový substituční model (Hasegawa, et al., 1985)

HKY+I - HKY substituční model se signifikantním poměrem invariabilních míst (Salemi & Vandamme, 2003)

HKY+I+G – HKY substituční model se signifikantním poměrem invariabilních míst s gamma parametrem

I – isthmus, zúžení, zkratka rozměru buňky, viz obr. 3.1

indel – na pozici došlo ke vložení (inserci) nebo ke ztrátě (deleci) nukleotidu oproti evolučně původní části DNA

ITS – Intergenic Transcribed Spacer, mezigenová transkribovaná DNA mezi geny 18S–5.8S–26S jaderného ribozomálního cistronu (Álvarez & Wendel, 2003, viz obr. 8.1)

JC – Jukes-Cantor substituční model (Jukes & Cantor, 1969)

JC+G Jukes-Cantorový substituční model s gamma parametrem

JK – *angl. jackknife*, diskriminační analýza při vynechání jednoho jedince (Hammer, 2018)

LDA – *angl. Linear Discriminant Analysis*, lineární diskriminační analýza

LM – *angl. Light Microscopy*, světelná mikroskopie

LSU – *angl. Large SubUnit*, rDNA, velká podjednotka ribozomální ribozomální DNA

M – měření, rozměry

MANOVA – *angl. Multivariate Analysis of Variance, Multivariační analýza variance*

MCMC metoda - Markov Chain Monte Carlo metoda, metoda Markovo-Monte-Carloových řetězců

ML – *angl. Maximum Likelihood*, maximální pravděpodobnost

MP – *angl. Maximum Parsimony*, maximální parsimonie

něm. - německy

nt – (počet) nukleotidů

Obr. - obrázek

p – hodnota, hodnota signifikance

p. - *angl. page*, stránka

PC osa – *angl. Principal Component*, osa zobrazená u PCA analýzy

PCA – *angl. Principal Component Analysis*, analýza hlavních komponent

PCR – *angl. Polymerase Chain Reaction*, polymerázová řetězová reakce

Pl – polární lalok, zkratka rozměru buňky, viz obr. 3.1

Pl. - *angl. plate*, nebo *franc. planche*, obrazová tabule

r – Pearsonův korelační koeficient

rbcL - *angl. Large subunit of the Ribulose-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase gene*, gen pro velkou podjednotku Ribulosa - 1,5 - bisfosfát karboxylázy/oxygenázy, zkráceně RuBisCO

rDNA – ribosomální DNA

rpm – *angl. revolutions per minute*, otáčky za minutu (ot.min^{-1}), vedlejší jednotka soustavy SI pro frekvenci

s. - stránka

SEM – *angl. Scanning Electron Microscopy*, skenovací elektronová mikroskopie

Sk - šířka krku, zkratka rozměru buňky, viz obr. 3.1

Ss – šířka semicely, zkratka rozměru buňky, viz obr. 3.1

SSU – *angl. Small SubUnit*, rDNA, malá podjednotka ribosomální DNA

T – thymin, pyrimidinová báze uvnitř nukleové kyseliny DNA

Tab. - *angl. table*, tabule, uváděná v citaci

tab. - tabulka v textu, popř. Tab. v názvu tabulky

TAE pufr, směs Tris(hydroxymethyl)aminomethanu, Acetic acid (kyseliny octové) a EDTA

Taf. - *něm. Tafel*, obrazová tabule

TEM - *Transmission Electron Microscopy*, transmisní elektronová mikroskopie

TPS – *ang. Thin plate spline*, třírozměrná deformovaná mřížka, program na geometrickou morfometriku

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

transkripce – přepis DNA na nematurovanou mRNA, ze které se následně vyštěpí introny a upraví se ta, že se podle této matrice tvoří krátké peptidy nebo proteiny

trnG^{ucc} -F, primer pro trnG intron, *forward*, ve směru přepisu trnG při transkripci

trnG^{ucc} intron – viz trnG intron

trnG^{ucc} -R, primer pro trnG intron, *reverse*, proti směru přepisu trnG při transkripci

v. - verze

v – vroubkování bazálního laloku, viz obr. 1.1

var. - varieta

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	4
Seznam použitých zkratk.....	5
1 Úvod.....	10
1.1 Krásivky.....	10
1.1.1 Kde najdeme krásivky a jak je poznáme.....	10
1.1.2 Druhové koncepty (nejen) krásivek.....	12
1.1.2.1 Morfologický koncept.....	12
1.1.2.2 Biologický koncept.....	13
1.1.2.3 Fylogenetický koncept.....	13
1.1.2.4 Morfologický koncept krásivek versus polyfázický přístup.....	14
1.1.3 <i>Euastrum</i>	16
1.1.3.1 Druhový komplex <i>Euastrum humerosum/didelta</i>	18
2. Cíle práce.....	22
3. Materiál a metody.....	23
3.1 Sběr materiálu, izolace kmenů, kultivace.....	23
3.1.1 Receptura média DY IV:.....	23
3.2 Extrakce DNA.....	23
3.3 PCR amplifikace.....	24
3.4 Fylogenetické analýzy.....	26
3.5 Morfologie buněk a kvantitativní metody.....	27
3.5.1 Světelná a skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	27
3.5.2 Geometrická morfometrika a měření.....	28
4. Výsledky:.....	30
4.1 Fylogenetické analýzy.....	30
4.1.1 trnG intron.....	30
4.1.2 SSU intron.....	30
4.1.3 Konkatenované sekvence trnG intronu a SSU intronu.....	31
4.2 Morfologie buněk.....	35
4.3 Metrické analýzy a geometrická morfometrika.....	39
4.3.1 Měření.....	39

4.3.2 Geometrická morfometrika.....	44
4.3.2.1 Geometrická morfometrika u tří linií trnG intronu.....	44
4.3.2.2 Geometrická morfometrika (GM) u pěti morfologických podskupin.....	46
4.3.2.3 Geometrická morfometrika u dvou subsetů <i>didelta</i> a <i>humerosum</i>	48
4.3.2.4 Lineárně diskriminační analýza (LDA) krásivek z literatury.....	53
4.4 Morfologie a taxonomické poznámky k jednotlivým liniím.....	53
4.4.1 Linie A.....	54
4.4.2 Linie B.....	55
4.4.3 Linie C.....	56
5. Diskuse.....	59
5.1 Fylogenetické analýzy.....	59
5.1.1 Mladé linie.....	60
5.2 Morfologie buněk.....	60
5.2.1 Rozměry a tvar.....	60
5.2.1.1 Morfologická plasticita.....	61
5.2.2 Linie trnG intronu.....	62
5.2.2.1 Výskyt různých variet uvnitř linií trnG intronu.....	65
5.2.2.2 Historie výskytu.....	66
5.2.2.3 Rozšíření.....	66
5.2.3 Shrnutí.....	67
6. Závěr.....	68
7. Seznam použité literatury.....	69
8. Příloha.....	81

1 Úvod

Tato práce navazuje na výzkum taxonomie a biogeografie krásivek (Desmiales, Zygnematophyceae) a především jejich genetickou variabilitu a morfologickou odlišnost fylogenetických linií. Byly to studie zaměřené na některé druhové komplexy *Micrasterias* (Neustupa et al., 2010, 2011b; Nemjová et al., 2011) a *Xanthidium* (Šťastný et al., 2013), kde pomohly i metody zkoumání ultrastruktury buněčné stěny skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) a studování tvaru buněk geometrickou morfometrikou. Zjištěné rozšíření se porovnávalo s literaturou. V této práci jsem se zaměřila na běžně se vyskytující a často zaměnitelné druhy krásivek *Euastrum humerosum*, *E. didelta* a *E. affine* (resp. *E. humerosum* var. *affine*) sdružující se do druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta*. Zkoumala jsem u nich genetickou a morfologickou diverzitu, jak lze vývojové linie odlišit měřením a geometrickou morfometrikou nebo ultrastrukturou buněčné stěny. Nakonec jsem srovnala rozšíření izolovaných kmenů se záznamy z literatury.

1.1 Krásivky

1.1.1 Kde najdeme krásivky a jak je poznáme

Krásivky (Desmiales, Desmidiaceae) patří mezi spájivé řasy (Zygnematophyceae). Desmiales mají čtyři čeledi. Jsou to Closteriaceae, Gonatozygaceae, Peniaceae a Desmidiaceae (viz Schéma 1.1). Desmidiaceae je jedna z nediverzifikovanějších skupin streptofytních zelených řas (Gontcharov & Melkonian, 2005). Krásivky jsou rozšířené na všech světadílech (Coesel, 1996). Patří mezi nejdůležitější skupiny fyto-bentosu s vysokou druhovou bohatostí a biomasou. Rostou na ponořených rostlinách v slabě kyselých rašelinných tůňkách, sladkovodních mokřadech nebo jezerech (Coesel & Meesters, 2007). Proto jsou krásivky používány v různých ekologických a biomonitoringových studiích, protože jsou důležitými bioindikátory kvality vody (např. Coesel, 2001, 2003; Pals et al., 2006; Krasznai et al., 2008; Neustupa et al., 2009, 2011a).

Při špatném zařazení do druhu, dochází ke zkreslení ekologických výsledků. Pro ochranu biotopů např. rašelinišť, ve kterých krásivky často rostou, to může mít zásadní dopad.

Krásivky jsou velice variabilní, tzv. morfologicky plastické (Kouwets, 1984, 2008). Hranice mezi druhy krásivek jsou často nejasné a dochází k záměnám (např. Růžička, 1981). Věrohodnost studií závisí na spolehlivosti druhových konceptů.

Schéma 1.1

Přehled spájitých řas (Gontcharov et al., 2003; Gontcharov & Melkonian, 2008):

- Spájitvé řasy (Zygnematophyceae)
 - Zygnematales (*Zygnema*, *Mesotaenium*, *Mougeotia*, *Spirogyra*)
 - **Desmidiiales**
 - Gonatozygaceae (*Gonatozygon*)
 - Closteriaceae (*Closterium*)
 - Peniaceae (*Penium margaritaceum*)
 - **Desmidiaceae**
 - ARTHR (*Staurodesmus convergens*, *Cosmarium contractum*);
 - STD1 (*Staurodesmus extensus*)
 - CO1 (*Cosmarium tinctum*)
 - **CO2** (*E.substellatum*, *E. verrucosum*, *E. germanicum*, *E. spinulosum*, *C. cyclicum*, *C. botrytis*, *Actinotaenium cucurbita*)
 - CO3 (*C.ornatum*)
 - **CO4** (*C. ovale*, *E. prowsei*, *E. moebii*)
 - *Xanthidium*
 - STD2 (*Cosmarium granatum*)
 - Mnohobuněčné 1+2 (*Spondylosium planum*, *Heismansia pusilla*, *Cosmarium sinostegos*, *Bambusina borneri*)
 - **Euastrum**
 - *E. subalbinum*, *E. binale*
 - ***E. affine***, *E. oblongum*
 - *Staurastrum*
 - *Micrasterias*
 - Omniradiální (*Cosmarium biretum*, *Actinotaenium silvae-nigrae*)
 - CAP (*Cosmarium depressum*, *Actinotaenium cruciferum*, *Penium polymorphum*)

Krásivky mají dvě semicely spojené isthmem, obsahující jádro. V každé semicelle je alespoň jeden chloroplast (viz obr. 1.1). Vysoká morfologická plasticita krásivek vedla k popsání více než 3000 druhů (Desmidiiales, Desmidiaceae; Gerrath, 2003; Gontcharov et al., 2003; Gontcharov, 2008). Podle novějších odhadů by krásivky mohly mít až 9000 druhů (Šťastný & Kouwets, 2012).

Následující stránky budou věnovány problematice určování druhů krásivek (Desmidiaceae), které patří mj. do protist.

1.1.2 Druhové koncepty (nejen) krásivek

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

Druhy jsou základní jednotkou pro určení diverzity organismů. Pouze s dobře definovanými druhy je možné správné poznání jejich biogeografie, ekologie celého společenstva nebo pochopení evoluce života. Druhy se určují např. podle tvaru (morfologie), ekologie, biologie (sexuální izolovanosti druhů), nebo tzv. „genetického“ vývoje (fylogeneze).

Druhy jsou tedy určeny různými druhovými koncepty např. morfologickým, ekologickým, biologickým, fylogenetickým, atd. (Manhart & McCourt, 1992; de Queiroz, 2007).

1.1.2.1 Morfologický koncept

Nejčastěji se v praxi využívá morfologický koncept u makroskopických organismů (stromů, zvířat, apod.). Zaměřuje se na znaky, které organismy určují do taxonomických jednotek podle tzv. klíčů.

Tradiční taxonomie, založená na morfologických znacích, byla nedávno zpochybněna molekulárními daty. U protistních organismů uvádím příklad morfologicky definovaného rodu *Chlorella*, který byl po zkoumání molekulárními, biochemickými, a dalšími metodami, rozdělen dokonce do dvou tříd - Trebouxiophyceae a Chlorophyceae (Chlorophyta; Huss et al., 1999). U řady dalších organismů, včetně makroskopických, byla odhalena skrytá (kryptická) diverzita (viz kap. 1.1.2.4; např. Sáez & Lozano, 2005; Kraft et al., 2010; John et al., 2014).

Protistní organismy bývají nejen často mikroskopické, ale jsou i tvarově variabilní a často mají synonymní pojmenování. Hranice mezi druhy protist se často překrývají. Zaměřující se druhy se seskupují do druhových komplexů. Jejich zkoumáním se našly např. u rozsivek nebo krásivek kryptické druhy (Trobajo et al., 2009; Neustupa et al., 2010, 2011b; Pouličková et al., 2010; Nemjová et al., 2011, Škaloud et al., 2012a, Šťastný et al., 2013).

U krásivek jsou taxonomicky uznávané druhy a variety (nižší taxonomické jednotky), formy nikoli. Forma může být dočasná, např. při změně ekologických podmínek (Kouwets, 2008). Termín ikonotyp se používá pro ilustraci, která slouží jako první popis druhu. Morfotyp se používá pro tvar připomínající dotýčný druh nebo varietu, ale není jisté, zda je s nimi totožný.

1.1.2.2 Biologický koncept

Při studiu druhů krásivek se také dříve zohledňoval i biologický přístup křížením různých kmenů a často spojeného s tvorbou spor (např. Blackburn & Tyler, 1987). U protist bylo obecně zjištěno, že tvoří trvalá stádia na vysychajících místech a naopak v trvale vhodných podmínkách schopnost tvořit spory ztrácejí (Corliss & Esser, 1974; Coesel, 1989; Foissner, 1997, 2006).

Krásivky se rozmnožují pohlavně konjugací a tvoří trvalá stádia – zygospory, které jsou pozorovány především u krásivek z vysychajících habitatů, ale nejčastěji se rozmnožují nepohlavně (Starr, 1955; Brook, 1981; Coesel, 1989).

1.1.2.3 Fylogenetický koncept

Fylogenetický koncept používá molekulární markery z různých částí buňky, především z jádra nebo organel (mitochondrie nebo plastidu). Často se využívá jaderných ribozomálních úseků DNA (SSU, ITS, LSU).

Nejčastěji používané markery pro krásivky jsou: *rbcL* z plastidu (gen pro velkou podjednotku enzymu RuBisCO – účastníci se fixace oxidu uhličitého při tmavé fázi fotosyntézy), SSU z jádra (Small SubUnit, 18S, malá podjednotka ribosomální DNA), nebo *cox III* z mitochondrie (podjednotka enzymu v dýchacím řetězci cytochrom c oxidáza; Popović & Stuchebrukhov, 2005; Gontcharov & Melkonian, 2008; Šťastný et al., 2013).

Pro infraspecifickou diverzitu je vhodné vybrat rychle mutující markery, nejlépe s ojedinělým výskytem, jako jsou např. introny pro tRNA z plastidu. Molekulární marker *trnG* intron má unikátní výskyt v plastidu řas a jeho fylogeneze se shoduje s *rbcL* a *cox III* (Turmel et al., 2005; Škaloud et al., 2012a). Další rychle mutující marker je ITS (Intergenic Transcribed Spacer), který je součástí ribozomálního cistronu, a je po transkripci vystřižen (Álvarez & Wendel, 2003). Další používaný intron je 1506 group I intron v SSU, intron první skupiny, zkráceně SSU intron (Gontcharov & Melkonian, 2004). Molekulární marker SSU intron (podobně jako ITS) je rychle mutující, ale jako rDNA má stovky nebo tisíce kopií (Álvarez & Wendel, 2003).

Homogenizace kopií nastává, když mají jednotnou strukturu, neboli jsou bez polymorfismu v rámci jednoho organismu. Homogenizace začíná probíhat teoreticky po zmnožení genů pomocí crossing overu mezi spárovanými homologními chromozomy při meióze (Zimmer et al., 1980). V případě, že nedošlo k homogenizaci molekulárního markeru (nedošlo ke *concerted evolution*), je třeba marker klonovat. Homogenizace často chybí např. u ITS (Hillis & Dixon, 1991; Liao, 1999; Álvarez & Wendel, 2003; Harpke & Peterson, 2006; Hall et al., 2008; Wang et al., 2016).

Homogenizace ribozomální DNA je u krásivek pravděpodobně zpomalena z několika důvodů: krásivky jsou polyploidní (mají mnoho sad genů, King, 1960); nebo, že se krásivky méně často rozmnožují pohlavně a tudíž se nepohlavním rozmnožováním kopíruje tatáž genetická struktura (Starr, 1955; Blackburn & Tyler, 1981, 1987; Brook, 1981; Hoshaw & McCourt, 1988; Coesel & Meesters, 2007).

1.1.2.4 Morfologický koncept krásivek versus polyfázický přístup

Pojetí rodů krásivek se úplně změnilo díky molekulárnímu výzkumu (McCourt et al., 2000; Gontcharov et al., 2003; Gontcharov & Melkonian, 2005, 2008, 2010, 2011; Gontcharov, 2008; Hall et al., 2008; Škaloud et al., 2011). Většina tradičních druhově bohatých rodů se začala považovat za polyfyletické nebo parafyletické (na základě markerů plastidového *rbcL* a jaderného SSU; Gontcharov & Melkonian, 2005, 2008; Gontcharov, 2008). Tradiční koncepty rodů se staly nevyhovující a proto jsem se v této studii zaměřila na úroveň druhu, pro jehož koncept bylo potřeba více dat. Jak bylo uvedeno výše, došlo kvůli morfologické plasticitě k popsání enormního množství infraspecifických taxonů a jejich platnost je stále nejasná (Růžička, 1977; Kouwets, 2008).

Několik studií založených na křížících experimentech (Blackburn & Tyler, 1987, Denboh et al., 2001, 2003) ukázaly široké pojetí některých druhových konceptů krásivek a existenci kryptické (skryté) nebo pseudokryptické diverzity. Kryptické druhy se liší geneticky a zároveň jsou morfologicky totožné. Pseudokryptické druhy mají drobné, morfologické rozdíly, které jsou pozorovatelné pouze důkladným zkoumáním ultrastruktury nebo statistickou analýzou tvaru (geometrickou morfometrikou; Zelditch, 2004; Mann & Evans, 2007). Pro odhalení kryptické diverzity se často využívá polyfázického přístupu, který ke správnému určení mezidruhové hranice využívá informace získané na základě více tradičních přístupů. Typicky zohledňuje fylogenetický a morfologický přístup (společně s ultrastrukturou buněčné stěny a moderně i geometricko-morfometrických dat).

Při zkoumání ultrastruktury se zkoumají vzorky skenovacím nebo transmisním elektronovým mikroskopem (SEM, nebo TEM). Specifickou metodou je zkoumání tvaru geometrickou morfometrikou. *Geometrická morfometrika* porovnává umístění homologických bodů (tzv. *landmarků*, viz obr. 1.2), které mají stejné umístění nebo mají stejnou evoluční minulost. Důležité je, aby byly landmarky oddělené, rozpoznatelné a u všech jedinců umístěné podle stejných kritérií. Aby se porovnal tvar, je potřeba standardizace velikosti, natočení či posunutí objektů přes sebe superimpozicí v Prokrustově analýze (Generalized Procrustes Analysis, GPA).

Další parametr je deformace, která tvar již ovlivňuje. Posunutím landmarků nad sebe se získá grafický výstup - *třírozměrná deformovaná mřížka* (thin plate spline). Z té lze zjistit, jaký tvar je pro dané skupiny typický.

Deformace mřížky může být způsobena vnitřními nebo vnějšími vlivy. Vnitřní vlivy jsou dané genetikou, kdy buňka roste či stárne nebo má jiný evoluční vývoj a vnější vlivy jsou třeba environmentální podmínky (Zelditch, 2004; Veselá et al., 2009; Černá & Neustupa, 2010; Rohlf, 2016b).

Je dobré umístit landmarky tak, aby zaznamenaly změnu tvaru. Landmarky kopírující tvar jsou užitečné a ostatní zbytečné. Často se rozhodne až po analýze, které proměnné (landmarky) zahrnout a které vynechat. Oproti tomu klasická metrická analýza měřených rozměrů definuje proměnné před sběrem dat, a nikoli po něm (Zelditch, 2004).

Geometrická morfometrika spolu s kvantitativními metodami slouží pro hodnocení biologických tvarů. Byly nedávno použity pro morfologické analýzy variability v různých skupinách mikroskopických řas, např. u rozsivek (Beszteri et al., 2005; Potapova & Hamilton, 2007; Veselá et al., 2009; Pouličková et al., 2010), u šupin Synurophyceae (Škaloud et al., 2012b) a u krásivek (Desmidiaceae, Neustupa & Šťastný, 2006; Neustupa et al., 2010, 2011b; Nemjová et al., 2011).

U krásivek se našly pseudokryptické i kryptické druhy u nejvíce diverzifikovaného rodu *Micrasterias*. Na základě křížení se našly kryptické druhy u *M. thomasiana* (Blackburn & Tyler, 1987).

Uvnitř kolektivního druhu *M. truncata* bylo několik linií. Krásivka *M. truncata* var. *semiradiata* tvořila samostatný clade *M. semiradiata*. Další varieta *M. truncata* var. *pusilla* tvořila s *M. zeylanica* australský clade *zeylanica*, a byla oddělena také biogeograficky. Uvnitř *M. truncata* byly ještě další kryptické sublinie (Nemjová et al., 2011).

Uvnitř druhového komplexu *M. crux-melitensis*/*M. radians* se našly tři linie. *M. radians* var. *evoluta* byla pseudokryptickým druhem, lišila se od *M. crux-melitensis* molekulárně a malými trny na polárním laloku pozorovanými skenovací elektronovou mikroskopií (Neustupa et al., 2010).

Uvnitř druhového komplexu *M. rotata* a *M. fimbriata* byly dvě linie *M. fimbriata* – A a B. Linie *M. fimbriata* byly pseudokryptickými druhy, protože se lišily nepatrně svými trny na polárním laloku a rozšířením v Evropě (Neustupa et al., 2011b). U všech výše zmíněných pseudokryptických druhů *Micrasterias* byly krásivky odlišné nejen molekulárně, ale i geometrickou morfometrikou.

U dalšího rodu *Xanthidium* byla pseudokryptická diverzita na úrovni variet druhového komplexu *X. cristatum* (*X. cristatum* var. *cristatum*, *X. cristatum* var. *uncinatum*, *X. cristatum* var.

scrobiculatum). Molekulární variabilita variet korelovala s geometrickou morfometrikou a s pozorováním skenovací elektronovou mikroskopií (Šťastný et al., 2013).

1.1.3 *Euastrum*

V této kapitole se budu zabývat krásivkami uvnitř rodu *Euastrum* (první popis *E. ansatum*; Ehrenberg, 1831). Tento rod obsahuje 296 taxonomicky uznaných druhů a 1318 infraspecifických taxonů (Guiry & Guiry, 2019).

Buňky *Euastrum* jsou biradiálně symetrické podle dvou kolmých rovin. První osa prochází středem buňky a apikálním zářezem (obr. 1.1 a: 2) a druhá osa prochází isthmem (obr. 1.1 a: 7; viz na příkladu příbuzné krásivky *Micrasterias*; obr. 1.1c).

Buňky jsou s hlubokým zaškrcením, semicely pyramidální a často pěti-laločnaté s jedním polárním, dvěma laterálními a dvěma bazálními laloky. Na vrcholu semicely je hluboký apikální zářez (viz obr. 1.1; Růžička, 1981; Gerrath, 2003; John & Williamson, 2009).

Molekulárními metodami se rod *Euastrum* rozdělil na čtyři skupiny (viz Schéma 1.1). Podle markerů SSU a *rbcL* je polyfyletickým rodem (Gontcharov & Melkonian, 2008). Dvě skupiny leží uvnitř rodu *Euastrum*, které se liší tvarem zářezu a velikostí buňky:

- 1) větší 50 μm s hlubokým apikálním zářezem a hladkou buněčnou stěnou, patří sem např. zkoumané *E. affine* spolu s podobným *E. oblongum*;
- 2) menší než 50 μm , s apikálním zářezem do tvaru „v“, patří sem např. *E. binale*;
- 3) a 4) třetí a čtvrtá skupina patří do linie CO2 a CO4 spolu s některými druhy *Cosmarium*.

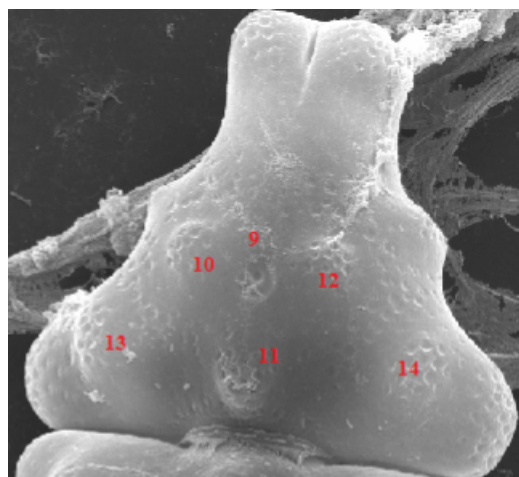
Pro taxonomii druhů či variet se popisuje: tvar laloků, rozměry buňky a poměry mezi délkou a šířkou buňky, tvar apikálního zářezu, povrch buněčné stěny, případně hrbolky a umístění pórů.

Vybrala jsem si běžně vyskytující se krásivky, větší 50 μm , *Euastrum humerosum*, *E. didelta* a *E. affine* (později *E. humerosum* var. *affine*). Často se zaměňují a sdružují se do druhového komplexu *E. humerosum/didelta*, s 35 popsányými varietami a 14 formami (Guiry & Guiry, 2019).

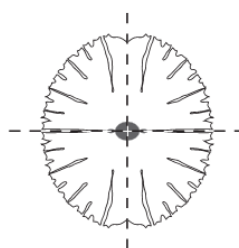
1.1 a



b

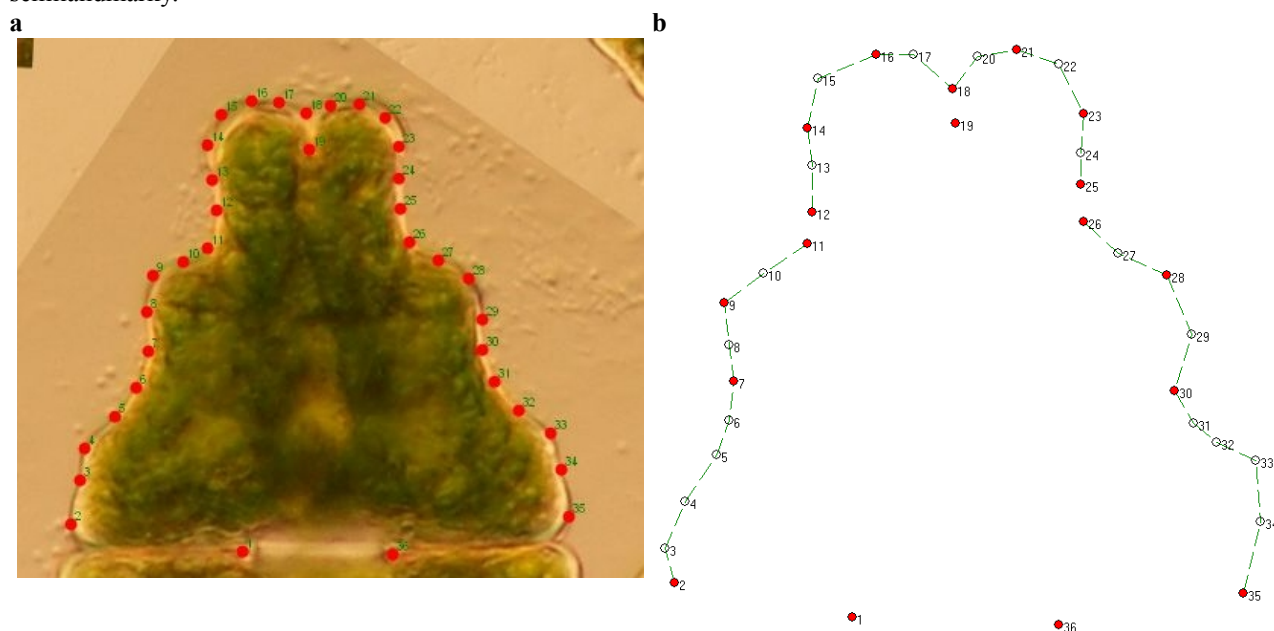


c



Obr. 1.1. Popis buňky krásivky: **a-b:** 1 – apex, 2 – apikální zářez, 3 – polární lalok, 4 – laterální lalok, 5 – bazální lalok, 6 – semicela, 7 – isthmus, 8 – vroubkování bazálního laloku, 9 – centrální pór, 10-12 – centrální hrbolky, 13-14 – laterální hrbolky; **c:** biradiální symetrie u krásivky *Microasterias* podobně jako *Euastrum* (upraveno podle Savriama & Klingenberg, 2011).

Obr. 1.2. Umístění landmarků na okraji buňky (a), rozlišení semilandmarků a landmarků (b); a - z programu tpsDig2 (Rohlf, 2015), b - z programu tpsUtil (Rohlf, 2013). Legenda: plná kolečka - landmarky, prázdná kolečka – semilandmarky.



1.1.3.1 Druhový komplex *Euastrum humerosum/didelta*

Druhový komplex *Euastrum humerosum/didelta* se od ostatních druhů rodu *Euastrum* liší počtem hrbolků (5), počtem centrálních pórů (1-2), svými rozměry, a popř. svým poměrem délky a šířky buňky (West & West, 1905; Krieger, 1937; Růžička, 1981).

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

Bylo pozorováno, že mezi dvěma druhy *E. humerosum* a *E. didelta* došlo ke konjugaci (Archer, 1875). Archer uvažoval o dvou možnostech, došlo buď ke křížení nebo byly krásivky dvěma varietami téhož druhu. U *E. affine* pohlavní rozmnožování pozorováno nebylo, ani jeho výsledek zygota (Růžička, 1981).

