

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. David Ryšánek

Biogeografie, diverzita a substrátová specificita aeroterestrické zelené řasy rodu *Klebsormidium* (Streptophyta)

Biogeography, diversity and substrate-specificity of aeroterrestrial green algal genus
Klebsormidium (Streptophyta)

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Pavel Škaloud, PhD.

Praha 2012

Prohlášení

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

V Praze

Podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat rodině, kamarádům a členům algologického pracoviště PřF UK, kteří mi během mého studia na Přírodovědecké fakultě UK pomáhali a podporovali mě. Moje největší poděkování patří mému školiteli Mgr. Pavlovi Škaloudovi, PhD., za výborné vedení diplomové práce a velkou trpělivost. Nakonec chci poděkovat RNDr. Kristýně Hřkové (katedra botaniky PřF JU a Ústav půdní biologie AV ČR) za provedení odběru vzorků v USA v Ohiu a Connecticutu a následné poskytnutí sekvencí.

Abstrakt

Vláknitá aeroterestrická řasa rodu *Klebsormidium* se nachází v širokém spektru prostředí, tj. od sladkovodního po terestrické. V poslední době používání molekulárních metod u tohoto rodu vedlo k zjištění, že diverzita je daleko větší, než se na základě morfologie předpokládalo a že druhový koncept založený na tradiční morfologii je nedostatečný. Proto jsem se pokusil jednotlivé fylogenetické linie vymezit, jak na základě biogeografického rozšíření, tak na základě ekologických preferencí. Dalším cílem mé práce bylo zjistit, zda i u aeroterestrické řasy platí ubikvitní teorie, protože doposud nebyla provedena žádná studie aerofytické řasy, která by se věnovala problematice biogeografického rozšíření protist. To jsem studoval na základě chloroplastového molekulární markeru *rbcL*.

Na základě získaných dat jsem zjistil, že geografické vymezení u linií rodu *Klebsormidium* se ukazuje být nepoužitelné z důvodu kosmopolitního výskytu nalezených genotypů. Ale na získaných datech ze substrátové specificity se ukazuje, že v rámci rodu *Klebsormidium* určité ekologické preference existují a jejich použití k vymezení druhů se jeví vhodné.

Abstract

Filamentous aeroterrestrial green algae genus *Klebsormidium* occurs in a very wide range of freshwater and terrestrial habitats. Recent results of molecular investigations led to the finding that the diversity within this genus is far greater than expected on the basis of the morphological features, and that the traditional phenotypic species concept is insufficient. I tried to differentiate phylogenetic lineages within the genus *Klebsormidium* by their different biogeographical distribution and environmental preferences. Since no study dealing with the biogeographic pattern of aeroterrestrial algae was so far undertaken, another aim of this work was to test validity of the protist ubiquity model in aeroterrestrial habitats. I studied this issue based on the chloroplast *rbcL* molecular marker.

Based on the obtained data I found that the geographic definition of particular *Klebsormidium* lineages turns out to be unusable because of the cosmopolitan occurrence of almost all genotypes. However, the data obtained from the substrate specificity study shows that clear ecological preferences exist within the genus *Klebsormidium* and could be simply used to define different lineages within the genus.

Obsah

1. Úvod.....	6
1.1 Aeroterestrická řasa <i>Klebsormidium</i> (Klebsormidiophyceae, Strepto-phyta).....	6
1.2 Biogeografie	8
1.3 Substrátová specificita aeroterestrických řas.....	10
1.4 Molekulární marker <i>rbcL</i> (velká podjednotka RuBisCO).....	14
2. Materiál a metody.....	18
2.1 Odběr vzorků	18
2.2 Charakteristiky odběrových míst.....	18
2.2.1 Česká republika	18
2.2.2 Velká Británie - Wales	18
2.2.3 Japonsko – Nikko	19
2.2.4 USA: Washington – Seattle.....	19
2.2.5 USA: Ohio – Cleveland.....	19
2.2.6 USA: Connecticut - Waterbury	19
2.3 Vzorky pro substrátovou specificitu.....	20
2.3.1 Čedič.....	21
2.3.2 Žula.....	21
2.3.3 Vápenec	21
2.3.4 Pískovec	22
2.4 Měření pH hornin	22
2.5 Kultivace vzorků.....	22
2.6 Molekulární část	22
2.7 Fylogenetické analýzy	24
3. Výsledky.....	25
3.1 Diverzita	25
3.2 Biogeografie	27
3.3 Substrátová specificita	31
4. Diskuze.....	34
5. Závěr.....	40
6. Literatura	41
7. Příloha	49

1. Úvod

1.1 Aeroterestrická řasa *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta)

Rod *Klebsormidium* P. C. Silva, Mattox a W. H. Blackwell (Silva a kol. 1972) se vyznačuje jednoduchými nevětvenými vlákny, s buňkami uspořádanými v jedné řadě. Buňky jsou cylindrické s tlustou buněčnou stěnou bez struktury. Každá buňka má jeden parietální chloroplast, který vyplňuje buňku přibližně z poloviny. Uprostřed chloroplastu je uložen jeden pyrenoid obklopený škrobovou vrstvou. Rozmnožují se jednak vegetativně fragmentací stélky nebo některé druhy asexuálně pomocí dvoubičíkatých zoospor, pohlavní rozmnožování nebylo dosud pozorováno. Zoospora je mírně zploštělá, asymetrická se dvěma subapikálně uloženými bičíky, které mají „multilayered structure“ (MLS) bičíkového kořene bez přítomnosti stigma. Zoosporangium vzniká z nespécializované buňky a zoospory unikají ze zoosporangia skrz zřetelný, laterální pór v buněčné stěně. Karyologické studie udávají počet chromosomů $n = 22 - 26$. *Klebsormidium* se odlišuje od ostatních podobných rodů zelených řas (např. *Ulotrix*, *Uronema*) buněčným dělením a ultrastrukturou zoospor (Floyd a kol. 1972, Marchant a kol. 1973, Lokhorst a Star 1985). Každá buňka obsahuje jeden peroxisom rostlinného typu vklíněný mezi jádrem a chloroplastovou membránou (Floyd a kol. 1972, Pickett-Heaps 1975). Ultrastrukturální znaky typické pro rod *Klebsormidium* jsou dva laterálně uložené bičíky s MLS - systémem, přetrvávající interzonální mitotické vřeténko (Stewart a Mattox 1975) a vícevrstevné uspořádání škrobových zrn kolem pyrenoidu, kterým kompletně proniká řada paralelních thylakoidních membrán. Stewart a Mattox (1975) vytvořili nový řád Klebsormidiales charakteristický těmito znaky: centripetální dělicí rýha, persistentní chromosomální mikrotubuly v telofázi a absence plasmodesmat. Na základě molekulárních a ultrastrukturálních dat spadá tento rod do streptofytní linie rostlin v blízké fylogenetické příbuznosti k parožnatkám a rostlinám (Marchant a kol. 1973, Sluiman a Guihal 1999, Karol a kol. 2001, Lewis a McCourt 2004, McCourt a kol. 2004, Sluiman a kol. 2008).

Klasifikace rodu *Klebsormidium* dříve založená pouze na morfologii se ukazuje být nedostatečná (Rindi a kol. 2008, 2011). Hlavním důvodem je, že morfologie *Klebsormidium* je extrémně jednoduchá a nabízí omezené množství charakteristik, které mohou být použity pro identifikaci druhu. Nejpoužívanější znaky v determinační literatuře jsou šířka vláken, typ

růstu vláken, tendence k rozpadání vláken, tvar buněk, struktura buněčné stěny, tvoření H-kusů, tvar chloroplastu a tvar pyrenoidu (Printz 1964, Ramanathan 1964, Ettl a Gartner 1995, Rifón-Lastra a Noguerol-Seoane 2001, John 2002). K těmto charakteristikám přidal Lokhorst (1996) další znaky, které se objevují při kultivaci této řasy, jako je povrchová vrstva odpuzující vodu v tekutém médiu, schopnost tvořit zoospory v laboratorních podmínkách, tvar otvoru na laterální buněčné stěně vytvořený zoosporami, klíčící schéma zoospor.

V současnosti používaný název rodu *Klebsormidium* byl navržen Silvou a kol. (1972) a urovnal tak zmatky kolem používání jména tohoto rodu, který byl původně popsán pod pojmenováním *Hormidium* (Kützing 1843). Od původního názvu po dnešní měl tento rod několik označení od *Hormidium* (Kützing 1843), přes *Stichococcus* (Gay 1891), *Hormococcus* (Chodat 1902), *Chlorhormidium* (Fott 1960) až k dnes používanému a všeobecně uznávanému *Klebsormidium* (Silva a kol. 1972).

Na základě rozsáhlé morfologické revize Lokhorst (1996) rozpoznal a nově morfologicky definoval osm druhů: *K. flaccidum*, *K. elegans*, *K. bilatum*, *K. crenulatum*, *K. mucosum*, *K. dissectum*, *K. fluitans* a *K. nitens*. Novis (2006) poté popsal nový druh *Klebsormidium acidophilum*, který našel na Novém Zélandu v kyselých potocích. Přes detailní morfologické vymezení jednotlivých druhů je ale druhové určení většiny v přírodě nalezených kmenů velmi složité a nejednoznačné. Navíc recentní studie využívající molekulární metody jasně ukazují, že klasifikace založená pouze na morfologii se téměř vůbec neodráží ve fylogenezi, která byla provedena na dvou molekulárních markrech *rbcL* a ITS (Rindi a kol. 2011).

Klebsormidium je kosmopolitní rod (Rindi 2008), který je rozšířený po celém světě od polárních oblastí až k tropickým (Ramanathan 1964, Lee a Wee 1982, Broady 1996, Lokhorst 1996, John 2002, 2003). Vyskytuje se v aeroterestrických prostředích jako je půda (Deason 1969), borka stromů (Handa a kol. 1991, Nakano a kol. 1991), písečné duny (Smith a kol. 2004), golfová hřiště (Baldwin a Whitton 1992), městské zdi (Rindi a kol. 2003, 2004, 2008), kamenné památníky (Uher a kol. 2005, Barberousse a kol. 2006), exponované skály (Frémy 1925), kyselá místa po těžbě (Lukešová 2001), či biotické krusty v pouštích (Lewis 2007). Navíc se tento rod může vyskytovat ve sladkovodních habitatech, jako jsou potoky a řeky (Morison a Sheath 1985, John 2002), jezera (Lokhorst 1996) a mokřady (John 2002).

1.2 Biogeografie

Biogeografie a diverzita protist se stala v posledních letech velmi kontroverzním a diskutovaným tématem, kdy na jedné straně jsou argumenty pro omezené rozšíření druhů protist a s tím související vysoká diverzita (Tyler 1996, Foissner 1999, 2006), zatímco na druhé straně jsou zastánci, kteří prosazují názor, že celková diverzita protist je daleko nižší ve srovnání s makroorganismy v důsledku globálního rozšíření většiny protist (Finlay a kol. 1996, Finlay 2002).

Zastánci ubikvitní teorie argumentují tím, že kosmopolitní rozšíření protist je způsobeno jejich malými rozměry a obrovskou velikostí populací, což umožňuje náhodné rozšiřování (Fenchel 1993, Finlay a kol. 1996, 2004). Tyto dva klíčové faktory, tj. velká populace a malá velikost organismů vysvětlují velké rozšíření volně žijících mikroskopických druhů na vhodné habitaty. V důsledku velké abundance protist je rozšiřování vzácně omezeno geografickými bariérami (Finlay 2002) a je řízeno náhodnými událostmi, jako je vítr, cirkulace oceánských proudů, transport na nohách vodních ptáků při migraci, mokrá kožešina zvířat, atd. (Fenchel a Finlay 2004). S tím je spojeno, že lokální vymírání u protist je vzácné. Pokles velikosti populace může být způsobeno biotickými interakcemi, jako je např. kompetice, predace, nebo fyziologickými podmínkami např. nedostatek vody, živin, teplota.

Další vliv na ubikvitní rozšíření protist je jejich malá velikost. Organismy menší než 1 mm mají tendenci být kosmopolitně rozšířeny (Fenchel a Finlay 2004). Ukazuje se, že hranice, kdy malá velikost organismu má ještě vliv na náhodné rozšiřování, je v rozmezí 1-10 mm (May 1988, Lawton 1998). Rychlost a míra rozšiřování je ovlivněna velikostí populace, proto abundantní druhy mají vyšší rychlost rozšiřování než méně početné populace. Velikost populace je v případě protist tak obrovská, že jen ze statistických důvodů je velmi pravděpodobné, že někteří jedinci z dané populace se dostanou na jiné místo (Finlay a kol. 2002, 2004). Vysoká pravděpodobnost rozšiřování neumožňuje izolaci a alopatriickou speciaci.

Většina protist má relativně nízkou globální druhovou diverzitu v důsledku kosmopolitního rozšíření většiny druhů bez existence endemických druhů. A proto také protista mají díky ubikvitnímu rozšíření vyšší lokální diverzitu než ostatní eukaryota. Naopak u makroorganismů je právě vlivem velkého počtu endemických druhů globální diverzita velká a lokální malá. Ty druhy, které jsou lokálně vzácné, jsou pravděpodobně vzácné i globálně a naopak druhy, které jsou lokálně abundantní, jsou hojné i globálně (Finlay a kol 2002).

Lokálně vzácní bývají převážně tzv. specialisti, kteří rostou v úzkém rozmezí ekologických faktorů jako je pH, teplota, dostupnost živin atd. Specialisti se většinou vyskytují jen na několika málo lokalitách a často v relativně malých populacích. Tyto charakteristiky obvykle vedou k závěru, že se jedná o endemické druhy. Naopak generalisti se vyznačují širokou ekologickou tolerancí a tím pádem jsou objevovány na více lokalitách, kde často tvoří větší populace než právě specialisti.

Ubikvitní teorii potvrzuje i několik studií provedených na různých skupinách protist, u kterých bylo prokázáno kosmopolitní rozšíření, například u zlativky rodu *Paraphysomonas* (Finlay a Clarke 1999), nebo u druhu *Micromonas pusilla* z třídy Prasinophyceae (Šlapeta a kol. 2006) a u obrněnky *Polarella glacialis* (Montresor a kol. 2003).

Zastánci umírněného ubikvitního modelu připouští, že velká část protist má kosmopolitní rozšíření, ale poukazují především na to, že i mikroskopické organismy mají biogeografii, a že geografické bariéry měly vliv na jejich rozšíření. Hlavním zastáncem umírněného ubikvitního modelu je Foissner (1999, 2006). Významnými argumenty pro umírněný ubikvitní model jsou „undersampling“, vliv člověka a vlajkové druhy protist s omezeným rozšířením.

„Undersampling“ se ukazuje být velkým problémem, který komplikuje získání odpovídajících dat o diverzitě a biogeografii protist. Ovlivněn je několika faktory, jednak malou velikostí protist, která ztěžuje provedení důkladného výzkumu. Dalším problémem je nedůkladné prozkoumání dané lokality, protože je sebrána obvykle pouze malá část z daného místa (např. jen několik mililitrů vody z rybníka). Při následném prohlédnutí vzorku se k determinaci používá světelný mikroskop a u některých skupin (např. Chrysophyceae) elektronový mikroskop, což občas vede k přehlédnutí vzácnějších druhů. Při malém počtu jedinců navíc občas dochází k nesprávnému určení druhů.

Dalším problémem při získávání přehledu o rozšíření protist je tvorba dormantních stádií. V důsledku tvorby dormantních stádií se často stává, že ani organismy typické pro daný habitat nejsou zaznamenány. To je způsobeno tím, že druhy jsou aktivní jen po určité době.

Cohan (2002) ukázal, že pomocí kultivace nelze získat méně než 10 % bakterií. A to vysvětluje, že ani použití různých způsobů kultivace protist nevede k získání méně početných druhů, a proto nelze získat ucelený přehled o diverzitě mikroorganismů (Foissner 2006, 2008).

Introdukce způsobená člověkem je dobře známa jak u rostlin a živočichů, tak i u protist, kde způsobuje zkreslené představy o rozšíření organismů. Foissner (1999, 2006)

ukázal na vliv člověka na současné rozšíření protist. Příkladem výskytu mikroorganismů na nepůvodních lokalitách je zavlečení velmi dobře rozpoznatelné řasy *Hydrodictyon* a rozsivky *Asterionella formosa* na Nový Zéland, kde tyto velmi rozpoznatelné řasy nebyly předtím spatřeny. Bylo to způsobeno dodáváním ryb a vodních rostlin z východní Asie (Kristiansen 1996). Dalším příkladem je vybudování kanálů, které měly vliv na rozšíření několika tropických a indopacifických druhů foraminifera a pravděpodobně i některých toxických obrněnek (Hallegraeff a Bolch 1992), které se dostaly do Středozemního moře přes Suezský průplav.

Foissner (2006) používá pro potvrzení názoru o omezeném rozšíření protist také tzv. vlajkové druhy. Jsou to druhy s nápadnou morfologií, u kterých přítomnost či absence ve vzorku může být lehce prokázána. Vlajkové druhy jsou častěji řasy než heterotrofní protista, protože řasy jsou svým zbarvením a tvarem často mnohem nápadnější než ostatní protista, a také se v minulosti jimi zabývalo mnohem více vědců. Jsou to například zelené řasy *Micrasterias hardyi* a *Staurastrum vistoriense*, nebo obrněnka *Prorocentrum foveolala* vyskytující se pouze v Austrálii (Tyler 1996).

Endemické druhy byly nalezeny u několika taxonů protist, u rozsivek rodu *Actinella* (Sabbe a kol. 2001) nebo rodu *Stauroneis* (Van de Vijver a kol. 2005). Dost často se stává, že určitý druh je ve skutečnosti komplexem několika druhů jako v případě nálevníku *Tetrahymena pyriformis*, kdy se jedná o komplex 25 druhů, přičemž některé druhy jsou endemické, např. *T. thermophila* (Nanney a kol. 1998, Nanney 2004). Podobným případem je obrněnka *Alexandrium tamarense*, u níž se rovněž jedná o komplex druhů, přičemž některé mají geograficky omezené rozšíření (John a kol. 2003).

