

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Biologie



Eva Kupčíková

Kryptická a pseudokryptická diverzita spájevých zelených řas (Zygnematophyceae)
Cryptic and pseudocryptic diversity of conjugating green algae (Zygnematophyceae)

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Jan Šťastný

Praha, 2013

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, 23. srpna 2013

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Janu Šťastnému a také Pavlovi Škaloudovi a Jiřímu Neustupovi za konzultace jak k bakalářské, tak k následující diplomové práci. Ráda bych poděkovala všem z algologické skupiny PřF UK za výbornou spolupráci. Nakonec bych poděkovala celé své rodině za trpělivost a podporu.

Abstrakt

Tato bakalářská práce shrnuje nejpoužívanější druhové koncepty ve třídě Zygnematophyceae. Bude představena tato skupina řas, a v molekulární fylogenetice používané molekulární markery. Nejasnosti v taxonomii při definování druhů byly způsobeny velice rozličnou morfologií a odlišným pohledem autorů na determinaci druhu a jejich podjednotek. Spájkivé řasy jsou skupinou jednobuněčných a mnohobuněčných řas. Vyskytují se často ve sladkovodních habitatech. Krásivky jsou důležitým bioindikátorem kvality vod. Používají se při hodnocení *conservation value*. Proto je důležité mít druhy dobře definované. Při odhalování (pseudo)kryptických druhů v rodech *Micrasterias* nebo *Xanthidium* byla použita kombinace metod molekulární fylogenetiky, elektronové mikroskopie a geometrické morfometrie. Geometrická morfometrie pomohla najít důležité detaily pro určení pseudokryptických druhů.

Klíčová slova: kryptická a pseudokryptická diverzita, konjugace, krásivky, *Micrasterias*, *Euastrum*, *Xanthidium*, molekulární fylogenetika, taxonomie, geometrická morfometrie, biogeografie, zelené řasy

Abstract

This bachelor thesis summarizes the most commonly used species concepts in the class Zygnematophyceae. This group of algae and the molecular markers used in the zygmatophytes' molecular phylogeny will be presented in this thesis. Zygnematophytes have unicellular or multicellular forms and they generally occur in freshwater habitats. Desmids are useful as indicators of water quality and they are also used for scoring of conservation value. Therefore it is important to have the species well defined. The confusion in defining of desmid species was caused by often very variable morphology. Some authors had different opinions on the classifying of desmid species and their subunits. The combination of molecular phylogeny, electron microscopy and geometric morphometrics was used in revealing of (pseudo)cryptic species in the genera *Micrasterias* or *Xanthidium*. The geometric morphometrics was helpful for finding of important details for distinguishing of particular pseudocryptic species.

Key words: cryptic and pseudocryptic diversity, conjugation, desmids, *Micrasterias*, *Euastrum*, *Xanthidium*, molecular phylogeny, taxonomy, geometric morphometrics, biogeography, green algae

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
ÚVOD	7
KRYPTICKÉ A PSEUDOKRYPTICKÉ DRUHY	8
KRYPTICKÁ A PSEUDOKRYPTICKÁ DIVERZITA U PROTIST	8
DRUHOVÝ KONCEPT	9
MORFOLOGICKÝ DRUHOVÝ KONCEPT	10
BIOLOGICKÝ DRUHOVÝ KONCEPT	11
FYLOGENETICKÝ DRUHOVÝ KONCEPT	11
SPÁJIVÉ ŘASY	11
ROZMNOŽOVÁNÍ U SPÁJIVÝCH ŘAS	13
POHLAVNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ U SPÁJIVÝCH ŘAS	14
<i>Zygnemataceae</i>	14
<i>Desmidiales a Mesotaeniaceae</i>	15
MORFOLOGICKÝ DRUHOVÝ KONCEPT U SPÁJIVÝCH ŘAS	17
<i>Nejasnosti v druhovém konceptu krásivek</i>	19
BIOLOGICKÝ DRUHOVÝ KONCEPT U SPÁJIVÝCH ŘAS	20
DIVERZITA KRÁSIVEK A JEJÍ VYUŽITÍ V EKOLOGICKÉM MONITORINGU	22
MULTIDISCIPLINÁRNÍ PŘÍSTUP A (PSEUDO)KRYPTICKÉ DRUHY KRÁSIVEK	24
GEOGRAFICKÁ, EKOLOGICKÁ A REPRODUKČNÍ IZOLACE DRUHŮ	26
<i>Ekologická a geografická izolace</i>	27
<i>Reprodukční a fyziologická izolace</i>	27
<i>Recentní vznik druhů</i>	27
MOLEKULÁRNÍ MARKERY	28
rDNA:	28
CHLOROPLASTOVÁ DNA	29
POUŽÍVANÉ MARKERY U SPÁJIVÝCH ŘAS	29
MULTIGENOVÝ PŘÍSTUP	30
<i>SSU a rbcL</i>	31
<i>Více markerů</i>	31
BARCODING	31
GEOMETRICKÁ MORFOMETRIKA U MICRASTERIAS	32
ZÁVĚR	33
PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY:	35
PŘÍLOHA	41

Úvod

V biologické praxi jsou základní jednotkou druhy a proto je třeba je mít dobře definované. Nejčastěji se určují podle morfologie (viz Morfologický koncept druhu). Křížícími pokusy, na základě reprodukční izolace, se odhalily tzv. *sibling species* (neboli kryptické druhy; viz Biologický koncept druhu, Biologický koncept druhu u spájkivých řas). Jejich objevení vedlo k přesvědčení, že s původním morfologickým konceptem není něco v pořádku a zavedl se biologický koncept druhu (Mayr 1944). V posledních asi 20 letech podle molekulárních markerů (viz Fylogenetický druhový koncept, Molekulární markery) se objevilo ještě více druhů a linií, včetně (pseudo)kryptických. Použití multidisciplinárního přístupu slouží k vymezení druhu z více hledisek, protože záleží, v jaké oblasti základní jednotky potřebujeme.

Skrytá diverzita u organismů není jen u mnohobuněčných, ale i jednobuněčných organismů, heterotrofních (Foraminifera, Ciliata) či autotrofních protist (Trebouxiophyceae, Zygnematophyceae, Bacillariophyceae, Chlorophyceae), nebo u symbiontů (*Asterochloris*, Trebouxiophyceae) či parazitů (viz Kryptická a pseudokryptická diverzita u protist). Bacillariophyceae a Zygnematophyceae slouží jako dobré bioindikátory (viz Diverzita krásivek a její využití v ekologickém monitoringu).

Spájkivé řasy jsou jednobuněčné i mnohobuněčné řasy s vysokou variabilitou a jsou dobrými ekologickými ukazateli kvality vody nebo vyzrálosti ekosystému. Různé rody (např. *Xanthidium* nebo *Micrasterias*, aj.) v čeledi Desmidiaceae mají řadu forem v závislosti na prostředí (nebo variet jako subspecifické jednotky), a u takových je obtížné zjistit druhovou příslušnost bez patřičného sledování větší populace jedinců (Mayr 1944, Bicudo & Carvalho 1969, Bicudo & Sormus 1972). U výše zmíněných rodů byla nalezena (pseudo)kryptická diverzita u *Micrasterias* (*M. radians*, *M. fimbriata*, *M. truncata* var. *semiradiata* nově *M. semiradiata*; Neustupa et al. 2010, 2011, Nemjová et al. 2011), *Xanthidium* (druhový komplex *X. cristatum* a *X. antilopaeum*; Šťastný et al. 2013), mj. i u dalších rodů *Cosmarium* (Gontcharov & Melkonian 2008, Šťastný & Kouwets 2012) a v druhovém komplexu *Closterium moniliferum – ehrenbergii* (Ichimura 1981, 1997, Denboh et al. 2001, 2003, aj.).

Rod *Micrasterias* je parafyletický a rody *Euastrum*, *Cosmarium* a *Staurodesmus* jsou polyfyletické. U *Euastrum* jsou známy sekvence *rbcL*, *psaA* a *coxIII* jen u několika druhů (viz Multidisciplinární přístup a (pseudo)kryptické druhy krásivek). Na úrovni druhů je málo prozkoumaným rodem a zatím o jeho skryté diverzitě není známo. Některé druhy nejsou jasně

definované, např. druhový komplex *E. humerosum/didelta* nebo *E. crassum*. Ve své diplomové práci bych se zaměřila na zkoumání jednoho z těchto nejasně definovaných druhů použitím polyfázického přístupu, a to především samplingu ve větší oblasti (popř. identifikace variet a zjištění ekologie), jeho kultivace, molekulární fylogenetiky, geometrické morfometrie a elektronové mikroskopie.

Ve své bakalářské práci se pokusím udělat rešerši, představím spájivé řasy, co je pro ně charakteristické nebo zajímavé a pro definice jejich druhů důležité. Stručně také představím druhové koncepty používané u této skupiny, molekulární markery zásadní pro molekulární fylogenetiku a ve zkratce představím geometrickou morfometriku.

Kryptické a pseudokryptické druhy

Moderní věda odlišuje kryptické, semikryptické a pseudokryptické druhy. K jejich zkoumání se v poslední době používá především molekulárních metod.

Kryptické druhy (sibling species) jsou definovány jako morfologicky (téměř) identické, ale geneticky odlišné (a reprodukčně izolované; Mann & Evans 2007).

Semikryptické druhy rozlišíme, pouze pokud máme k dispozici kromě morfologie i informace o původu (místa nebo ekologie; Mann & Evans 2007).

Termín **pseudokryptický druh** je používán v těch případech, kdy ani před křížením nebo pomocí molekulárních metod či metod geometrické morfometrie se neodhalí rozdíl. Odlišnost se odhalí až po statistickém zkoumání rozdílů (Mann & Evans 2007). Někdy jsou termíny, semikryptický a pseudokryptický, považovány za ekvivalentní, proto dále budu používat jen termín pseudokryptický druh nebo pseudokryptická diverzita.

Kryptická a pseudokryptická diverzita u protist

Protista jakožto skupina jednobuněčných a mnohobuněčných organismů složená z mnoha linií hrají mnohdy klíčovou roli v nejrůznějších ekosystémech (např. *Emiliana huxleyi* pro udržování nízkého obsahu CO₂ v atmosféře nebo uvolňování DMS do ovzduší a tím ovlivnění i množství srážek). Mají širokou škálu využití jako bioindikátory, nebo slouží jako potrava, symbionti, apod.

Obrovské skryté diverzity dosahuje *Asterochloris* jako symbiont lišejníku (Trebouxiophyceae; Škaloud & Peksa 2010). U *Toxoplasma gondii*, jako příkladem parazitů, byly nalezeny dvě linie, ale jestli to jsou populace nebo druhy je zatím nejasné (Tibayrenc & Ayala 2002). Příklady skryté diverzity u heterotrofních zástupců jsou Foraminifera

(Pawlowski et al. 2008), *Tetrahymena pyriformis* nebo *Paramecium aurelia* (Ciliata; Simon et al. 2008, Catania et al. 2009). Mezi autotrofní skupiny protist, u kterých byla nalezena kryptická diverzita, patří např. Trebouxiophyceae (*Prasiola crista*; Moniz et al. 2012), Chlorophyceae (pseudokryptické druhy *Desmodesmus* nebo *Pseudomuriella*; Vanormelingen et al. 2007, Fučíková et al. 2011), Ulvophyceae, Bangiophyceae, Bacillariophyceae (*Cyclotella meneghiniana* nebo pseudokryptická *Navicula cryptocephala*; Bezsteri et al. 2005, Pouličková et al. 2010), Zygnematophyceae v druhovém komplexu *Closterium moniliferum* – *ehrenbergii* (Ichimura 1981, 1997, Denboh et al. 2001, 2003, aj.), u *Micrasterias* (*M. radians*, *M. fimbriata*, v kolektivním druhu *M. truncata* – především jeho variety *semiradiata*, která tvoří vlastní druh *M. semiradiata*; Neustupa et al. 2010, 2011, Nemjová et al. 2011), *Xanthidium* (druhový komplex *X. cristatum* a *X. antilopaeum*; Šťastný et al. 2013), *Cosmarium* (*C. punctulatum*; Gontcharov & Melkonian 2008, Šťastný & Kouwets 2012) a další.

Také je důležité připomenout, že skrytá diverzita není jen u jednobuněčných organismů, ale i u mnohobuněčných – jako je třeba *Ulva* (Ulvophyceae, Kraft et al. 2010), '*Porphyra leucosticta*' complex, *Mastocarpus* nebo *Bangia* (Rhodophyta; Brodie et al. 2007, Lindstrom 2008, Kucera & Saunders 2012).

Druhový koncept

V biologické praxi jsou základní jednotkou druhy a proto je třeba je mít dobře definované. Záleží však na znacích, které si vybereme jako zásadní pro vymezení druhu, a v jaké oblasti biologie je potřebujeme (Manhart & McCourt 1992). Proto je dobré použít multidisciplinární přístup pro jeho potvrzení z více hledisek (viz Multidisciplinární přístup).

Nejdříve se druhy určovaly jen podle morfologie (viz Morfologický koncept druhu), později podle reprodukční izolace a odhalily se tzv. *sibling species* (neboli kryptické druhy; viz Biologický koncept druhu, Biologický koncept druhu u spájivých řas). Jejich objevení vedlo k přesvědčení, že s původním morfologickým konceptem není něco v pořádku. Ernst Mayr shrnul dosavadní koncepty a zavedl druhový koncept biologický, uvedl problematiku velké variability v rámci (polythetického) druhu, který zaujímá mnoho forem (Mayr 1944, Manhart & McCourt 1992).

Podle širšího pojetí fylogenetického konceptu můžeme druhy pokládat za monofyletické linie vymezené speciací a extinkcí s odvozenými znaky (viz Příloha, Tabulka P2). Tento koncept se testoval asi posledních 20 let pomocí molekulárních *markerů* (resp.

díky dostupnosti DNA sekvencí, viz Fylogenetický druhový koncept, Molekulární markery) a objevilo se ještě více druhů a linií, včetně (pseudo)kryptických.

Je otázka, zda existuje konsenzuální (obecně uznávaný, univerzální) koncept druhů. Manhart & McCourt (1992) uvádějí, že ne. Jaký druhový koncept se vybere, záleží na typu pozorovaných znaků (viz tabulka 1). Univerzálním konceptem se zabýval také de Queiroz (2005). Kde by se podle něj mělo upustit od tradičního seskupování druhů podle podobnosti do hierarchických jednotek¹, podle klasického morfologického konceptu, ale měly by se seskupovat jen do vývojových větví (linií; clades), a to podle alternativních druhových konceptů, aby byly rozpoznatelné, monofyletické nebo reprodukčně izolované. Tyto linie a druhy jsou pak považovány za *Category of biological organization*.

Tabulka 1. podle Sites & Marshall (2003), de Queiroz (2005), podrobněji viz příloha tabulka P2.

Typ výzkumu	Předmět zájmu	Druhový koncept
Hybridní zóna	Reprodukční bariéry	Biologický, Rozpoznávací, Izolační
Systematika	Identifikovatelnost a monofylie (monofyletismus)	Fylogenetický, Hennigův, Monofyletický neboli Apomorfický, Diagnostický, Evoluční
Ekologie	Odlišné niky	Ekologický
Paleontologie a taxonomie	Morfologické rozdíly	Fenetický
Populační genetika, molekulární systematika	Hledání genetických jedinců	Fylogenetický, Genotypický
Kladistika		Kohezní

Dále budou podrobněji probrány používané koncepty u třídy Zygnematophyceae - morfologický, biologický a fylogenetický.

