

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra botaniky

studijní program: Biologie

studijní obor: Botanika

diplomní zaměření: Algologie a ekologie řas

Diplomová práce

**Molekulární fylogenetika a geometrická morfometrika
aerofytických zelených rias komplexu
Coccomyxa/Pseudococcomyxa s. l.**

(Molecular phylogenetics and geometric morphometrics of aerophytic green algae
of *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* s. l. complex)

Katarína Nemjová



školitel:
Jiří Neustupa

Praha 2009

Prehlasujem, že som predloženú prácu vypracovala samostatne s použitím citovanej literatúry.

Katarína Nemjová

Abstract

This thesis deals with molecular diversity and shape variation of the traditionally delimited unicellular coccoid genera *Coccomyxa* SCHMIDLE and *Pseudococcomyxa* KORŠIKOV (Trebouxiophyceae, Viridiplantae). The complex of these traditional genera was found monophyletic position within the class Trebouxiophyceae on the basis of 18S rDNA sequences. Subdivision of this lineage into individual clades was based on 18S rDNA, ITS1 and ITS2 sequences. The results did not confirm delimitation of traditional genera. However, they suggest ecological differentiation of individual clades. The results of phylogenetic analyses were further supported by reconstructions of ITS2 secondary structures and analyses of the compensatory base changes (CBC) among individual clades. The mutual relationships among clades remained, however, partially unclear. Geometric morphometric variation of cell shapes illustrated pattern that was mostly not correlated with molecular data. This indicates high degree of evolutionary plasticity and possible unreliability of these morphological features in taxonomy of the group.

Obsah

Prológ.....	1
1 Úvod.....	2
1.1 Taxonómia rodu <i>Coccomyxa</i> (s dôrazom na súčasné znalosti).....	2
1.2 Morfológický popis rodu <i>Coccomyxa</i>	6
1.3 Ekológia rodu <i>Coccomyxa</i>	8
1.4 Taxonómia rodu <i>Pseudococcomyxa</i>	10
1.5 Morfológický popis rodu <i>Pseudococcomyxa</i>	11
1.6 Ekológia rodu <i>Pseudococcomyxa</i>	12
1.7 Druhový koncept v komplexe rodov <i>Coccomyxa/Pseudococcomyxa</i>	12
2 Metodika a materiál.....	16
2.1 Kultúry.....	16
2.2 Spracovanie prírodného materiálu.....	16
2.3 Molekulárne metódy.....	16
2.4 Vnútrogenomová variabilita – klonovanie.....	19
2.5 Fylogenetické analýzy.....	20
2.6 Hodnotenie morfológie a geometrická morfometrika.....	22
3 Výsledky.....	24
3.1 Fylogenetická pozícia študovaných kmeňov.....	24
3.2 Molekulárna variabilita v študovaných kmeňoch.....	38
3.2.1 Variabilita v sekundárnej štruktúre ITS2 oblasti.....	39
3.3 Morfológické charakteristiky vybraných kmeňov.....	49
3.4 Morfometrické analýzy vybraných kmeňov.....	56
4 Diskusia.....	68
4.1 Fylogenetická pozícia a vzťahy medzi skupinami.....	68
4.2 Intragenomová variabilita v jednotlivých fylogenetických líniách.....	72
4.3 Ekologické charakteristiky jednotlivých línií.....	74
4.4 Porovnanie tradičných morfológických a morfometrických charakteristík v komplexe <i>Coccomyxa/Pseudococcomyxa</i>	76
5 Záver.....	79
6 Literatúra.....	80
7 Príloha.....	88

Skratky

A	adenín
AIC	Akaikeho informačné kritérium
bp	párov báz
C	cytozín
CAUP	Zbierka rias Univerzity Karlovej
CCALA	Zbierka autotrofných organizmov, Třeboň
CCAP	Culture collection of algae and protozoa, Agryll
CCW	counter clock wise
CNI	closest neighbor interchange
CVA	kanonická diskriminačná anlyza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
f.	firma
G	guanín
GTR	generalized time reversible model
GTR+G	generalized time reversible model s gamma distribucí
GTR+I	generalized time reversible model s výpočtem invariantných pozícií
hLRT	hierarchical likelihood ratio tests
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
ITS	internal transcribed spacer
ML	maximum likelihood
MP	maximum parsimony
NIES	Microbial Culture Collection, Tsukuba, Japan
NJ	neighbor-joining
NNI	nearest neighbor interchange
NO _x	oxidy dusíka
OTU	operačná taxonomická jednotka
PCA	analýza hlavných komponent
PCR	polymerase chain reaction
rDNA	ribozomálna deoxynukleová kyselina
SAG	Culture Collection of algae, Göttingen
SO ₂	oxid siričitý
SPR	subtree pruning-regrafting
SSU	small subunit
T	tymín
TBE	Tris/Borate/EDTA
TBR	tree bisection-reconnection
U	uracil

Prológ

Diplomová práca sa zaoberá molekulárnou diverzitou a tvarovými charakteristikami rodov *Coccomyxa* SCHMIDLE a *Pseudococcomyxa* KORŠIKOV, vymedzených tradičnou morfológiou. Komplex týchto druhov tvorí monofyletickú skupinu v triede Trebouxiophyceae na základe 18S rDNA. Ďalšie členenie v rámci tohoto cladu je podporené analýzami molekulárnych markerov 18S rDNA, ITS1 a ITS2. Sekundárna štruktúra ITS2 oblasti a analýzy compensatory base changes podporujú toto rozdelenie do fylogenetických skupín. Toto rozdelenie však nepodporuje tradičné vymedzenie na základe morfológických kritérií, ale ukazuje sa, že fylogenetické skupiny je možné vymedziť ekologicky. Analýzy tvarových zmien v bunkách potvrdili veľkú variabilitu, tento pattern však neodpovedá ani fylogenetickým skupinám ani ekologickým preferenciám. To spolu so získanými molekulárnymi datami ukazuje na evolučnú plasticitu a pravdepodobne na malú možnosť rozlíšenia medzi taxonomickými jednotkami komplexu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa*.

Tieto a ďalšie poznatky uvedené v tejto práci by nevznikli za odbornej, technickej a osobnej podpory ľudí, ktorým by som rada na tomto mieste poďakovala.

Veľká vďaka patrí Jiřímu Neustupovi za vedenie diplomové práce, za poodhalenie metód geometrickej morfometriky a za nadšený prístup k oboru; Markovi Eliášovi za to, že ma zasvätil do molekulárnej biológie a jej metodiky, za poskytnutie sekvencie kmeňa T4, za podnetné rady, nápady a pripomienky k tejto práci; Pavlovi Škaloudovi za rady ohľadom fylogenetiky a molekulárnych metód, za poskytnutie sekvencie kmeňa K1 a ochotu mi so všetkým poradiť; Veronike Kaufnerovej za poskytnutie sekvencií kmeňov zo Šumavy C13, C14, C15 a C16 a za povzbudivé slová, Ondrovi Peksovi za poskytnutie kmeňov symbiontov z lišajníkov a Pavlovi Příbylovi za poskytnutie kmeňa A1.

Yvonne Němcovej, Jane Veselej, Honzovi Šťastnému, Katke Černej, Martine Pichrtovej, Aničke Kynčlovej, Renáte Svátkovej, Davidovi Šubrtovi a ďalším ľuďom z algologického pracoviska vďačím za vytvorenie príjemného a tvorivého pracovného prostredia.

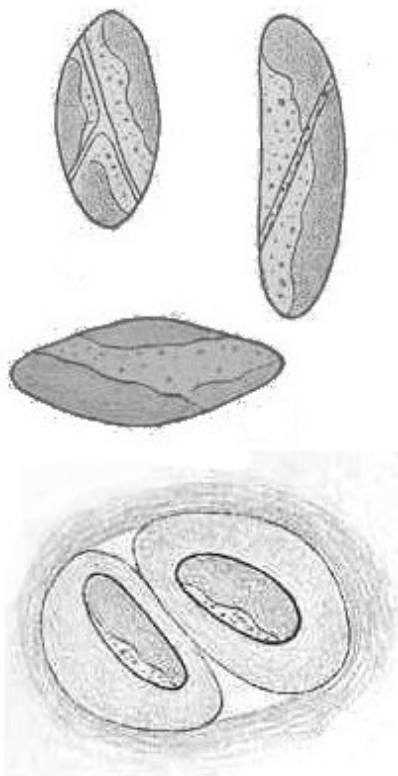
Rodičom ďakujem za finálnu podporu počas celého štúdia, bez ktorej by som sa nemohla téme venovať tak podrobne. Súčasne si veľmi cením aj trpezlivosť, ktorú so mnou mali počas dopisovania práce.

1 Úvod

Diplomová práca sa zaoberá molekulárnou a morfometrickou diverzitou morfotypov *Coccomyxa/Pseudococcomyxa*. Tieto rody boli popísané ako 2 rozdielne rody na základe morfolologickej variability. V literárnom prehľade sa venujem taxonómii týchto dvoch rodov od popísania až do súčasnosti, morfológickému popisu rodov a ich ekológii.

1.1 Taxonómia rodu *Coccomyxa* (s dôrazom na súčasné znalosti)

Rod *Coccomyxa* popísal SCHMIDLE (1901) ako slizový nárost spod jedle z okolia Heidelbergu. Vyznačuje sa oválnymi bunkami samostatne alebo po dvojiciach či štvoriciach buniek uložených v zdanlivo bezštruktúrnym slize. Bunky majú rozdielne konvexné uhly dlhších strán a zaguľatené alebo zúžené konce buniek. Parietálny chloroplast väčšinou nepokrýva celú bunku, ale odhaľuje cytoplasmu s malým jadrom a niekoľkými tukovými inklúziami. Pyrenoid chýba (SCHMIDLE 1901). Typový druh rodu *Coccomyxa confluens* (KÜTZING) FOTT



Obr. 1 *Coccomyxa confluens*, typový druh rodu, pôvodné kresby (Schmidle 1901)

(FOTT 1974) (Obr. 1) sa rozmnožuje šikmým delením bunky v materskej stene, niekedy v krížovom usporiadaní, takže vzniknú štyri autospory. Najčastejšie však tvorí dve autospory (KOSTIKOV ET AL. 2002b). *Coccomyxa confluens* však nie je pôvodným názvom pre tento druh. SCHMIDLE (1901) typový druh trefne nazval *Coccomyxa dispar* SCHMIDLE, čím vystihol jej variabilitu, nielen morfológickú, ale ako sa neskôr ukázalo i jej habitatovú nešpecificitu (pôda, epifyty, lišajníky) (JAAG 1933). Neskoršie štúdie VAN DEN HOEKA (1963) poukázali na podobnosť druhov *Gloeocapsa confluens* KÜTZING a *G. montana* s druhom *Coccomyxa dispar*. Jeho pozorovania potvrdil FOTT (1974), keď uviedol paratyp *Coccomyxa confluens*. Malé rozmery buniek a slizový obal sťažovali jednotlivé pozorovania a správne zaradenie tohto organizmu do druhu a začlenenie do systému dovedy známych organizmov. Polemika okolo taxonomického zaradenia prebiehala od vzniku rodu.

SCHMIDLE (1901) diskutoval príbuznosť a podobnosť s rodmi *Dactylococcus*, *Dactylothece* a *Raphidium*. Druh *Dactylococcus dispar* varíruje vo veľkosti a tvare buniek, ale podľa diagnózy W. G. Westa nie je zrejmá prítomnosť pyrenoidu ani štruktúra slizu a rozmiestenie buniek (SCHMIDLE 1901). Druh *Dactylococcus natans* CHODAT (= *D. lacustris* CHOD.) považuje takisto za blízko príbuzný, avšak jasne odlišiteľný na základe tvaru, prítomnosti pyrenoidu a výskytu. SCHMIDLE (1901) považoval rod *Coccomyxa* za spojovací prvok medzi rodmi *Raphidium* a *Dactylothece* LANGERHEIM. Bohužiaľ u rodu *Raphidium* neuvádza meno autora, takže nie je zrejmé o aké *Raphidium* ide, pretože taxonómia rodu *Raphidium* v tej dobe nebola jasná a mnoho vtedajších druhov *Raphidium* je dnes basionymom pre odlišné rody. V tej dobe do rodu *Raphidium* patrili niektoré druhy, ktoré v súčasnosti patria do rodu *Elakatothrix* WILLE a niektoré do rodu *Raphidonema* LANGERHEIM (ETTL & GÄRTNER 1995). Za najpríbuznejší považoval práve rod *Raphidium*, ktorý neobsahuje pyrenoid a rozmnožuje sa priečnym delením. Na základe tohto tvrdenia sa môžeme prikláňať k názoru, že sa jedná o súčasný rod *Raphidonema* LANGERHEIM, pretože ten obsahuje buď nahý alebo žiadny pyrenoid. Tvar bunky je síce výrazne rozdielny, ale to SCHMIDLE (1901) nepovažuje za podstatné, pretože vo vode žijúce tetrasporické riasy netvoria sliz. Toto zaradenie k triede Oocystaceae podporoval i CHODAT (1913) začlenením rodu do Protococcoidee, pretože u *C. dispar* pozoroval len rozmnožovanie pomocou autospor. Dovtedy monotypický rod súčasne rozšíril o nové druhy voľne žijúce i symbiotické z lišajníkov *Peltigera* a *Solorina* (CHODAT 1913).

Tvorbu priečnej priehradky ako pri pravom bunkovom delení pozoroval jedine PRINTZ (1927), na základe čoho zaradil rod *Coccomyxa* do Pleurococcaceae. Toto pozorovanie bolo ostatnými algologmi odmietnuté, rovnako ako pozorovanie zoospor u *Coccomyxa subellipsoidea* ACTON (JAAG 1933). PRINTZ (1927) problematizoval zaradenie rodu nielen v rámci triedy Chlorophyceae, ale diskutoval i možnosti, že bunky rodu *Coccomyxa* sú len časťou zložitého životného cyklu Ulotrichaceae alebo ich redukovanými zástupcami, či dokonca, že patria ku skupine Heterokontophyta.

Nedostatočné poznanie nielen spôsobu rozmnožovania, ale aj iných popisných znakov ako je prítomnosť pyrenoidu a tvar buniek viedli švajčiarskeho algologa Otta von Jaaga k revízii rodu *Coccomyxa*. V tej dobe, tridsaťdva rokov od popísania rodu SCHMIDLEM (1901), už rod obsahoval 32 druhov (JAAG 1933). JAAG (1933) sa podujal problém rodu riešiť priamym pozorovaním a porovnávaním paralelných kultúr. Študoval nielen morfológiu jednotlivých kmeňov v závislosti na kultivačných podmienkach a dedičnosť tvarovej variability, ale zaoberal sa aj fyziológiou jednotlivých kmeňov. Študované kmene získal vlastnou

izoláciou z prírodného materiálu a zo zbierok iných algológov (JAAG 1933).

JAAG (1933) žiadne pleurokokálne delenie buniek nepozoroval, a preto zastával názor, že rod patrí do Protococcoideae, rovnako ako jeho učiteľ CHODAT (1913). Jaagova monografia utriedila vtedajšie znalosti o jednotlivých druhoch a nemalým dielom prispela k rozšíreniu vedomostí o rode *Coccomyxa*. Tento radostný stav ucelených poznatkov, však netrval ani dvadsať rokov, keď popisáním nového rodu *Pseudococcomyxa* KORŠIKOV sa znovu otvorila diskusia okolo zaradenia rodu a niektorých druhov (KORŠIKOV 1953, HOEK 1963, FOTT 1974, FOTT 1981). Systém zelených rias v tej dobe radil zelené kokálne sliz produkujúce riasy najčastejšie do skupiny Palmellaceae alebo Chlorellaceae (KORŠIKOV 1953), ako rozlišovacie znaky rodov sa používali tvar buniek, typ a počet chloroplastov, prítomnosť pyrenoidu, počet autospor, pretrvávajúce bunkovej steny autosporangia po uvoľnení autospór a umiestenie buniek v kolónii. FOTT (1974) na základe podobností s druhom *Palmeloglea protuberans* KÜTZING (koncentrický sliz) preradil rod do skupiny Palmogloeaceae FOTT (=Radiococcaceae FOTT EX KOMÁREK 1979) (Chlorococcales) (ETTL & GÄRTNER 1995), ktorú definoval ako skupinu rozmnožujúcu sa hlavne autosporami, zriedkavo zoosporami (KOSTIKOV ET AL. 2002b). Pri ďalšej revízii tejto skupiny v nej zostali výhradne autosporinné zelené riasy (KOMÁREK & FOTT 1983, ETTL & GÄRTNER 1995). Čeľaď Radiococcaceae teda môže byť definovaná ako zelené riasy rozmnožujúce sa autosporami, s guľovitými alebo elipsovými bunkami s hladkou bunkovou stenou, uloženými v slize (KOSTIKOV ET AL. 2002b). KOSTIKOV ET AL. (2002b) však upozorňuje, že morfológické znaky sa v tejto skupine nepoužívajú konzistentne a mnoho druhov nebolo popísaných správne, preto postavil nový systém skupiny, kde jasne stanovil dôležitosť jednotlivých morfológických znakov. K jednotlivým skupinám patriacim do čeľade však chýbajú fylogenetické a ultraštruktúrne data, takže ani tento umelý systém sa nedá považovať za konečný a platný. Rod *Coccomyxa* samozrejme zaradil do tejto čeľade, pretože svojim vzhľadom si odpovedá s Radiococcaceae. Ale kvôli konzistencii znakov rod *Coccomyxa* rozčlenil do niekoľkých nových rodov (*Sphaerococcomyxa*, *Coenodispora*, *Coenobotrys*, *Neocystis* a *Planctococcomyxa*), ktorým sa budem venovať v podkapitole o druhovom koncepte. Tento počín bez fylogenetických podkladov bol neopodstatneným, hlavne keď vezmeme do úvahy, že ten istý autor v tom istom roku na konferencii v Smoleniciach deklaroval príbuznosť s rodom *Pseudococcomyxa* (KOSTIKOV ET AL. 2002a), ktorý vo svojej revízii skupiny Radiococcaceae (KOSTIKOV ET AL. 2002b) vôbec nezmieňuje. Ďalšie práce koncept skupiny Radiococcaceae rozbili a ukázali, že Radiococcaceae boli a sú len sbernou skupinou rias, ktoré na základe sekvencií 18S rDNA patria do tried Trebouxiophyceae a Chlorophyceae (WOLF ET AL. 2003, PAŽOUTOVÁ 2008). Fylogenetické

analýzy, ktoré skúmali fotobionty rodu *Coccomyxa* jednoznačne zaradili rod do triedy Trebouxiophyceae ako sesterskú skupinu k rodu *Nannochloris* (LOHTANDER ET AL. 2003). Sekvencie označené týmto názvom boli získané z organizmov uložených v zbierke SAG pod číslami 251-1, 251-2 a názvom *Choricystis* (SKUJA) FOTT. Trieda Trebouxiophyceae vznikla odčlenením od triedy Chlorophyceae na základe rozdielov v sekvenciách 18S ribozomálnej DNA. Trieda sa však vyznačuje i spoločnými morfológickými znakmi ako je metacentrická mitóza, CCW (counter clockwise) pozícia bičíkových koreňov a nepohyblivé vegetatívne bunky (FRIEDL 1995). Trieda sa považuje za takzvanú skupinu lichenizovaných rias. Priekopníkmi v analýze sekvencií DNA u rodu *Coccomyxa* boli ZOLLER & LUTZONI (2003), ktorí analyzovali fotobionty rôznych druhov kalichovky *Omphalina* QUELET (Basidiomycota). Už táto prvá štúdia ukázala, že rod *Coccomyxa* tvorí niekoľko podskupín (klastrov) a to najmenej jednu zloženú z voľne žijúcich zástupcov a dve skupiny asociované s mykobiontom v lišajníku – skupinu asociovanú s kalichovkou *Omphalina* (Basidiomycota) a skupinu asociovanú s lišajníkmi z rádu Peltigerales (ZOLLER & LUTZONI 2003). Vzťahy medzi týmito skupinami sa však nepodarilo jednoznačne vyriešiť. Zvlášnosťou je, že jediný druh *Coccomyxa subellipsoidea* tvorí asociácie naprieč rôznymi druhmi kalichoviek a rôznymi kontinentami (ZOLLER & LUTZONI 2003), táto silná konzervácia je doprevádzaná veľmi nízkymi substitučnými rýchlosťami u fotobionta. Vyššie substitučné rýchlosti u fotobiontov z Peltigerales a voľne žijúcich druhov *Coccomyxa* mohli spôsobiť efekt priťahovania dlhých konárov (long branch attraction) (FELSENSTEIN 1978), a tak umelo vytvoril monofyletickú skupinu fotobiontov kalichoviek (ZOLLER & LUTZONI 2003). Na nízku variabilitu ITS oblasti (oblasť DNA použitá i v štúdiu ZOLLER & LUTZONI (2003)) upozorňovala LOHTANDER ET AL. (2003), ktorá sa kvôli tomu rozhodla pre analýzy fotobiontov v lišajníkoch *Peltigera* WILLD. a *Nephroma* ACH. použiť oblasť 18S rDNA (SSU DNA). Táto nízka variabilita však bola len medzi kmeňmi získanými z väčšiny štítnatcov (*Peltigera*) a nefróm (*Nephroma*), od nich sa výrazne odlišovali sekvencie získané z fotobionta *Peltigera britannica* a *Coccomyxa glaronensis* JAAG CCALA306, čo vypovedá o malej diverzite sekvencií ITS len v skupine fotobiontov z *Nephroma* a *Peltigera* (sekvencie sa líšili v jednej bázi), ale zároveň je prekvapivé, že fotobiont z *P. britannica* a *C. glaronensis* sa tak výrazne odlišovali od ostatných fotobiontov z Peltigerales a od seba navzájom, čo by mohlo ukazovať na niekoľkonásobný vznik mutualistického vzťahu u tejto skupiny lišajníkov. Na základe SSU DNA skúmaní fotobionti tvorili jeden klaster (skupinu) s dobrou bootstrapovou podporou. V tomto klade sa od seba jednoznačne oddelili dve podskupiny fotobionti z *Nephroma* a *Peltigera* a *C. glaronensis* s endofytmi izolovanými z *Ginkgo biloba* (LOHTANDER ET AL.

2003). Rod *Coccomyxa* netvorí len mutualistické vzťahy s mykobiontom v lišajníkoch, ale v rôznej miere kolíše medzi symbiotickým až parazitickým spôsobom života so zástupcami ríši Opisthokonta, Plantae a Chromalveolata (SIMPSON & ROGER 2004, RODRÍGUEZ ET AL. 2008, LEWIS & MULLER-PARKER 2004, STEVENSON & SOUTH 1974, TRÉMOUILLAX-GUILLER ET AL. 2002, HOSHINA & IMAMURA 2008, MAINX 1928). Sú známe organizmy, ktoré parazitujú na slávke jedlej *Mytilus edulis* a fylogeneticky patria do skupiny *Coccomyxa*. Najbližšiu príbuznosť vykazujú s *C. glaronensis* (RODRÍGUEZ ET AL. 2008). Typová kultúra *C. parasitica* STEVENSON & SOUTH (CCAP 216-18) však na základe sekvencií 18S rDNA patrí k kladu *Nannochloris*. RODRÍGUEZ ET AL. (2008), však diskutujú možnosť, že typová kultúra prerástla iným organizmom, pretože morfológicky si tento kmeň neodpovedá s popisom tohto druhu (STEVENSON & SOUTH 1974), ale súhlasí s práve nimi vyizolovanými parazitickými *Coccomyxa* zo slávky jedlej *Mytilus edulis*. Endofyty získané z *Ginkgo biloba* patria takisto do príbuznosti k *C. glaronensis* (TRÉMOUILLAX-GUILLER ET AL. 2002). Naproti tomu symbiont z *Paramecium bursaria* patrí do druhej skupiny do bližšej príbuznosti k *C. pringsheimii* (HOSHINA & IMAMURA 2008). Analýza sekvencií 18S rDNA rozdeľuje rod *Coccomyxa* do dvoch subkladov, s *C. pringsheimii* JAAG a s *C. glaronensis*. Ich spoločný konár rovnako ako ich samostatné línie sú podporené vysokými bootstrapmi v maximum likelihood, maximum parsimony a neighbor-joining analýzach (HOSHINA & IMAMURA 2008).

1.2 Morfológický popis rodu *Coccomyxa*

Bunky rodu *Coccomyxa* sú malých rozmerov a variabilného tvaru, vždy dlhšie než širšie, na koncoch zaguľatené alebo sa zužujúce. Bunky sú buď rovné, alebo mierne konvexné. Môžu byť vretenovité, elipsovité až skoro okrúhle (guľovité), niekedy s rôznymi výbežkami (SCHMIDLE 1901, KOMÁREK & FOTT 1983). Veľkosťne spadajú do rozmedzia 7-14 x 4-10 μm (JAAG 1933).

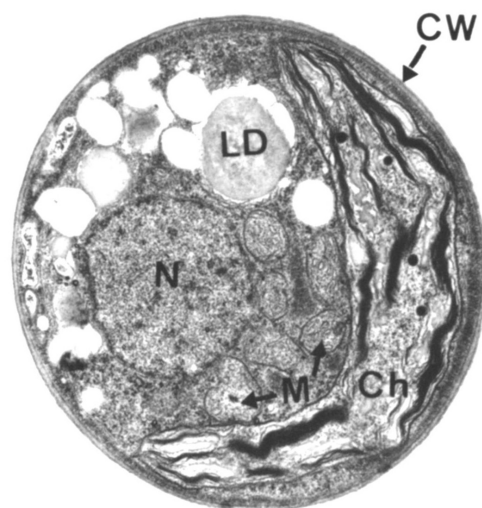
Bunku chráni tenká hladká bunková stena, ktorá je 40-100 nm široká (PEVELING & GALUN 1976). U endofyta z *Ginkgo biloba* je ešte užšia maximálne do 50 nm (TRÉMOUILLAX-GUILLER ET AL. 2002). Plazmatická membrána neprilieha u všetkých buniek tesne k bunkovej stene, ale tvorí invaginácie, v ktorých sa nachádzajú jemné granulózne štruktúry (PEVELING & GALUN 1976).