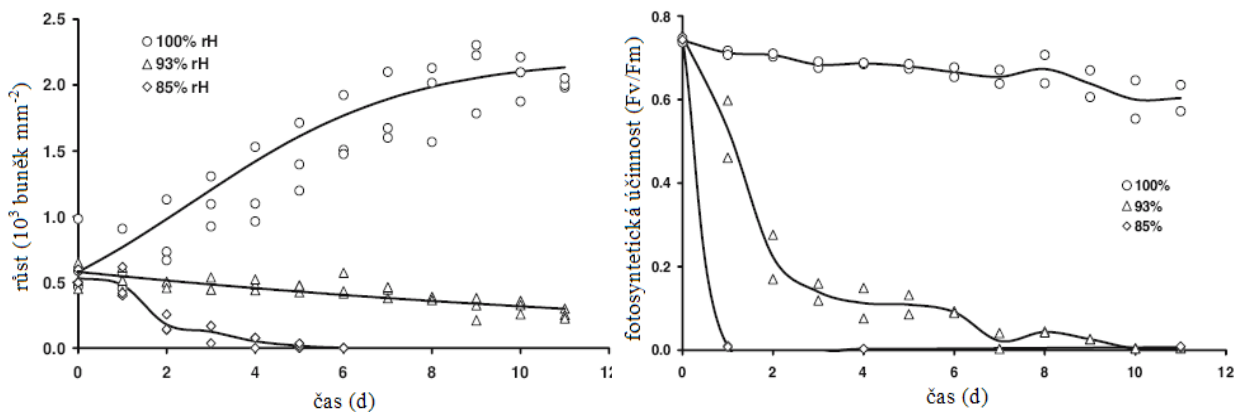
1.3 Substrátová specificita aeroterestrických řas

Aeroterestrické řasy jsou nalézány na celém světě. Vyskytují se v nejrůznějších prostředích, jako jsou extrémně suché, studené nebo teplé pouště, kde jsou často jedinými primárními producenty, dále pak na povrchu různých substrátů jako je půda, skála, na rostlinách, ale jsou nacházeny i v jeskyních, na sněhu, či na zvířatech. Většina aeroterestrických habitatů řas představuje extrémní prostředí charakteristické různě dlouhými obdobími s nedostatkem vody, nízkou nebo naopak vysokou teplotou a velkou intenzitou slunečního záření. V mnoha těchto habitatech navíc dochází ke fluktuaci výskytu

environmentálních faktorů. Vyrovnat se s těmito stresujícími situacemi vede terestrické řasy k vyvinutí specifických morfologických či fyziologických adaptací, nebo to vede k obsazení chráněnějších mikrohabitátů, ve kterých jsou podmínky příznivější. Nejdůležitější faktory, které ovlivňují výskyt společenstev řas, jsou světlo, vlhkost, teplota, dostupnost živin a pH (Hoffmann 1989).

Půdní společenstva jsou ovlivňována fluktuací úrovní vlhkosti, a proto půdní řasy jsou obecně adaptovány k přežívání období vysychání. Sezónní změny ve struktuře půdních řas jsou většinou kvantitativní, díky fluktuaci dostupnosti vody, zatímco druhové složení zůstává konstantní během roku (Metting 1981). Vliv pH na řasové společenstvo je často obtížné posoudit z důvodu časté korelace s ostatními faktory. Suché půdy jsou skoro vždy zásadité, naopak vlhké půdy jsou spíše kyselé (Shields a Durrell 1964). Lithofytické řasy žijí na nebo uvnitř kamenných substrátů, zahrnující i ty pod povrchem kamene. V odpovědi na extrémní ekologické podmínky a časté frekvence změn v prostředí jsou lithofytické řasy přizpůsobeny k tomu, že za vhodných podmínek jsou schopny rychle aktivovat metabolismus, naopak za nepříznivých ho dokáží vypnout. Metabolická aktivita je většinou limitována na krátké periody, kdy je přítomna vhodná kombinace teploty, světelné intenzity a vlhkosti, jako nejdůležitější faktor se ukazuje dostupnost vody. Proto porózní skála, která funguje jako past na vodu (Friedmann 1972), může mít vliv na rozšíření terestrických řas.

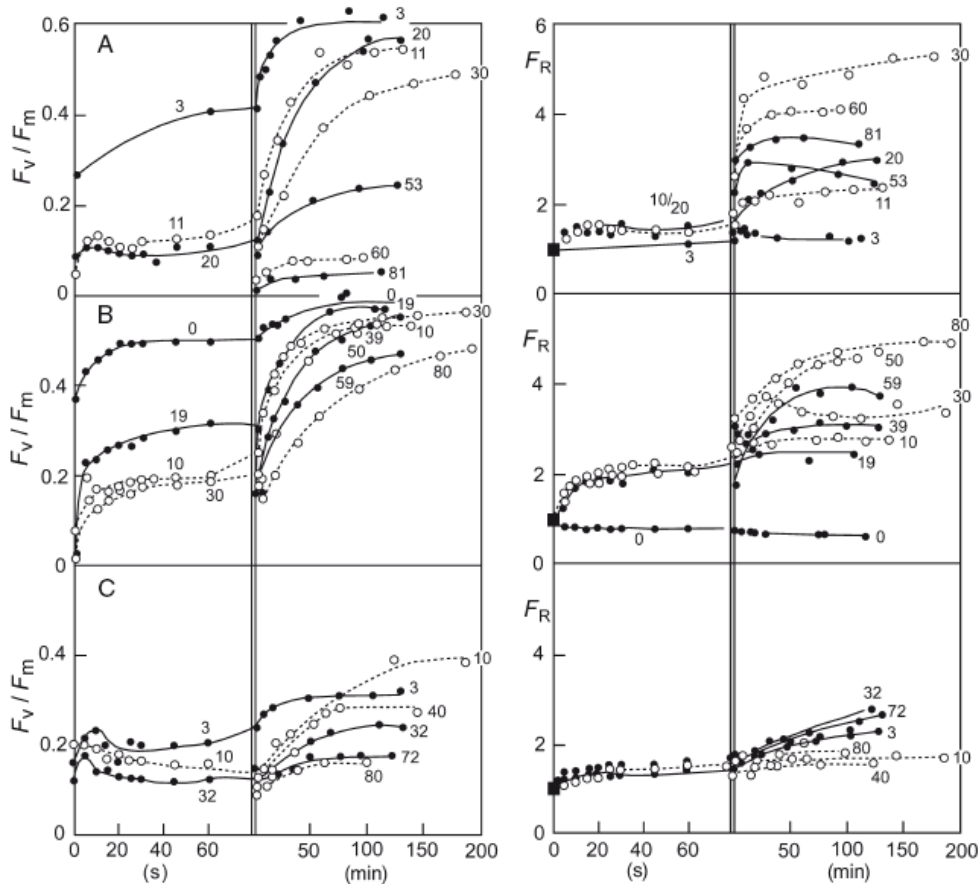
Fotosyntetická aktivita byla zkoumána na řasových koloniích na fasádě budovy s důrazem na změny v dostupnosti vody a vzdušné vlhkosti (Haubner 2006). Pozitivní růst a optimální fotosyntéza byly zaznamenány při 100 % relativní vlhkosti. Vzdušná vlhkost pod 93 % vedla k inhibici jak růstu, tak fotosyntézy (obr. 1). Všechny studované linie rostly mezi 1 a 30 °C s optimální rychlostí při 20 - 23 °C, indikující eurythermální vlastnosti. Data ukazují, že kapalná voda nebo 100 % vzdušná vlhkost jsou předpoklady pro optimální růst a fotosyntézu aeroterestrických mikrořas. Ačkoli i když vyschnou a jsou neaktivní, tyto mikroorganismy se dokáží rychle zotavit při náhlé dostupnosti vody, např. po dešti. Tyto fyziologické schopnosti dobře vysvětlují ekologický úspěch aeroterestrických řas vyskytujících se na člověkem vytvořených substrátech jako jsou fasády budov nebo střešní tašky v městských oblastech.



Obr. 1: Graf vlevo: hojnost (buněk mm^{-2}) se mění s časem (den) za různé relativní vzdušné vlhkosti u *Stichococcus* sp. ROS 55/3. Graf vpravo: fotosyntetická účinnost (Fv/Fm) se mění v čase za různé relativní vlhkosti u *Stichococcus* sp. ROS 55/3. Symboly představují jednotlivé hodnoty, křivky byly vytvořeny ze střední hodnoty, s výjimkou hodnoty ze 100 % relativní vzdušné vlhkosti.

Luttge a Budel (2009) zkoumal fyziologické vlastnosti dvou typů biofilmů, červeného rostoucího na hladké borce stromů a zeleného na hrubé borce stromů. Ve stejné oblasti je hrbolatá borka ovocných stromů (*Malus* - jabloň) převážně pokryta červenou nebo fialově hnědou vrstvou epifytických terestrických řas *Trentepohlia umbrina*. Naopak hladká borka lesních stromů (*Fagus sylvatica* L. – buk lesní, a *Acer* sp. - javor) je pokryta jasně zeleným biofilmem tvořeným zelenými řasami *Desmococcus*, *Apatococcus* a *Trebouxia* s několika buňkami *Coccomyxa*. Tyto řasy jsou tolerantní vůči vysychání. Po odebrání kůry s biofilmem byly vzorky uschovány v prostředí se suchým vzduchem a ve tmě po různě dlouhá období. Rychlost a stupeň zotavení závisely na délce času, po které řasové nárosty byly drženy v suchém vzduchu ve vysychajícím stavu. Lepší zotavení projevovaly vzorky se zeleným biofilmem, které dokázaly znovu fotosyntetizovat i po 80 dnech vysychání, což je výrazně lepší než pro červené nárosty, u kterých se prokázalo zotavení pouze po 30 – 40 dnech vysychání (obr. 2). Z toho vyplývá, že různý typ borky tvoří různé ekofyziologické niky, které mohou být osidlovány odlišnými řasami.

Peksa a Škaloud (2011) publikovali studii, v níž se zabývali fotobiontem rodu *Asterochloris* u lišejníků rodu *Lepraria* a *Stereocaulon* (Stereocaulaceae, Ascomycota). Fotobionti *Asterochloris* z konkrétních linií byly nalezeny a asociovány s taxonomicky různými, ale ekologicky stejnými lišejníky. Vystavení dešti a slunci se ukázalo jako nejvýznamnější environmentální faktor, který jasně rozdělil linie fotobionta *Asterochloris* na výskyt buď v ombrobofních nebo ombrofilních lišejnících, které byly klastrovány v kompletně odlišných liniích. Kromě toho dva taxony fotobionta byly odlišeny na základě jejich substrátových a klimatických preferencí. Tato studie ukazuje jasnou preferenci fotobionta k environmentálním podmínkám.



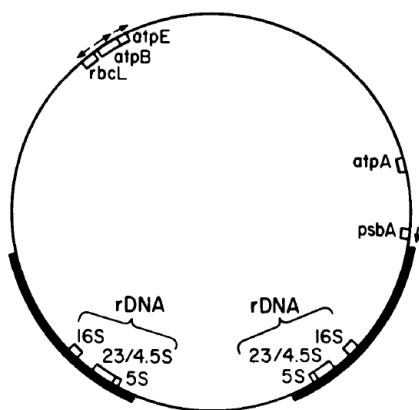
Obr. 2: Znovuoživující kinetika potenciálního kvantového výnosu PSII, F_v/F_m a základní fluorescence vyjádřená jako poměr F_R , to jest poměr kvocientu základní fluorescence vytvořené během opětovného zvlhčení ku základní fluorescenci naměřené v suchém stavu, pro (A) červenou borku, (B) zelenou borku, (C) zelenou borku, ze které byly odstraněny všechny řasy na začátku období vysychání. Všimněte si rozděleného měřítka úsečkami: krátkodobé zotavení (vlevo od úsečky) a dlouhodobé zotavení (vpravo). Čísla na křivkách udávají počet dnů, po které byly borky drženy v suchém prostředí.

Rindi a Guiry (2004) zkoumali společenstva řas ve městech v Evropě na starých zdech. Podle dominant byly rozlišeny dvě seskupení, kde dominovaly druhy s vláknitou stélkou: první společenstvo, v němž dominoval řád Prasiolales s rody *Rosenvingiella* sp. a *Prasiola* sp. a druhé seskupení s dominantou rodu *Klebsormidium*. Schéma rozšíření nejpočetnějších druhů ukázalo znatelný rozdíl mezi městy, ale nevýznamný rozdíl v zeměpisné šířce. Řasové nárosty ve městech byly buď prvního, nebo druhého typu, nikdy však obojího. Vliv klimatu na měřítku stovek kilometrů se považuje za nejdůležitější faktor určující relativní distribuci těchto společenstev. Společenstva Prasiolales jsou primárně asociována s deštivými a chladnými Atlantickými oblastmi Evropy, zatímco uskupení s dominantou *Klebsormidium* převládá v sušší kontinentální Evropě nebo mediteránu. Složení

těchto seskupení ukazuje extrémně limitující změnu na malém měřítku a nevýznamnou změnu v detekci mezi různými místy ve stejném místě z některých nejběžnějších druhů. Fyziologické atributy Prasiolales a *Klebsormidium* ve vztahu k různým klimatickým režimům jsou považovány za rozhodující faktory určující rozšíření těchto řas. Druhy rodu *Trentepohlia* vyskytující se v západním Irsku se liší v jejich preferencích pro určitý substrát, obvykle tvoří dobře vyvinuté populace pouze na určitém typu povrchu (cement pro *T. aurea* a *T. iolithus*, borka stromu pro *T. abietina*, vápenec pro *T. cf. umbrina*). Naopak *Printzina lagenifera* se vyskytuje na širokém rozsahu substrátů.

1.4 Molekulární marker *rbcL* (velká podjednotka RuBisCO)

Genom plastidu tvoří kruhová molekula DNA se strukturou obsahující dvě velké zdvojené oblasti se zpětnou orientací označované jako inverted repeat (IR) rozdělující kruh na velkou a malou oblast bez zpětné orientace (obr. 3). IR vždy zahrnuje ribosomální RNA geny a různý počet jiných genů. Průměrná velikost chloroplastové DNA je v průměru 120 - 160 kbp u bezcévných i u většiny vyšších rostlin (Green 2011), extrémem v tomto ohledu je *Floydiella terrestris* s 521 kbp (Brouard a kol. 2010). DNA obsahuje geny kódující 23S, 16S, 5S, a 4,5S ribosomální RNA (rRNA), několik tRNA a ribosomální proteiny. Dále pak geny kódující velkou podjednotku ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza (*rbcL*), α , β , ϵ a DCCD vázající proteolipidy podjednotky ATP syntázy (*atpA*, *atpB*, *atpE* a *atpH*), 32 kilodaltonový thylakoidní membránový protein (*psbA*), p700 chlorofyl a apoprotein a tři polypeptidy cytochrom b6-f komplex (Curtis a Clegg 1984). Přehled všech genů v plastidu je uveden v tabulce 1, převzaté z publikace Green (2011).



Obr. 3: Strukturní organizace typického chloroplastového genomu u vyšších rostlin. Zahrnuta je mapa pozice genu kódující velkou podjednotku ribulosa-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza (*rbcL*), α , β , ϵ podjednotka ATP syntézy (*atpA*, *atpB*, *atpE*), 32 kilodaltonový tylakoidní membránový protein (*psa*) a 23S, 16S, 5S a 4,5S ribozomální RNA geny. Zdvojené oblasti se zpětnou orientací jsou znázorněny tlustou čarou. Šipky ukazují směr transkripce.

Enzym ribulosa-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza (RuBisCO) je klíčovým enzymem v Calvinově cyklu při fixaci oxidu uhličitého do sacharidů během fotosyntézy u prokaryontních a eukaryotních autotrofních organismů. Další funkcí RuBisCO je katalýza prvního kroku ve fotorespiraci glykolu produkovaného z ribulosa-1,5-bisfosfátu a kyslíku (Yoshinaga a kol. 1988).

RuBisCO o molekulární hmotnosti 500 – 560 kilodaltonů je složeno z 8 velkých podjednotek (50000 – 55000 daltonů) s katalytickou aktivitou a 8 malých podjednotek (12000 – 16000 daltonů) s funkcí dosud neznámou. Velká podjednotka označovaná jako *rbcL* gen je kódován v chloroplastu, kde se vyskytuje v jedné kopii na plastid. Malá podjednotka *rbcS* gen je umístěn v jádře a je součástí malé multigení rodiny (Poulsen 1981, Curtis a Clegg 1984).

Gen *rbcL* je obvykle dlouhý 1428 párů bází a výhody používání tohoto genu ve fylogenetické analýze jsou: jednoduchá amplifikace pomocí PCR, většinou bez výskytu inzercí či delecí, absence intronů (výjimkou je ale rod *Euglena*, u kterého *rbcL* gen obsahuje 9 intrnů; Stiegler a kol. 1982), přiměřená délka, nízká substituční rychlost pro odvození fylogeneze na vyšší úrovni a dostupnost široké sady primerů. Ačkoliv se jistá variabilita v rychlosti evoluce *rbcL* sekvence u různých linií vyskytuje, nemá žádný vliv k rozluštění fylogenetických vztahů (Nickrent a Soltis 1995).

Velká podjednotka RuBisCO je vysoce konzervována v průběhu evoluce. Sekvence rostlin jsou v průměru z 86 - 94 % identické, naopak sinicová s rostlinnou sekvencí jsou ze 78 - 85 % totožné (Curtis a Clegg 1984). Gen *rbcL* obsahuje vysoce konzervativní úseky v enzymaticky aktivních oblastech kolem katalytické pozice lysin-175 (přibližně 67 pozic), největší variabilita se vyskytuje na karboxy a amino konci (Poulsen 1981). Kimura (1981)

odhadl podíl nukleotidové substituce pro první, druhou a třetí pozici v kodónu 0,036, 0,019, a 0,135 a pro synonymní substituci pak 0,116.