Druhy *E. humerosum* nebo *E. didelta* jsou jako ostatní krásivky morfologicky plastické. Mají zaznamenané různé smíšené formy svých semicel, kdy každá může mít rozdílný tvar podle aktuálních podmínek (viz obr. 1.6; Ducellier, 1915, 1918; South, 1984, Neustupa et al., 2008; Černá & Neustupa, 2010). Díky své plasticitě se tak mohou krásivky podobat i jiným druhům. Nejčastěji se *E. didelta* zaměňuje s druhem dvakrát menším *E. ansatum* (Růžička, 1981). Rovněž se mohou lišit tvarem laloků - laterálních (*E. pinnatum*) nebo bazálních (*E. sinuosum* je má rozštěpené).

Mohou se lišit poměrem bazálních a laterálních laloků, atd. (*E. everettense*; viz West & West, 1905; Krieger, 1937; Prescott et al., 1977; Růžička, 1981).

Euastrum humerosum Ralfs (1848, viz obr. 1.3, rozměry viz tab. 1.1) má nejširší polární lalok, na něm relativně dlouhé postranní výběžky, vroubkovaný bazální lalok, a v příčném průřezu je tělo krásivky trojlaločnaté. U *E. humerosum* bylo popsáno sedm variet a dvě formy (Guiry & Guiry, 2019); s výskytem v Evropě, Asii a Severní Americe (viz obr. 1.7; tab. 8.1).

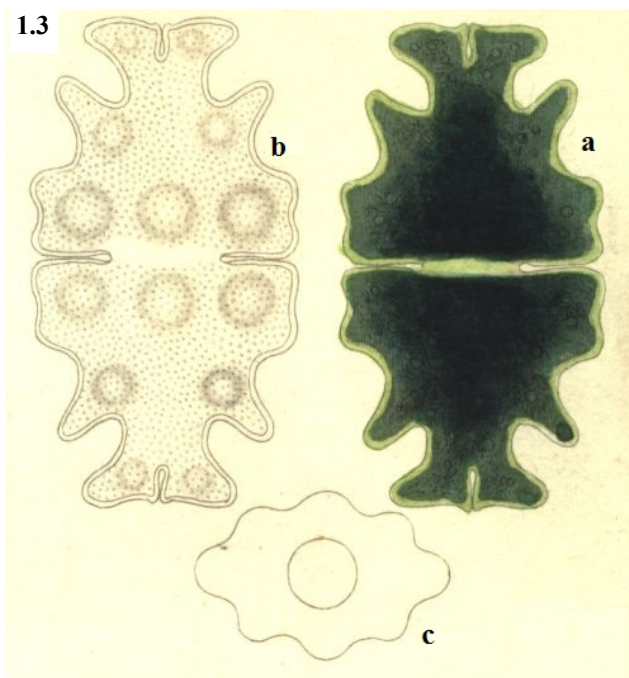
E. affine Ralfs (1844, rozměry Ralfs, 1848, viz tab. 1.1); bylo považováno za příbuzné *E. humerosum* a tudíž bylo později popisováno jako *E. humerosum* Ralfs var. *affine* (Ralfs) Wallich (1860; nebo Raciborski, 1885; viz obr. 1.4). *E. affine* má užší polární lalok než *E. humerosum*, s kulatými postranními výběžky. V příčném průřezu je tělo krásivky čtyřlaločnaté. *E. affine* je ze všech tří morfotypů nejkratší (viz tab. 1.1-1.2). Byly u něj popsány tři variety a dvě formy (Guiry & Guiry, 2019); s výskytem v Evropě, Asii, Africe a Severní Americe (tab. 8.1).

E. didelta Turpin ex Ralfs (1848, viz obr. 1.5, rozměry viz tab. 1.1) je ze všech tří morfotypů nejdelší (viz tab. 1.1-1.2). *E. didelta* mělo při původních popisech názvy *Heterocarpella Didelta* (Turpin, 1828, s. 295), nebo *Cosmarium Didelta* (Meneghini, 1840, s. 219). *E. didelta* je nyní popisováno s hladkými bazálními laloky. V průřezu je tělo krásivky čtyřlaločnaté. Dříve bylo *E. didelta* popisováno i s vroubkovaným okrajem bazálních laloků jako *E. didelta* Ralfs typu *b*, které bylo přesunuto do *E. humerosum* (West & West, 1905).

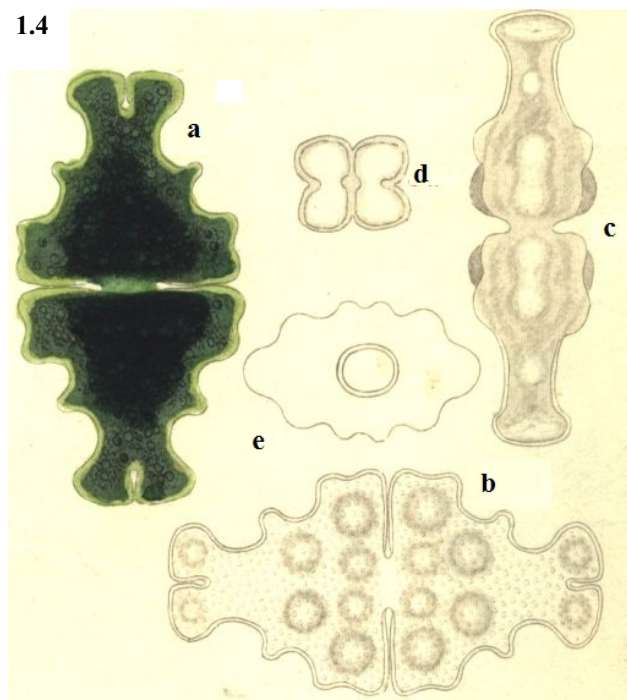
U krásivky *E. didelta* bylo popsáno dvacet pět variet a deset forem; s výskytem na všech světadílech kromě Antarktidy a Afriky (Guiry & Guiry, 2019). Uvádím často zmíněné variety v literatuře – např. *E. didelta* var. *bengalicum* a *E. didelta* var. *cuneatiforme* (z Indomalajsie a severní Austrálie); *E. didelta* var. *denticulatum* (ze Švýcarska, obr. 1.6 c); *E. didelta* var. *quadriceps* (z Jižní Ameriky); *E. didelta* var. *truncatum* (z Laponska a Kanady; viz obr. 1.6 d a 1.7, citace viz tab. 8.1).

Obrázky 1.3-1.5 a tab. 1.1 jsou podle originálního popisu (Ralfs, 1848).

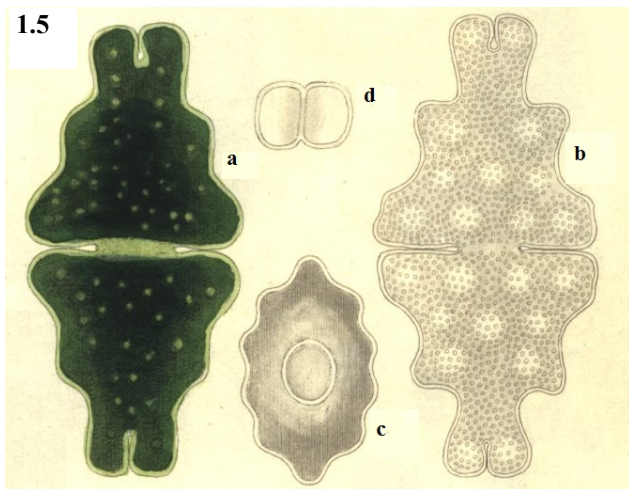
Obr. 1.3. *Euastrum humerosum* Ralfs (upraveno podle Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig. 2).



Obr. 1.4. *Euastrum affine* Ralfs (upraveno podle Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig.3).



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



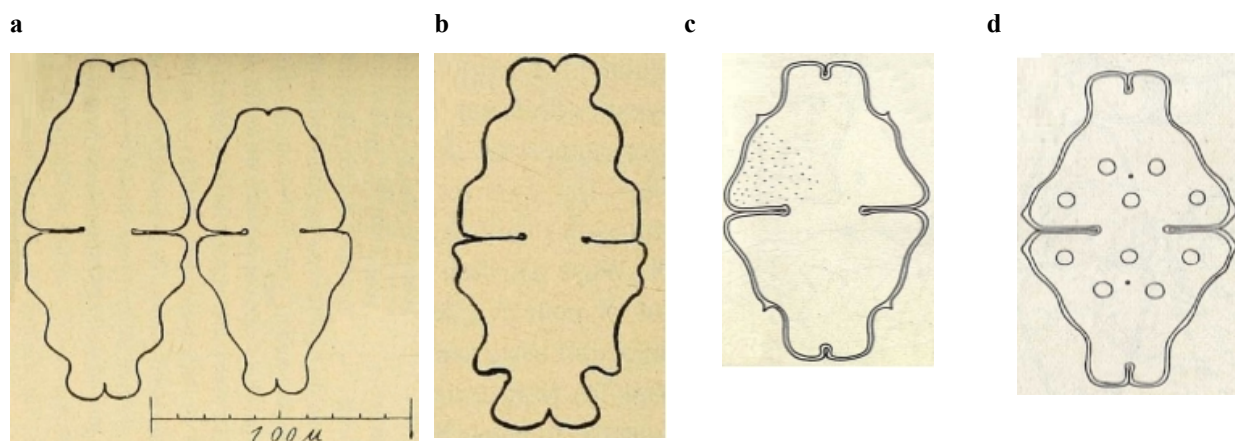
Tab. 1.1. Rozměry buněk krásivek druhového komplexu. Rozměry platí pro jednotlivé buňky originálního popisu v palcích a jsou převedeny na μm (1 palec = $2,54 \cdot 10^4 \mu\text{m}$; Ralfs, 1848).

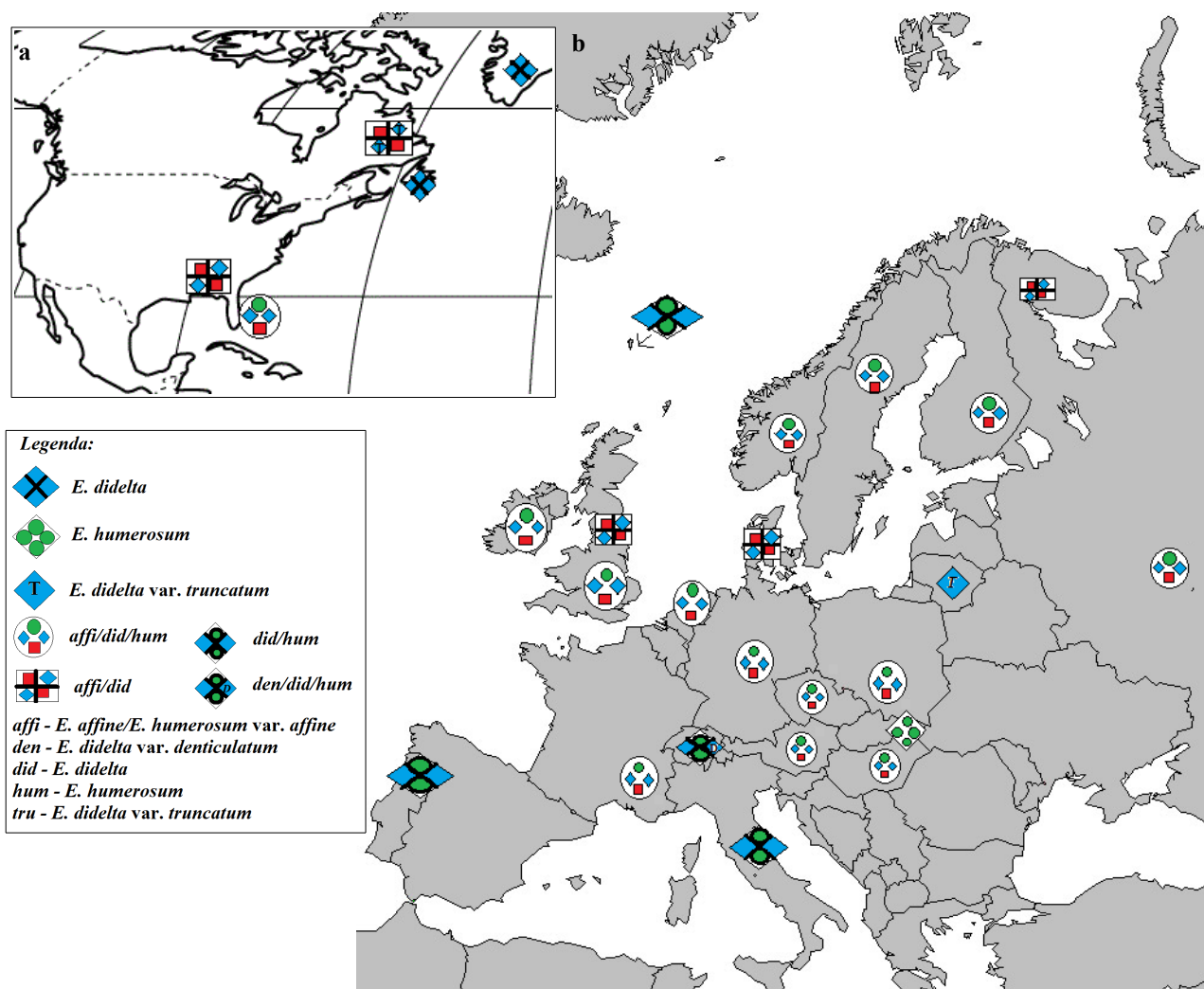
	Délka buňky	Šířka v bazálním laloku	Šířka na konci	Šířka krku	Délka projekcí na straně krku	Šířka ve středních lalocích	Isthmus
<i>E. humerosum</i> Ralfs	(1/225) 112,89	(1/382) 66,49	(1/727) 34,94	(1/1199) 21,18	(1/2314) 10,98	-	-
<i>E. affine</i> Ralfs	(1/230) 110,43	(1/458) 55,46	(1/917) 27,7	(1/1204) 21,1	-	(1/659) 38,54	-
<i>E. didelta</i> Ralfs	(1/185) 137,3	(1/357) 71,15	(1/752) 33,78	-	-	-	(1/1250) 20,32

Tab. 1.2. Rozměry u druhového komplexu *Euastrum humerosum /didelta* (upraveno podle Růžička, 1981; Coesel & Meesters, 2007).

	délka buňky [μm]	šířka buňky [μm]	isthmus [μm]	poměr délky a šířky
<i>E. humerosum</i> Ralfs var. <i>humerosum</i> Ralfs	(95-) 120-140 (170)	(55-) 65-75 (96)	13-30	(1,55-) 1,7-1,9 (-2)
<i>E. humerosum</i> Ralfs var. <i>affine</i> (Ralfs) Wallich	(80-) 100-130 (140)	(32-) 55-65 (80)	12-25	(1,5-) 1,7-1,9 (-2,1)
<i>E. didelta</i> Turpin ex Ralfs var. <i>didelta</i> Ralfs ex Ralfs	(100-) 120-150 (-180)	(50-) 60-75 (-85)	(12-) 15-25 (-32)	(1,5-) 1,7-2,2 (-2,6?)

Obr. 1.6. Smišené formy a-b, variety *E. didelta*. **a:** *E. didelta* f. du Val Piora f. *mixtes*; **b:** *E. humerosum*; **c:** *E. didelta* var. *denticulatum*; **d:** *E. didelta* var. *truncatum*; (upraveno podle Ducellier, 1915 - a: Pl. I, Fig. 3, 4; b: s. 90, Fig. 25; c-d: upraveno podle Krieger, 1937, c: Taf. 67: Fig. 11, d: Taf. 68: Fig. 1).





Obr. 1.7. Mapa výskytu druhového komplexu *E. humerosum/didelta* v Severní Americe (a) a Evropě (b). Zdroje viz tab. 8.1. Upraveno podle mapaevropy, 2018; darkfate, 2019.

2. Cíle práce

V diplomové práci jsem si kladla za cíl odpovědět na tři základní otázky.

- 1) Jaká je genetická a morfologická diverzita v druhovém komplexu *Euastrum humerosum/didelta*?
- 2) Jsou-li vývojové linie druhového komplexu *E. humerosum/didelta* rozpoznatelné, jakými metodami je lze rozlišit: kvantitativními metodami použitím měření a geometrické morfometrie; nebo skenovací elektronovou mikroskopií?
- 3) Do jakých linií druhového komplexu *E. humerosum/didelta* je možné teoreticky zařadit krásivky z literatury z oblastí Evropy (a Severní Ameriky), když použiji lineární diskriminační analýzu geometricko-morfometrických dat a rozměry buňky, resp. jejich poměry?

3. Materiál a metody

3.1 Sběr materiálu, izolace kmenů, kultivace

Sběr přírodních vzorků probíhal především v lokalitách České republiky, dále v severní Evropě a v Severní Americe. Většinu kmenů mi poskytl školitel Mgr. Jan Šťastný, PhD. a kolegyně Mgr. Katarína Jurdíková (Nemjová), čtyři kultury byly zakoupeny z portugalské sbírky řas ACOI (Santos, 2007) a ostatní jsem izolovala z vlastních nebo zapůjčených přírodních vzorků. Seznam kultur je uveden v tabulce (tab. 8.5).

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

3.1.1 Receptura média DY IV:

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

3.2 Extrakce DNA

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

3.3 PCR amplifikace

Pro následující fylogenetické analýzy bylo PCR metodou (polymerázovou řetězovou reakcí) namnoženo dostatečné množství molekulárních markerů v Mastercycler.pro (Eppendorf, ČR). Pro PCR amplifikaci byly vybrány tyto markery: plastidový trnG^{ucc} intron (trnG intron) a jaderný SSU intron. Pro trnG intron byly použity tyto primery trnG^{ucc}-F, trnG^{ucc}-R (Neustupa et al., 2010), pro SSU intron byly použity primery HelF, HelR (pojmenovány podle iniciálů jejich autorky, Bestová, nepubl.; viz tab. 3.1). Primer HelF začíná na pozici 1183, počítané podle 16S *Escherichia coli* (Brosius et al., 1978) a měl by předcházet pozici 1506 (SSU intronu první skupiny 1506, Gontcharov & Melkonian, 2004). Pozice byla zjištěna porovnáním sekvence primeru a sekvence z literatury v programu MEGA v. 7 (Kumar et al., 2016). Další ingredience použité pro PCR jsou uvedené v tabulce tab. 3.2. Byly použity dva teplotní cykly (viz tab. 3.3).

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

Tab. 3.1. Seznam použitých primerů.

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

Tab. 3.2. Složení reakční směsi – Gold master mix (upraveno podle Škaloud et al., 2012a). V případě SSU intronu bylo použito jiných hodnot u vody a MgCl₂, uvedeno v závorce; dd voda – destilovaná voda; dNTP – deoxynukleosid trifosfát.

<i>Složka [koncentrace]</i>	<i>Množství na vzorek [μl]</i>	<i>Složka [koncentrace]</i>	<i>Množství na vzorek [μl]</i>
pufr Gold	2	dd voda	13,1 (13,3)
dNTP [10mM]	0,4	enhancer	0,6
primer F [25nM]	0,25	polymeráza Gold [5U/μl]	0,2
primer R [25nM]	0,25	DNA [10ng/l]	1
MgCl ₂ [25mM]	2,2 (2)		

Tab. 3.3. PCR teplotní cykly pro úseky trnG intronu (upraveno podle Škaloud et al., 2012a) a SSU intronu (Bestová, nepubl.)

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

3.4 Fylogenetické analýzy

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

Globální alignment byl vytvořen pomocí algoritmu ClustalW v programu MEGA v. 7 (Thompson et al., 1994; Kumar et al., 2016). Byly použity výchozí parametry pro výpočet. Po úpravách bylo získáno 756 pozic v alignmentu.

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

Alignment konkatenovaných sekvencí z *trnG* intronu a SSU intronu měl 1557 pozic, byl získán jako v předchozích případech v programu MEGA v.7 (Kumar et al., 2016).

Substituční modely byly vybrány v programu MEGA v. 7, podle hodnot BIC (Baysova informačního kritéria). Pro *trnG* intron byl vybrán Tamura-3-parametrový substituční model (Tamura, 1992) jako speciální případ HKY modelu (Hasegawa-Kishino-Yano model; Hasegawa et al., 1985), který byl použit v programu MrBayes. Pro SSU intron byl použit JC+G model (s gamma parametrem 0,1; Jukes & Cantor, 1969; Nei & Kumar, 2000; Kumar et al., 2016). Pro konkatenované sekvence jsem vybrala substituční model HKY+I+G model, při výběru jsem použila nástroj SMS ve PhyML online programu (Hasegawa et al., 1985; Lefort et al., 2017).

Bootstrapová podpora byla spočítána z 1000 opakování v programu MEGA v. 7 společně s ML a MP analýzami (Efron, 1982; Felsenstein, 1985; Nei & Kumar, 2000; Kumar et al., 2016). Pro zjištění posteriorních pravděpodobností v nodech stromů byla použita Markov chain Monte Carlo metoda (MCMC metoda, Metropolis et al., 1953; Hastings, 1970), za použití dvou paralelních výpočtů studených řetězců v programu MrBayes 3.2.6 x64 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003; Ronquist et al., 2012). Při výpočtech v programu MrBayes byly použity parametry: pro HKY model pro *trnG* intron (*lset=2*); pro JC+G model pro SSU intron (*lset nst=1 prset statefreqpr=fixed(equal)*); a pro HKY+I+G model pro konkatenované sekvence *trnG* intronu a SSU intronu (*lset applyto=() nst=2 rates=invgamma*; Kimura, 1980; Hasegawa et al., 1984, 1985; brantfaircloth, 2015). Běhy MCMC byly kontrolovány konvergenčními diagnostikami ESS

(Estimated Sample Size, odhad velikosti vzorku), a PSRF (Potential Scale Reduction Factor, potenciálnímu škálovému redukčnímu faktoru; Gelman & Rubin, 1992). Diagnostika PSRF by měla při konvergování řetězců MCMC dosahovat 1.0. Dále byla kontrolována směrodatná odchylka, která měla dosáhnout nuly, jakmile by řetězce zkonvergovaly.

3.5 Morfologie buněk a kvantitativní metody

Morfologická variabilita druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* byla pozorována světelnou a skenovací elektronovou mikroskopií (LM a SEM) a zkoumána geometrickou morfometrikou (GM), která zobrazuje variabilitu komplexněji a z jiného úhlu pohledu než SEM. Kultury řas byly určeny do morfotypů podle dostupné literatury pro střední Evropu (Růžička, 1981).

Originální popis *E. humerosum* se více podobá *E. humerosum* var. *affine* v monografiích (viz níže). Originální popis *E. didelta* typ *b* se podobá *E. humerosum* v monografiích (Růžička, 1981; Coesel & Meesters, 2007). Proto jsem si kmeny rozdělila okometricky podle přístupu West & West (1905), kteří se zaměřili na vroubkování bazálního laloku. Krásivky bez vroubkování jsem popsala jako *E. didelta* a s vroubkováním jako *E. humerosum*. Tímto způsobem jsem mohla vyfiltrovat tvarové rozdíly geometrickou morfometrikou mezi *E. didelta*, než kdybych rozlišovala linie s více morfotypy dohromady - *E. didelta*, *E. humerosum* uvnitř jedné linie a *E. didelta* a *E. humerosum* var. *affine* v linii jiné. Morfologické skupiny jsem mohla lépe posoudit i lineárně diskriminační analýzou geometricko-morfometrických dat s daty z literatury (LDA GM dat z literatury). Pro geometricko-morfometrické, metrické analýzy a SEM byly použity 5-7 týdnů staré kultury, kultivované za stejných podmínek.

3.5.1 Světelná a skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Mikrofotografie byly pořízeny digitálním fotoaparátem Olympus E30 (Tokyo, Japonsko) na světelném mikroskopu Olympus BX 51. Z důvodu poruchy předchozího aparátu byl použit později fotoaparát Canon EOS 1100D (Taiwan) na světelném mikroskopu Olympus CX31 (Tokyo, Japonsko). Pro morfometrické analýzy (měření a geometrickou morfometriku) bylo nafoceno 30 buněk od každého kmenu (kromě outgroupu E10 a kmenu E15). Kmen E10 byl tvarově hodně odlišný *E. everettense*. Kmen E15 měl v době posledního focení nedovyvinuté buňky a bez laloků, proto byly buňky pro další analýzy nepoužitelné.

Preparáty pro SEM byly fixované několika kapkami formalínu a ošetřené ultrazvukem, aby se odstranil slizový obal buněk. Připravené vzorky byly nakapány na krycí sklíčka s poly-L-

lysinem; sklíčka byla předtím umytá acetonem a pokrytá třikrát poly-L-lysinovým roztokem (ředěným 1:10 destilovanou vodou). Připravená sklíčka se vzorkem byla přenesena do 30% acetonu a dehydratována acetonovou sérií: po působení v 30% acetonu byly vzorky přemístěny do 50%, 70%, 90%, 95%, 99% (u všech po 10 min) a dvakrát ve 100% acetonu odvodněného kuličkami Nalsit. V laboratoři elektronové mikroskopie byly vzorky po promytí od acetonu usušeny pomocí kapalného CO₂ (v jeho kritickém bodě v přístroji Bal-Tec CPD 030). Vzorky byly nalepeny na destičku a pozlacené v naprašovacím zařízení Bal-Tec SCD 050. Preparáty byly pozorovány ve skenovacím elektronovém mikroskopu JEOL 6380 LV (Hyliš & Nebesářová, 2008a, 2008b).

3.5.2 Geometrická morfometrika a měření

Pro geometrickou morfometriku (GM) a měření byly vybrány nafocené plně vyvinuté semicely. Většina fotografií kmenů byla pořízena fotoaparátem Olympus E30 (Tokyo, Japan) při zvětšení 200x. Kmeny K4 a K57 byly foceny fotoaparátem Canon EOS 1100D (Taiwan) při zvětšení 400x. Fotografie byly otočeny a oříznuty v programu Zoner Photo Studio v. 17-X (Lane et al., 1995-2015).

Rozměry (výška semicely, šířka semicely, isthmus, polární lalok a šířka krku) byly změřeny v programu ImageJ v.2 (Schindelin et al., 2015, viz zkratky obr. 3.1). Bylo použito měřítko pro „40x“ objektiv, které bylo podle potřeby přepočítáno na objektiv „20x“. Každá hodnota byla změřena třikrát a všechny rozměry byly převedeny do tabulkového editoru a spočteny poměry: Ds/Ss, 2Ds/Ss, Ds/I, Ds/Pl, Ds/Sk, Pl/Sk (zkratky viz obr. 3.1). Poměr 2Ds/Ss nahrazoval poměr uváděný v literatuře (poměr délky a šířky buňky). Hodnoty 10. a 90. percentil a statistiky PCA, LDA, CVA, a MANOVA (Wilksova lambda; Bonferroniho korelované p-hodnoty) byly počítány v programu PAST v. 3.20 (Hammer et al., 2001). V grafu PCA a CVA hodnot měření a poměrů byl zobrazen biplot (v programu PAST v. 3.20). Biplot ukazoval míru vlivu použitých proměnných na výsledný graf.

Geometricko-morfometrická data byla analyzována v balíčku TPS - tpsUtil v. 1.60; tps Dig2 v. 2.18; tpsRelw v. 1.67; tps Small v. 1.33 (Rohlf, 2013, 2015, 2016a, 2017a, 2017b). Statistiky byly analyzovány v programu PAST v. 3.20 (Hammer et al., 2001). Bylo použito 36 homologních bodů na semicelu, z toho 18 pevných landmarků a 18 semilandmarků (viz obr. 1.2). Bylo testováno 22 kmenů a v každém kmenu 30 náhodně vybraných buněk.

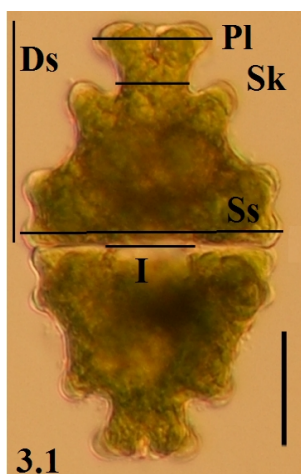
Hodnoty skóre na relativních warpech byly otestovány v programech tpsSmall32 (Rohlf, 2016a) a PAST v. 3.20 (Hammer et al., 2001). Hodnoty z Prokrustovy analýzy a z Kendalova prostoru vykazovaly v programu tpsSmall32 lineární závislost (Rohlf, 2016a). PCA geometricko-

morfometrických dat (relativních warpů) zjistila míru variability pro jednotlivé PC osy, v programu PAST v. 3.20 (Hammer et al., 2001). Grafické výstupy tpsRelw v. 1.54 (Rohlf, 2014) byly zarovnané podle PCA a sloužily pro zjištění znaků, kterými se mezi sebou navzájem lišily jednotlivé části grafu - kladné a záporné části PC os.

Při výpočtech mezi stejnými typy dat, např. u skóre na relativních warpech, byla použita variance. Při kombinaci relativních warpů s měřením byla použita korelace, podobně jako u měřených dat spolu s jejich poměry.

Geometrickou morfometrikou byly testovány tři molekulární linie trnG intronu, byly pojmenovány pracovníě jako linie A: *humerosum*, linie B: *scandinave*, linie C: *affine*. Data byla spojena s měřením. Kvůli přítomnosti dvou morfotypů v liniích byly všechny kmeny rozděleny podle přístupu West & West (1905; podle převažujícího morfotypu *E. didelta* nebo *E. humerosum*) do pěti morfologických podskupin: linie A (*humerosum-didelta*, *humerosum-humerosum*), linie B (*scandinave*), linie C (*affine-didelta*, *affine-humerosum*). Následně byly vytvořeny dva subsety podle přítomnosti morfotypu *E. humerosum* nebo *E. didelta*: *humerosum* se dvěma podskupinami (*humerosum-humerosum*, *affine-humerosum*) a *didelta* se třemi podskupinami (*humerosum-didelta*, *scandinave*, *affine-didelta*).

Pro přiřazení krásivek z literatury (z Evropy a Severní Ameriky) k pěti morfologickým podskupinám byla použita lineárně diskriminační analýza (LDA) dat geometrické morfometrie a měření. Krásivky z literatury byly analyzovány spolu s originálně nafocenými a změřenými buňkami zkoumaných kmenů. Pro přesnější výsledky byly použity testy čistě geometrické morfometrie (GM), geometrické morfometrie s poměry (GM+P) a geometrické morfometrie s poměry a měřením (GM+MP). Výjimečně se přihlíželo i k datům vyšlým v LDA GM dat s nedefinovanou skupinou (označenou v programu PAST jako „?“). Při definitivním přiřazení, krásivky z literatury do morfologické podskupiny, jsem přihlížela nejen k výsledkům LDA, ale i k rozměrům dané linie.



Obr. 3.1 Atributy měření pro semicelu. Legenda: **Ds** – délka semicely, **I** – isthmus, **Pl** – polární lalok, **Sk** - šířka krku, **Ss** – šířka semicely. Kmen K27, archiv autora, měřítko 30 μ m.