V bunkách sa nachádza jeden parietálny chloroplast, často hrncovitého alebo žliabkovitého tvaru, vyplňujúci viac než polovicu bunky (JAAG 1933, PEVELING & GALUN 1976, TRÉMOUILLAX-

GUILLER ET AL. 2002). Chloroplast je preplnený tylakoidmi, medzi ktorými občas leží škrobové zrnko (PEVELING & GALUN 1976, TRÉMOUILLAX-GUILLER ET AL. 2002).

Diskutovaný pyrenoid sa u rodu *Coccomyxa* nevyskytuje (FOTT 1974, KOMÁREK & FOTT 1983, GRAHAM & WILCOX 2002). Avšak bolo popísaných niekoľko druhov, u ktorých bol pyrenoid pozorovaný. V súčasnosti im KOSTIKOV ET AL. (2002b) vyčlenil vlastný rod. Avšak pyrenoid nebol pozorovaný len u niektorých iných druhov, ale aj priamo u typového druhu. JAAG (1933) v čerstvom materiáli *C. dispar* (= *C. confluens*) pozoroval veľký a zreteľný pyrenoid blízko stredu chloroplastu, ktorý sa farbilo jódou na typickú modrú farbu. Pôvodný typový materiál pyrenoid neobsahoval (SCHMIDLE 1901, JAAG 1933). Na základe toho do rodu zahrnul aj druhy, ktoré obsahovali pyrenoid (JAAG 1933). Prítomnosť alebo neprítomnosť pyrenoidu nemusí byť podstatným znakom na rodovej či druhovej úrovni (KRIENITZ ET AL. 2001).

V bunke sa okrem chloroplastu nachádzajú typické eukaryotické štruktúry. Jadro je svetelným mikroskopom ťažko pozorovateľné (SCHMIDLE 1901, JAAG 1933). V bunke sa nachádza jedna až niekoľko mitochondrií s tubulárnymi kristami (TRÉMOUILLAX-GUILLER ET AL. 2002, PEVELING & GALUN 1976). Archaeplastida sa však vyznačujú plochými kristami v mitochondriách (ADL ET AL. 2005). Tubulárne mitochondriálne kristy svedčia o intenzívnom metabolizme lipidov (TRÉMOUILLAX-GUILLER ET AL. 2002). Už SCHMIDLE (1901) a JAAG (1933) pozorovali v bunkách zrnčka nejasného pôvodu. Nefarbili sa ani jódou ani hematoxylínom. Ich predpoklad, potvrdili neskoršie štúdie ultraštruktúry – v bunkách rodu *Coccomyxa* sa nachádza väčšie množstvo tukových kvapiek (Obr. 2) (PEVELING & GALUN 1976,



Obr. 2 Endofyt z *Ginkgo biloba*, rez bunkou, CW bunková stena, LD tukové kvapky, M mitochondria s tubulárnymi kristami, Ch chloroplast, N jadro, mierka 500nm, obrázok prevzatý z TRÉMOUILLAX-GUILLER ET AL. (2002)

TRÉMOUILLAX-GUILLER ET AL. 2002). U fotobiontov lišajníkov sa v bunkách ešte nachádza multivesikulárny komplex, ktorý s kultiváciou v kultúrach mizne (PEVELING & GALUN 1976).

Dôležitým znakom pri determinovaní zelených mikroskopických rias je spôsob rozmnožovania. Rod *Coccomyxa* sa rozmnožuje výhradne autosporami. Najčastejšie sú autosporangia s dvoma autosporami, ale u niektorých druhov je typický i počet štyri autospory na autosporangium. Za určitých podmienok môže vzniknúť až osem autospor v autosporangiu (JAAG 1933, ETTL & GÄRTNER 1995). Autospory sa uvoľňujú zoslizovaním

bunkovej steny autosporangia (KOSTIKOV ET AL. 2002b).

Tvorba autospor začína delením chloroplastu šikmo dohora (Obr. 1). Materská membrána sa na delení nezúčastňuje, ale v hyalinnom priestore sa začne tvoriť slizový obal. Novo vzniklé bunky sa na koncoch zaoblia a zostanú vedľa seba ležať v posunutej paralelnej pozícii. U deliacich sa buniek môže nastať hneď ďalšie delenie, takže vzniknú v krížovom usporiadaní hneď štyri dcerinné bunky (SCHMIDLE 1901). Jadro sa delí v metacentrickom usporiadaní (FRIEDL 1995, GRAHAM & WILCOX 2000). JAAG (1933) popisuje delenie ako vznik 2 alebo 4 autospor vnútri materskej membrány, ktorá postupom času nabobtná a zahlieni sa (u druhu *C. confluens*). U fotobiontov lišajníkov však pozoroval produkciu slizu priamo materskou membránou (JAAG 1933).

1.3 Ekológia rodu *Coccomyxa*

Rod *Coccomyxa* sa všeobecne považuje za aerofytický (ETTL & GÄRTNER 1995). Riasové organizmy žijúce v terestrickom prostredí sa tomuto habitatu prispôbili svojou morfológiou a fyziológiou. Za najdôležitejší faktor pre typicky vodné organizmy pri prechode na súš sa považuje voda (vzdušná vlhkosť) (KALINA & VÁŇA 2005). A preto sa u terestrických rias museli vyvinúť mechanizmy ako zabrániť stratám vody. Riasy znižujú pomer medzi povrchom a objemom, takže rozmanitosť tvarov klesá a bunky sa zaguľacujú. Slizový obal je ďalšou evolučnou novinkou, ktorá zvyšuje odolnosť voči vysychaniu.

Druhy rodu *Coccomyxa* sú kozmopolitne rozšírené, s preferenciou k acidofilným substrátom. Väčšina zástupcov je terestrická (*C. confluens*, *C. naegeliana* (ARTARI) WILLE). Tri druhy boli popísané z vodného prostredia. *C. lacustris* (CHODAT) CHODAT, *C. chodatii* JAAG a *C. litoralis* (HANSGIRG) WILLE. *C. litoralis* je jediným voľne žijúcim morským zástupcom. Od popísania však už nebol zaznamenaný žiadny nález. Obe sladkovodné *Coccomyxa* druhy sa v súčasnosti nepovažujú za platné taxony rodu (GUIRY & GUIRY 2009).

V terestrickom prostredí sa vyskytujú v pôde, na skalách, alebo epifyticky na borke stromov, listoch, ihliciach a lišajníkoch, či epixylicky na mŕtvom dreve. Spektrum habitatov je široké. V spoločenstvách rias týchto mikrobiotopov druhy rodu *Coccomyxa* len málokedy dominujú. Tvorí však jeho nezdabateľnú súčasť. V súčasnosti je častejšie pozorovaný fenomén epifytických rias na ihličí (BRÅKENHJELM & QINGHONG 1995, SØCHTING 1997), ktorý koreluje so znečistením ovzdušia a zvýšeným spadom emisií NO_x a SO₂ z ovzdušia. Oxid siričitý poškodzuje kutikulu ihlíc a tie sa tak stávajú dobrým substrátom pre uchytenie rias, zároveň

zdroj dusíka podporuje ich rozvoj. Na rozvoj týchto, ale aj iných aerofytických spoločenstiev má vplyv aj vzdušná vlhkosť a dĺžka vegetačného obdobia. Preferujú teplú a vlhkú jeseň (BRÄKENHJELM & QINGHONG 1995, BRÜCK 1983). Humidita prostredia má na rozvoj týchto spoločenstiev nezanedbateľný vplyv, dokonca sa zdá, že je to spolu s osvetlením najdôležitejší faktor osídlenia tohto mikrohabitatu (SØCHTING 1997). Tento názor podporuje i štúdia GORRASSONA (1998), kde poukazuje na zvýšený výskyt týchto spoločenstiev na ihličí rodu *Picea* a porovnáva ho s minimálnymi epifytickými spoločenstvami na ihličí rodu *Pinus*. Smrek má uzatvorenejšiu korunu, kratšie viacročné ihlice sú posadené blízko u seba, a tak lepšie udržiavajú vzdušnú vlhkosť.

Status lichenizovanej riasy (FRIEDL 1995) rodu *Coccomyxa* náležite patrí. Väčšina zástupcov bola popísaná zo symbióz s lišajníkmi. Rod tvorí lichenizované symbiózy s rodmi *Peltigera*, *Solorina*, *Nephroma*, *Omphalina*, *Botridina*, *Icmadophila*. Zatiaľ sa nevie, či rod má predispozície k vstupu do týchto spoločenstiev, alebo a tomuto stavu symbiotické druhy prispôbili až druhotne (ZOLLER & LUTZONI 2003). Jedno je však isté, v spoločnosti mykobionta sa im darí.

Symbionti lišajníkov sú pravdepodobne uspôsobení menšími a okrúhlejšími bunkami. Táto vlastnosť sa môže v kultúrach strácať (JAAG 1933). Ukazuje sa, že v rode *Coccomyxa* vznikla lišajníková symbióza niekoľkokrát nezávisle na sebe. Najmenej dvakrát – prvýkrát u Ascomycota v skupine Peltigerales a druhýkrát u Basidiomycota s rodom *Omphalina*. Zdá sa, že niektorí mykobionti vytvárajú symbiózu len s konkrétnym druhom riasy, iné hubové symbionty zase nie sú až tak špecifické a tvoria symbiózy s celou skupinou rias (JAAG 1933, ZOLLER & LUTZONI 2003, KALINA & VÁŇA 2005).

Mutualistický vzťah mykobionta a fotobionta, však nie je vždy ľahko určiteľný ako symbióza. Často ukazovalo, že hubové mycélium viac-menej parazitovalo na fotobiontovi. Až v poslednej dobe sa zistilo, že to môže byť i naopak a fotobiont „parazituje“ na mykobiontovi (KALINA & VÁŇA 2005). Rod *Coccomyxa* je známy i svojimi parazitickými zástupcami. Nie sú však známe prípady, kde by napadal hubové organizmy. Prvými pozorovanými parazitovanými organizmami boli morské bezstavovce (*C. astericola* ROSENVINGE, *C. ohiurae* ROSENVINGE, *C. parasitica* STEVENSON & SOUTH). STEVENSON A SOUTH (1974) zistili, že parazitický spôsob života je u druhu *C. parasitica* fakultatívny. Parazitizmus je akési prilepšenie životasprávy. V okolí parazitovaných *Placoplecten magellanicus* sa však žiadna voľne žijúca *Coccomyxa* nenašla. Druh *C. parasitica* bol neskôr pozorovaný v ďalších morských mäkkýšoch (GRAY ET AL. 1999, LEWIS & MULLER-PARKER 2004). Rod *Coccomyxa* pravdepodobne napáda len oslabené jedince. Napadnutí jedinci väčšinou dokážu

udržať populáciu infektora v rozumnej miere, avšak v niektorých prípadoch môže dôjsť k premnoženiu riasy a to spôsobí odumieranie tkanív hostiteľa a jeho smrť (STEVENSON & SOUTH 1974).

Mutualistické vzťahy v rode *Coccomyxa* sa však neprikláňajú len k zvýhodneniu buniek rodu *Coccomyxa*. Zistilo sa, že zástupca rodu *Coccomyxa* žije endosymbioticky s jedincami druhu *Ginkgo biloba*, kde sa pravdepodobne podieľa na metabolizme lipidov (TRÉMOUILAX-GUILLER & HUSS 2007). Táto endosymbióza je svetovo rozšírená. Endosymbiont v hostiteľských bunkách prekonáva niekoľko štádií. V prekuzore sa dajú rozpoznať mitochondrie a jadro, tylakoidy sú v tomto štádiu nedovyvinuté. Vyvinú sa až v štádiu dozrelej bunky (TRÉMOUILAX-GUILLER 2002). Tento unikátny typ endosymbiózy sa dedí vertikálne, je to jediný pozorovaný prípad endosymbiózy medzi dvoma zástupcami ríše Plantae (Archaeplastida) (TRÉMOUILAX-GUILLER & HUSS 2007).

1.4 Rod *Pseudococcomyxa* a jeho taxonomické zaradenie

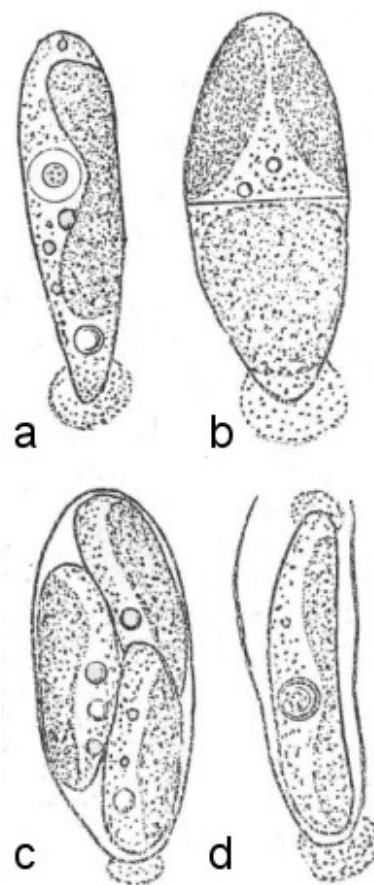
Tento rod už neprekonal tak rozsiahle taxonomické zmeny ani nepodnietil tak vášnivé diskusie o taxonomickom vymedzení. Je však nemenej zaujímavý, práve kvôli výraznej morfolologickej podobnosti s rodom *Coccomyxa*. Rod *Pseudococcomyxa* KORŠIKOV má bunky pozdĺžne vajcovité, niekedy zaokrúhlené, často nesymetrické s rôznymi pólmi bunky. Chloroplast je žliabkovitý bez pyrenoidu (MAINX 1928, KORŠIKOV 1953), niekedy tvorí laloky, takže pripomína zástupcov Xanthophyceae (BROADY 1987). Bunky na užšom póle bunky tvoria slizový disk, ktorým sa prichytávajú k podkladu. Rovnako ako rod *Coccomyxa* rozmnožuje sa len vegetatívne, produkciou autospor (2-4 v autosporangiu). Rody sa však líšia spôsobom uvoľňovania autospor zo sporangia. U rodu *Pseudococcomyxa* sa autospory uvoľňujú ruptúrou materskej bunkovej steny, na rozdiel od rodu *Coccomyxa*, kde sa materská bunková stena rozpustí (ETTL & GÄRTNER 1995). KORŠIKOV (1953) popísal tento rod ako monotypický s jediným druhom *P. adhaerens* (Obr. 3) a zaradil ho do čeľade Ankistrodesmaceae, trieda Chlorophyceae. Do tejto čeľade patria jednobunkové riasy tvoriace sliz na jednom alebo na oboch pólach bunky, ktorým držia pohromade dve, štyri alebo osem buniek. Čeľaď Ankistrodesmaceae považoval za sesterskú s čeľaďou Oocystaceae (KORŠIKOV 1953). Zaradenie rodu sa už nemenilo.

Jedinou zmenou systému bolo posunutie čeľade Ankistrodesmaceae sensu KORŠIKOV na nižšiu taxonomickú jednotku, kde sa rod *Pseudococcomyxa* začal radíť do podčeľade Ankistrodesmoideae, čeľad' Chlorellaceae (FOTT & KOMÁREK 1983, Ettl & GÄRTNER 1995). V súčasnosti sa rod radí do čeľade Oocystaceae (GUIRY & GUIRY 2009). Podľa fylogenetických analýz rody *Pseudococcomyxa* a *Coccomyxa* tvoria spoločnú evolučnú líniu a pravdepodobne budú zlúčené do jedného rodu *Pseudococcomyxa*, pretože k tomuto rodu existuje typová kultúra (FRIEDL ET AL. 2007). Typová kultúra bola vyizolovaná Pringsheimom z *Paramecium bursaria* a je uložená v zbierke CAUP pod názvom H102 *Pseudococcomyxa simplex*.

Ani masívne presuny zástupcov medzi rodmi, či iných zástupcov do rodu sa nekonali. To však môže byť iba dôsledok síce kozmopolitného výskytu, ale malých abundancií. Súčasne sú bunky rodu veľmi variabilné, a tak Koršikovov popis odpovedá veľkému množstvu variability.

FOTT (1981) na základe MAINXOVHO (1928) popisu usúdil, že druh *Coccomyxa simplex*, odpovedá KORŠIKOVU (1953) popisu *P. adhaerens*, a tak ustanovil novú kombináciu pre holotyp rodu *P. simplex* (MAINX) FOTT. KORŠIKOV (1953)

popísal druh ako voľne žijúci z potoka a MAINXOV (1928) typový kmeň pochádzal z kultúry črievičky *Paramecium bursaria*. FOTT (1981) predpokladal, že do rodu *Pseudococcomyxa* budú priradení aj ďalší zástupci rodu *Coccomyxa* (*C. glaronensis* JAAG, *C. ovalis* JAAG, *C. pringsheimii* JAAG, *C. solorinae-bisporae* JAAG, *C. subellipsoidea* ACTON), kvôli tomu, že sliz sa u nich tvorí iba na špičke bunky. To sa však nikdy nestalo.



Obr. 3 *Pseudococcomyxa simplex*, pôvodná kresba (Koršikov 1953): a - vegetatívna bunka, b - delenie bunky, c - autosporangium, d - bunka, ktorá zostala po uvoľnení autospor v bunkovej stene sporangia

1. 5 Morfológický popis rodu *Pseudococcomyxa*

Bunky rodu *Pseudococcomyxa* sú vždy dlhšie než širšie, malých rozmerov v rozmedzí od 7 – 10 μm dĺžky a 2 – 4 μm šírky. Tvar majú takisto veľmi variabilný, bunky sú často nesymetrické, vajcovité, oválne, elipsovité s jedným pólom bunky viac zašpičatylým. Plazmatická membrána prilieha tesne k bunkovej stene tvorenej sporopolenínom (GROSS 2000). Tenká bunková stena môže byť na užšom póle zhrubnutá do papily, kde sa vylučuje slizový disk, ktorým sa bunky prichytávajú vzájomne a k podkladu. V bunke sa nachádza rozmerný parietálny chloroplast, často laločnatý, ktorý neobsahuje pyrenoid (BROADY 1987). Medzi tylakoidmi v chloroplaste sa zriedkavo vyskytujú škrobové zrnká. V cytoplazme sa hromadia olejové kvapky (BROADY 1987), tie sú pozorovateľné i svetelným mikroskopom (MAINX 1928, KORŠIKOV 1953). Bunky sa rozmnožujú jedine nepohlavne priečnym delením, ktoré prebieha šikmo k protiláhlej bunkovej stene, ale boli pozorované i iné smery delenia (MAINX 1928, HINDÁK 1984). Bunky sa rozmnožujú autosporami. Zvyčajne tvoria dve alebo štyri autospory, zriedkavo osem, ktoré sa uvoľňujú ruptúrou bunkovej steny sporangia na širšom konci bunky. V materskej bunkovej stene často zostáva jedna autospóra, ktorá sa ďalej vyvíja (Obr. 3) (KORŠIKOV 1953, BROADY 1987).

1. 6 Ekológia rodu *Pseudococcomyxa*

Rod *Pseudococcomyxa* bol popísaný z vodného prostredia. Bunky boli prichytené slizovým diskom k podkladu, alebo sa voľne vznášali vo vodnom stĺpci. Rod bol popísaný z oblasti Charkova z malého vodného toku (KORŠIKOV 1953). Rod však nie je typicky vodný a nájdeme ho aj v aerofytických spoločenstvách (NEUSTUPA & ALBRECHTOVÁ 2003, LUKEŠOVÁ 2001). V terestrickom prostredí sa bežne vyskytuje v pôde (BROADY 1979, LUKEŠOVÁ 2001, HOFFMANN ET AL. 2007). Ale objavuje sa aj na borke stromov, či v iných nárastových spoločenstvách (ETTL & GÄRTNER 1995). V týchto spoločenstvách málokedy dominuje. Abundantnejším sa rod stáva až pri extrémnejších podmienkach, keď ostatné riasy už nie sú konkurencieschopné. Rod preferuje acidofilné prostredie. Sú známe prípady, keď zástupci rodu kolonizovali zásobné roztoky živných médií, či destilovanú vodu (SLÁDEČKOVÁ 1959, BROADY 1987, FOTT & KOMÁREK 1958). Rod sa vyskytuje v extrémnych podmienkach nielen ako sú chemické roztoky, ale dokáže prežiť aj extrémne teploty a nepriaznivé vlhkostné pomery. Zástupci rodu sú rozšírení po celej Antarktíde (BROADY 1987, BARGAGLI ET AL. 1996).

1.7 Druhový koncept v komplexe rodov *Coccomyxa*/*Pseudococcomyxa*

Do rodu *Coccomyxa* v súčasnosti patrí 22 platných taxonov (GUIRY & GUIRY 2009). Ale v tejto databáze sú uvedené ako platné aj druhy, ktoré KOSTIKOV ET AL. (2002b) podľa svojho systému uvádza ako nové druhy a rody. Súčasne sú v databáze uvedené i nové rody podľa KOSTIKOVA ET AL. (2002b). Autori databáze GUIRY & GUIRY (2009) sami uvádzajú tieto názvy s poznámkou o potrebnej verifikácii tohto údaju.

Do rodu *Pseudococcomyxa* patria tri taxóny. V databázi Algaebase (GUIRY & GUIRY 2009) sú uvedené dva druhy (*P. simplex*, *P. gloeoglossa* FIDDIAN). Tretím druhom je *P. ellipsoidea* HINDÁK (HINDÁK 1984). Rod *Pseudococcomyxa* bol popísaný na základe druhu *P. simplex* (= *P. adhaerens*). Druh *P. ellipsoidea* sa od druhu *P. simplex* líši viacerými sférickými diskami a menšími bunkami. V prírode je však abundantnejšia *P. simplex*.

Rod *Coccomyxa* bol pri svojom vzniku popísaný veľmi stručne (SCHMIDLE 1901). Nedostatok ľahko pozorovateľných rozlišovacích znakov, sťažoval nielen popis, ale hlavne následné determinácie. Laxný popis dovolil následné zaradenie množstva nových druhov, ktoré viacmenej odpovedali znakom rodu. Mohutný sliz u niektorých zástupcov rodu znemožňoval jednoznačné pozorovanie. Napríklad SCHMIDLE (1901) pyrenoid nepozoroval, ale JAAG (1933) v čerstvom materiáli *C. dispar* pyrenoid rozlíšil. Tak sa stalo, že do rodu boli zaradené i organizmy, ktoré v skutočnosti do rodu nepatria. Dlhá polemika sa viedla okolo druhu *C. brevis* (VISCHER) GÄRTNER & SCHRAGL, ktorý bol najskôr popísaný ako *Nephrodiella brevis* VISCHER (Xanthophyceae), na základe obsahu chlorofylu *a* a *c*. V neskorších analýzach bol druh preradený do rodu *Coccomyxa*, keď sa zistilo, že miesto chlorofylu *c* obsahuje chlorofyl *b* (ŠESTÁK 1963, GÄRTNER & SCHRAGL 1988). Tým sa tento druh jednoznačne preradil ku chlorofytným riasám. Avšak to nebolo jeho konečné taxonomické zaradenie, pretože druh bol popísaný na základe dvoch typových položiek, a tak sa nakoniec na základe podrobných morfológických pozorovaní rozdelil na dva druhy *Neocystis brevis* KOSTIKOV ET HOFFMANN a *N. vischeri* KOSTIKOV ET HOFFMANN. (KOSTIKOV & HOFFMANN 2002).

Druhy rodu *Coccomyxa* boli rovnako i po veľkej revízii rodu JAAGOM (1933) popísané nejednoznačne a niektoré údaje stále chýbajú. V nedávnej minulosti bol takisto nabúraný druhový koncept v skupine Radiococcaceae, kam sa rod *Coccomyxa* radil na základe tvorby slizu. Jednotliví zástupci rodu boli preklasifikovaní do nových rodov, aby sa znaky neprekrývali v jednom rode (prítomnosť pyrenoidu, počet autospor, prítomnosť okrúhlych buniek a typ rozpúšťania materskej steny autosporangia) (KOSTIKOV ET AL. 2002b).

Je však zřejmé, že ani táto klasifikácia nie je konečnou. Tejto práci k dôveryhodnosti chýbajú údaje o metodike a k popisu nových rodov typové kultúry. Súčasne nový systém v tejto skupine autori postavili na tvare buniek a type slizového obalu. Tieto znaky sú však veľmi variabilné. Druhy rodu *Coccomyxa* v rôznych podmienkach tvoria guľovité bunky, avšak tento stav je spôsobený prítomnosťou hostiteľa (STEVENSON & SOUTH 1974, JAAG 1933). A tvorba slizu, je znakom veľmi variabilným, tvoriacim sa len za určitých podmienok (PAŽOUTOVÁ 2008). Neplatnosť KOSTIKOVHO ET AL. (2002b) systému už potvrdili i ďalší autori, keď zistili, že v skupine sú zaradení ako zástupci skupiny Chlorophyceae, tak Trebouxiophyceae (WOLF ET AL. 2003, PAŽOUTOVÁ 2008). KOSTIKOV ET AL. (2002b) tejto práci preklasifikoval druh *Coccomyxa olivacea* BOYE-PETERSEN na *Sphaerococcomyxa olivaceae* (BOYE-PETERSEN) KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN, tento druh ustanovili typovým druhom rodu *Sphaerococcomyxa* KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN, pretože tento druh má občas prítomné sférické bunky. Podobne vytvorili ďalší nový rod *Coenodispora* KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN kam zaradili *Coenodispora litoralis* (HANSGIRG) KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN, čo je vlastne synonymom pre *Coccomyxa litoralis* (HANSGIRG) WILLE, jediného zástupcu rodu *Coccomyxa* popísaného z morského prostredia, okrem parazitických zástupcov. Do rodu *Sporotetras* BUTCHER zaradili druh *Sporotetras polydermatica* (BUTCHER) KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN, k čomu určili synonymum *Coccomyxa epigloaeae* JAAG ET THOMAS. Dalším novým rodom, ktorý vznikol tak, aby odpovedal systematicky morfológickým kritériám je rod *Coenobotrys* KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN, kde je pre typový druh rodu určený basionym *Coccomyxa gloeobotridiformis* REISIGL, ale nie *C. gloeobotridiformis* REISIGL sensu BROADY 1982. Do rodu *Coccomyxa* zahrňujú iba tri druhy *Coccomyxa confluens* (KÜTZING) FOTT, *C. corbierei* WILLE a *C. dispar* SCHMIDLE. *C. dispar* považujú za typový druh rodu. Vôbec v tomto článku neberú v úvahu, že *C. confluens* (KÜTZING) FOTT, je len novou kombináciou názvu typového druhu *C. dispar* SCHMIDLE (FOTT 1974). Do rodu *Neocystis* HINDÁK radia už spomínané druhy *Neocystis brevis* a *N. vischeri*, ale aj nové kombinácie druhov *N. curvata* (BROADY) KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN (basionym: *C. curvata* BROADY), *Neocystis pringsheimii* (BOURRELLY) KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN (syn.: *C. pringsheimii* (BOURRELLY) FOTT), *C. subglobosa* f. *scabra* (WATANABE) KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN (bas.: *C. subglobosa* f. *scabra* WATANABE) a už predtým do rodu zaradená *N. subglobosa* (PASCHER) HINDÁK (bas. *C. subglobosa* PASCHER). Posledným novým rodom, obsahujúcim niektorého zo zástupcov pôvodne popísaného ako *Coccomyxa* je monotypický rod *Planktococcomyxa* KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN s typovým

druhom *P. lacustris* (CHODAT) KOSTIKOV, DARIENKO, LUKEŠOVÁ ET HOFFMANN, synonymom je *C. lacustris* (CHODAT) CHODAT, druh popísaný z planktonu jazier.