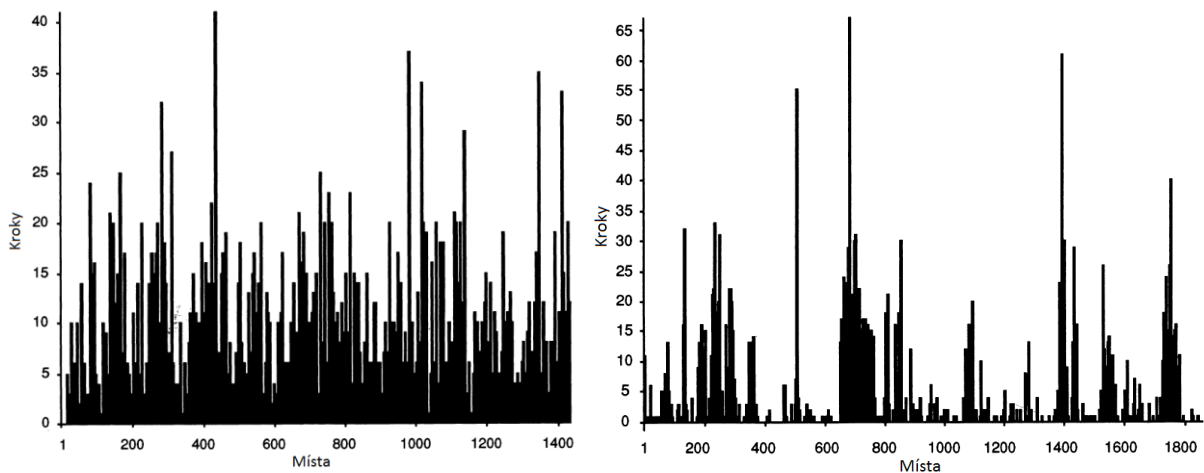
Funkce	Geny	Poznámky
RNA		
Ribosomální	<i>rns, ml, rns5</i>	4,5S rRNA pouze v rostlinách
Transferová	<i>trnA (ugc), trnC (gca), trnD (guc), trnE (uuc), trnF (gcc), trnG (gcc), trnG (ucc), trnH (gug), trnI (cau), trnI (gau), trnK (uuu), trnL (caa), trnL (uaa), trnM (cau), trnN (guu), trnP (ugg), trnQ (uug), trnR (acg), trnR (ccg), trnR (ucu), trnS (gru), trnS (uga), trnT (ugu), trnV (uac), trnW (cca), trnY (gua)</i>	
ostatní	<i>rnpB (ribonucleaza P), ffs RNA (SRP), ssrA (tmRNA)</i>	
Transkripce	<i>cbbX, rbcR, rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2, matK</i>	matK v zelené linii, cbbX a rbcR v červené linii
Translace	<i>tufA</i>	
Ribosomální proteiny		
malá podjednotka	<i>rps2, rps3, rps4, rps5, rps6, rps7, rps8, rps9, rps10, rps11, rps12, rps13, rps14, rps15, rps16, rps17, rps18, rps19, rps20</i>	všechny plastidy v červené linii
velká podjednotka	<i>rpl1, rpl2, rpl3, rpl4, rpl5, rpl6, rpl7, rpl8, rpl9, rpl10, rpl11, rpl12, rpl13, rpl14, rpl15, rpl16, rpl17, rpl18, rpl19, rpl20, rpl21, rpl22, rpl23, rpl24, rpl25, rpl26, rpl27, rpl28, rpl29, rpl30, rpl31, rpl32, rpl33, rpl34, rpl35, rpl36</i>	všechny plastidy červené linie a v některých zelených
Fotosyntéza		
ATP syntaza	<i>atpA, atpB, atpD, atpE, atpF, atpG, atpH, atpI</i>	všechny plastidy v červené linii
Fotosystém I	<i>psaA, psaB, psaC, psaD, psaE, psaF, psal, psaj, psal, psam</i>	psaD, E, F není v rostlinách
Fotosystém II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbi, psbj, psbk, psbl, psbn, psbt, psbv, psbx, psby, psbz, psb28</i>	
Cytochrom komplex	<i>petA, petB, petD, petF, petG, petL(ycf7), petM(ycf31), petN(ycf6)</i>	petF jaderný v rostlinách a v mnoha řasách
NADH dehydrogenaza	<i>ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>	pouze rostliny, mimo některých gymnosperms
Metabolismus	<i>accD, acpP, chlB, chlI, chlL, chlN, rbcL*, rbcS*, thiG, thiS, cysA</i>	accD pouze rostliny, *rbcL a rbcS mají odlišný původ v červené a zelené linii
Kontrola kvality proteinů	<i>clpC, clpP, dnaB, dnaK, ftsH(ycf25), groEL</i>	
Shluk, membránové vložení	<i>ccs1, ccsA, secA, secG, secY, sufB, sufC, tatC</i>	pouze červená linie

Tab. 1: Seznam základních plastidových genů.

Při studiu (Nickrent a Soltis 1995) krytosemenných rostlin bylo u *rbcL* genu 482 (33,6 %) z 1431 pozic bází fylogeneticky informativních, zatímco pro 18S rRNA to bylo 341 (18,4 %) z 1853 pozic. Párové srovnání u krytosemenných rostlin ukázalo, že *rbcL* je obvykle 3x variabilnější než 18S rDNA. Protože 18S rRNA oblast je přibližně o 400 párů bází delší než *rbcL*, poměr počtu fylogeneticky informativních míst na molekulu je okolo 1,4 x větší pro *rbcL* ve srovnání s 18S rDNA. Variabilita genu *rbcL* je pravidelněji rozmístěna podél celé délky genu více než u 18S rDNA, kde se střídají oblasti s vysokou variabilitou s oblastmi s extrémně konzervativními místy (obr. 4).

Příkladem použití *rbcL* genu pro fylogenetické vztahy je studie Rindi a kol. (2007). Systematika řádu Prasiolales byla zkoumána fylogeneticky. Byla založená na analýze *rbcL* a

18S rRNA genu pro reprezentování všech 4 rodů současně zahrnutých do tohoto řádu (*Prasiococcus*, *Prasiola*, *Prasiolopsis*, *Rosenvingiella*). Gen *rbcL* měl větší sekvenční divergenci než 18S rRNA gen a byl užitečnější pro fylogenetické odvození v řádech rodů a druhů. Ve fylogenezi založené na *rbcL* genu byly objeveny tři hlavní linie *Prasiola*, *Prasiolopsis* a *Rosenvingiella*.



Obr. 4: Histogram variability u *rbcL* (vlevo). Počet kroků (osa y) byl odvozen z *rbcL* stromu s intervaly šířky (osa x) nastavené pro čtyři báze. Variabilita je rozmístěna relativně rovnoměrně po celé délce 1431 míst molekuly. Histogram variability u 18S rDNA (vpravo). Počet kroků (osa y) byl odvozen z 18S rDNA stromu s intervaly šířky (osa x) nastavené pro čtyři báze. Variabilní oblasti jsou koncentrovány ve variabilních doménách a jsou rozděleny extrémně konzervovanými místy po celé délce 1853 míst molekuly.

2. Materiál a metody

2.1 Odběr vzorků

Pro studium biogeografie aeroterestrické zelené řasy *Klebsormidium* byly odebrány směsné vzorky z lokalit s výskytem smíšených lesů v mírném pásu severní polokoule. Celkem bylo zanalyzováno 6 odběrů z 3 kontinentů (2 z Evropy, 3 ze Severní Ameriky a 1 z Asie), (obr. 5). Na každé lokalitě o rozloze přibližně jednoho až tří kilometrů čtverečních byl odebrán směsný vzorek, který obsahoval tři typy substrátů a to kámen, borku stromu a půdu. Jednotlivý substrát byl na dané lokalitě odebrán pomocí sterilního skalpelu desetkrát, kdy mezi odběrovými místy byly minimálně 50 metrové rozestupy. Odběr materiálu na borce byl proveden přibližně jeden metr nad zemí ze všech světových stran, z kamene byl vždy seškrábnut pomocí sterilního skalpelu viditelný zelený biofilm a vzorek z půdy byl odebrán z vrchní vrstvy asi 0 až 0,5 cm. Jednotlivé odběry byly provedeny mezi roky 2009 až 2011. Kristýna Hrčková provedla odběry v Severní Americe v Ohio a v Connecticutu i s následným zpracováním odběrů, zahrnující kultivaci a sekvenaci. Celkem mi poskytla 44 sekvencí (22 z Ohia a 22 z Connecticutu).

2.2 Charakteristiky odběrových míst

2.2.1 Česká republika

Vzorky z České republiky byly sbírány na jaře 2009 v Českém Středohoří, v Dražanském údolí, na Šumavě, v Krkonoších a v Českém Švýcarsku. Meteorologická data jsou vztažena pro Prahu (50° s. š. 14° v. d.). Průměrná teplota a srážky v lednu jsou -1,3 °C, 25,7 mm a v červenci 19,3 °C, 81,0 mm. Roční průměrná teplota 9,6 °C a roční úhrn srážek 527,7 mm.

2.2.2 Velká Británie - Wales

Lokality Merthyr Tydfil, Glynneath, Brecon a okolí přehrady Talybont, na kterých byly sbírány vzorky, se nacházejí v jižním Walesu asi 40 km severně od Cardiffu. Odběr

proběhl v dubnu 2011. Meteorologická data pro tuto oblast pocházejí ze stanice Cardiff (51° s. š. 3° z. d.). Průměrná teplota a srážky v lednu jsou 4,5 °C, 90,7 mm a pro červenec to jsou pak hodnoty 16,0 °C a 69,3 mm. Roční průměrná teplota 9,9 °C a roční úhrn srážek 919,9 mm.

2.2.3 Japonsko – Nikko

V okolí města Nikko (36° s. š. 139° v. d.) byl proveden odběr na jaře 2009, kde průměrná teplota v lednu je -4,5 °C, a srážkový úhrn 22,7 mm a v červenci 17,6 °C, 174,0 mm. Průměrná roční teplota 6,7 °C a průměrné roční srážky 1178,1 mm.

2.2.4 USA: Washington – Seattle

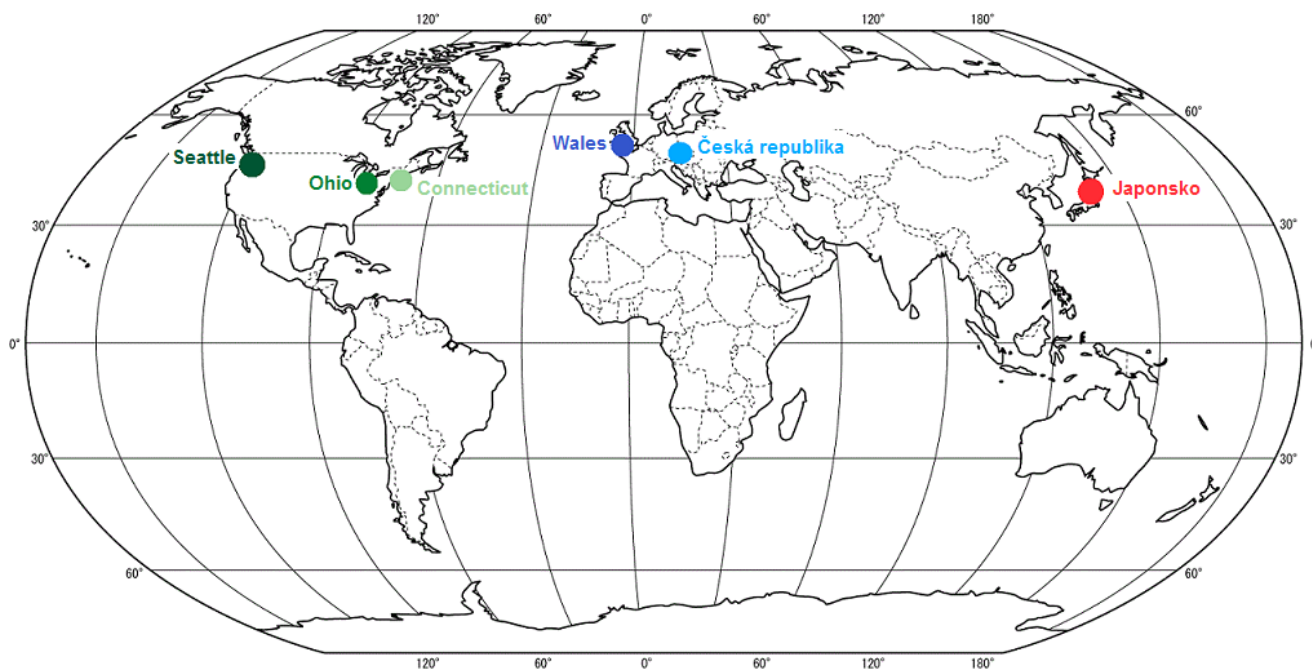
Odběr vzorků na lokalitách National Forest Park a Nilkenson v okolí Seattlu proběhl v červenci 2011. Meteorologická data pro Seattle (47° s. š. 122° z. d.), jsou: průměrná teplota a srážky v lednu 5,1 °C, 137,4 mm a v červenci 18,5 °C, 22,5 mm. Průměrná roční teplota 11,5 °C a roční úhrn srážek 977,1 mm.

2.2.5 USA: Ohio – Cleveland

Vzorky byly odebrány na podzim 2009 v okolí města Cleveland. Průměrná teplota a srážky v Clevelandu (41° s. š. 81° z. d.) v lednu jsou -4,0 °C, 64,2 mm a v červenci je průměrná teplota 22,1 °C a srážkový úhrn 91,3 mm. Průměrná roční teplota 9,7 °C a průměrný úhrn srážek 942,8 mm.

2.2.6 USA: Connecticut - Waterbury

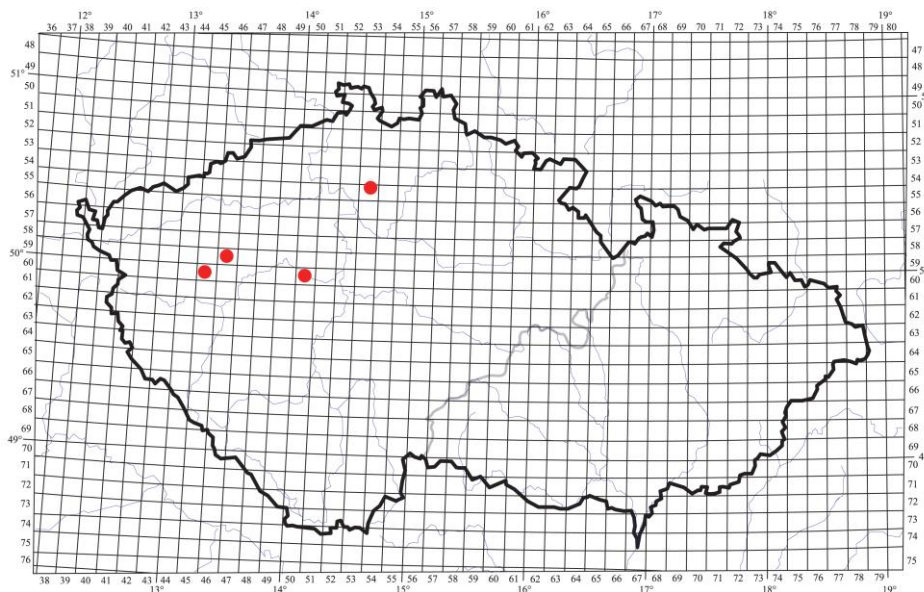
Ve státě Connecticut byly odebrány na podzim 2009 vzorky z okolí města Waterbury (41° s. š. 73° z. d.). Pro zdejší okolí jsou průměrné lednové teploty -1,7 °C, se srážkovým úhrnem 79,4 mm a červencové hodnoty jsou 23,1 °C, 90,6 mm. Průměrná teplota 10,7 °C a průměrné roční srážky 1257,0 mm.



Obr. 5: Odběrová místa s vyznačenou polohou na mapě světa.

2.3 Vzorčky pro substrátovou specifitu

Pro studium substrátové specifity byly vybrány čtyři typy hornin: vápenec, pískovec, čedič a žula. Tyto horniny byly vybrány jednak z důvodu, že jak žula, tak i pískovec mají nižší hodnotu pH než čedič a vápenec, to znamená, že mají pH mírně kyselé až neutrální a čedič a vápenec mají pH zásadité. Druhým důvodem výběru hornin je jejich rozdílná pórovitost a nasákavost. Pískovec a vápenec mají větší pórovitost a nasákavost než žula a čedič. Vzorčky byly odebrány na čtyřech lokalitách: kopec Vladař u Žlutic, kopec u obce Ležky, okolí Koněpruských jeskyní v Českém Krasu a oblast okolo vesnice Houska na Kokořínsku (obr. 6) na území České republiky na jaře 2011.



Obr. 6: Mapa České republiky s vyznačenými odběrovými místy.

2.3.1 Čedič

Vzorky byly odebrány na kopci Vladař. Pro tuto oblast platí tyto klimatické údaje. V lednu je průměrná teplota $-2,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ s průměrnými srážkami 34 mm, pro červenec je to pak $16,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, 68 mm, roční hodnoty jsou $7,0 - 7,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 493-522mm srážek. Vlastnosti čediče: objemová hmotnost $2900 - 3000\text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, nasákavost $0 - 2\%$, pórovitost 0% .

2.3.2 Žula

Odběr vzorků byl proveden u obce Ležky. Pro tuto oblast platí tyto klimatické údaje. V lednu je průměrná teplota $-2,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ s průměrnými srážkami 24 mm, v červenci $17,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 69 mm, roční $7,0 - 7,6\text{ }^{\circ}\text{C}$; 493-522mm. Vlastnosti žuly: objemová hmotnost $2620 - 2685\text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, nasákavost $0,2 - 0,4\%$, pórovitost $0,6 - 1\%$.

2.3.3 Vápenec

Vzorky z vápence byly odebrány v Českém Krasu u Koněpruských jeskyň. Roční teploty $7,1 - 8,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, srážky 480 - 617 mm. Vlastnosti vápence: objemová hmotnost $2600\text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, nasákavost $0,8 - 3,3\%$, pórovitost $16 - 30\%$.

2.3.4 Pískovec

Pro odběr vzorku z pískovce byla zvolena lokalita na Kokořínsku u obce Houska. Roční teploty 7,7 -8,1 °C, srážky 499-655 mm. Vlastnosti: objemová hmotnost 1993 – 2080 kg.m⁻³, nasákavost 4,5 – 6,5 %, pórovitost 13,6 – 26 %.

2.4 Měření pH hornin

Pro studium substrátové specifity jsem měřil pH pro každou horninu, protože nejsou dostupná data o hodnotách pH v důsledku různého podílu obsahu jednotlivých složek v horninách. Pro měření pH jsem použil pH metr WTW 330/SET1 s elektrodou SenTix Sur s plochou membránou. Pro každou horninu jsem provedl 10 měření.