Morfologický druhový koncept

Podle obecné definice je *druh nejmenší skupinou, která je konzistentně a perzistentně rozdílná a odlišitelná běžným způsobem* (Cronquist 1978) nebo *je druh složen ze skupiny jedinců s podobnými morfologickými znaky* (Mayr 1940). Tyto morfologické znaky by měly být trvale rozlišitelné běžnými prostředky, u algologů to znamená především světelnou a elektronovou mikroskopii (Manhart & McCourt 1992).

¹ Podle mezinárodního kódu názvosloví (ICN = International Code of Nomenclature) jsou považovány za hierarchické jednotky říše, kmen/oddělení, třída, řád, čeleď nebo druh (McNeill et al. 2012).

Biologický druhový koncept

Podle definice biologického druhového konceptu je druh *skupinou křížících přírodních populací, které jsou reprodukčně izolované a mají specifickou niku* (Mayr 2003). Druh je tedy vymezen reprodukčními, ekologickými a genetickými charakteristikami (Manhart & McCourt 1992). Při testování hranic biologického druhu se zkoumá *potenciální křížení / vnitřní reprodukční izolace* (viz příloha tabulka P2).

Fylogenetický druhový koncept

Podle de Queiroz (2005) je fylogenetický druhový koncept často spojen s monofyletismem. U monofyletických skupin platí, že linie sdílí odvozené (autapomorfické) znaky a kromě předka zahrnují i všechny jeho potomky. U monofyletických druhů navíc platí, že jsou si příbuznější a zároveň jsou jedinečné (Manhart & McCourt 1992, de Queiroz 1998).

Za **fylogenetické druhové koncepty** jsou v širším slova smyslu považovány také Hennigův, Monofyletický, Diagnostický nebo Genealogický druhový koncept (Coyn & Orr 2004; de Queiroz 2005, viz tabulka P2).

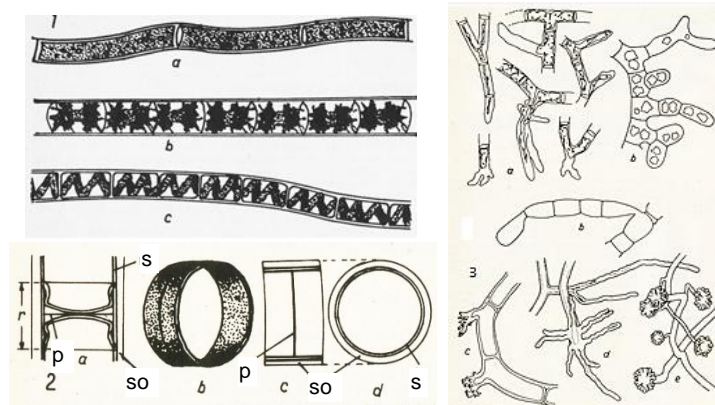
Fylogenetický koncept je podle de Queiroz (2005) propojen i s **kohezním** druhovým konceptem, který se zabývá genetickou příbuzností, určuje hranice mezi populacemi, u kterých probíhá genetický tok, genetický drift a přírodní selekce. Spojuje evoluční, ekologické, izolační a rozpoznávací mechanismy (de Queiroz 1998). Použití společně fylogenetické a fenetické metody je často užitečné (Sites & Marshall 2003). Mezi fenetické metody např. patří geometrická morfometrika.

Spájkivé řasy

Spájkivé řasy (Zygnematophyceae) společně s Coleochaetophyceae a Charophyceae jsou považovány za sesterské linie Embryophyta (Vyšší rostliny, Becker & Marin 2009). Vývojové větve Embryophyta a Zygnematophyceae se vyvinuly ze společného předka a pravděpodobně jsou si blíže příbuzné než Embryophyta s druhými dvěma výše zmíněnými skupinami (Wodniok et al. 2011). Třída Zygnematophyceae zahrnuje dva řády - vláknité Zygnematales a jednobuněčné Desmidiiales. Řády jsou tradičně děleny na menší taxony podle segmentace a ultrastruktury buněčné stěny - Zygnematales na čeledě Zygnemataceae a Mesotaeniaceae; a Desmidiiales na čeledě Gonatozygaceae, Peniaceae, Closteriaceae a Desmidiaceae (Mix 1972, Růžička 1977, Coesel & Meesters 2007). Closteriaceae je jedinou

monofyletickou čeledí (Hall et al. 2008). U ostatních linií uvnitř řádu Desmiales (včetně řádu Zygnematales) je to zatím nejasné a vyžaduje další zkoumání.

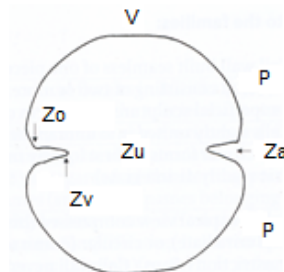
Spájkivé řasy obývají většinou sladkovodní habitaty (Brook 1981, Hoshaw & McCourt 1988). Oproti jiným skupinám řas jsou vymezeny svým charakteristickým rozmnožováním (konjugací), a nepřítomností bičíkatých stádií ve svém životním cyklu (Brook 1981). Pro Zygnemataceae je typické, že mají nevětvená vlákna často připevněná k podkladu rhizoidy (Kadlubowska 1984).



Obr. 1. Vegetativní vlákna Zygnemataceae, a – *Mougeotia*, b – *Zygnema*, c – *Spirogyra* (Kadlubowska 1984, str. 12). Obr. 2. Stavba vláken *Spirogyra silesiaca*, a - prstenec mezi buňkami, b - izolovaný prstenec (ring), c - prstenec zepředu, d - prstenec z bočního pohledu; p - pás, s - stěna prstence, so - slizovitá obálka, r - prstenec (Kadlubowska 1984, str. 12). Obr. 3. Stavba rhizoidů, a – *Mougeotia* sp., b - *Zygnema peliosporum*, c - *Spirogyra* sp. d-e *Spirogyra fluviatilis* (Kadlubowska 1984, str. 14)

Pro krásivky (Desmiales) jsou typické symetrické buňky, kde horizontální rovina dělí buňku na dva téměř zrcadlově souměrné obrazy. U Desmidiaceae je charakteristické, že je buňka zaškrcením (sinus) rozdělena na dvě poloviny (semicely) a jádro leží v jejím zúžení (istmus; obr 4).

Obr. 4. - Základní morfologie z frontálního pohledu, Za-zaškrcení, Zo-okraj zaškrcení, Zv-vrchol zaškrcení, Zu-zúžení, P-půlbuňka, V-vrchol (Coesel & Meesters 2007, str. 10).



Zygnematales se často vyskytují ve sladkovodních habitatech, ale i v brakických vodách, ve stojaté mělké vodě rybníků, v příkopech nebo i ve větších vodních plochách, často se vyskytují společně s cévnatými rostlinami (*Typha* apod.). Některé druhy se vyskytují i

v polárních oblastech a/nebo aerofyticky (Hoshaw & McCourt 1988, Ettl & Gartner 1995, Pichrtová et al. 2013).

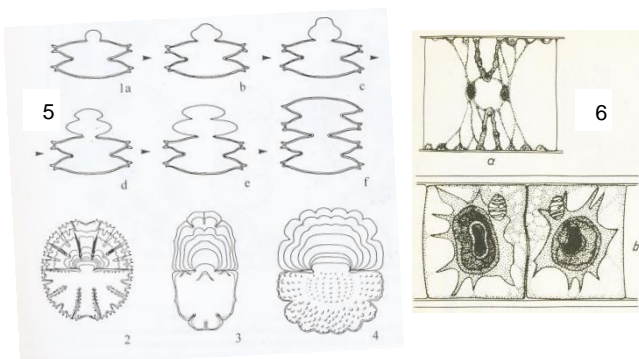
Desmidiales se vyskytují ve sladkovodních habitatech, převážně v mírně kyselých oligo- až mesotrofních jezerech, rybnících, popř. mokřadech (či rašeliništích), rostou v bentosu nebo metafytonu, vzácně v tekoucích vodách, planktonu eutrofních lehce alkalických vod, subaerofyticky v mokřém substrátu (např. v mechu, na vlhkých skalách) nebo ve vysychajících oblastech. Preference prostředí se liší, zda žijí v horách či v nížinách, nebo zda žijí v temperátním či tropickém podnebí. Dosahují velikosti 10-1000 μm (Vyverman 1989, Gerrath 2003, Kouwets 2008).

Jako modelové organismy spájitých řas slouží především *Micrasterias thomasi* pro studium morfogeneze buněčné stěny (Meindl 1993) nebo *Mougeotia* a *Mesotaenium*, u kterých byla zkoumána souvislost fytochromů s pohybem chloroplastů (Wu & Lagarias 1997, Wada 2013).

Podle průběhu rozmnožování (konjugace) se dělí Zygnemataceae na několik sekcí, např. u *Spirogyra*, *Zygnema* nebo *Mougeotia* (tabulka P1) a tvar zygot je pro ně klíčový. Některé evoluční větve *Zygnema* se dají rozpoznat podle barvy zygospor nebo akinet, resp. podle barvy mesospor. Její barva by tak mohla sloužit jako určovací znak druhů *Zygnema* (Stancheva et al. 2012, viz příloha, obr. P1). Pro vymezení druhů u *Spirogyra* by se mohly použít replikující se konce buněk (Drummond et al. 2005). Někdy slouží jako pomocný znak pro určování krásivek tvar jejich zygospor, popř. průběh pohlavního rozmnožování.

Rozmnožování u spájitých řas

Spájitvé řasy se rozmnožují nepohlavně dělením buněk pomocí fragmoplastu (obr. 5,6) nebo pohlavně konjugací.



Obr. 5. Vývoj pŕlbuňky krásivky, 1a-f – šest po sobě následujících stádií u *Micrasterias laticeps*, 2-4 - mezistupně ve vývoji u *Micrasterias papillifera* (2), *Euastrum crassum* (3) a *Cosmarium caelatum* var. *spectabile* (Coesel & Meesters 2007, str. 13). Obr. 6. Dělení buňky u Zygnemataceae pomocí fragmoplastu, a - *Spirogyra*, b - *Zygnema* (Kadlubowska 1984, str. 22)

Pro nepohlavní rozmnožování Desmidiales je charakteristické, že po rozdělení jádra se mezi nimi vytvoří nová buněčná stěna a rozdělí buňku napůl. Nová pŕlbuňka pučí z mateřské

v oblasti zúžení, zvětšuje svoji velikost a postupně se morfologicky diferencuje (obr. 5). Desmidiaceae se tímto způsobem rozmnožuje nejčastěji (Coesel & Meesters 2007).

Pohlavní rozmnožování u spájitých řas

Konjugace (conjugation) je u většiny spájitých řas vzácná a u mnoha druhů Desmidiaceae ani nebyla pozorována (Starr 1955, Blackburn & Tyler 1981, 1987, Brook 1981, Hoshaw & McCourt 1988, Coesel & Meesters 2007).

Při pohlavním rozmnožování jsou vegetativní buňky přeměněny v gametangium a jejich protoplasty v amoeboidní pohlavní buňky (gamety). Tyto bezbičíkaté gamety se pohybují konjugačním aparátem k druhé gametě. Po jejich spojení dochází ke vzniku zygoty. Z ní se vyvíjí **zygospora** se třemi vrstvami: **endospora, mesospora a exospora**; a slouží k překonání nepříznivých podmínek, hlavně sucha. Po zavlhčení proběhne „zrání“ a dochází k meiose. Ze vzniklých meiospor často tři ze čtyř zanikají, u Mesotaeniaceae se zachovávají všechny (např. *Cylindrocystis* nebo *Spirotaenia*). Mesospora pak praskne a skrz operkulum v exosporě se vyvíjí klíček, který se dále vegetativně dělí (Brook 1981).

V rámci třídy Zygnematophyceae se odlišuje několik typů konjugačního aparátu, různé konjugační procesy, párování a také různé tvary a barvy zygospor (Růžička 1977, Blackburn & Tyler 1981, Brook 1981, Kadlubowska 1984).

U vláknitých, zygematálních spájivek je klasická taxonomie založená především na strukturách souvisejících s pohlavním rozmnožováním. Při určování krásivek slouží tvar zygospor a průběh pohlavního rozmnožování jako pomocný znak.

Zygnemataceae

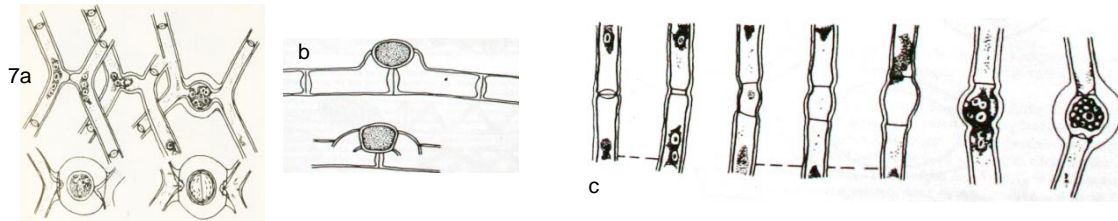
U vláknitých spájivek Zygnemataceae se rozlišuje skalariformní a laterální, popř. terminální typ konjugace. Nejčastější rody této skupiny *Mougeotia* a *Zygnema* jsou podle těchto typů rozděleny na sekce (Tabulka P1).

Kadlubowska (1984) dělí konjugace u Zygnemataceae na:

1. skalariformní konjugace, u které se propojí vlákna konjugačními kanály, v nichž splývají gamety (obr. 7b, P1);
2. laterální konjugace probíhá mezi vedle sebe ležícími buňkami v rámci jednoho vlákna, konjugující kanál vzniká prodloužením buněčné stěny (obr. 7a);
3. terminální konjugace probíhá podobně jako laterální, ale konjugační kanál vzniká z dělící přepážky buněčné stěny (obr. 7c).

Dále se mohou konjugace dělit na podtypy podle toho, kde vzniknou zygoty:

a) u isogamické extragametangiální jsou zygoty v konjugačním kanálu, vyskytuje se jen u skalariformní konjugace; *b)* u isogamické bigametangiální jsou zygoty ohraničené v obou gametangiích; *c)* u anisogamické monogametangiální jsou zygoty jen v jednom z gametangií. Poslední dvě možnosti (*b* a *c*) se vyskytují u všech typů konjugace.



Obr. 7 Konjugace isogamní, extragametangiální konjugace skalariformní u *Mougeotia oedogonioides* (a), laterální u *M. genuflexa* (b), terminální u *M. oedogonioides* (a -, b - podle Kadlubowska 1984, str. 25, 30, 31)

Desmidiáles a Mesotaeniaceae

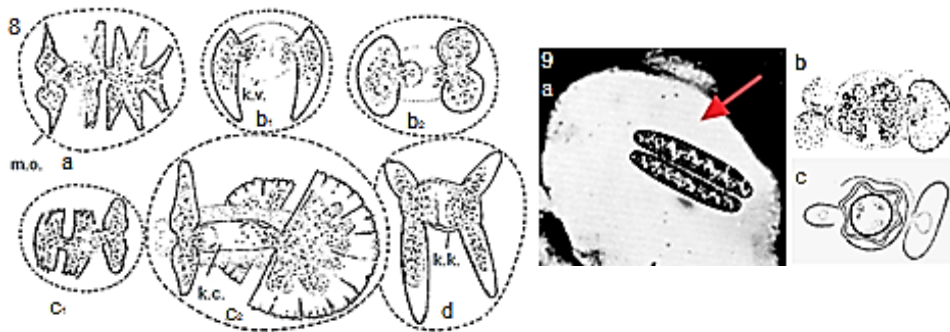
U krásivek *sensu lato*, lze dělit konjugace podle typu konjugačního aparátu - konjugačního kanálu, konjugačního váčku (nebo konjugačního cylindru), popř. v slizovité obálce² (obr. 8, 9; Blackburn & Tyler 1981, Brook 1981).