Predbežné výsledky fylogenetickej revízie komplexu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* prezentoval FRIEDL ET AL. (2007) na medzinárodnej konferencii, kde navrhoval na základe analýz 18S rDNA, ITS2 a AFLP rozdeliť tento komplex do dvoch rodov *Pseudococcomyxa* a *Avernensia*, ktoré vlastne odpovedajú už skôr zisteným dvom subkladom v monofyletickej línii tohto komplexu (LOHTANDER ET AL. 2003). Oddelenie týchto rodov podporuje aj morfológickými charakteristikami ako sú tvar buniek, typ chloroplastu a tvorba bunkových agregátov.

Druhový koncept rodu je neustálený. Situáciu sťažuje i neexistencia typovej kultúry rodu *Coccomyxa*. Do rodu sú radení ako sladkovodní, tak morskí zástupcovia, voľne žijúci aj symbiotickí, s pyrenoidom i bez neho, s autosporami uvoľňujúcimi sa ruptúrou bunkovej steny, tak zoslizovatením bunkovej steny. Rod bol už od popísania veľmi variabilný a v súčasnosti vyžaduje revíziu založenú nielen na morfológických kritériách, ktoré ako sa ukázalo v iných štúdiách nemusia odpovedať evolučným vzťahom medzi druhmi, či rodmi (WOLF ET AL. 2003). Prvé kroky v tomto smere už boli urobené. Niektorí zástupcovia boli oskevenovaní a rod jednoznačne zaradili do triedy Trebouxiophyceae, kde tvorí monofyletickú skupinu. Fylogenetické analýzy však boli urobené len na lichenizovaných zástupcoch rodu (ZOLLER & LUTZONI 2003, LOHTANDER ET AL. 2003), kde sa ukázalo, že v rode je istá časť variability konzervovaná, ale nájdu sa aj sekvencie, ktoré sú si navzájom veľmi vzdialené.

Cieľom tejto diplomovej práce je rozšíriť znalosti o molekulárnej diverzite tejto skupiny rias, hlavne zistením molekulárnych charakteristík voľne žijúcich aerofytických zástupcov rodu a ich porovnaním so súčasnými poznatkami o molekulárnej variabilite v 18S rDNA a ITS oblasti. Súčasne novým metodickým prístupom k morfológii (geometrická morfometrika) sa zaoberá tvarovou variabilitou v rode a jeho zástupcoch a porovnáva relevantnosť morfometrických charakteristík s fylogenetickými skupinami. K fylogenetickým skupinám sú zároveň zhodnotené ekologické preferencie skúmaných kmeňov a lokalita zberu.

2 Metodika a materiál

2.1 Kultúry

Kultúry použité v tejto práci som získala väčšinou vlastnou izoláciou z prírodného materiálu; kultúry H102 a H103 zo zbierky CAUP (Zbierka rias Univerzity Karlovy); od svojho školiteľa kultúry tropických kmeňov T1, T2, T3, T5; izoláty z lišajníkov E1, E2, E3, E4, E5 od Ondřeje Peksy a kultúru A1 od Pavla Příbyla. Lokality a mikrohabitaty analyzovaných kmeňov sú uvedené v Tab. 1.

2.2 Spracovanie prírodného materiálu

Nazbieraný prírodný materiál som prepravovala v papierových sáčkoch alebo v eppendorfkách. V laboratóriu som časť prírodného materiálu (ihličie, borka, drevo, pôda) preniesla pomocou sterilnej pinzety do sterilnej eppendorfky, kde som pridala balotinky (priemer 0,5 mm) a destilovanú vodu. Zmes som zvortexovala a naniesla na Petriho misky s 2N BBM (KALINA 1994, BISCHOFF & BOLD 1963). Túto zmesnú vzorku som kultivovala pri dennom osvetlení a laboratórnej teplote (21°C). Po objavení sa kolónií rias som misky pozorovala pod mikroskopom Olympus C31 a sterilnou ihlou som izolovala kolónie morfológicky odpovedajúce rodom *Coccomyxa* a *Pseudococcomyxa*. Kultúry som ďalej udržiavala na šikmom agare 2N BBM pri dennom osvetlení a laboratórnej teplote a v chladničke pri 15°C a osvetlení 6 W/m².

2.3 Molekulárne metódy

Na izoláciu genómovej DNA som používala kit Invisorb Spin Plant Minikit, kde som postupovala podľa modifikovaného protokolu Invitrek. Na začiatku som pridala 100µl Lysis Buffer P a sklenené balotinky (priemer 0,5 mm) k bunkám do 1,5 ml eppendorfky, ktoré som potom stočila na mlynčeku na drvenie rastlinného materiálu RetschMM200 pri 300ot./s 5-10 minút. Potom som na ľade k zmesi pridala len 300µl Lysis Buffer P a 20µl proteinkinázy K. Ďalej som postupovala podľa protokolu. Vyizolovanú DNA som uchovávala pri 4°C.

kmeň	lokality	GPS pozícia	nadmorská výška	mikrohabitat
A1	subizolát z CCALA816, Abisko, blízko glaciálnej morény Karsavagge	69°21'N, 18°49'E		povlak v malom potoku
C1	Krušné Hory, okolie Litvínova	50°38'09"N, 13°38'17"E	472 m. n. m.	pôda pramenište
C2	Kokořínsko, hrad	50°26'26"N, 14°34'30"E	350 m. n. m.	3-ročné ihličie smreku
C3	Petrov-Medník	49°52'18"N, 14°27'11"E	230 m. n. m.	2-ročné ihličie smreku
C4	Terčino údolí, Novohradské hory	48°46'44"N, 14°45'03"E	480 m. n. m.	kôra duglasky tisolistej
C5	Noohradské hory, Dobrá voda – továreň	48°49'36"N, 14°46'59"E	480 m. n. m.	3-ročné ihličie smreku
C6	Noohradské hory, Dobrá voda – továreň	48°49'36"N, 14°46'59"E	480 m. n. m.	pôda
C7	Noohradské hory, Dobrá voda – továreň	48°49'36"N, 14°46'59"E	480 m. n. m.	smreková kôra
C8	Kokořínsko - Želízy	50°25'51"N, 14°30'40"E	220 m. n. m.	3-ročné ihličie smreku
C9	Klet, České Budějovice	48°51'56"N, 14°17'02"E	1080 m. n. m.	2-ročné ihličie smreku
C10	Krušné Hory, okolie Litvínova	50°37'50"N, 13°38'31"E	460 m. n. m.	rozkladajúce sa drevo (jaseň)
C11	Loket, Supí potok	50°11'12"N, 12°44'36"E	416 m. n. m.	javorová kôra
C12	Třeboň, rybník Svět	48°59'39"N, 14°45'53"E	440 m. n. m.	3-ročné ihličie smreku
C13	Šumava	49°06'04"N, 13°31'04"E	740 m. n. m.	mŕtve drevo
C14	Šumava	49°05'20"N, 13°35'29"E		mŕtve drevo
C15	Šumava	49°03'54"N, 13°34'43"E	1050 m. n. m.	mŕtve drevo
C16	Šumava	49°06'57"N, 13°23'16"E	850 m. n. m.	mŕtve drevo
E1	Somiedo	43°02'31"N, 6°16'00"W	1700 m. n. m.	fotobiont <i>Solorina bispora</i>
E2	Somiedo	43°02'31"N, 6°16'00"W	1500 m. n. m.	fotobiont <i>Solorina crocea</i>
E3	Somiedo	43°02'31"N, 6°16'00"W	1700 m. n. m.	fotobiont <i>Solorina saccata</i>
E4	Steiermark	47°34'41"N, 14°42'22"E	840 m. n. m.	fotobiont <i>Peltigera aphthosa</i>
E5	Somiedo	43°02'31"N, 6°16'00"W	1700 m. n. m.	fotobiont <i>Peltigera leucophlebia</i>
H102	CAUP			z kultúry <i>Paramecium barsaria</i>
H103	CAUP -Adršpach			zmáčané pieskovcové skaly
K1	rieka Buchtarma, Katn-Karagaj región, Kazachstan			schnúce mŕtve rameno rieky
S1	Saka Golu, Igneada, Turecko	41°50'38"N, 27°58'28"E	10 m. n. m.	kôra stromu
S2	Saka Golu, Igneada, Turecko	41°50'38"N, 27°58'28"E	10 m. n. m.	kôra stromu
T1	tropický dažďový prales, Mac Ritchie Reservoir Park, Singapur	01°21'22"N, 103°48'34"E	150 m. n. m.	kôra stromu
T2	horský tropický les, Cibodas, Jáva	6°45'30"N, 107°00'10"E	1500 m. n. m.	kôra <i>Ehretia javanica</i>
T3	horský tropický les, Cibodas, Jáva	6°45'30"N, 107°00'10"E	1500 m. n. m.	kôra <i>Cleistocalyx operculata</i>
T4	Singapur, nárast na stoncích Bambussa sp.	01°18'41"N, 103°48'47"E	70 m. n. m.	stonka <i>Bambussa</i> sp.
T5	tropický dažďový prales, Mac Ritchie Reservoir Park, Singapur	01°21'22"N, 103°48'34"E	150 m. n. m.	kôra stromu
U1	Karpatská biosferická rezervácia Hoverla	48°06'33"N, 24°26'17"E	900 m. n. m.	slizový nárast na dreve
U2	Karpatská biosferická rezervácia Hoverla	48°06'33"N, 24°26'17"E	900 m. n. m.	slizový nárast na dreve
U3	Karpatská biosferická rezervácia Hoverla	48°06'33"N, 24°26'17"E	900 m. n. m.	slizový nárast na dreve
U4	Karpatská biosferická rezervácia Hoverla	48°07'23"N, 24°27'35"E	1000 m. n. m.	drevo jedle
U5	Karpatská biosferická rezervácia Hoverla	48°03'31"N, 24°27'54"E	900 m. n. m.	pôda

Tab. 1 Pôvod a mikrohabitat študovaných kmeňov

Koncentrácia vyizolovanej DNA a PCR produktov bola meraná na biofotometri od firmy Eppendorf. Pre PCR reakciu som vyizolovanú DNA nariedila na 5ng/μl. K amplifikácii ITS a 18S oblasti rDNA som používala reakčné zmesi o zložení viz Tab. 2.

chemikálie	1 PCR reakcia
templátová DNA (5 ng/μl)	1 μl
DNA polymeráza RedTaq	0,5 μl
10xSigma PCR Buffer	2 μl
DNTP	0,4 μl
forward primer	0,25 μl
reverse primer	0,25 μl
sterilná MiliQ voda	15,6 μl

Tab. 2 Reakčná zmes pre PCR reakciu

reakcie	teplota	čas
iniciálna denaturácia	94°C	180 s/ 300s
denaturácia	94°C	45 s
annealing	54°C	60 s
elongácia	72°C	120 s
záverečná elongácia	72°C	600 s
hold	10°C	

Tab. 3 Cyclus pre amplifikáciu ITS a 18S rDNA

K amplifikácii úsekov som používala optimalizovaný cyklus uvedený v Tab. 3 na cycleri PCR Mastercycler gradient od f. Eppendorf alebo na cycleri TouchGene Gradient od f. Eppendorf. Cykly pre 18S a ITS oblasť sa líšili len časom na iniciálnu denaturáciu, 5 minút pre 18S a 3 minúty pre kratšiu ITS oblasť.

K amplifikácii ITS oblasti som používala primery 1500af (forward) a ITS4 (reverse), k amplifikácii 18S rDNA oblasti kombinácie primerov NS1/1850R, NS1/18L, 18SF/18L a 18SF/1650R(vivi).

Amplifikované úseky som vizualizovala s použitím etidiumbromidu na 1% TBE gele pri elektroforéze s napätím 100V počas pätnástich minút. Unikátny PCR produkt som prečistila pomocou JetQuick PCR Purification Kit. Nešpecifické PCR produkty som z gelu vyrezávala a to tak, že najprv som celý PCR produkt 16 μl, zmiešaný so 4μl 6x Orange Loading Dye, naniesla na 1,5%TBE gel a všetky rozlíšené dĺžky amplifikovaných DNA fragmentov pri elektroforéze (90V 45 minút) som vyrezala pod UV lampou, tieto fragmenty gelu som prečistila pomocou kitu Gel Extraction Kit (QIAquick).

Niekoľko vzoriek bolo osekvenovaných na 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) v DNA laboratóriu PĚF UK s použitím kitu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, kde bola najprv použitá ½ reakcia pre cyklické sekvenovanie podľa optimalizovaného protokolu a následne bol DNA fragment precipitovaný pomocou octanu sodného a etanolu. Ďalšie vzorky boli sekvenované firmou Macrogen (sekvenátor ABI3730XL). Jednotlivé úseky boli osekvenované pomocou primerov uvedených v Tab. 4.

Kvôli získaniu sekvencie celej 18S pre kultúru T2 som si nadesignovala primer 298F podľa konzervovaného úseku v alignmente 18S sekvencií druhov *Coccomyxa* a vlastných

sekvencií. Tvorbu dimerov a optimálnu teplotu topenia primeru som otestovala v programe FASTPCR v3.5.30 (KALENDAR 2009).

primer	Sekvencia 5'→3'	oblasť	použitie	citácia
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCT	18S	PCR	Hamby et al. 1988
18L	CACCTACGGAAACCTTGTTACGACTT	18S	PCR	Hamby et al. 1988
LR1850	CCTCACGGTACTTGTTT	18S	PCR	Friedl 1996
18SF	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	18S	PCR	Katana et al. 2001
18SR	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG	18S	PCR	Katana et al. 2001
1122F	GGCTGAAACTTAAAGGAATTG	18S	PCR	Friedl, unpubl.
1263R	GAACGGCCATGCACCACC	18S	PCR	Friedl, unpubl.
1617F	GCCSTTTGTACACACCCGCCGTCGC	18S	PCR, seq	Friedl, unpubl.
Viv1 1650R	TCACCAGCACACCCAAT	18S	PCR, seq	Kipp 2004
AI 1500af	GCGCGCTACACTGATGC	18S	PCR, seq	Helms et al. 2001
402-23F	GCTACCACATCCAAGGAAGGCA	18S	seq	Katana et al. 2001
416-37R	ATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCC	18S	seq	Katana et al. 2001
895-916F	GTCAGAGGTGAAATTCTTGAT	18S	seq	Katana et al. 2001
898-919R	TAAATCCAAGAAATTCACCTCT	18S	seq	Katana et al. 2001
1275-304F	ATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTG	18S	seq	Katana et al. 2001
1323-44F	CGAACGAGACCTCAGCCTGCTA	18S	seq	Katana et al. 2001
1308-39R	CTCGTTCGTTAACGGAATTAACC	18S	seq	Katana et al. 2001
1636-57R	GGTAGGAGCGACGGGCGGTGTG	18S	seq	Katana et al. 2001
1635-44F	CCGCCCGTCGCTCCTACCGA	18S	seq	Katana et al. 2001
ITS2N	TCGCTGCGTTCTTCATC	ITS	PCR, seq	Beck et al. 1998
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	PCR, seq	White et al. 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS	PCR, seq	White et al. 1990
298F	CATTCAAATTTCTGCCCTATCA	18S	seq	Nemjová

Tab. 4 Zoznam použitých primerov, v stĺpci použitie je skratkami označené použitie pri PCR reakcii alebo seq pri sekvenácii

2.4 Vnútrogenomová heterogenita - klonovanie

Na základe priamych sekvencií oblasti ITS som objavila vnútrogenomovú variabilitu v kmeňoch A1, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, H103, S1, S2, U1, U4. U väčšiny kmeňov som detekovala na základe priamej sekvencie indel jednej bázi. U kmeňov C5, C6, C7, C9, C10, C11 a C12 bola variabilita väčšia, takže chromatogram priamej sekvencie nebol zreteľne čitateľný, v sekvencii sa dajú rozpoznať najmenej štyri zmutované miesta. Priame sekvencie kmeňov boli C5, C6, C7, C9, C10, C11 a C12 zhodné, od nich sa odlišovala priama sekvencia kultúry H103. Preto som kmene C8, C9, C10 a H103 klonovala. K tomu som použila pJET1.2/blunt plasmid vektor a postupovala som podľa protokolu pre ligáciu PCR produktu so „sticky ends“, pretože RedTaq používaná polymeráza pridáva na konce nasyntetizovaného reťazca jeden adenín. Používala som 1/2 reakciu. Takto transformované kompetentné bunky *E. coli* som kultivovala na miskách s LB médiom

potreých IPTG (zabraňuje tvorbe dcérskych kolónií) 16 hodín pri 37 °C v inkubátore Nüve EN055. Potom som získané kolónie vypichovala špáratkou a vkladala do pripraveného PCR mixu (Tab. 5) s primermi 1617F a ITS4 (Tab. 4). Výsledok PCR som skontrolovala na 1% TBE gele a pozitívne PCR amplikony som prečistila pomocou JetQuick PCR Purification Kit.

Chemikálie	Možstvo [μl]
MgCl ₂	2
pufr	2
dNTP	0,4
Primer 1617F	0,25
Primer ITS4	0,25
H ₂ O	13,9
Gold polym.	0,2

Tab. 5 PCR reakčná zmes
pre amplifikáciu
klonovaných úsekov

LB médium

Do 500ml redestilovanej vody som pridala 10g bakteriologického agaru a 12,5g LB Broth Powder. Premiešala som obsah. Po vyklávaní som pridala do zmesi 5 ml vykláovanej vody s primiešaným ampicilinom (0,025g). Vo flow-boxe som LB-médium naliala do Petriho misiek.

2.5 Fylogenetické analýzy

Získané chromatogramy boli skontrolované manuálne a prepojené v programe Seqassem v09/2004 (HEPPERLE 2004). Na prípravu alignmentov boli použité okrem sekvencií získaných v tejto práci aj homologické sekvencie príbuzných organizmov z triedy Trebouxiophyceae stiahnuté z celosvetovej databázy GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Homologické sekvencie boli rozpoznané na základe algoritmu BLAST (ALTSCHUL ET AL. 1990). Sekvenciu označenú ako c 169 som získala z databázy JGI (<http://www.jgi.doe.gov/>). Ďalšie použité sekvencie poskytol Marek Eliáš (T4), Pavel Škaloud (K1) a Veronika Kaufnerová (C13, C14, C15, C16).

Sekvencie získané klonovaním boli pred zahrnutím do alignmentu manuálne skontrolované v programe Mega4.0 (TAMURA ET AL. 2007) a chimerické sekvencie boli vylúčené z analýz. Alignmenty boli pripravené pomocou algoritmu ClustalW (THOMPSON ET AL. 1994) v programe

Mega 4.0 (TAMURA ET AL. 2007) pre 18S rDNA a 5.8S rDNA. Pri príprave alignmentu bolo použité základné nastavenie „gap opening penalty“ 15 a „gap extension penalty“ 6,66. Alignment ITS2 oblasti bol manuálne pripravený podľa sekundárnej štruktúry v programe 4SALE (SIEBEL ET AL. 2006, SIEBEL ET AL. 2008). Sekundárna štruktúra ITS2 oblasti bola vypočítaná na základe najnižšej voľnej energie v programe mFold (MATHEWS ET AL. 1999, ZUKER 2003) a manuálne vyladená porovnaním s publikovanými sekundárnymi štruktúrami ITS2 pre príbuzné rody *Botryococcus* a *Trebouxia* (SCHULTZ ET AL. 2006, SELIG ET AL. 2008, BEIGGI & PIERCEY-NORMORE 2007). Sekundárna štruktúra bola vizualizovaná v programe RNAviz (DE RIJK ET AL. 2003). Z alignmentu boli odstránené loopy a tento súbor bol použitý pre výpočet alignmentov s kombináciami parametrov pre open gap penalty (7-20/2.5) a gap extension penalty (2-10/1.5) pomocou algoritmu ClustalW (THOMPSON ET AL. 1994) v programe SOAP (LÖYTYNOJA & MILINKOVITCH 2001). Porovnaním týchto alignmentov som odstránila ďalšie nestabilné oblasti, v alignmente som nechala iba pozície podporené 90% všetkých alignmentov.

Vhodný substitučný model pre výpočet Bayesovskej analýzy (HUELSENBECK & RONQUIST 2001, RONQUIST & HUELSENBECK 2003) a pre výpočet maximum likelihood v programe PAUP v4.0b10 (SWOFFORD 2003) bol vybraný na základe porovnania modelov pomocou PAUP/MrModelTest (NYLANDER 2004) na základe AIC a hLRT kritéria.

Alignmenty pre ITS1 oblasť boli takisto pripravené pomocou výpočtu alignmentov v programe SOAP (LÖYTYNOJA & MILINKOVITCH 2001) s nastavenými parametrami pre „gap opening penalty“ 7,0 – 20, krok 2,5 a pre „gap extension penalty“ 2 – 10 s krokom 1,5. Pretože tento úsek je variabilnejší než ITS2 oblasť, nestabilných oblastí sa v alignmente nachádzalo viac. Z alignmentov boli odstránené iba pozície, ktoré získali podporu u menej než 50% všetkých alignmentov.

Neighbor-joining stromy boli vypočítané v programe Mega4.0 (TAMURA ET AL. 2007) s modelom maximum composite model a 2000 opakovaniami, ostatné parametre boli nastavené defaultne.

Maximum parsimony analýzy boli počítané takisto v programe Mega4.0 (TAMURA ET AL. 2007) s algoritmom CNI (close neighbor interchange) a complete deletion option, takže v alignmente nezostali, žiadne medzery. Bootstrapové hodnoty boli vypočítané s 1000 opakovaniami.

Bayesovská analýza bola vypočítaná v MrBayes 3.1.2 (HUELSENBECK & RONQUIST 2001, RONQUIST & HUELSENBECK 2003) pre alignment ITS2 s GTR+I modelom podľa AIC kritéria pre 3.000 000 generácií a teplotou prehriateho reťazca 0,1, ďalšie parametre boli ponechané

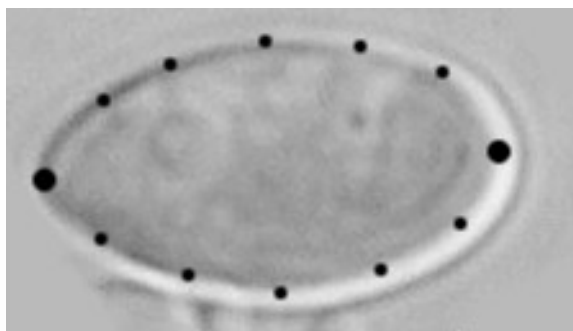
na defaultné nastavenie. Pre 18S rDNA alignment boli použitý model GTR+G+I, a parametre ngen=1000000, Temp=0,1.

Maximum likelihood (ML) stromy boli počítané pomocou serverov PhyML 3 (18S rDNA a ITS1) a PhyML 2 (ITS2) (GUIDON & GASCUEL 2003), so substitučným modelom GTR+G+I a ôsmimi substitučnými kategóriami. Ako počiatkový strom bol použitý strom vypočítaný pomocou algoritmu BIONJ. U všetkých analýz bol použitý algoritmus vyhľadávania najpravdepodobnejšieho stromu SPR&NNI (subtree pruning and regrafting & nearest neighbor interchange) a 100 opakovaní pre výpočet bootstrapovej podpory vetvenia stromu. Pre výpočet ITS2 ML stromov bolo použitých 5 počiatkových stromov. Pre výpočet ML stromov pre 18S rDNA a ITS1 oblasť bol použitý jeden počiatkový strom.

Pre výpočet ML u ITS2 oblasti bol použitý aj program PAUP (SWOFFORD 2003) so substitučným modelom GTR+I podľa AIC kritéria, tento program oproti PhyML používa algoritmus prehadzovania vetví TBR (tree bisection-reconnection). Stromy boli pre vizualizáciu upravené pomocou programov TreeView (PAGE 1996), Mega 4.0 (TAMURA ET AL. 2007) a GIMP 2.4.5 (www.gimp.org).

2.6 Morfológia a geometrická morfometrika

Kultúry pre hodnotenie morfológických charakteristík boli kultivované pri 15°C a osvetlení 6 W.m⁻² na šikmom agare s 2N BBM (BISHOFF & BOLD 1963). Po 43 dňoch boli všetky kultúry vyfotografované s Nomarského kontrastom na mikroskope BX-51 fotoaparátom CAMEDIA C5060. Pre morfometrické analýzy bolo náhodne vybraných 50 buniek z každej kultúry. Fotografie boli spracované v programe GIMP 2.4.5 (www.gimp.org). Digitalizácia a ďalšie spracovanie údajov o tvare prebehlo v programoch balíčku TPS (Rohlf 2008). V programe



Obr. 4 Pozície landmarkov. Väčšie body označujú landmarky 2. typu, menšie body označujú semilandmarky

tpsDig2 bolo na obryse každej bunky zvolených 12 landmarkových bodov (Obr. 4). Dva body ako landmarky 2. typu (morfológicky si odpovedajúce štruktúry) boli zvolené na oboch póloch bunky. Ostatné landmarky boli označené ako kĺzavé landmarky (landmarky 3. druhu), ktorým je umožnené sa posúvať po ich spojnici. Pomocou programu TPSRelW boli vypočítané centroid size podľa polôh

jednotlivých landmarkov. Tie boli použité ako charakteristiky veľkosti. Centroid size sa počíta ako druhá odmocnina sumy štvorcov vzdialeností jednotlivých landmarkov od centroidu (ťažiska) bunky (pozícií landmarkov) (ZELDITCH ET AL. 2004). Pred vlastnými analýzami boli všetky údaje o pozíciách landmarkov štandardizované pomocou Prokrustovskej superimpozície. Tento proces škáluje všetky bunky na jednotkovú centroidovú veľkosť. Zároveň bunky rotuje a presúva do jednotnej vzťažnej sústavy podľa referenčného objektu. Tým sa odstraňuje variabilita, ktorú by do analýz mohli vnieť premenné, na ktorých je tvar závislý (veľkosť, orientácia a pozícia v Euklidovskom priestore) (ZELDITCH ET AL. 2004).