2.5 Kultivace vzorků

Pro získání kmenů *Klebsormidium* ze vzorků pro studium biogeografie a substrátové specifity byla použita metoda kultivace na Petriho miskách (s průměrem 10 – 12 cm) s BBM médiem (Bischoff a Bold 1963) obohaceným o půdní dekolt a agar. Z jednotlivých vzorků jsem odebral přibližně 0,2 g substrátu, smíchal jsem s 10 ml destilované vody a skleněnými kuličkami o průměru 0,5 mm (Sigma). To jsem nechal 8-10 minut promixovat na vortexu (Vortex Genie 2, Scientific Industries). Ze vzniklé suspenze jsem odebral asi 250 µl a rozprostřel na Petriho misku s BBM médiem, to jsem pro každý vzorek provedl dvakrát. Kultivace probíhala za laboratorní teploty (~ 22 °C) a za denního osvětlení.

2.6 Molekulární část

Po 4 až 6 týdnech kultivace byly pod světelným mikroskopem Olympus CX31 vyizolovány jednotlivé narostlé mikrokolonie za použití metody „single cell“ PCR (Duff et al. 2008, Auinger a kol. 2008), modifikované o jednoduchou izolaci DNA pomocí InstaGene matrix (BioRad). Pomocí sterilní jehly byly jednotlivé kolonie vloženy přímo do 2 ml mikrozkušavky z víčkem (Eppendorf) se 100 µl InstaGene matrix pufru a 2 - 3 skleněnými kuličkami s průměrem 1,5 mm (Sigma). Mikrozkušavky jsem dal do mlýnku na drcení rostlinného materiálu Retsch MM400, kde po dobu 6 minut při 30 frekvencích za sekundu docházelo k rozbíjení buněčných stěn řasy *Klebsormidium*. Následně jsem dal zkušavky s řasovou suspenzí do thermomixeru (Termoblok Thermomixer compact, Eppendorf) na

30 minut při teplotě 56 °C a míchání 700 rpm. Potom jsem vyjmul zkumavky a vortexoval přibližně 10 s na vortexu (Vortex Genie 2, Scientific Industries). Opět jsem vložil zkumavky do thermomixeru, a to na 8 minut při 100 °C a pak vortexoval 10 s. Nakonec jsem miktozkumavky stočil na centrifuze (Centrifuga Centrifuge 5415D, Eppendorf) 2 minuty při 12000 otáčkách.m⁻¹ (rpm). Vyizolovaná DNA byla uchovávána při -20 °C. Pokaždé bylo vyizolováno 20 kmenů *Klebsormidium* na lokalitu. Jako molekulární marker byl zvolen *rbcL* (velká podjednotka RuBisCO), který tvoří podobnou topologii fylogenetického stromu jako marker ITS (Rindi a kol. 2011), ale je variabilnější a tudíž přináší více genetické informace. Koncentrace vyizolované DNA a PCR produktu byla naměřena na přístroji Nanodrop 1000 spectrophotometer, Thermo scientific. Pro PCR reakci jsem naředit DNA vzorky destilovanou vodou MilliQ na 5 ng/μl. Vyizolovaná DNA byla amplifikována pomocí polymerázy AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied biosystems) a byly použity nově navržené primery: forward primer KF590 (sekvence GATGAAAACGTAAACTCTCAGC) a reverse primer KR2 (sekvence GGTTGCCTTCGCGAGCTA) Master mix (reakční směs) pro PCR je uvedena v tab. 2. PCR reakce proběhla v následném optimalizovaném cyklu: 1. krok iniciální denaturace 95°C 2 min, 2. krok denaturace 94°C 1 min, 3. krok annealing 47°C 1 min, 4. krok elongace 72°C 1 min 30 s, 2. až 4. krok proběhl v 37 cyklech a 5. krok finální elongace 72°C 8 min. K amplifikaci úseku DNA byl použit cycler Touchgene Gradient, Techne.

složka	μl na 1 vzorek
polymeráza	0,2
MgCl ₂	2,0
pufř	2,0
voda	13,9
dNTP	0,4
forward primer	0,3
reverse primer	0,3
DNA	1,0

Tab. 2: PCR reakční směs

Pro vizualizaci amplifikovaných úseků DNA jsem použil elektroforézu s 1 % TBE gelem s etidiumbromidem při napětí 100V po dobu 15 minut. Jednotlivé PCR produkty byly přečištěny pomocí kitu Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit (Genomed) nebo pomocí octanu. Sekvenační data byla získána ve firmě Macrogen Ltd. (Seoul, South Korea) na sekvenátoru ABI3730XL.

2.7 Fylogenetické analýzy

Analýza polymorfních míst byla provedena programem DnaSP verze 5.10 (Librado a Rozas 2009). Pro úpravu sekvencí *rbcL* genu byl použit program SeqAssem (Hepperle 2004) a následný alignment byl proveden pomocí algoritmu ClustalW (Thompson et al. 1994) programem MEGA 5.05 (Tamura et al. 2011). V tomto programu byla také provedena analýza genetické vzdálenosti uvnitř linií a mezi liniemi pomocí dvouparametrového Kimura modelu. Fylogenetický nezakořeněný strom byl vytvořen pomocí programu Mr.Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck a Ronquist 2001) metodou Bayesovy inference (BI). Fylogenetické vztahy byly založeny na Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML). MP byla provedena použitím programu PAUP 4.0b10 (Swofford 2002), ML analýza byla vypočtena v programu GARLI (Zwickl 2006, unpublished Ph.D. dissertation). Parametry substitučních modelů byly získány za použití programu PAUP/Mr.Modeltest 2.3 (Nylander 2004). Nakonec, pro vytvoření haplotypové sítě pro analýzu geografie kmenů, byl použit program TCS 1.21 (Clement a kol. 2000). Haplotypová síť byla vytvořena na základě haplotypového párového rozdílu a s 95 % limitem propojení.

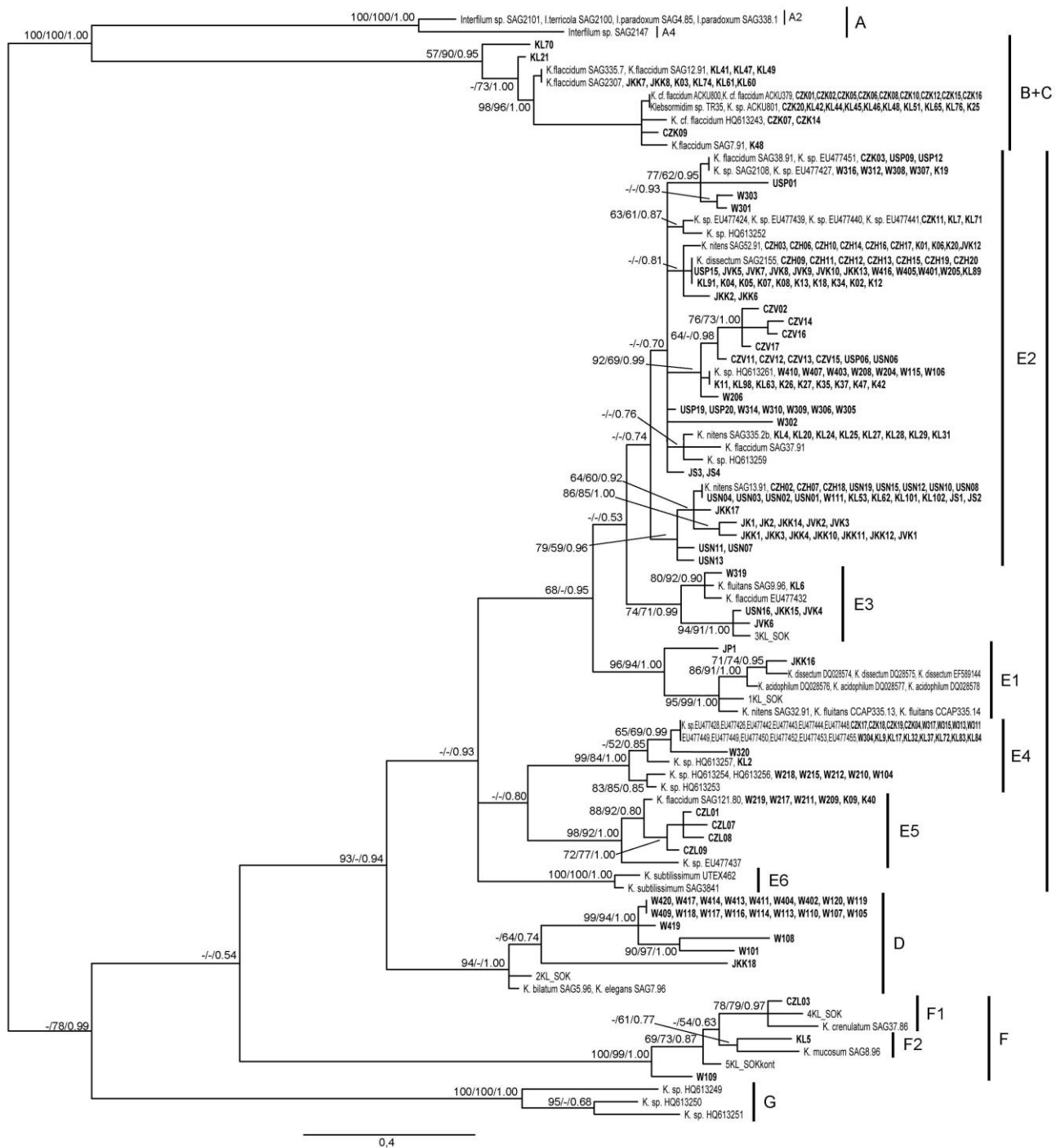
Bootstrapová podpora a posteriorní pravděpodobnost byla vysvětlována jako slabá (< 50 %), střední (pro BI 50 – 94 %, pro ML a MP 50 – 79 %) a vysoká (pro BI > 94 %, pro ML a MP > 79 %).

3. Výsledky

3.1 Diverzita

Celkem bylo použito 306 sekvencí, z toho 234 bylo získáno během této studie (187 bylo získáno při studii biogeografie a 47 při zjištění substrátové specificity) a 72 sekvencí pochází z GenBanku (příloha taulka 1). Fylogenetická analýza byla provedena na chloroplastovém markeru *rbcL* (velká podjednotka RuBisCO) na 606 bp dlouhém úseku. Z 606 bp bylo konstantních znaků 438 (72,3 %), parsimonně informativních znaků bylo 148 (24,4 %) a parsimonně neinformativních bylo 20 (3,3 %). Alignment obsahoval 79 unikátních sekvencí, z toho 30 sekvencí představovalo více než jedna sekvence a 49 sekvencí (19 pocházelo z GenBanku a 30 představovalo nové sekvence) bylo zastoupeno pouze jednou sekvencí. Na základě alignmentu byl vytvořen fylogram Bayesovou interferencí (BI), kdy bylo získáno sedm hlavních supercladů (označené písmeny A, B, C, D, E, F, G) se slabou až vysokou podporou (obr. 7). Bootstrapová podpora byla spočítána metodou maximum likelihood (ML) a maximum parsimony (MP). U některých linií byla podpora vysoká až střední, ale u většiny linií byla podpora slabá. Označení linií odpovídá studii Rindi a kol. (2011). Nově získané sekvence se ve fylogenetickém stromu nacházely ve většině supercladů kromě A a G. Superclade A byl tvořen rodem *Interfilum* a superclade G byl tvořen genotypy *Klebsormidium* pocházejícími z biologických půdních krust nebo z pouští. U supercladu E bylo rozpoznáno šest linií (označených E1, E2, E3, E4, E5, E6) se střední až vysokou podporou BI, ale často slabou MP a ML podporou. Nové sekvence v tomto supercladu padly do všech linií kromě linie E6, která byla tvořena sekvencemi z druhu *K. subtilissimum*.

Průměrné genetické vzdálenosti uvnitř linií a mezi liniemi, vypočtené pomocí dvouparametrového Kimura modelu, ukazují, že největší hodnota průměrné genetické vzdálenosti uvnitř linií byla zjištěna u supercladu G (0,034), následována liniemi D, A a B +C (tab. 3). Průměrná genetická vzdálenost mezi liniemi byla v rozsahu 0,022 až 0,168.



Obr. 7: Fylogenetický strom vytvořený Bayesovou analýzou ze všech *rbcL* sekvencí rodu *Klebsormidium*, s vyznačenou bootstrapovou podporou (BP) a Bayesovou posteriorní pravděpodobností (PP) na nodech. Zleva do prava hodnoty podpor odpovídají maximum parsimony BP, maximum likelihood BP a Bayesova PP. BP menší než 50 % a PP menší než 0.5 nejsou vyznačeny.

	A	BC	D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	F	G
A	0,031										
BC	0,143	0,020									
D	0,129	0,168	0,032								
E1	0,143	0,168	0,069	0,008							
E2	0,137	0,162	0,062	0,022	0,015						
E3	0,133	0,154	0,067	0,025	0,029	0,013					
E4	0,145	0,152	0,072	0,045	0,052	0,050	0,012				
E5	0,144	0,166	0,081	0,047	0,054	0,055	0,048	0,012			
E6	0,141	0,163	0,074	0,050	0,050	0,052	0,049	0,053	0,005		
F	0,163	0,158	0,135	0,140	0,134	0,137	0,130	0,136	0,139	0,016	
G	0,158	0,165	0,132	0,119	0,114	0,115	0,129	0,121	0,128	0,152	0,034

Tab. 3: Průměrné genetické vzdálenosti uvnitř linií a mezi liniemi vypočtené pomocí dvouparametrového Kimura modelu. Na diagonále jsou průměrné genetické vzdálenosti uvnitř linií a pod diagonálou jsou průměrné genetické vzdálenosti mezi liniemi.

3.2 Biogeografie

V rámci studie biogeografie bylo celkem získáno 187 *rbcL* sekvencí ze tří kontinentů. Ze Severní Ameriky jich bylo 65 (Seattle 21, Ohio 22, Connecticut 22) z Evropy 88 (Wales 63, Česká republika 25) a z Asie 34 (Japonsko 34). Alignment byl vytvořen na základě 44 unikátních sekvencí, o celkové délce 606 bp - z toho bylo 440 (72,6 %) bp konstantních, 143 (23,6 %) bp bylo parsimonně informativních a 23 (3,8 %) bp parsimonně neinformativních.

Bayesovskou analýzou *rbcL* sekvencí (obr. 8) byly získány čtyři superclady (označeny jako B + C, D, E, F), které většinou získaly střední až vysokou podporu. Výjimkou byla linie E, která získala střední Bayesovskou PP podporu a slabou ML a MP bootstrapovou podporu. Superclade E obsahoval pět linií se slabou až střední podporou označených E1, E2, E3, E4 a E5. Toto označení odpovídá popisu linií z recentní studie zabývající rodem *Klebsormidium* a rodem *Interfilum* (Rindi a kol. 2011), ve které byly fylogenetické vztahy založeny na dvou molekulárních markerech *rbcL* a ITS.

Superlinie B a C se ukázaly být na základě získaných sekvencí polyfyletickou linií, a proto byly souhrnně označeny jako superclade B + C. Superclade B + C je kosmopolitní linie, obsahující kmeny převážně ze Severní Ameriky (76,2 %). Kmeny z Evropy a Asie tvořily menšinu (14,3 % z Evropy, 9,5 % z Asie).

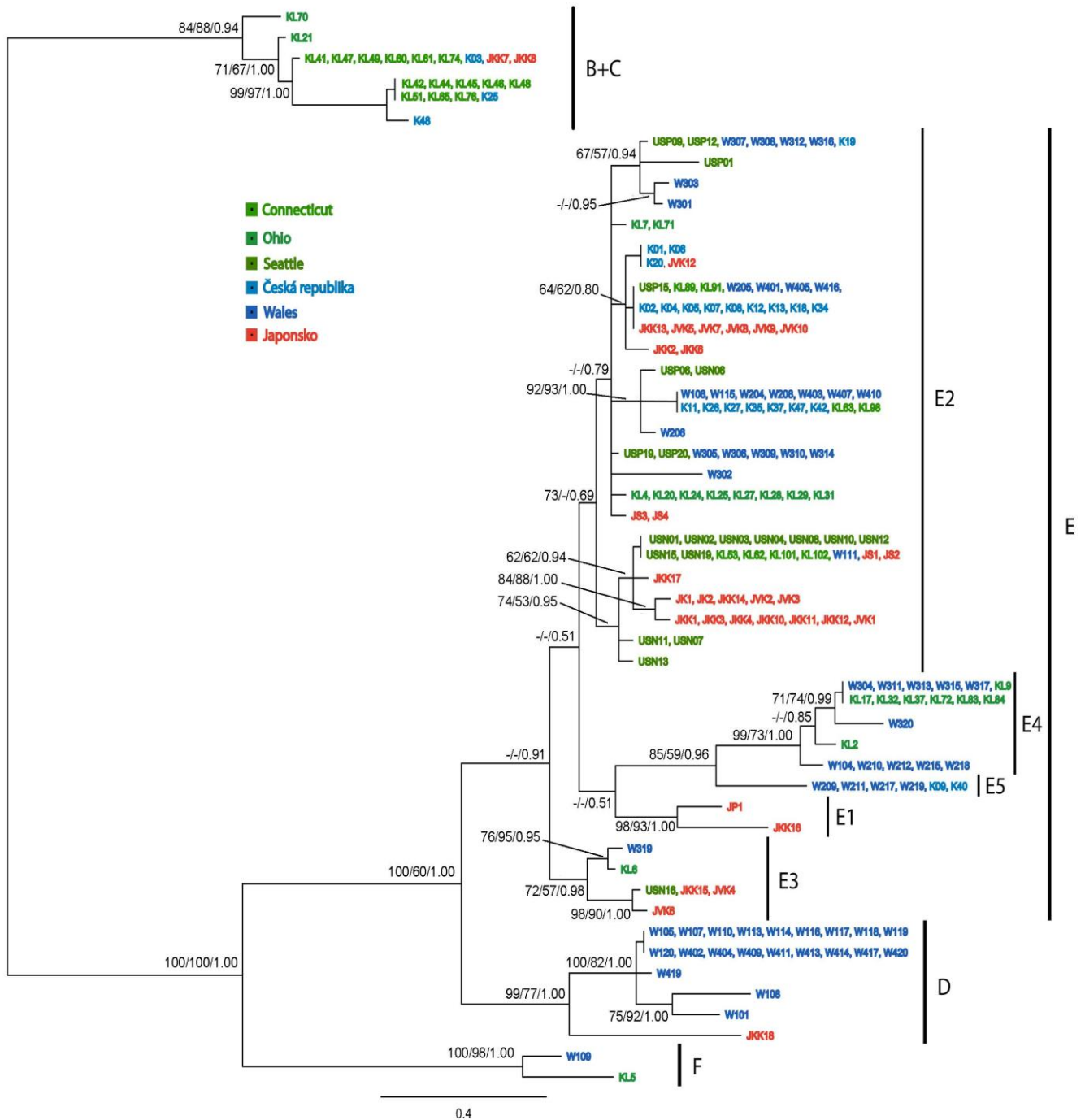
Superclady D a E byly rozpoznány jako sesterské linie se střední až vysokou podporou. Superlinie D se ukazuje být geograficky omezena na oblast západní Evropy, kdy 95,5 % kmenů pocházelo z jižního Walesu, a jen jeden kmen byl získán z Asie z Japonska. Navíc, jak ukazuje haplotypová síť, nejedná se o stejné holotypy. Mezi haplotypy z Walesu a

haplotypem z Japonska bylo rozpoznáno 28 nukleotidových záměn, a jejich celková podobnost tak dosahuje pouze 95,5 %.