4. Výsledky:

4.1 Fylogenetické analýzy

U druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* jsem odhalila genetickou variabilitu u obou molekulárních markerů, trnG intronu a SSU intronu.

4.1.1 trnG intron

Fylogenetickou analýzou trnG intronu (přes 700 nukleotidů dlouhého) jsem zkoumala 24 kmenů druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta*, včetně outgroupu *E. everettense* (viz obr. 4.1; viz *alignment* v elektronické příloze). Získala jsem tři dobře podpořené linie se statistickou podporou: BI/ML/MP: linii A (1.00/100/99), linii B (?/95/90, a linii C (1.00/99/100). Genetická vzdálenost byla mezi liniemi A a B: 0,016, mezi liniemi A a C: 0,027, a mezi liniemi B a C: 0,011. Mezi outgroupem *E. everettense* a skupinami druhového komplexu byly genetické vzdálenosti větší než 0,05 (mezi outgroupem a linií: A - 0,075, B – 0,058, C - 0,061).

Konečný alignment obsahoval 848 znaků. Bez mezer a chybějících dat bylo v analýzách použito 756 pozic nukleotidů. Mezi třemi liniemi bylo 744 znaků bez polymorfismu a 12 polymorfních pozic (6 transverzí, 5 tranzic a 1 indel).

4.1.2 SSU intron

Fylogenetickou analýzou SSU intronu jsem zkoumala 18 kmenů druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta*, včetně outgroupu *E. everettense*. Použila jsem méně kmenů, protože měly některé kmeny totožné sekvence trnG intronu a místo odběru.

První polovina sekvence SSU intronu byla dobře čitelná a druhá polovina byla značně polymorfní. Kromě kmenů E10 a K55 byly sekvence první poloviny SSU intronu totožné. Ostatní kmeny se lišily v polymorfním úseku. Pro použitelnost druhé poloviny sekvence jsem vynechala pozice, na kterých byla informace pro dva nukleotidy (tzv. duality).

SSU intron byl přes 400 nt dlouhý. Skupinu kmenů E9 a K56, *E. humerosum* var. *affine* jsem získala se statistickou podporou MP/ML: 63/64, další skupiny neměly jasně rozdělené skupiny (viz obr. 4.2 a, b). Původně bylo 528 pozic alignmentu. Po vynechání dualit jsem spočítala ML strom z 426 pozic. SSU intron byl uvnitř druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* velice variabilní (viz *alignment* v elektronické příloze). Bayesův fylogenetický strom nekoreloval s výsledky ML/MP stromu pro SSU intron (viz obr. 4.2 b).

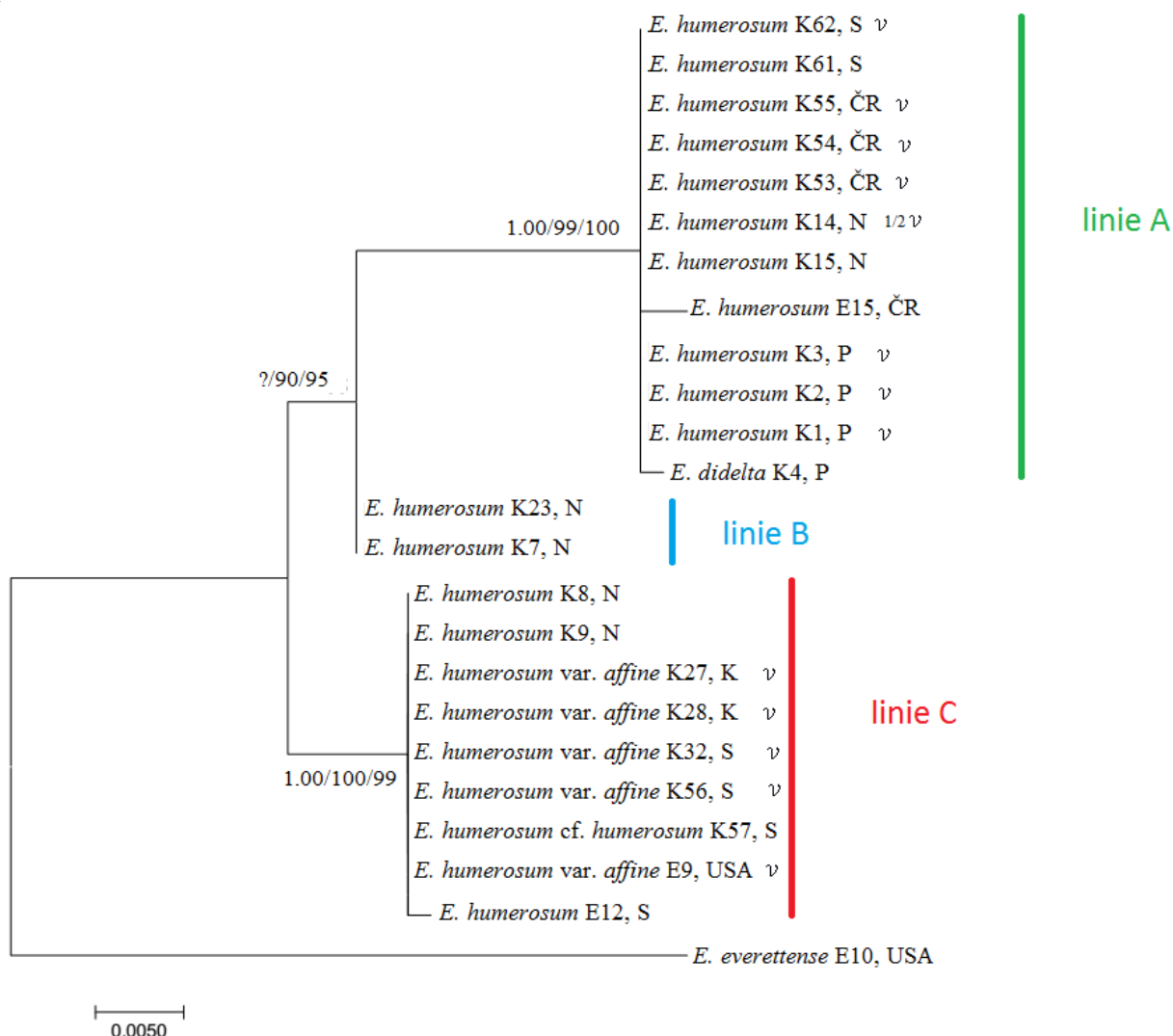
4.1.3 Konkatenované sekvence trnG intronu a SSU intronu

Konkatenací trnG intronu a SSU intronu jsem získala tři oddělené linie se statistickou podporou BI/ML/MP: 74/-/91. Rozdělení dvojice linií B a C od zbytku kmenů bylo s ML statistickou podporou 56. Fylogeneze SSU intronu korelovala s liniemi trnG intronu jen částečně. Kmen E10 (outgroup *E. everettense*) byl uvnitř linie C, nebyl oddělený jako u trnG intronu (viz obr. 4.3).

Dále se ve výsledcích zabývám liniemi trnG intronu, a jejich podskupinami podle základních morfotypů druhového komplexu, *E. humerosum* vs. *E. didelta* (viz metodika). Pro přehled jsem v obr. 4.1 zobrazila, zda je u kmenů přítomné vroubkování bazálního laloku. Především u linií A a C bylo vroubkování bazálního laloku přítomno nebo naopak chybělo.

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

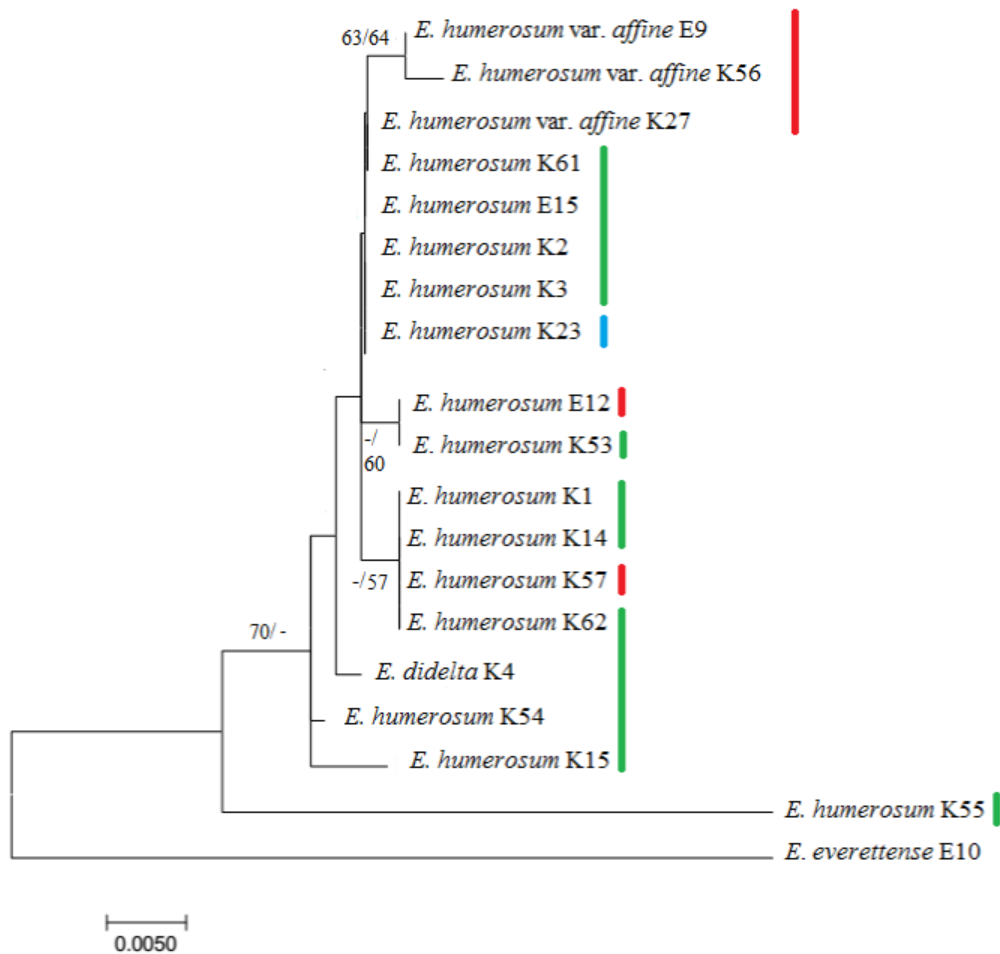
4.1



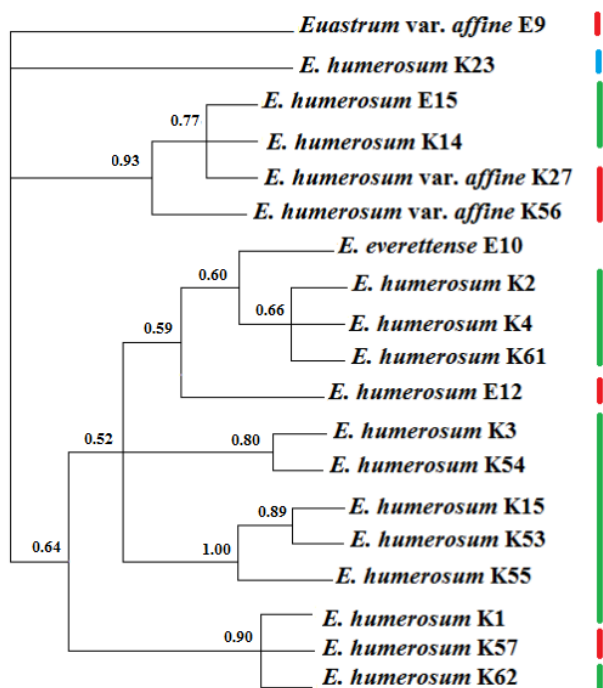
Obr. 4.2. Fylogenetické stromy pro SSU intron **a**: ML strom s hodnotami statistické podpory MP/ML; měřítko zobrazuje odhadovaný počet substitucí na nukleotid; **b**: strom z programu MrBayes s BI statistickou podporou. Nad uzly jsou uvedeny statistické podpory s hodnotami většími než 50.

4.2

a

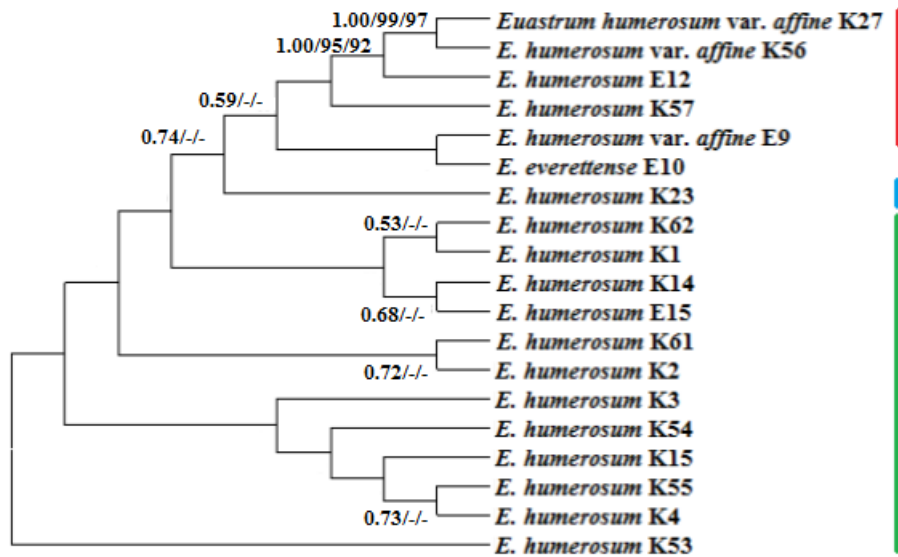


b

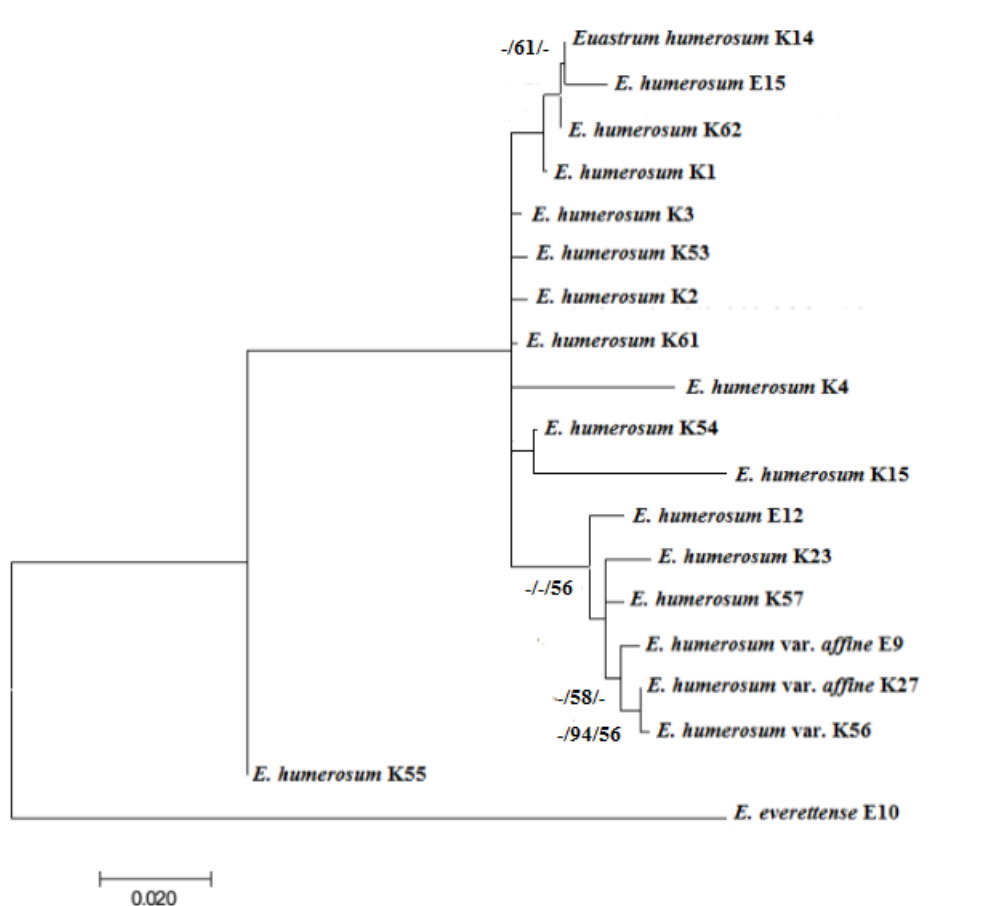


Obr. 4.3. Fylogenetický nezakořeněný strom pro konkatované sekvence trnG intronu a SSU intronu **a**: z programu MrBayes s hodnotami statistické podpory BI/MP/ML; **b**: ML strom se stejnými hodnotami a **c**: MP strom na další stránce. Nad uzly jsou uvedeny statistické podpory s hodnotami většími než 50.

4.3 a

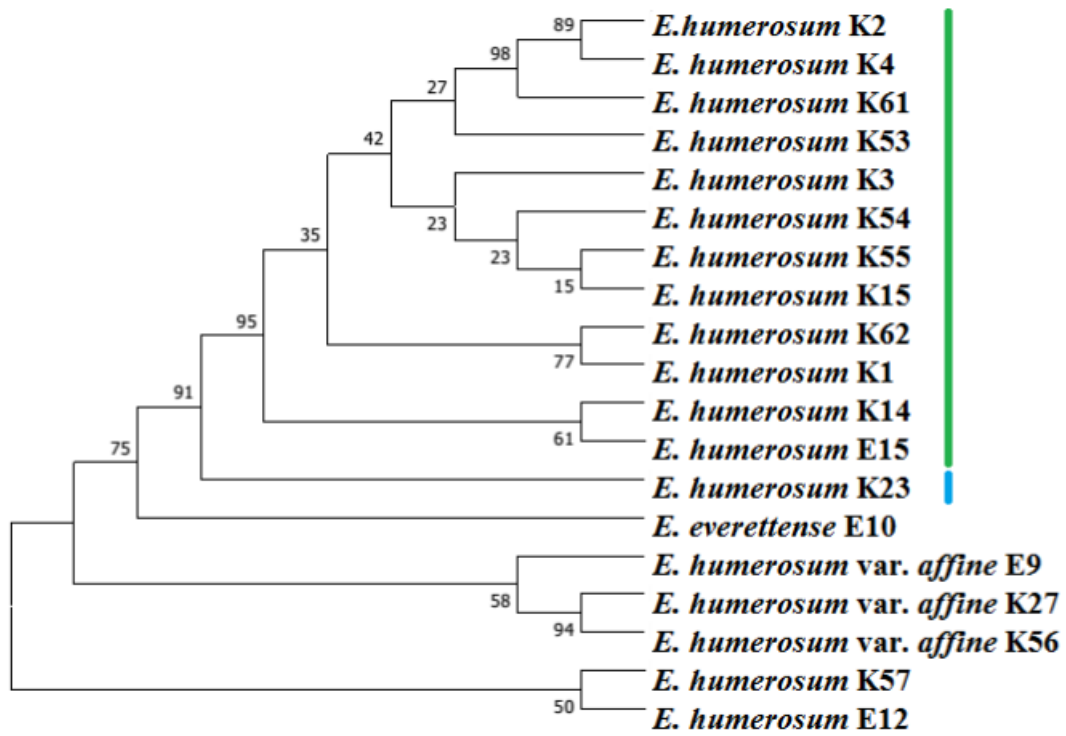


b



Obr. 4.3 – pokračování.

c



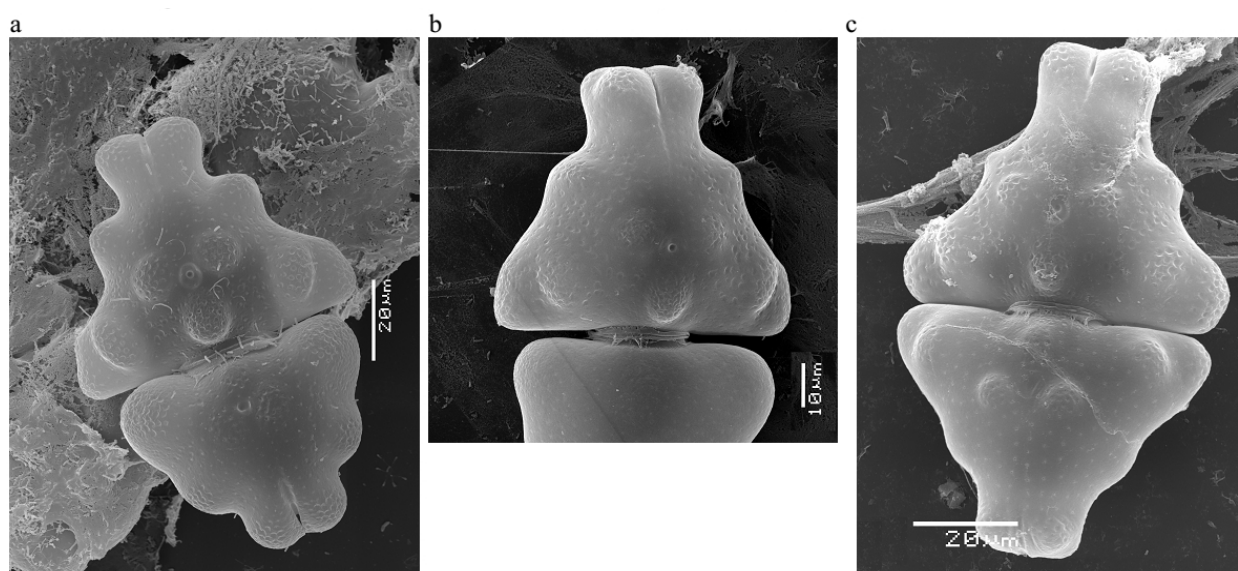
4.2 Morfologie buněk

U krásivek jsem zkoumala i jejich morfologii. Kultivované kmeny se podobaly jiným morfotypům než původně byly určeny při jejich kultivaci. Evoluční linie A a C měly uvnitř dva základní morfotypy – *Euastrum humerosum* a *E. didelta*. Tyto morfotypy se lišily vroubkováním bazálního laloku (*E. didelta* bylo bez něj). Proto jsem tyto dvě linie rozdělila do podskupin.

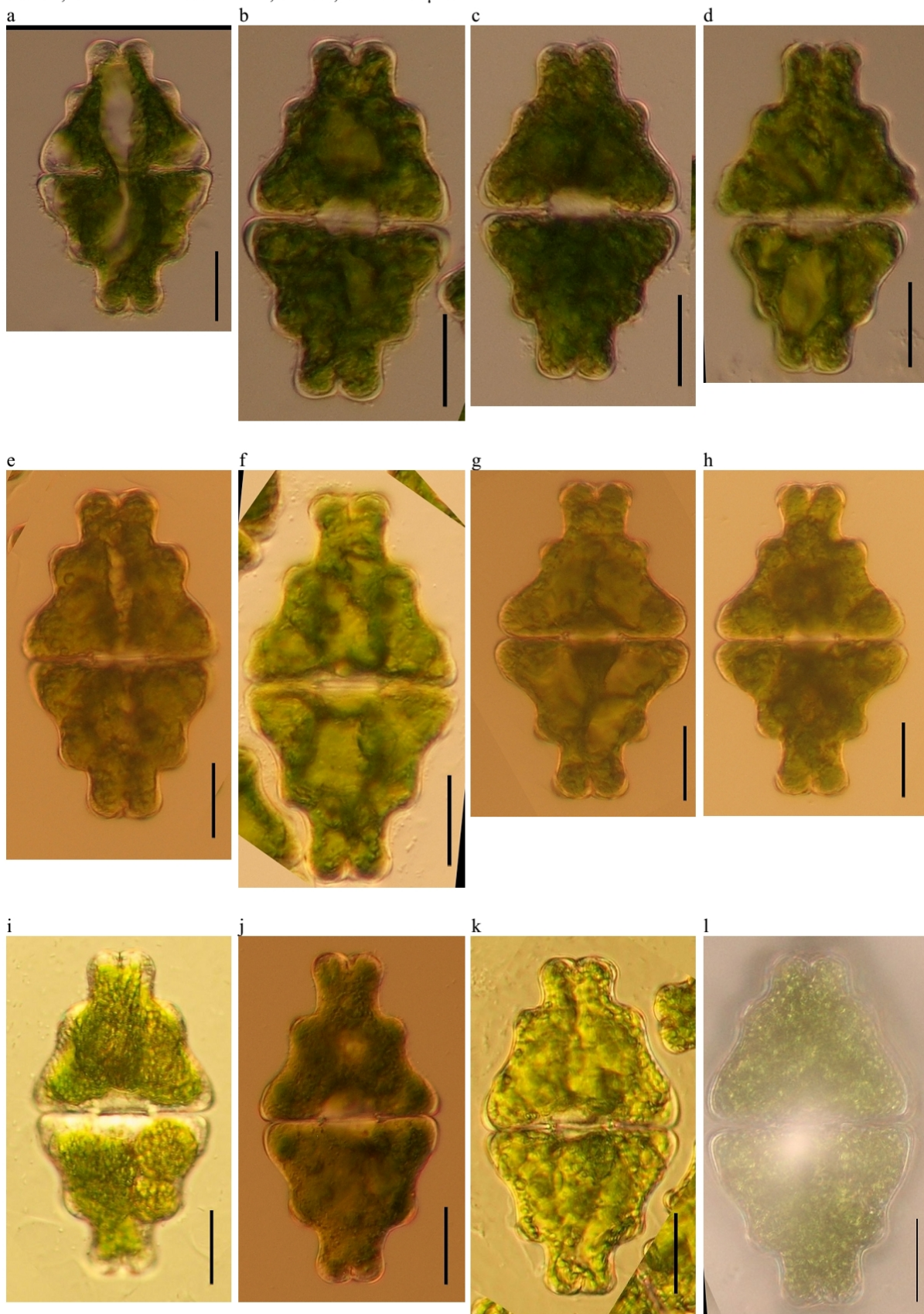
Celkem bylo pět morfologických podskupin podle převažujícího morfotypu: v linii A – *humerosum-didelta*, *humerosum-humerosum*, v linii B – *scandinave*, v linii C – *affine-didelta*, *affine-humerosum* (viz Tabule I-III, a tab. 4.1). Pro zjištění rozdílů mezi liniemi jsem proto celý soubor rozdělila na dva subsety: *humerosum* s dvěma podskupinami (*humerosum-humerosum* a *affine-humerosum*) a *didelta* s poskupinami (*humerosum-didelta*, *scandinave*, a *affine-didelta*; viz tab 4.7-4.9). V každém subsetu se linie lišily v něčem jiném. V subsetu *didelta* se linie lišily svým krkem: v linii A se krk směrem k tělu krásivky zužoval; v linii B byl ve tvaru A; v linii C byl tvar podobný jako v linii A. Linie C se lišila od ostatních především proto, že bazální laloky byly mnohem širší než ostatní laloky v buňce. Mezi liniemi se krk lišil i svým rozměrem (viz podkap. 4.3.1). V subsetu *humerosum* se linie lišily svým polárním lalokem: v linii A byl užší než v linii C. Na tabulích I-III jsou zobrazeny mikrofotografie kmenů uvnitř různých morfologických podskupin.

Skenovací elektronovou mikroskopií jsem zjistila u všech linií, že: v každé semicele byly tři centrální hrbolky s jedním centrálním pórem a dva laterální hrbolky po stranách bazálního laloku. Povrch buněčné stěny byl vzorkován jemnými důlky v místě růstu buňky – v lalocích a v hrbolcích (viz obr. 4.4).

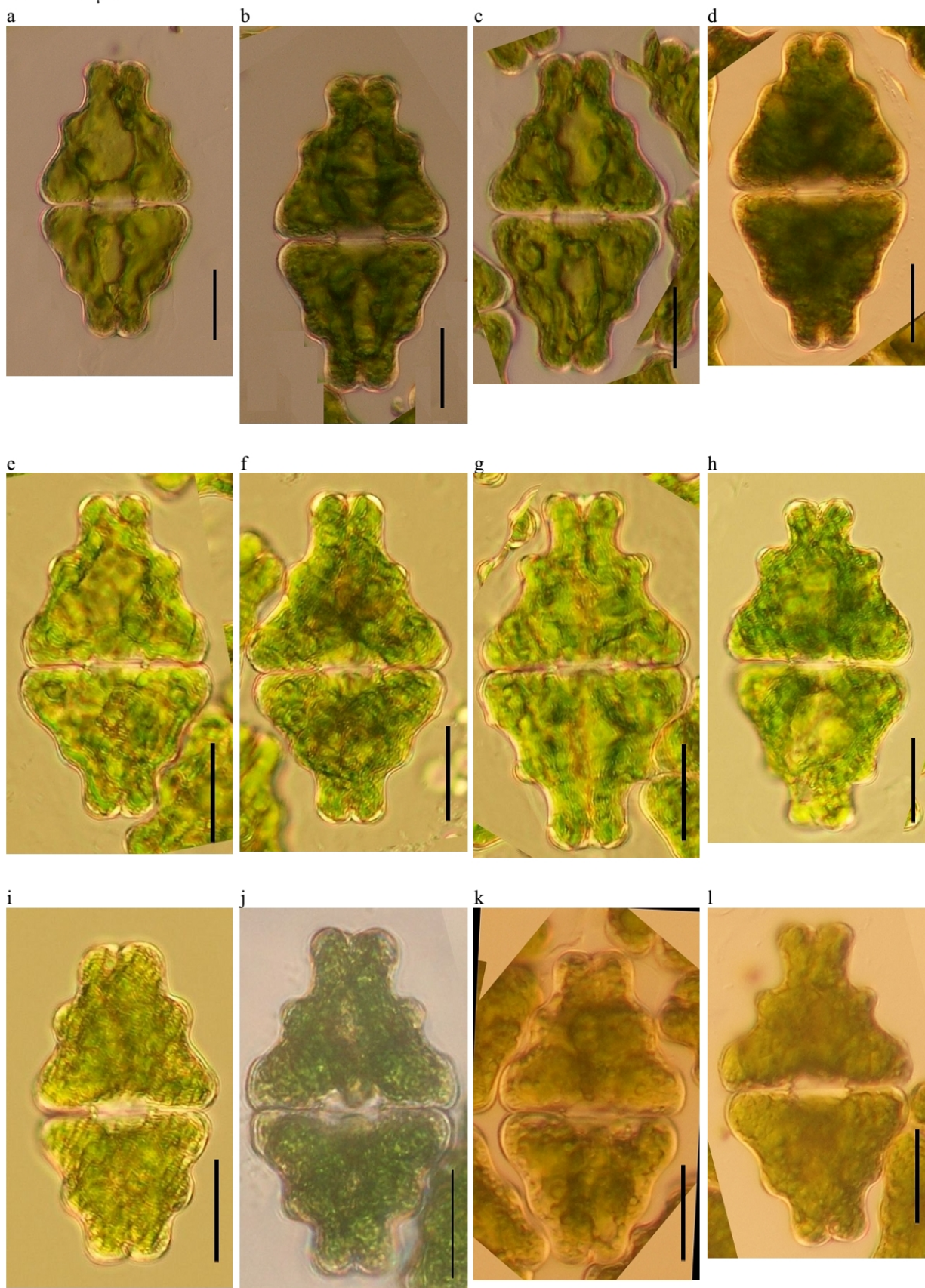
Obr. 4.4. Fotografie ze SEM, **a:** linie A, kmen K61, **b:** linie B, kmen K23, **c:** linie C, kmen K8.