Konjugační kanál zůstává součástí stěny zygospory a nachází se převážně u saccodermních krásivek (viz Morfologický koncept spájivých řas; Blackburn & Tyler 1981, Brook 1981).

Konjugační váček může být tvarovaný, nediferencovaný (bez definitivní stěny nebo bez membrány), rozsáhlý (pro orientaci konjugujících se buněk) nebo je tvořen jen slizovitou obálkou (obr. 8a, 9a). Tvarovanému váčku se někdy říká konjugační cylindr (Blackburn & Tyler 1981).

Typy konjugace nejsou jednotné zvláště u rodů. Rod *Mesotaenium* (např. obr. 9c) má kromě konjugačního kanálu i rozsáhlý konjugační váček. Tvarovaný váček a slizovitá obálka se vyskytuje u *Micrasterias* (obr. 8a, c), zato nediferencovaný a rozsáhlý váček u *Cosmarium* (obr. 8b₂, 9b), a u *Closterium* (např. obr. 8b, d) dokonce i konjugační kanál (Blackburn & Tyler 1981, Brook 1981). Pohled na konjugační aparát se podle autorů liší u druhu *Closterium littorale*, který má buď konjugační kanál (Blackburn & Tyler 1981) nebo rozsáhlý konjugační váček (Brook 1981).

² Slizovitá obálka je považována také za konjugační váček (Brook 1981).



Obr. 8. Konjugační aparáty u různých krásivek. Slizovitá obálka (a); nediferencovaný slizovitý konjugační váček (b₁) je secernován papilami během jeho tvorby; bez omezení (b₂); konjugační váček (c) jemnější bez zrnitého slizu (c₁), robustní, se zrnitým slizem (*Micrasterias*) nebo jemnější bez zrnitého slizu (*Staurodesmus*, c₂); robustní konjugační kanál (d). s.o. - slizovitá obálka; k.v. - konjugační váček; k.c. - konjugační cylindr, k.k. - konjugační kanál (zpracováno podle Blackburn & Tyler 1981, Brook 1981). Obr. 9. Nestrukturalizovaná slizovitá obálka druhu *Spirotaenia condensata* (a); rozsáhlý váček - *Cosmarium botrytis* (b), *Mesotaenium dodekahedron* (c), (a - přejato z Hoshaw & Hilton 1966; b-c, přejato z Brook 1981, str. 126, 145)

Podrobnější popis konjugace u skupiny Desmidiaceae

U většiny druhů krásivek je konjugace vzácná. Můžeme rozdělovat kmeny na heterotalické a homotalické podle schopnosti sexuálně se rozmnožovat v kulturách. Kmeny se buď pohlavně rozmnožují jen mezi různými kmeny (heterotalické kmeny) nebo v rámci jednoho kmenu (homotalické kmeny). Homotalické kmeny často konjugují těsně po vegetativním dělení. V čeledi Desmidiaceae mají krásivky, kromě vláknitých rodů *Bambusina* a *Desmidium*, rovnocenné gamety. Zygospora se tvoří mezi buňkami (isogamie) nebo v jedné z nich (anisogamie). U některých vláknitých krásivek se pár vláken může před rozmnožováním rozpadnout (kdy ostatní vlákna zůstanou zachována; Růžička 1977).

Gamety jsou většinou tvořené z protoplastu (celého obsahu buňky), který otvorem mezi půlbuňkami buněčnou stěnu opouští a spojí se mezi buňkami v konjugačním váčku nebo v kanále. Často není snadné rozlišit, jakým způsobem konjugace proběhne, protože následuje rychlé nabobtnání tenké stěny. U některých druhů se mohou v některých generacích zapojit čtyři buňky a vytvoří se dvě zygospor (twin-zygospore). Jejich výskyt je častý u druhového komplexu *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Růžička 1977, Coesel & Menken 1988).

Zygospor

Tvar zygospor bývá většinou sférický až eliptický, někdy zaoblený až nepravidelně polygonální. Často se zygospor odlišují ve struktuře mesospor. Mohou ji mít jemnější

s většími póry nebo s pórovitými otisky. Zřídka jsou mesospory rovné nebo jinak skulpturované. Buněčná stěna je k zygospoře buď volně upevněná a snadno oddělitelná, nebo těsně spojená spolu s jejími výrůstky (Růžička 1977).

Abnormálně tvořené zygospory mohou být: a) šroubovitě stočené nebo vzniklé ze dvou navzájem kolmých buněk u *Closterium*; b) zaškrčené, když gameta zůstane v tuhé buněčné stěně; nebo c) vícerozměrné po proběhnutí tří konjugací. U druhů není jednotné, zda se u nich vyskytuje zygospora jedna nebo dvě (Růžička 1977).

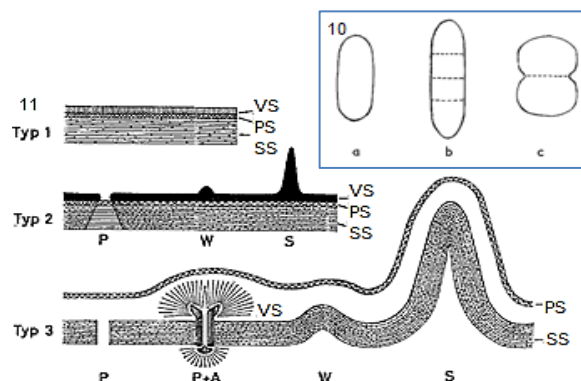
U Desmidiaceae jsou známy i asexuální spory, pro taxonomii nepoužitelné. Někdy pozorované jsou **parthenospory**. Ty se tvoří z obsahu jedné buňky, tj. bez pohlavního rozmnožování. U stejného druhu jsou oproti zygosporám menší a velmi podobné. Vzácnější jsou **aplanospory** a **akinety**. U aplanospory se protoplast zmenší a uvnitř buňky je obklopen novou, tlustou buněčnou stěnou. U akinety buněčná stěna vegetativní buňky velmi ztloustne (Růžička 1977).

Morfologický druhový koncept u spájkových řas

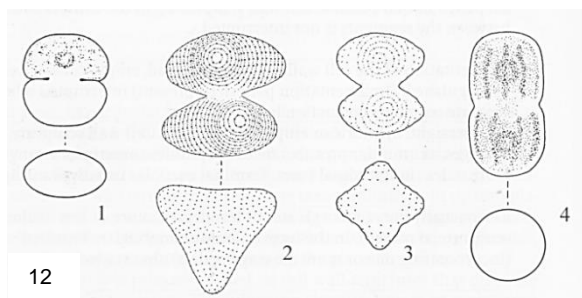
Spájkivé řasy (spájkivky) jsou obvykle rozdělovány podle své morfologie na jednobuněčné, koloniální nebo vláknité. Mezi vláknité patří *Spirogyra*, *Mougeotia* nebo *Zygnema* (Zygnemataceae) a některé krásivky, např. *Bambusina* nebo *Desmidium* (Desmidiaceae). Koloniální spájkivkou je např. *Cosmocladium* (Desmidiaceae). Jednobuněčné jsou často děleny na nepravé krásivky ('saccoderm' desmids) a pravé krásivky ('placoderm' desmids; Brook 1981, Coesel & Meesters 2007, Kouwets 2008).

Podle segmentace a ultrastruktury buněčné stěny byly dříve spájkivky rozděleny na Zygnematales (Saccodermatae, obr. 10a, 11 typ I) a Desmidiales (Placodermatae), a Desmidiales na Archidesmismidiineae (obr. 10b, 11 typ II) a Desmidiineae (obr. 10c, 11 typ III; Mix 1972).

Obr. 10. Schéma stavby buněčné stěny Zygnematophyceae: celistvá (a), segmentovaná (b), buněčná stěna ze dvou segmentů, uprostřed zaškrčená (c; Mix 1972). Obr. 11. Schéma typů buněčné stěny Zygnematophyceae. VS – vnější stěna, PS – primární stěna, SS – sekundární stěna, P – pór, P+A – Pór s pórovým aparátem, W- wart, S – spine (Mix 1972).

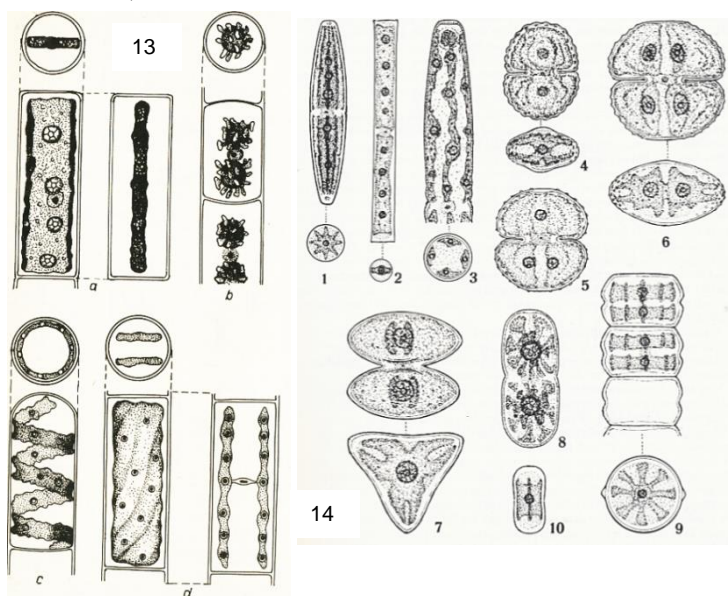


Podle průřezu můžeme dělit krásivky na biradiální, tri-až multiradiální nebo omniradiální (obr. 12), ale nikoli do čeledí. Dobře známé rody krásivek jsou: omniradiální *Cylindrocystis*, *Closterium*, *Actinotaenium*, *Pleurotaenium*; biradiální *Euastrum*, *Micrasterias*, *Cosmarium*, *Xanthidium*; (bi-), tri- až multiradiální *Staurastrum*, *Staurodesmus*; nebo pseudo-omniradiální, tvořící vláknité kolonie *Hyalotheca* (Kouwets 2008).



Obr. 12. - Příklady (1) biradiální, (2) triradiální, (3) kvatriradiální, a (4) omniradiální krásivky (pohled z frontálního a apikálního pohledu; (Coesel & Meesters 2007, str. 10).

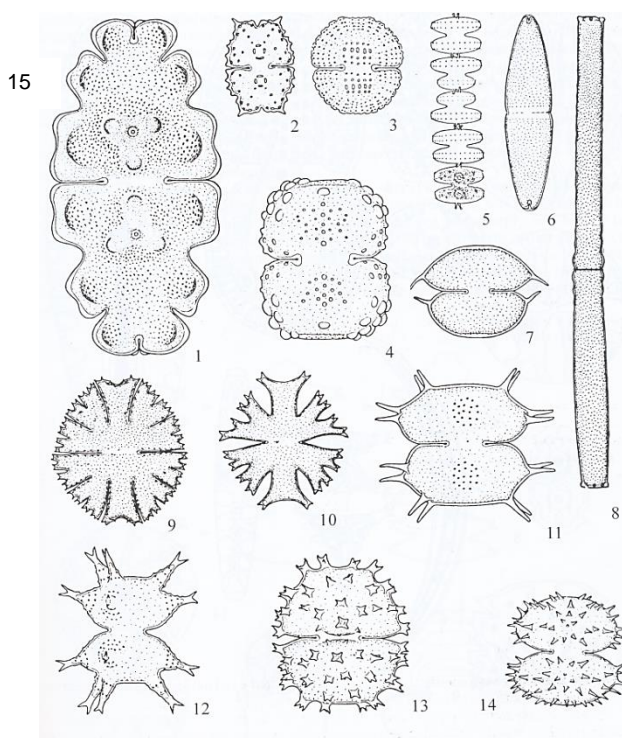
Dalšími určovacími znaky jsou počet, tvar nebo umístění chloroplastů a pyrenoidů (obr. 13, 14).



Obr. 13. Různé druhy chloroplastů u Zygnemataceae. Chloroplast deskovitý u *Mougeotia* sp. (a), hvězdicovitý u *Zygnema* sp. (b), páskovitý u *Spirogyra* sp. (c), dvoj-páskovitý u *Sirocladium* sp. (d; Kadlubowska 1984, str. 16-17). Obr. 14. Důležité typy chloroplastů u Desmidiaceae, 1 – steloidní, 2 - deskovitý, 3 - parietální, 4 - 7 furkoidní (4 a 7 s jedním pyrenoidem v chloroplastu, 6 se dvěma pyrenoidy, 5 dichotypický); 8 - asteroidní, 9 - pseudosteloidní, 10 - s jedním steloidním chloroplastem v buňce (Růžička 1977, str. 25)

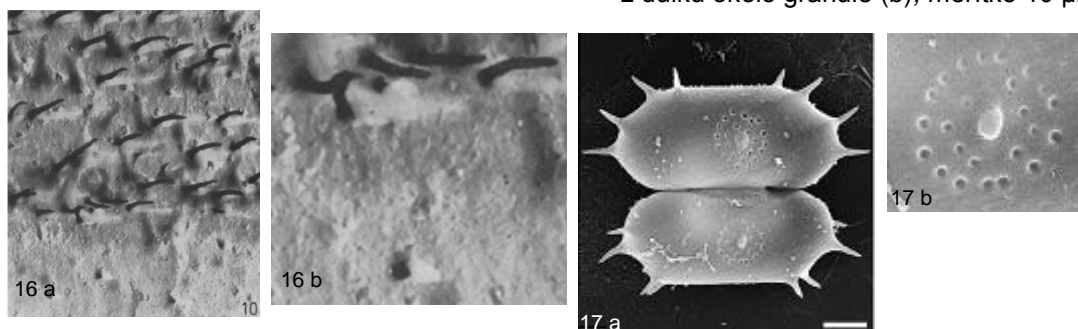
Buněčná stěna krásivky může být jednoduchá a hladká, ale většinou je více či méně ornamentovaná většími nebo menšími důlky, granulemi, *warts* (bradavice), *spines* (ostny,

trny), atd. Navíc okraje půlbuňky mohou mít *incisions* (zářezy) a *extensions* (výběžky, obr. 15,16, 17; Kouwets 2008).



Obr. 15. Buněčné skulptury v: 1 - *Euastrum oblongum*, 2 - *Eu. turneri*, 3 - *Cosmarium formosulum*, 4 - *C. ungerianum* var. *subtriplicatum*, 5 - *Sphaerosozoma aubertianum* var. *archeri*, 6 - *Tetmemorus granulatus*, 7 - *Staurodesmus convergens*, 8 - *Pleurotaenium ehrenbergii*, 9 - *Micrasterias papillifera*, 10 - *M. crux-melitensis*, 11 - *Xanthidium antilopaeum*, 12 - *Staurastrum furcigerum*, 13 - *St. spongiosum*, 14 - *St. teliferum* (Coesel & Meesters 2007, str. 11). Obr. 16. Spines (nahore) a warts (dole) u buněčné stěny *Gonatozygon brebissonii* (a, Mix 1972), přiblížení na detail (b). Obr. 17 *Xanthidium antilopaeum* var. *depauperatum* (a, Šťastný et al. 2013), detail centrální ornamentace složené

z důlků okolo granule (b), měřítko 10 µm.



Nejasnosti v druhovém konceptu krásivek

Krásivky jsou velice morfologicky variabilní. Druhů je popsáno několik tisíc a u některých druhů jsou popsány i další infraspecifické taxony - variety nebo (eko)formy. Varieta je nejčastěji se vyskytující forma v populaci, která je někdy i odděleným taxonem (např. *M. truncata* var. *semiradiata*; Nemjová et al. 2011). Ostatní vyskytující se formy jsou vzácnější. Občas byly popisovány jako jiné taxony a způsobilo to zmatky v taxonomii. Ekoforma je varianta daná jiným prostředím. Po rozdělení buňky se buněčná stěna dceřiných půlbuňek vyvíjí, např. v jiné teplotě nebo pH a může být jinak tvarovaná či ornamentovaná (Meindl 1993, Kouwets 2008, Neustupa et al. 2008, Černá & Neustupa 2010).