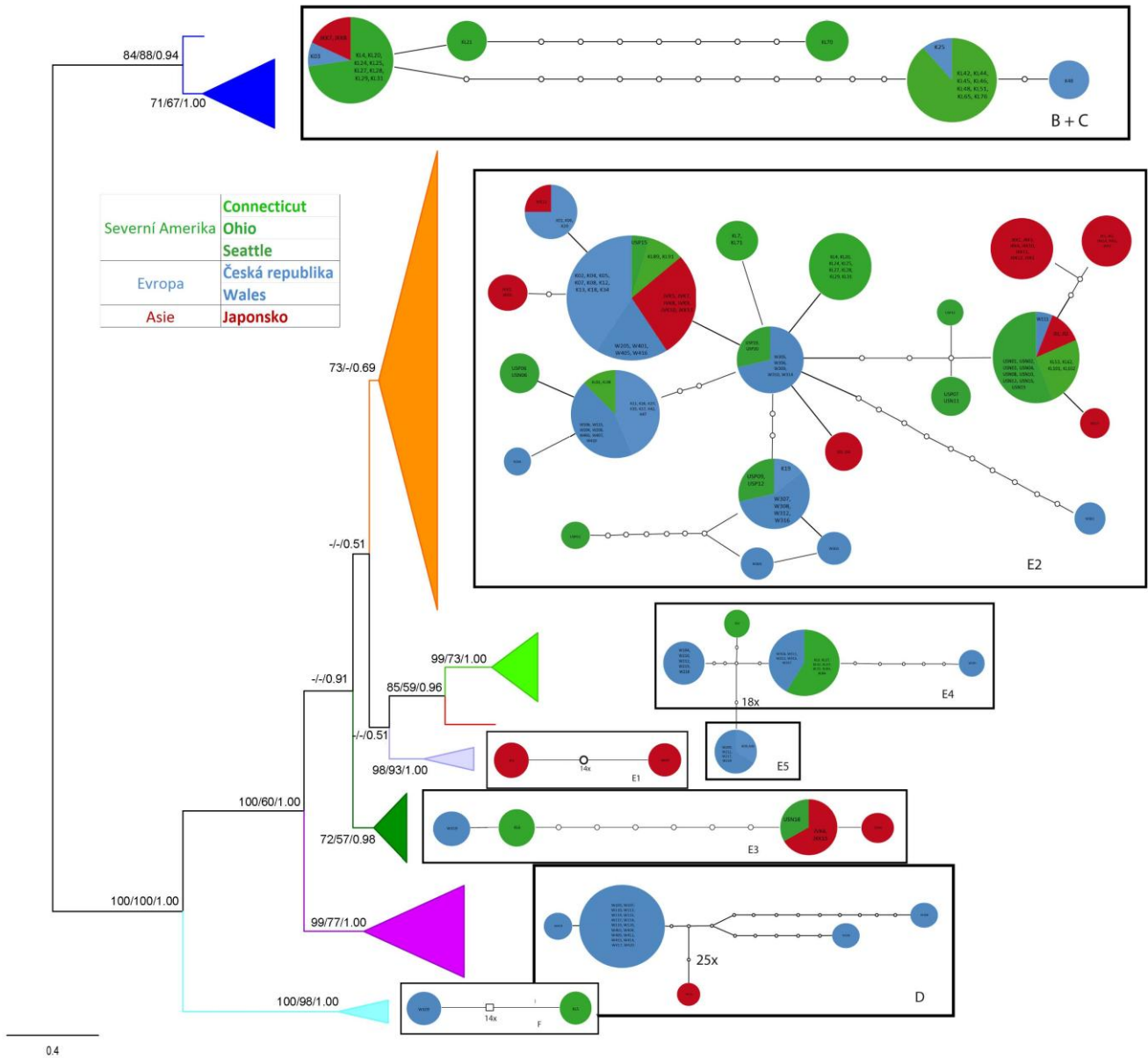
Superclade E, mající střední až slabou podporu, byla rozpoznána jako vysoce diverzifikovaná a početná linie s kosmopolitním rozšířením ve smíšených lesích severní polokoule. Celkem bylo do této linie umístěno 142 ze 187 sekvencí, což je 76 % všech kmenů získaných pro studium biogeografie. Z toho 33,8 % pochází ze Severní Ameriky, 44,4 % z Evropy a 21,8 % z Asie. Analýzou bylo rozpoznáno pět vnitřních linií E1, E2, E3, E4 a E5. Linie E1 je tvořena pouze dvěma kmeny pocházejícími z Asie. Linie E1 je charakterizována jako sladkovodní, s preferencí kyselých habitatů (Rindi a kol. 2011), proto je počet sekvencí tak malý. Linie E2 je kosmopolitní a dominantní linií ve smíšených lesích severní polokoule. Zastoupení kmenů z jednotlivých kontinentů (Severní Amerika 34,5 %, Evropa 41,8 %, Asie 23,6 %) je podobné jako u celého supercladu E. Linie E3 je ubikvitní. Tato linie obsahuje 6 kmenů, které byly nalezeny na všech třech kontinentech (S. Amerika 33,3 %, Evropa 16,7 %, Asie 50 %). Linie E4 a E5 jsou sesterské linie se střední až vysokou podporou. Do linie E4 patří kmeny ze Severní Ameriky (57,9 %) a Evropy (42,1 %). Nebyl nalezen žádný kmen z Asie, který by patřil do této linie. Linie E5 byla v této studii tvořena pouze jedním genotypem pocházejícím pouze z Evropy (byl nalezen na obou studovaných místech).

Superclade F byl tvořen pouze dvěma kmeny, pocházejícími z Evropy a Severní Ameriky.

U stromu vytvořeného Bayesovskou analýzou byly větve sloučeny tak, aby přehledně zobrazily vzájemnou příbuznost a diverzitu linií (B+C, D, E1, E2, E3, E4, E5, F). Pro účely detailního znázornění biogeografického pattern byly navíc pro každou linii vytvořeny haplotypové sítě na základě úplného datasetu všech získaných sekvencí (obr. 9). Celkem bylo získáno 44 haplotypů z toho 23 haplotypů bylo nalezeno pouze jednou a 21 haplotypů bylo zaznamenáno vícekrát (2krát až 22krát). Jednotlivé haplotypy jsou znázorněny pomocí výšečových grafů, kdy velikost grafu představuje počet shodných haplotypů. Na spojnici mezi jednotlivými haplotypy jsou znázorněny body představující nukleotidové záměny. Nejvíce haplotypů (21) bylo nalezeno v linii E2, nejméně pak v liniích E5 (1), E1 (2) a F (2).



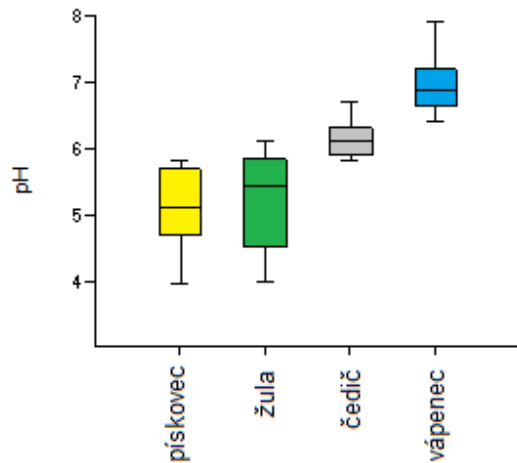
Obr. 8: Fylogenetický strom vytvořený Bayesovou analýzou ze všech *rbcL* sekvencí získaných pro studium biogeografie rodu *Klebsormidium*, s vyznačenou bootstrapovou podporou (BP) a Bayesovou posteriorní pravděpodobností (PP) na nodech. Zleva do prava hodnoty podpor odpovídají maximum parsimony BP, maximum likelihood BP a Bayesova PP. BP menší než 50 % a PP menší než 0.5 nejsou vyznačeny.



Obr. 9: Fylogenetický strom vytvořený Bayesovou analýzou ze všech *rbcL* sekvencí získaných při studiu biogeografie rodu *Klebsormidium*, s haplotypovými sítěmi. Na nodech je vyznačena bootstrapová podpora (BP) a Bayesova posteriorní pravděpodobnost (PP). Zleva do prava hodnoty podpor odpovídají maximum parsimony BP, maximum likelihood BP a Bayesova PP. BP menší než 50 % a PP menší než 0.5 nejsou vyznačeny.

3.3 Substrátová specificita

Naměřené hodnoty pH jednotlivých odebraných substrátů jsou znázorněny v obr. 10. Průměrné naměřené pH pískovce bylo 5, žuly 5,2, čediče 6,2 a vápence 7. Z naměřených hodnot je patrné, že pískovec a žula měly mnohem nižší pH než čedič a vápenec.

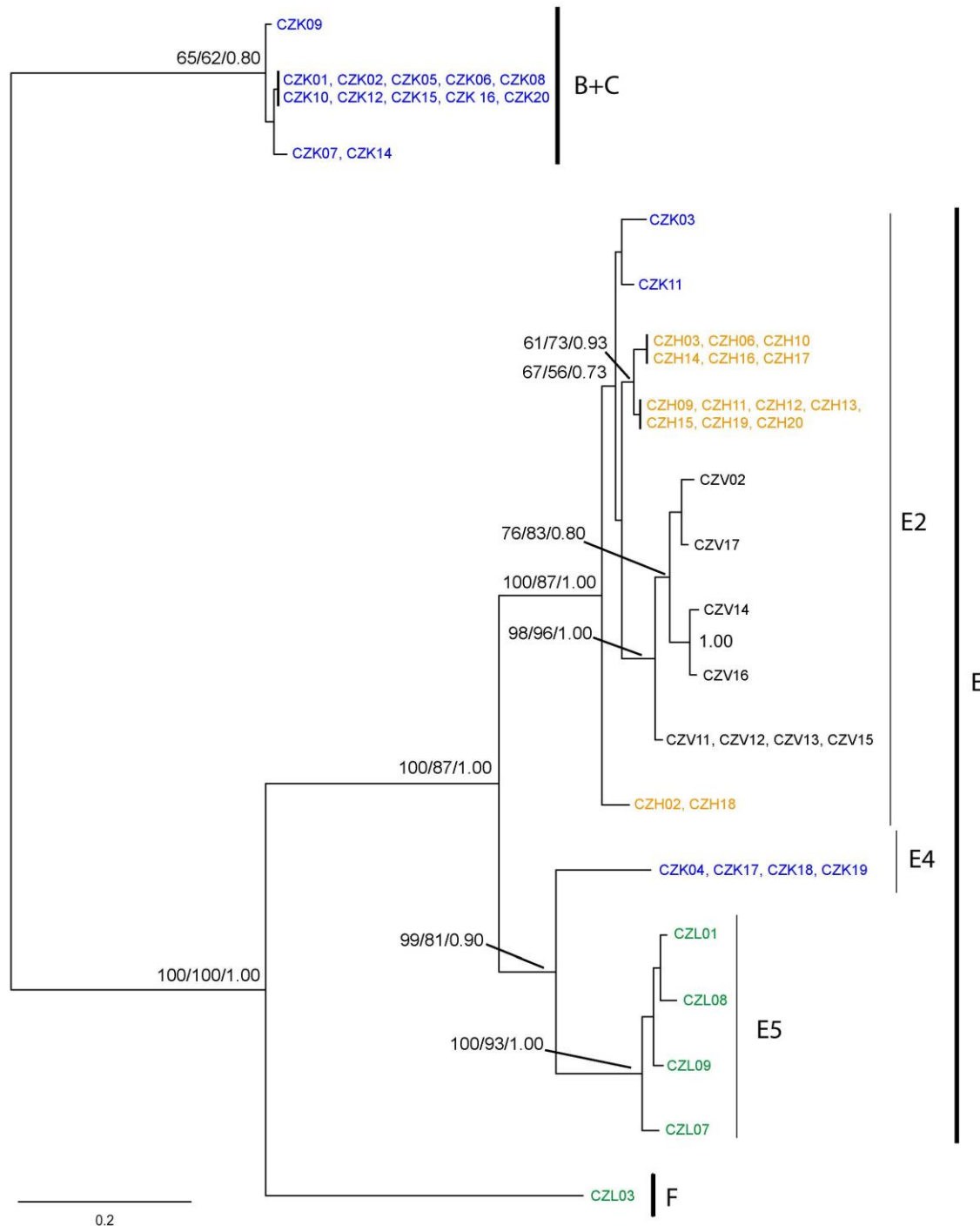


Obr. 10: pH studovaných hornin.

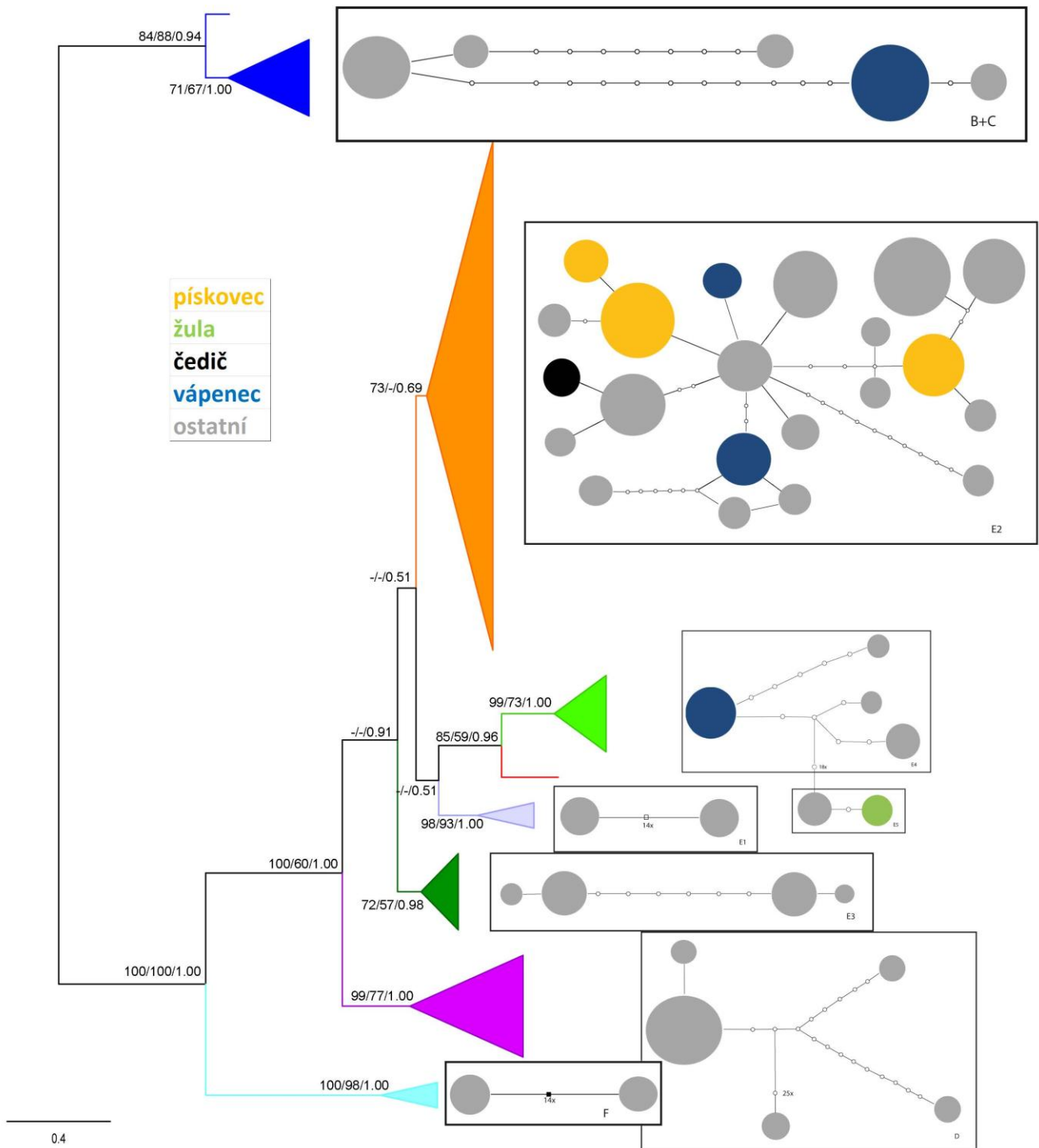
Pro studium substrátové specificity bylo celkem získáno 47 sekvencí (vápeneč 19, pískovec 15, čedič 8, žula 5). Ze žuly bylo získáno pouze pět kmenů, protože jich během kultivace více nevyrostlo. Naopak u ostatních substrátů byl při stejném způsobu kultivace získán velký počet kolonií. Alignment obsahoval 19 unikátních sekvencí *rbcL* genu o délce 606 bp. Na základě Bayesovy interference (BI) byl vytvořen fylogram, který získané sekvence rozdělil do tří supercladů (označeny jako A + B, E, F) mající střední až vysokou podporou (obr. 11). Superclade A + B obsahoval pouze kmény (celkem 13) získané z vápence. Superclade E obsahoval tři linie E2, E4, E5 se střední až vysokou podporou. Linie E2 byla tvořena kmény pocházející ze substrátů vápence (2), pískovce (15) a čediče (8). Jednotlivé substráty tvoří uvnitř této linie jasně oddělené fylotypy. Clade E4 byl tvořen kmény z vápence a byl představován jedním haplotypem. Clade E5 je charakteristický kmény pocházející ze žuly. Superclade F byl tvořen pouze jednou sekvencí pocházející ze žuly.