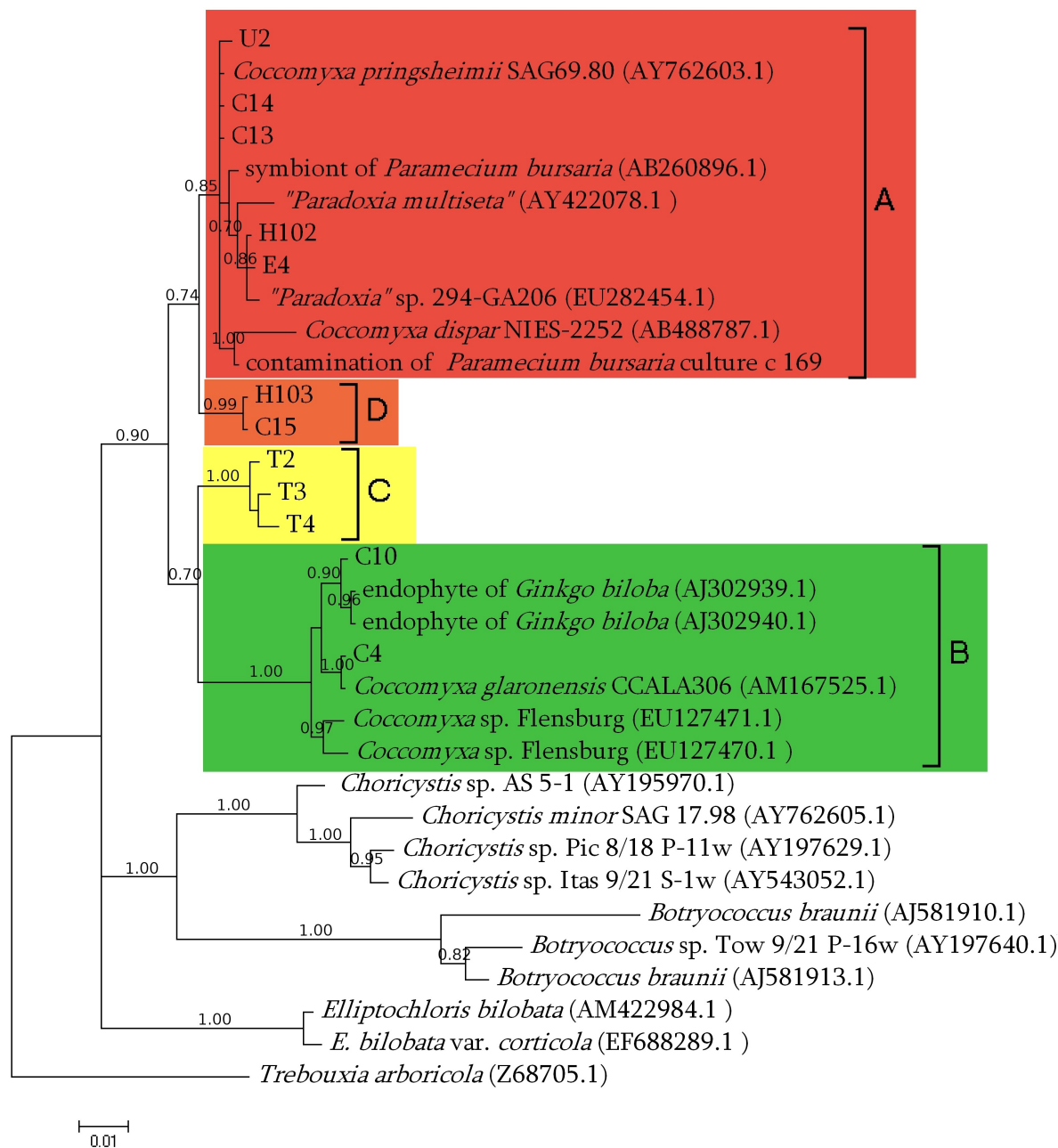
Vstupné data najprv neboli symetrizované, pretože som predpokladala, že pri úprave fotografií som bola schopná u buniek rozlíšiť „bruško“ a „chrbát“. Avšak prvé analýzy relatívnych warpov ukázali, že druhá osa pravdepodobne ukazuje variabilitu spôsobenú práve nerozoznaním „bruška“ a „chrbátu“ buniek. To mohlo byť spôsobené aj tým, že bunky sú trojrozmerné a pod mikroskopom boli fotografované z rôznych strán/pohľadov. Preto som odstránila nesymetrickú časť variability a pracovala som len so symetrickou variabilitou. Objekty som symetrizovala podľa osy x. K tomu som použila postup uvedený v KLINGENBERG ET AL. (2002). Na symetrizovanom súbore súradníc pozícií landmarkov v Kendallovom priestore po Prokrustovskej superimpozícii som urobila analýzu hlavných komponent (PCA) v programe TPSRelW v 1.40 (Rohlf 2008). Pozície objektov v ordinačnom priestore som vyhodnotila pre fylogenetické skupiny a pre skupiny odvodené od mikrobiotopu kultúry. Okrem PCA som použila aj analýzu kanonických variát (CVA). CVA je diskriminačnou metódou, snaží sa maximalizovať rozdiely medzi predom daným skupinami. Na kanonické osy najviac prispievajú znaky, ktoré sú málo variabilné v rámci skupiny a čo najviac variabilné medzi skupinami. Naproti tomu PCA je ordinačná metóda a slúži na zobrazovanie polohy objektov vo smere ich najväčšej variability. Táto variabilita nemusí byť zákonite rovnaká ako variabilita, ktorá rozdeľuje skupiny (MARHOLD & SUDA 2002, ZELDITCH ET AL. 2004). Program PAST v 1.88 (HAMMER ET AL. 2001) používa pre štatistické hodnotenie signifikantnosti diskriminácie skupín v CVA analýze výpočty Wilksovo lambda a Pillai trace. Vzájomné vzdialenosti skupín v priestore CVA os som vypočítala pomocou neparametrických párových testov výpočtom Mahalanobisovej vzdialenosti s 1000x permutovaným súborom dát. CVA analýzy som počítala v programe PAST (HAMMER ET AL. 2001), grafické výstupy som zpracovala v programe Sigmaplot (www.sigmaplot.com). PCA analýzy som vypočítala v programe CANOCO (TER BRAAK & SMILAUER 1997). Údaje z relatívnych warpov som neštandardizovala, takže pozícia na PCA ose koreluje s množstvom variability vysvetlených osami relatívnych warpov.

3 Výsledky

Cieľom diplomovej práce bolo zistiť molekulárnu variabilitu v morfológicky definovanom komplexe rodov *Coccomyxa/Pseudococcomyxa*. Zistila som, že molekulárna variabilita v komplexe *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* je väčšia než doteraz známa heterogenita (medzi lichenizovanými zástupcami). V rámci diplomovej práce som pracovala s 37 kmeňmi *Coccomyxa/Pseudococcomyxa*. Získaním sekvencií ITS oblasti ku 32 kmeňom a 18S rDNA k jedenáctim kmeňom práca prispela k poznaniu molekulárnej diverzity v tomto komplexe. V osemnástich kmeňoch som zistila vnútrogenomovú variabilitu v ITS oblasti.

3.1 Fylogenetická pozícia študovaných kmeňov

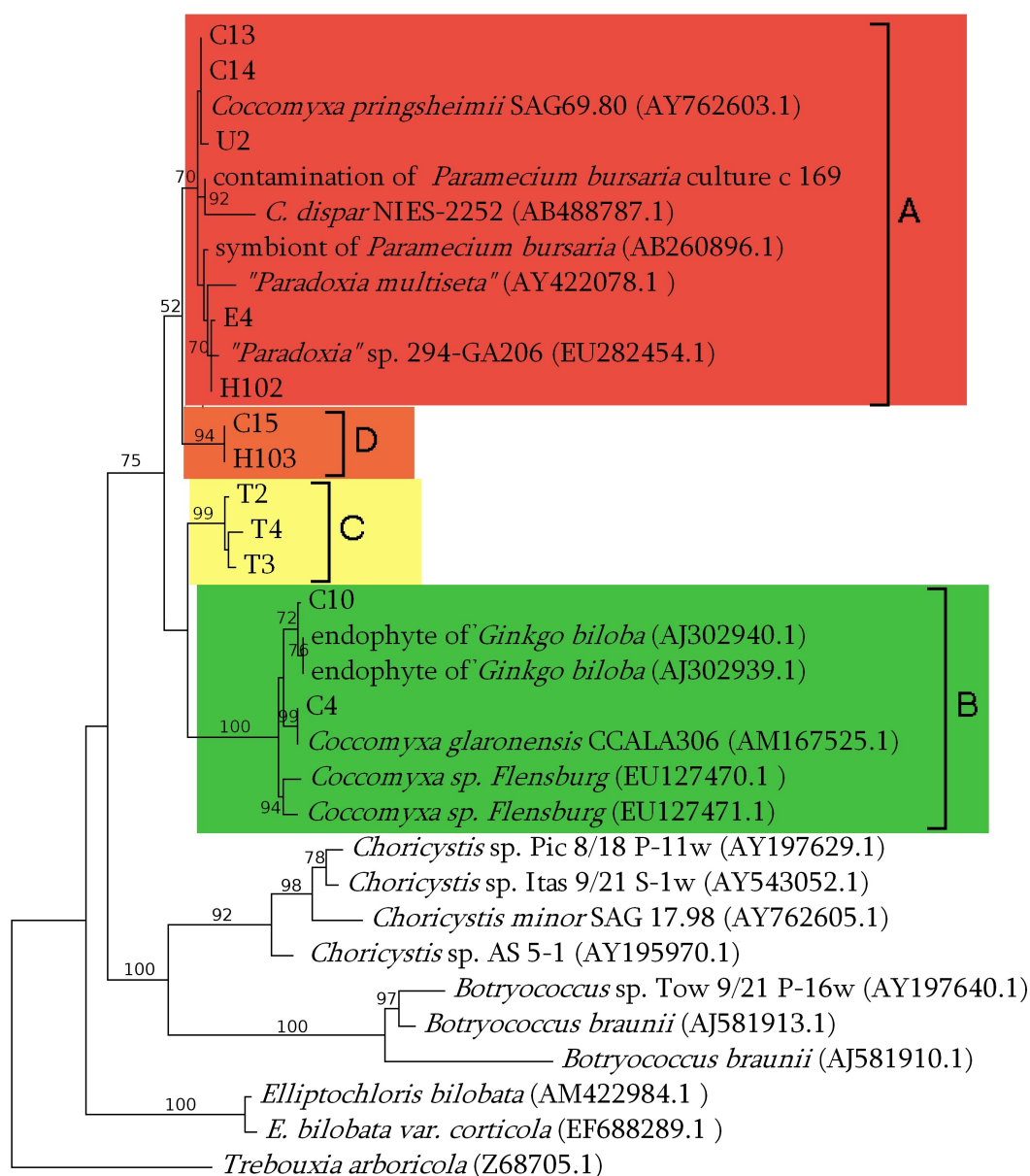
Študované kmene patria do komplexu druhov *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* do triedy Trebouxiophyceae do kladu *Botryococcus/Choricystis* (KARSTEN ET AL. 2005). V rámci tohto kladu tvoria monofyletickú skupinu. Celková dĺžka alignmentu pre 18S rDNA bola 3629 bp. Po odstránení intronov a pozícií s neznámymi nukleotidmi mal celkový alignment 1575 bp. V alignmente bolo 1330 pozícií bez polymorfizmu. Najvierohodnejší strom bol získaný s vierohodnosťou (log likelihood) - 4765,06886 za použitia GTR+G+I modelu a monofýlia tejto skupiny bola podporená bootstrapovou hodnotou 75%. Pre Bayesovskú analýzu bol použitý rovnaký model. Oddelenie celej skupiny *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* je podporené posteriornou pravdepodobnosťou 0,90. Pri Bayesovskej analýze sa všeobecne považujú za signifikantné hodnoty nad 0,95, pretože Bayesovská analýza systematicky nadhodnocuje posteriorné pravdepodobnosti oproti bootstrapovým hodnotám získaným pomocou ML (BRITTON ET AL. 2007). Rovnakú bootstrapovú hodnotu ako v ML získal tento konár aj v maximum parsimony (MP) analýze. V MP analýze bolo nájdených 113 najkratších stromov s dĺžkou 422 krokov. Na základe sekvencií 18S rDNA sa v študovanej skupine rias dajú rozoznať dve hlavné fylogenetické línie (Obr. 5, Obr. 6, Obr. 7). Línia A+D je podporená bootstrapovou hodnotou 52% v ML a 50% v MP a posteriornou pravdepodobnosťou 0,74. Tieto hodnoty nie sú vysoké, rovnako ako u druhej línie B+C (Obr. 5 a Obr. 6, Obr. 7), kde je bootstrapová hodnota iba 40% v ML a 42% v MP a posteriorná pravdepodobnosť je 0,70. Tieto nízke hodnoty môžu byť spôsobené malým samplingom v skupine C a D a väčšou divergenciou sekvencií v skupinách B, C, D oproti skupine A. Súčasne môže byť zmieňovaný



Obr. 5 Fylogenetický strom zobrazujúci vzťahy medzi študovanými kmeňmi a známymi sekvenciami organizmov patriacich do komplexu *Coccoxymyxa/Pseudococcoxymyxa*. Strom je zakorenený príbuznými sekvenciami z cladu *Botryococcus/Choricystis* a sekvenciou *Trebouxia arboricola*. Strom je výsledkom Bayesovskej analýzy s použitím modelu GTR+G+I na 18S rDNA markeru. Posteriórne pravdepodobnosti sú uvedené len nad hodnoty 0,7. Accession number sekvencií z Genbanku sú uvedené za názvom sekvencie v zátvorkách

efekt dôsledkom zrýchlenej evolúcie v skupinách B, C oproti skupine A. Pozícia skupiny C nie je v rámci týchto dvoch fylogenetických línií (A a B) na základe 18S rDNA jednoznačná. Aj to môže byť dôvodom pre nízke rozlíšenie fylogenetických línií. Neighbor-joining strom na základe 18S rDNA s vylúčením skupín C a D podporuje rozdelenie na tieto dve skupiny (A a B) s bootstrapovou hodnotou 100% pre obe skupiny. Skupina C je v Bayesovskej analýze priradená ku skupine B s posteriórnou pravdepodobnosťou 0,70. Maximum likelihood

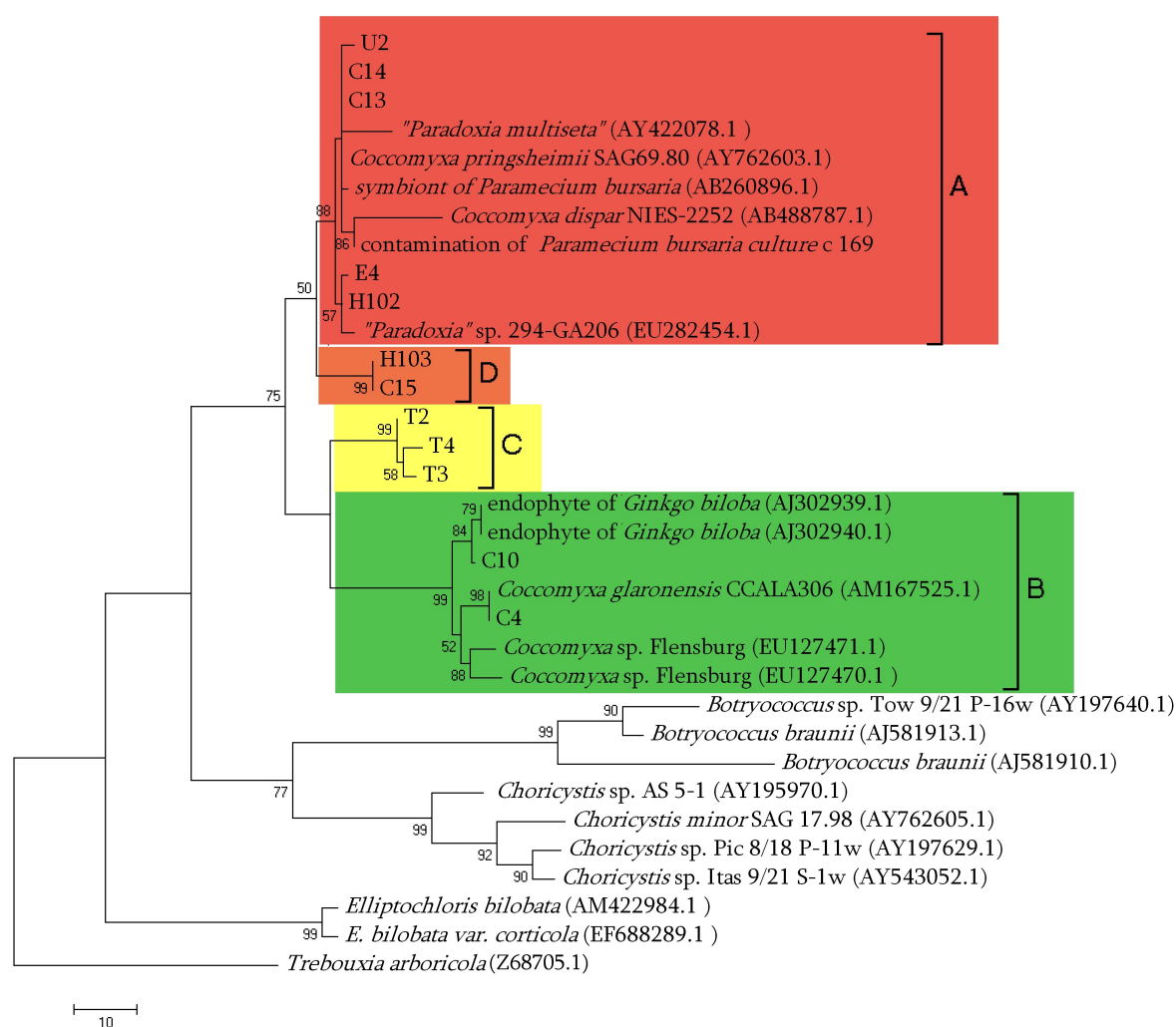
priradilo skupinu C takisto do línie B, ale bootstrapové hodnotenie tohto pripojenia je iba 40%. Samotná skupina C je vysoko podporená (ML bootstrapová hodnota 99%, MP bootstrapová podpora 99%, posteriórna pravdepodobnosť 1,00). Neighbor-joining analýza, metóda založená na výpočte matice vzdialeností, priradila skupinu C a kultúry H103 a C15 do fylogenetickej línie ku skupine A s bootstrapovou podporou 63% (skupina C) resp. 78% (skupina D)) (výsledný strom nie je zobrazený). Dosiaľ žiadna známa sekvencia neklastuje do skupiny C, patria sem iba kmene T2, T3 a T4.



0.02

Obr. 6 Maximum likelihood strom 18S rDNA pre študovanú skupinu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa*. ML algoritmus bol počítaný v programe PhyML za použitia substitučného modelu GTR+G+I. Bootstrapy sú uvedené len pre konáre podporené väčším bootstrapom než 51%

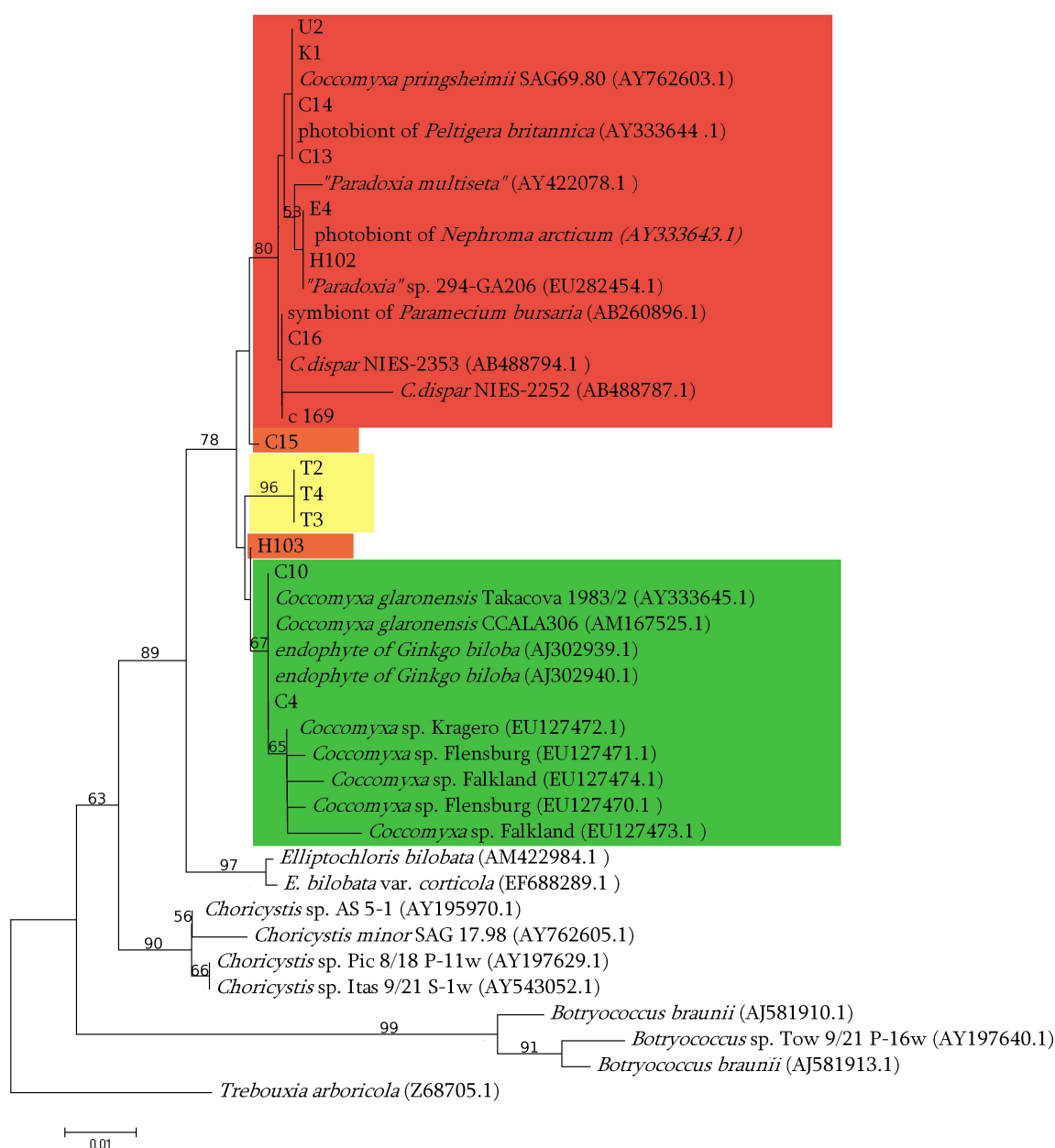
Skupina A je na stromoch z maximum likelihood a Bayesovskej analýzy podporená najnižšou bootstrapovou hodnotou a posteriornou pravdepodobnosťou (52% resp. 0,85) než ostatné skupiny. Maximum parsimony tejto skupine priradilo vyššiu bootstrapovú hodnotu 88%. Do skupiny A patrí na základe týchto analýz sekvencia *C. pringsheimii* SAG 69.80. Sekvencie autentického kmeňa *C. pringsheimii* nie sú známe. Do skupiny A ďalej patria kmene H102, E4, C13, C14 a U2. Kultúra H102 je typovou kultúrou druhu *Pseudococcomyxa simplex*, izolovaná z kultúry *Paramecium bursaria*. Do skupiny A patrí aj sekvencia c 169, ktorá kontaminovala kultúru *Paramecium bursaria*, sekvencia bola získaná z databáze JGI pod označením „*Chlorella vulgaris*“. Jej najpodobnejšia, aj keď v skupine A s výrazne zrýchlenou evolúciou, je sekvencia v Genbanku označená ako *Coccomyxa dispar* zo zbierky NIES (Microbial culture collection Japonsko). Do skupiny A boli súčasne zaradené sekvencie v Genbanku označené ako „*Paradoxia* sp.“ a „*Paradoxia multiseta*“ (EU282454



Obr. 7 Prvý maximum parsimony strom s dĺžkou 422 pre 18S rDNA počítaný v programe Mega4.0 algoritmom CNI, zobrazené sú iba bootstrapové hodnoty pre konáre podporené viac než 50%.

a AY422078), tieto názvy uvádzam v úvodzovkách, pretože sa pravdepodobne nejedná o skutočný rod *Paradoxia*, ktorý podľa morfológických znakov patrí do triedy Chlorophyceae, ale o sekvenciu kontaminácie kultúry *Paradoxia multiseta*.