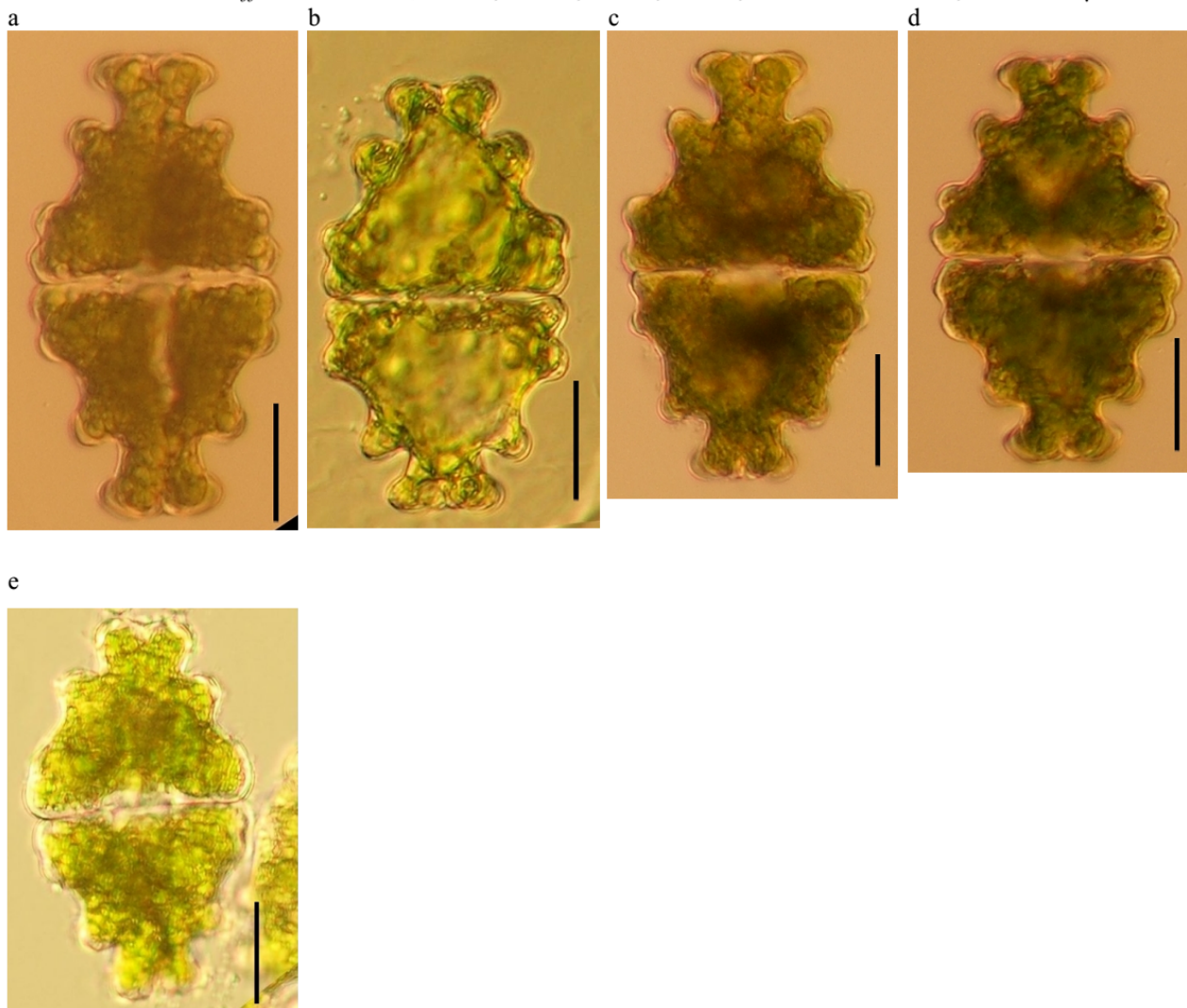
Tabule I. Linie A- humerosum-humerosum, a: K1, b-d: K3, e: K55, f: K53, g-h: K61, humerosum-didelta: i - j: K14, k: K15, l: K4. Zvětšení: a-k: 200x; l: 400x, měřítko 30µm.



Tabule II. Linie B, a-c: K7, d: K23. **Linie C – affine – didelta**, e-g: K8, h: K9, i: E12, j-l: K57. Zvětšení 200x, měřítko 30 μm .



Tabule III. Linie C – *affine-humerosum*, a: K56, b: K28, c: K27, d: K32, e: E9. Zvětšení 200x, měřítko 30 μm.



4.3 Metrické analýzy a geometrická morfometrika

4.3.1 Měření

U krásivek jsem změřila rozměry délky (Ds), šířky semicely (Ss), polárního laloku (Pl), šířky krku (Sk), a isthmu (I) a zjistila jsem poměry v rámci vývojových linií a v morfologických podskupinách (viz tab. 4.1, 4.2, 4.3). Kmeny se navzájem lišily svojí délkou i šířkou svých semicel (viz graf 4.1-4.2). Kmen K61 byl signifikantně odlišný svými rozměry od všech ostatních kmenů.

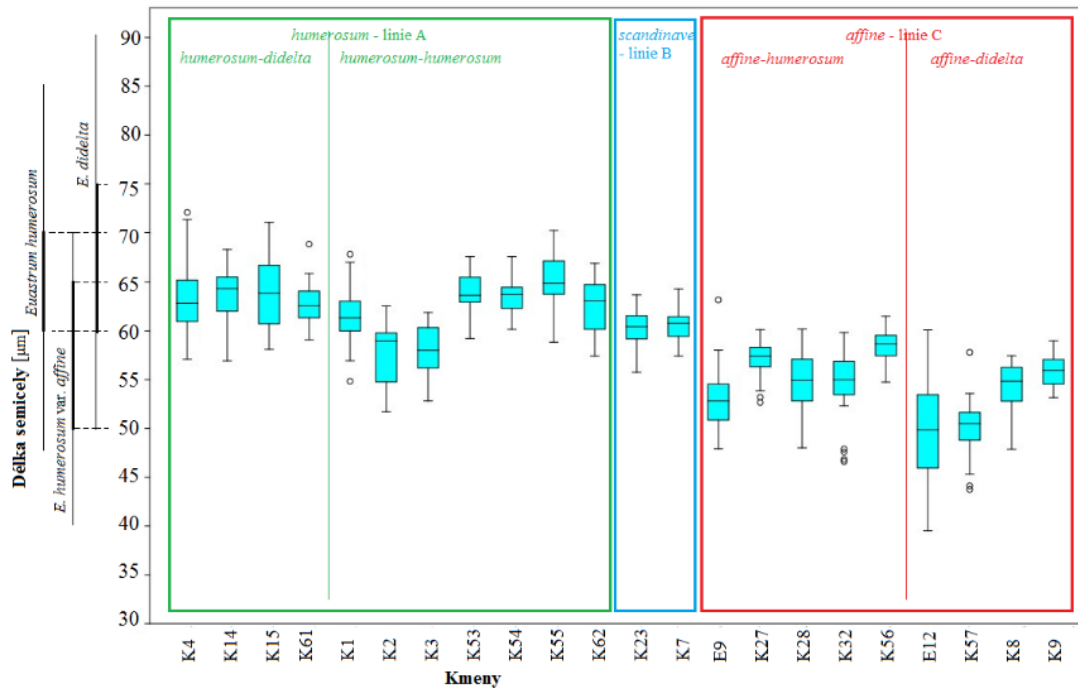
Tab. 4.1. Hodnoty měření pro tři linie trnG intronu; v závorce jsou uvedena maxima a minima, nejčastější hodnoty jsou uvedeny v rozmezí mezi 10. a 90. percentilem; Ds – délka semicely, Ss – šířka semicely.

	<i>Délka semicely</i>	<i>Šířka semicely</i>	<i>Isthmus</i>
<i>Linie A (humerosum)</i>	(52)58-67(72)	(62)68-79(87)	(15)- 18-23-(28)
<i>Linie B (scandinave)</i>	(56)58-63(64)	66-72(74)	18- 21-(22)
<i>Linie C (affine)</i>	(40)48-59(63)	(49)57-70(75)	(13)- 17-21 -(24)
	<i>Polární lalok</i>	<i>Šířka krku</i>	<i>2Ds/Ss</i>
<i>Linie A (humerosum)</i>	(23)- 27-32 -(35)	(22) -25-31- (37)	(1,5) - 1,6-1,8 - (1,9)
<i>Linie B (scandinave)</i>	(27)- 28-30 -(31)	(26) -28-30- (33)	(1,6) - 1,7-1,8 - (1,9)
<i>Linie C (affine)</i>	(19)- 24-33 -(37)	(16)-19-26 - (30)	(1,5) - 1,6-1,8 - (2,1)

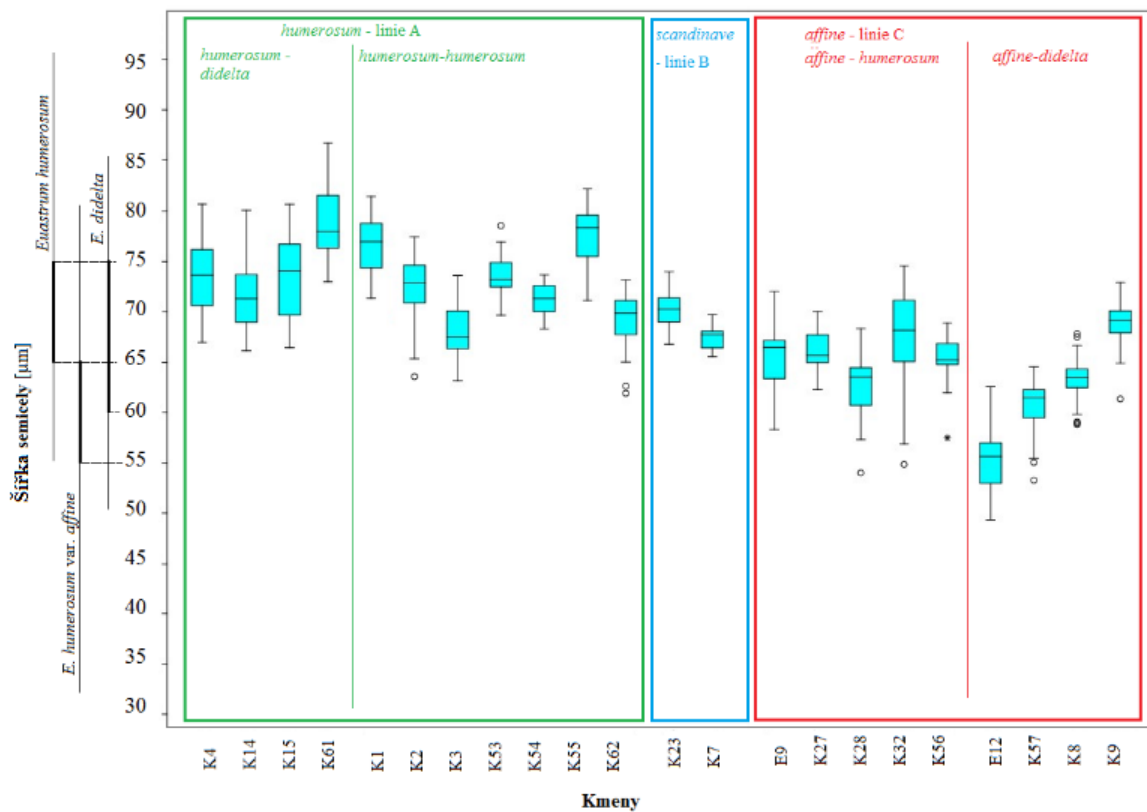
Tab. 4.2. Poměry rozměrů semicely pro linie trnG intronu. Ds – délka semicely, I- isthmus, Pl – polární lalok, Sk – šířka krku, Ss – šířka semicely (viz obr. 3.1; a obr. 4.1).

	<i>Ds/Ss</i>	<i>Ds/I</i>	<i>Ds/Pl</i>
<i>Linie A</i>	(0,7) - 0,8-0,9 - (1)	(2,2) - 2,7-3,5 - (4,1)	(1,8) - 1,9-2,4 - (2,5)
<i>Linie B</i>	0,8-0,9	(2,6) - 2,8-3,3 - (3,5)	(1,9) - 2-2,2
<i>Linie C</i>	(0,7) - 0,8-0,9 - (1)	(2,2) - 2,5-3,3 - (3,8)	(1,5) - 1,7-2,2 - (2,6)
	<i>Ds/Sk</i>	<i>Pl/Sk</i>	
<i>Linie A</i>	(1,8) - 2-2,5 - (2,8)	(0,8) - 1-1,2 - (1,3)	
<i>Linie B</i>	(1,8) - 1,9-2,2 - (2,3)	0,9-1,1	
<i>Linie C</i>	(1,4) - 2-2,9 - (3,2)	(0,9) - 1-1,6 - (1,8)	

Graf 4.1. Grafy délek semicely u zkoumaných kmenů, vlevo je porovnání s morfotypy (viz tab.1.2).



Graf 4.2. Grafy šířek semicely u zkoumaných kmenů, vlevo je porovnání s morfotypy (viz tab.1.2).



Tab. 4.3. Rozměry semicely pro pět morfologických podskupin (z linie A: *humerosum-didelta*, *humerosum-humerosum*, B: *scandinave*, C: *affine-didelta*, *affine-humerosum*).

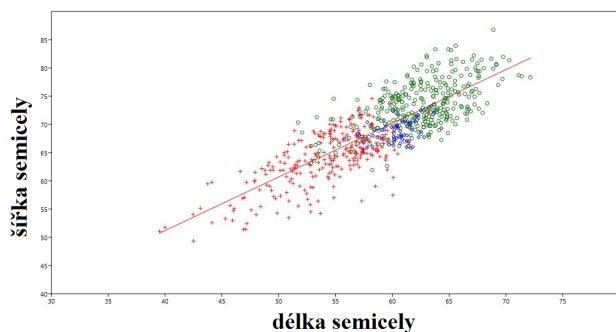
	délka semicely	šířka semicely	isthmus
<i>humerosum-didelta</i>	(57)-60-68-(72)	(66)-68-81-(87)	(17)-20-24-(28)
<i>humerosum-humerosum</i>	(52)-57-67-(70)	(62)-67-79-(82)	(15)-18-22-(25)
<i>scandinave</i>	(56) - 58-63 - (64)	66-72 - (74)	18-21 - (22)
<i>affine-didelta</i>	(40)-46-57-(60)	(49)-54-70-(73)	(15)-16-22-(24)
<i>affine-humerosum</i>	(47)-51-59-(63)	(54)-61-70-(75)	(13)-17-20-(23)
	poměr délka/šířka	polární lalok	šířka krku
<i>humerosum-didelta</i>	(1,5)-1,6-1,8-(1,9)	(25)-27-32-(35)	(23)-25-31-(33)
<i>humerosum-humerosum</i>	(1,5)-1,6-1,8-(1,9)	(23)-27-32-(35)	(22)-25-31-(37)
<i>scandinave</i>	(1,6) - 1,7-1,8 - (1,9)	(27) - 28-30 - (31)	(26) - 28-30 - (33)
<i>affine-didelta</i>	(1,5)-1,6-1,9-(2)	(19)-21-29-(31)	(16)-20-27-(30)
<i>affine-humerosum</i>	(1,5)-1,6-1,8-(2,1)	(24)-28-34-(37)	(18)-19-24-(26)

Měřením semicel jsem získala tři signifikantně oddělené vývojové linie, kde šířka byla závislou proměnnou na délce semicely (viz graf 4.3), Bonferroniho korelovaná p-hodnota byla $p < 10^{-12}$. Wilksova lambda pro tři vývojové linie A, B, C vyšla 0,21 (v rámci MANOVA). Nevysvětlená variabilita byla pro tři linie 21%. Použitím základních rozměrů délky (Ds) a šířky semicely (Ss), isthmusu, a poměru 2Ds/Ss byla nevysvětlená variabilita 41,25%, se signifikancí $p < 10^{-118}$. Graf 4.4 zobrazuje závislost tří základních rozměrů mezi třemi liniemi.

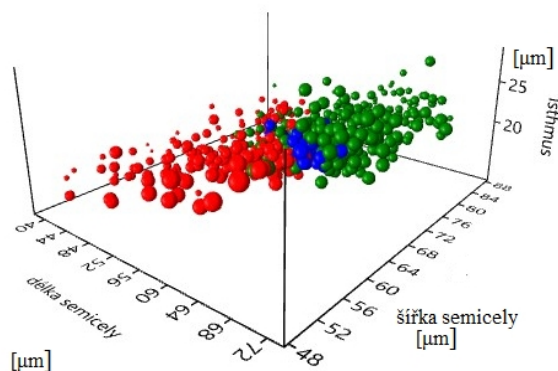
V analýze hlavních komponent (PCA) hodnot měření a poměrů jsem získala 11 nenulových PC os. První PC osa zobrazila 31,2 % z celkové variability. V kladné části osy byly linie A a B, a v zápornějších hodnotách byla linie C. Linie se navzájem překrývaly, tak jako i v ostatních PC osách (viz graf 4.5). Druhá PC osa zobrazila 24,8 % z celkové variability. Třetí PC osa zobrazila 21,2 % z celkové variability. Čtvrtá PC osa zobrazila 12,7 % z celkové variability. Pátá PC osa zobrazila 9,6 % z celkové variability.

Graf 4.3-4.4. Grafy zobrazující funkční závislost rozměrů pro vývojové linie A, B a C. Legenda: **zeleně** – linie A, **modře** – linie B, **červeně** – linie C. **Graf 4.3.** Lineární model závislosti šířky na délce semicely pro tři linie. Model: $y = 0,95 + 13,18 x$, kde x je délka semicely, y je šířka (semicely). Statistika: $r = 0,819$; $p = 6,926E^{-161}$. **Graf 4.4.** 3D graf závislosti hodnot rozměrů semicely (délka, šířka a isthmus) pro linie A, B, a C. Rozměry jsou uvedené v μm .

Graf 4.3.



Graf 4.4.



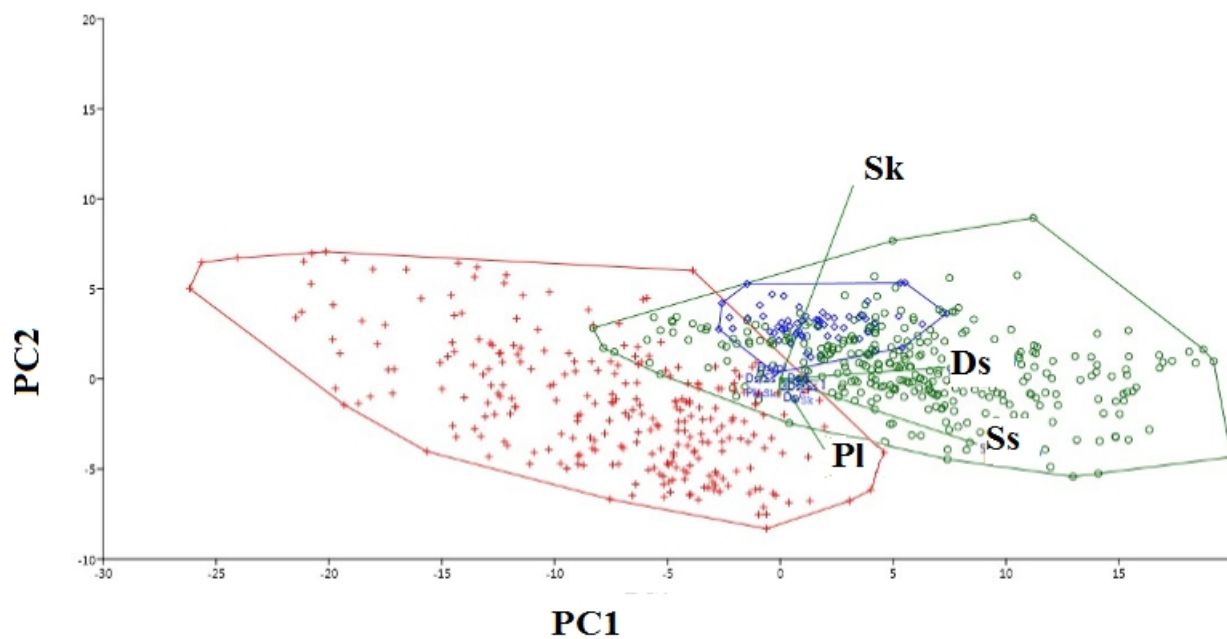
Z biplotu uvnitř grafu PCA jsem, pro jednotlivé osy v programu PAST, zjistila největší vlivy některých proměnných – délka a šířka semicely, šířka krku a polární lalok (D_s , S_s , S_k , Pl ; viz graf 4.5). Délka a šířka semicely (D_s a S_s) byly nejbližší první PC ose. Šířka krku (S_k) byla nejbližší druhé PC ose. Proměnná polárního laloku (resp. šířka Pl) byla nejbližší ve směru třetí a čtvrté PC osy. Poslední rozměr isthmus (I) byl nejbližší páté PC ose. Poměry měly malý vliv pro rozdělení skupin.

Lineární diskriminační analýza (LDA) tří linií vyšla, pro data měření pěti rozměrů s jejich poměry, z 85,15%. První CV osa rozdělovala z 95,7 %. Druhá CV osa rozdělovala z 4,3 % (viz graf 4.6). Linie A a B se překrývaly v záporné části první CV osy, linie C byla převážně v kladné části první CV osy.

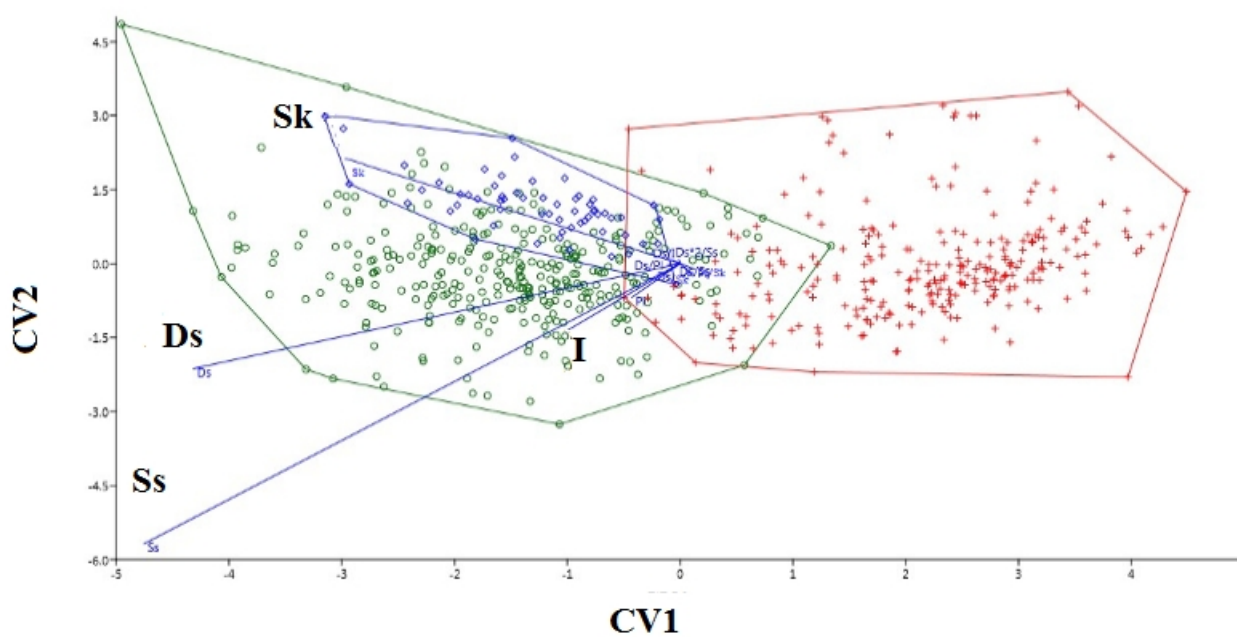
Biplot uvnitř grafu CVA ukazoval největší vliv tří rozměrů: délky a šířky semicely; a šířky krku (viz graf 4.6). Tyto výsledky korelovaly s viditelnými rozdíly v grafech 4.1 a 4.2 a dále v tabulce tab. 4.1. Nejdelší buňky byly u linie A a nejkratší buňky u linie C. Široký krk měly buňky linií A a B; a úzký krk měly buňky linie C.

Pro data měření byla diskriminace (LDA) tří linií trnG intronu úspěšná pro více než 85% buněk. Linie A se zaměňovala s linií B z 20,3% (67 buňkami) a s linií C z 2,42% (8 buňkami). Linie B se zaměňovala s linií A z 10 % (6 buňkami). Linie C se zaměňovala s linií A z 4,07 % (11 buňkami) nebo s linií B z 1,48 % (4 buňkami). Nejvíce se zaměňovaly linie A a B (viz graf 4.6). Linie C se odlišovala od ostatních krásivek natolik, že se jen asi z 5-6% zaměňovala s jinou linií.

Graf 4.5. Graf PCA molekulárních linií s biplotem, s hodnotami měření (rozměrů a poměrů). Legenda: ○ linie A; ◇ linie B; + linie C. Zkratky viz obr. 3.1.



Graf 4.6. Graf CVA molekulárních linií s biplotem, s hodnotami měření (rozměrů a poměrů). Legenda: viz výše.



4.3.2 Geometrická morfometrika

Geometrickou morfometrikou jsem porovnávala mezi sebou 22 kmenů v rámci tří linií trnG intronu, s použitím 18 landmarků a 18 semilandmarků (viz graf 4.7; tab. 4.6-4.7 a tab. 4.9). Tři vývojové linie i pět morfologických podskupin jsem odlišila signifikantně geometrickou morfometrikou (viz podkap. 4.3.2.1; 4.3.2.2; tab. 4.6-4.7). Pět podskupin jsem rozdělila na dva subsety *didelta* a *humerosum* (viz tab. 4.7; tab. 4.9). Kmeny jsem rozdělila do subsetů, resp. podskupin v rámci linií, podle převládajícího morfotypu buněk. Použila jsem přístup West & West (1905): vroubkovaný okraj bazálního laloku měly kmeny v subsetu *humerosum*, hladký okraj bazálního laloku měly kmeny v subsetu *didelta*. Dosáhla jsem jednotného rozdělení landmarků pro jednotlivé subsety, protože křivka polárního a bazálního laloku se uvnitř základních morfotypů *E. humerosum*/*E. didelta* lišila.

Zjistila jsem tvarové tendence linií a podskupin na *deformované mřížce* (viz tab. 4.4; tab. 4.8). U *E. humerosum* linií A a C byly obě křivky polárního a bazálního laloku komplexnější. U *E. didelta* byly největší rozdíly v polárním laloku a šířce krku. Dvojice linií A a B měla relativně (oproti polárnímu laloku) širší krk než linie C. Linie C měla relativně nejširší polární lalok a relativně nejužší krk (viz tab. 4.7-4.8 a 4.10).

Rozměry a poměry jsem přidala jako další proměnné v analýze PCA a LDA (viz tab. 4.6; tab. 4.9).

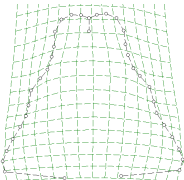
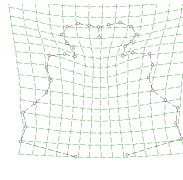
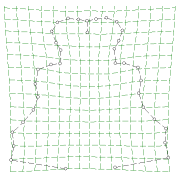
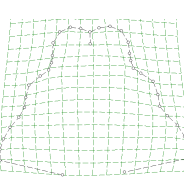
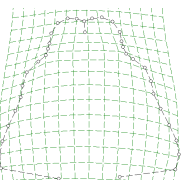
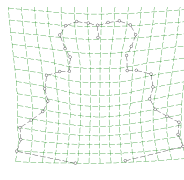
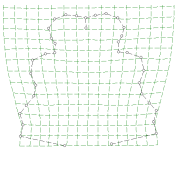
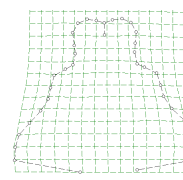
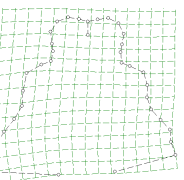
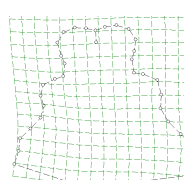
4.3.2.1 Geometrická morfometrika u tří linií trnG intronu

Nesymetrizovanou analýzou PCA geometricko-morfometrických dat (relativních warpů, neboli po superimpozici landmarků; GPA) jsem získala 68 nenulových PC os.

Jaké tvarové tendence měly jednotlivé podskupiny jsem zjistila z tpsRelw výstupů, které byly zarovnané podle PCA (viz tab. 4.4). *První* PC osa zobrazila 33,8 % z celkové variability. V záporné části osy, kde se překrývaly všechny linie, měly buňky zářezy mělké. V kladné části osy, kde převažovala linie C byly zářezy naopak hlubší a krátký krk. *Druhá* PC osa zobrazila 15,5 % z celkové variability. V záporné části osy, kde byly linie A a C, měly buňky zářezy hluboké. V kladné části osy, kde byla z malé části linie A a dále linie B a C, byly zářezy mělké. *Třetí* PC osa zobrazila 10,6 % z celkové variability. V záporné části osy měly buňky zářezy mělké, v kladné části zářezy hluboké a relativně delší krk. *Čtvrtá* PC osa zobrazila 9,3 % z celkové variability, v záporné části osy byly buňky rovnoměrně laločnaté a v kladné části byl široký bazální a úzký polární lalok, celkový tvar buňky byl trojúhelníkový. *Pátá* PC osa zobrazila 5,6 % variability (viz graf 4.7 A; tab.

4.4). Přidáním rozměrů a poměrů se v PCA více odlišila dvojice linií A a B od linie C (viz graf 4.7B).

Tab. 4.4. Rozklad variability pro celý druhový komplex *Euastrum humerosum/didelta*, pro kladnou a zápornou část osy (grafický výstup tps.Relw, použito z archivu autora).