Substrátová specificita získaných genotypů byla namapována na haplotypovou síť vytvořenou na datech z biogeografické části (obr. 12). Většina haplotypů je znázorněna bez informace ekologické preference a jen k několika haplotypům byly přiřazeny genotypy s ekologickou preferencí. Je dobře vidět, že jednotlivé genotypy se nepřekrývají. U linie E2, která je velice heterogenní, se vyskytují haplotypy s preferencí ke třem typům hornin, a to

k pískovci, vápenci a čediči. Linie B + C je zastoupena genotypy pocházejícími z vápence. Do linie E4 patří genotypy z vápence a do linie E4 pak sekvence nalezené na žule. Pro linii D, která byla nalezena ve velké abundanci v západní Evropě, nebyl zatím nalezen habitat, kterým by tato linie mohla být specifická.



Obr. 11: Fylogenetický strom vytvořený Bayesovou analýzou ze všech *rbcL* sekvencí získaných pro studium substrátové specifity rodu *Klebsormidium*, s vyznačenou bootstrapovou podporou (BP) a Bayesovou posteriorní pravděpodobností (PP) na nodech. Zleva do prava hodnoty podpor odpovídají maximum parsimony BP, maximum likelihood BP a Bayesova PP. BP menší než 50 % a PP menší než 0.5 nejsou vyznačeny.



Obr. 12: Fylogenetický strom vytvořený Bayesovou analýzou ze všech *rbcL* sekvencí získaných při studiu substrátové specificitě rodu *Klebsormidium*, s haplotypovými sítěmi. Na nodech je vyznačena bootstrapová podpora (BP) a Bayesova posteriórní pravděpodobnost (PP). Zleva do prava hodnoty podpor odpovídají maximum parsimony BP, maximum likelihood BP a Bayesova PP. BP menší než 50 % a PP menší než 0.5 nejsou vyznačeny.

4. Diskuze

Protože jsem získal pouze krátké úseky *rbcL* genu 606 bp, nebyly v mé studii některé superclady a linie podpořeny, i když na delším úseku 1149 bp tohoto genu již jsou jednotlivé linie vysoce podpořeny, jak ukazuje studie Rindi a kol. (2011). Proto byly jednotlivé superclady/linie popsány jako ve studii Rindi a kol. (2011), ve které byl fylogenetický strom vytvořen na dvou molekulárních markerech *rbcL* a ITS a tudíž jednotlivé linie měly větší podporu. I takto krátký úsek však postačil k zařazení nových sekvencí k již nalezeným liniím. Přestože byl použit úsek o délce pouze 606 bp, poměrně velká proporce variabilních pozic (27,7 %) je velmi podobná variabilitě u ITS (Rindi a kol. 2011), která je přibližně o 100 bp kratší. Proto i takto krátký úsek *rbcL* u rodu *Klebsormidium* obsahoval více variabilních pozic než ITS. Při použití všech dostupných sekvencí pro získání přehledu o celkové diverzitě bylo variabilních znaků více než při studii substrátové specificity, a to z důvodu získání menšího počtu linií. Menší počet sekvencí ale vedl k tomu, že fylogenetické metody Bayesova interference, maximum parsimony a maximum likelihood přinesly větší bootstrapovou podporu než v případě celého datasetu.

Genetická vzdálenost uvnitř supercladů A, D a G je v rozmezí 0,031 až 0,034 což je více než genetická vzdálenost mezi liniemi E1, E2 a E3, kde se pohybuje v rozmezí 0,022 až 0,029. Podle *rbcL* analýzy ve studii Rindi a kol. (2011) superclade A obsahuje dvě vysoce podpořené linie, proto se dá očekávat, že i linie D a G mohou být po získání nových genotypů nebo přidáním jiných variabilnějších molekulárních markerů v budoucnu rozděleny na několik vnitřních linií.

Celkový podíl variabilních pozic v genu *rbcL* byl v rámci rodů *Klebsormidium* a *Interfilum* vypočten na 29 % (Rindi a kol. 2011). Protože se jedná o relativně konzervativní gen (Curtis a Clegg 1984), jde o poměrně vysoké číslo, což vynikne při porovnání s ostatními skupinami organismů. Ve srovnání s rostlinami, kde je druhové určení na základě morfologie a ekologie snazší, je taková variabilita téměř srovnatelná s celou skupinou krytosemenných rostlin, u nichž byla variabilita v genu *rbcL* vypočtena na 33,6 % (Nickrent a Soltis 1995). Například u celého řádu Fabales je počet variabilních pozic dokonce o něco nižší 25,7 % (Bello a kol. 2009). U rodu *Caragana* (Fabaceae) bylo zjištěno pouze 8,3 % variabilních míst (Zhang a kol. 2008). U řas například u řádu Tribonematales je tato variabilita 13,5 %. U jednotlivých rodů tohoto řádu (*Bumilleriopsis*, *Ophiocytium*, *Tribonema*, *Xanthonema*) se variabilita *rbcL* markeru pohybuje v rozmezí 5,9 až 13,2 % (Maistro a kol. 2007). Vzniklá variabilita buď může být způsobena vysokou mutační rychlostí u rodu *Klebsormidium*, nebo

se v *rbcL* genu v důsledku dlouhé evoluční historie nahromadila spousta variabilních míst. Pokud platí druhá hypotéza, tak by to znamenalo, že jednotlivé superclady by šlo považovat za rody, kterých se během dlouhého geologického období a evoluce skupiny do dnešního dne zachovalo pouze šest. Tuto domněnku podporuje i morfologicky značně odlišný superclade A, tradičně považovaný za samostatný rod *Interfilum*. Tento rod však na základě fylogenetických analýz spadá do rodu *Klebsormidium* (Mikhailyuk a kol. 2008, Rindi a kol. 2011).

Naopak na základě získané variability ITS (Rindi a kol. 2011) by v porovnání z jinými studii (de Vargas a kol. 2001, Piercey-Normore a DePriest 2001, Škaloud a Peksa 2010) šlo brát celý superclade E jako jeden druh. A pokud by byl aplikován CBC koncept jako ve studii Coleman (2009), pak by ani jednotlivé superclady nešlo považovat za druhy. Naopak variabilita v rámci konzervativnějšího markeru *rbcL* by odpovídala existenci několika separátních druhů v rámci supercladu E.

Cílem této práce však nebylo vyřešení fylogenetických vztahů v rámci rodu *Klebsormidium*, pro které by byl zapotřebí delší úsek *rbcL* v kombinaci s jiným variabilním markrem pro lepší vymezení linií. Cílem ani nebylo druhové vymezení v rámci rodu. Jak ukázala studie Rindi a kol. (2008, 2011), morfologický koncept v rámci rodu *Klebsormidium* je nepoužitelný, protože morfologické vymezení druhů neodpovídá fylogenetickým liniím. Ukázalo se, že i typický druh *K. flaccidum* je polyfyletický, vyskytující se v několika liniích (B, C, E2, E3, E5). Proto jsem se pokusil vymezit jednotlivé linie na základě omezeného geografického rozšíření, jako to ukazuje studie Novis (2006) u nově popsánoého novozélandského druhu *K. acidophilum*. Tento druh je zároveň vymezen i ekologicky, protože preferuje habitaty potoků s vysokou kyselostí. Dalším cílem proto bylo pokusit se některé linie vymezit na základě ekologických preferencí. Zdá se, že jasné ekologické vymezení lze pozorovat u linií G a E1. Zatím co se linie G vyskytuje v biologických půdních krustách nebo na pouštích, linie E1 je typická pro sladkovodní prostředí. Během této studie i po přidání kmenů ze Severní Ameriky a Asie nebyl objeven žádný nový superclade. Proto usuzuji, že by diverzita v rámci rodu *Klebsormidium* mohla už být známa, a že počet nových supercladů by tudíž mohl být konečný.

Biogeografické vymezení genotypů rodu *Klebsormidium* se ukázalo jako nepoužitelné, protože většina linií měla kosmopolitní rozšíření. Jak naznačují získaná data, dochází k velkému genetickému toku mezi geografickými oblastmi, a proto tu nejsou linie geograficky vymezené. Výjimku představuje pouze superclade D, který by mohl být omezen pouze na oblast západní Evropy. Rozšíření této linie je v rozporu s názorem Finley a kol. (2001), který předpokládá, že vzácné druhy budou lokálně i globálně méně početné. To v případě této linie

neplatí, protože na dané lokalitě byla dokonce dominantní a v ostatních oblastech nebyla vůbec nalezena. To buď znamená, že se opravdu jedná o endemickou linii, nebo má tato linie specifické ekologické nároky vůči substrátům, které se na ostatních místech nevyskytovaly. Naopak linie E3 tento předpoklad plně znázorňuje. I když bylo celkem nalezeno pouze 6 kmenů patřících do této linie, nalezeny byly na všech třech studovaných kontinentech. Co se týče lokální a globální diverzity, na daném studovaném území (lokálně) bylo nalezeno 4 až 5 linií, zatímco pro daný kontinent (globálně) to pak bylo 5 až 7 linií. Celkem bylo na všech třech kontinentech v rámci biogeografické studie nalezeno 8 linií, přičemž globální dosud známá diverzita rodu *Klebsormidium* představuje 11 linií. V rámci České republiky byla provedena jak část biogeografická tak substrátová, tím pádem z tohoto území pochází nejvíce dat z heterogenních míst odběru. Na tomto území bylo nalezeno pět linií, což představuje přibližně polovinu globální diverzity. To může být způsobeno tím, že některé linie nemohly být sebrány z důvodu jejich specifických ekologických preferencí. Tak tomu je například u linie G, která je charakteristická výskytem v půdních biologických krustách nebo suchých pouštích, dále pak u linie E1, která je charakteristická převážně genotypy vyskytujícími se ve vodním prostředí. Protože z vodního prostředí a z pouští nebyly v rámci této práce odebrány žádné vzorky, tyto genotypy nebyly nalezeny. Jedinou výjimkou jsou dva získané genotypy v rámci linie E1 v důsledku odebrání substrátu v blízkosti menšího vodopádu v Japonsku. Linie E4 je pak charakteristická výskytem v městských habitatech (Rindi a kol. 2008).

Výše uvedené skutečnosti poukazují na fakt, že lokální (v rámci kontinentů) diverzita je u aeroterestrických řas téměř srovnatelná s celkovou (všechny tři kontinenty) diverzitou, což podporuje představy zastánců ubikvitního modelu (Fenchel a Finlay 2003, Finlay 2002). Jak ale ukazuje druhá část práce zaměřená na ekologické vymezení linií, malá superlokální (např. v rámci jednoho kopce) diverzita je spíše ovlivněna prostředím, ve kterém je proveden odběr vzorků. Diverzita na malém měřítku závisí na tom, zda se jedná spíše o heterogenní prostředí, kde je více typů habitatů a tím pádem i větší lokální diverzita, nebo naopak o homogenní prostředí, kde je diverzita ovlivněna menším počtem habitatů. I v rámci vodních habitatů je vliv prostředí důležitým faktorem ovlivňujícím diverzitu (Katz a kol. 2005). V homogenním prostředí klesá diverzita, proto je v oceánech menší celková i lokální diverzita v porovnání s vnitrozemskými vodními plochami a přílivovými zónami, kde v důsledku větší heterogenity je i větší diverzita. A proto i terestrick biotop představuje vysoce heterogenní prostředí, kde je na základě tohoto důsledku relativně nízká superlokální (v rámci jednoho kopce nebo omezeného území) diverzita a naopak vysoká lokální (Česká republika) diverzita. Proto je pro danou lokalitu nalezeno tím více linií či genotypů čím více habitatů je odebráno.

Pokud by byl odebrán pouze jeden typ substrátu, představující jen několik málo habitatů, bylo by nalezeno jen velmi omezené množství genotypů. To dobře ilustruje část diplomové práce věnovaná substrátové specificitě. Na čediči odebraném na kopci Vladař u Žlutic byla zaznamenána pouze jedna linie z 11 dosud známých, a u ostatních lokalit nebyla situace výrazně jiná. V okolí obce Houska na Kokořínsku na několika kilometrech čtverečních byly odebrány vzorky z pískovce a byly celkem nalezeny pouze tři genotypy spadající do jedné linie. Genotypy nalezené na žule z kopce u obce Ležky spadají do dvou linií. Pouze u vápence bylo nalezených genotypů více, které celkem spadaly do tří linií. Tyto výsledky ukazují, že lokální diverzita u aeroterestrické řasy rodu *Klebsormidium* je ovlivněna diverzitou odebraných habitatů.

Ve studii Rindi a kol. (2011) autoři diskutovali pravděpodobně omezené geografické rozšíření některých supercladů či linií. Linie B se zdála být geograficky omezena pouze na východní Evropu, ale v rámci této práce byla tato linie nalezena i v Severní Americe. Stejně tak se linie C jevila být geograficky omezena na oblast západní Evropy. Tato linie se ale ukázala být kosmopolitní, s výskytem jak v Severní Americe, tak i ve východní Asii. To opět podporuje ubikvitní model.

V rámci biogeografické studie byly vzorky odebrány ve smíšeném lese mírného pásu severní polokoule. Ukázalo se, že pro tento ekosystém je charakteristická linie E2, která představuje více jak 76 % získaných sekvencí. Dále pak byla v tomto ekosystému relativně početná linie B + C. Ostatní nalezené linie již byly nalezeny vzácně, což může být způsobeno tím, že se buď vyskytovaly pro ně v ne zrovna typickém prostředí (E4 a F), nebo nebyl daný habitat v rámci tohoto ekosystému nebyl odebrán (E1 a G), nebo se jedná o genotypy vzácné, které jsou nalézány jen sporadicky. Doposud pocházelo přibližně 80 % všech známých sekvencí rodu *Klebsormidium* z Evropy, proto se dalo předpokládat, že prozkoumání jiných kontinentů by mohlo vést k objevení nové linie v rámci tohoto rodu. Paradoxem je, že nová linie se našla jediná, a to v rámci vysoce prozkoumané Evropy. Naopak na ostatních kontinentech nebyla nalezena žádná geograficky specifická linie. Pouze v rámci linie E2 byly nalezeny tři haplotypy, přičemž jeden z nich byl relativně početný s výskytem pouze v Severní Americe, a další dva haplotypy byly charakteristické pro oblast východní Asie.

Kosmopolitní rozšíření haplotypů rodu *Klebsormidium* ukazuje, že u tohoto rodu dochází k vysokému genetickému toku mezi jednotlivými kontinenty. To může být způsobeno jejich malou velikostí a velkou abundancí, což umožňuje náhodné rozšíření pomocí náhodných událostí, jako jsou větrné proudy nebo hurikány (Fenchel a Finlay 2004). Dalším možným faktorem ovlivňující kosmopolitní rozšíření tohoto rodu může být vliv člověka, který

jako u ostatních protist způsobuje změny v geografickém rozšíření některých druhů (Foissner 2006). Příkladem je rozšíření rodu *Hydrodictyon* na Nový Zéland (Kristiansen 1996). U rodu *Klebsormidium* doposud nebyla pozorována klidová stádia (cysty, akinety), která by umožnila přežít období během šíření. Je ale známo, že jednotlivé buňky mají schopnost přežívat dlouhé období ve vyschlém stavu (Elster a kol. 2008, Holzinger a kol. 2011). To dokonce zvyšuje pravděpodobnost šíření, protože mají možnost se šířit kdykoliv a ne jen ve stádiu dormance.

Morfologie rodu *Klebsormidium* je velice variabilní a znaky používané pro determinaci se během kultivace mění (Škaloud 2006). Jedním z nejčastěji používaných znaků při determinaci druhů je šířka vláken. Ukázalo se, že i během kultivace se u jednotlivých kmenů šířka vláken mění. Navíc je šířka výrazně ovlivněna faktory prostředí jako je pH, teplota, vlhkost a ozáření. Tato variabilita může následně ovlivnit morfologické určení druhů, což je také jeden z důvodů, proč morfologické vymezení druhů neodpovídá fylogenetickému rozdělení rodu (Rindi a kol. 2008, 2011). Určení genotypů na základě ekologických vlastností se naopak ukazuje jako možný způsob vymezení jednotlivých linií. U všech nalezených genotypů jsem našel jasný vliv substrátu na jejich výskyt. Fyziologické studie zaměřené na kmene z rodu *Klebsormidium* ukazují širokou preferenci ke zkoumaným chemicko-fyziologickým podmínkám. Proto je otázkou, proč se na žule *Klebsormidium* skoro nevyskytuje a dominují zde kokální řasy. Přitom na stejně kyselém pískovci je tento rod vcelku hojný jak početně tak genotypově. Jedním z možných vysvětlení by mohl být fakt, že žula má v důsledku malé pórovitosti menší schopnost zadržet vodu na delší dobu, a proto může hrát nedostatek vody klíčovou roli ve složení společenstva řas těchto substrátů. Je možné, že malé kokální řasy mají v důsledku lepšího poměru povrchu k objemu větší schopnost pomaleji vysychat než řasy s vláknitou stélkou (Kaplan a kol. 2011), a proto na žule dominují. Dostupnost vody pro aeroterestrické řasy velmi podstatným faktorem. Jednotlivé druhy se mohou výrazně lišit délkou, po kterou jsou schopny přežít bez nedostatku vody (Luttge a Budel 2009).