Skupina B je podporená vysokými bootstrapovými hodnotami ako v MP, tak v ML analýze (99% resp. 100%) a posteriornou pravdepodobnosťou 1,00. V tejto skupine sú dobre vymedzené tri podskupiny, ale vzťahy medzi nimi nie sú na základe 18S rDNA zrejmé. Podľa ML a Bayesovskej analýzy je podskupina parazitických zástupcov (EU127470.1 a EU127471.1) podporená vysokým bootstrapom a posteriornou pravdepodobnosťou (94%



Obr. 8 NJ strom, čiastočný alignment 399bp 18S rDNA, Maximum composite model, 2000 opakovaní. Na strome sú vyznačené skupiny A (červenou), B (zelenou), C (žltou), D (oranžovou). Zobrazené sú iba bootstrapové hodnoty vyššie než 50%

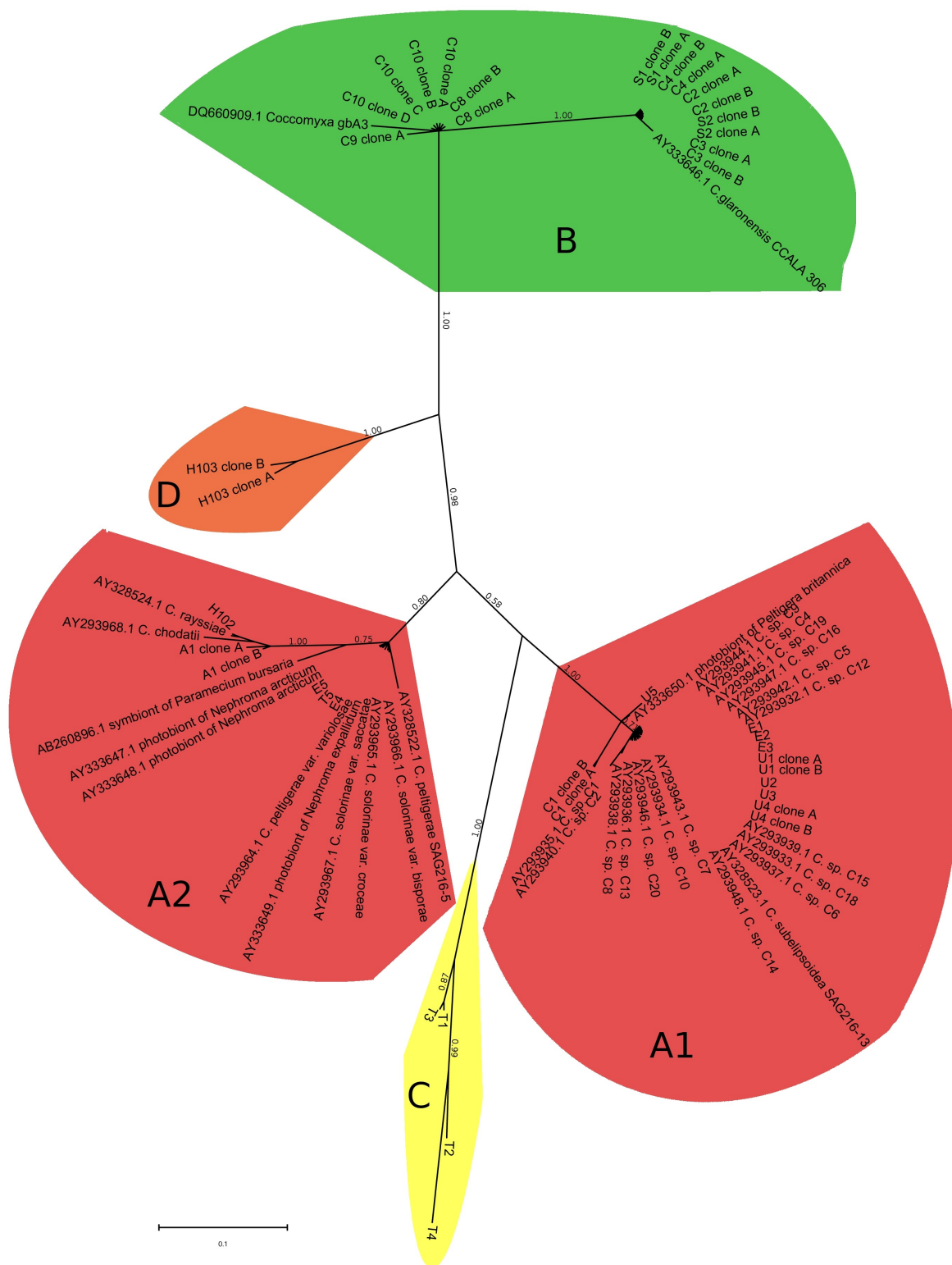
a 0,97). Vzťah ďalších dvoch podskupín v rámci skupiny B je nejasný, ich spoločná evolučná história bola podporená ML bootstrapovou hodnotou iba 46% a posteriornou pravdepodobnosťou 0,51. MP analýza priradila k skupine oddelenej v ML a Bayesovskej analýze skupinu s kmeňom C4 a sekvenciou *C. glaronensis* CCALA 306, ale tiež s nízkou bootstrapovou podporou (52%). Do skupiny B patria kmene C4 a C10 a sekvencie *C. glaronensis* CCALA 306, endofytov z *Ginkgo biloba* a parazitických zástupcov rodu *Coccomyxa* izolovaných zo slávky jedlej *Mytilus edulis*.

Kvôli priradeniu známych, ale čiastočných sekvencií, ktoré patria ku kladu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* som vypočítala ešte NJ strom (Obr. 8) pre 18S rDNA z alignmentu 399bp dlhého s dodanými sekvenciami z Genbanku, sekvenciou z enviromentálneho sekvenovania vysychajúceho mŕtveho ramena z Kazachstanu (K1) a sekvenciou C16. Skupina A sa týmto rozšírila o päť členov: C16, K1, symbionty z lišajníkov *Peltigera britannica* a *Nephroma arcticum* a o sekvenciu označenú jako *Coccomyxa dispar* zo zbierky NIES, izolovanú z Antarktídy. Do skupiny B sa priradili ďalšie sekvencie parazitických *Coccomyxa*. Súčasne sa do kladu priradila *C. glaronensis* Takačová 1983/2 (AY333645), ktorá je len sekvenciou toho istého kmeňa ako sekvencia *C. glaronensis* CCALA306 (AM167525), ale pod dvoma accession number, pretože boli sekvenované v dvoch rôznych štúdiách. Čiastočný alignment rozhodil skupinu D, kde sa kultúra C15 priradila ku skupine A, ale kultúra H103 sa priradila ku skupine B s bootstrapovou podporou 42%.

K lepšiemu rozlíšeniu v rámci skupín som používala alignmenty ITS1 a ITS2 sekvencií. ITS2 alignment som získala na základe porovnania sekundárnych štruktúr. Po vyradení ťažko zalignovateľných oblastí som pre analýzy použila alignment 136 bp dlhý. Tento alignment obsahoval 81 pozícií bez polymorfizmu.

ML analýza pomocou programu PhyML (Obr. 10) vyústila do jedného najvierohodnejšieho stromu (log likelihood -598,77614). ML analýza v programe PAUP s GTR+I modelom získala podobný najvierohodnejší strom s vierohodnosťou (-ln L) 602,12675. Topológia stromu z Bayesovskej analýzy (Obr. 9) bola takisto podobná. NJ analýza rovnako s vysokými štatistickými podporami oddelila jednotlivé skupiny, ale vzťahy medzi podskupinami v rámci týchto skupín dostatočne nerozriešila. Všetky takto získané stromy sú nezakorenené.

V skupine A rozlíšenej na 18S rDNA stromoch sa na základe ITS2 vyčlenili dve podskupiny A1 a A2 (Obr. 9). Skupiny A1 a C majú posteriornu pravdepodobnosť 1,00. Skupina A2 má



Obr. 9 Nezakorenený strom pre ITS2 oblasť získaný bayesovskou analýzou. Posteriórne pravdepodobnosti sú uvedené len pre konáre s podporou väčšou než 0,7. Pre výpočet bol použitý substitučný model GTR+I a teplotou teplého reťazca 0,1 s opakovaniami pre 3 mil. generácií.

omnoho menšiu posteriornu pravdepodobnosť (0,80), maximum likelihood stromy ju však oddeľujú s vyššími bootstrapovými hodnotami (PhyML 92%, PAUP 84%). Skupina A1 je na ML stromoch podporená podobnými bootstrapami (PhyML 75%, PAUP 84%). Vzťahy medzi týmito skupinami však analýza ITS2 oblasti dostatočne štatisticky signifikantne nerozlíšila. Skupina D sa na základe Bayesovskej analýzy javí najpríbuznejšia klastru A2, C a A1 (0,98). Oddelenie skupiny D je podporené posteriornou pravdepodobnosťou 1,00. V ML stromoch však už pozícia tejto skupiny nie je tak jednoznačná. ML počítaná v programe PhyML priradzuje skupinu D takisto do bližšej príbuznosti ku skupine A2, avšak s bootstrapovou podporou len 52% (Obr. 10). Na najvierohodnejšom strome z programu PAUP je skupina D priradená do príbuznosti skupín A1 a C, avšak s bootstrapovou podporou iba 41%. V ML stromoch je podpora skupiny D nižšia než v Bayesovskej analýze (PhyML 79%, PAUP 84%). Skupina D je tvorená len klonmi jediného kmeňa H103 z CAUP. Rovnako ako pre skupinu C zatiaľ nie je známa žiadna podobná sekvencia. Klony sú vzájomne sekvenčne variabilnejšie než napríklad izoláty symbiontov z rôznych lišajníkov (skupina A2). Postavenie tejto skupiny v rámci vzťahov so skupinami A1, A2 a C je nejasné.

Do fylogenetickej skupiny A1 patria kmene C1, E1, E2, E3, U1, U2, U3, U4, U5 a sekvencie *C. subellipsoidea* SAG 216-13 (AY328523.1), symbiont z *Peltigera britannica* (AY330650.1) a symbionti z kalichovky *Omphalina* (AY293932.1-48.1). Skupina je konzervovaná a je v nej len niekoľko sekvenčných zmien. Menšie odchýlky od konzervovanej sekvencie vykazovali kmene C1 a U5.

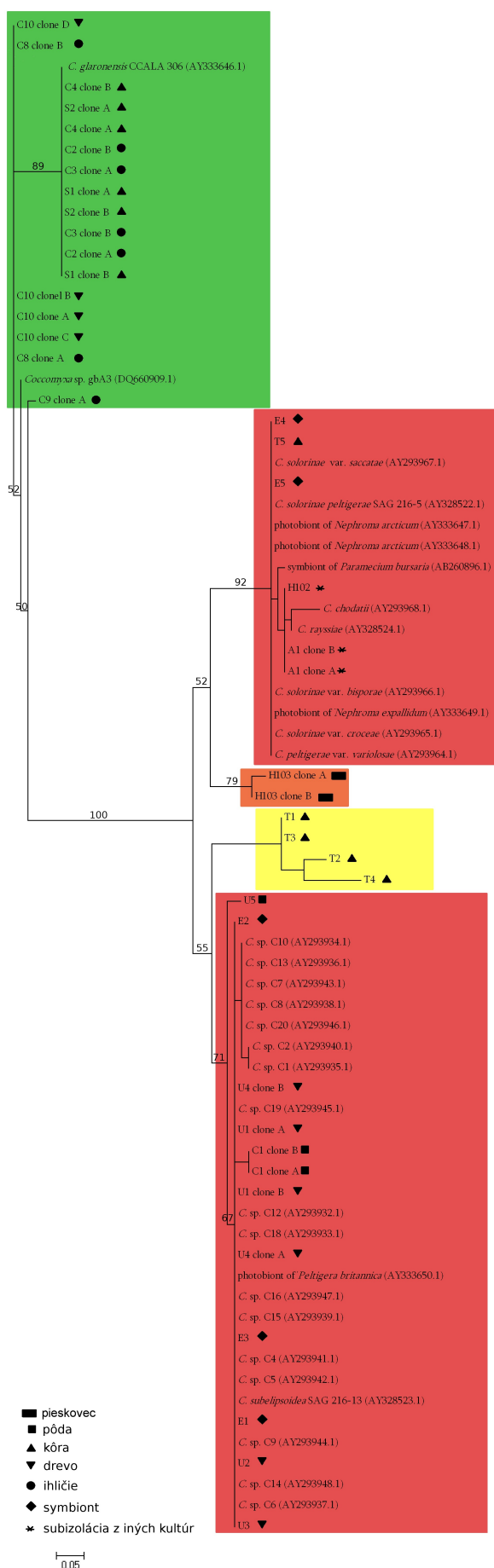
Do skupiny A2 patria kmene E4, E5 a T5, súčasne sú do skupiny zahrnuté i sekvencie z Genbanku označené ako fotobionty z lišajníkov *Nephroma articum* a *N. expallidum* a sekvencie lichenizovaných zástupcov rodu *Coccomyxa*, popísaných z lišajníkov *Solorina* a *Peltigera*: *C. solorinae* var. *bisporae* – typová kultúra, *C. peltigerae* var. *variolosae* – typová kultúra, *C. solorinae* var. *saccatae*, *C. solorinae* var. *croceae* – typová kultúra, *C. peltigerae* SAG 216-5. Sekvenčne je táto skupina veľmi konzervovaná a tieto sekvencie sa líšia jedinou nukleotidovou zámenou. Do skupiny A2 ďalej patria kmene H102 a A1 a sekvencie *C. chodatii* – typová kultúra, *C. rayssiae* – typová kultúra a symbiont z *Paramecium bursaria* (AB260896.1). Tieto kmene sa v rámci skupiny A2 vyčleňujú do vlastnej podskupiny s posteriornou pravdepodobnosťou v Bayesovskej analýze 0,75. V rámci tohto kladu je významne podporená skupina sekvencií H102, A1 a *C. rayssiae* a *C. chodatii* (posteriorná pravdepodobnosť 1,00). Analýza v programe PAUP už túto skupinku podporila iba bootstrapovou podporou 57%. V ML strome z programu PAUP je

sekvencia AB260896.1, symbiont z *Paramecium bursaria*, bazálny v rámci skupiny A2. Algoritmus programu PhyML oddelenie tejto podskupinky takisto nepodporil (Obr. 10).

Na základe ITS2 skupina C, ktorá na 18S rDNA stromoch mala nejasné postavenie, je teraz priradená ku skupine A s posteriornou pravdepodobnosťou 0.98 a bootstrapovou hodnotou 100% (Obr. 9, Obr. 10). Do skupiny C patria len sekvencie kmeňov T1, T2, T3 a T4. Sekvencie T1 a T3 boli identické. Na základe porovnania dĺžok konárov medzi kmeňmi, môžeme súdiť, že skupina C patrí medzi rýchlejšie evoluujúce skupiny. Mutačná rýchlosť v skupine je relatívne vyššia oproti ostatným skupinám, o čom svedčia dlhé konáre medzi kmeňmi T1, T3 a T2 a T4 (Obr. 9, Obr. 10). Príbuzenské vzťahy k skupinám A1, A2 a D nie sú jednoznačné. ML analýza v programe PAUP ukazuje na najbližšiu príbuznosť so skupinou A1 s podporou tohto konára 70%. Naproti tomu ML v programe PhyML už tento konár podporuje len bootstrapom 55%. Posteriorná pravdepodobnosť v Bayesovskej analýze tento konár podporuje hodnotou 0,58.

Fylogenetická línia B rozlíšená na základe 18S rDNA stromu je od skupiny A dobre oddelená aj na základe analýz ITS2 oblasti (posteriorná pravdepodobnosť 1,00; bootstrapové hodnoty programu PAUP a PhyML 100%). Vzťahy v rámci tejto skupiny podobne ako v skupine A nie sú dostatočne vyriešené. Zdá sa, že v rámci skupiny B, bola línia, ktorá rýchle evolvovala. Táto evoluujúca línia je vysoko podporená ako posteriornou pravdepodobnosťou 1,00 v Bayesovskej analýze, tak bootstrapovými hodnotami 97% (PAUP) a 89% (PhyML) v ML analýze. Do tejto evoluujúcej skupiny sa zaradili sekvencie kmeňov C2, C3, C4, S1, S2 a sekvencia *C. glaronensis* zo zbierky CCALA. Vzťahy medzi touto skupinkou a ďalšími sekvenciami v skupine B (C8, C9, C10, *Coccomyxa* sp. gbA3) nie sú dostatočne dobre štatisticky podporené ani v Bayesovskej analýze ani v maximum likelihood analýze.

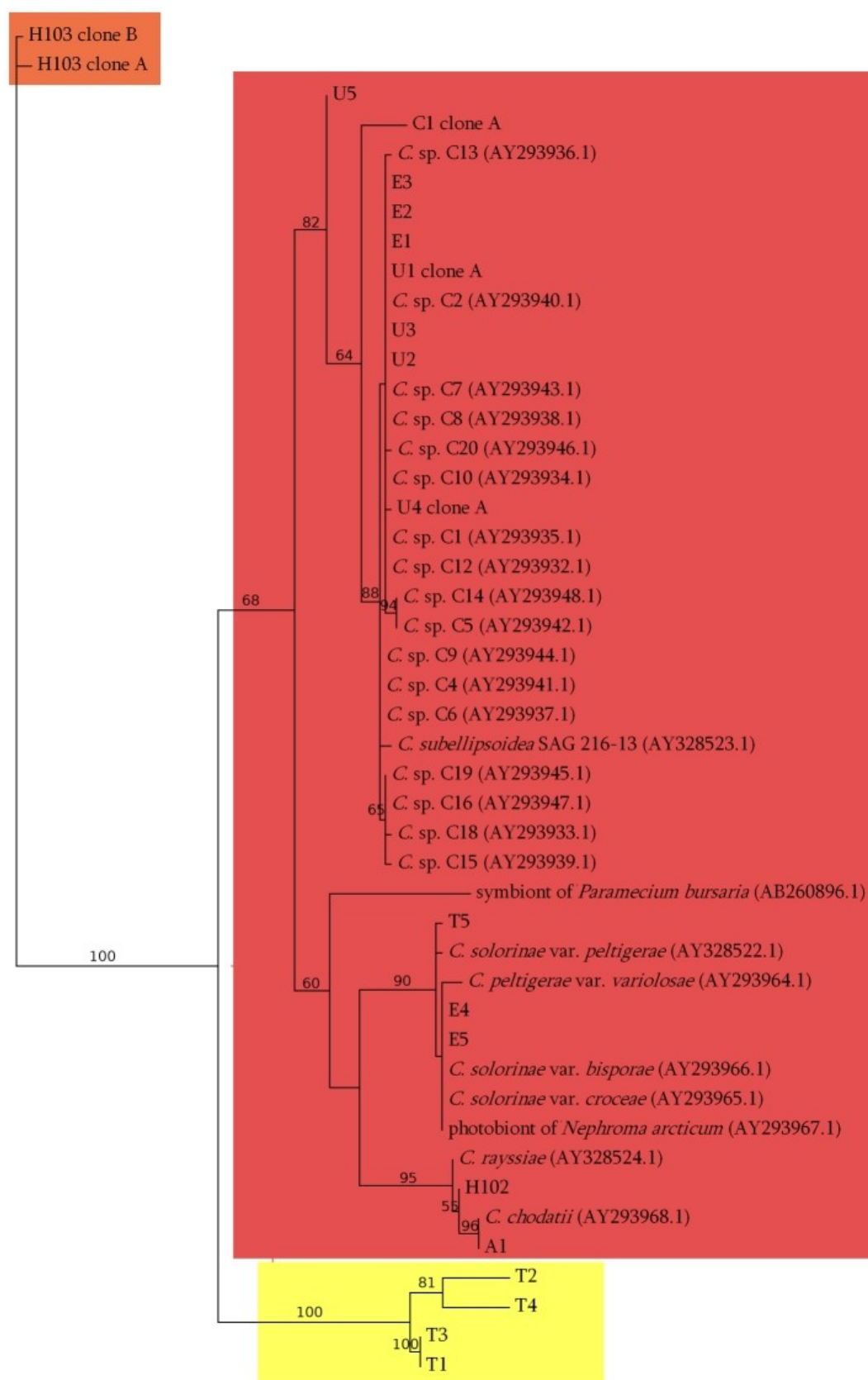
Priame sekvencie kmeňov C5, C6, C7, C11 a C12, použitých v morfometrických analýzach, sú zhodné s priamymi sekvenciami kultúr C9 a C10. Tieto kultúry patria do skupiny B.



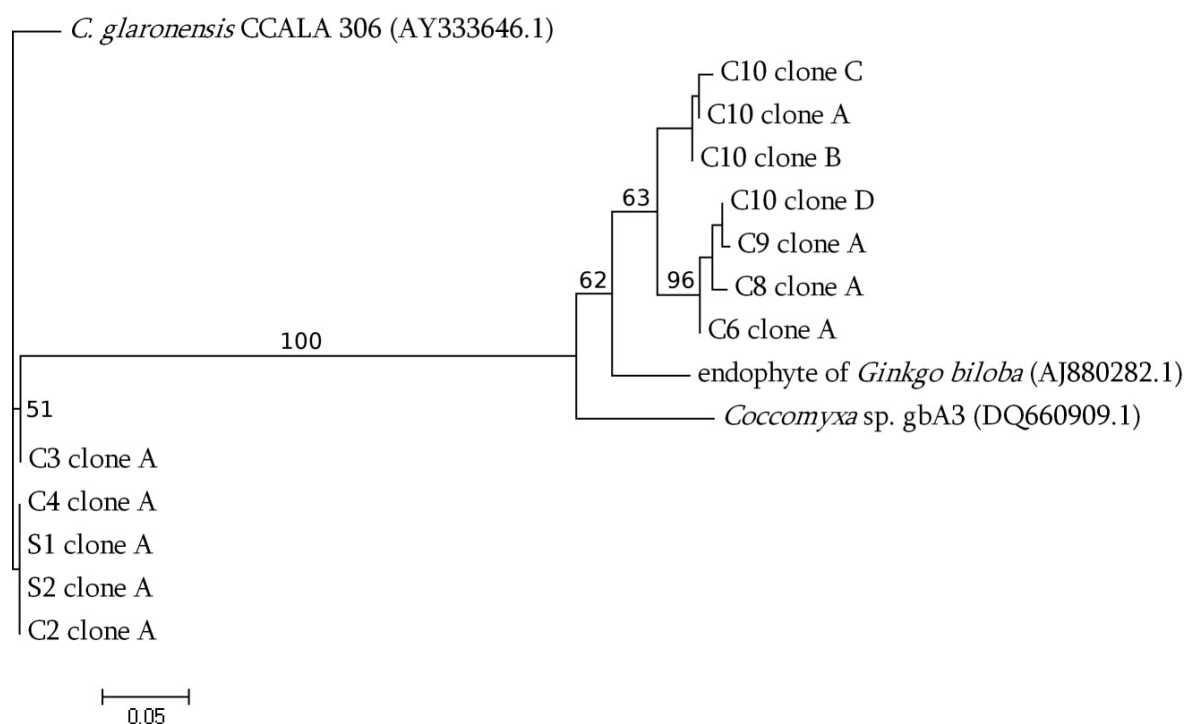
Obr. 10 ML analýza ITS2 oblasti v programe PhyML so substitučním modelom GTR+G+I, fylogenetické skupiny sú označené farbami podobne ako na Obr. 8, ku študovaným kmeňom je značkami zobrazený mikrobiotop

Maximum likelihood analýzami markeru ITS1 som sa snažila lepšie rozlíšiť vzťahy medzi skupinami. Dve hlavné fylogenetické línie A a B sa od seba v tejto oblasti, líšili tak, že spoločný vierohodný alignment pre obe skupiny nebol možný. Preto som tieto dve skupiny zaligovala osobitne. Pre výpočet ML stromu bol použitý alignment 149bp dlhý pre skupiny A, C, D a 254 bp pre skupinu B. Z pôvodného alignmentu boli odstránené pozície, ktorých mnohonásobné priradenie pri rôznych nastavenia parametrov „gap opening penalty“ a „gap extension penalty“ sa nevyskytovali vo viac ako 50% takto vytvorených alignmentoch. Získané fylogenetické stromy sú nezakorenené. ML strom (log likelihood -953,5597) pre skupinu A, jednoznačne, s bootstrapovou podporou 100%, vyčlenil zo skupiny A kultúru H103 a skupinu C (Obr. 11). Skupina A2 rovnako ako na ITS2 stromoch má nízku podporu (bootstrapová podpora 60%). Avšak v rámci tejto skupiny ITS1 marker jednoznačne vymedzil podskupinu v ITS2 oblasti sekvenčne veľmi konzervovanú (kultúry E4, E5, T5 a sekvencie symbiontov z rádu Peltigerales) a podskupinku tvorenú kultúrami H102 a A1 a sekvenciami typových kultúr *C. chodatii* a *C. rayssiae*. Skupina A1 je podporená bootstrapovou hodnotou 82%. Spolu tieto dve skupiny A1 a A2 tvoria jednu spoločnú líniu podporenú bootstrapovou hodnotou 68%. Táto skupina je viditeľná aj na 18S rDNA stromoch s bootstrapovou podporou 70% na ML strome. Skupina C v tejto analýze klastruje z vonku k skupine A, čo sa líši od ITS2 stromu, kde klastruje k skôr k skupine A1, aj keď iba s nízkou bootstrapovou podporou. Na ML strome ITS1 má toto usporiadanie bootstrapovú podporu 100%.

ML strom ITS1 (log likelihood -868,1947) pre skupinu B (Obr. 12) neprinesol nové informácie oproti stromu z ITS2. Strom jednoznačne s bootstrapovou podporou 100% od seba oddelil rýchle evolvujúcu skupinu s *C. glaronensis* a kmeňmi C2, C3, C4, S1 a S2 a skupinu s kultúrami C8 a C10 a sekvenciou DQ660909.1, do tejto skupiny sa priradila aj sekvencia ITS1 získaná z endofyta z *Ginkgo biloba*. Tá sa s bootstrapovou podporou 62% oddeľuje od skupiny klonov kultúr C8 a C10. Do tejto skupiny súčasne patrí aj kultúra C6, ku ktorej sa mi podarilo získať čistú sekvenciu ITS1. V rámci tohto klastru sa ešte vzájomne dajú odlíšiť ITS klony. Na vzťahy medzi týmito podskupinami v rámci skupiny B však nemôžeme usudzovať, pretože je to strom nezakorenený, a preto otázka, či je skupina s *C. glaronensis* len skupinou, ktorej predok rýchle evolvoval oproti ostatným členom svojej skupiny, alebo či tieto dve podskupiny vznikli divergenciou spoločného predka, zostáva nezodpovedaná.