V průběhu více než 160 let, od začátku taxonomie krásivek roku 1848 (po vydání Ralfsovy knihy „The British Desmidiaceae“), se pojetí druhů a jeho nižších taxonomických jednotek – variet, forem apod., často lišilo podle preferencí autora, kdy někteří nepoukazovali na předešlé znalosti. V období před Darwinovou knihou o evoluci („The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life“) byl častěji vymezen nový druh než varieta, v období poté byla popsána spíše nová varieta než druh. Jasně odlišné formy se staly vnitrodruhovými jednotkami (subspecies, variety) nebo naopak ekoformy byly považovány za taxony. Byly většinou popisovány monothetickým morfologickým konceptem, u kterého s každým popsáním nové variety se zprůměroval a měnil popis druhu. Ve 20. století po Vídeňském botanickém kongresu z roku 1905, se tvořily tzv. kolektivní druhy. V tomto období se začal používat polythetický druhový koncept. Ve kterém se od první formy popisují variety, jak se od ní liší, a zároveň se popis druhu nemění. Často jsou variety jen tvarově podobné a nemusí být uvnitř druhu evolučně příbuzné (anebo jsou oddělenými taxony). Slučovaly se do kolektivních druhů podle podobnosti, často bez ohledu na velikosti buněk v rámci infraspecifických taxonů. Vznikala rozličná synonyma jmen intraspecifických jednotek a přenechávala se odpovědnost příslušným autorům. Pro použitelný druhový koncept jsou nutné taxonomické revize použitím polyfázického přístupu, nejen z pohledu morfologického, ale i genetického a pozorováním životního cyklu. Pro intraspecifickou (vnitrodruhovou) hierarchii by se měly použít jen druhy a variety, od forem by se mělo upustit (Kouwets 2008).

Morfologický koncept ve 20. století byl nahrazován nejdříve biologickým konceptem a posléze fylogenetickým. Pomocí molekulárních metod se ukázalo, že dobře definované rody jako např. *Cosmarium*, *Staurodesmus*, *Euastrum* jsou polyfyletické, a *Micrasterias* je parafyletický (Gontcharov a Melkonian 2005, 2008, Gontcharov 2008, Hall et al. 2008).

Spirogyra nebo *Zygnema* jsou podle molekulárních metod parafyletické. V rámci *Spirogyra* leží *Sirogonium* (Chen et al. 2012), nebo ve větvi *Zygnema* se nachází *Zygonium* (Stancheva et al. 2012).

Biologický druhový koncept u spájitých řas

Krásivky mají v životním cyklu sexuální a asexuální reprodukci. Sexuální rozmnožování je selekční výhodou. Krásivky tak mohou přestát období sucha a dochází i ke genetické rekombinaci (Blackburn & Tyler 1987) a mj. dochází i k segregaci chromosomů a vysokému genetickému polymorfismu. Při asexuální reprodukci se mohou

kumulovat mutace a jednotlivé populace se mohou rozrůznit natolik, že se mezi sebou nemusí rozmnožovat a stanou se různými biologickými druhy (Ichimura 1996, 1997).

Většina druhů krásivek se množí asexuálně, ostatní schopné se pohlavně rozmnožovat se též za vhodných stabilních podmínek jen dělí (Blackburn & Tyler 1987). Biologický koncept druhu (Mayr 2003) funguje u organismů schopných sexuální reprodukce. Je otázka, zda při rozšíření i na apomiktické skupiny (množící se bez oplodnění; Löve 1964), by tady byl biologický koncept nejvhodnější.

Při vymezení biologických druhů se v pokusech biologové opírají o různé hranice – ekologické, etologické, mechanické izolace nebo životaschopnost/sterilitu hybridů (viz tabulka 2) - a zkoumají se především pomocí křížících pokusů. Jako příkladem zkoumání biologického konceptu u Zygnemataceae jsou pokusy u druhu *Spirogyra*. Většinou se rozmnožoval asexuálně a při sexuálním rozmnožování bylo těžko pozorovatelné, jestli konjugace proběhla mezi stejnými nebo různými vlákny (McCourt & Hoshaw 1990).

Tabulka 2. Zkoumání vymezení druhů (jejich izolací) pomocí křížících pokusů

reference	Mayr (1944, str. 247- 257)	Ichimura 1981, 1997	Ichimura 1997	Blackburn & Tyler 1987
	Izolace	Typy (1-5)	při negativním výsledku je	4 mezistupně, <i>tiers</i>
	1. ekologická	1. normální F1 generace vysoká životaschopnost, 1:1 <i>mating types</i> ³ .		1. párování gamet
	2. etologická (pohyby, feromony)	2. životaschopnost F1 generace, 14% bez sexuální interakce		2. tvorba zygospór
	3. mechanická (fyziologie)	3. snížená životaschopnost F1 generace, recesivní genetický faktor ⁴	kondenzace obsahu jader, vznik tlusté stěny - postzygotická izolace	3. křížení rodičovských jedinců
	4. sterilita / neživotaschopnost hybridů	4. snížená životaschopnost F1	izolace sterilizací	4. křížení F1 generace mezi sebou a zpětné křížení s parentální generací.
		5. bez sexuální interakce	interakce, konjugace - prezygotická izolace	Zkoumá se tak jejich životaschopnost; biologická zdatnost; přivést další své potomky úspěšně na svět, kteří by byli zdraví a plodní.

³ Mating types – párující se typy, mohou mít označení +- u heterothalických kmenů nebo ++ u homothalických kmenů (Blackburn & Tyler 1987).

⁴ Pokud je alela genu *zym* (*zygote maturation*) defektní, u recesivního homozygota to způsobí zánik zygoty. (Ichimura 1997).

Nejnámější křížící experimenty u krásivek (resp. *Closterium moniliferum-ehrenbergii* a *Micrasterias thomasiana*) jsou práce Ichimiry (např. Ichimura 1981, 1997, atd.) a Blackburn & Tyler (1987). Propojením biologického konceptu se zkoumáním alozymů elektroforézou⁵, ekologií a biogeografií se zabýval mj. Coesel (1988a, 1988b, 1989, Coesel & Menken 1988). Denboh (et al. 2001, 2003) našel mezi biologickým a fylogenetickým konceptem souvislost.

Navození konjugace je pomocí média s nedostatkem dusíku, ale naopak vysokým obsahem CO₂. Pokusy křížení bývají spojeny s vysycháním, obdobím klidu a zpětným zavlhčením a vyklíčením, které se někdy musí zopakovat (i třikrát; Blackburn & Tyler 1987).

Coesel (1988a, 1988b, 1989) a Coesel & Menken (1988) objevili, že ve vysychajících habitatech byly převážně sexuálně kompatibilní kmeny *Closterium ehrenbergii* a v rašeliništích naopak inkompatibilní (nepodařilo se mu u nich indukovat konjugaci). Tyto biologické entity byly odděleny jak ekologicky, tak geograficky.

Ichimura studoval stejný druhový komplex ve východní Asii (např. v Japonsku, nebo v Nepálu) v oblastech taktéž vysychajících, v rýžovém poli, na okraji kaluží nebo v malých rybnících, a společně s Denbohem a dalšími spolupracovníky objevili 18 biologických druhů (Ichimura 1981, Ichimura 1997, Denboh et al. 2001, 2003).

Ve vysychajících podmínkách byla konjugace pozorována i v severní Austrálii u *Micrasterias thomasiana* (Walker & Tyler 1984).

Nejen kvůli vzácnosti výskytu pohlavního rozmnožování, ale i kvůli malé úspěšnosti konjugace a klíčení při křížících pokusech a časové náročnosti (několik měsíců i let), není uplatnění biologického konceptu u spájivých řas nejvhodnější. Úspěšnost v křížících pokusech Blackburn & Tyler (1987) nebo Coesel (1988a) klesala geometrickou řadou.

Diverzita krásivek a její využití v ekologickém monitoringu

Zygnematophyceae mají nejvyšší diverzitu ze streptophytních řas, kde jejich druhy a variety byly převážně popsány pomocí morfologického konceptu. Recentně udávaný odhad, založený na údajích Gerratha (2003), je cca 4000 druhů v rámci celých Zygnematophyceae, z toho asi 1000 druhů v řádu Zygnematales, tj. vláknitých spájivek, a zbylých 3000 druhů v rámci krásivek. Největší druhové diverzity dosahují krásivky v mělkých, mesotrofních jezerech (nebo v rašeliništích) s velkým zastoupením rozvětvených nebo členitých makrofytních

⁵ Alozymová analýza předcházela zkoumání markerů z DNA. Elektroforézou se oddělí buněčný lyzát a porovnávají se kmeny mezi sebou. Kde alozymy jsou enzymy kódované na stejném úseku chromosomu, mohou být stejné nebo polymorfnní a mohou se jimi zkoumat populace nebo vyšší taxonomické jednotky (Manhart & McCourt 1992, Bader 1998).

jako je *Myriophyllum*, *Potamogeton* nebo *Utricularia* (Brook 1981, Gerrath 2003, Kouwets 2008).

Krásivky jsou převážně součástí metafytonu na ponořených rostlinách, ale jsou časté i v bentosu. Mají úzkou ekologickou niku, velice omezeně snesou vysychání, mohou se šířit na rostlině v rámci vodního tělesa nebo teoreticky prostřednictvím ptáků (Bland & Brook 1974, Brook 1981, Vyverman 1989, Coesel 1996, 2001).

Druhy krásivek mají odlišnou biogeografii, především na úrovni kontinentů (Coesel 1996). Podporuje to také *moderate endemism model*, který předpokládá, že zhruba třetina protist má omezené rozšíření a je založen na *flagship species*, které jsou výrazné a těžko přehlédnutelné. Tento model je do značné míry protikladný ubikvitní teorii (teorii kosmopolitního rozšíření protist podle Finlay & Fenchel 2004), která je založena na ekologické teorii (kde rozšíření závisí jen na vhodných podmínkách prostředí; Foissner 2011).

Kvůli vysokým požadavkům na prostředí a rychlejší reakci na jeho změny se krásivky často využívají pro vyhodnocení stádia sukcese a pro hodnocení kvality vod jako bioindikátory (Coesel 2001).

Holandřan Coesel vymyslel metodu hodnocení ekologického stavu mokřadních biotopů, založenou na druhovém složení na daném místě nalezených krásivek, která při hodnocení využívá mj. i to, jak je dané společenstvo typické pro "zralé" klimaxové biotopy nebo naopak pro raná stádia sukcese. Metoda zahrnuje tři parametry - druhovou diverzitu krásivek, vzácnost druhů a stupeň sukcese. Souhrn těchto parametrů dává hodnotu *conservation value*, u které platí čím větší druhová diverzita, tím větší je výsledná hodnota. Tato metoda byla využita v praxi např. při ekologickém hodnocení vodních těles v Nizozemí a může sloužit jako odůvodnění k ochraně lokalit (Coesel 2001, 2003).

Bioindikátory jsou levnější než chemické hodnocení kvality vod a odráží dlouhodobější časové měřítko a působení faktorů přímo na živé jedince. Jelikož jako nejčastější bioindikátory v rámci protist slouží vysoce abundantní zástupci, s úzkou ekologickou nikou (a tím pádem i rychlou reakcí na změny v prostředí), jsou nejčastěji používány rozsivky (Bacillariophyceae) a krásivky (Desmidiaceae). Proto musí být dobře definované a dobře určitelné druhy (Bellinger & Sigeo 2010, Coesel 2001, Silva 1999).

Ekologický monitoring může být chybný, pokud je odhalena (pseudo)kryptická diverzita, jelikož (pseudo)kryptické druhy mají většinou odlišnou nebo překrývající se ekologii (viz Recentní vznik druhů). Kryptické druhy byly nalezeny již u několika rodů Desmidiales a u dalších je jejich výskyt předpokládán (Škaloud et al. 2012). V posledních

několika letech se využívá multidisciplinárního přístupu k odhalování pseudokryptických nebo kryptických druhů.

Multidisciplinární přístup a (pseudo)kryptické druhy krásivek

Polyfázický neboli multidisciplinární přístup zahrnuje zkoumání více metodami, např.: plasticity fenotypu a různých životních stádií v rozdílných podmínkách, biochemický a fyziologický přístup, fylogenetický koncept, porovnání druhových konceptů a multigenový přístup (Pröschold & Leliaert 2007). Nemusí být nutně použity všechny metody, stačí jich několik – např. fylogenetický koncept nebo porovnání plasticity fenotypu. Multidisciplinární přístup byl použit při řešení rozporů mezi molekulární fylogenetikou a taxonomií. Mohl by pomoci při popisu monofyletických rodů, který by byl založený na morfologických a molekulárních synapomorfích (např. ve skupině Desmidiaceae; Gontcharov & Melkonian 2011).

Především se ale může využívat při odhalování kryptických nebo pseudokryptických druhů. Jednou z možností zkoumání fenotypu je pozorování morfologie buněčné stěny skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM – viz např. Šťastný & Kouwets 2012) nebo pomocí geometrické morfometrie společně s molekulárními markery (Neustupa et al. 2010, 2011, Nemjová et al. 2011, Šťastný et al. 2013, viz tabulka 3). Podle definice kryptických druhů (viz Kryptické a pseudokryptické druhy) by mělo platit, že po zpracování výše zmíněnými metodami by se *a*) buď našly rozdíly mezi liniemi byt' nepatrné a druhy by byly pseudokryptické nebo *b*) by se rozdíly nenašly a druhy by byly kryptické.

Použitím biologického a fylogenetického druhového konceptu (resp. markeru ITS) byla nalezena kryptická diverzita u druhového komplexu *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Ichimura 1981, 1997, Denboh et al. 2001, 2003, aj.). Nejpočetnější a mj. polyfyletický rod spájívek je *Cosmarium*. Např. druh *C. punctulatum* se vyskytuje ve dvou subliniích *Cosmarium* (SSU, 1506 group I intron, rbcL; Gontcharov & Melkonian 2008), při pozorování pomocí SEM se objevily morfologické rozdíly (nebyly ale použity stejné klony jako u předešlé práce; Šťastný & Kouwets 2012). U dalšího rodu *Xanthidium* byla také objevena pseudokryptická diverzita, a to 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 v SEM (Šťastný et al. 2013).

U druhového komplexu *X. antilopaeum* byly molekulární studie založené na čtyřech markerech. Ve spojeném stromu markerů *coxIII* a *rbcL* se vyskytuje *X. antilopaeum* ve třech liniích společně s *X. subhastiferum* nebo *Staurostrum tumidum*, kde *X. antilopaeum* var. *basiornatum* je sesterskou linií *S. tumidum* (a zdá se být separátním druhem). Ve stromech *trnG^{uuc}* a ITS markerů v rámci *X. antilopaeum* je více linií a sublinií. Tyto stromy jsou inkongruentní, protože ITS rDNA má asi více paralogů a *trnG^{uuc}* se vyskytuje v genomu plastidu jen jednou (viz obr. P2). Jedna linie v rámci *X. antilopaeum* je oddělená i geograficky v Grónsku a USA podle *trnG^{uuc}* (Šťastný et al. 2013).

U nejvíce diverzifikovaného rodu *Micrasterias* s řadou popsaných variet, je překvapivé, že se u něj (pseudo)kryptické druhy vyskytují, konkrétně kryptické *M. thomasiana*, *M. crux-melitensis*, nebo pseudokryptické *M. radians* a *M. fimbriata* (Bicudo & Sormus 1972, Blackburn & Tyler 1987, Neustupa et al. 2010, 2011).