U vápence byla v porovnání s ostatními substráty nalezena vysoká genotypová variabilita. To by mohlo být způsobeno tím, že vzorek pocházel z více heterogenních typů habitatů než u ostatních zkoumaných hornin. Některé kameny byly odebrány na slunných, teplých místech s delším obdobím nedostatku vody a jiné ze stinných, studených míst blízko vstupů do jeskyní, kde je relativně vyšší vlhkost a stálejší teplota. Genotypy spadající do linie E4 by mohly být ty, které pocházejí ze severních sušších míst, protože linie E4 je charakteristická výskytem na zdech ve městech. U jednoho kmene z linie E4, izolovaného ve městě Konstanz v Německu, byly testovány některé ekofyziologické předpoklady, definované

na základě podmínek prostředí naměřených na odběrovém místě. Laboratorní testy potvrdily optimální růst při relativně nízké intenzitě osvětlení, což odpovídá výskytu na severních zdech v úzkých uličkách města. Dále byl tento kmen tolerantní vůči vysoké koncentraci soli (je relativně stenohalinní). Tato aklimatizace je spojena s občasným počůráváním zdí psy či solením pozemních komunikací. Tyto vlastnosti by bylo potřeba prozkoumat blíže i u ostatních linií a zjistit, zda lze jednotlivé linie na základě ekofyziologických předpokladů rozlišit na základě vlivu osvětlení, vysychání, pH či teplotě. Rozdíly v ekofyziologických vlastnostech mezi některými liniemi již byly potvrzeny při studiu dvou morfologicky určených druhů rodu *Klebsormidium* (Kaplan a kol. 2011). Jedním z nich byl druh *K. crenulatum*, který na základě *rbcL* sekvence patří do linie F, a *K. nitens* patří do linie E2. Ukázalo se, že oba druhy se liší jak osmotickým potenciálem, tak i plazmolýzou.

5. Závěr

V této diplomové práci jsem se zabýval i) diverzitou a biogeografickým rozšířením aeroterestické zelené řasy rodu *Klebsormidium* ve smíšených lesích mírného pásu severní polokoule, a ii) možnému biogeografickému či ekologickému odlišení jednotlivých genotypů. Genetická příbuznost kmenů byla zkoumána na základě použití molekulárního markeru *rbcL*.

Fylogenetickou analýzou 187 sekvencí získaných při biogeografické studii bylo získáno 8 supercladů/linií. Nejčastější a zároveň nejtypičtější linií pro smíšené lesy mírného pásu severní polokoule byla linie E2, která představovala 76 % všech získaných sekvencí. Genotypy rodu *Klebsormidium* se ukázaly být kosmopolitní, což poukazuje na možnost náhodného šíření v důsledku malé velikosti a velkých populací a na vysoký genový tok mezi studovanými oblastmi. Protože se ukázalo, že genotypy rodu *Klebsormidium* jsou kosmopolitní, možnost vymezit jednotlivé linie na základě omezeného geografického rozšíření se jeví být nemožná. Naopak studie substrátové specificity přinesla jasné důkazy o ekologických preferencích jednotlivých genotypů. Na studovaných horninách byly vždy nalezeny genotypy asociované pouze s jedním typem substrátu. Vymezení genotypů na základě substrátových preferencí je proto vysoce reálné, o čemž svědčí i některé jiné studie zabývající se tímto rodem (Rindi a kol. 2008, Kaplan a kol. 2011).

6. Literatura

Auinger, B. M., Pfandl, K., a Boenigk, J. (2008): Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: combining microscopic analysis with single-cell PCR. *Applied and environmental microbiology*, 2505-2510.

Baldwin, N. A., a Whitton, B. A. (1992). Cyanobacteria and eukaryotic algae in sports turfs and amenity grasslands – a review. *J. Appl. Phycol*, 4: 39-47.

Barberousse, H., Tell, G., Yéprémian, C., a Couté, A. (2006). Diversity of algae and cyanobacteria growing on building facades in France. *Algol. Studies*, 120: 81-105.

Bello, M. A., Bruneau, A., Forest, F., a Hawkins, J. A. (2009). Elusive Relationships Within Order Fabales: Phylogenetic Analyses Using *matK* and *rbcL* Sequence Data. *Systematic Botany*, 34:102-114.

Bischoff, H., a Bold, H. C. (1963). Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycological Studies IV. -Univ. Texas Publ.* 6318: 1-95.

Broady, P. A. (1996): Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodivers. Conserv.*, 5: 1307-1335.

Brouard, J. S., Otis, C., Lemieux, C., a Turmel, M. (2010). The exceptionally large chloroplast genome of the green alga *Floydiella terrestris* illuminates the evolutionary history of the Chlorophyceae. *Genome Biol. Evol.*, 2: 240-256.

Clement, M., Posada, D., a Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, 9: 1657-1660.

Cohan, F. M. (2002): What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 457-487.

Coleman, A. W. (2009). Is there a molecular key to the level of „biological species“ in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 50: 197-203.

Curtis, S. E., a Clegg, M. T. (1984). Molecular Evolution of Chloroplast DNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 291-301.

Deason, T. R. (1969): Filamentous and colonial soil algae from Dauphin Island, Alabama. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 88: 240–246.

de Vargas, C., Renaud, S., Hilbrecht, H., a Pawlowski, J. (2001). Pleistocene adaptive radiation in *Globorotalia truncatulinoides*: Genetic, Morphologic, and environmental evidence. *Paleontological Society*. 27: 104-125.

Duff, R. J., Ball, H., a Lavrentyev, P. J. (2008): Application of combined morphological - molecular approaches to the identification of planktonic protists from environmental samples. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 55: 306-312.

Elster, J., Degma, P., Kováčik, L., Valentová, L., Šramková, K., a Pereira, A. B. (2008). Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia. *Biologia*. 63: 843-851.

Ettl, H., a Gartner, G. (1995). Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Jena and New York. 721.

Fenchel, T. (1993): There are more small than large species? *Oikos*, 68: 375-378.

Fenchel, T., a Finlay, B. J. (2004): The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *Bioscience*, 777.

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

Finlay, B. J., a Clarke, K. J. (1999): Apparent global ubiquity of species in the protist genus *Paraphysomonas*. *Protist*, 150, 419-430. *Biology*, 7:162.

Finlay, B. J., Corliss, J. O., Esteban, G., a Fenchel, T. (1996): Biodiversity at the microbial level: the number of free-living ciliates in the biosphere. *The quarterly review of biology*, 71(2).

Finlay, B. J., Esteban, G. F., Clarke, K. J., a Olmo, J. L. (2001): Biodiversity of terrestrial protozoa appears homogeneous across local and global spatial scales. *Protist*, 152: 355-366.

Finlay, B. J., Genoveva, F. E., a Fenchel, T. (2004): Protist diversity is different? *Protist*, 155: 15-22.

Finlay, B. J., Monaghan, E. B., a Maberly, S. C. (2002): Hypothesis: the rate and scale of dispersal of freshwater diatom species is a function of their global abundance. *Protist*, 261.

Floyd, G. L., Stewart, K. D., a Mattox, K. R. (1972). Cellular organization, mitosis, and cytokinesis in the ulotrichalean alga *Klebsormidium*. *J. Phycol.* 8: 176-184.

Foissner, W. (1999): Protist diversity: estimates of the near-imponderable. *Protist*, 150, 363-368.

Foissner, W. (2006): Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozoologica*, 45: 111-136.

Foissner, W. (2008): Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodivers Conserv*, 17: 235-242.

Fott, B. (1960). Taxonomische Übertragungen und Namensänderungen unter den Algen. *Preslia*, 32: 142-154.

Frémy, A. P. (1925). Essai sur l'écologie des algues saxicoles, aériennes et subaériennes, en Normandie. *Nuova Notarisia*, 36: 297-304.

Friedmann, E. I. (1972). Ecology of lithophytic algal habitats in Middle Eastern and North American deserts. Pages 182-185 in L. E. Rodin (ed.), Ecophysiological foundation of ecosystems productivity in arid zones. Nauka, U.S.S.R. Acad. Sci., Leningrad. **Gay, F.** (1891). Recherches sur le développement et la classification de quelques algues vertes. Klincksieck, Paris.

Green, B. R. (2011). Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *The plant journal*. 66: 34-44.

Hallegraeff, G. M., a Bolch, C. J. (1992): Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *J. Plankton Res.*, 14: 1067-1084.

Handa, S., Nakano, T., a Takeshita, S. (1991): Some corticolous algae from Shibetsu, Hokkaido, northern Japan. *J. Jpn. Bot.*, 66: 211-223.

Haubner, N., Schumann, R., a Karsten, U. (2006). Aeroterrestrial microalgae growing in biofilms on facades – response to temperature and water stress. *Microbial Ecology*, 51: 285-293.

Hepplerle, D. (2004): SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualisation tool for molecular sequences.

Hoffmann, L. (1989). Algae of Terrestrial Habitats. *The Botanical Review*, 55: 77-105.

Holzinger, A., Lutz, C., a Karsten, U. (2010). Desiccation stress causes structural and ultrastructural alterations in the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust. *J. Phycol.*, 47: 591-602.

Huelsenbeck J. P., a Ronquist, F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754-755.

Chodat, R. 1902). Algues vertes de la Suisse. *Matériaux pour la Flore Cryptogamique Suisse*. Vol. I, Fasc. 3. Bern.

John, D. M. (2002): Orders Chaetophorales, Klebsormidiales, Microsporales, Ulotrichales. In John, D. M., Whitton, B. A. & Brook, A. J. [Eds.] The Freshwater Algal Flora of the British Isles. n Cambridge University Press, Cambridge, UK, 433–468.

John, D. M. (2003): Filamentous and plant-like green algae. In Wehr, J. D. & Sheath, R. G. [Eds.] *Freshwater Algae of North America*. Academic Press, San Diego, California, pp. 311–352.

John, U., Fensome, R. A., a Medlin, L. K. (2003): The application of molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* „species complex“ (Dinophyceae). *Molecular biology and evolution*, 20: 1015-1027.

Kaplan, F., Lewis, L. A., Wastian, J., a Holzinger, A. (2011). Plasmolysis effect and osmotic potential of two phylogenetically distinct alpine strains of *Klebsormidium* (Streptophyta). *Protoplasma*.

Karol, K. G., McCourt, R. M., Cimino, M. T., a Delwiche, C. F. (2001): The closest living relatives of land plants. *Science*, 294: 2351-2353.

Katz, L. A., McManus, G. B., Snoeyenbos-West, O. L. O., Griffin, A., Pirog, K., Costas, B., a Foissner, W. (2005). Reframing the 'Everything is everywhere' debate: evidence for high gene flow and diversity in ciliate morphospecies. *Aquat. Microb. Ecol.* 41: 55-65.

Kimura, M. (1981). Estimation of evolutionary distances between homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 454-458.

Kristiansen, J. (1996): Dispersal of freshwater algae - a review. *Hydrobiologia*, 336, 151-157.

Kützing, F. T. (1843). *Phycologia generalis*. Brockhaus, Leipzig.

Lawton, J. H. (1998): Small is beautiful, and very strange. *Oikos*, 81: 3-5.

Lee, K. B., a Wee, Y. C. (1982): Algae growing on walls around Singapore. *Malays. Nat. J.*, 35: 125-132.

Lewis, L. A., (2007). Chlorophyta on land: independent lineages of green eukaryotes from arid lands. In: Seckbach, J. (Ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Springer, Dordrecht, 571-582.

Lewis, L. A., a McCourt, R. M. (2004): Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.*, 91: 1535-1556.

Librado, P., a Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.

Lokhorst, G. M. (1996): Comparative taxonomic studies on the genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. In Julich, W. [Ed.] *Cryptogamic Studies*, Vol. 5, Gustav Fischer, Stuttgart, Germany, 1–55.

Lokhorst, G. M. a Star, W. (1985). Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in *Klebsormidium mucosum* nov. Comb., formerly *Ulothrix verrucosa* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 21: 466-476.

Lukešová, A. (2001). Soil algae in brown coal and lignite post-mining areas in central Europe (Czech Republic and Germany). *Restor. Ecol.*, 9: 341-350.

Luttge, U., a Budel, B. (2010). Resurrection kinetics of photosynthesis in desiccation-tolerant terrestrial green algae (Chlorophyta) on tree bark. *Plant Biology.*, 12: 437-444.

Maistro, S., Broady, P. A., Andreoli, C., a Negrisolo, E. (2007). Molecular phylogeny and evolution of the order Tribonematales (Heterokonta, Xanthophyceae) based on analysis of plastidial genes *rbcL* and *psaA*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 407-417.

Marchant, H. J., Pickett-Heaps, J. D., a Jacobs, K. (1973): An ultrastructural study of zoosporogenesis and the mature zoospore of *Klebsormidium flaccidum*. *Cytobios*, 8: 95-107.

May, R. M. (1988): How many species are there on Earth? *Science*, 241: 1441–1449.

McCourt, R. M., Delwiche, C. F., a Karol, K. G. (2004): Charophyte algae and land plant origin. *Trends Ecol. Evol.*, 19: 661-666.

Metting, B. (1981). The systematics and ecology of soil algae. *Bot. Rev.* 47: 195-312.

Mikhailyuk, T. I., Sluiman, H. J., Massalski, A., Mudimu, O., Demchenko, E. M., Kondratyuk, S. Y., Friedl, T., (2008). New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *J. Phycol.* 44: 1586-1603.

Montresor, M., Lovejoy, C., Orsini, L., a Procaccini, G. (2003): Bipolar distribution of cyst-forming dinoflagellate *Polarella gracialis*. *Polar Biol*, 26: 186-194.

Morison, M. O., a Sheath, R. G. (1985): Responses to desiccation stress by *Klebsormidium rivulare* (Ulotrichales, Chlorophyta) from a Rhode Island stream. *Phycologia*, 24: 129-145.

Nanney, D. L. (2004): No trivial pursuit. *BioScience*, 54: 720-721.

Nanney, D. L., Park, C., Preparata, R., a Simon, E. M. (1998): Comparison of sequence differences in a variable 23S rRNA domain among sets of cryptic species of ciliated Protozoa. *J. Euk. Mikrobiol.*, 45: 91-100.

Nakano, T., Handa, S., a Takeshita, S. (1991): Some corticolous algae from the Taishaku Kyo Gorge, western Japan. *Nova Hedwigia*, 52: 427–451.

Nickrent, D. L., a Soltis, D. E. (1995). A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18S rDNA and *rbcL* sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 82: 208-234.

Novis, P. M. (2006): Taxonomy of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low-pH habitats. *Phycologia*, 45: 293-301.

Nylander J. A. A. (2004). MrModeltest v2. <http://www.abc.se/~nylander> (last accessed 12 March 2011).

Peksa, O., a Škaloud, P. (2011). Do photobionts influence the ecology of lichens? A case study of environmental preferences in symbiotic green alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae). *Molecular Ecology*: 20: 3936-3948.

Pickett-Heaps, J. D. (1975). Green algae: structure, reproduction and evolution in selected genera. *Sinauer. Sunderland. Massachusetts.* 606.

Piercey-Normore, M. D., a DePriest, P. T. (2001). Algal switching among lichen symbioses. *American Journal of Botany.* 88: 1490-1498.

Poulsen, C. (1981). Comments on the structure and function of the large subunit of the enzyme ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *Carlsberg Res. Commun.* 46: 259-278.

Printz, H., (1964). Die Chaetophorales der Binnengewässer. Eine systematische Übersicht. *Hydrobiologia*, 24: 1-376.

Ramanathan, K. R. (1964): Ulotrichales. Indian Council of Agricultural Research, *New Delhi*, ix + 188 pp.

Rifón-Lastra, A., a Nogueroles-Seoane, Á. (2001). Green algae associated with the granite walls of monuments in Galicia (NW Spain). *Cryptogamie. Algol.*, 22: 305-326.

Rindi, F., a Guiry, M. D. (2003). Composition and distribution of subaerial algal assemblages in Galway City, western Ireland. *Cryptogam. Algol.*, 24: 245-267.

Rindi, F., a Guiry, M. D. (2004). Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. *Phycologia*, 43: 225-235.

Rindi, F., Guiry, M. D., a López-Bautista, J. M. (2008): Distribution, morphology, and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environment in Europe. *J. Phycol.*, 44: 1529-1540.

Rindi, F., McIvor, L., Sherwood, A. R., Friedl, T., Guiry, M. D., a Sheath, R. G. (2007). Molecular phylogeny of the green algal order Prasiolales (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 43: 811-822.

Rindi, F., Mikhailyuk, T. I., Sluiman, H. J., Friedl, T., a López-Bautista, J. M. (2011): Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58: 218-231.

Sabbe, K., Vanhoutte, K., Lowe, R. L., Bergey, E. A., Biggs, B. J. F., Francoeur, S., Hodgson, D., a Vyverman, W. (2001) Six new *Actinella* (Bacillariophyta) species from Papua New Guinea, Australia and New Zealand: further evidence for widespread diatom endemism in the Australasian region. *Europ. J. Phycol.*, 36: 321-340.

Shields, L. M., a F. Drouet. (1962). Distribution of terrestrial algae within the Nevada test site. *Amer. J. Bot.*, 49: 547-554.

Silva, P. C., Mattox, K. R., a Balackwell, W. H. (1972): The generic name *Hormidium* as applied to green algae. *Taxon*, 21: 639-645.

Sluiman, H. J., a Guihal, C. (1999): Phylogenetic position of *Chaetospheridium* (Chlorophyta), a basal lineage in the Charophyceae, inferred from 18S rDNA sequences. *J. Phycol.*, 35: 395-402.

Sluiman, H. J., Guihal, C., a Mudimu, O. (2008): Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA 44 phylogenies and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella*, and *Entransia*. *J. Phycol.*, 44: 183-195.

Smith, S. M., Abed, R. M. M., a Garcia-Pichel, F. (2004). Biological soil crusts of sand dunes in Cape Cod National Seashore, Massachusetts. *USA Microb. Ecol.*, 48: 200-208.

Stewart, K. D., a Mattox, K. R. (1975). Comparative cytology, evolution and classification of the green algae, with some consideration of the origin of the other organisms with chlorophylls a and b. *Bot. Rev.* 41: 104-135.

Stiegler, G. L., Matthews, H. M., Bingham, S. E., a Hallick, R. B. (1982). The gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in *Euglena gracilis* chloroplast DNA: location, polarity, cloning and evidence for an intervening sequence. *Nucleic Acids Res.* 10: 3427-3444.

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

Škaloud, P. (2006). Variation and taxonomic significance of some morphological features in European strains of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Nova Hedwigia.*, 83: 533-550.

Škaloud, P., a Peksa, O. (2010). Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54: 36-46.

Šlapeta, Jan. López-García, P., a Moreira, D. (2006): Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 23-29.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., a Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., a Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position 86 specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.