Obr. 11 ML nezakorený strom pre skupiny A, C a D počítaný na základe sekvencií ITS1 markeru s použitým substitučním modelom GTR+G+I. Bootstrapy sú uvedené len pre konáre podporené >50%



Obr. 12 Nezakorenený ML strom ITS1 oblasti pre fylogenetickú líniu B. Strom bol vypočítaný v programe PhyML s použitím substitučného modelu GTR+G+I. Bootstrapy sú uvedené len pre konáre podporené >50%

Vo fylogenetických skupinách možno vybadat' isté ekologické preferencie (Obr. 10). Skupina A je lichenizovaná lišajníkmi rodu *Omphalina* (len A1), *Peltigera* (A2 a A1), *Solorina* (A1 a A2) a *Nephroma* (A2). Do skupiny súčasne patria aj kmene získané ako voľne žijúce z mŕtveho smrekového a jedľového dreva (kmene U1, U2, U3, U4, C13, C14, C15, C16). Kmene U1 až U4 boli zbierané na lokalitách, kde boli priamo pozorované kalichovky *Omphalina*. Do skupiny A1 ešte patria tri kmene E1, E2 a E3 izolované z lišajníka *Solorina*. Druhy popísané Jaagom (1933) z tohto rodu však na základe sekvencií typových kultúr patria do skupiny A2. So sekvenciami týchto typových kultúr je identická aj sekvencia typovej kultúry *C. peltigerae* var. *variolosae*. Do skupiny A2 súčasne patria aj kmene E4 a E5 získané z lišajníkov *Peltigera*. Do tejto sekvencne veľmi konzervovanej skupiny patrí aj kmeň T5, ktorý bol získaný izoláciou z kôry. V rámci ITS2 a ITS1 sa v skupine A2 vyčleňuje podskupina kmeňov H102 a A1 spolu so sekvenciami *C. chodatii* a *C. rayssiae*. Kmeň A1 bol izolovaný zo submerzného spoločenstva z potoka v okolí Abiska. Kultúra H102 bola získaná izoláciou z kultúry *Paramecium bursaria*. Typová kultúra *C. chodatii* bola získaná zo Ženevského jazera, *C. rayssiae*, ako epifyt z lišajníka v Rumunsku. Do skupiny A2 súčasne klastruje aj sekvencia získaná zo symbionta *Paramecium bursaria*. Na základe 18S rDNA do celej skupiny A, ktorá nerozlišuje medzi skupinami A1 a A2, patrí aj sekvencia c169,

získaná podobne ako kultúra H102 subizoláciou z kultúry *Paramecium bursaria*. Do skupiny A súčasne patria aj kmene zo zbierky NIES, u kmeňa NIES-2353, je známe, že bol izolovaný z Antarktídy. Kmeň A1 bol izolovaný pri ľadovcovej moréne.

Skupina C je tvorená len kultúrami izolovanými z tropického dažďového pralesa z dvoch rôznych lokalít. Usudzovať na mikrohabitatové preferencie v tejto skupine môžeme len ťažko, pretože kmene boli získané z nárastových spoločenských stromov (T1, T2, T3) a na *Bambusa* sp. (T4), ale iné mikrobioty neboli preskúmané. Ekologická preferencia je však v tejto skupine zrejmalá. Neboli nájdené žiadne temperátne kmene, ktoré by patrili do tejto skupiny.

V skupine D je tiež ťažké určiť ekologické preferencie, pretože do tejto skupiny patria len kultúry H103 a C15. Kultúra C15 bola izolovaná z dreva na Šumave. Kultúra H103 bola izolovaná z pieskovca v Adršpachu. Tento mikrobiotop moje odbery nepokrývali.

Do skupiny B patria kmene izolované hlavne z kôry a ihličia smreku. Patria tam však aj kmene izolované z dreva (C10) a z pôdy (C6). Sekvencie *C. glaronensis* a *Coccomyxa* sp. gbA3, patria takisto do skupiny. *C. glaronensis* zo zbierky CCALA bola izolovaná z lišajníka. Pôvod izolátu *Coccomyxa* sp. gbA3 nie je známy. Súčasne na základe 18S rDNA analýz do skupiny patria ešte endofyty z *Ginkgo biloba* a parazitujúci zástupci v slávke jedlej *Mytilus edulis*. Parazitujúci zástupci tvoria monofyletickú skupinu. Vzťahy medzi ostatnými zástupcami línie nie sú jednoznačne rozlíšiteľné na základe ITS2 sa zdá, že v rámci tejto jednej línie sa vyvinula skupina, ktorá začala rýchlejšie evolvovať, než ostatní zástupcovia skupiny.

Zdá sa, že v skupine A sú preferenčne lichenizovaní zástupci a v skupine B voľne žijúci, vrátane zástupcov, ktorí preferujú iný spôsob života než symbiózu. Do skupiny C patria iba tropickí zástupcovia.

3.2 Molekulárna variabilita študovaných kmeňov

18S rDNA

Kmene v 18S rDNA oblasti boli dobre zalignovateľné. Kmene U2, T3, C13, C14 a sekvencie c 169 (kontaminácia kultúry *Paramecium bursaria*) a sekvencie *C. dispar* NIES-2252 a NIES-2353 (AB488787.1, AB488794.1)EU127473.1 z *Coccomyxa* parazitujúcej *Mytilus edulis* obsahovali intrón na rovnakej pozícii ako *C. pringsheimii* (AY762603) na pozícii 985 v celkovom alignmente. Kultúry T4, C16 a sekvencie c169, a *C. dispar* NIES-2252 a NIES-2353 obsahovali intrón na pozícii 2035. Intróny kultúr C16 a c169 sa sekvenčne líšili o jeden indel.

ITS1

ITS1 oblasť bola veľmi variabilná u študovaných kmeňoch a ťažko zalignovateľná. Táto oblasť spolu s 5.8S a ITS2 oblasťou sú v genóme vo veľkých množstvách. V niektorých kmeňoch som zaznamenala vnútrogenomvú variabilitu v tejto oblasti. Šlo o kmene C10 a H103.

U kmeňa C10 sa jedná o väčšie genomové prestavby než o jednoduché substitúcie, či indely. Celkovo to bolo 31 variabilných pozícií len v rámci týchto klonov. Klony sa líšili o tri veľké indely (5, 11 a 4 nukleotidy).

Klony kmeňa H103 sa v ITS1 oblasti líšili na 23 pozíciách, v klonoch boli takisto väčšie indely (2, 2, 2, 5, 6 nukleotidov). U ostatných kultúr som vnútrogenomovú variabilitu v ITS1 oblasti nezaznamenala.

5.8S rDNA

Táto oblasť patrí k najkonzervovanejším úsekom. V tejto oblasti je len 16 variabilných pozícií z celkovej dĺžky 159 bp.

ITS2

Študované kmene sa v ITS2 oblasti líšili dĺžkou (217 – 275). Niektoré kmene boli v oblasti ITS2 heterogénne, čiže obsahovali viac rôznych kopíí ITS2, ktoré sa vzájomne líšili buď o jeden indel a niekoľkými variabilnými pozíciami (týmto zmenám sa viac venujem v nasledujúcej kapitole).

3.2.1 Variabilita v sekundárnej štruktúre ITS2 oblasti

Sekundárna štruktúra ITS2 oblasti kmeňov si odpovedá viac než si odpovedajú primárne sekvencie tejto oblasti u študovaných kmeňov. Sekundárna štruktúra je tvorená zo štyroch nerovnako dlhých helixov, na ktorých sa rozlišujú stemy a loopy. Stemy sú konzervované úseky, väčšina sekvenčnej variability je sústredená do loopov. Pokiaľ sa u kmeňov vyskytuje viac klonov, líšia sa často len indelmi alebo substitúciami v loope. Zmena párovania báz v oblasti stemu má vplyv na sekundárnu štruktúru, ktorá je dôležitá pri RNA processingu.

Vlásenky sú jednoduché, bez žiadneho ďalšieho vetvenia. Helix I je zložený z 9 – 12 párujúcich sa báz. Je vždy kratší alebo rovnako dlhý ako helix II. Výnimku tvorí skupina B, ktorá má oproti ostatným skupinám na konci helixu I inzerciu o dĺžke štyroch resp. piatich párov báz.

Helix II je dlhý maximálne 13 párujúcich bází – u skupiny B a u kultúry H103, v ostatných skupinách je jeho dĺžka konzervovaná na 12 z párovaných bázach. U všetkých skupín je v helixe II rozpoznateľný pyrimidín-pyrimidín (tymín - tymín) „mismatch“ na začiatku helixu. Pred ním sa ešte nachádza nerozlíšený purín- purín „mismatch“, ktorý sa u tropických kmeňov T2 a T4 a u časti skupiny B, ktorá rýchlo evolvovala, nevyskytoval. Helix III bol vždy najdlhší. Začína u všetkých kmeňov GGCT párovaním. Aj keď jeho dĺžka varíruje najviac zo všetkých ramien (32 – 41 bp) jeho stavba a rozloženie báz je relatívne konzervované, pre jednotlivé skupiny sú stemy tohto ramena stále. Pre dve hlavné fylogenetické línie je dĺžka konzervovanejšia, skupina A spolu so skupinami C a D má dĺžku 32-35 párov báz, skupina B 39- 41 párov báz. V skupine A sa univerzálne zalignovateľná oblasť UGG (COLEMAN 2003) v ramene 3 blízko vrcholu dala rozpoznať avšak u skupiny B sa takáto kombinácia znakov nenachádzala. Vo všetkých skupinách sa blízko vrcholu nachádzal motív GGU.

Štvrté rameno je najvariabilnejšie, čo do dĺžky (11 – 18 párov bází) i čo do sekvenčných zmien. Bolo problematcky zalignovateľné aj na základe sekundárnej štruktúry, pretože v ňom často prebiehali inzercie alebo delécie. Ani na základe sekundárnej štruktúry nebolo možné vytvoriť spoľahlivý alignment tejto oblasti. Toto rameno má vyšší podiel GC (guanín-cytozín) párov oproti ostatným ramenám.

Sekundárna štruktúra ITS2 je len artificijným modelom, vypočítaným na základe najnižšej voľnej energie. Skutočná sekundárna štruktúra, ktorá sa tvorí pri podmienkach v bunke môže

byť odlišná.

Podľa prác Coleman (2003, 2007, 2009) sa dá na základe zmien párujúcich nukleotidov (CBC – compensatory base change a hCBC hemi CBC) v konzervovaných oblastiach určiť možnosť vzájomného kríženia a teda vzťah fylogenetických skupín s biologickým konceptom druhov. Pretože jednotlivé skupiny sú veľmi variabilné a helixy I a IV sú problematicky zalignovateľné, CBC som hľadala len na druhom a treťom ramene pre všetky kombinácie skupín (Tab. 6). Pri porovnávaní rozdielov medzi skupinami som brala za podstatné tie zmeny, ktoré odlišovali skupiny a nie zmeny, ktorými sa odlišovali len niektoré kmene zo skupiny.

V študovaných kmeňoch sa dá rozlíšiť šesť až sedem subtypov podľa sekundárnej štruktúry, tie odpovedajú fylogenetickým skupinám podľa ITS2 stromu.

	A1	A2	C	D	B1	B2
A1		3	(+1 u T2)	1	3	2
A2	1		3 (+1 u T2)	1	4	3
C	(+1 u T2 +1 u T1, T3, T4)	1 (+1 u T2)		2	3(+2 u T2)	2
D	2	3	2(+1 u T2 +1 u T1, T3, T4)		2	2
B1	2	2	2(+1 u T2 +1 u T1, T3, T4)	3		1
B2	2 (+1 u U5)	2	3 (+1 u T1, T3, T4)	2	1	

Tab. 6 Počet CBC a hCBC v helixoch II a III v sekundárnej štruktúre ITS2. Uvedené CBC a hCBC sa vyskytovali vo všetkých kmeňoch danej skupiny, pokiaľ sa niektoré CBC alebo hCBC vyskytovalo len u niektorého z kmeňov uvádzam toto číslo v zátvorke s údajom o tom, v ktorom kmene to tak bolo. Nad diagonálou sú vedené CBC, pod diagonálou sú uvedené hCBC

Skupina A1 (Obr. 14, Obr. 16, Obr. 17)

Táto skupina patrí, čo sa týka sekundárnej štruktúry k tým konzervatívnejším, aj keď v skupine boli detekované dva kmene, ktoré sa od ostatných kmeňov odlišovali viacerými zmenami. Šlo nielen o nukleotidové zámenny v loopoch, ale aj o hCBC. U kmeňa C1 to boli 4 hCBC, u kmeňa U5 taktiež 4 hCBC, ale na iných pozíciách než u kmeňa C1. Medzi kmeňmi tejto skupiny sú rozdiely sú na pozíciách: 16 – C alebo U u kmeňov E2, E3, 22 – variabilná pozícia u väčšiny kmeňov (C, U), 27 – delécia u kmeňa C1 (A), 74 – variabilná pozícia u väčšiny kmeňov (G, U), 98 – u kmeňov U5, C1, je A miesto G, 128 – A, G, C, 129 – u C1 je

G miesto A, 131 – inercia G u U5, 143 – C1 má A miesto G, 153 – C alebo T u kmeňov E2, E3, 157 – kmeň U5 má A miesto G, 158 – kmeň C1 má A miesto C, 163 – U5 má T miesto C, 183 – C1 má C miesto T, 191 – U5 T miesto C, na pozícii 198 – majú kmene E2, E3 U alebo G resp. A alebo G, rovnako ako na pozícii 204, kde tieto kmene môžu mať A alebo G, na pozícii 213 je u kmeňa C1 inercia cytozínu. U kmeňov E2 a E3 som detekovala štyri variabilné pozície (16, 153, 198 a 204), pravdepodobne sa takisto jedná o heterogenitu medzi kópiami ITS v týchto kmeňoch. Celkovo sa kmene v tejto skupine líšia 18 zámienami a indelmi.

Skupina A1 je, čo sa týka sekundárnej štruktúry ITS2 konzervovaná. Medzi kmeňmi nie je žiadna zámiena páru bází CBC. V helixe III som našla 3 hemiCBC u kmeňa U5 a dve hemiCBC u kmeňa C1. Tieto CBC nie sú ekvivalentné. Ostatné kmene sa líšia ešte v niektorých bázach v loopoch a nepárujúcich oblastiach. Helix II je plne štruktúrne i sekvenčne konzervovaný. Helix IV je ľahko zalignovateľný so štyrmi variabilnými pozíciami, ktorými sa pravdepodobne odlišujú klony ITS2 v kultúrach E2 a E3 (dve pozície) a dve hCBC pre C1 a U5 (Obr. 17).

Skupina A2 (Obr. 14, Obr. 16, Obr. 17)

Kmene patriace do tejto skupiny sa vzájomne líšia hlavne iným zložením loopov, stemy sú veľmi málo variabilné. Na základe ITS2 sekundárnej štruktúry sa dajú v tejto skupine rozpoznať dve podskupiny. V helixe I je v skupine A2a je oproti skupine A2b navyše posledný pár cytozín-guanín a na začiatku helixu je jeden cytozín inzerovaný. Helix II je konzervovaný bezo zmeny. V helixe III sa nachádzajú dve hCBC. Helix IV je už ťažko zalignovateľný, hlavne kvôli pravdepodobne inzerovanej repetícii tymín – purín v skupine A2a. (Obr. 17)

Skupina A2a

Skupina A2a je homogénna. Medzi sekvenciami študovaných kmeňov a sekvenciami z Genbanku nie je jediná variabilná pozícia, okrem sekvencie pod kódom AY293965.1, ktorá v helixe III mala oproti ostatným deletovanú jednu guaninovú bázu.

Skupina A2b

V tejto skupine je celkovo 12 zmien, z toho 9 v loopoch a oblastiach spájajúcich helixy. Dve zmeny menia možnosť párovania bází. U kmeňa A1 som detekovala dve rôzne kópie ITS2 oblasti. Klony sa líšia o jeden tymín na piatej pozícii. Klony sa ešte pravdepodobne líšia

prítomnosťou guanínu alebo cytozínu na 22. pozícii, purínovou bázou na 52. pozícii, pyrimidínom na 54. pozícii, uracilom alebo guanínom na 85. pozícii, cytozínom alebo adenínom na 129. pozícii. V kultúre H102 je jediná variabilná pozícia 173, kde sa môže nachádzať guanín alebo cytozín. Sekvencia *C. chodatii* (AY293968) sa líši inzerciou guanínu do stemu v helixe III, má dve hCBC v helixe III a chýba jej jeden guanín v loope v helixe III. Táto sekvencia sa ešte líši bázami na začiatku helixu III, ale tieto bázy sa vôbec nepárujú, čo je dôvodom pre zváženie možnosti chyby pri sekvenovaní. Kmeň H102 sa spolu s *C. chodatii* (AY293968) od klonov kmeňa A1 odlišuje prítomnosťou cytozínu v oblasti spojujúcej helix III a helix IV.

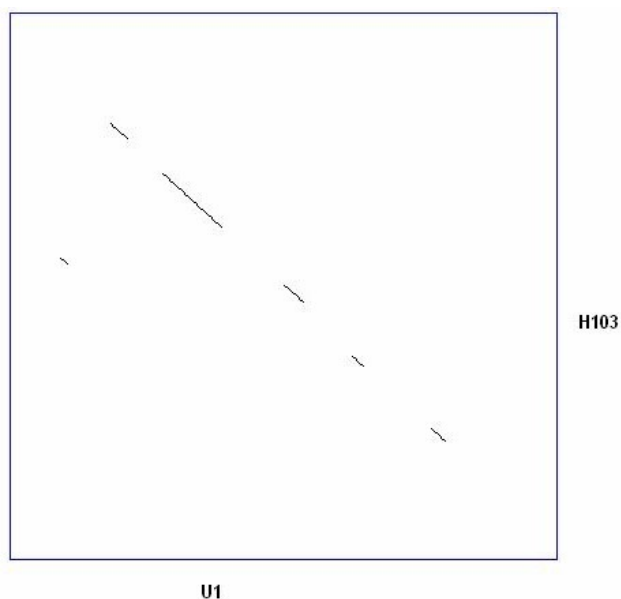
Skupina C (Obr. 14, Obr. 16, Obr. 17)

Sekvencie kmeňov T1, T2, T3 a T4 sú na prvý pohľad veľmi diverzifikované, ale sekundárna štruktúra v tejto skupine je konzervovaná. Kmene T1 a T3 sú sekvenčne zhodné, kmeň T2 sa od nich líši jedným hCBC v helixe II. Helixy III sa nelíšia u týchto troch kmeňov. V helixoch I a IV sú v kmeni T2 inzercie párov báz po jednom resp. dvoch pároch báz. V helixe I je takisto nahradená trojica párov cytozín- guanín v kmeňoch T1 a T3 trojicou tymín- adenín u kmeňa T2 (Obr. 16). Celkovo je medzi kmeňmi T1, T3 a T2 sedem CBC a 1hCBC v helixe I. V helixe IV sú celkovo štyri substitúcie, z toho len jedna je typu hCBC. Ostatné rozdiely sa týkajú u len loopov a spojujúcich oblastí.

Kultúra T4 je sekvenčne najdiverzifikovanejšia, ale štruktúrne odpovedá tejto skupine, líši sa hlavne inzerciami párov báz na konci helixov I, II, III. V helixe I má oproti T2 inzerovanú štyrikrát repetíciu páru uracil- adenín (Obr. 16). Kmene T1 a T3 a T4 líšia šiestimi CBC v helixe I, Kmene T2 a T4 sa v helixe I líšia len jedným CBC a jedným hCBC. Ani helix II nezostal štruktúrne rovnaký. Na rovnakom mieste ako medzi kmeňmi T1, T3 a T2 je jedna hemi CBC. Kmeň T4 má navyše na konci helixu II vložených päť párov báz a tri nukleotidy (Obr. 14). Helix III má jedno hCBC zhodné s T1 a T3, súčasne sa koniec helixu III úplne prestaval, v porovnaní s T2 sú tesne pred loopom deletované dva páry báz a vložené štyri páry báz a štyri nepárujúce nukleotidy (Obr. 14). V helixe IV sa takisto nachádza oblasť, ktorá podľahla masívnym prestavbám v sekundárnej a primárnej sekvencii (Obr. 17).

Skupina D (kultúra H103) (Obr. 14, Obr. 16, Obr. 17)

Táto skupina je tvorená len dvoma klonmi z kultúry H103. Ale napriek tomu tvoria vlastnú podskupinu, pretože najvyššiu sekvenčnú podobnosť podľa algoritmu BLAST (ALTSCHUL ET AL. 1990) vykazujú 83% so skupinou A (kmeň U1) (Obr. 13). Klony sa líšia v helixe I (Obr. 16) a v helixe II a jedným hCBC v helixe III. Ďalšie rozdiely sú v loopoch. Kópie ITS2 oblasti sú v tejto skupine najvariabilnejšie zo všetkých skupín. Klony sa vzájomne líšia siedmymi zmenami.



Obr. 13 Dot plot ITS2 oblasti pre klon A kultúry H103 a sekvenciu kultúry U1

Skupina B (Obr. 15, Obr. 16, Obr. 17)

Táto skupina sa od skupiny A odlišuje inzerciou stemu na konci helixu III . V rámci tejto fylogenetickú línie sa dajú rozoznať dva subtypy B1 a B2 sekundárnej štruktúry ITS2 .

Skupina B1

Kmene v tejto skupine sú sekvenčne veľmi homogénne. Tomu odpovedá i štruktúrna similarita, pretože rozdiely sú jedine v loopoch, indel jednej báze u rôznych klonov v každom zo študovaných kmeňov. Klony u kmeňov S1 a S2 sa vzájomne odlišujú ešte na pozícii 84, kde sa nachádza buď cytozín alebo adenín. Klony kmeňa C3 sa líšia v pozícii 85, kde sú možné oba dva puríny. Táto variabilita je v oblasti spojenia helixov II a III. Sekvencia *C. glaronensis* (AY333646.1) z Genbanku sa od študovaných kmeňov odlišovala

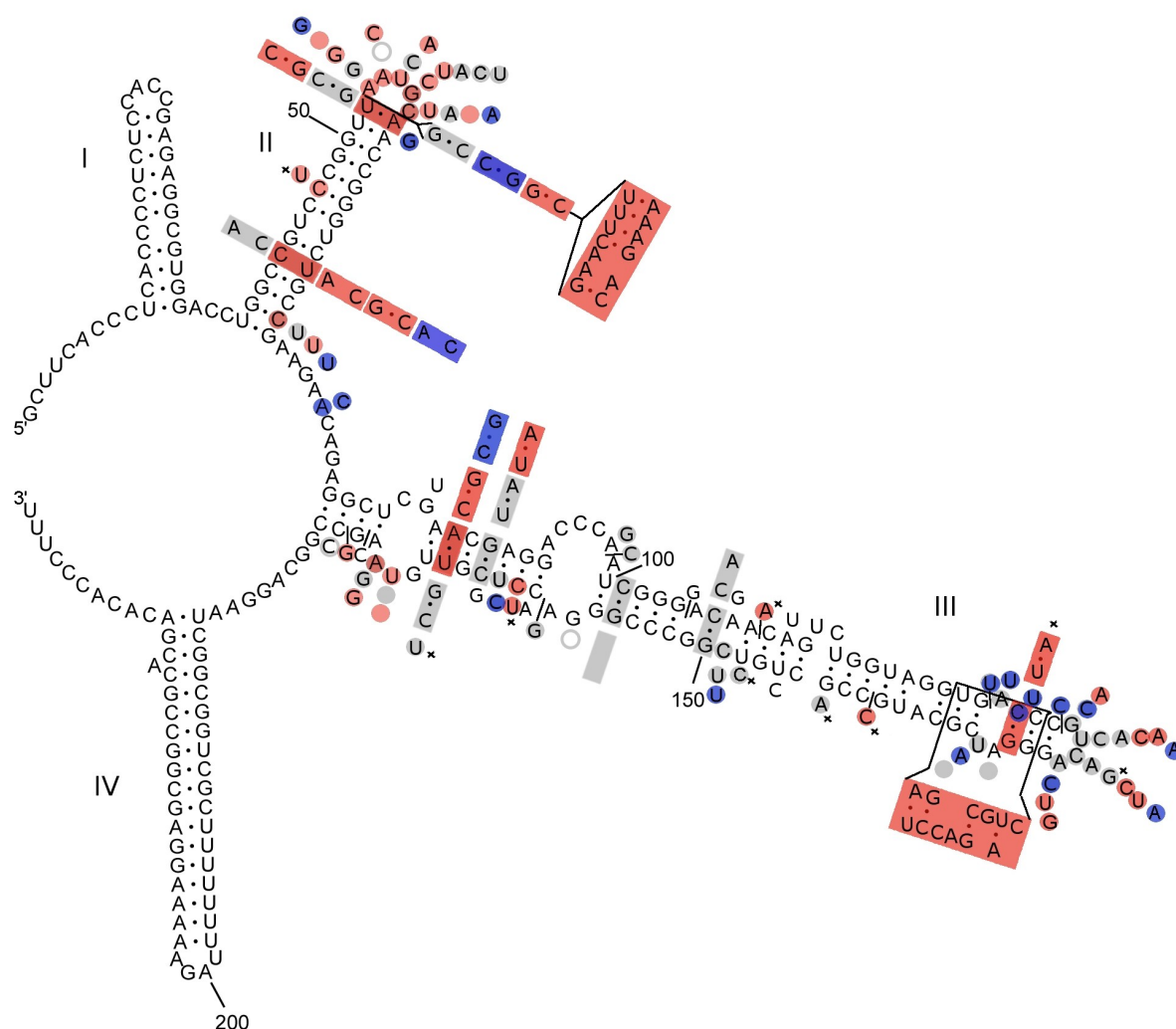
vo viacerých bázach, ale štruktúrne sa od tejto skupiny neodlišovala, rozdiely boli len v loopoch helixov II a III. V oblasti spojujúcej helixy III a IV je u *C. glaronensis* jedna neznáma báza. Variabilitu v helixe IV som nezaznamenala. Študované kmene boli zhodné a sekvencia *C. glaronensis* (AY333646.1) je iba čiastočná, takže daný úsek už nebolo možné porovnať.