U *M. truncata* se objevilo několik samostatných linií na úrovni variet *M. truncata semiradiata* (nově nazývanou *M. semiradiata clade*, molekulární data korelují i s geometrickou morfometrikou) a *M. truncata* var. *pusilla* (společně s *M. zeylanica* tvoří tropický australský *M. zeylanica clade*, oddělený také biogeograficky). Ve zbývající linii *M. truncata* se vyskytují další kryptické sublinie, u kterých je třeba ověřit křížicími pokusy, zda nejsou jen populacemi druhu (Nemjová et al. 2011).

U druhového komplexu *M. crux-melitensis*/*M. radians* jsou tři linie. Liší se nejen podle markerů ITS a *trnG^{uuc}*, ale i biogeograficky. Dvě linie *M. radians* (africká *M. radians* var. *evoluta* a asijská *M. radians* var. *bogoriensis*) jsou od ostatních linií *M. crux-melitensis* z Evropy a USA odlišné. *M. radians* var. *evoluta* na svém polárním laloku má 1-2 trny oproti ostatním liniím v druhovém komplexu (zkoumáno v SEM). *M. crux-melitensis* má jednu podlinii *M. crux-melitensis* var. *janeira* ve Finsku, která je odlišná i po stránce geometrické morfometrie. Linie *M. radians* var. *evoluta* a *M. radians* var. *bogoriensis* jsou pseudokryptické druhy. U *M. crux-melitensis* var. *janeira* chybí pozorování v SEM a zkoumání dalších kmenů, ale podle geometrické morfometrie by se dalo soudit, že by mohl být subspecifickou linií (Neustupa et al. 2010).

Při zkoumání dvou příbuzných druhů *M. fimbriata* a *M. rotata* se zjistilo, že u *M. fimbriata* jsou dvě oddělené linie podle markeru *trnG^{uuc}*. A-linie se vyskytuje v severozápadní Evropě a USA, B-linie je spíše ve střední Evropě, Dánsku a Irsku. *M. rotata* je jasně oddělenou linií podle *trnG^{uuc}*, vyskytující se v severní, západní i střední Evropě. Statistické

zhodnocení morfometrických dat koreluje s molekulárními daty. Mezi A-linií a B-linií *M. fimbriata* jsou v SEM nepatrné rozdíly. Druhy jsou pseudokryptické (Neustupa et al. 2011).

Dalším polyfyletickým a na úrovni druhů málo molekulárně prozkoumaným rodem je *Euastrum*. V databázích NCBI a EMBL-EBI jsou uvedeny kompletní sekvence genů (hlavně *cox III*, *psaA*, *rbcL*, a méně *atpB*, *SSU* a *ITS1*) jen u pěti druhů rodu *Euastrum*. Od každého druhu je sekvenován jen jeden kmen (když počítáme kompletní geny). Některé druhy nejsou jasně definované, např. druhový komplex *E. humerosum/didelta* nebo *E. crassum*. Ve své diplomové práci bych se zaměřila na zkoumání jednoho z těchto nejasně definovaných druhů použitím polyfázického přístupu (SEM, sekvenování *trnG^{ucc}* markeru, geometrická morfometrika, viz tabulka 3).

Při popsání nového druhu je třeba znát charakteristický znak (sekvence markeru) nebo typový kmen. Kmen je třeba uchovávat při stanovených podmínkách, tak aby při nich nedocházelo k mutacím. Ten společně s jeho sekvencí by tak sloužil jako reference při případných změnách metod a při revizi taxonomie skupiny (Pröschold & Leliaert 2007).

Tabulka 3. Možné multidisciplinární přístupy za použití různých metod: molekulárních markerů, geometrické morfometrie a SEM.

(Pseudo)kryptické druhy (reference)	SSU	rbcL	cox III	ITS	trnG ^{ucc} intron	Geometrická morfometrika	SEM
<i>Micrasterias radians</i> (Neustupa et al. 2010)	x			x	x	x	x
<i>M. fimbriata</i> (Neustupa et al. 2011)					x	x	x
<i>M. truncata</i> a jeho variety (viz text; Nemjová et al. 2011)	x				x	x	x
<i>Xanthidium cristatum</i> a <i>X. antilopaeum</i> (Šťastný et al. 2013)		x	x	x	x	x	x

Geografická, ekologická a reprodukční izolace druhů

Existují teorie, které tvrdí, že pro vznik druhů je nutná nějaká izolace - buď geografická, nebo negeografická. A často je spojena s biologickými izolačními mechanismy: *a*) ekologickými (organismy mají jiné požadavky na habitat), *b*) mechanickými nebo *c*) tvorbou sterilních nebo neživotaschopných hybridů (Mayr 1944, Coyne & Orr 2004). V oddělených populacích se tak hromadí změny a mohou se vyvinout reprodukční izolace, i když nutně nemusí vést ke vzniku nových druhů (Mayr 1944).

Ekologická a geografická izolace

U druhového komplexu *Closterium moniliferum-ehrenbergii*, testovaného v západní Evropě, byly kmeny *Closterium ehrenbergii* oddělené geograficky, ekologicky, měly jiné podmínky sexuálního rozmnožování a byly si vzájemně alozymově a morfologicky podobné (Coesel 1988a, 1988b, 1989, Coesel & Menken 1988).

Reprodukční a fyziologická izolace

U různých druhů *Micrasterias* např. byla reprodukční izolace viditelná i morfologicky. Pomocí morfologického konceptu taxonomicky zařazené druhy se mezi sebou nekřížily (Blackburn & Tyler 1987).

Jednou z výše uvedených možností izolačních mechanismů je vznik sterlních, mezi sebou se nekřížících hybridních organismů, např. u rostlin. Hybridní rostliny se mohou pak množit asexuálně. Někdy dochází ke zmnožení sady chromozomů (polyploidizaci) a může vzniknout nový druh (Budd & Mishler 1990, Coyn & Orr 2004).

Polyploidizací se často zvyšuje velikost buněk. Jako příklad by mohly být polyploidní druhy z druhového komplexu *Closterium moniliferum-ehrenbergii*, které jsou oproti jiným druhům větší (Denboh et al. 2003).

Dalším příkladem je modelový organismus *Micrasterias thomasiana*. Při některých pokusech křížení občas docházelo u zygot k polyploidizaci. Nově vzniklí jedinci měli více výběžků a větší velikost (Blackburn & Tyler 1987).

Recentní vznik druhů

U spájivých řas existuje předpoklad, že mnoho druhů vzniklo recentně, a za krátký časový úsek neměly šanci se morfologicky odlišit (na úroveň taxonomických druhů). Australský *M. zeylanica clade* se oddělil od příbuzné *M. truncata* před asi 5 miliony lety (Blackburn & Tyler 1987, Coesel 1996, Nemjová et al. 2011). Kryptické druhy nebo infraspecifické taxony se tedy oddělily později, řádově asi před tisíci lety.

Za předpokladu vzniku druhů geografickou a obzvlášť ekologickou izolací, by nově vzniklé druhy měly mít jinou ekologickou niku (jiné požadavky na prostředí). Z toho vyplývá, že by to mělo platit pro kryptické nebo pseudokryptické druhy.

Když se takovýmto původně izolovaným druhům daří a začnou se opět šířit, můžou mít následně společnou nebo překrývající niku. Tento předpoklad vychází ze stádií vzniku druhů po nějaké izolaci (Mayr 1944, Flegr 2005).

Na dané lokalitě se tak může změnit složení a počet druhů. Pokud jsou druhy stále morfologicky nerozlišené, mohlo by to mít vliv na chybné výsledky při ekologickém monitoringu (hodnocení kvality vod, conservation value, apod.).

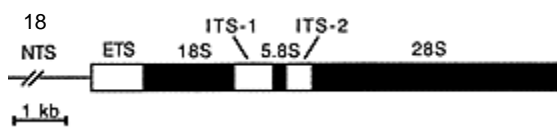
Molekulární markery

Jako markery pro určení fylogenetické příbuznosti se často používají geny pro esenciální součásti buňky - ribosomy, nebo proteiny důležité v zásadních biochemických drahách v organelách (v chloroplastu *rbcL*, *psaA* nebo *psaB*, v mitochondrii *cox*). Z těchto pro buňku nezbytných součástí se pro sekvenování a následný alignment používají jen jejich podjednotky kódované typicky v určité části genomu buňky.

Geny se často používají pro zkoumání fylogenetické příbuznosti starších vývojových linií. Zato introny se mohou použít pro recentní skupiny, čeledě, rody a nejčastěji druhy, např. ITS nebo u spájkivých řas *trnG^{ucc}* intron (viz kapitola Používané markery u spájkivých řas).

rDNA:

Ribosomální DNA (rDNA) se vyskytuje jak u prokaryot (popř. organel eukaryot, v mitochondrii nebo v chloroplastu) nebo v jádře eukaryot. V genomu eukaryot vytváří rDNA tandemově repetitivní kopie transkripční jednotky a *spacers* (Hillis & Dixon 1991, obr. 18) a v jádře často představuje jadérko. rDNA se přepisuje na RNA i se *spacers*, které pak slouží pro její *processing* (složení do sekundární struktury a další úpravy). Transkripční jednotka má pořadí ETS (External Transcribed Spacer), 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 a 28S, (kde ITS je Internal Transcribed Spacer, obr. 18). Různé oblasti se mohou amplifikovat v sekcích pomocí primerů v polymerázové řetězové reakci (PCR). 5S rRNA se přepisuje samostatně (Hillis & Dixon 1991).



Obr. 18. rDNA oblast u Eukaryot. (Hillis & Dixon 1991).

Pro fylogenetické analýzy velkých vývojových skupin se využívá nejméně se měnící část rDNA, 18S u eukaryot (SSU; dříve se používal jako marker jeho *transkript* rRNA, nyní se používá rDNA, namnožená metodou PCR pomocí primerů), nebo 16S u prokaryot (Hillis & Dixon 1991, Denboh et al. 2003). Pro determinaci druhů se naopak používá marker ITS (jeho sekundární struktura RNA), který koreluje s biologickým konceptem druhu, resp. u druhového komplexu *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Denboh et al. 2003).

Chloroplastová DNA

Plastidové geny kódují rRNAs, tRNAs a proteiny. Mezi proteiny patří zejména podjednotky RNA polymerázy (*rpo*), ribosomy, NADH *oxido-reductase complex* (*ndh*) a proteiny zapojené ve fotosyntéze. Poslední skupina zahrnuje velkou podjednotku Rubisco (**rbcL**), podjednotky fotosystémů: PSI (např. **psaA**), PSII (např. **psbA**); *ATP synthase* (např. **atpB**) a *Cyt b₆/f complex* (např. **petA**). Tyto geny jsou často organizovány v kontraskribovaných *clustrech*, které kódují proteiny zapojené v transkripci/ translaci nebo ve fotosyntéze (Baumgartner et al. 1993).

Plastidový genom byl sekvenován u dvou zástupců spájitých řas - u *Zygnema* a *Staurastrum* (obr. P2), genom dosahuje asi 160 kpb, obsahuje přes 120 genů a asi 10 intronů (group I a II). Na rozdíl od jiných streptofytních řas nemají invertovanou oblast (inverted repeat⁶), která je obvyklá u Embryophyta, zato mají velký obsah intronů. Jedním z nich je **trnG^{uuc} group II intron** (glycine transfer RNA, G^(uuc)) U Embryophyta se nachází v *Large single copy region* v plastidu v rámci úseku **trnS^{gcu}-trnG^{uuc}-trnG^{uuc}** a má největší potenciálně informativní charakter; u *Staurastrum* je **trnS^{gcu}** jen jako pseudogen (Turmel et al. 1999, 2005, 2007, Shaw et al. 2005). Transkripty group II intronů jsou schopné se samy sbalit, především v cytoplazmě. Jsou přítomny v bakteriích a organelách eukaryot. Mohou být kódovány i v jádře. Představují mobilní ribozymy a jsou esenciální pro funkci některých proteinů, např. v plastidu (Chalamcharla et al. 2010, Lambowitz & Zimmerly 2010, Petersen et al. 2011). Mezi další ribozymy schopné se samy sbalit patří i group I introny (Cate et al. 1996).

Používané markery u spájitých řas

Marker **SSU** se může testovat jako rRNA nebo rDNA. Studuje se i jeho sekundární struktura, tak jako u jiných ribosomálních RNA (Hillis & Dixon 1991) nebo u **ITS** (1 nebo 2, obr. P3). ITS strukturu modelovali např. Coleman & Vacquier (2002) nebo Denboh et al. (2003) a byla porovnávána s biologickým konceptem druhu.

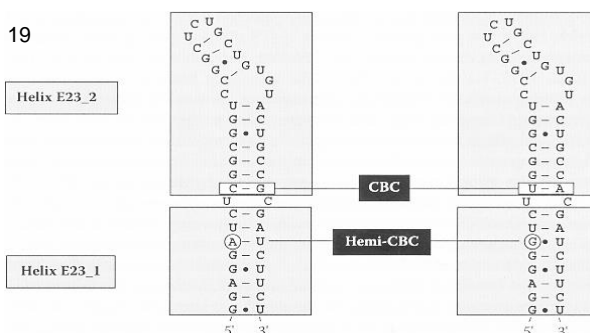
U těchto dvou markerů se obvykle řeší *Compensatory Base Change* (CBC, kompenzační změna bazí) nebo *Hemi-CBC*. U *Hemi-CBC* dojde k jedné změně v jedné pozici nukleotidu a zároveň se řetězec RNA může párovat, např. **A-U** -> **G•U**. Naopak u CBC jsou změny dvě ⁷, např. **C-G** -> **U-A**, (Guttel et al. 1994, Gontcharov & Melkonian 2005,

⁶ Invertovaná oblast je v plastidovém genomu dvakrát, ale „čte se“ obráceně, a rozděluje tento genom na dvě části, *Small single copy* a *Large single copy*, které jsou jen jednou (Turmel 2007).

⁷ První změna je kompenzována změnou druhou, resp. v návaznosti by to byla změna **A-U** -> **G•U** -> **G-C**.

Pröschold & Leliaert 2007, Škaloud & Peksa 2010). Obrázky znázorňující kompenzační změny bazí u SSU (viz obr. 19), u ITS jsou v příloze (obr. P4).

Obr. 19. Kompenzační změny bazí např. *Oogamochlamys* (vlevo) a *Lobochlamys* (vpravo) v molekulárním markeru SSU v daných helixech, CBC a hemi-CBC jsou zvýrazněny (Pröschold & Leliaert 2007: str. 140).



U SSU spájivých řas je typický 1506 group I intron, ležící na pozici 1506, který se sekundárně ztratil u některých druhů *Spirogyra* (Bhattacharya et al. 1994, Besendahl & Bhattacharya 1999, Gontcharov et al. 2003).

U sekundární struktury ITS jsou jisté konzervované struktury *stem* (stonky) a měnící se části *loop* (smyčky). Její určité oblasti mohou být typické pro různé skupiny spájivých řas (Denboh et al. 2003). Coleman (2000) kritizuje marker pro častou kontaminaci jinými druhy ze stejné linie nebo z jiných linií, např. „hub“.

rbcL se často používá společně se SSU (viz multigenový přístup). Má rozlišovací schopnost u větších linií, skupin a např. u *Spirogyra* clade i u jeho menších linií (Drummond et al. 2005).

trnG^{unc} (group II) intron je nekódující chloroplastový molekulární marker používaný u krásivek pro vymezení druhů (Neustupa et al. 2010, 2011, Nemjová et al. 2011, Škaloud et al. 2012). Oproti ITS má určitou výhodu, nehrozí kontaminace organismy neobsahující plastidy, nebo introny, které nejsou přítomny u sekundárních plastidů (např. u rozsivek) (Coleman 2000, Cattolico et al. 2008).