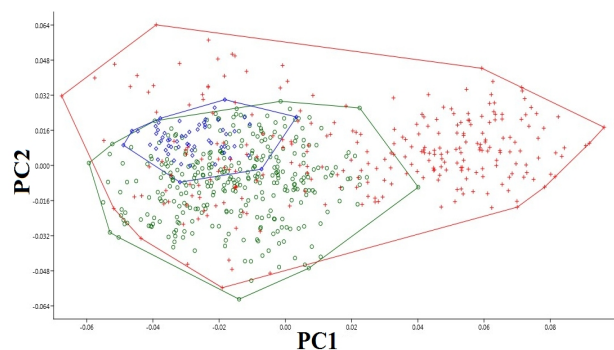
<i>Euastrum humerosum/didelta</i>					
PC1; 33,8 %		PC2; 15,5 %		PC3; 10,6 %	
-	+	-	+	-	+
					
<i>Euastrum humerosum/didelta</i>					
PC4; 9,3 %		PC5; 5,6 %			
-	+	-	+		
					

Diskriminace tří linií vyšla pro GM data z 88,79%, se signifikancí $p < 10^{-14}$ a nevysvětlenou variabilitou 20 % (Wilksova lambda 0,20, viz tab. 4.6). Linie trnG intronu se v CVA grafu částečně překrývaly (viz graf 4.7C). S přidáním rozměrů a poměrů vyšla diskriminace lépe z 95,3 %, se signifikancí $p < 10^{-16}$ a nevysvětlenou variabilitou 9 % (Wilksova lambda 0,09; viz tab. 4.6). Linie trnG intronu se překrývaly v CVA grafu méně než při použití pouze GM dat (viz graf 4.7D).

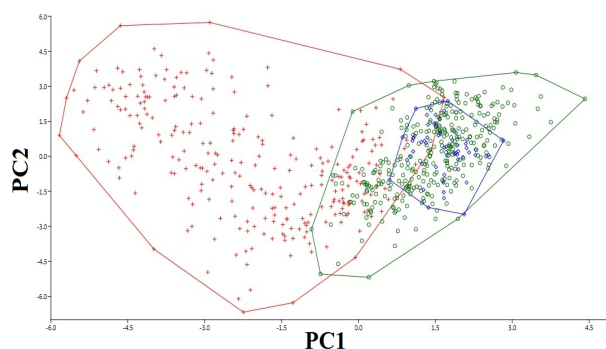
LDA geometricko-morfometrických dat rozlišila linie A,B z více než 91%, spojením s měřením z více než 93%. LDA geometricko-morfometrických dat rozlišila linii A s linií C, nebo linii B s linií C z více než 95%, spojením s měřením z více než 99%. Měření pomohlo rozlišit linie mezi sebou o 2 až 4% lépe než jen podle samotného tvaru. V CVA grafu se buňky překrývaly, protože měly podobný charakter – tvar nebo rozměry semicely (viz tzv. *confusion matrix*, tab. 4.5; grafy 4.7 C, D).

Graf 4.7. A-B: PCA pro tři linie: graf rozkladu variability GM dat mezi třemi liniemi; **C-D:** CVA: – diskriminace tří linií. Legenda: **O** linie A; **◇** linie B; **+** linie C; GM – geometrická morfometrika.

A: GM

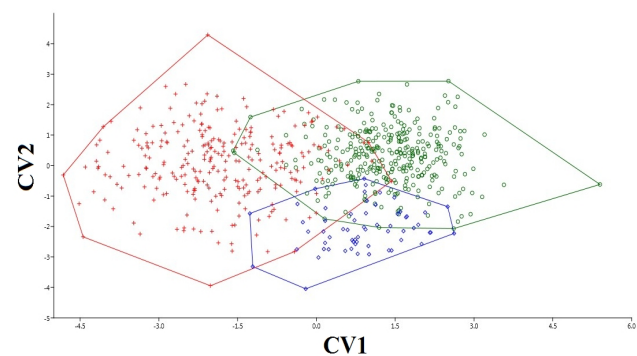


B: GM s měřením a poměry

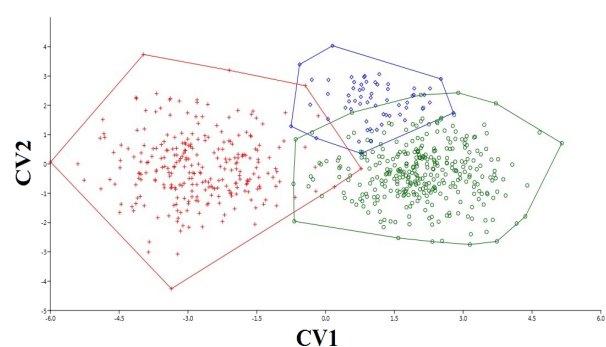


C-D: CVA grafy pro 3 skupiny.

C: GM



D: GM s měřením a poměry



Tab. 4.5. Confusion matrix: procentuální zastoupení správně diskriminovaných evolučních linií mezi sebou, v horním trojúhelníku pouze s geometricko-morfometrickými (GM) daty, v dolním trojúhelníku jsou GM data spojené s měřením.

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

4.3.2.2 Geometrická morfometrika (GM) u pěti morfologických podskupin

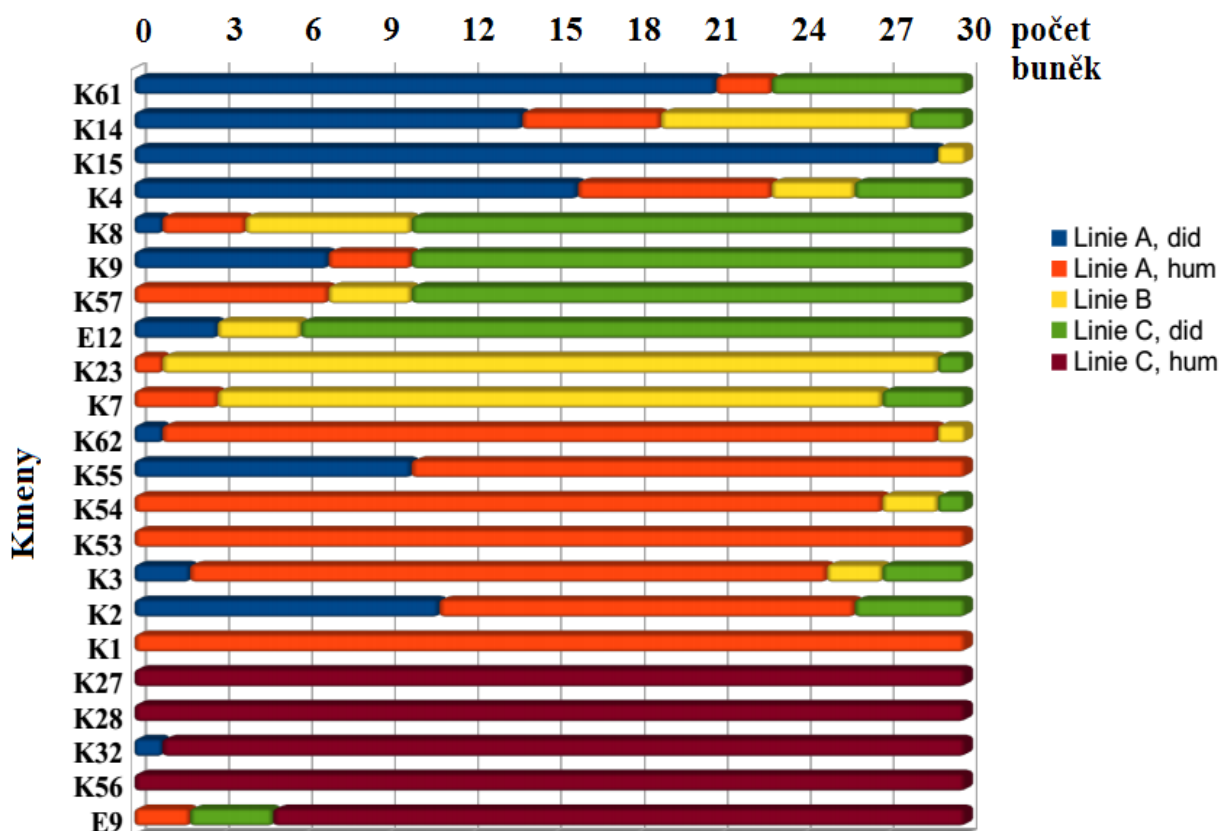
Nesymetrizovanou PCA pro pět morfologických podskupin jsem získala se stejnými hodnotami PC os jako pro tři evoluční linie (viz tab. 4.6).

Diskriminace (LDA) GM dat pro pět morfologických podskupin bez rozdělení na subsety vyšla 86,67 %, Wilksova lambda vyšla 0,01807 (nevysvětlená variabilita 1,8 %) se signifikancí

$p < 10^{-5}$. Diskriminace (LDA) GM dat s měřením pro pět morfologických podskupin vyšla 93,03 %, Wilksova lambda vyšla 0,0063 (nevysvětlená variabilita 0,63%) se signifikancí $p < 10^{-5}$ (tab. 4.7; tab. 4.9).

LDA geometricko-morfometrických dat pro pět morfologických podskupin měla o 2% horší diskriminaci než byla pro 3 molekulární linie. Podobně byla diskriminace GM dat s měřením pro pět morfologických podskupin horší než u tří evolučních linií.

Krásivky jsem zkoumala i z hlediska míry morfologické plasticity. Výjimečně některé kmeny měly 100% integritu: kmeny K27-K28 z Kanady a kmen K56 ze Švédska byly určeny jako *E. humerosum* var. *affine* a patřily do linie C; kmen K1 z Portugalska určený jako *E. humerosum* patřil do linie A. Nejvíce polymorfní kmeny byly: kmeny K14 a K4 z linie A; kmen K8 z linie C (viz graf 4.8). Data jsem získala z klasifikační tabulky pro LDA).



Graf 4.8. Morfologická plasticita pěti podskupin. Procentuální zastoupení klasifikovaných kmenů lineární diskriminační analýzou geometricko-morfometrických dat v programu PAST 3.20; graf byl vytvořený v LibreOffice (LibreOffice contributors, 2000-2018), z archivu autora. Legenda: hum – morfotyp *Euastrum humerosum*, did – morfotyp *E. didelta*.

4.3.2.3 Geometrická morfometrika u dvou subsetů *didelta* a *humerosum*

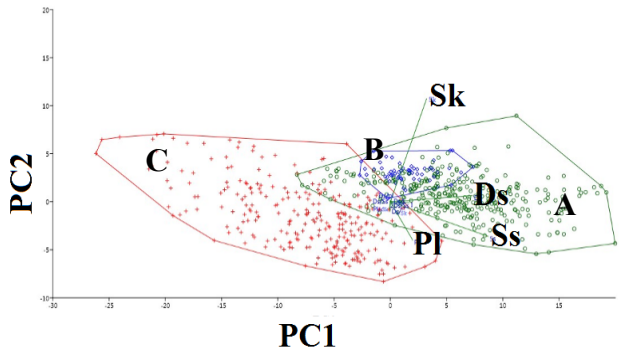
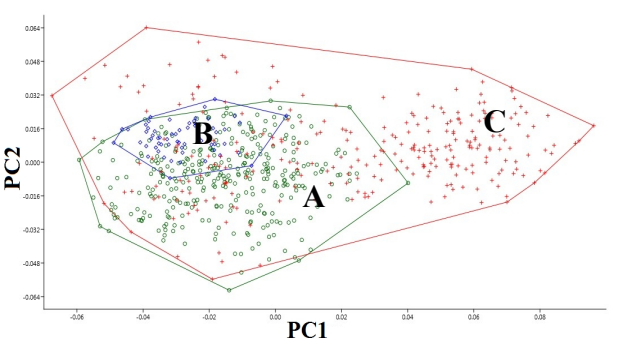
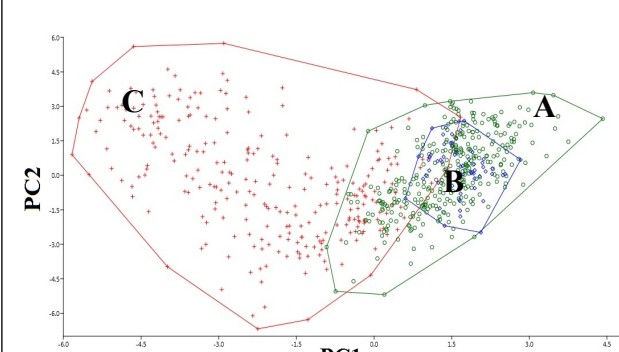
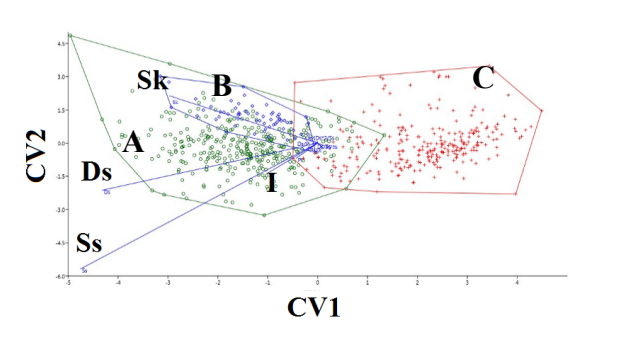
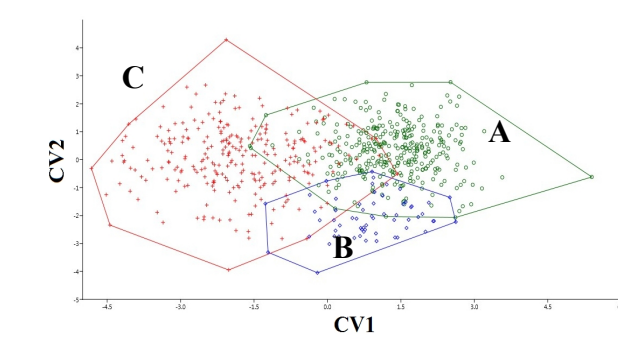
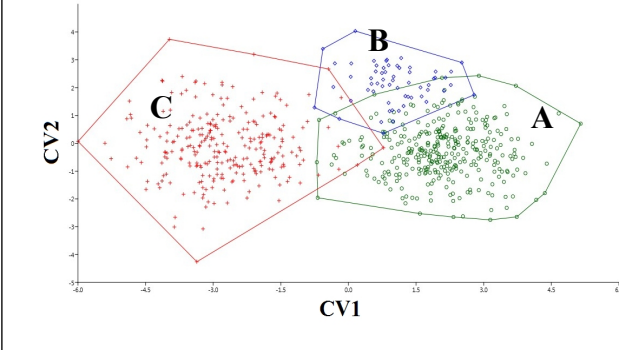
Rozdělením na dva subsety *didelta* a *humerosum* podle vroubkování bazálního laloku, *humerosum* (s) a *didelta* (bez) jsem získala výsledky s vyššími hodnotami diskriminace (viz tab. 4.7; tab. 4.9). V subsetu *didelta* spolehlivost diskriminace dosáhla 97%. V subsetu *humerosum* spolehlivost diskriminace mezi liniemi A a C dosáhla dokonce 100%.

Tvarové preference podskupin v subsetu *didelta* nebyly tak jednoznačné jako v subsetu *humerosum*, jelikož se v PCA grafu podskupiny dosti překrývaly (viz tab. 4.7). Podskupina *humerosum-humerosum* měla rovnější krk a mělčí zářezy laloků a podskupina *affine-humerosum* měla výrazný polární lalok s tvarem jako zátka od karafy (viz tab. 4.7 – 4.8).

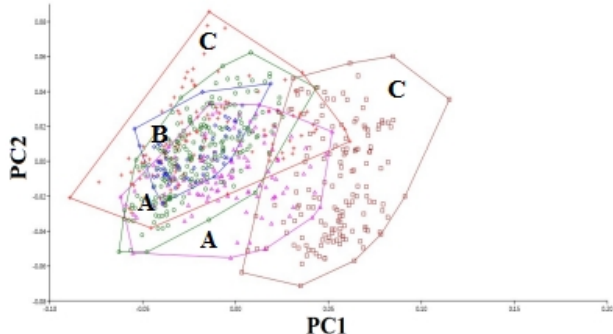
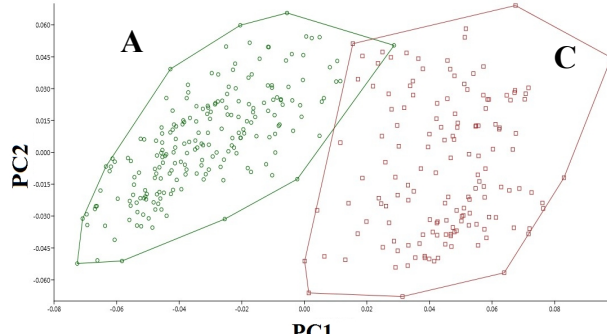
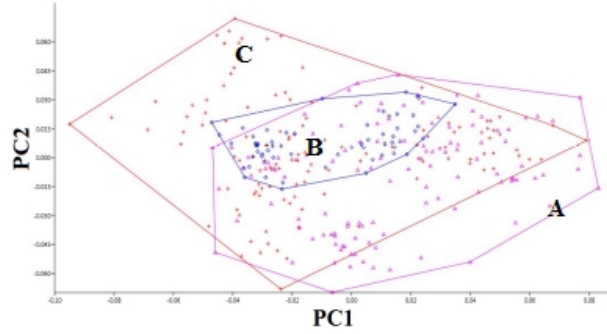
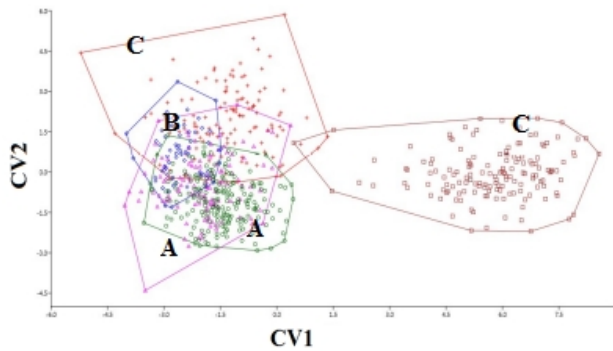
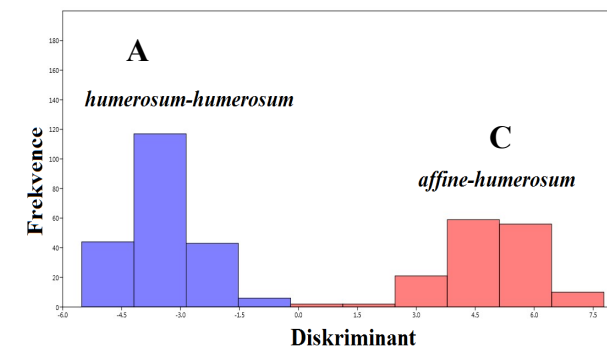
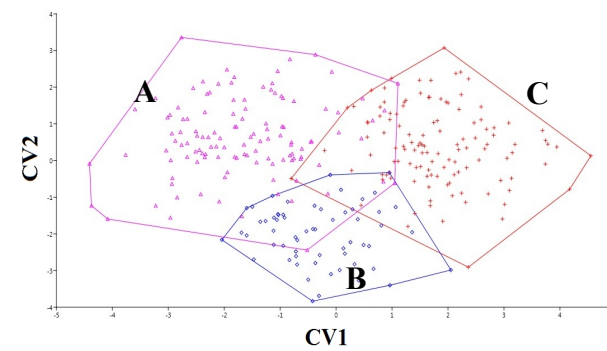
Rozdělením skupin na dva základní morfotypy *E. humerosum/didelta* se podařilo rozlišit podskupinu *affine-humerosum* od obou linií A a B se 100% spolehlivostí, jak geometrickou morfometrikou, tak spojenou s měřením (viz tab. 4.7; tab. 4.9).

Tab. 4.6-4.7. Přehledové tabulky pro grafy PCA a CVA s nejdůležitějšími hodnotami pro tři evoluční linie a pět morfologických podskupin.

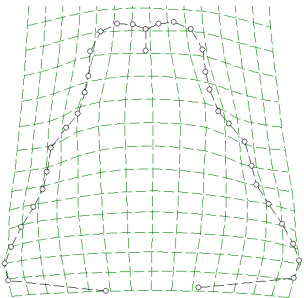
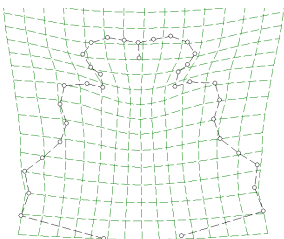
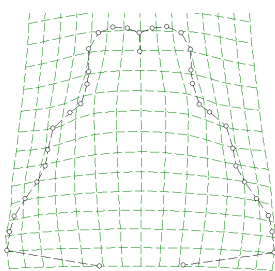
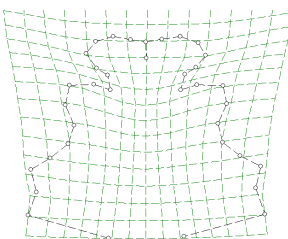
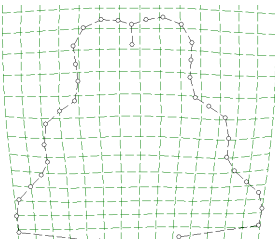
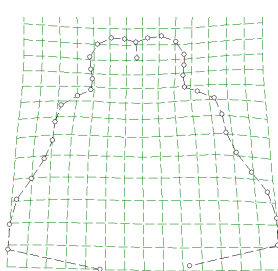
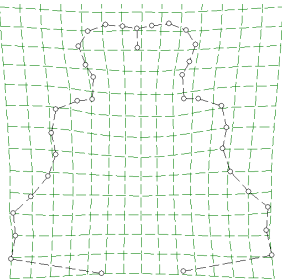
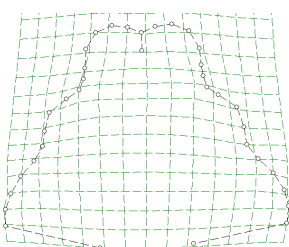
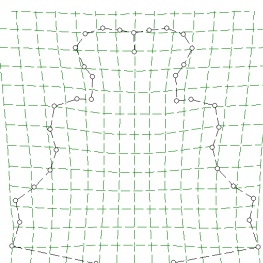
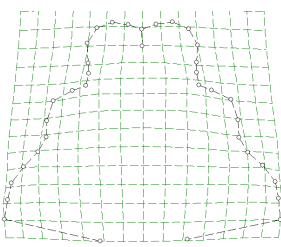
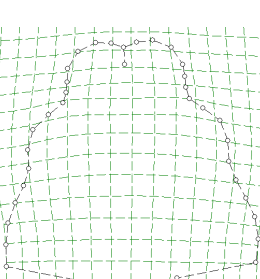
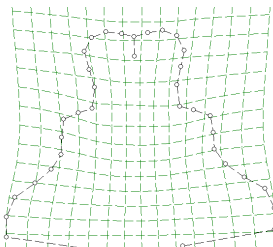
Tab. 4.6: PCA a CVA grafy pro tři linie s hodnotami. Legenda: zeleně O – linie A, modře ◊ – linie B, červeně + – linie C; M – měření (rozměry a poměry), GM – geometrická morfometrika, Ds - Délka semicely, Ss – Šířka semicely, I – Isthmus, Pl – Polární lalok, Sk – Šířka krku; signifikance je Bonferroniho korelovaná p-hodnota

<p>M: PCA, 11 os, PC1-PC5 (v %): 31,2; 24,8; 21,2; 12,7; 9,6, korelace</p> 			<p>GM: PCA, 68 os, PC1-PC5 (v %): 33,8; 15,5; 10,6; 9,3; 5,6</p> 			<p>GM+M: PCA, 79 os, PC1-PC5 (v %): 6; 4,8; 3,9; 2,8; 2,4; korelace</p> 		
<p>M-CVA, 2 osy, CV1-CV2 (%): 95,7; 4,3</p> 			<p>GM-CVA, 2 osy, CV1-CV2 (%): 84,5; 15,5</p> 			<p>GM+M-CVA, 2 osy, CV1-CV2 (%): 92; 8</p> 		
Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:	Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:	Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:
$p < 10^{-12}$	0,21	85,15 %	$p < 10^{-14}$	0,20	88,79 %	$p < 10^{-16}$	0,09	95,3%

Tab. 4.7. PCA a CVA grafy pro 5 podskupin, a subsety *humerosum* a *didelta* s geometricko-morfometrickými daty: Linie A: Δ *humerosum-didelta*; \circ *humerosum-humerosum*; linie B: \diamond - *scandinave*; linie C: $+$ *affine-didelta*; \square - *affine-humerosum*.

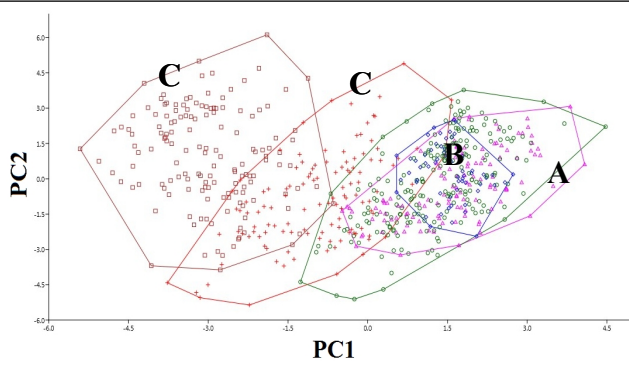
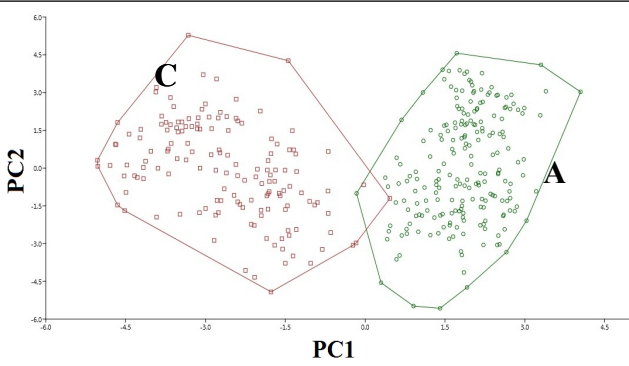
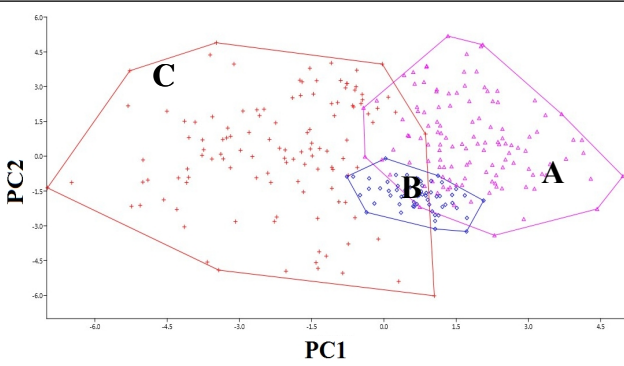
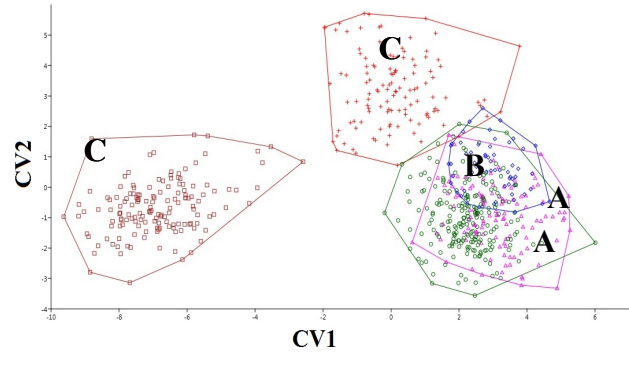
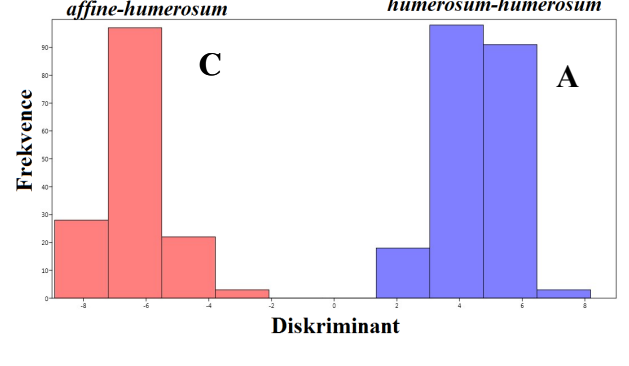
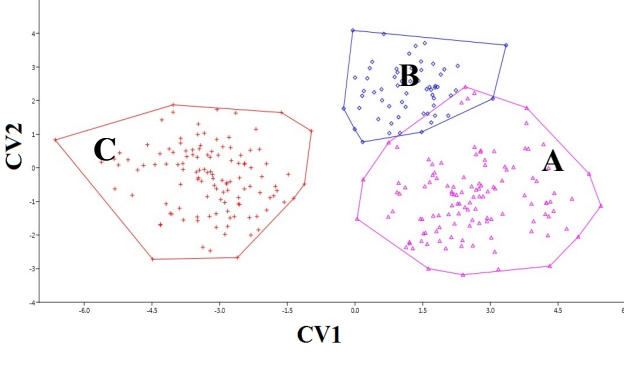
5 podskupin			Subset <i>humerosum</i>			Subset <i>didelta</i>		
PCA, 68 os, PC1-PC5 (v %): 33,8; 15,5; 10,6; 9,3; 5,6			PCA, 68 os, PC1-PC5 (v %): 43,5; 19,1; 5,6; 4,3; 4,1			PCA, 68 os, PC1-PC5 (v %): 30,1; 17,5; 14,7; 8,2; 4,9		
								
CVA, 4 osy, CV1-CV4 osy (%): 81,3; 9,6; 6,2; 2,9			CVA, CV1 osa: 100 %			CVA, 2 osy, CV1-CV2 (%): 70,4; 29,6		
								
Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:	Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:	Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:
$p < 10^{-5}$	0,01807	86,67 %	$p < 10^{-146}$	0,0565	100 %	$p < 10^{-7}$	0,1417	93,67%

Tab. 4.8. Význam PC os pro 5 podskupin a dva subsety *humerosum* a *didelta* s geometricko-morfometrickými daty (hum - morfotyp *E. humerosum*, did – morfotyp *E. didelta*)

5 podskupin:		Subset <i>humerosum</i>		Subset <i>didelta</i>	
Jako pro 3 linie s GM daty (viz tab. 4.4): PC1 + vykrojené laloky, - mělké laloky, PC2 + široký krk, - úzký krk, PC3 + vykrojené laloky a delší krk, - mělké laloky, PC4 + široká báze, - úzká báze, PC5 náklon bazálního laloku		PC1 + vykrojené laloky, - mělké laloky, PC2 + relativně širší krk, - relativně užší krk a další laloky, vroubkování bazálního laloku		PC1 + široce zvonovitý tvar s relativně širokou bází, - pravidelné laloky; PC2 + úzký zvonovitý tvar s relativně úzkým polárním lalokem, - vyboulený tvar s relativně širokým krkem a širokými laloky	
PC1 záporná	PC1 kladná	PC1 záporná	PC1 kladná	PC1 záporná	PC1 kladná
					
PC2 záporná	PC2 kladná	PC2 záporná	PC2 kladná	PC2 záporná	PC2 kladná
					

Tab.4.9. PCA (korelovaná) a CVA grafy pro pět morfologických podskupin, a subsety *humerosum* a *didelta* s geometricko-morfometrickými daty a měřením (rozměry a poměry).