Tyler, P. A. (1996): Endemism in freshwater algae with special reference to the Australian region. *Hydrobiologia*, 336: 1-9.

Uher, B., Aboal, M., a Kovacik, L. (2005). Epilithic and chasmoendolithic phycoflora of monuments and buildings in South-Eastern Spain. *Cryptogram. Algol.* 26: 275-308.

Van de Vijver, B., Gremmen, N. J. M., a Beyens, L. (2005): The genus *Stauroneis* (Bacillariophyceae) in the Antarctic region. *Journal of Biogeography*, 32: 1791-1798.

Yoshinaga, K., Ohta, T., Suzuki, Y., a Sugiura, M. (1988). *Chlorella* chloroplast DNA sequence containing a gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and a part of a possible gene for the β' subunit of RNA polymerase. *Plant Molecular Biology*, 10: 245-250.

Zhang, M., Fritsch, P. W., a Cruz, B. C. (2009). Phylogeny of *Caragana* (Fabaceae) based on DNA sequence data from *rbcL*, *trnS-trnG*, and ITS. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50: 547-559.

Zwickl D. J. (2006). Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

7. Příloha

Tab. 1: Seznam všech získaných a použitých kmenů.

druh	kmen	clade	lokalita	habitat	GenBank číslo (rbcl)
Interfilum sp.	SAG 2101	A	Ukrajina	trhliny žulového výběžku	HQ613236
Interfilum terricola	SAG 2100	A	Belgie, Haute Ardenne	půda z dubového lesa	HQ613238
Interfilum paradoxum	SAG 4.85	A	Itálie, Bressanone	půda	HQ613239
Interfilum paradoxum	SAG 338.1	A	Velká Británie. Epping u Londýna	půda z bukového lesa	HQ613240
Interfilum sp.	SAG 2147	A	Česká republika	půda	HQ613237
Klebsormidium sp.	KL70	B + C	USA, Ohio, Cleveland	kámen	x
Klebsormidium sp.	KL21	B + C	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium flaccidum	SAG 335.7	B + C	Švédsko, Smaland	sladkovodní	EU477434
Klebsormidium flaccidum	SAG 12.91	B + C	Česká republika, nádrž Sojovice	sladkovodní	EU477436
Klebsormidium flaccidum	SAG 2307	B + C	Německo	jílovitá půda na poli s řepou	HQ613242
Klebsormidium sp.	KL41	B + C	USA, Connecticut	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL47	B + C	USA, Connecticut	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL49	B + C	USA, Connecticut	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL60	B + C	USA, Connecticut	půda	x
Klebsormidium sp.	KL61	B + C	USA, Connecticut	půda	x
Klebsormidium sp.	KL74	B + C	USA, Connecticut	kámen	x
Klebsormidium sp.	K03	B + C	Česká republika, České středohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium sp.	JKK7	B + C	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK8	B + C	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium flaccidum	ACKU 800	B + C	Ukrajina, Boguslav	žulový výběžek	HQ613245
Klebsormidium flaccidum	ACKU 379	B + C	Ukrajina	žulový výběžek	HQ613258
Klebsormidium sp.	TR 35	B + C	Ukrajina, Zhytomir	žulový výběžek	HQ613260

Klebsormidium sp.	ACKU 801	B + C	Ukrajina, Boguslav	žulový výběžek	HQ613262
Klebsormidium sp.	CZK01	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK02	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK05	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK06	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK08	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK10	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK12	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK15	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK16	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK20	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	KL42	B + C	USA, Connecticut	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL44	B + C	USA, Connecticut	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL45	B + C	USA, Connecticut	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL46	B + C	USA, Connecticut	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL48	B + C	USA, Connecticut	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL51	B + C	USA, Connecticut	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL65	B + C	USA, Connecticut	půda	x
Klebsormidium sp.	KL76	B + C	USA, Connecticut	borka stromu	x
Klebsormidium sp.	K25	B + C	Česká republika, České středohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium flaccidum	Lira7	B + C	Rusko	sladkovodní	HQ613243
Klebsormidium sp.	CZK07	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK14	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK09	B + C	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium flaccidum	SAG 7.91	B + C	bývalý SSSR	sladkovodní	EU477435
Klebsormidium sp.	K48	B + C	Česká republika, Dražanské údolí	kámen	x
Klebsormidium sp.	W105	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W107	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W110	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W113	D	Wales, Glynneath	kámen	x

Klebsormidium sp.	W114	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W116	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W117	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W118	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W119	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W120	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W402	D	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W404	D	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W409	D	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W411	D	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W413	D	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W414	D	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W417	D	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W419	D	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W420	D	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W101	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W108	D	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK18	D	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	2KL_SOK	D			x
Klebsormidium bilatum	SAG 5.96	D	Belgie, Poppel	břeh u potoka	EU477425
Klebsormidium elegans	SAG 7.96	D	Nizozemsko, Staverden	dřevo	EU477430
Klebsormidium sp.	JP1	E1	Japonsko, Nikko	půda	x
Klebsormidium sp.	JKK16	E1	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium dissectum	Novis K25	E1	Nový Zéland, řeka Acheron	sladkovodní	DQ028574
Klebsormidium dissectum	Novis K37	E1	Nový Zéland, řeka Ryton	sladkovodní	DQ028575
Klebsormidium dissectum	Novis LCR-K2	E1	Nový Zéland, hora Philistinem	půda	EF589144
Klebsormidium acidophilum	Novis K48	E1	Nový Zéland, potok Agility	sladkovodní	DQ028576
Klebsormidium acidophilum	Novis KM	E1	Nový Zéland, Millerton	sladkovodní (kyselé pH)	DQ028577
Klebsormidium acidophilum	Novis KRIV	E1	Nový Zéland, důl Sullivan	sladkovodní (kyselé pH)	DQ028578
Klebsormidium nitens	SAG 32.91	E1	Velká Británie, řeka Gannel	sladkovodní	EU477447

Klebsormidium fluitans	CCAP 335.13	E1	Velká Británie, řeka Hayle	sladkovodní	HQ613246
Klebsormidium fluitans	CCAP 335.14	E1	Velká Británie, řeka Hayle	sladkovodní	HQ613247
Klebsormidium flaccidum	SAG 38.91	E2	Německo, Witzenhausen	x	EU477433
Klebsormidium sp.	GALW015451	E2	Portugalsko, Porto	zed' v městě	EU477451
Klebsormidium sp.	SAG 2108	E2	x	x	HQ613255
Klebsormidium sp.	GALW015473	E2	Francie, Bordeaux	zed' v městě	EU477427
Klebsormidium sp.	CZK03	E2	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	USP09	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USP12	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	W307	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W308	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W312	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W316	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	K19	E2	Česká republika, Koleč	zed' porostlá mechem	x
Klebsormidium sp.	USP01	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	W301	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W303	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	GALW015340	E2	Norsko, Bergen	zed' v městě	EU477424
Klebsormidium sp.	GALW015548	E2	Jižní Afrika, Greskop	zed' v městě	EU477439
Klebsormidium sp.	GALW015463	E2	Německo, Hamburg	zed' v městě	EU477440
Klebsormidium sp.	GALW015499	E2	Německo, Konstans	zed' v městě	EU477441
Klebsormidium sp.	CZK11	E2	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	KL7	E2	USA, Ohio, Cleveland	kámen	x
Klebsormidium sp.	KL71	E2	USA, Ohio, Cleveland	kámen	x
Klebsormidium sp.	Namibia 5	E2	Namibie	umělé kamenné podloží	HQ613252
Klebsormidium nitens	SAG 52.91	E2	Dánsko, ostrov Mors	půda	EU477446
Klebsormidium sp.	CZH03	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH06	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH10	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH14	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x

Klebsormidium sp.	CZH16	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH17	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	K01	E2	Česká republika, České Středohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium sp.	K06	E2	Česká republika, České Středohoří	mech	x
Klebsormidium sp.	K20	E2	Česká republika, Milská stráž	půda	x
Klebsormidium sp.	JVK12	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium dissectum	SAG 2155	E2	Francie, Col du Bussang	půda	EU477429
Klebsormidium sp.	CZH09	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH11	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH12	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH13	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH15	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH19	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH20	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	USP15	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	JVK5	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JVK7	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JVK8	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JVK9	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JVK10	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK13	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	W205	E2	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	W401	E2	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W405	E2	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W416	E2	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	KL89	E2	USA, Connecticut	borka stromu	x
Klebsormidium sp.	KL91	E2	USA, Connecticut	borka stromu	x
Klebsormidium sp.	K02	E2	Česká republika, České Středohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium sp.	K04	E2	Česká republika, České Středohoří	půda	x
Klebsormidium sp.	K05	E2	Česká republika, České Středohoří	kámen, znělec	x

Klebsormidium sp.	K07	E2	Česká republika, České Středohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium sp.	K08	E2	Česká republika, České Středohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium sp.	K12	E2	Česká republika, České Středohoří	půda	x
Klebsormidium sp.	K13	E2	Česká republika, České Středohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium sp.	K18	E2	Česká republika, České Středohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium sp.	K34	E2	Česká republika, Velké Přílepy	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK2	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK6	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	CZV02	E2	Česká republika, kopec Vladař	kámen, čedič	x
Klebsormidium sp.	CZV11	E2	Česká republika, kopec Vladař	kámen, čedič	x
Klebsormidium sp.	CZV12	E2	Česká republika, kopec Vladař	kámen, čedič	x
Klebsormidium sp.	CZV13	E2	Česká republika, kopec Vladař	kámen, čedič	x
Klebsormidium sp.	CZV14	E2	Česká republika, kopec Vladař	kámen, čedič	x
Klebsormidium sp.	CZV15	E2	Česká republika, kopec Vladař	kámen, čedič	x
Klebsormidium sp.	CZV16	E2	Česká republika, kopec Vladař	kámen, čedič	x
Klebsormidium sp.	CZV17	E2	Česká republika, kopec Vladař	kámen, čedič	x
Klebsormidium sp.	USP06	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN06	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	ACKU 799	E2	Ukrajina, Boguslav	žulový výběžek	HQ613261
Klebsormidium sp.	W106	E2	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W115	E2	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W204	E2	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	W208	E2	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	W403	E2	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W407	E2	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	W410	E2	Wales, Merthyr Tydfil	kámen	x
Klebsormidium sp.	K11	E2	Česká republika, České Středohoří	půda	x
Klebsormidium sp.	K26	E2	Česká republika, České Středohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium sp.	K27	E2	Česká republika, České Středohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium sp.	K35	E2	Česká republika, Dražanské údolí	kámen, břidlice	x

Klebsormidium sp.	K37	E2	Česká republika, Dražanské údolí	kámen, břidlice	x
Klebsormidium sp.	K42	E2	Česká republika, České Středoohoří	kámen, znělec	x
Klebsormidium sp.	K47	E2	Česká republika, Dražanské údolí	kámen, břidlice	x
Klebsormidium sp.	KL63	E2	USA, Connecticut	půda	x
Klebsormidium sp.	KL98	E2	USA, Connecticut	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	W206	E2	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	USP19	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USP20	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	W305	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W306	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W309	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W310	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W314	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W302	E2	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium nitens	SAG 335.2b	E2	USA, Barlow	sladkovodní	AF408254
Klebsormidium sp.	KL4	E2	USA, Ohio, Cleveland	kámen	x
Klebsormidium sp.	KL20	E2	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL24	E2	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL25	E2	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL27	E2	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL28	E2	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL29	E2	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL31	E2	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium flaccidum	SAG 37.91	E2	Peru, jezero Titicaca	sladkovodní	HQ613244
Klebsormidium sp.	TR 31	E2	Austrálie	půda	HQ613259
Klebsormidium sp.	JS3	E2	Japonsko, Nikko	silnice	x
Klebsormidium sp.	JS4	E2	Japonsko, Nikko	silnice	x
Klebsormidium nitens	SAG 13.91	E2	Nový Zéland, Tehoa	půda	HQ613248
Klebsormidium sp.	CZH02	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	CZH07	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x

Klebsormidium sp.	CZH18	E2	Česká republika, Kokořínsko	kámen, pískovec	x
Klebsormidium sp.	USN01	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN02	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN03	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN04	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN08	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN10	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN12	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN15	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN19	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	W111	E2	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	KL53	E2	USA, Connecticut	půda	x
Klebsormidium sp.	KL62	E2	USA, Connecticut	půda	x
Klebsormidium sp.	KL101	E2	USA, Connecticut	půda	x
Klebsormidium sp.	KL102	E2	USA, Connecticut	půda	x
Klebsormidium sp.	JS1	E2	Japonsko, Nikko	silnice	x
Klebsormidium sp.	JS2	E2	Japonsko, Nikko	silnice	x
Klebsormidium sp.	JKK17	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JK1	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JK2	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK14	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JVK2	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JVK3	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK1	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK3	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK4	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK10	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK11	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK12	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JVK1	E2	Japonsko, Nikko	kámen	x

Klebsormidium sp.	USN07	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN11	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	USN13	E2	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	W319	E3	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium fluitans	SAG 9.96	E3	Nizozemsko, Rijsenhout	nad vodní hladinou zásaditého jezera	EU477438
Klebsormidium sp.	KL6	E3	USA, Ohio, Cleveland	kámen	x
Klebsormidium flaccidum	GALW015442	E3	Irsko, Galway	zeď v městě	EU477432
Klebsormidium sp.	USN16	E3	USA, Seattle	kámen	x
Klebsormidium sp.	JKK15	E3	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JVK4	E3	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	JVK6	E3	Japonsko, Nikko	kámen	x
Klebsormidium sp.	3KL_SOK	E3	x	x	x
Klebsormidium sp.	ROS85/1	E4	Německo, Borchon	zeď v městě	EU477426
Klebsormidium sp.	GALW015468	E4	Dánsko, Copenhagen	zeď v městě	EU477428
Klebsormidium sp.	GALW015492	E4	Slovinsko, Koper	zeď v městě	EU477442
Klebsormidium sp.	GALW015478	E4	Velká Británie, Londýn	zeď v městě	EU477443
Klebsormidium sp.	GALW015472	E4	Francie, Marseilles	zeď v městě	EU477444
Klebsormidium sp.	GALW015560	E4	Itálie, Pavia	zeď v městě	EU477448
Klebsormidium sp.	GALW015300	E4	Itálie, Pisa	zeď v městě	EU477449
Klebsormidium sp.	GALW015559	E4	Velká Británie, Plymouth	zeď v městě	EU477450
Klebsormidium sp.	GALW015462	E4	Česká republika, Praha	zeď v městě	EU477452
Klebsormidium sp.	GALW015298	E4	Itálie, Siena	zeď v městě	EU477453
Klebsormidium sp.	GALW015493	E4	Malta, La Valletta	zeď v městě	EU477455
Klebsormidium sp.	CZK04	E4	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK17	E4	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK18	E4	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	CZK19	E4	Česká republika, Český Kras	kámen, vápenec	x
Klebsormidium sp.	W304	E4	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W311	E4	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W313	E4	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x

Klebsormidium sp.	W315	E4	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	W317	E4	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	KL9	E4	USA, Ohio, Cleveland	kámen	x
Klebsormidium sp.	KL17	E4	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL32	E4	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL37	E4	USA, Ohio, Cleveland	zed' v městě	x
Klebsormidium sp.	KL72	E4	USA, Ohio, Cleveland	kámen	x
Klebsormidium sp.	KL83	E4	USA, Ohio, Cleveland	borka stromu	x
Klebsormidium sp.	KL84	E4	USA, Ohio, Cleveland	borka stromu	x
Klebsormidium sp.	W320	E4	Wales, okolí přehrady Talybont	kámen	x
Klebsormidium sp.	TR 18	E4	Austrálie	půda	HQ613257
Klebsormidium sp.	KL2	E4	USA, Ohio, Cleveland	kámen	x
Klebsormidium sp.	SAG 2107	E4	x	x	HQ613254
Klebsormidium sp.	SAG 2109	E4	x	x	HQ613256
Klebsormidium sp.	W104	E4	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	W210	E4	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	W212	E4	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	W215	E4	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	W218	E4	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	SAG 2065	E4	Dánsko, Roskilde	lesní plantáž	HQ613253
Klebsormidium flaccidum	SAG 121.80	E5	Německo, Solling	borka buku	EU477431
Klebsormidium sp.	W209	E5	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	W211	E5	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	W217	E5	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	W219	E5	Wales, Brecon	kámen	x
Klebsormidium sp.	K09	E5	Česká republika, České Středohoří	mech	x
Klebsormidium sp.	K40	E5	Česká republika, České Středohoří	mech	x
Klebsormidium sp.	CZL01	E5	Česká republika, Ležky	kámen, žula	x
Klebsormidium sp.	CZL07	E5	Česká republika, Ležky	kámen, žula	x
Klebsormidium sp.	CZL08	E5	Česká republika, Ležky	kámen, žula	x

Klebsormidium sp.	CZL09	E5	Česká republika, Ležky	kámen, žula	x
Klebsormidium sp.	UNA00067477	E5	USA, Florida, jezero June	zed' malého dřevěného domu	EU477437
Klebsormidium subtile	UTEX 462	E6	USA, Aljaška, Port Barrow	x	AF408253
Klebsormidium subtile	SAG 384.1	E6	USA, Aljaška, Port Barrow	ve sněhu	EU477454
Klebsormidium sp.	CZL03	F	Česká republika, Ležky	kámen, žula	x
Klebsormidium sp.	4KL_SOK	F	x	x	x
Klebsormidium crenulatum	SAG 37.86	F	Itálie, Bressanone	půda	HQ613241
Klebsormidium sp.	KL5	F	USA, Ohio, Cleveland	kámen	x
Klebsormidium mucosum	SAG 8.96	F	Nizozemsko, Valkenswaard	půda blízko řeky Dommel	EU477445
Klebsormidium sp.	5KL_SOKont	F	x	x	x
Klebsormidium sp.	W109	F	Wales, Glynneath	kámen	x
Klebsormidium sp.	14613.5e	G	Jižní Afrika, Koeboes	biologická půdní krusta	HQ613249
Klebsormidium sp.	14621.6	G	Jižní Afrika, Západní Kapsko	půdní krusta	HQ613250
Klebsormidium sp.	LUK 318	G	Česká republika	půda ze skládky po těžbě uhlí	HQ613251