Mitochondriální gen **cox III**, kóduje *cytochrome oxidase subunit III*, je jedním z vhodných markerů pro multigenové analýzy, např. pro systematiku *Zygnema* společně s *rbcL* (Stancheva et al. 2012) nebo pro fylogenezi celé skupiny Zygnematophyceae (Hall et al. 2008).

Multigenový přístup

Multigenový přístup používá více genů a po fylogenetické analýze se jejich stromy spojí. Nejčastěji se používalo propojení markerů z jádra a z chloroplastu, resp. SSU a *rbcL* nebo se v současné době uplatňuje využití více molekulárních markerů, nejen z jádra a

chloroplastu, ale i z mitochondrie. Použitím dvou a více markerů se zabývají následující dvě podkapitoly.

SSU a rbcL

Použitím markeru **SSU** společně s **rbcL** se podařilo podpořit monofylii třídy Zygnematophyceae (McCourt et al. 2000, Gontcharov et al. 2003). Tyto fylogenetické analýzy navazovaly na předchozí práce pro SSU (Bhattacharya et al. 1994, Surek et al. 1994, Besendahl & Bhattacharya 1999, Denboh et al. 2001, atd.) nebo rbcL (Park et al. 1996).

Při testování jen markeru SSU se stávalo, že v některých větvích se měnil rychleji než v ostatních. Tyto linie se nazývají dlouhé a komplikací je jejich přitahování (long branch attraction, LBA). Jako příklad může být *Spirogyra grevilleana*, která byla přitahována dlouhou větví sesterské skupiny, např. s Charales, (Besendahl & Bhattacharya 1999). Rod *Spirogyra* se nemohl umístit do Zygnematophyceae. Bylo předpokládáno, že širším samplíngem (větším počtem vzorků z více lokalit) by se mohly vyjasnit pozice ve fylogenetickém stromě, jestliže by se našly sekvence s evolucí pomalejší (neboli s menší frekvencí mutací; Gontcharov et al. 2003).

Přidání více molekulárních markerů může vyřešit konfliktní pozice ve fylogenetickém stromě - druhy nebo rody (Gontcharov et al. 2004), popř. zjistit, kde by mohly ležet s určitou pravděpodobností. Širším samplíngem u větve *Spirogyra* se objevilo 8 vnitřních linií, u nichž morfologické znaky nebo průběh konjugace nekorelovaly s molekulárními daty (Drummond et al. 2005, Chen et al. 2012).

Více markerů

U Zygnematophyceae se upřesňovala pozice ve fylogenetickém stromě markery – coxIII, ITS, psaA a rbcL. Markery SSU, psaA a cox III (jaderný, chloroplastový a mitochondriální gen) byly použity při testování monofylie *Micrasterias* (Škaloud et al. 2011). V jiné studii se využilo markerů rbcL, cox III a trnG^{ucc} intron. Prvními dvěma geny se zkoumaly linie, a trnG^{ucc} intron sloužil pro zařazení druhů uvnitř rodu u *Pleurotaenium*, *Docidium* a *Triplastrum* (Škaloud et al. 2012).

Barcoding

Barcoding je jedna z metod určení druhů či definování jejich hranic. Jeho účelem je najít nějaký marker, který by co s největší jistotou odlišil druhy. Ideálně by takový *barcode* měl být universální (měl by se u každého druhu vyskytovat a snadno získat) a měl by odlišit

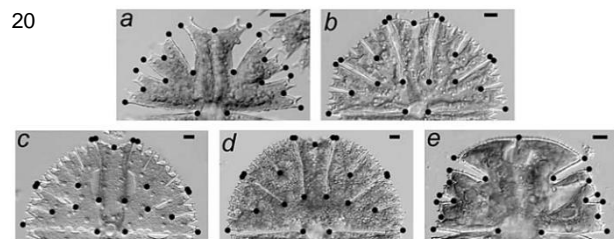
od sebe i blízce příbuzné druhy. Jeden z navrhovaných barcodů pro streptophytní řasy by mohl sloužit marker trnG^{ucc} (Hall et al. 2010, Šťastný et al. 2013).

Geometrická morfometrika u *Micrasterias*

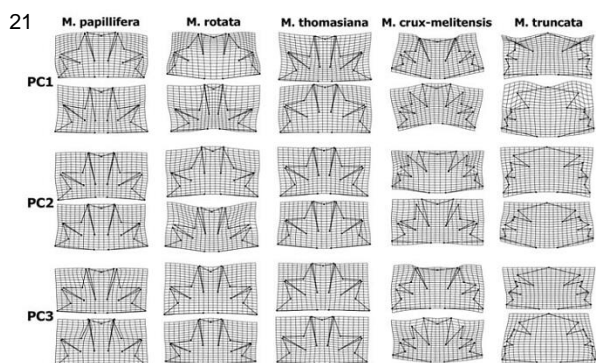
Geometrická morfometrika patří mezi fenetické metody (tabulka P2), druhy se rozlišují na základě podobnosti. Pro tyto studie se hodí např. rod *Micrasterias*, protože má hodně pozic pro *landmarky* (vzájemně si odpovídající homologní body, viz obr. 20), a je biradiální. Pozice landmarků se dále v "tvaroprostoru" statisticky srovnávají. Jednou z mnoha analýz morfometrických dat je *Principal Component Analysis* (PCA), která se zabývá nejdůležitějšími částmi buňky, u kterých jsou vidět signifikantní rozdíly (Neustupa & Šťastný 2006, Neustupa & Škaloud 2007, viz obr. 21).

Tato metoda byla použita např. při studiu populací *Micrasterias* (Neustupa & Šťastný 2006) nebo byla porovnána s markerem SSU, který koreloval s tvarem polárního laloku (Neustupa & Škaloud 2007). Geometrická morfometrika byla využita při odhalování pseudokryptických nebo kryptických druhů, např. u *M. truncata* var. *semiradiata* nebo *M. fimbriata* (Nemjová et al. 2011, Neustupa et al. 2011).

Obr. 20. Pozice landmarků u zástupců *Micrasterias*, a – *M. crux-melitensis*, b – *M. papillifera*, c – *M. rotata*, d – *M. thomasiana*, *M. truncata*, měřítko 10 μm (přejato z Neustupa & Škaloud 2007).



Obr. 21. Hlavní odlišnosti tvarů u druhů *Micrasterias*, transformační mřížky z konsenzuální konfigurace extrémních pozic na prvních třech osách *Principal Component* u pěti druhů *Micrasterias*, (převzato z Neustupa & Škaloud 2007)



Závěr

Kryptická nebo pseudokryptická diverzita se nachází nejen u jednobuněčných, ale i u mnohobuněčných protist. Příkladem mohou být spájkivé řasy (Zygnematophyceae). Zygnematophyceae žijí především ve sladkovodních habitatech. Při vhodných podmínkách se rozmnožují většinou asexuálně, pohlavní rozmnožování u mnoha druhů spájkivých řas ani nebylo pozorováno. Sexuálně se rozmnožují nejčastěji ve vysychajících lokalitách, kde vytváří trvalá stádia (zygospory). Konjugace se může rozdělit na několikero typů: pomocí konjugačního kanálu nebo konjugačního váčku, a další podtypy. Taxonomické třídění založené na morfologii zygospory a průběhu konjugace je nadále využíváno u skupiny Zygnemataceae, kvůli nedostatku molekulárních dat.

Pomocí morfologického konceptu bylo popsáno kolem 4000 druhů spájkivých řas a nespočet infraspecifických taxonů. Celá řada popsaných variet a morfologická variabilita druhů znemožňuje jejich spolehlivou taxonomii a v uplynulých 160 letech se lišil názor na popsání intraspecifických jednotek. Často jsou variety jen tvarově podobné a nemusí být v rámci druhu evolučně příbuzné. Při jejich slučování do tzv. kolektivních druhů, nekriticky podle podobnosti, vznikala synonyma jmen vnitrodruhových taxonů, kdy se přenechávala odpovědnost příslušným autorům. Podle biologického a fylogenetického konceptu se předpokládá, že bude druhů několikanásobně více. Molekulární metody odhalily, že některé rody krásivek, které byly původně jen morfologicky popsány, jsou parafyletické (*Micrasterias*) nebo polyfyletické např. *Cosmarium*, *Staurodesmus* nebo *Euastrum*. Ukazuje se, že existuje více linií zhruba na úrovni rodů. Společně s dalšími metodami se jeví, že bude i více linií na úrovni druhů, alespoň dvakrát více než bylo popsáno podle morfologie.

Morfologický koncept pro popis nových taxonů řas se zdá nedostačující. Nové druhy řas je třeba mít v kulturách a mít osekvenovány jeho nejdůležitější markery, u streptofytních řas by mohl stačit trnG^{ucc} marker. Pro infraspecifické jednotky, u kterých není jisté, zda by mohly být druhy nebo jen populacemi, se často používají křížící pokusy. U spájkivých řas jsou tyto pokusy časově náročné a u mnoha druhů se nedají použít kvůli absenci pohlavního rozmnožování. Proto se začaly využívat i jiné metody založené na jiných předpokladech vzniku druhů.

Druhy jak morfologicky odlišné tak i kryptické vznikají různým způsobem a jsou různě izolované - geograficky, ekologicky, reprodukčně atd. Multidisciplinární přístup s použitím především molekulárních metod, ekologie, elektronové mikroskopie a geometrické morfometrie pomáhá odhalovat kryptické druhy a nebo geografickou variabilitu.

U spájivých řas byly nalezeny (pseudo)kryptické druhy v druhovém komplexu *Closterium moniliferum - ehrenbergii*, u *Micrasterias* (*M. radians*, *M. fimbriata*, na úrovni variet *M. truncata*, resp. *M. truncata* var. *semiradiata*), *Xanthidium* (druhový komplex *X. cristatum* nebo *X. antilopaeum*), u *Cosmarium* (*Cosmarium punctulatum*) a dalších.

Zdá se, že je častější výskyt pseudokryptických druhů na úrovni variet a leckdy jsou i geograficky oddělené, např. africká *M. radians* var. *evoluta* a asijská *M. radians* var. *bogoriensis* mají jinou biogeografii než příbuzná evropsko-americká *M. crux-melitensis*; nebo geograficky oddělená grónsko-americká linie v rámci *X. antilopaeum*. Na úrovni variet se liší především *X. cristatum*, u kterého molekulární metody korelovaly s geometrickou morfometrikou. Pomocí SEM se odhalily nepatrné rozdíly např. u linií *M. fimbriata*, které korelovaly jak s geometrickou morfometrikou, tak částečně i s jejich biogeografií. Polyfázickým přístupem se podařilo vymezit několik dobře definovaných druhů, např. *M. semiradiata* nebo *M. rotata*. V těchto studiích byl použit i marker $trnG^{ucc}$, který by mohl sloužit i jako barcode streptofytních řas.

Pokud je u některých druhů potvrzené, že jsou monofyletické, daly by se použít i v dalších aplikacích, kde jsou potřeba druhy jako jednotky. Bez (pseudo)kryptických linií by se mohly určovat ve světelném mikroskopu jen podle morfologie. Ty by se mohly bez problémů používat jako bioindikátory. Biologicky cennou lokalitu (např. nějaký mokřad) bychom mohli také určit pomocí indexu *conservation value* (čím vyšší, tím cennější). Hodnotu indexu *conservation value* zvyšuje stádium „zralosti“ ekosystému, výskyt sledovaných vzácných druhů krásivek, a větší druhová diverzita (i se započítáním pseudokryptických a kryptických druhů). Pro určení (pseudo)kryptických druhů je třeba časově náročnější, ale přesnější metody. Pod skenovacím mikroskopem by se daly rozeznat pseudokryptické druhy snadněji než pod menším zvětšením. Pro jemnější zkoumání kryptických druhů by se musel vzorek z lokality nakultivovat a narostlou kulturu osekvenovat zvoleným markerem (u krásivek $trnG^{ucc}$). Tímto způsobem bychom zjistili větší druhovou diverzitu a tím i větší hodnotu indexu *conservation value*.

Jedním z polyfyletických rodů je také *Euastrum*, který je na druhové úrovni málo prozkoumaným rodem. Zatím v odborné literatuře nebyla popsána jeho (pseudo)kryptická diverzita, která je předpokládána u mnoha rodů krásivek, včetně *Euastrum*. Ve své diplomové práci bych se zaměřila na některé nejasně definované druhy (*E. humerosum/didelta* nebo *E. crassum*). Použila bych při tom polyfázický přístup, především molekulární fylogenetiku, geometrickou morfometriku a elektronovou mikroskopii.

Přehled použité literatury:

- Bader, J.M., 1998. Measuring genetic variability in natural populations by allozyme electrophoresis. - In: Karcher, S.J. (Ed.), *Tested Studies for Laboratory Teaching*. Presented at the Proceedings of the 19th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE) [online]. Case Western Reserve University, Cleveland, pp. 25–42 [cit. 2013–08–11]. Dostupné z: <http://www.ableweb.org/volumes/vol-19/2-bader.pdf>.
- Baumgartner, B.J., Rapp, J.C., Mullet, J.E., 1993. Plastid Genes Encoding the Transcription / Translation Apparatus Are Differentially Transcribed Early in Barley (*Hordeum vulgare*) Chloroplast Development: Evidence for Selective Stabilization of *psbA* mRNA. - *Plant Physiol.* 101, 781–791.
- Becker, B., Marin, B., 2009. Streptophyte algae and the origin of embryophytes. - *Ann. Bot.* 103, 999–1004.
- Bellinger, E.G., Sigeo, D.C., 2010. *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*. Wiley-Blackwell, 271 pp.
- 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.
- 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.
- Bhattacharya, D., Surek, B., Rüsing, M., Damberger, S., Melkonian, M., 1994. Group I introns are inherited through common ancestry in the nuclear-encoded rRNA of Zygnematales (Charophyceae). - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Evolution 91, 9916–9920.
- Bicudo, C.E. de M., Carvalho, L.M. de, 1969. Polymorphism in the desmid *Xanthidium regulare* and its taxonomic implications. - *J. Phycol.* 5, 369–375.
- Bicudo, C.E. de M., Sormus, L., 1972. Polymorphism in the desmid *Micrasterias laticeps* and its taxonomical implications. - *J. Phycol.* 8, 237–242.
- Blackburn, S.I., Tyler, P.A., 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.
- Bland, R.D., Brook, A.J., 1974. The spatial distribution of desmids in lakes in northern Minnesota, U.S.A. - *Freshwater Biol.* 4, 543–556.
- Brodie, J., Bartsch, I., Neefus, C., Orfanidis, S., Bray, T., Mathieson, A.C., 2007. New insights into the cryptic diversity of the North Atlantic – Mediterranean “*Porphyra leucosticta*” complex: *P. olivii* sp. nov. and *P. rosenfurtii* (Bangiales, Rhodophyta). - *Eur. J. Phycol.* 42, 3–28.
- Brook, A.J., 1981. *The Biology of Desmids*. - Botanical Monographs 16. ed. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, 276 pp.
- Budd, A.F., Mishler, B.D., 1990. Species and Evolution in Clonal Organisms - Summary and Discussion. - *Syst. Bot.* 15, 166–171.
- Catania, F., Wurmser, F., Potekhin, A.A., Przyboś, E., Lynch, M., 2009. Genetic Diversity in the *Paramecium aurelia* Species Complex. - *Mol. Biol. Evol.* 26, 421–431.
- Cate, J.H., Gooding, A.R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B.L., Kundrot, C.E., Cech, T.R., Doudna, J.A., 1996. Crystal Structure of a Group I Ribozyme Domain: Principles of RNA Packing. - *Science* 273, 1678–1685.
- Cattolico, R.A., Jacobs, M.A., Zhou, Y., Chang, J., Duplessis, M., Lybrand, T., McKay, J., Ong, H.C., Sims, E., Rocap, G., 2008. Chloroplast genome sequencing analysis of *Heterosigma akashiwo* CCMP452 (West Atlantic) and NIES293 (West Pacific) strains [online]. - *BMC Genomics* 9, 211 [cit. 2013–08–13]. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/211>.
- Coesel, P.F.M., 1988a. Biosystematic studies on the *Closterium moniliferum* / *ehrenbergii* complex (Conjugatophyceae, Chlorophyta) in western Europe. II. Sexual compatibility. - *Phycologia* 27, 421–429.
- Coesel, P.F.M., 1988b. Biosystematic studies on the *Closterium moniliferum* / *ehrenbergii* complex (Chlorophyta, Conjugatophyceae) in western Europe. III. Morphological variability. - *Cryptogam.: Algol.* 9, 165–172.