Linie A: Δ *humerosum-didelta*; O *humerosum-humerosum*; linie B: \diamond - *scandinave*; linie C: $+$ *affine-didelta*; \square - *affine-humerosum*; k - korelace.

5 podskupin			Skupina <i>humerosum</i>			Skupina <i>didelta</i>		
PCA, 79 os, PC1-PC5 (v %): 5,4; 4,5; 3,8; 2,7; 2,2			PCA, 79 os, PC1-PC5 (v %): 7,2; 5,3; 3,1; 2,6; 2,5			PCA, 79 os, PC1-PC5 (v %): 6,2; 5,6; 4,1; 3,2; 2,6		
								
CVA, 4 osy, CV1-CV4 (%): 79,29; 13,36; 4,85; 2,5			CVA, 1 CV osa : 100 %			CVA, 2 osy, CV1-CV2 (%): 83,47; 16,53		
								
Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:	Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:	Signifikance:	Wilksova lamda:	LDA:
$p < 10^{-5}$	0,0063	93,03 %	$p < 10^{-168}$	0,03	100 %	$p < 10^{-8}$	0,0495	97,33%

4.3.2.4 Lineárně diskriminační analýza (LDA) krásivek z literatury

V LDA analýze krásivek z literatury jsem zjistila, že se různé variety *E. didelta* vyskytovaly ve všech studovaných podskupinách kromě *affine-humerosum*. *E. humerosum* se vyskytovalo v podskupinách *humerosum-humerosum*, *scandinave*, *affine-humerosum*. *E. affine* se vyskytovalo pouze v podskupině *affine-humerosum* (viz tab. 8.6).

Lineárně diskriminační analýzou jsem zjistila, jaké krásivky z literatury by mohly patřit do pěti různých testovaných morfologických podskupin (viz tab. 8.6). Použila jsem různé kombinace testování shody s pěti podskupinami (viz metodika). Především jsem použila kombinace shody tvaru (pouze GM dat), tvaru s poměry (GM+ P) nebo tvaru s měřením a poměry (GM+MP).

LDA GM dat dala výsledky teoretického rozšíření (viz obr. 4.5, viz tab. 8.6).

4.4 Morfologie a taxonomické poznámky k jednotlivým liniím

Zkoumané krásivky byly podobné mnoha ilustracím z literatury, ale geometrickou morfometrikou byly shodné ilustrace jen některé (viz tab. 8.6). Linie se lišily svým tvarem a rozměry. Rozměry jsou uvedené v 10.-90. percentilu a zaokrouhlené na celé číslo (viz tab. 4.10).

V linii A byl morfotyp *E. didelta* s variabilním polárním lalokem a hladkým bazálním lalokem; další morfotyp byl *E. humerosum* s vroubkovaným bazálním lalokem.

V linii B byl morfotyp *E. didelta* s polárním lalokem se širokým napojením na tělo krásivky, s krkem ve tvaru písmene A.

V linii C byl morfotyp *E. didelta* s hladkým bazálním lalokem, ale mnohem širším než byly ostatní laloky a s užším krkem než u jiných *E. didelta* z ostatních linií. *E. humerosum* z linie C měl bazální lalok s vroubkovaným okrajem a mnohem širším polárním lalokem než bylo *E. humerosum* z linie A (viz tab. 4.10).

Tab. 4.10. Rozlišení morfologických podskupin podle základních charakteristik – tvaru a rozměrů. Legenda: Bl – bazální lalok, Ds – délka semicely, Pl – polární lalok, Sk – šířka krku, Ss – šířka semicely (v místě bazálního laloku). Rozměry jsou uvedené v μm .

Linie	Linie A		Linie B	Linie C	
podskupina	<i>humerosum-didelta</i>	<i>humerosum-humerosum</i>	<i>scandinave</i>	<i>affine-didelta</i>	<i>affine-humerosum</i>
Bl	hladký	vroubkovaný	hladký	hladký, široký	vroubkovaný
Sk	rovný 25-31	25-31	tvar písmene A 28-30	úzký 20-27	19-24
Pl	polymorfní 27-32	polymorfní 27-32	28-30	úzký 21-29	široký 28-34
Ds	58-67		58-63	48-59	
Ss	68-80		66-72	57-70	

4.4.1 Linie A

Linie A (viz Tabule I) měla buňky dlouhé 115-134 μm (2 délky semicely) a široké 68-80 μm v bazálním laloku, 18-23 μm v isthmu, 27 - 32 μm v polárním laloku a 25 - 31 μm v místě krku, a měly poměr délky a šířky buňky (2Ds/Ss) 1,6-1,8; další poměry viz tab. 4.2. Polární lalok měly buňky rovný s oblým zakončením (viz Tabule I: c,d) nebo lehce srdcovitě rozšířený (viz Tabule I: a, f-i).

Kmeny jsem rozdělila do dvou morfologických podskupin 1) *humerosum-didelta* (K14, K15, K61, K4); a 2) *humerosum-humerosum* s vroubkováním bazálního laloku (K1-3, K53-55, K62). Kmen K14 se podobal oběma morfotypům *E. didelta/E.humerosum*. U kmenů z NP Rago (K14, K15) a *E. didelta* (K4) byly laterální laloky méně prominující. Kmen K61 měl velmi rozšířený bazální lalok a byl signifikantně odlišný od ostatních kmenů i linií.

Lineární diskriminační analýzou geometricko-morfometrických dat vyšla linie A především pro krásivky z literatury označované jako: *E.didelta*, *E. didelta/ampullaceum*, *E. humerosum*, *E. humerosum var. parallelum* (viz tab. 8.6, skupiny 1 a 2).

A1: Do podskupiny *humerosum-didelta* se zařadili podle tvaru spojením s poměry (*GM*, *GM+P*) dva zástupci: *Euastrum didelta* (South, 1984, Fig. 7b; z Newfoundlandu v Kanadě) a *E. didelta/ampullaceum* (Ducellier, 1915, s. 91, Fig. 27; ze Savojských Alp ve Francii). Ikonotyp *E. didelta* Ralfs (1848, Tab. XIV, Fig. 1a; z Britských ostrovů) se zařadil pouze geometrickou

morfometrikou s měřením (*GM+MP*). Buňky podskupiny *humerosum-didelta* byly ikonotypu dost podobné, ale změřila jsem je kratší než byly uvedené v literatuře.

A2: Do podskupiny *humerosum-humerosum* se zařadili zástupci, podle tvaru spojením s poměry (*GM*, *GM+P*): *E. didelta* (West & West, 1905, Pl. XXXV, Fig. 4), *E. humerosum* (Ells, 1998, Fig. 6; Škaloud, 2006, z Postávky na Slovensku; Fromm, 2014, Abb. 135, z Berlína v Německu), poslední zástupce *E. humerosum* se zařadil podle tvaru spojeném s měřením a s poměry (*GM+MP*). Nicméně zástupce *E. didelta* (West & West, 1905) byl podle záznamů delší než buňky z linie A. Varieta *E. humerosum* var. *parallelum* (Krieger, 1937, Taf. 69, Fig. 9) byla velice podobná buňkám z podskupiny *humerosum-humerosum* a byla zařazená pouze geometrickou morfometrikou (*GM*), protože byla v literatuře uvedená bez rozměrů.

Linie A se vyskytovala podle molekulárních analýz v Portugalsku, střední Evropě (ČR) a severní Evropě (Norsku, Švédsku) a z výsledků lineární diskriminační analýzy bylo teoretické rozšíření navíc v západní Evropě a v dalších zemích střední Evropy a v Severní Americe (viz obr. 4.5; tab. 8.6).

4.4.2 Linie B

Linie B (Tabule II), měla buňky dlouhé 115-125 μm (2 délky semicely) a široké 66-72 μm v bazálním laloku, 18-21 μm v isthmu, 28 – 30 μm v polárním laloku a 28 – 31 μm v místě krku, a měly poměr délky a šířky buňky (2Ds/Ss): 1,7-1,8; další poměry viz tab. 4.2.

Buňky linie B měly široký krk s malými laterálními laloky a buď obloukovitě zakončeným nebo jemně srdcovitě zakončeným polárním lalokem. Krásivky v této linii se zaměňovaly s morfotypem *Euastrum didelta*, z linií A a C.

Kmeny K7 a K23 se tvarově lišily. Kmen K23 měl jednotný tvar, a připomínal kmen K4 z linie A, lišil se v polárním laloku, který končil buď rovně nebo srdcovitě, podobně jako u jiných kmenů v linii A. Kmen K7 měl srdcovitě rozšířený polární lalok a ostatní laloky byly rovnoměrně rozmístěné a zaoblené.

Lineární diskriminační analýzou geometricko-morfometrických dat vyšla linie B především pro krásivky z literatury označované jako: *E. didelta*, *E. didelta* f. *latior* a *E. didelta* f. *du val Piora* a *E. humerosum*; morfologická podskupina s pracovním názvem *scandinave*; viz tab. 8.6, skupina 3). Do linie B podle tvaru spojeném s poměry a rozměry patřili teoreticky zástupci (*GM*, *GM+MP*, *GM+P*): *E. didelta* a *E. didelta* f. *latior* (South, 1984, Fig. 4a, 8c, z Newfoundlandu v Kanadě), *E.*

didelta f. du val Piora (Ducellier, 1915, Pl. I, Fig. 2, ze Savojských Alp ve Francii) a *E. humerosum* (Fromm, 2014, Abb. 133, z Berlína v Německu).

Linie B se vyskytovala podle molekulárních analýz v severní Evropě (Norsku) a podle výsledků lineární diskriminační analýzy bylo teoretické rozšíření navíc ve střední Evropě a v Severní Americe (viz obr. 4.5; tab. 8.6).

4.4.3 Linie C

Linie C (Tabule II-III), měla buňky dlouhé 97-117 μm (2 délky semicely) a široké 57-70 μm v bazálním laloku, 18-21 μm v isthmu, 24 – 33 μm v polárním laloku a 19 – 26 μm v místě krku, a měly poměr délky a šířky buňky (2Ds/Ss): 1,6-1,8; další poměry viz tab. 4.2.

Kmeny jsem rozdělila do dvou morfologických podskupin podle jejich tvaru.

Morfologická podskupina *affine-didelta* (viz Tabule II) byla označená v kulturách jako *E. humerosum*. Po kultivaci byla většina buněk bez vroubkování bazálního laloku, s hladkým okrajem a vypadala jako morfotyp *E. didelta*. Buňky měly pravidelné laloky a úzký krk, polární lalok se srdcovitě rozšiřoval (E12, K9, K57, viz Tabule II, h-l), nebo laterálně obloukovitě zakončoval (K8, viz Tabule II, a-c). Výjimečně bylo napojení krku rovné spolu s polárním lalokem (K8, viz Tabule II, b). Kmen E12 dosti připomínal kmen K23 z linie B, měl pravidelné laloky a jeho polární lalok se srdčitě rozšiřoval (viz Tabule II, e).

Morfologická podskupina *affine-humerosum* (viz Tabule III) byla označená v kulturách jako *E. humerosum* var. *affine*. Polární lalok byl na konci srdcovitě rozšířený (E9 a K32; viz Tabule III,d), nebo byl široce laterálně obloukovitě zakončený (K27, K28, K56; viz Tabule III, a-c). Laterální lalok byl výraznější se zaobleným či s globulárním zakončením. Bazální lalok byl rozdvojený. Kmen E9 měl polární lalok většinou srdcovitě zakončení a výjimečně i zakončení obloukovité a tak se kmen mohl podobat i morfotypu *E. didelta* (byla zobrazena jeho hraniční forma, nicméně jeho obvyklá forma se podobala kmenu K32, viz Tabule III, e).

Lineární diskriminační analýzou geometricko-morfometrických dat vyšla linie B především pro krásivky z literatury označované jako: *E. didelta* var. *inermiforme* a *E. humerosum* var. *affine* (viz tab. 8.6, skupiny 4 a 5).

C1: Do podskupiny *affine-didelta* byly podle, jak LDA GM dat, tak GM s měřením zařazení zástupci (GM, GM+MP): *E. didelta* (Ducellier, 1915, s. 89, Fig. 21a, ze Savojských Alp ve Francii; Ducellier, 1918, s. 127, Fig. 112 ze Švýcarska) a *E. didelta* var. *inermiforme* Nob (Ducellier, 1915, s. 86, Fig. 14; ze Savojských Alp ve Francii). Podle tvaru, i s kombinací s poměry

byli zařazeni zástupci (GM, GM+P): *E. didelta* (Lenzenweger, 2002, Taf. II, Fig. 9) a *E. sinuosum* (West & West, 1905, Pl. XXXVI, Fig. 1), u kterého nebyly patrné centrální póry, pouze pět hrbolků, které byly typické i pro druhový komplex *E. humerosum/didelta*, ale krásivka byla kratší než linie C.

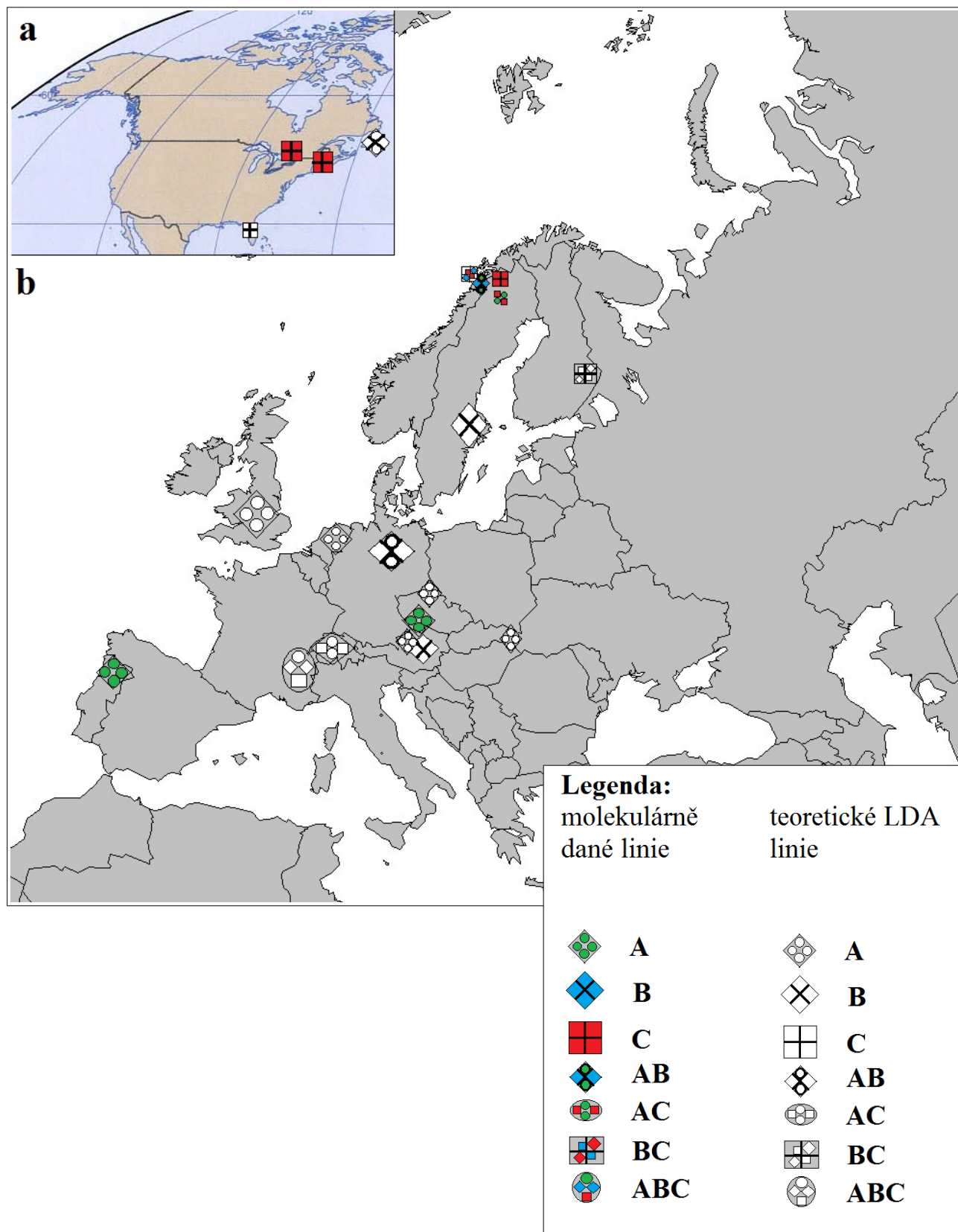
C2: Do podskupiny *affine-humerosum* byl, podle LDA GM dat a podpořené i GM s měřením zařazen pouze zástupce (GM, GM+MP): *E. humerosum* (Ducellier, 1918, s. 133, Fig. 121; ze Švýcarska). Jiné *E. affine* si byly podobné a shodovaly tvarem s měřením (GM+MP): *E. affine* (Brown, 1930, Pl. XIII, Fig. 52, z Floridy, USA; Lenzenweger, 1976, Taf. 1, Fig. 6; z Finska, Joensuu). Další zástupci, podobní této skupině, se shodovali v LDA GM dat s poměry a GM s měřením (GM+P, GM+MP): *E. humerosum* (Mout, 2012, z Nizozemí) a *E. humerosum var. affine* (Coesel & Meesters, 2007, Pl. 42, Fig. 2, z Nizozemí). Ikonotyp *E. affine* (Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig. 3a, z Britských ostrovů, v tab. 8.6 neuveden) se geometrickou morfometrikou zařadil pouze při nedefinování skupiny, a rozměry z textu se shodovaly s linií C. Zástupci *E. humerosum* (Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig. 2a, z Britských ostrovů; Ducellier, 1918, s. 92, Fig. 63 B, ze Švýcarska, Col du Grimsel) a *E. humerosum var. affine* (Lenzenweger, 1996, Taf. 9, Fig. 13, z Rakouska) se zařadili jen spojením GM dat s měřením (GM+MP).

Linie C se vyskytovala podle molekulárních analýz v severní Evropě (Norsku, Švédsku) a v Severní Americe; z výsledků lineární diskriminační analýzy se teoreticky vyskytovala také ve střední Evropě (Švýcarsku, Francii; viz obr. 4.5; tab. 8.6).

Podle LDA geometricko-morfometrických dat se linie střetávaly ve střední Evropě (v Savojských Alpách ve Francii) a v Kanadě (viz obr. 4.5; tab. 8.6). Molekulární linie se střetávaly pouze v Norsku (viz obr. 4.5).

V jednom vzorku ze Švédska (SWE SJ15) se vyskytovaly morfotypy *E. humerosum* a *E. humerosum var. affine* (viz tab. 8.5) a zároveň byly i z jiných linií trnG intronu (*E. humerosum* z linie A, *E. humerosum var. affine* z linie C). Po kultivaci, ale měly obě vroubkovaný bazální lalok. V Norsku se linie střetávaly na dvou různých místech se stejným morfotypem *E. humerosum*. Po kultivaci krásivek z Národního parku Rago a Lofot převažoval tvar *E. didelta* (u kmenu K14 z NP Rago jen u jedné poloviny zkoumaných buněk, viz obr. 4.1, viz Tabule I).

Obr. 4.5. Mapa rozšíření evolučních linií v Severní Americe (a) a Evropě (b). Legenda je v ilustraci (viz tab. 8.6; upraveno CIA, 2001; mapaevropy, 2018).



5. Diskuse

Krásivky jsou velice morfologicky plastické a v rámci druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* je popsáno 35 variet a 14 forem (Guiry & Guiry, 2019). Tyto krásivky se vyskytují takřka ve všech světadílech kromě Antarktidy (viz tab. 8.1). Rostou ve slabě kyselých rašelinných tůních či oligo- až mezotrofních jezerech (Coesel & Meesters, 2007).

Zjistila jsem nesoulad určovaných krásivek podle renomovaných klíčů s původními popisy (Ralfs, 1848; Růžička, 1981; Coesel & Meesters, 2007). Krásivka *E. humerosum* Ralfs byla v klíčích popisovaná jako *E. humerosum* var. *affine*. Krásivky *E. didelta* typu *b* Ralfs nebo *E. affine* Ralfs byly popisované v klíčích jako *E. humerosum*, resp. *E. humerosum* var. *affine*.

Většina variet se navzájem podobala svým základním morfotypům (Ralfs, 1848); a měly jeden centrální pór, který byl viditelný i ve skenovací elektronové mikroskopii (viz obr. 4.4, např. Lenzenweger, 1981, 1996; Růžička, 1981; South, 1984; Coesel & Meesters, 2007; John & Williamson, 2009; Anissimova & Terlova, 2015).

5.1 Fylogenetické analýzy

Jedním z cílů diplomové práce bylo zjistit infraspecifickou variabilitu uvnitř druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta* – použitím vhodného rychle mutujícího markeru (např. trnG intronu, SSU intronu nebo ITS).

Plastidový marker trnG intron měl u příbuzné krásivky unikátní výskyt (*Staurastrum*, Turmel et al., 2005). Další dva markery byly jaderné a běžně se vyskytují v tisíci kopiích. Pro průkazné výsledky bylo potřeba mít proto tyto jaderné markery homogenní.

V našem případě marker trnG intron měl čitelné sekvence, marker SSU intron byl homogenní z poloviny a marker ITS byl zcela heterogenní.

Analýzou trnG intronu druhového komplexu *E. humerosum/didelta* jsem získala tři linie s vysokou statistickou podporou (obr. 4.1), analýzou SSU intronu jsem získala naopak linie s velmi nízkou statistickou podporou (obr. 4.2).

Polymorfní polovina SSU intronu odpovídala často používanému SSU intronu první skupiny – 1506 (podle pozice v 16S *Escherichia coli*; Brosius et al., 1978; Denboh et al., 2001; Gontcharov & Melkonian, 2005; Chen & Schagerl, 2012). Zjistila jsem, že české kmeny měly překvapivě navzájem velice odlišné sekvence SSU intronu (kmeny K53-K55, viz obr. 4.2).

Spojením (konkatenací) obou sekvencí jsem získala dvě rozdělené skupiny: linie A a dvojice linií B s C (viz obr. 4.3). Ačkoli ML strom vycházel se statistickou podporou 56, lepší byly jiné

statistiky pro rozdělení všech tří linií se statistickou podporou BI větší než 70 a MP větší než 90, naneštěstí bez ML statistické podpory.

5.1.1 Mladé linie

Jak už jsem psala dříve, dobře podpořené byly pouze linie plastidového intronu trnG intronu s unikátním výskytem a více heterogenní byly jaderné markery SSU intron a ITS, které měly více kopií.

Sekvence trnG intronu a SSU intronu se také lišily svou délkou. Sekvence trnG intronu byly zhruba o polovinu delší než sekvence SSU intronu (700 nukleotidů versus 500 nukleotidů).

U druhů rodu *Spirogyra* (Zygnematales, Zygnemataceae) nebo *Closterium* (Desmidiaceae, Closteriaceae) byly sekvence SSU intronu homogenní a daly průkazné výsledky rozdělení druhů na rozdíl od druhů čeledi Desmidiaceae (Besendahl & Bhattacharya, 1999; Denboh et al., 2001; Tsuchikane et al., 2010; Chen & Schagerl, 2012). U Desmidiaceae zatím v SSU intronu nebyly dobře statisticky podpořené výsledky, pouze se spojením s rbcL (Gontcharov & Melkonian, 2008).

Důvodem proč jsou sekvence SSU intronu a ITS málo homogenní může být odlišná frekvence pohlavního rozmnožování u různých čeledí spájivých řas (Zygnematophyceae). U *Spirogyra* a dalších Zygnematales je tvorba spor velmi častá a spory patří mezi diskriminační znaky (Chen et al., 2012). U Desmidiaceae je výskyt pohlavního rozmnožování méně obvyklý (Starr, 1955; Brook, 1981).

Dalším důvodem rozdílné čitelnosti (homogenní či heterogenní vlastnosti) zkoumaných sekvencí, může být tím, že linie trnG intronu jsou pravděpodobně mladé.

5.2 Morfologie buněk

Z hlediska morfologie buněk byly krásivky uvnitř druhového komplexu *E. humerosum/didelta* hodně morfologicky plastické (Tabule I-III).

Povrch buněčné stěny u téhož druhového komplexu jsem zkoumala skenovací elektronovou mikroskopií. Všechny tři linie měly shodné znaky – jeden centrální pór a stejné uspořádání pětice hrbolků (obr. 4.4).

5.2.1 Rozměry a tvar

Krásivky druhového komplexu *E. humerosum/didelta* byly velmi morfologicky plastické v polárním a bazálním laloku. Krásivky se lišily uvnitř linií natolik, že podle klíčů se určovaly jako

dva rozdílné morfotypy *E. didelta* a *E. humerosum*, především v liniích A a C. Tyto morfotypy se lišily vroubkováním bazálního laloku. Proto jsem se zaměřila na zjištění diskriminačních znaků mezi liniemi měřením a zkoumáním tvaru geometrickou morfometrikou.

Linie se lišily svými rozměry: délkou svých semicel (Ds), resp. délkou buněk (2Ds). Jednotlivé morfotypy se lišily i dalšími rozměry: *E. humerosum* - šířkou polárních laloků (Pl); a *E. didelta* šířkou krku (Sk; tab. 4.10).

Buňky linií A a B měly uvnitř morfotypu *E. didelta* širší krk než linie C.

Linie A měla uvnitř morfotypu *E. humerosum* užší polární lalok než u linie C (viz tab. 4.3; tab. 4.8).

Zjištěné rozměry jsem porovnávala s literaturou (viz tab. 1.2; grafy 4.1-4.2). Rozměry linie A korelovaly s rozměry morfotypu *E. didelta* a *E. humerosum*. Rozměry linie B korelovaly s rozměry morfotypu *E. didelta*. Rozměry linie C korelovaly s rozměry morfotypu *E. humerosum* var. *affine*.

5.2.1.1 Morfologická plasticita

Jak jsem již poznamenala, bylo popsáno hodně variet a morf (Guiry & Guiry, 2019). V této diplomové práci jsem rovněž zaznamenala velkou morfologickou plasticitu, i když jsem pěstovala kultury za stejných podmínek. Pozorovala jsem jiný morfotyp po vypěstování než byl původně.

Zjistila jsem, že v přírodních podmínkách byly v jednom vzorku ze Švédska dva morfotypy patřící do různých linií. V jiném vzorku z Norska byly naopak buňky původně popsány jako stejný morfotyp *E. humerosum*, ale po kultivaci měly rozdílné morfotypy a patřily do jiných linií. V laboratorních podmínkách jsem zjistila, že se buňky lišily nejen mezi liniemi, mezi kmeny uvnitř linií A a C, ale dokonce i v rámci jednoho kmenu K14 z linie A - buňky byly s odlišnými morfotypy, lišící se vroubkováním bazálního laloku (viz obr. 1.1 a 4.1, Tabule I-III, graf 4.8).

Jiní autoři zjistili, že byla morfologická plasticita způsobena vlivem různých podmínek, např. jiného pH nebo teploty (Ducellier, 1915; Neustupa et al., 2008; Černá & Neustupa, 2010).

Uvnitř druhového komplexu *E. humerosum/didelta* nebyl jasný vzorec v jakém pH se vyskytují dané morfotypy. *E. didelta* se vyskytovalo v zásaditějším (Krieger, 1937), v kyselejších (Růžička, 1981) nebo ve stejném pH jako *E. humerosum* (Štěpánková et al., 2008). Naneštěstí jsem měla pH a další parametry pouze u jednoho vzorku z oblasti Abisko. Proto jsem nemohla porovnat pH v rámci linií, ani s literaturou.

Morfologická plasticita vedla rovněž k záměnám. Jak jsem uvedla, uvnitř jednoho kmenu linie A byly oba morfotypy: *E. humerosum* a *E. didelta*. Lišily se vroubkováním bazálního laloku.

Byly podobné oběma typům *a/b E. didelta* v původním popisu (Ralfs, 1848). Odpovídaly tomu i rozměry (porovnej tab. 1.1.; tab. 4.1; tab. 4.3).

Plasticita bazálního laloku vedla tedy pravděpodobně k taxonomickým přesunům, např. *E. didelta* typu *b* do *E. humerosum* (West & West, 1905). Proto jsem asi zaznamenala podobné rozměry uvnitř linie A jako v literatuře pro *E. humerosum* a *E. didelta* (tab. 1.1 a 4.1, graf 4.1 a 4.2, Růžička, 1981; Coesel & Meesters, 2007). Linie A trnG intronu by mohla být totožná s původním popisem *E. didelta* Ralfs (1848).

Taxonomické přesuny mohly vést k záměně původního *E. humerosum* Ralfs za *E. humerosum* var. *affine* Wallich. Morfotyp *E. humerosum* Ralfs (1848) měl v původním popisu široký polární lalok. Morfotyp *E. humerosum* z klíče 80. let 20. století měl velmi úzký polární lalok (Růžička, 1981).

Ačkoli byly krásivky uvnitř druhového komplexu *E. humerosum/didelta* plastické, dosti by mohlo pomoci odhalit totožnost k dané linii porovnání s ilustracemi v této studii a s rozměry pro oddělení dvojic linií A, B s linií C (Tabule I-III, tab. 4.10).

Vypracováním třetího cíle lineární diskriminační analýzou krásivek z literatury jsem zjistila zařazení různých variet druhového komplexu *E. humerosum/didelta* do linií trnG intronu a tím i teoretické rozšíření.

5.2.2 Linie trnG intronu

Všechny tři linie měly společný povrch buněčné stěny – jeden centrální pór a pětici hrbolků, podobně jako již bylo zaznamenáno v literatuře (Anissimova & Terlova, 2015, viz obr. 4.4). Výjimkou byla jedna varieta *E. didelta* var. *bengalicum*, kde byly centrální póry dva (Wei, 1991).

Všechny linie trnG intronu měly téměř stejnou šířku isthmu a poměr délky a šířky buňky (resp. 2Ds/Ss): 1,6-1,8 (odlišnosti viz tab. 4.1). Navzájem se především linie lišily tvarem krku a polárního laloku, resp. jejich rozměrů a délkou a šířkou svých buněk, resp. semicel (viz Tabule I-III, tab. 4.1, tab. 4.10).

Linie A měla z druhového komplexu *E. humerosum/didelta* nejdelší a nejširší buňky. Běžně měly buňky polární lalok stejnou šířku jako šířka krku s obloukovitým zakončením a ± výrazné laterální laloky. Od linie B se linie A lišila tím, že buňky měly rovné napojení na tělo krásivky. Od linie C se linie A lišila tím, že buňky měly užší polární lalok a širší krk (viz tab. 4.10).