Skupina B2

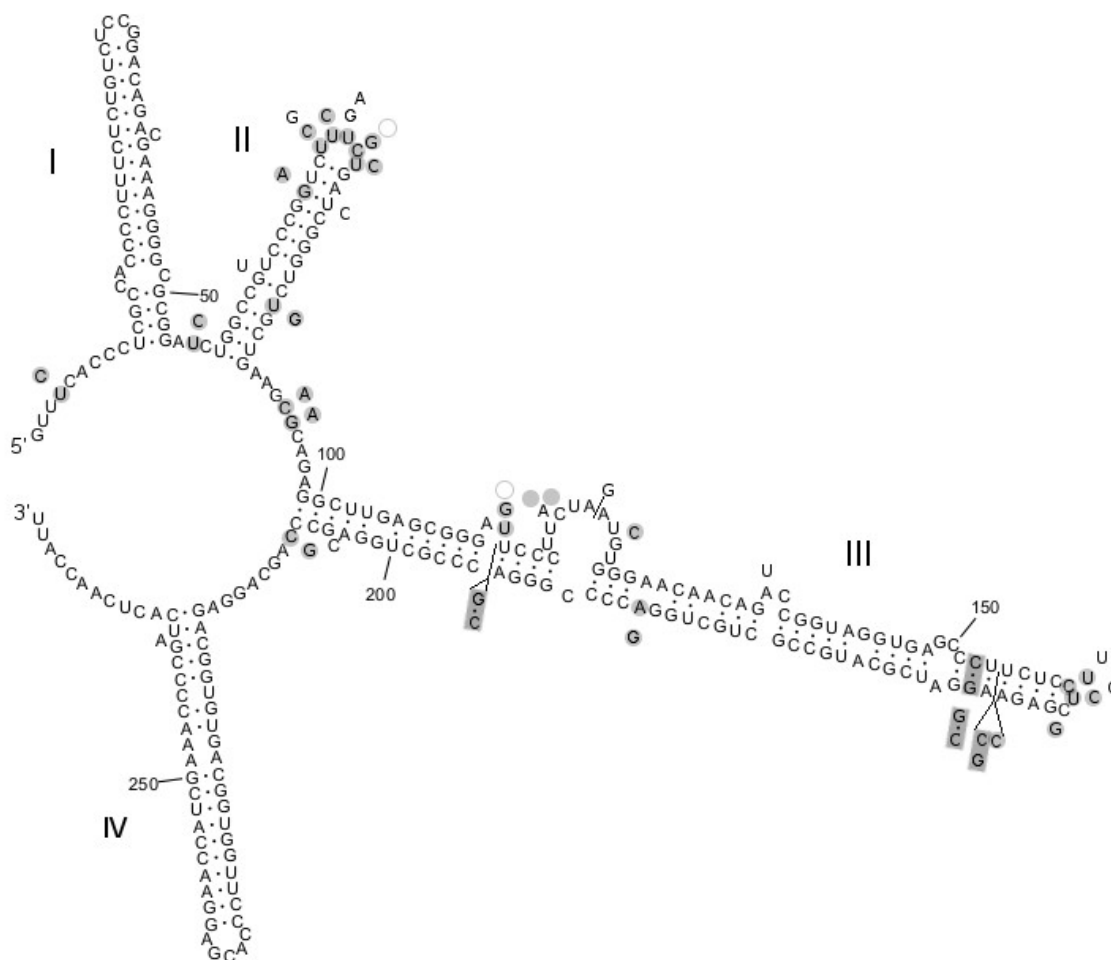
Túto skupinu od skupiny B1 a aj všetkých ostatných skupín odlišuje inzercia na konci helixu I, ktorá predlžuje helix o šesť párov bází oproti B1. Rovnako ako skupina B1 má na konci helixu III inzerciu, ale o tri nukleotidy kratšiu.

Táto skupina patrí medzi najrýchlejšie podliehajúce mutáciám, v jednotlivých kmeňoch sa vyskytuje vždy viac rôznych kopíí ITS oblasti. Klony som získala iba pre kmene C10 a C8. Jeden klon sa mi podarilo získať aj pre kmeň C9. Na základe priamych sekvencií do tejto skupiny patria aj kultúry C5, C6, C7, C11 a C12. Klony kmeňa C10 sa v ITS2 oblasti líšia v dvoch indeloch v oblastiach loopov. Klony C8 sa odlišujú od C10 dvoma nukleotidami v loope helixu IV (Obr. 17). C8 klon A sa ešte líši inzerciou adenínu do stemu v helixe I (Obr. 16). Klon C9 sa odlišuje substitúciami troch nukleotidov v helixe I (Obr. 16), jednou párujúcou a jednou nepárujúcou zmenou v helixe II a prestavbami v loope helixu II. Ďalšie zmeny oproti klonom C8 a C10 sú len v loope helixu IV (Obr. 17).

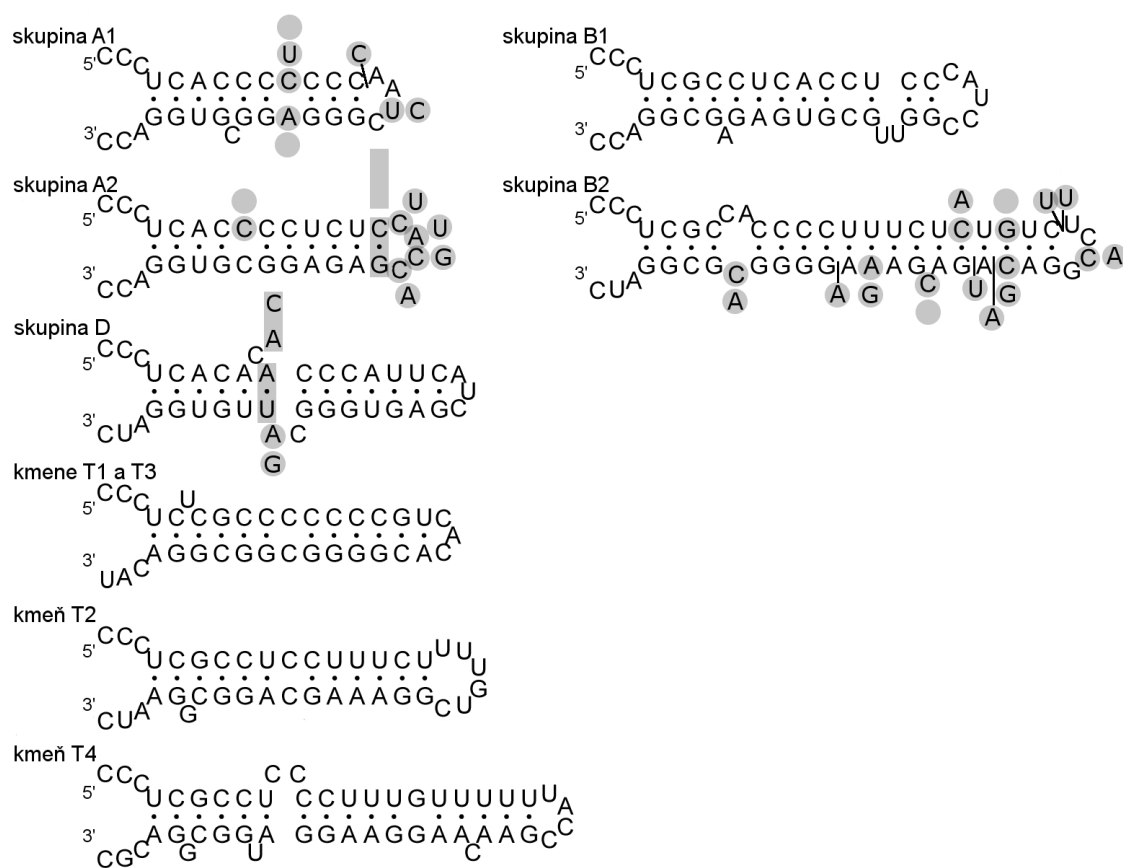
Sekvencia *Coccomyxa* sp. gb3A (DQ660909.1) patrí takisto do skupiny, ale od sekvencií sa odlišuje väčšou variabilitou v helixoch I a IV. Od študovaných kmeňov sa líšila jedným hCBC v helixe I (Obr. 16) a deléciou štyroch párov bází, jedným hCBC a inzerciou páru bází (cytozín-guanín) v helixe IV (Obr. 17). V helixe III sa nenachádzala žiadna CBC ani hCBC.



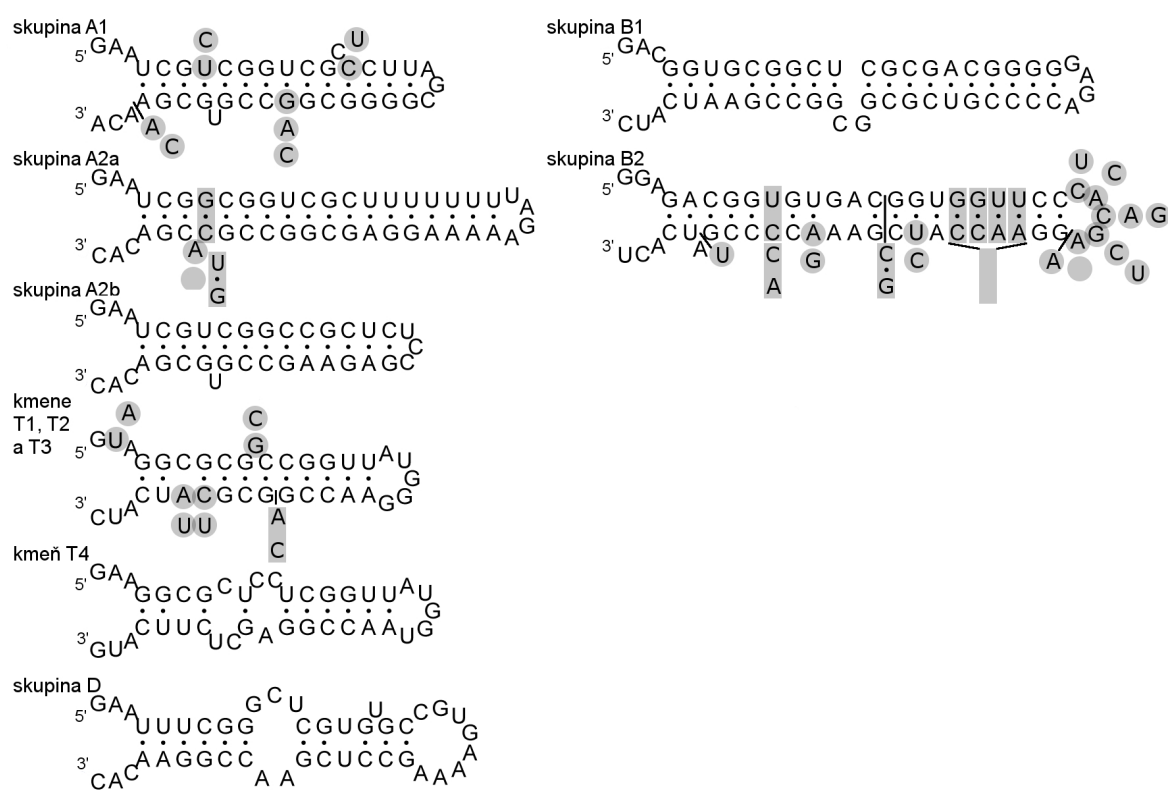
Obr. 14 Sekundárna štruktúra ITS2 oblasti pre fylogenetické skupiny A, C, D. Ako muster je použitá štruktúra kultúry E5. Rozdiely medzi skupinami sú zobrazené pre druhé a tretie rameno. Substitúcie a inzercie sú znázornené v krúžku, alebo pokiaľ sa týkajú celého páru báz sú označené rámečkom. Delécie sú označené obdobným spôsobom prázdny polom. U inzercií a delécií nevieme čo z toho skutočne nastalo jedná sa len o inzerciu alebo deléciu oproti štruktúre kultúry E5. Zmeny sú označené sivou farbou pre skupinu A1, červenou farbou pre skupinu C a modrou farbou pre skupinu D. Veľké inzercie u skupiny C sa týkajú len kmeňa T4. Zmeny, ktorými sa odlišujú iba niektoré kmene zo skupiny sú označené krížikom. Zmeny v rámci skupiny A2 sú označené písmenami bez farebného označenia.



Obr. 15 Sekundárna štruktúra ITS2 oblasti pre fylogenetickú líniu B. Ako muster je použitá štruktúra ITS2 klonu A kmeňa C10. Substitúcie a inzercie sú znázornené v krúžku, alebo pokiaľ sa týkajú celého páru báz sú označené rámcikom. Delécie sú označené obdĺžnikovým spôsobom prázdny polom. U inzercií a delécií nevieme čo z toho skutočne nastalo, jedná sa len o inzerciu alebo deléciu oproti štruktúre kultúry C10 klonu A. Delécie sú znázornené prázdny polom. Zmeny v skupine B2 sú bezfarebné.



Obr. 16 Rozdiely v helixoch I medzi skupinami A1, A2, C, D, B1 a B2. Pre skupinu C sú zobrazené helixy I pre každý kmeň osobitne kvôli veľkej variabilite v skupine. Rozdiely v ostatných skupinách sú zobrazené sivou farbou



Obr. 17 Helixy IV pre jednotlivé skupiny A1, A2, B1, B2, C a D. Rozdiely v rámci skupín sú zobrazené sivou farbou. Kmeň T4 zo skupiny C je zobrazený samostatne kvôli veľkej variabilite

3.3 Morfológické charakteristiky vybraných kmeňov

Jednotlivým bunkám kmeňov použitých v morfometrických analýzach som zistila morfológické charakteristiky o dĺžke a šírke. K týmto údajom uvádzam ďalšie popisné štatistiky ako je medián, smerodatná odchýlka a priemer. Fotografie jednotlivých kmeňov sú v Prílohe.

Kmeň C1

- dĺžka buniek: 5 – 7,3 μm ; smerodatná odchýlka 0,48; medián 6,1
- šírka buniek: 2,1 – 3,2 μm ; smerodatná odchýlka 0,25; stredná hodnota 2,7
- priemerná bunka 6,0 x 2,7 μm

Kmeň C3

- dĺžka buniek: 5,4 – 8,3 μm ; smerodatná odchýlka 0,74; medián 6,8
- šírka buniek: 2,7 – 5,0 μm ; smerodatná odchýlka 0,57; stredná hodnota 3,8
- priemerná bunka 6,9 x 3,8 μm

Kmeň C4

- dĺžka buniek: 5,2 – 8,7 μm ; smerodatná odchýlka 0,66; medián 6,4
- šírka buniek: 2,5 – 5,9 μm ; smerodatná odchýlka 0,57; stredná hodnota 3,4
- priemerná bunka 6,5 x 3,4 μm

Kmeň C5

- dĺžka buniek: 7,1 – 9,25 μm ; smerodatná odchýlka 0,5; medián 8,0
- šírka buniek: 2,6 – 5,7 μm ; smerodatná odchýlka 0,79; stredná hodnota 3,9
- priemerná bunka 8,1 x 4,0 μm

Kmeň C6

- dĺžka buniek: 5,16 – 7,65 μm ; smerodatná odchýlka 0,55; medián 6,5
- šírka buniek: 2,2 – 5,0 μm ; smerodatná odchýlka 0,47; stredná hodnota 3,1
- priemerná bunka: 6,5 x 3,2 μm

Kmeň C7

- dĺžka buniek: 5,6 – 7,94 μm ; smerodatná odchýlka 0,40 ; medián 6,7
- šírka buniek: 2,3 – 3,9 μm ; smerodatná odchýlka 0,31; stredná hodnota 3,0
- priemerná bunka 6,7 x 3,0 μm

Kmeň C8

- dĺžka buniek: 5,7 – 8,4 μm ; smerodatná odchýlka 0,63 ; medián 7,0
- šírka buniek: 2,9 – 5,3 μm ; smerodatná odchýlka 0,5; stredná hodnota 3,7
- priemerná bunka 7,0 x 3,8 μm

Kmeň C10

- dĺžka buniek: 6,9 – 9,2 μm ; smerodatná odchýlka 0,52 ; medián 7,8
- šírka buniek: 2,7 – 4,9 μm ; smerodatná odchýlka 0,46; stredná hodnota 3,5
- priemerná bunka: 7,8 x 3,6 μm

Kmeň C11

- dĺžka buniek: 5,8 – 8,7 μm ; smerodatná odchýlka 0,71 ; medián 7,1
- šírka buniek: 1,9 – 4,8 μm ; smerodatná odchýlka 0,66; stredná hodnota 2,9
- priemerná bunka: 7,2 x 3 μm

Kmeň C12

- dĺžka buniek: 5,8 – 9,1 μm ; smerodatná odchýlka 0,74 ; medián 7,5
- šírka buniek: 2,6 – 4,95 μm ; smerodatná odchýlka 0,57; stredná hodnota 3,5
- priemerná bunka: 7,4 x 3,5 μm

Kmeň E1

- dĺžka buniek: 4,5 – 6,6 μm ; smerodatná odchýlka 0,4 ; medián 5,5
- šírka buniek: 1,8 – 3,3 μm ; smerodatná odchýlka 0,31; stredná hodnota 2,5
- priemerná bunka: 5,6 x 2,5 μm

Kmeň E2

- dĺžka buniek: 6,5 – 10,3 μm ; smerodatná odchýlka 0,78 ; medián 8,7
- šírka buniek: 2,7 – 5,8 μm ; smerodatná odchýlka 0,61; stredná hodnota 4,1
- priemerná bunka: 8,6 x 3,1 μm

Kmeň E4

- dĺžka buniek: 4,8 – 8,7 μm ; smerodatná odchýlka 0,93 ; medián 6,3
- šírka buniek: 2,4 – 5,6 μm ; smerodatná odchýlka 0,62; stredná hodnota 3,8
- priemerná bunka: 6,4 x 4,0 μm

Kmeň E5

- dĺžka buniek: 4,0 – 6,8 μm ; smerodatná odchýlka 0,65; medián 5,4
- šírka buniek: 1,8 – 3,6 μm ; smerodatná odchýlka 0,43; stredná hodnota 2,7
- priemerná bunka: 5,5 x 2,7 μm

Kmeň H102

- dĺžka buniek: 6,4 – 10,7 μm ; smerodatná odchýlka 1,23 ; medián 7,9
- šírka buniek: 2,9 – 5,0 μm ; smerodatná odchýlka 0,53; stredná hodnota 3,7
- priemerná bunka: 8,0 x 3,9 μm

Kmeň H103

- dĺžka buniek: 6,1 – 9,9 μm ; smerodatná odchýlka 0,84; medián 7,9
- šírka buniek: 2,0 – 4,0 μm ; smerodatná odchýlka 0,45; stredná hodnota 2,9
- priemerná bunka: 7,8 x 2,9 μm

Kmeň T1

- dĺžka buniek: 5,4 – 8,95 μm ; smerodatná odchýlka 0,85 ; medián 6,8
- šírka buniek: 1,7 – 3,8 μm ; smerodatná odchýlka 0,4; stredná hodnota 3,0
- priemerná bunka: 6,9 x 3,0 μm

Kmeň T2

- dĺžka buniek: 5,9 –13,72 μm ; smerodatná odchýlka 1,2 ; medián 7,4
- šírka buniek: 2,4 – 5 μm ; smerodatná odchýlka 0,56; stredná hodnota 3,7
- priemerná bunka: 7,6 x 3,7 μm

Kmeň T3

- dĺžka buniek: 5 –11,65 μm ; smerodatná odchýlka 1,34 ; medián 7,0
- šírka buniek: 2,1 – 5,4 μm ; smerodatná odchýlka 0,61; stredná hodnota 3,3
- priemerná bunka: 7,2 x 3,3 μm

Kmeň T5

- dĺžka buniek: 5,9 –9,34 μm ; smerodatná odchýlka 0,77 ; medián 7,2
- šírka buniek: 2,2 – 4,0 μm ; smerodatná odchýlka 0,46; stredná hodnota 3,2
- priemerná bunka: 7,2 x 3,2 μm

Kmeň U1

- dĺžka buniek: 6,1 –10,65 μm ; smerodatná odchýlka 1,16 ; medián 7,2
- šírka buniek: 2,3 – 4,3 μm ; smerodatná odchýlka 0,4; stredná hodnota 3,3
- priemerná bunka: 7,5 x 3,3 μm

Kmeň U2

- dĺžka buniek: 6,4 –8,95 μm ; smerodatná odchýlka 0,69; medián 7,7
- šírka buniek: 2,4 – 3,7 μm ; smerodatná odchýlka 0,29; stredná hodnota 3,2
- priemerná bunka: 7,7 x 3,2 μm

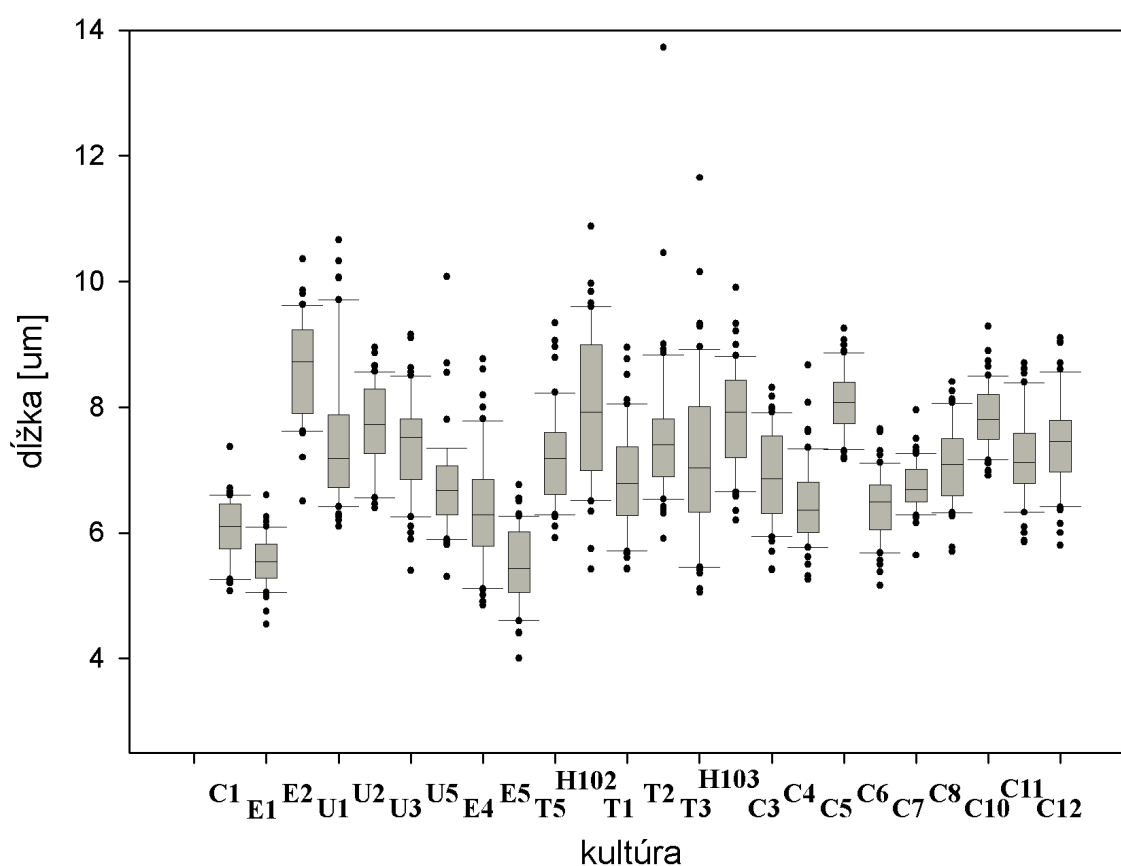
Kmeň U3

- dĺžka buniek: 5,4 –9,16 μm ; smerodatná odchýlka 0,82 ; medián 7,5
- šírka buniek: 2,0 – 3,7 μm ; smerodatná odchýlka 0,36; stredná hodnota 2,8
- priemerná bunka: 7,4 x 2,9 μm

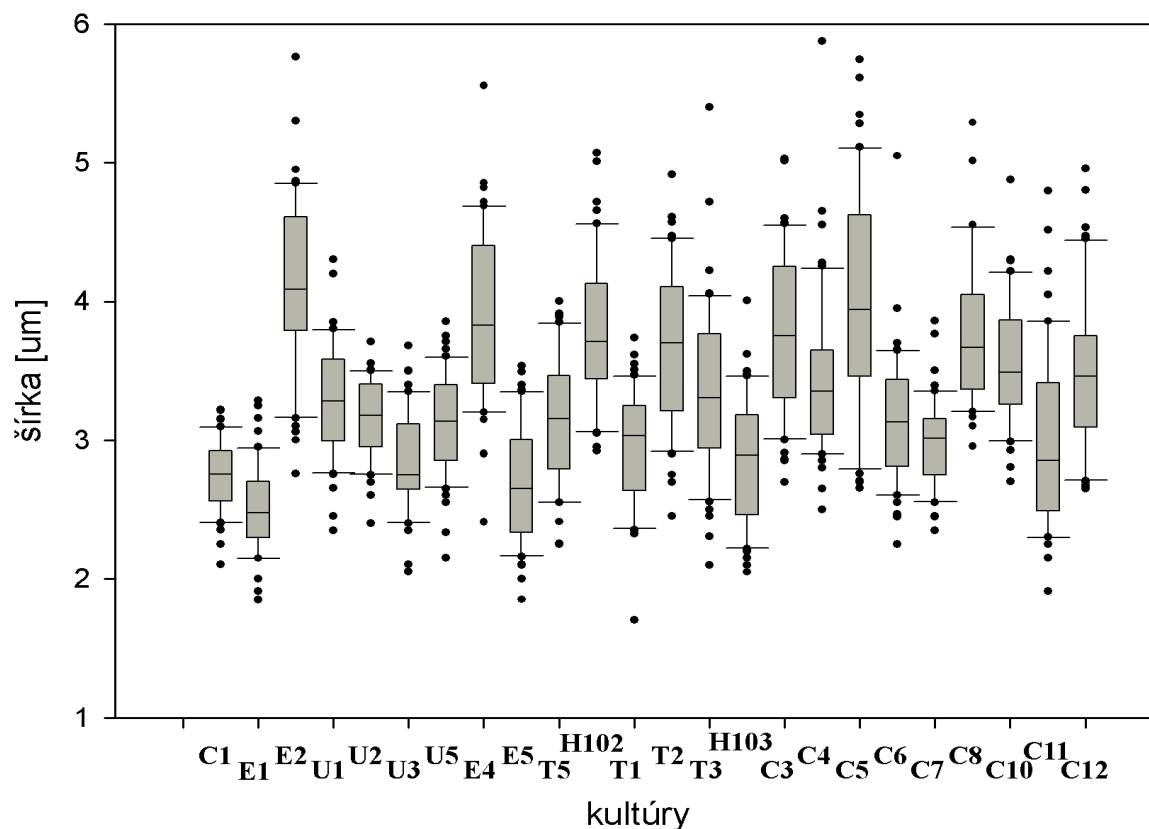
Kmeň U5

- dĺžka buniek: 5,3 –10,0 μm ; smerodatná odchýlka 0,8 ; medián 6,7
- šírka buniek: 2,1 – 3,8 μm ; smerodatná odchýlka 0,36; stredná hodnota 3,1
- priemerná bunka: 6,8 x 3,1 μm

Box- ploty pre dĺžky a šírky buniek sú zobrazené na Obr. 18 a Obr. 19. Variabilita v dĺžkach a šírkach buniek sa kmeň od kmeňa líši. Kmene C1, E1 a E5 patria medzi najkratšie, súčasne majú aj oproti ostatným kmeňom menšiu šírku buniek. Kmene C1 a E1 v šírke varirujú len veľmi málo, kmeň E5 je v šírke variabilnejší. Všeobecne by sa dalo povedať, že dlhšie bunky majú i väčšiu šírku a zároveň rozptyl v šírke. Kultúra H103 patrí k dlhším a zároveň užším. V šírke sa dajú kmene rozdeliť na tie, ktoré majú bunky širšie než 3,75 a tie ktoré túto hodnotu prekročia len zriedkavo. V dĺžke buniek sa žiaden takýto trend nedá vypožorovať. Väčšina buniek je dlhá do 12 μm . Jediná výnimka je u kultúry T2, kde dĺžka bunky dosiahla skoro 14 μm . Dĺžka buniek väčšinou varirovala v rozmedzí 1-2 μm , výnimkou v tomto sú kmene H102 a T3, ktoré mali väčší rozptyl dĺžky buniek (Obr. 18).