- 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, 351 pp.
- Coesel, P.F.M., Menken, S.B.J., 1988. Biosystematic Studies on the *Closterium moniliferum* / *ehrenbergii* Complex (Chlorophyta, Conjugatophyceae) in Western Europe. I. Isozyme Patterns. - *Br. phycol. J.* 23, 193 – 198.
- Coleman, A.W., 2000. The Significance of a Coincidence between Evolutionary Landmarks Found in Mating Affinity and a DNA Sequence. - *Protist* 151, 1–9.
- Coleman, A.W., Vacquier, V.D., 2002. Exploring the Phylogenetic Utility of ITS Sequences for Animals: A Test Case for Abalone (*Haliotis*). - *J. Mol. Evol.* 54, 246–257.
- Coyne, J.A., Orr, H.A., 2004. *Speciation*. Sinauer, Sunderland, Mass., 545 pp.
- Cronquist, A., 1978. Once again, what is a species? - In: Knutson, L.V. (Ed.), *Biosystematics in Agriculture*. Allanheld, Osmun & Co., Montclair, New Jersey, pp. 3–20.
- 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.
- De Queiroz, K., 1998. The General Lineage Concept of Species, Species Criteria, and the Process of Speciation. - In: Howard, D.J., Berlocher, S.H. (Eds.), *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, pp. 57–75.
- De Queiroz, K., 2005. A Unified Concept of Species and Its Consequences for the Future of Taxonomy. - *Proc. Calif. Acad. Sci.* 56, 196–215.
- De Queiroz, K., 2007. Species Concepts and Species Delimitation. - *Syst. Bot.* 56, 879–886.
- 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.
- Dillard, G.E., 1990. *Freshwater Algae of the southeastern United States. Part 3, Chlorophyceae: Zygnematales: Zygnemataceae, Mesotaeniaceae and Desmidiaceae (Section 1)*. - Bibliotheca Phycologica 85. ed. J. CRAMER, Berlin, 172 pp.
- Drummond, C.S., Hall, J., Karol, K.G., Delwiche, C.F., McCourt, R.M., 2005. Phylogeny of *Spirogyra* and *Sirogonium* (Zygnematophyceae) based on rbcL sequence data. - *J. Phycol.* 41, 1055–1064.
- EMBL-EBI. The European Bioinformatics Institute. Part of the European Molecular Biology Laboratory [online]. Cambridge: EMBL-EBI 2013. [cit. 2013-08-20]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/>.
- Ettl, H., Gärtner, G., 1995. *Syllabus Der Boden-, Luft- Und Flechtenalgen*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 721 pp.
- Finlay, B.J., Fenchel, T., 2004. Cosmopolitan Metapopulations of Free-Living Microbial Eukaryotes. - *Protist* 155, 237–244.
- Flegr, J., 2005. *Evoluční biologie*. Academia, Prague, Czech Republic, 559 pp.
- Foissner, W., 2011. Dispersal of protists: the role of cysts and human introductions. - In: Fontaneto, D. (Ed.), *Biogeography of Microscopic Organisms: Is Everything Small Everywhere?* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 61–87.
- Fučíková, K., Rada, J.C., Lukešová, A., Lewis, L.A., 2011. Cryptic diversity within the genus *Pseudomuriella* Hanagata (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales) assessed using four Barcode markers. - *Nova Hedwigia* 93, 29–46.

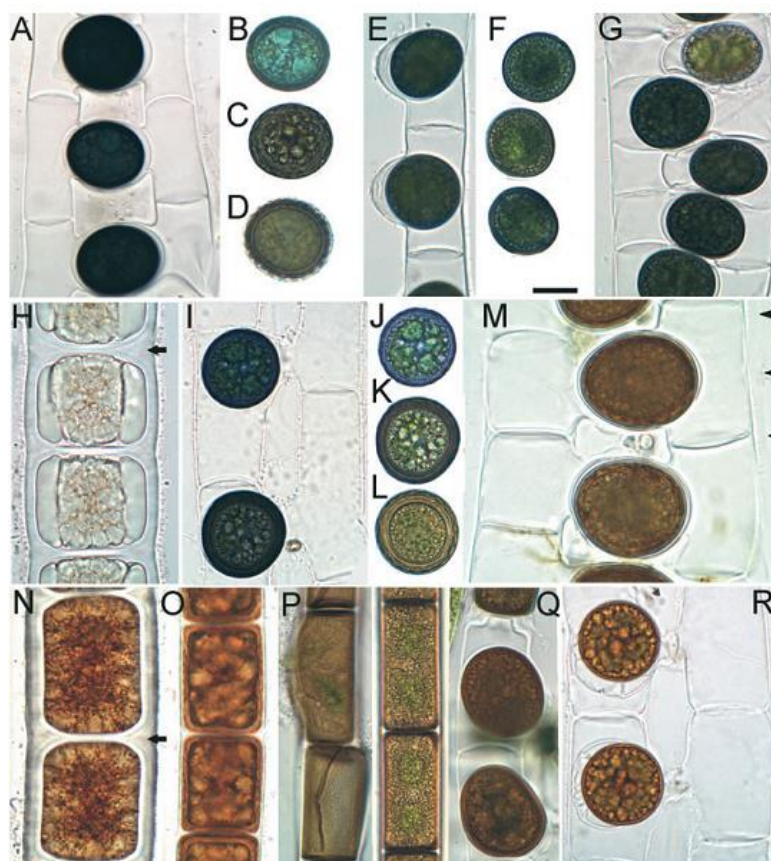
- Gerrath, J.F., 2003. Conjugating Green Algae and Desmids. - *In*: Wehr, J.D., Sheath, R.G. (Eds.), *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Academic Press, Boston, pp. 353–381.
- Gontcharov, A.A., 2008. Phylogeny and classification of Zygnematophyceae (Streptophyta): current state of affairs. - *Fottea* 8, 87–104.
- Gontcharov, A.A., Marin, B., Melkonian, M., 2003. Molecular Phylogeny of Conjugating Green Algae (Zygnematophyceae, Streptophyta) Inferred from SSU rDNA Sequence Comparisons. - *J. Mol. Evol.* 56, 89–104.
- Gontcharov, A.A., Marin, B., Melkonian, M., 2004. Are Combined Analyses Better Than Single Gene Phylogenies? A Case Study Using SSU rDNA and *rbcL* Sequence Comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta). - *Mol. Biol. Evol.* 21, 612–624.
- 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., 2011. A Study of Conflict between Molecular Phylogeny and Taxonomy in the Desmidiaceae (Streptophyta, Viridiplantae): Analyses of 291 *rbcL* Sequences. - *Protist* 162, 253–267.
- Guttel, R.R., Larsen, N., Woese, C.R., 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. - *Microbiol. Rev.* 58, 10–26.
- Hall, J.D., Fučíková, K., Lo, C., Lewis, L.A., Karol, K.G., 2010. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. - *Cryptogam.: Algal.* 31, 529–555.
- 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.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. - *Q. Rev. Biol.* 66, 411–453.
- Hoshaw, R.W., Hilton J., R.L., 1966. Observations on the sexual cycle of the saccoderm desmid *Spirotaenia condensata*. - *J. Ariz. Acad. Sci.* 4, 88–92.
- Hoshaw, R.W., McCourt, R.M., 1988. The Zygnemataceae (Chlorophyta): a twenty-year update of research. - *Phycologia*, Phycological review 27, 511–548.
- Chalamcharla, V.R., Curcio, M.J., Belfort, M., 2010. Nuclear expression of a group II intron is consistent with spliceosomal intron ancestry. - *Genes Dev.* 24, 827–836.
- Chen, C., Barfuss, M.H.J., Pröschold, T., Schagerl, M., 2012. Hidden genetic diversity in the green alga *Spirogyra* (Zygnematophyceae, Streptophyta) [online]. - *BMC Evol. Biol.* 12, [cit. 2013–05–14]. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/12/77>.
- Ichimura, T., 1981. Mating Types and Reproductive Isolation in *Closterium ehrenbergii* Meneghini. - *Bot. Mag. Tokyo* 94, 325–334.
- Ichimura, T., 1996. Genome rearrangement and speciation in freshwater algae. - *In*: Kristiansen, J. (Ed.), *Biogeography of Freshwater Algae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1–17.
- Ichimura, T., 1997. Natural populations of the *Closterium ehrenbergii* (Desmidiaceae, Chlorophyta) species complex in Nepal. - *Phycol. Res.* 45, 47–54.
- Kadlubowska, J.Z., 1984. *Conjugatophyceae. I, Chlorophyta VIII: Zygnemales*. - Süßwasserflora von Mitteleuropa 16. ed. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 532 pp.
- Kouwets, F.A.C., 2008. The species concept in desmids: the problem of variability, infraspecific taxa and the monothetic species definition. - *Biologia*, Section Botany 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.
- Kucera, H., Saunders, G.W., 2012. A survey of Bangiales (Rhodophyta) based on multiple molecular markers reveals cryptic diversity. - *J. Phycol.* 48, 869–882.

- Lambowitz, A.M., Zimmerly, S., 2010. Group II Introns: Mobile Ribozymes that Invade DNA [online]. - *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3, a003616 [cit. 2013-08-13]. Dostupné z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a003616>.
- Lindstrom, S.C., 2008. Cryptic diversity and phylogenetic relationships within the *Mastocarpus papillatus* species complex (Rhodophyta, Phylloporaceae). - *J. Phycol.* 44, 1300–1308.
- Löve, A., 1964. The biological species concept and its evolutionary structure. - *Taxon* 13, 33–45.
- 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.
- Mayr, E., 1940. Speciation Phenomena in Birds. - *Am. Nat.* 74, 249–278.
- Mayr, E., 1944. *Systematics and the Origin of Species: from the viewpoint of a zoologist*. - Columbia biological series XIII. ed. Columbia University Press, 2nd print. New York, 334 pp.
- Mayr, E., 2003. *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution and Inheritance* [online]. The Belknap Press of Harvard University Press, 12. print. Cambridge (Mass.), 974 pp. Dostupné z: <http://books.google.cz>.
- McCourt, R.M., Hoshaw, R.W., 1990. Noncorrespondence of Breeding Groups, Morphology, and Monophyletic Groups in *Spirogyra* (Zygnemataceae: Chlorophyta) and the Application of Species Concepts. - *Syst. Bot.* 15, 69–78.
- 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.
- McNeill, J., Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawkworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme van Reine, W.F., Smith, G.F., Wiersema, J.H., Turland, N.J., 2012. Taxa and their ranks: Article 3.1. - In: *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Melbourne Code); Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress, Melbourne, Australia, July 2011* [online]. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Germany [cit. 2013-08-12]. Dostupné z: <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php?page=art3>.
- Meindl, U., 1993. *Micrasterias* Cells as a Model System for Research on Morphogenesis. - *Microbiol. Rev.* 57, 415–433.
- Mix, M., 1972. Die Feinstruktur der Zellwände bei Mesotaeniaceae und Gonatozygaceae mit einer vergleichenden Betrachtung der verschiedenen Wandtypen der Conjugatophyceae und über deren systematischen Wert. - *Arch. Mikrobiol.* 81, 197–220.
- Moniz, M.B.J., Rindi, F., Novis, P.M., Broady, P.A., Guiry, M.D., 2012. Molecular phylogeny of Antarctic *Prasiola* (Prasiolales, Trebouxiophyceae) reveals extensive cryptic diversity. - *J. Phycol.* 48, 940–955. *NCBI: Nucleotide*. National Center for Biotechnology Information [online]. Bethesda MD, USA: National Library of Medicine.[cit. 2013-08-20]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>.
- 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., Škaloud, P., 2007. Geometric morphometrics and qualitative patterns in the morphological variation of five species of *Micrasterias* (Zygnemophyceae, Viridiplantae). - *Preslia* 79, 401–417.
- 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.
- 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., Poulíčková, A., Škaloud, P., 2011. A novel, combined approach to assessing species delimitation and biogeography within the well-known desmid species *Micrasterias fimbriata* and *M. rotata* (Desmiales, Steptophyta). - *Hydrobiologia* 667, 223–239.
- Park, N.E., Karol, K.G., Hoshaw, R.W., McCourt, R.M., 1996. Phylogeny of *Gonatozygon* and *Genicularia* (Gonatozygaceae, Desmiales) based on rbcL sequences. - *Eur. J. Phycol.* 31, 309–313.

- Pawlowski, J., Majewski, W., Longet, D., Guiard, J., Cedhagen, T., Gooday, A.J., Korsun, S., Habura, A.A., Browser, S.S., 2008. Genetic differentiation between Arctic and Antarctic monothalamous foraminiferans. - *Polar Biol.* 31, 1205–1216.
- Petersen, K., Schöttler, M.A., Karcher, D., Thiele, W., Bock, R., 2011. Elimination of a group II intron from a plastid gene causes a mutant phenotype. - *Nucleic Acids Res.* 39, 5181–5192.
- Pichrtová, M., Remias, D., Lewis, L.A., Holzinger, A., 2013. Changes in Phenolic Compounds and Cellular Ultrastructure of Arctic and Antarctic Strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after Exposure to Experimentally Enhanced UV to PAR Ratio. - *Microb. Ecol.* 65, 68–83.
- 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.
- Pröschold, T., Leliaert, F., 2007. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. - In: Brodie, J., Lewis, J. (Eds.), *Unravelling the Algae, the Past, Present, and Future of Algal Systematics*. CRC Press, Boca Raton, pp. 231–265.
- Růžička, J., 1977. *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele un. Obermiller), Stuttgart, 291 pp.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E., Small, R.L., 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. - *Am. J. Bot.* 92, 142–166.
- Silva, L.H.S., 1999. Fitoplâncton de um reservatório eutrófico (Lago Monte Alegre), ribeirão preto, São Paulo, Brasil. - *Rev. Brasil. Biol* 59, 281–303.
- Simon, E.M., Nanney, D.L., Doerder, F.P., 2008. The “*Tetrahymena pyriformis*” complex of cryptic species. - *Biodivers. Conserv.* 17, 365–380.
- Sites Jr, J.W., Marshall, J.C., 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. - *Trends Ecol. Evol.* 18, 462–470.
- Stancheva, R., Sheath, R.W., Hall, J.D., 2012. Systematics of the genus *Zygnema* (Zygnematophyceae, Charophyta) from Californian watersheds. - *J. Phycol.* 48, 409–422.
- Starr, R.C., 1955. Isolation of sexual strains of placoderm desmids. - *Bull. Torrey Bot. Club* 82, 261–265.
- Surek, B., Beemelmanns, U., Melkonian, M., Bhattacharya, D., 1994. Ribosomal RNA sequence comparisons demonstrate an evolutionary relationship between *Zygnematales* and charophytes. - *Plant Syst. Evol.* 191, 171–181.
- 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., Peksa, O., 2010. Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). - *Mol. Phylogenet. Evol.* 54, 36–46.
- Škaloud, P., Šťastný, J., Nemjová, K., Mazalová, P., Pouličková, A., Neustupa, J., 2012. Molecular phylogeny of baculiform desmid taxa (Zygnematophyceae). - *Plant Syst. Evol.* 298, 1281–1292.
- 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.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. - *Trends Parasitol.* 18, 405–410.
- Turmel, M., Otis, C., Lemieux, C., 1999. The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: Insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Evolution 96, 10248–10253.
- Turmel, M., Otis, C., Lemieux, C., 2005. 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, [cit. 2013–05–13]. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/3/22>.