Linie A (morfologické podskupiny *humerosum-didelta*, *humerosum-humerosum*; viz obr. 4.1; Tabule I.)

Linie A měla tvarově variabilní všechny laloky. Proměnlivost bazálních laloků, především přítomnost nebo absence vroubkování, mě vedla k rozdělení linie na dvě morfologické podskupiny: *E. didelta* (morfologická podskupina *humerosum-didelta*) se podobala původnímu popisu *E. didelta* typu *a* (Ralfs, 1848); a *E. humerosum* (morfologická podskupina *humerosum-humerosum*) se podobala původnímu popisu *E. didelta* typu *b* (Ralfs, 1848) a později krásivky uvedené v klíčích konce 20. a začátku 21. století jako *E. humerosum* (West & West, 1905; Růžička, 1981; Coesel & Meesters, 2007).

Rozměry: délka buňky: 115-134 μm , šířka: 68-80 μm , isthmus: 18-23 μm , polární lalok: 27 - 32 μm , šířka krku: 25 - 31 μm , poměr délky a šířky buňky: 1,6-1,8.

Tyto rozměry částečně korelovaly s *E. didelta* a *E. humerosum* z literatury (Růžička, 1981; Coesel & Meesters, 2007, viz tab. 1.2). V literatuře byly krásivky *E. didelta* uvedené ještě delší než byli naměřeni zástupci linie A (Ralfs, 1848; West & West, 1905). Zároveň byly buňky linie A dvakrát delší než buňky *E. ansatum*, se kterými se často zaměňovaly (Růžička, 1981).

Rozšíření: Portugalsko, ČR, Švédsko, Norsko.

Teoretické rozšíření LDA GM dat z literatury (z výsledků lineárně diskriminační analýzy geometricko-morfometrických dat literárních záznamů): Nizozemí, Slovensko, Rakousko, Francie, Německo, Švýcarsko, a možná Itálie (viz obr. 4.5). Nejisté rozšíření je na Britských ostrovech. Ikonotyp *E. didelta* Ralfs (1848, Tab. XIV, Fig. 1a) se zařadil pouze tvarem s měřením, kde převažoval vliv měření (viz tab. 8.6).

Toto rozšíření jsem vyvodila ze shody s tvarem ilustrací těchto variet: *E. didelta*, *E. didelta/ampullaceum*, *E. humerosum*, *E. humerosum var. parallelum* (West & West, 1905; Ducellier, 1915; Krieger, 1937; South, 1984; Ells, 1998; Škaloud, 2006; Fromm, 2014; podrobné citace a výskyt viz tab. 8.6).

Varieta *E. humerosum var. parallelum* byla zařazená pouze geometrickou morfometrikou do morfologické podskupiny *humerosum-humerosum*. Rozměry u této variety nebyly uvedeny (Krieger, 1937).

Linie B (morfológická podskupina *scandinave*, viz obr. 4.1; Tabule II)

Linie B měla středně dlouhé a široké buňky. Běžně měly buňky krk ve tvaru A. Tato charakteristika linii B také odlišovala od linie A. Spolu s linií A měly stejnou šířku krku, a zároveň měly širší krk než buňky u linie C.

Zakončení polárního laloku bylo proměnlivé – buňky linie B ho měly buď ve tvaru srdce nebo obloučků.

Linie B se zaměňovala s morfotypy *E. didelta* linie A a linie C (morfológickými podskupinami *humerosum-didelta*, *affine-didelta*).

Rozměry: délka buňky: 115-125 μm , šířka: 66-72 μm , isthmus: 18-21 μm , polární lalok: 28 – 30 μm , šířka krku: 28 – 31 μm , poměr délky a šířky buňky: 1,7-1,8.

Tyto rozměry částečně korelovaly s *E. didelta* (Růžička, 1981; viz tab. 1.2).

Rozšíření: Norsko (obr. 4.1, obr. 4.5).

Teoretické rozšíření LDA GM dat z literatury: Německo, Francie a Kanada (viz obr. 4.5, tab. 8.6).

Toto rozšíření jsem vyvodila ze shody s tvarem ilustrací těchto variet: *E. didelta* a *E. didelta f. latior*, *E. didelta f. val Piora* a *E. humerosum* (Ducellier, 1915; South, 1984; Fromm, 2014; podrobné citace a výskyt viz tab. 8.6).

Linie C (morfológické podskupiny *affine-didelta* a *affine-humerosum*, viz obr. 4.1; Tabule II-III)

Linie C měla nejkratší a nejužší buňky z celého druhového komplexu *E. humerosum/didelta*. Běžně měly buňky širší polární lalok než krk. Od ostatních linií se buňky linie C lišily právě nejužším krkem a nejkratší délkou semicely, resp. buněk.

Buňky linie C měly variabilní polární i bazální lalok a mohly se zaměnit s jinými krásivkami z linií A a B, především se to dělo uvnitř morfotypu *E. didelta* (morfológická podskupina *affine-didelta*). Druhý morfotyp *E. humerosum* (morfológická podskupina *affine-humerosum*) se výrazně lišil od linie A širokým polárním lalokem a úzkým krkem. V literatuře býval také tento druhý morfotyp označován jako *E. humerosum* var. *affine* (Růžička, 1981).

Rozměry: délka buňky: 97-117 μm , šířka: 57- 70 μm , isthmus: 17-21 μm , polární lalok: 24 - 33 μm , šířka krku: 19 – 26 μm , poměr délky a šířky buňky: 1,6-1,8.

Tyto rozměry korelovaly s *E. humerosum* var. *affine* (Růžička, 1981; viz tab. 1.2) a s rozměry polárního laloku *E. humerosum* (Ralfs, 1848).

Rozšíření pro morfotyp *E. didelta*, morfologickou podskupinu *affine-didelta*: Norsko a Švédsko (obr. 4.1, obr. 4.5).

Teoretické rozšíření LDA GM dat z literatury: Francie a Švýcarsko (obr. 4.5; tab. 8.6).

Toto rozšíření jsem vyvodila ze shody s tvarem ilustrací těchto variet: *E. didelta* a *E. didelta* var. *inermiforme* Nob (Ducellier, 1915, 1918; Lenzenweger, 2002). Velmi podobné studovaným krásivkám byl morfotyp v literatuře označován jako *E. sinuosum* (West & West, 1905), u kterého nebyly patrné centrální póry, pouze pět hrbolků, které byly typické i pro druhový komplex *E. humerosum/didelta*, ale krásivka byla kratší než linie C.

Rozšíření pro morfotyp *E. humerosum*, morfologickou podskupinu *affine-humerosum*: Švédsko, Kanada, a USA (obr. 4.1, obr. 4.5).

Teoretické rozšíření z LDA GM dat z literatury: Švýcarsko, Finsko, Nizozemí, Britské ostrovy (obr. 4.5; tab. 8.6).

Toto rozšíření jsem vyvodila ze shody s tvarem ilustrací těchto variet: *E. affine*, *E. humerosum* a *E. humerosum* var. *affine* (Ralfs, 1848; Ducellier, 1918; Brown, 1930; Lenzenweger, 1976, 1996; Coesel & Meesters, 2007). Ikonotyp *E. affine* (Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig. 3a, z Britských ostrovů, v tab. 8.6 neuveden) se geometrickou morfometrikou zařadil pouze při nedefinování skupiny, a hodnotami z textu se shodoval s linií C. Krásivka *E. humerosum* Ralfs vyšla podobně jako jiný ikonotyp *E. didelta* Ralfs spojením tvaru s měřením, čili tu rozměry buňky měly velký vliv pro zařazení do linie.

5.2.2.1 Výskyt různých variet uvnitř linií trnG intronu

Jak jsem poznamenala v přehledu linií trnG intronu, různé podskupiny v liniích (dané svým morfotypem *E. didelta* či *E. humerosum*) jsem geometrickou morfometrikou přiřadila k různým varietám uvedených v literatuře (viz výše). U některých podskupin jsem přiřadila více variet, pravděpodobně díky veliké morfologické plasticitě:

linie A) *E. didelta* (podskupina *humerosum-didelta*), *E. humerosum* var. *parallellum* (podskupina *humerosum-humerosum*)

linie B) *E. didelta* f. *val Piora*, *E. didelta* f. *latior*

linie C) *E. didelta* var. *inermiforme* (podskupina *affine-didelta*), *E. humerosum* var. *affine* (podskupina *affine-humerosum*).

Z výsledků lineárně diskriminační analýzy geometricko-morfometrických dat druhového komplexu *E. humerosum/didelta* (originálních i z literatury) vyplývá, že jsou skupiny variet částečně oddělené. Porovná-li to s příbuznou krásivkou *Micrasterias truncata*, její varieta *M. truncata* var. *pusilla*, byla oddělena také molekulárně (Nemjová et al., 2011).

Podobné odhalení pseudokryptické diverzity jako u našeho druhového komplexu bylo objeveno u jiného druhového komplexu *Micrasterias crux-melitensis/radians* (Neustupa et al., 2010). V obou výše zmíněných studiích byly použity podobné markery (SSU, trnG intron), ale v této diplomové práci byla sekvenována pouze nekódující DNA (SSU intron a trnG intron).

5.2.2.2 Historie výskytu

Srovnala jsem historické rozšíření linií z dostupné literatury. V Čechách se jednalo o záznamy bez ilustrací. Krásivka *E. didelta* byla potvrzena na konci 19 století v severních Čechách v oblasti Šluknova, Liberce a Krkonoš (s uvedenými rozměry, délkou a šířkou: 70-140 x 45-70 μm, Hansgirg, 1886), nicméně tyto hodnoty mohly patřit všem třem liniím. O sto let později byl potvrzený výskyt v severních Čechách (v Jizerských horách; Štěpánková et al., 2008) a také i jinde v ČR *E. humerosum* a *E. humerosum* var. *affine* (Šťastný, 2010; v horách Jeseníky, Štěpánková et al., 2012). Jednalo se o všechny základní morfotypy bez uvedených rozměrů a ilustrací.

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

5.2.2.3 Rozšíření

Jak jsem uvedla výše, zjistila jsem náznaky rozšíření tří linií trnG intronu, s molekulární a teoretickou podporou - pro oblast Evropy a Severní Ameriky (viz obr. 4.5).

Předpokládala jsem podobnou biogeografii jako u *Micrasterias fimbriata* (Neustupa et al., 2011b). Jedna z hranic rozšíření jejích linií byla řeka Rýn. Nicméně jsem měla málo vzorků, abych měla i molekulární podporu tohoto tvrzení i pro studovaný druhový komplex *E. humerosum/didelta*.

Tři linie trnG intronu se střetávaly ve Švédsku a Norsku (s molekulární podporou). Teoreticky z výsledků LDA GM dat a měření ilustrací z literatury se tyto linie střetávaly v Alpách, Francii a Kanadě (viz obr. 4.5). Řeka Rýn by mohla být hranicí šíření pro linii C. Na západním břehu Rýna (Francie) byly linie A a C, na východním břehu Rýna (Rakousko) byla pouze linie A (viz obr. 4.5).

Srovnám-li rozšíření *E. didelta* v Evropě, mohly to být všechny tři linie trnG intronu, popř. další zatím nezjištěné evoluční linie. Ve Francii a Nizozemí mohla být kromě linie A i teoreticky linie C. Buňky linie C měly užší krk a byly kratší délky než v linii A. Ve Švýcarsku, Německu, popř. ve Francii mohla být teoreticky linie B, která se lišila délkou buňky (s buňkami kratšími než měla linie A a delšími než linie C) a relativně širší základnou krku oproti linii A, širšímu krku oproti linii C (viz tab. 4.10).

E. humerosum mohlo být teoreticky ve dvou liniích ve Francii a Nizozemí. Linie A měla užší polární lalok a linie C měla širší polární lalok. Linie A byla delší než linie C. V Německu a Slovensku mohla být teoreticky linie.

5.2.3 Shrnutí

Díky překrývajícím se rozměrům a velké morfologické plasticitě bylo obtížné správně stanovit výpis druhů bez molekulární podpory nebo geometrické morfometriky. Naneštěstí se často pouze odkazovalo na původní literaturu a zřídka se zobrazovaly rozšířené a známé krásivky. Z těchto a jiných důvodů - velké morfologické plasticity, přeorganizování morfotypů do různých celků (taxonomickým přesunům) – docházelo k různým záměnám mezi druhy. Budoucnost by mohlo mít zobrazení krásivek nadšenci přírody, kteří mají k dispozici techniku pro zobrazení řas a mohou takřka okamžitě publikovat na internetových stránkách (Ells, 1998; Kinross, 2002; Wagner, 2008; Plewka, 2011; Mout, 2012; Fučíková, 2015; André, 2017; Scipion, 2017; Opitz, 2018).

V praxi by mohlo pomoci zařadit krásivky do molekulární linie, i přes velikou morfologickou plasticitu, porovnání krásivek s ilustracemi z tabulí (Tabule I-III).

Krásivku rodu *Euastrum* lze určit podle podélného zářezu apexu. Podle tvaru buňky ji lze podle klíče zařadit do druhu a změřit buňku, resp. semicelu, a určit přibližnou linii (délka a šířka). Šířka krku a polárního laloku jen potvrdí jde-li o jednu z linií A,B nebo zda by buňka mohla patřit do linie C. Spolehlivější by bylo je porovnat také geometricko-morfometrickou metodou podobně jako *Micrasterias fimbriata* (Neustupa et al., 2011b). Nejspolehlivější stále zůstává jejich porovnání molekulárních sekvencí trnG intronu.

6.Závěr

Zjistila jsem tři, pravděpodobně mladé, signifikantně odlišené molekulární linie trnG intronu u druhového komplexu *Euastrum humerosum/didelta*. Analýza jaderného SSU intronu neměla jednotné výsledky a konkatenací jsem získala statistickou podporu pro rozdělení linie B a C od ostatních kmenů. Toto rozdělení nemá statistickou podporu v geometrické morfometrice, kde se překrývaly linie A a B, linie C byla výrazně odlišná.

Linie trnG intronu - linie A,B a C byly odlišitelné délkou a šířkou buněk. V literatuře souhlasily rozměry *E. didelta* a *E. humerosum* s liniemi A a B, rozměry *E. humerosum* var. *affine* souhlasily s linií C.

Krásivky byly morfologicky plastické – ve dvou liniích A a C měly dva různé morfotypy *E. didelta* a *E. humerosum*. Linie se lišily kromě délky a šířky buněk také v rámci svých morfotypů. Morfotyp *E. didelta* se lišil v liniích šířkou a tvarem krku. Morfotyp *E. humerosum* se lišil šířkou polárního laloku.

Uvnitř druhového komplexu docházelo k záměnám především z důvodu morfologické plasticity. V literatuře často chybělo přeměřování polárního laloku a ilustrace. V historii také došlo k taxonomickým přesunům původního morfotypu *E. didelta* Turpin ex Ralfs typ b do *E. humerosum* (West & West, 1905) a linie A by mohla být pravděpodobně totožná původnímu popisu *E. didelta* Ralfs. Krásivka *E. humerosum* var. *affine* z klíčů Růžička (1981) a Coesel & Meesters (2007) byla pravděpodobně původně popisovaná jako *E. humerosum* Ralfs.

Pro správné určení linií bychom měli krásivky porovnat s varietami různých morfotypů a získanými ilustracemi v této studii a porovnat s rozměry zjištěných linií. Nejspolehlivější zůstává porovnání trnG intronu fylogenetickou analýzou. Měly by se přehodnotit některé biomonitoringové studie a doplnit pro větší přesnost fotografiemi spolu s rozměry.

7. Seznam použité literatury

- Álvarez, I., Wendel, J.F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. - *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 417–434. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)
- Andersen, R.A., Morton, S.L., Sexton, J.P., 1997. Provasoli-Guillard national center for culture of marine phytoplankton 1997 List of strains. - *J. Phycol.* 33, 1–75. doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00001.x
- André, 2008 [cit. 10.7.2018]. *Euastrum humerosum* Ralfs var. *affine* (Ralfs) Wallich. Le Naturaliste Forum. De la Loupe au microscope... Vos observations macro et microscopiques! [online]. Dostupné na: <<http://www.lenaturaliste.net/forum/viewtopic.php?f=91&t=1520&p=6162&hilit=humerosum>>.
- André, 2017 [cit. 10.7.2018]. *Euastrum didelta* Ralfs. Le Naturaliste Forum. De la loupe au microscope... Vos observations macro et microscopiques! [online]. Dostupné na: <<http://www.lenaturaliste.net/forum/viewtopic.php?f=91&t=20444&p=112976&hilit=euastrum+humerosum#p112976>>.
- Anissimova, O., Terlova, E., 2015 [cit. 13.8.2018]. *Euastrum* Ehrenberg (Conjugatophyceae) in bogs of the Moscow region. - *Issues of modern algology* 8. Dostupné na: <<http://algology.ru/665>>.
- Archer, W., 1875. PROCEEDINGS OF SOCIETIES: Dublin Microscopical Club: Singular and unprecedented Case of Conjugation between two distinct, but allied, Desmidian Species. - *Q. J. Microsc. Sci.* 15, 414–415.
- Baldwin, B.G., 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae. - *Mol. Phylogenet. Evol.* 1, 3–16. [https://doi.org/10.1016/1055-7903\(92\)90030-K](https://doi.org/10.1016/1055-7903(92)90030-K)
- Besendahl, A., Bhattacharya, D., 1999. Evolutionary analyses of small-subunit rDNA coding regions and the 1506 group I introns of the Zygnematales (Charophyceae, Streptophyta). - *J. Phycol.* 35, 560–569. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3530560.x>
- Beszteri, B., Ács, É., Medlin, L., 2005. Conventional and geometric morphometric studies of valve ultrastructural variation in two closely related *Cyclotella* species (Bacillariophyta). - *Eur. J. Phycol.* 40, 89–103.
- Blackburn, S.I., Tyler, P.A., 1981. Sexual reproduction in desmids with special reference to *Micrasterias thomasiana* var. *notata* (Nordst.) Grönblad. - *Br. phycol. J.* 16, 217–229.
- Blackburn, S.I., Tyler, P.A., 1987. On the nature of Eclectic Species - a Tiered Approach to Genetic Compatibility in the Desmid *Micrasterias thomasiana*. - *Br. phycol. J.* 22, 277–298.
- Borge, 1906. Beiträge zur Algenflora von Schweden. - *Ark. Bot.* 6.
- brantfaircloth, 2015 [cit. 12.8.2018]. Substitution models in mrbayes. GitHubGist [online]. Dostupné na: <<https://gist.github.com/brantfaircloth/895282>>.
- Briskaitė, R., Kostkevičienė, J., Naujalis, J., 2008. Desmids (Chlorophyta, Zygnematophyceae) from the Girutiskis mire complex reserve (East Lithuania). - *Biologia* 63.

- Brook, A.J., 1981. - *The Biology of Desmids*, Botanical Monographs 16. ed. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, 276 pp.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F., 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry* 75, 4801–4805.
- Brown, H.J., 1930. The Desmids of the Southeastern Coastal Plain Region of United States. - *T. Am. Microsc. Soc.* 49, 97.
- Caraus, I., 2012. Algae of Romania. A distributional checklist of actual algae. *Studii si Cercetari - Biologie* 7, 1–809.
- CIA, 2001 [cit. 12.8.2018]. Political World Map. Central Intelligence Agency [online]. Dostupné na: <<http://hdl.loc.gov/loc.gmd/g3200.ct002066>>.
- Coesel, P.F.M., 1989. Biosystematic studies on the *Closterium moniliferum / ehrenbergii* complex (Chlorophyta, Conjugatophyceae) in western Europe. IV. Distributional aspects. *Cryptogam.: - Algol.* 10, 133–141.
- Coesel, P.F.M., 1996. Biogeography of desmids. - *Hydrobiologia* 336, 41–53.
- Coesel, P.F.M., 2001. A method for quantifying conservation value in lentic freshwater habitats using desmids as indicator organisms. - *Biodivers. Conserv.* 10, 177–187.
- Coesel, P.F.M., 2003. Desmid flora data as a tool in conservation management of Dutch freshwater wetlands. - *Biologia* 58, 717–722.
- Coesel, P.F.M., Meesters, K.J., 2007. *Desmids of the Lowlands: Mesotaeniaceae and Desmidiaceae of the European Lowlands*. KNNV Publishing, Zeist, the Netherlands, (8-15pp.), 351 pp.
- Cooke, M.A., 1887. *British Desmids: a supplement to british fresh-water algae*. Williams and Norgate, London.
- Corliss, J.O., Esser, S.C., 1974. Comments on the Role of the Cyst in the Life Cycle and Survival of Free-Living Protozoa. - *T. Am. Microsc. Soc., Symposium: Perspectives on the Biology of Dormancy* 93, 578–593. <https://doi.org/10.2307/3225158>
- Croasdale, H., Grönblad, R., 1964. Desmids of Labrador 1. Desmids of the Southeastern Coastal Area. - *T. Am. Microsc. Soc.* 83, 142.
- Černá, K., Neustupa, J., 2010. The pH-related morphological variations of two acidophilic species of Desmidiaceae (Viridiplantae) isolated from a lowland peat bog, Czech Republic. - *Aquat. Ecol.* 44, 409–419.
- darkfate, 2019[cit. 31.7.2019]. Slepá mapa světa. Mapa světa.info. Mapy světa[online]. Dostupné na: <https://mapasveta.info/svet/images/svet_slepa_mapa2.gif>.
- de Oliveira, I.B., Bicudo, C.E. de M., Moura, C.W. do N., 2011. *Euastrum* (Desmidiaceae, Zygnematophyceae) na planície litorânea do norte da Bahia, Brasil. - *Sitientibus série Ciências Biológicas* 11, 62–73.
- de Queiroz, K., 2007. Species Concepts and Species Delimitation. - *Systematic Biol.* 56, 879–886.

- Deflandre, G., 1926. Contributions à la flore algologique de France—I. Confolentais. - *B. Soc. Bot. FR.* 73, 987–999.
- Denboh, T., Hendrayanti, D., Ichimura, T., 2001. Monophyly of the genus *Closterium* and the order Desmidiaceae (Charophyceae, Chlorophyta) inferred from nuclear small subunit rDNA data. - *J. Phycol.* 37, 1063–1072.
- Denboh, T., Ichimura, T., Hendrayanti, D., Coleman, A.W., 2003. *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Charophyceae, Chlorophyta) species complex viewed from the 1506 group I intron and ITS2 of nuclear rDNA. - *J. Phycol.* 39, 960–977.
- Ducellier, F., 1915. Contribution à l'étude du Polymorphisme et des Monstruosités chez les Desmidiacées. - *Bull. Soc. bot. Genève*, 2 VII, 75–118.
- Ducellier, F., 1918. Contribution à l'étude de la Flore Desmidiologique de la Suisse (Suite*) Deuxième partie. - *Bull. Soc. bot. Genève* 10, 85–154.
- Efron, B., 1982. *The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans*. SIAM. Society for Industrial and Applied Mathematics. Doi:10.1137/1.9781611970319
- Ehrenberg, C.G., 1831. Über die Entwicklung und Lebensdauer der Infusionsthierchen; nebst ferneren Beiträgen zu einer Vergleichung ihrer organischen Systeme. - *Abhandlungen der Königlich-Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Physikalische Klasse* 1–154.
- Ells, W., 1998 [cit. 11.4.2018]. Optical and SEM examination of some species of the desmid genus *Euastrum*. - *Micscape Magazine* [online]. Dostupné na: <<http://www.microscopy-uk.net/mag/art98/semdes.html>>.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. - *Evolution* 39, 783–791.
- Florin, M.-B., 1957. Plancton of Fresh and Brackish Waters in the Södertälje Area. - *Acta Phytogeogr. Suec.* 37, 0–144.
- Foissner, W., 1997. Soil ciliates (Protozoa: Ciliophora) from evergreen rain forests of Australia, South America and Costa Rica: diversity and description of new species. - *Biol. Fert. Soils* 25, 317–339.
- Foissner, W., 2006. Biogeography and Dispersal of Micro-organisms: A Review Emphasizing Protists. - *Acta protozool.* 45, 111–136.
- Fromm, T., 2014. Zur Situation der Desmidiaceen in Berlin in den Jahren 2009 bis 2014. - *Verh. Bot. Ver. Berlin Brandenburg* 147, 185–249.
- Fučíková, K., 2015 [cit. 10.7.2018]. *Euastrum humerosum*. iNaturalist [online]. Dostupné na: <<https://www.inaturalist.org/observations/1880403>>.
- Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. - *Statist. Sci.* 7, 457–472.
- Gerrath, J.F., 2003. Conjugating Green Algae and Desmids, - in: Wehr, J.D., Sheath, R.G. (Eds.), *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Academic Press, Boston, pp. 353–381.

- Gontcharov, A.A., 2008. Phylogeny and classification of Zygnematophyceae (Streptophyta): current state of affairs. - *Fottea* 8, 87–104.
- Gontcharov, A.A., Marin, B., Melkonian, M., 2003. Molecular Phylogeny of Conjugating Green Algae (Zygnemophyceae, Streptophyta) Inferred from SSU rDNA Sequence Comparisons. - *J. Mol. Evol.* 56, 89–104.
- Gontcharov, A.A., Melkonian, M., 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.
- Grabowska, M., Hindák, F., Hindáková, A., 2014. Phototrophic microflora of dystrophic Lake Sęczek, Masuria, Poland. - *Oceanol. Hydrobiol. St.* 43, 337–345.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2019 [cit. 14.4.2019]. AlgaeBase [online]. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Dostupné na: <<http://www.algaebase.org>>.
- Gysels, J., Vanhoof, A., Vaes, L., Luts, R., Wouters, P., Horemans, M., Loos, G., 2015[cit. 8.7.2018]. *Praktische gids voor de sieraalgen van Vlaanderen* [online], Natuurpunt Educatie. Natuurpunt.Mechelen, Belgium. Dostupné na: <https://issuu.com/natuurpunt/docs/gids_sieraalgen_16april2015>.
- Hall, J.D., Karol, K.G., McCourt, R.M., Delwiche, C.F., 2008. Phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data. - *J. Phycol.* 44, 467–477.
- Hammer, O., 2018. *PAST*. PAleontological STatistics. Version 3.20. Reference manual.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. - *Palaeontol. Electron.* 4, 9.
- Hansgirg, A., 1886. Prodrömus der Algenflora von Böhmen. Erster Theil. enthaltend die Rhodophyceen, Phaeophyceen und einen Theil der Chlorophyceen. - *Das Archiv für die naturwissenschaftliche Landesdurchforschung von Böhmen* V, 5–279.
- Harpke, D., Peterson, A., 2006. Non-concerted ITS evolution in Mammillaria (Cactaceae). - *Mol. Phylogenet. Evol.* 41, 579–593. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.036>
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the Human - Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA. - *J. Mol. Evol.* 22, 160–174.

- Hasegawa, M., Yano, T., Kishino, H., 1984. A new molecular clock of mitochondrial DNA and the evolution of Hominoids. - *Proc. Japan Acad. Ser. B* 60, 95–98.
- Hastings, W.K., 1970. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. - *Biometrika* 57, 97–109.
- Hepperle, D., 2002. *SeqAssem*. SequentiX - Digital DNA Processing, Warnow - Klein Raden, Germany.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. - *Q. Rev. Biol.* 66, 411–453.
- Hoshaw, R.W., McCourt, R.M., 1988. The Zygnemataceae (Chlorophyta): a twenty-year update of research. - *Phycologia* 27, 511–548.
- Huss, V.A.R., Frank, C., Hartmann, E.C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B.M., Wenzeler, P., Kessler, E., 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). - *J. Phycol.* 35, 587–598.
- Hylíš, M., Nebesářová, J., 2008a [cit. 9.7.2018]. Metody přípravy biologických vzorků pro elektronovou mikroskopii aplikované LEM. LEM, Laboratoř elektronové mikroskopie [online]. Dostupné na: <<https://web.natur.cuni.cz/~lem/index.php?p=metody>>.
- Hylíš, M., Nebesářová, J., 2008b [cit. 9.7.2018]. Vybavení. LEM, Laboratoř elektronové mikroskopie [online]. Dostupné na: <<https://web.natur.cuni.cz/~lem/index.php?p=vybaveni>>.
- Chen, C., Barfuss, M.H.J., Pröschold, T., Schagerl, M., 2012 [cit. 2013-05-14]. Hidden genetic diversity in the green alga *Spirogyra* (Zygnematophyceae, Streptophyta) [online]. - *BMC Evol. Biol.* 12. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/12/77>. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-77>
- Chen, C., Schagerl, M., 2012. Slow evolution of 1506 group I intron in *Spirogyra* Link 1820 (Zygnematophyceae, Streptophyta), a fast evolving lineage in the Zygnemataceae. - *Fottea* 12, 255–272. <https://doi.org/10.5507/fot.2012.018>
- Islam, A.N., Irfanullah, H.M., 2006. Hydrobiological studies within the tea gardens at Srimangal, Bangladesh. V. Desmids (*Euastrum*, *Micrasterias*, *Actinotaenium* and *Cosmarium*). - *Bangl. J. Plant Taxon.* 13, 1–20.
- John, D.M., Williamson, D.B., 2009. *A practical guide to the desmids of the West of Ireland*. Martin Ryan Institute, National University of Ireland, Galway.
- John, U., Litaker, R.W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M.L., Anderson, D.M., 2014. Formal Revision of the *Alexandrium tamarense* Species Complex (Dinophyceae) Taxonomy: The Introduction of Five Species with Emphasis on Molecular-based (rDNA) Classification. - *Protist* 165, 779–804.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules, - in: Munro, H.N. (Ed.), *Mammalian Protein Metabolism* III. Academic Press, pp. 21–132.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. - *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.

- King, G.C., 1960. The Cytology of the Desmids: The Chromosomes. - *New Phytol.* 59, 65–72.
- Kinross, J., 2002 [cit. 10.7.2018]. Freshwater Algae from Loch Skeen, 26th May 2002. Loch Skeen Plankton[online]. Dostupné na: <<http://algalweb.net/skeen.htm>>.
- Kouwets, F.A.C., 1984. The Taxonomy, Morphology and Ecology of Some Smaller *Euastrum* Species (Conjugatophyceae, Desmidiaceae). - *Br. phycol. J.* 19, 333–347.
- Kouwets, F.A.C., 2008. The species concept in desmids: the problem of variability, infraspecific taxa and the monothetic species definition. - *Biologia* 63, 881–887.
- Kraft, L.G.K., Kraft, G.T., Waller, R.F., 2010. Investigations into southern Australian *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) taxonomy and molecular phylogeny indicate both cosmopolitanism and endemic cryptic species. - *J. Phycol.* 46, 1257–1277.
- Krasznai, E., Fehér, G., Borics, G., Várbíró, G., Grigorszky, I., Tóthmérész, B., 2008. Use of desmids to assess the natural conservation value of a Hungarian oxbow (Malom-Tisza, NE-Hungary). - *Biologia, Section Botany* 63, 928–935.
- Krieger, W., 1937. Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außereuropäischen Arten, - in: *Rabenhorst's Kryptogamen - Flora, Band 13, Abteilung 1, Teil 1.* Akademische Verlagsgesellschaft M. B. H., Leipzig, pp. 1–712.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. - *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Lakshminarayana, J.S.S., 1976. Studies on a series of small freshwater pools near St. John's, Newfoundland II. Algae. - *Hydrobiologia* 49, 129–135.
- Lane, T. G., Independent JPEG Group, Vollbeding, G., Randers-Pehrson, G., Leffler, S., Silicon Graphics, Inc., Gailly, J.-L., Adler, M., Coffin, D., Microsoft corporation, Adams, M. D., Elonen, J., ITU-T/ISO/IEC, Porter, M., Volland, G., Maddock, J., Intel Corporation, SpiderMonkey JavaScript Engine, Druckmüller, M., Maria, M., Adobe Systems Incorporated, National Institute of Technology, USA, Terra Informatica Software, Inc., and SQLite 3.8.3.1, 1995-2015, Zoner Photo Studio v. 17 (Sestavení 12). ZONER software, a. s. Dostupné na: <<https://www.zoner.cz/download>>.
- Lefort, V., Longueville, J.-E., Gascuel, O., 2017. SMS: Smart Model Selection in PhyML. - *Mol. Biol. Evol.* 34, 2422-2424. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>.
- Lenarczyk, J., Lenzenweger, R., Jacuńska, U., 2015. Spatial and temporal variations in the genera *Euastrum* Ralfs and *Micrasterias* Ralfs (Desmidiaceae) assemblages of high altitude lakes (Western Carpathians). - *Nova Hedwigia* 101, 233–250.
- Lenzenweger, R., 1967. Beiträge zur Desmidiaceenflora des Ibmer Moores (2. Fortsetzung). - *Jb. Oö. Mus.-Ver.* 112a, 173–184.
- Lenzenweger, R., 1971. Beiträge zur Desmidiaceenflora des Ibmer Moores, 5. und letzte Fortsetzung. - *Jb. Oö. Mus.-Ver.* 116, 293–303.

- Lenzenweger, R., 1976. Einige Desmidiaceen aus Mooren Nordkareliens nebst Beobachtungen an Doppelzygoten. - *Linzer biol. Beitr* 8, 63–78.
- Lenzenweger, R., 1981. Zieralgen aus dem hornspitzgebiet bei Gosau - Teil I: Desmids from the “Hornspitz” - region near Gosau (upper Austria) - Part I. - *Naturk. Jb. d. Stadt Linz* 27, 25–82.
- Lenzenweger, R., 1995[cit. 14.7.2018]. *Ein Blick ins Unsichtbare - Algen aus dem Alm- und Laudachsee. Naturwissenschaftliche Sammlungen Kremsmünster, Berichte des Anselm Desing vereins*[online] 4–13. Dostupné na: <http://www.zobodat.at/pdf/ADV_28_0001-0032.pdf>.
- Lenzenweger, R., 1996. *Desmidiaceenflora von Österreich* Teil 1, Bibliotheca Phycologica. J. CRAMER, Berlin, Stuttgart.
- Lenzenweger, R., 2002 [cit. 19.7.2018]. *Euastrum* (Tafel II). Zieralgen, Schmuckalgen – Desmidiaceen [online]. Dostupné na: <<http://www.hydro-kosmos.de/desmids/tf2800.htm>>.
- Liao, D., 1999. Concerted Evolution: Molecular Mechanism and Biological Implications. - *Am. J. Hum. Genet.* 64, 24–30.
- LibreOffice contributors, 2000-2018 [cit. 28.4.2019]. LibreOffice Version: 6.1.0.3. Dostupné na: <LibreOffice.org>.
- Lopes, M.R.M., Bicudo, C.E. de M., 2002. Desmidioflórula de um lago da planície de inundação do rio Acre, estado do Amazonas, Brasil. Desmid Flora of the Flood Plain Lake, Acre River, Amazonas State, - *Brazil. Acta Amazonica* 33, 167–212.
- Manhart, J.R., McCourt, R.M., 1992. Molecular data and species concepts in the algae. - *J. Phycol.* 28, 730–737.
- Mann, D.G., Evans, K.M., 2007. Molecular genetics and the neglected art of diatomics, - in: Brodie, J., Lewis, J. (Eds.), *Unravelling the Algae, the Past, Present, and Future of Algal Systematics*. CRC Press, Boca Raton, pp. 231–265.
- mapaevropy, 2018[cit. 9.7.2018]. Slepá mapa Evropy. Mapa Evropy[online]. Dostupné na: <<http://www.mapaevropy.com/img/slepa-mapa.jpg>>.
- Martello, G.V., 2006. Alcune desmidiee della zona di Caldenave e della Val d’Inferno - Massiccio montuoso dei Lagorai (Trento). - *Inf. Bot. Ital.* 38, 513–536.
- McCourt, R.M., Karol, K.G., Bell, J., Helm-Bychowski, K.M., Grajewska, A., Wojciechowski, M.F., Hoshaw, R.W., 2000. Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnematophyceae) based on rbcL sequences. - *J. Phycol.* 36, 747–758.
- Medvedova, L.A., 2001. Biodiversity of aquatic algal communities in the Sikhote-Alin biosphere reserve (Russia). - *Cryptogam. Algol.* 22, 65–100.
- Meneghini, J., 1840. Synopsis Desmidiearum hucusque cognitarum. - *Linnaea* 14, 201–240.8.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A.W., Rosenbluth, M.N., Teller, A.H., Teller, E., 1953. Equations of state calculations by fast computing machines. - *J. Chem. Phys.* 21, 1087–1091.

- Mout, J., 2012-2015 [cit. 19.7.2018]. *Sieralgen*. BIOLOGIE en GEOLOGIE [online]. Dostupné na: <<http://www.sieralgen.nl/>>
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Nemjová, K., Neustupa, J., Šťastný, J., Škaloud, P., Veselá, J., 2011. Species concept and morphological differentiation of strains traditionally assigned to *Micrasterias truncata*. - *Phycol. Res.* 59, 208–220.
- Neustupa, J., Černá, K., Šťastný, J., 2011a. The effects of aperiodic desiccation on the diversity of benthic desmid assemblages in a lowland peat bog. - *Biodivers. Conserv.* 20, 1695–1711.
- Neustupa, J., Černá, K., Šťastný, J., 2009. Diversity and morphological disparity of desmid assemblages in Central European peatlands. - *Hydrobiologia* 630, 243–256.
- Neustupa, J., Škaloud, P., Šťastný, J., 2010. The molecular phylogenetic and geometric morphometric evaluation of *Micrasterias crux-melitensis*/ *M. radians* species complex. - *J. Phycol.* 46, 703–714. doi:10.1111/j.1529-8817.2010.00863.x
- Neustupa, J., Šťastný, J., 2006. The geometric morphometric study of Central European species of the genus *Micrasterias* (Zygnematophyceae, Viridiplantae). - *Preslia* 78, 253–263.
- Neustupa, J., Šťastný, J., Hodač, L., 2008. Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. - *Aquat. Microb. Ecol.* 51, 77–86.
- Neustupa, J., Šťastný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Goodyer, E., Pouličková, A., Škaloud, P., 2011b. A novel, combined approach to assessing species delimitation and biogeography within the well-known desmid species *Micrasterias fimbriata* and *M. rotata* (Desmidiaceae, Steptophyta). - *Hydrobiologia* 667, 223–239.
- Opitz, A., 2018 [cit. 19.7.2018]. *Euastrum didelta* Ralfs. Die Moore im Tiroler Bezirk Kitzbühel. Galerien [online]. Dostupné na: <<https://www.moor-impressionen.at/galerien/pic-1001799.htm>>.
- Pals, A., Elst, D., Muylaert, K., Van Assche, J., 2006. Substrate specificity of periphytic desmids in shallow softwater lakes in Belgium. - *Hydrobiologia* 568, 159–168.
- Patterson, A.J., Chamberlain, B., Thayer, D., 2004. *FinchTV*. Geospiza Research Team.
- Plewka, M., 2011 [cit. 19.7.2018]. *Euastrum humerosum*. Pling [online]. Dostupné na: <http://www.plingfactory.de/Science/Atlas/Kennkarten%20Algen/01_e-algae/Conjugophyceae/e-source/Euastrum%20humerosum.html>.
- Popović, D.M., Stuchebrukhov, A.A., 2005. Proton Exit Channels in Bovine Cytochrome *c* Oxidase. - *J. Phys. Chem. B* 109, 1999–2006. <https://doi.org/10.1021/jp0464371>
- Potapova, M., Hamilton, P.B., 2007. Morphological and Ecological Variation within the *Achnanthydium minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex. - *J. Phycol.* 43, 561–575.
- Pouličková, A., Veselá, J., Neustupa, J., Škaloud, P., 2010. Pseudocryptic Diversity versus Cosmopolitanism in Diatoms: a Case Study on *Navicula cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and Morphologically Similar Taxa. - *Protist* 161, 353–369.

- Prescott, G.W., Croasdale, H.T., Vinyard, W.C., 1977. *A synopsis of North American desmids*. 2,2: Desmidiaceae: Placodermae, Section 2. University of Nebraska Press, Lincoln.
- Prescott, G.W., Scott, A.M., 1942. The Fresh-Water Algae of Southern United States I. Desmids from Mississippi, with Descriptions of New Species and Varieties. - *T. Am. Microsc. Soc.* 61, 1.
- Protist Information Server, 1995-2018[cit. 11.7.2018]. *Euastrum humerosum*. Chlorophyta. Protist Information Server[online]. Dostupné na: <<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Euastrum/humerosum/index.html>>.
- Protist Information Server, 1995-2018[cit. 11.7.2018]. *Euastrum affine*. Chlorophyta. Protist Information Server[online]. Dostupné na: <<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Euastrum/affine/index.html>>.
- Protist Information Server, 1995-2018[cit. 11.7.2018]. *Euastrum didelta*. Chlorophyta. Protist Information Server[online]. Dostupné na: <<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Euastrum/didelta/index.html>>.
- Raciborski, M., 1885. Opisy nowych Desmidyjów polskich (Tablica X-XIV). De Nonnullis Desmidiaceis novis vel minus cognitiss, quae in Polonia inventae sunt. Cum tabulis V. - *Pamiętnik Wyzd. III. Akad. Umiej. w Krakowie* 10, 57–100.
- Ralfs, J., 1844. XXV. - On the British Desmidiaceae. - *Ann. mag. nat. hist.* 14, 187–194.
- Ralfs, J., 1848. *The British Desmidiaceae*. Reeve, Benham and Reeve, London.
- Rohlf, F.J., 2013. tpsUtil ver.1.60, tps Utility program. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2014. tpsRelw ver. 1.54, tps Relative warps. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2015. tpsDig2 Version 2.18, tps. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2016a. tps Small32, tps. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2016b [cit.12.8.2018]. A glossary for Geometric Morphometrics. Morphometrics at SUNY Stony Brook[online]. Dostupné na: <<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>>.
- Rohlf, F.J., 2017a. Tpsrelw32 v. 1.67, tps Relative warps. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., 2017b. tps Utilw32, tps Utility program. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. - *Bioinformatics* 19, 1572–1574.

- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayers, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. - *Systematic Biol.* 61, 539–542.
- Růžička, J., 1977. *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*, Band 1. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 2 seš., 291 pp.
- Růžička, J., 1981. *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*, Band 1, 2. Lieferung. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele un. Obermiller), Stuttgart, 736 pp.
- Sáez, A.G., Lozano, E., 2005. Body doubles. - *Nature* 433, 111–111.
- Salemi, M., Vandamme, A.-M., 2003. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge University Press, Cambridge, 406 pp.
- Salisbury, R.K., 1936. The Desmids of Florida. Ohio - *Jour. Sci.* 36, 55–61.
- Santos, L. 2007[cit. 9.7.2018]. ACOI Cultures. ACOI. Coimbra Collection of Algae [online]. Dostupné na: <http://acoi.ci.uc.pt/acoi_list.php>.
- Savriama, Y., Klingenberg, C., 2011. Beyond bilateral symmetry: geometric morphometric methods for any type of symmetry. - *BMC Evol Biol* 11, 280. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-280>
- Scipion, 2017 [cit. 10.7.2018]. Quelques desmidées. Le Naturaliste Forum. De la loupe au microscope... Vos observations macro et microscopiques! [online]. Dostupné na: <<http://www.lenaturaliste.net/forum/viewtopic.php?f=135&t=20075&p=110942&hilit=euastrum+humerosum#p110942>>.
- Scott, A.M., Prescott, G.W., 1958. Some freshwater algae from Arnhem land - in the *Northern Territory of Australie. Records of the American-Australian scientific expedition to Arnhem Land* 3 3, 9–136.
- Scott, A.M., Prescott, G.W., 1961. Indonesian Desmids. - *Hydrobiologia* 17, 1–259.
- Schindelin, J., Rueden, C.T., Hiner, M.C., Eliceiri, K.W., 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. - *Mol. Reprod. Dev.* 82, 518–529. doi:10.1002/mrd.22489
- South, G.R., 1984. Taxonomic implications of morphometric variation in a bloom population of *Euastrum didelta* (Chlorophyta: Desmidiaceae). - *Phycologia* 23, 47–52.
- Starr, R.C., 1955. Isolation of sexual strains of placoderm desmids. - *Bull. Torrey Bot. Club* 82, 261–265.
- Škaloud, P., 2006 [cit. 9.7.2018]. *Euastrum*. Sinice a řasy.cz – galerie [online]. Dostupné na: <<http://galerie.sinicearasy.cz/galerie/streptophyta/zygnemophyceae/euastrum>>.
- Škaloud, P., 2010 [cit. 9.7.2018]. Media recipes. CAUP. Culture Collection of Algae of Charles University in Prague [online]. Dostupné na: <<https://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media.html>>.
- Škaloud, P., Kynčlová, A., Benada, O., Kofroňová, O., Škaloudová, M., 2012b. Toward a revision of the genus *Synura*, section Petersenianae (Synurophyceae, Heterokontophyta): morphological characterization of six pseudo-cryptic species. - *Phycologia* 51, 303–329.

- Škaloud, P., Nemjová, K., Veselá, J., Černá, K., Neustupa, J., 2011. A multilocus phylogeny of the desmid genus *Micrasterias* (Streptophyta): Evidence for the accelerated rate of morphological evolution in protists. - *Mol. Phylogenet. Evol.* 61, 933–943.
- Škaloud, P., Šťastný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Pouličková, A., Neustupa, J., 2012a. Molecular phylogeny of baculiform desmid taxa (Zygnematophyceae). - *Plant Syst. Evol.* 298, 1281–1292.
- Šťastný, J., 2007. Die Desmidiaceenflora von Piskovny Cep (Südböhmen). - *Novit. Bot. Univ. Carol.* 18, 53–62.
- Šťastný, J., 2010. Desmids (Conjugatophyceae, Viridiplantae) from the Czech Republic; new and rare taxa, distribution, ecology. - *Fottea* 10, 1–74.
- Šťastný, J., Kouwets, F.A.C., 2012. New and remarkable desmids (Zygnematophyceae, Streptophyta) from Europe: taxonomical notes based on LM and SEM observations. - *Fottea* 12, 293–313.
- Šťastný, J., Škaloud, P., Langenbach, D., Nemjová, K., Neustupa, J., 2013. Polyphasic evaluation of *Xanthidium antilopaeum* and *Xanthidium cristatum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) species complex. - *J. Phycol.* 49, 401–416.
- Štěpánková, J., Hašler, P., Hladká, M., Pouličková, A., 2012. Diversity and ecology of desmids of peat bogs in the Jeseníky Mts: spatial distribution, remarkable finds. - *Fottea* 111–126.
- Štěpánková, J., Vavrušková, J., Hašler, P., Mazalová, P., Pouličková, A., 2008. Diversity and ecology of desmids of peat bogs in the Jizerské hory Mts. - *Biologia, Section Botany* 63, 895–900.
- Tamura, K., 1992. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases. - *Mol. Biol. Evol.* 9, 678–687.
- Tangen, K., Haworth, E.Y., Brettrum, P., Müller, C., 1978. An annotated check-list of microalgae from Ovre Hemdalsvatn and its tributaries. - *Holarctic. Ecol.* 1, 155–161.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. - *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Trobajo, R., Clavero, E., Chepurinov, V.A., Sabbe, K., Mann, D.G., Ishihara, S., Cox, E.J., 2009. Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae). - *Phycologia* 48, 443–459.
- Tsuchikane, Y., Sato, M., Ootaki, T., Kokubun, Y., Nozaki, H., Ito, M., Sekimoto, H., 2010. Sexual Processes and phylogenetic relationships of a homothallic strain in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). - *J. Phycol.* 46, 278–284. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00806.x>
- Turmel, M., Otis, C., Lemieux, C., 2005 [cit. 2013-05-13]. The complete chloroplast DNA sequences of the charophycean green algae *Staurastrum* and *Zygnema* reveal that the chloroplast genome underwent

- extensive changes during the evolution of the Zygnematales [online]. - *BMC Biol.* 3. Dostupné na: <<http://www.biomedcentral.com/1741-7007/3/22>>.
- Turpin, P.J.F., 1828. 3. Aperçu organographique sur le nombre deux. - *Mus. Hist. Nat. Mém.* XIV, 295–344.
- Veselá, J., Neustupa, J., Pichrtová, M., Pouličková, A., 2009. Morphometric study of *Navicula* morphospecies (Bacillariophyta) with respect to diatom life cycle. - *Fottea* 9, 307–316.
- Wagner, R., 2005-2014 [cit. 20.7.2018]. Zygnematales. Dr. Ralph Wagner [online]. Dostupné na: <<http://www.dr-ralf-wagner.de/index-englisch.htm>>.
- Wallich, G.C., 1860. XXI. - Descriptions of Desmidiaceae from Lower Bengal. - *Ann. & Mag. Nat. Hist.* S3., V., 184–197.
- Wang, W., Ma, L., Becher, H., Garcia, S., Kovarikova, A., Leitch, I.J., Leitch, A.R., Kovarik, A., 2016. Astonishing 35S rDNA diversity in the gymnosperm species *Cycas revoluta* Thunb. - *Chromosoma* 125, 683–699. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0556-3>
- Wei, Y., 1991. SEM study of cell walls of 24 desmids (Desmidiaceae, Chlorophyta) from China. - *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 9, 263–276.
- Weisse, T., 2008. Distribution and diversity of aquatic protists: an evolutionary and ecological perspective.- *Biodivers. Conserv.* 17, 243–259.
- West, W., West, G.S., 1905. *A monograph of the British Desmidiaceae*. Ray Society, London.
- Wolle, F., 1892. New and Enlarged Edition. *Desmids of the United States* and List of American Pediastrums With Nearly Fourteen Hundred Illustrations on Sixty-Four Colored Plates. Moravian Publication Office, Bethlehem, PA.
- Woodhead, N., Tweed, R.D., 1958. A check list of tropical West African algae: (Fresh- and Brackish- water). - *Hydrobiologia* 11, 299–396.
- Zelditch, M. (Ed.), 2004. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston.
- Zimmer, E.A., Martin, S.L., Beverley, S.M., Kan, Y.W., Wilson, A.C., 1980. Rapid duplication and loss of genes coding for the α chains of hemoglobin. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2158–2162.

8.Příloha

Tab. 8.1. Geografické rozšíření druhového komplexu *Euastrum humerosum didelta* (affi-*E. affine*/*E. humerosum* var. *affine*, den - *E. didelta* var. *denticulatum*, did – *E. didelta*, hum - *E. humerosum*, par - *E. humerosum* var. *parallelum*, scr - *E. humerosum* var. *scrobiculata*, tru - *E. didelta* var. *truncata*, při neuvedení morfotypu, byly přítomny všechny).

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

Tab. 8.1 - pokračování

<i>Lokalita výskytu</i>	<i>affi</i>	<i>did</i>	<i>hum</i>	<i>zdroj</i>
- Rusko	x	x	x	Cooke, 1887 (did, Laponsko); West & West, 1905; Anissimova & Terlova, 2015 (hum, affi, Moskva)
<i>jižní Evropa</i>				
-Azorské oo.		x		West & West, 1905
- Itálie		x	x	Cooke, 1887; West & West, 1905; Martello, 2006 (did)
- Portugalsko		x	x	Santos, 2007
- Španělsko (Galicie)		x	x	West & West, 1905
<i>Severní Amerika</i>				
- Grónsko		x		West & West, 1905
- Kanada, Labrador	x	x		Croasdale & Grönblad, 1964 (tru);
- Kanada,		x		Lakshminarayana, 1976; South, 1984
New Foundland				
- USA	x	x		Wolle, 1892 (did - rozšířený, <i>affi</i> , od Pensylvánie po Georgii); Prescott & Scott, 1942 (did, Mississippi)
-Florida, Pensylvánie	x	x	x	Cooke, 1887; Wolle (1892, Pensylvánie); West & West, 1905; Brown, 1930 (affi, did, Florida); Salisbury, 1936 (hum)
<i>Jižní Amerika</i>				
- Brazílie		x		Krieger, 1937 (qua); Lopes & Bicudo, 2002 (qua); de Oliveira et al., 2011 (qua)
- Kolumbie		x		Krieger, 1937 (qua)
- Paraguay		x		West & West, 1905
<i>Asie</i>				
- Bangladéš		x		Islam & Irfanullah, 2006
- Srí Lanka		x		West & West, 1905; Krieger, 1937 (ben)
- Indie	x	x	x	West & West, 1905; Krieger, 1937 (ben)
- Japonsko	x	x	x	Protist Information Server, 1995-2018
- východní Čína	x			Wei, 1991; Medvedova, 2001
<i>Afrika</i>				
- Sierra Leone	x			Woodhead & Tweed, 1958
<i>Austrálie a Indonésie</i>				
- Austrálie		x		Scott & Prescott, 1958 (ben)
- Borneo		x		Scott & Prescott, 1961 (ben)
- Jáva		x		Krieger, 1937 (cun)
- Sumatra		x		Scott & Prescott, 1961 (ben, cun)

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

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

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

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

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

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

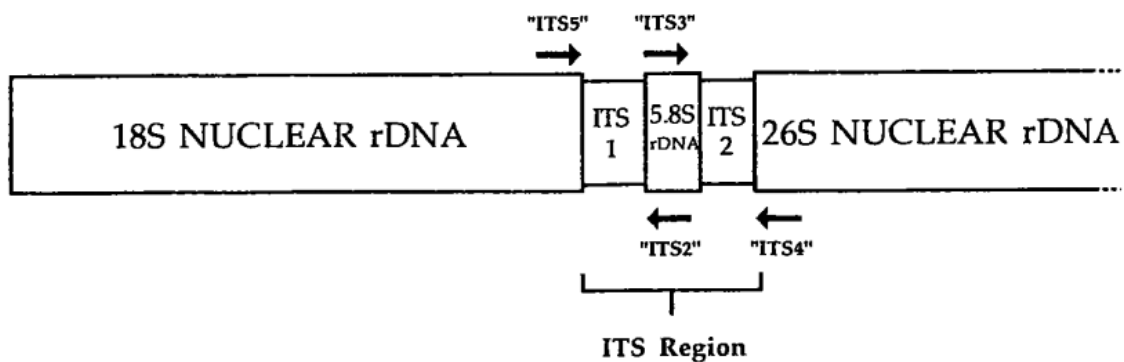
Tab. 8.5. Seznam kultur (ACOI kultury; Santos, 2007; kultivace kmenů E9-E15 autorem; ident.-identifikace).

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

Tab. 8.5 - pokračování.

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

Obr. 8.1. Repetice 18S-26S jaderné ribosomální DNA spolu s ITS (Baldwin, 1992).



Tab.8.6. LDA výsledky krásivek z literatury. GM – geometrická morfometrika, GM+MP – GM v kombinaci rozměrů a jejich poměrů, GM+P - GM s poměry- Class. - klasifikováno, JK – Jackknife. Morfologické podskupiny: Linie A: 1 – *humerosum-didelta*, 2 – *humerosum-humerosum*, Linie B: 3 - *scandinave*, Linie C: 4 – *affine-didelta*, 5-*affine-humerosum*. Rozměry: Ds – délka semicely, Ss – šířka semicely, Sk - šířka krku

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

Tab. 8.6 - pokračování

Jméno	Zdroj	Místo	GM		GM+P		GM+MP		Linie. rozměry
			Class.	JK	Class.	JK	Class.	JK	
<i>E. didelta</i>	Lenzenweger, 1967, Taf. VIII, Fig. 2	Rakousko, Ibmer Moor, Horní Rakousy	2	2	0	0	0	0	?A
<i>dto</i>	Lenzenweger, 1971, Taf. XXXII, Fig. 21	Rakousko, Ibmer Moor, Horní Rakousy	2	2	0	0	0	0	?
<i>dto</i>	Lenzenweger, 1995, Abb. 7, vpravo	Rakousko, Štýrsko,	3	3	0	0	0	0	?
<i>dto</i>	Lenzenweger, 2002, Taf. II, Fig. 9	-	0	4	4	4	3	3	?
<i>dto</i>	Martello, 2006, Fig. 25	Itálie, Val d'Inferno, Monti Lagorai	0	0	0	0	2	2	A
<i>dto</i>	Ralfs, 1848, Tab. XIV, Fig. 1a	Britské oo.	0	0	0	0	0	1	Ds> A
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 4c	Kanada, Fairhaven, Newfoundland	3	3	0	0	0	0	A
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 4f	<i>dto</i>	3	3	0	3	0	0	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 5c	<i>dto</i>	0	0	0	0	0	3	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 5f	<i>dto</i>	3	3	0	0	0	0	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 6a	<i>dto</i>	3	3	0	0	0	0	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 6e	<i>dto</i>	0	2	0	0	0	0	C
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 7b	<i>dto</i>	1	1	1	1	3	3	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 7c	<i>dto</i>	0	0	0	0	0	3	?
<i>dto</i>	South, 1984, Fig. 8c	<i>dto</i>	3	3	3	3	0	3	C?
<i>dto</i>	West & West, 1905, Pl. XXXV, Fig. 4	-	2	2	2	2	0	0	?, Ds> A
<i>E. didelta f. didelta</i>	South, 1984, Fig. 4b	Kanada, Fairhaven, Newfoundland	0	0	0	3	3	3	A
<i>E. didelta f. intermediae</i>	Ducellier, 1915, Pl. I, Fig. 6	Francie, Savojské Alpy, Bisanne	2	2	0	0	0	0	C

Tab. 8.6 - pokračování

Jméno	Zdroj	Místo	GM		GM+P		GM+MP		Linie. rozměry
			Class.	JK	Class.	JK	Class.	JK	
<i>E. didelta f. latior</i>	South, 1984, Fig. 4a	Kanada, Fairhaven, Newfoundland	3	3	0	3	0	3	?
<i>E. didelta f. val Piora</i>	Ducellier, 1915, Pl. I, Fig. 2	Francie, Savojské Alpy, Bisanne	3	3	3	3	0	3	?
<i>E. didelta var. crassum</i>	South, 1984, Fig. 4h	Kanada, Fairhaven, Newfoundland	0	3	0	0	0	0	C
<i>E. didelta var. everettensiforme</i>	Ducellier, 1915, s. 87, Fig. 16	Francie, Savojské Alpy, Bisanne	0	1	0	0	0	0	C
<i>E. didelta var. inermiforme</i>	Ducellier, 1915, s. 86, Fig. 14	<i>dto</i>	0	4	0	0	0	4	C
<i>E. didelta var. tatricum</i>	Raciborski, 1885, Tab. XIII, Fig. 3	Polsko, Tatry	0	0	0	2	0	0	
<i>E. didelta var. truncatum</i>	South, 1984, Fig. 9d	Kanada, Fairhaven, Newfoundland	3	2	0	2	0	2	?
<i>E. didelta/ampullaceum</i>	Ducellier, 1915, s. 91, Fig. 27	Francie, Savojské Alpy, Bisanne	1	2	1	1	4	4	C
<i>E. humerosum</i>	Ducellier, 1918, s. 133, Fig. 121	Švýcarsko, močál Hudelmoos	5	5	0	0	0	5	C?
<i>dto</i>	Ducellier, 1918, s. 92, Fig. 63 B	Švýcarsko, Col du Grimsel	0	0	0	0	5	5	C
<i>dto</i>	Ducellier, 1918, s. 92, Fig. 63 C	<i>dto</i>	0	0	4	4	4	4	C
<i>dto</i>	Ells, 1998	-	2	2	2	2	0	0	?
<i>dto</i>	Fromm, 2014, Abb. 133	Německo, Berlín	3	3	3	3	3	3	A
<i>dto</i>	Fromm, 2014, Abb. 135	<i>dto</i>	2	2	2	2	2	2	A?
<i>dto</i>	Mout, 2012	Nizozemí, jezero van Esschenven	0	0	5	5	5	5	?

Tab. 8.6 - pokračování

Jméno	Zdroj	Místo	GM		GM+P		GM+MP		Linie. rozměry
			Class.	JK	Class.	JK	Class.	JK	
<i>E. humerosum</i>	Plewka, 2011	Německo, Köln	0	0	0	3	0	3	?
<i>dtto</i>	Ralfs, 1848, Tab. XIII, Fig. 2a	Britské oo.	0	0	0	0	0	5	?
<i>dtto</i>	Škaloud, 2006	Slovensko, Postávka, Vihorlat	2	2	2	2	0	0	?
<i>dtto</i>	Wagner, 2008	Nizozemí, Elfenmeer	0	0	0	0	0	2	?
<i>dtto</i>	Wolle, 1892, Pl. XXXII, Fig. 12	USA.	0	0	0	5	0	0	A
<i>E. humerosum</i> var. <i>affine</i>	André, 2008	Francie, Vosges	0	0	0	0	4	4	C
<i>dtto</i>	Coesel & Meesters, 2007, Pl. 42, Fig. 2	Nizozemí	0	0	0	5	5	5	C
<i>dtto</i>	Gysels et al., 2015, s. 44, Fig. 8, vpravo	<i>dtto</i>	0	0	2	2	0	0	Ss< A
<i>dtto</i>	Lenzenweger, 1996, Taf. 9, Fig. 13	Rakousko	0	0	0	0	0	5	C
<i>dtto</i>	Lenzenweger, 2002, Taf. II, Fig. 10	-	0	0	0	2	4	4	?
<i>dtto</i>	Scipion, 2017	Francie, Belledone	0	0	0	0	1	1	Ds> A
<i>E. humerosum</i> var. <i>parallelum</i>	Krieger, 1937, Taf. 69, Fig. 9	-	0	2	0	0	0	0	?
<i>E. sinuosum</i>	West & West, 1905, Pl. XXXVI, Fig. 1	-	0	4	0	4	0	0	Ds<C