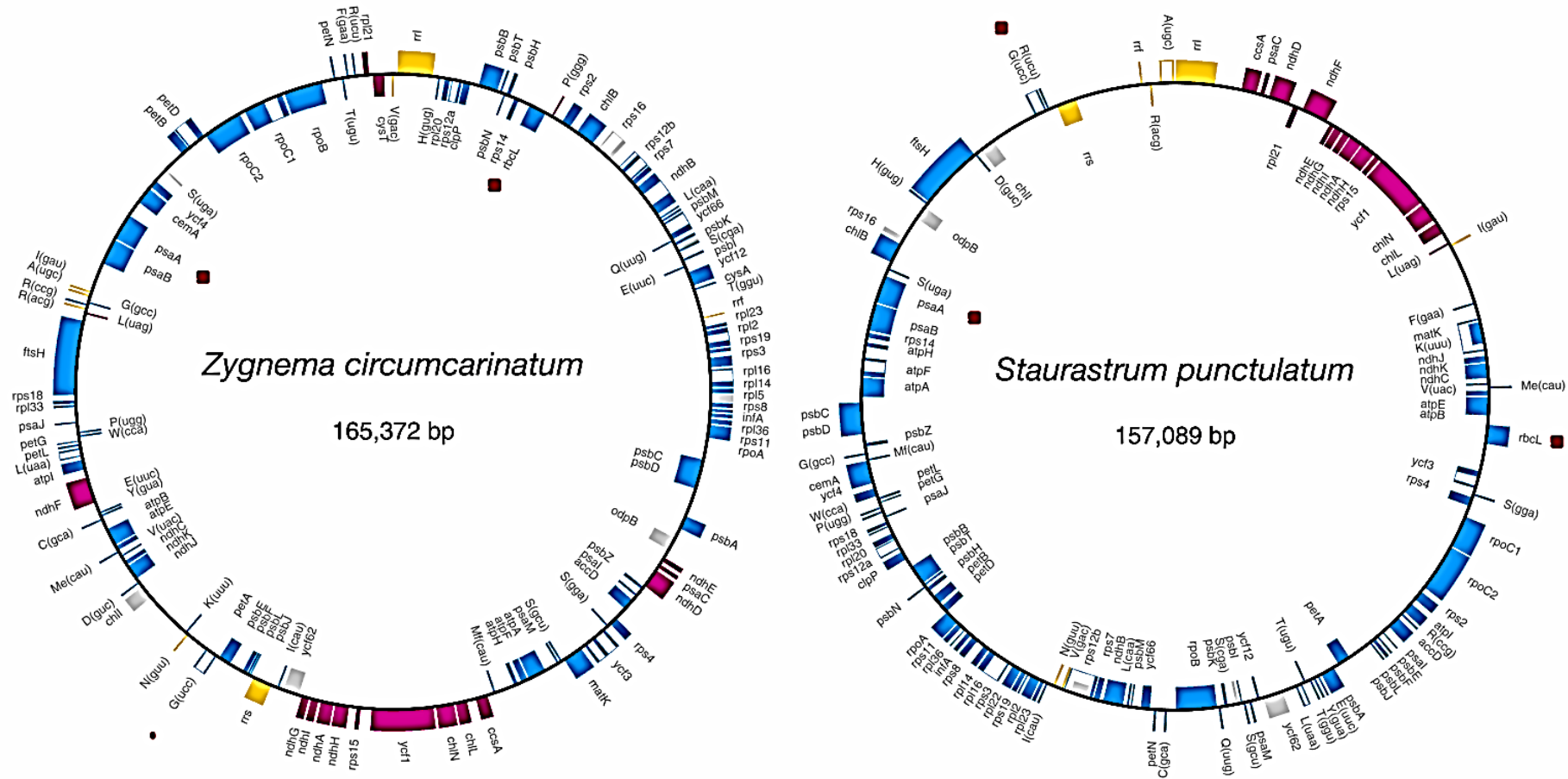
- Turmel, M., Pombert, J.-F., Charlebois, P., Otis, C., Lemieux, C., 2007. The green algal ancestry of land plants as revealed by the chloroplast genome. - *Int. J. Plant Sci.* 168, 679–689.
- Vanormelingen, P., Hegewald, E., Braband, A., Kitchke, M., Friedl, T., Sabbe, K., Vyverman, W., 2007. The systematics of a small spineless *Desmodesmus* species, *D. costato-granulatus* (Sphaeropleales, Chlorophyceae), based on ITS2 rDNA sequence analyses and cell wall morphology. - *J. Phycol.* 43, 378–396.
- Vyverman, W., 1989. Desmids (Zygnematophyceae, Desmidiales) from Mount Giluwe (Southern Highlands Province, Papua New Guinea). - *Nova Hedwigia* 48, 317–339.
- Wada, M., 2013. Chloroplast movement. - *Plant Sci.* 210, 177 – 182.
- Walker, T.D., Tyler, P.A., 1984. Tropical Australia, a dynamic limnological environment. - *Verh. - Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 22, 1727–1734.
- Wodniok, S., Brinkmann, H., Glöckner, G., Heidel, A.J., Phillipe, H., Melkonian, M., Becker, B., 2011. Origin of land plants: Do conjugating green algae hold the key? [online]. - *BMC Evol. Biol.* 11, [cit. 2013–05–17]. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/104>.
- Wu, S.-H., Lagarias, J.C., 1997. The phytochrome photoreceptor in the green alga *Mesotaenium cladariorum*: implication for a conserved mechanism of phytochrome action. - *Plant, Cell Environ.* 20, 691–699.

Příloha

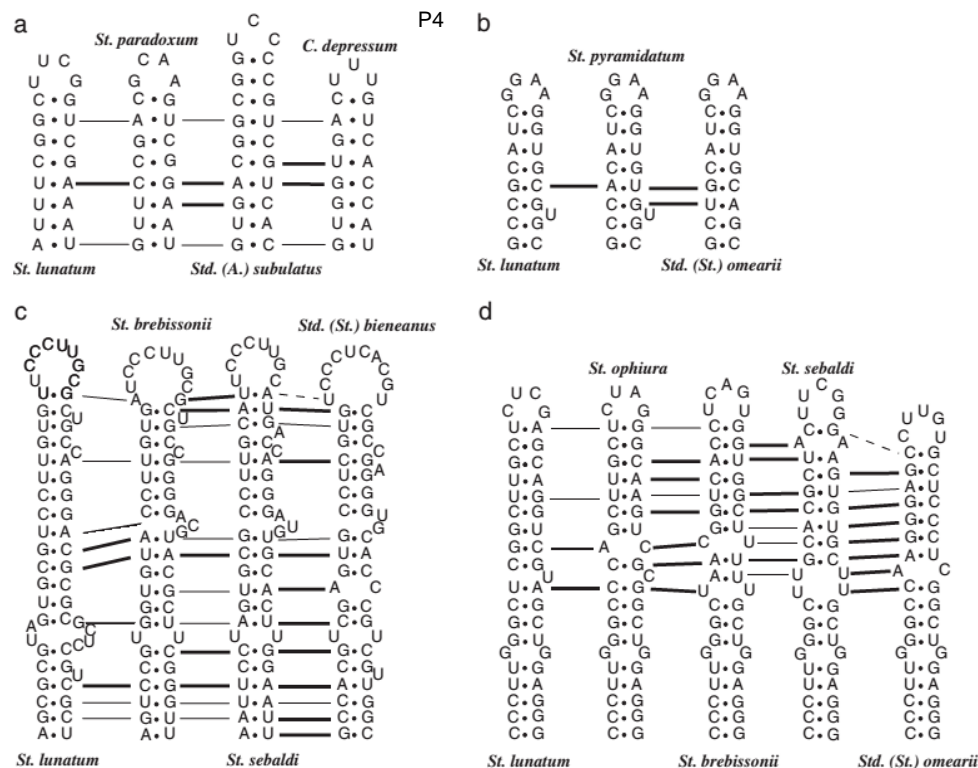
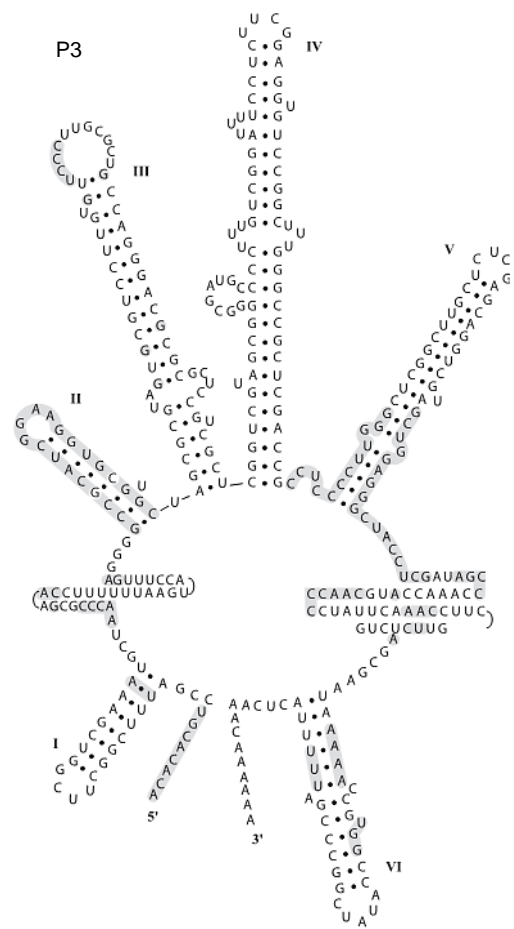


Obr. P1. Reprodukční struktury *Zygnema* z Kalifornie, A - *Z. californicum* (skalariformní konjugace), B-D *Z. californicum* zygospory, E a F - *Z. aplanosporum* (aplanospory), G - *Z. aplanosporum* skalariformní konjugace, H - *Z. sterile* akinety (bezbarvá mesospora), I - *Z. carinthiacum* skalariformní konjugace, J-L - *Z. carinthiacum* zygospory, M - *Z. giganteum* skalariformní konjugace, N - *Z. sterile* hnědé akinety, O - *Z. irregulare* akinety s hnědou mesosporou, P - *Z. subcylindricum* akinety s hnědou mesosporou v různě zaostřené rovině, Q - *Z. subcylindricum* konjugace s zygosporami v gametangiu, R - *Z. argillarii* skalariformní konjugace (rozšířená exospora). Šipky ukazují na vícevrstevné stěny, hrot šipky ukazuje pektinovou vrstvu, která kryje filamenta. Měřítko 20 μm , světelný mikroskop (Stancheva et al. 2012)

Obr. P2. Sekvenované plastidové genomy u *Staurastrum punctulatum* a *Zygnema circumcarinatum* – často používané markery u Zygnematophyceae jsou označeny červenou tečkou (Turmel 2005): Každý gen v *Staurastrum* a *Zygnema* cpDNA je barevně kódován k oblasti *Marchantia* cpDNA [GenBank:NC 001319] nesoucí jeho homology; modrozelená - large single-copy region, červenorudá - small single-copy region, žlutá - IR. Geny zobrazené šedě u *Marchantia* cpDNA chybí.



Obr. P3. Model sekundární struktury transkriptu ITS1 *Staurastrum lunatum*, sestavený podle termodynamických algoritmů sbalení RNA a podpořeny kompenzačními změnami bazí. Šest domén je označeno I-VI. Konzervované části u 21 sekvencí *Staurastrum* jsou tučné, konzervované části z 90% v 39 sekvencích krásivek jsou šedivé. (Gontcharov & Melkonian 2005) Obr. P4. Příklady CBC (plná čára) a hemi-CBC (tenká čára) v helixech I (a), II (b), IV (c, d) u transkriptu ITS1 *Staurastrum*. *S. lunatum* byl vybrán jako referenční druh. Zleva doprava klesá příbuznost. Nejistá homologie mezi pozicemi je zobrazena přerušovanou čarou. (Gontcharov & Melkonian 2005)



Tabulka P1. aniso- anisogamie, bi- bigametangiální, extra- extragametangiální, iso- isogamie, mono– monogametangiální; s- sekce (Kadlubowska 1984).

		<i>Debarya</i>	<i>Mougeotia</i>	<i>Mougeotiopsis</i>	<i>Pleurodiscus</i>	<i>Sirocladium</i>	<i>Sirogonium</i>	<i>Spirogyra</i>	<i>Temnogametum</i>	<i>Zygnema</i>	<i>Zygnemopsis</i>	<i>Zygogonium</i>
skalární	iso, extra	x	s. Mesocarpus	M. calospora	P. borinquinaez					s. Pectinatum		x
	iso, bi	x	s. Staurospermum						x		x	
	ani, mono		s. Plagiospermum			x	x	x		s. Leiospermum		
laterální	iso, extra		s. Mesocarpus							s. Pectinatum		x
	ani, mono							x		s. Leiospermum		
terminální	iso, extra		M. oedogonioides						x			
	ani, mono											

Tabulka **P2**. Alternativní druhové koncepty a vlastnosti které je odlišují (podle de Queiroz 2005, 2007). * exklusivní splynutí je ekvivalentní k jedné interpretaci monofyletismu, monofyletická verze fylogenetického druhového konceptu je obvykle zaměřena na příbuznost populací než pro alely.

Druhový koncept (tradiční jméno)	Charakteristické vlastnosti (Kritéria druhů)	Zastánci druhových definic
Biologický	Potenciální křížení/ Vnitřní reprodukční izolace	Wright (1940); Mayr (1942, 1963); Dobzhansky (1950)
Izolační	Izolační mechanismy	Mayr (1942, 1963); Dobzhansky (1970)
Rozpoznávací	Rozpoznání kompatibilních párů a fertilizační systém	Paterson (1978, 1985)
Evoluční	Jednotná evoluční role, tendence nebo osud	Simpson (1951, 1961); Wiley (1978, 1981)
Ekologický	Odlišné adaptivní oblasti (niky)	Van Valen (1976)
Kohezní	Vnitřní kohezní mechanismy	Templeton (1989)
Fylogenetický	Asociace s fylogenetickou systematikou (Kladistikou)	Viz níže
<ul style="list-style-type: none"> • Hennigův 	Druhy jsou na obou koncích ohraničeny kladogenetickými konci (speciace nebo extinkce)	Hennig (1966); Ridley (1989)
<ul style="list-style-type: none"> • Monofyletický (Apomorfický) 	Monofyletismus (jako důkaz apomorfie = odvozenými charakteristickými znaky)	Rosen (1979); Mishler (1985)
<ul style="list-style-type: none"> • Diagnostický 	Rozpoznatelnost (vlastnost fixního charakteristického rozdílného znaku)	Cracraft (1983); Nixon a Wheeler (1990)
<ul style="list-style-type: none"> • Genealogický* 	Exklusivní splynutí alel ve více lokusech	Baum a Shaw (1995)
Fenetický	Fenetické seskupování podobných organismů oddělených mezerami mezi jinými skupinami	Michener (1970); Sneath a Sokal (1973)
Genotypický	Deficit mezistupňů v genotypch (heterozygotech) na více místech v genomu	Mallet (1995)