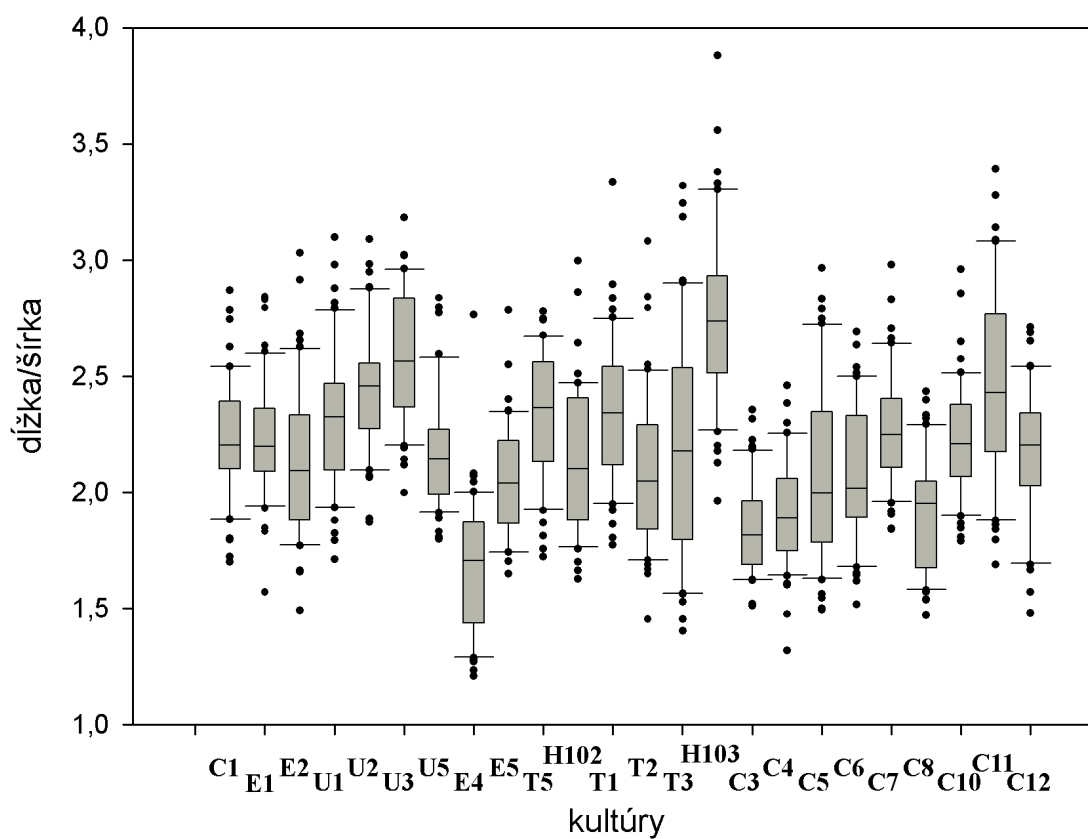
Obr. 18 Box-ploty zobrazujúce variáciu dĺžky buniek v študovaných kmeňoch



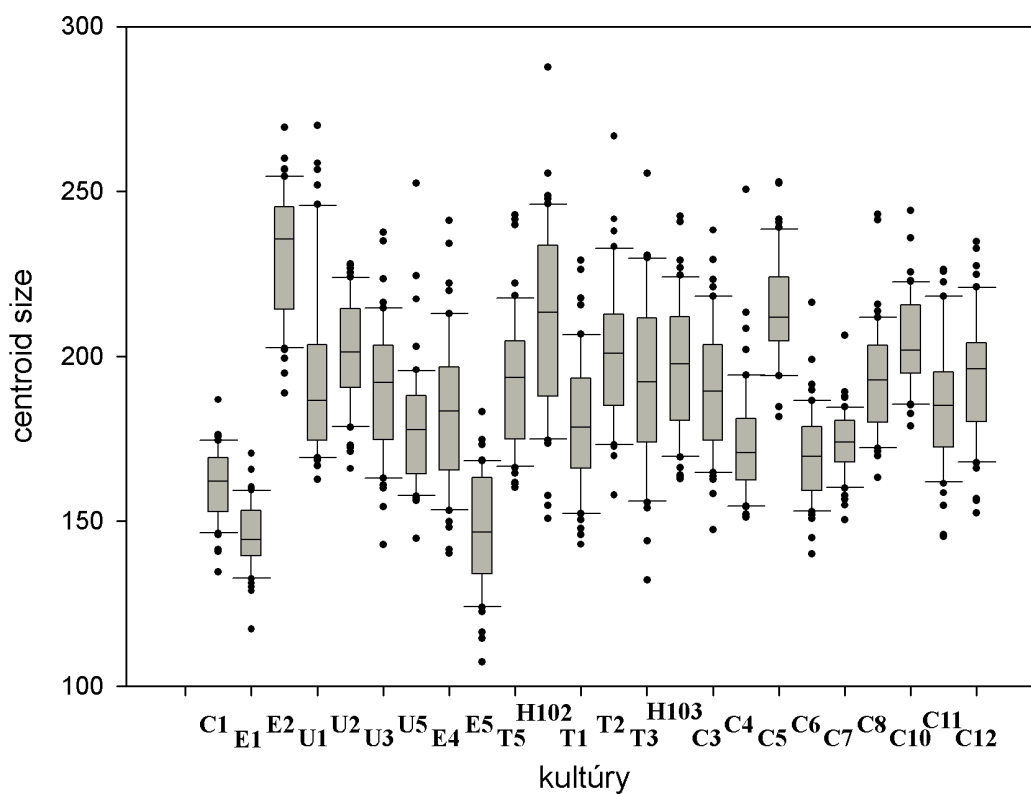
Obr. 19 Box-ploty zobrazujúce variáciu šírky buniek v študovaných kmeňoch.

Pre jednoduchý tvar buniek ako má *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* sa často používa pomer dĺžky a šírky na popísanie tvaru bunky (Obr. 20). Najvariabilnejšia sa v tejto charakteristike ukázala byť kultúra T3. Väčšina kmeňov má pomer väčší než 1,75. Priemerná hodnota sa u väčšiny kmeňov pohybuje okolo 2, výnimku tvoria kmene E4, C3, C4 a C8, ktoré majú len niekoľko buniek s pomerom väčším než dva (Obr. 20). Vysoký pomer dĺžka/šírka majú kmene U3, H103 a C11, čo znamená, že bunky týchto kmeňov majú priemerne dvakrát tak dlhé bunky ako sú široké.

Celkovú veľkosť bunky popisuje veličina centroid size, ktorá je odmocninou sumy štvorcov vzdialeností landmarkov od centroidu konfigurácie landmarkov. Pretože berie do úvahy viac rozmerov než dĺžka a šírka, mohla by popisovať veľkosť bunky lepšie než len dĺžka a šírka. Ako je vidieť na box-plotoch na Obr. 18 a Obr. 19, jednotlivé kmene sú viac-menej stále v šírke a dĺžke, naproti tomu centroid size v rámci kmeňov varíruje vo väčšej miere (Obr. 21). Ale kmene C1, E1, C4, C6 a C7 nevarírujú ani v centroid size. Podľa centroid size majú najväčšie bunky kultúry E2 a H102. Najmenšie zase kmene C1, E1 a E5. Kmeň E5 však naproti tým dvom je v centroid size variabilnejší (Obr. 21).



Obr. 20 Box-ploty zobrazujúce variáciu pomeru dĺžky a šírky buniek v študovaných kmeňoch



Obr. 21 Box-ploty zobrazujúce variáciu v centroid size v študovaných kmeňoch.

3.4 Morfometrické analýzy vybraných kmeňov

Po odstranení vplyvu alometrie Prokrustovskou superimpozíciou som sa zaoberala tvarovými zmenami v komplexe *Coccomyxa/Pseudococcomyxa*. U študovaných buniek som zistila, že asymetrická časť variability popisuje 47,79% z celkovej variability v súbore dát s pôvodnými pozíciami landmarkov a tzv. reflected/relabelled copy pozíciami landmarkov. Prínos jednotlivých PCA komponentov ku konkrétnemu typu variability je uvedený v Tab. 7. Pretože druhá PCA os, ktorá vysvetľovala 1/3 celkovej variability v nesymetrizovanom súbore dát, poukazovala na tvarové zmeny, ktoré boli pravdepodobne arbitrárne vnesené nesprávnym rozoznaním spodnej a vrchnej časti bunky (Obr. 23), som sa v ďalšom štúdiu zamerala len na symetrickú časť variability.

Symetrická časť variability		Asymetrická časť variability	
PCA osy	percento vysvetlenej variability	PCA osy	percento vysvetlenej variability
1	47,07	2	33,17
5	2,05	3	10,87
6	1,66	4	2,19
8	0,69	7	0,98
10	0,44	9	0,5
11	0,22	13	0,05
12	0,06	14	0,02
16	0,01	15	0,01
17	0,01		
18	0,01		
suma	52,22	suma	47,79

Tab. 7: Vysvetlená tvarová variabilita jednotlivých PCA os u študovaných kmeňov v analýze relatívnych warpov na súbore dát pozícií landmarkov pôvodných objektov a pozícií landmarkov na zkradlových kópiách týchto objektov

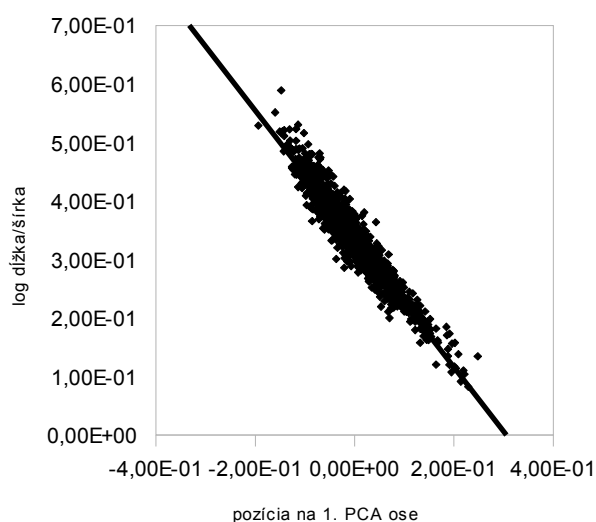
Prvá PCA os v analýze relatívnych warpov popisuje 90,30% symetrickej variability (Tab. 8). Táto istá variabilita bola popísaná prvou osou (57,92%) aj v nesymetrizovanom súbore dát. Tvarový trend medzi dlhými, úzkymi bunkami a skoro guľatými bunkami je zřejmý. Druhá osa popisuje zmeny v užšom konci bunky a to konkrétne zašpičateľosť alebo oblosť tohto pólu bunky (Obr. 24). Tretia osa si odpovedá s mierou konvexnosti bunky. Štvrtá osa popisuje zase zmeny v prednej časti bunky, tentokrát preliačenie či rozšírenie (Obr. 25). Piata osa, aj keď

popisuje necelé percento variability jej tvarový trend je ešte zreteľný. Odpovedá zmenám konvexnosti v stredovej časti bunky. Najvýraznejší tvarový trend popisuje variabilitu medzi dlhými a úzkymi bunkami na strane jednej a bunkami skoro okrúhlymi na strane druhej. Tento trend sa dá popísať pomerom dĺžka/šírka buniek, preto som tento vzťah testovala pomocou regresie. Medzi prvou PCA osou relatívnych warpov a logaritmom pomeru dĺžka/šírka je lineárny negatívny vzťah s funkciou regresnej priamky: $f(x) = -1,1x + 0,33$ a koeficientom korelácie $R^2 = 0,91$ (Obr. 22).

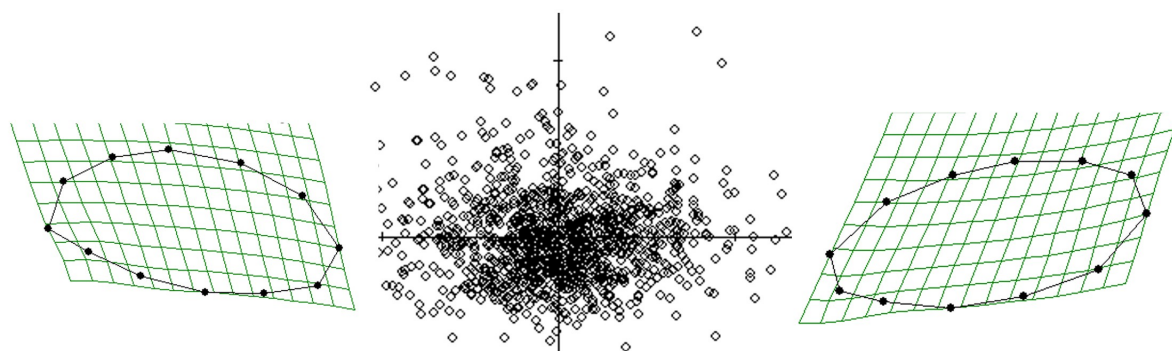
Samostatná dĺžka alebo šírka neodpovedajú žiadnej tvarovej zmene vyjadrenej nekorelovanými PCA osami u relatívnych warpov.

PCA osa	eigenvalues	% vysv. var.	kumul. % vysv. var.
1	2,3	90,3	90,3
2	0,49	4,07	94,37
3	0,43	3,22	97,59
4	0,28	1,34	98,93
5	0,22	0,86	99,79
6	0,1	0,16	99,95
7	0,04	0,02	99,98
8	0,02	0,01	99,98
9	0,02	0,01	99,99
10	0,02	0	100

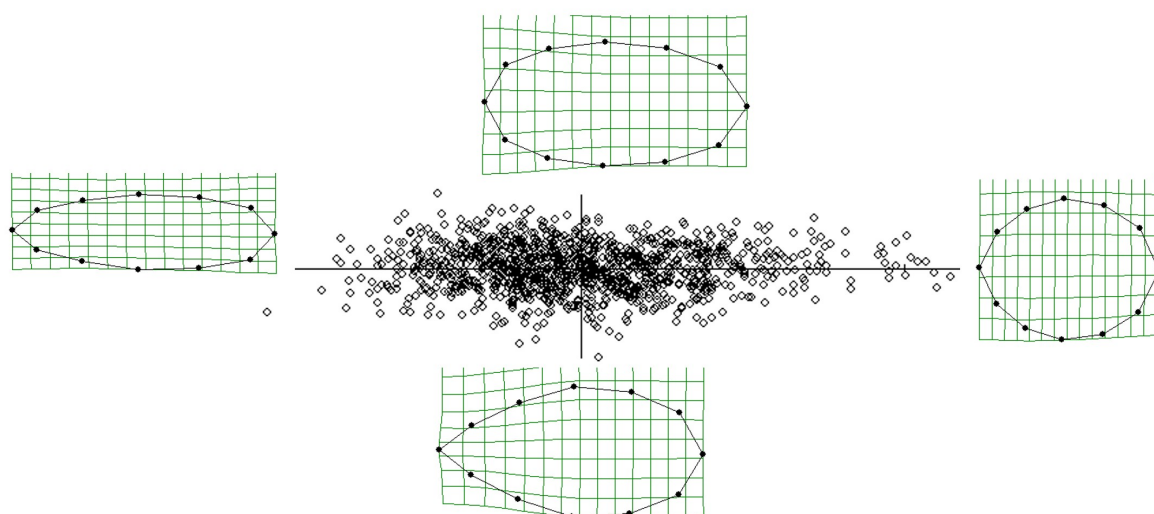
Tab. 8 Hodnoty vlastných čísel a percentá vysvetlenej variability v symetrizovanom súbore dat o tvarovej variabilite u študovaných kmeňoch



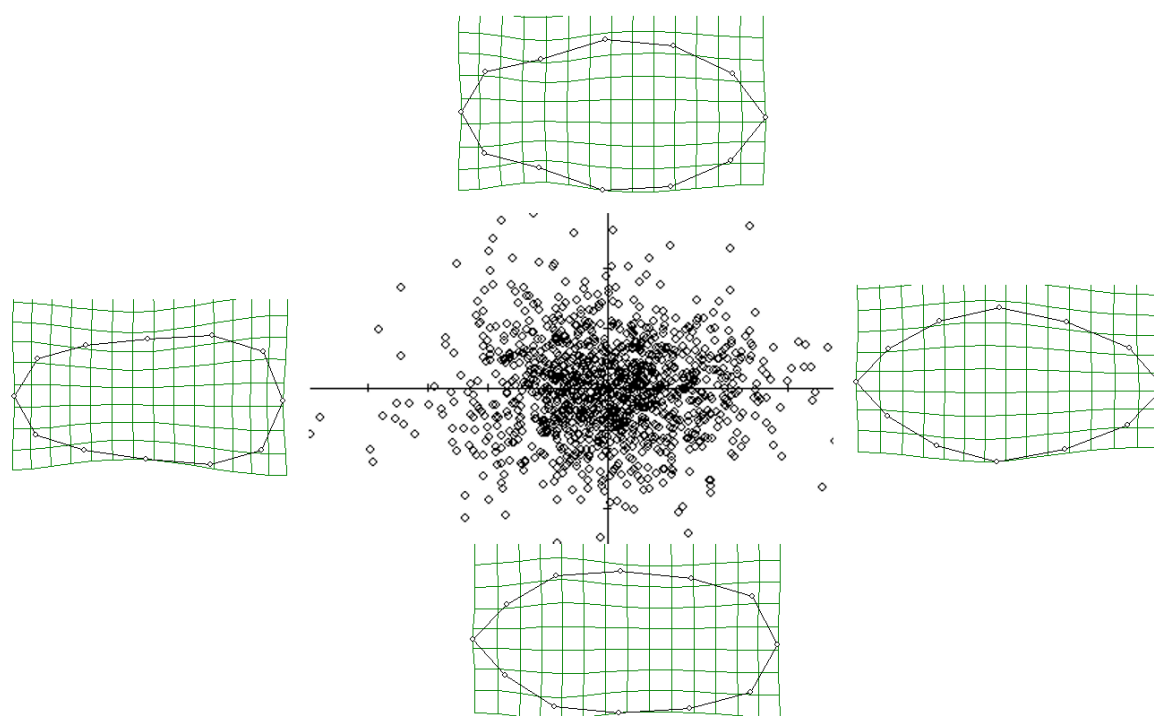
Obr. 22 Korelácia medzi pozíciou bunky na prvej PCA ose a logaritmom jej pomeru dĺžky a šírky



Obr. 23 Zobrazenie tvarovej zmeny pozdĺž druhej PCA osi na nesymetrizovanom súbore dat. Graf zobrazuje druhú a tretiu PCA osu. Zo zobrazení thin split plate je vidieť, že bunky na pravej a ľavej strane (pozitívne a negatívne hodnoty na druhej ose) sú skoro zrkadlové kópie podľa x osy.

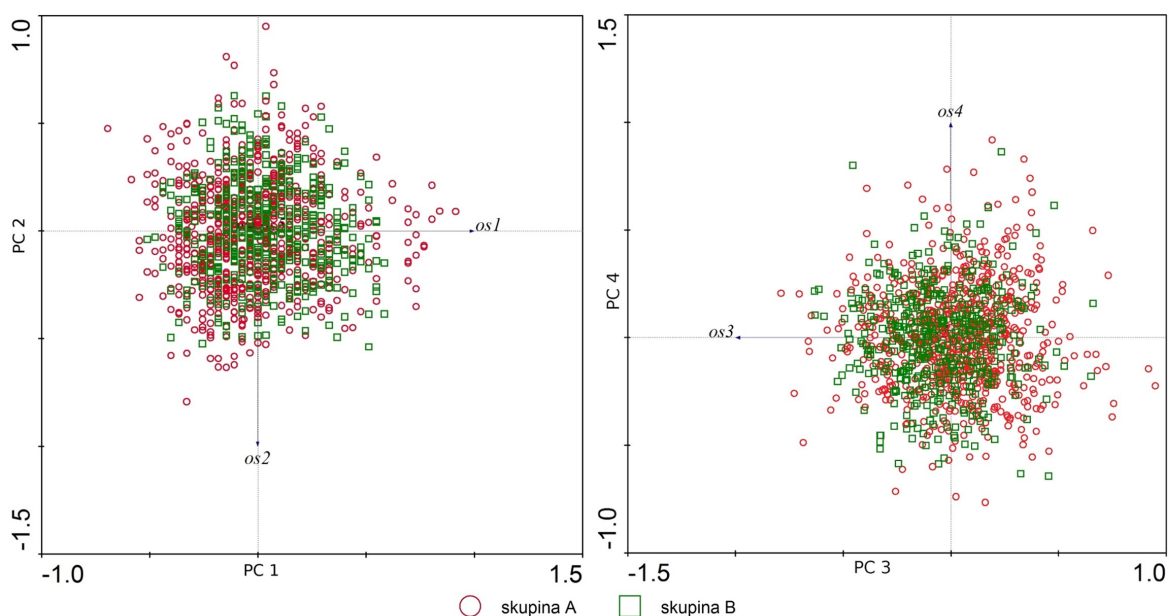


Obr. 24 Zobrazenie tvarových zmien pozdĺž prvej a druhej PCA osi v analýze relatívnych warpov po odstranení nesymetrickej variability. Prvá osa popisuje zmenu v pomere dĺžky a šírky buniek, vysvetľuje 90,30% variability. Druhá osa súvisí so začipčateľnosťou pólu bunky.



Obr. 25 Zobrazenie tvarových zmien pozdĺž tretej a štvrtej PCA osi v analýze relatívnych warpov po odstranení nesymetrickej variability. Tretia osa súvisí konvexnosťou bunky, štvrtá osa popisuje tvarové zmeny v prednej časti bunky (zúženie, alebo rozšírenie)

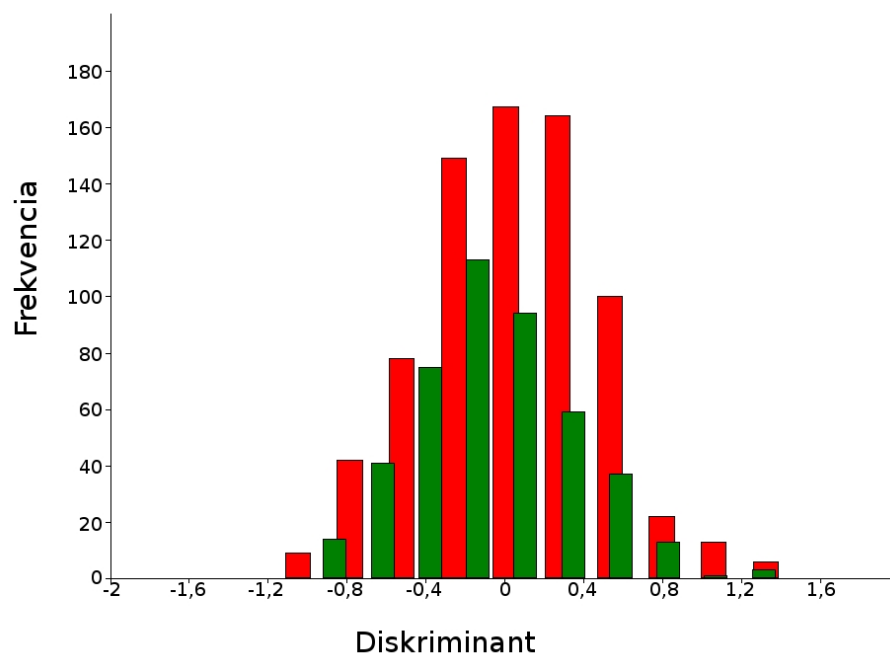
Zobrazením PCA diagramov relatívnych warpov som sa snažila nájsť vhodnú hypotézu, ktorá by sa dala testovať diskriminačnými analýzami. Pretože dve hlavné fylogenetické línie v rámci kladu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* sú na základe molekulárnych údajov dobre podporené, rozlíšila som bunky podľa príslušnosti k fylogenetickej línii A alebo B. Podľa prvej a druhej osi medzi týmito dvoma skupinami je veľký prekryv v tvare buniek (Obr. 26), rovnako to je aj medzi treťou a štvrtou osou. Prvá PCA osa vysvetľuje 90,3% variability, druhá PCA osa vysvetľuje 4,1% tvarovej variability. Tretia a štvrtá osa spolu vysvetľujú 4,5% variability. Piata PCA osa popisuje už len necelé jedno percento variability v súbore dat o 1200 bunkách (Tab. 8). Diskriminačná analýza (Obr. 27) s použitím Hottelingovho testu je signifikantná s p-hodnotou $1,422 \times 10^{-9}$. Ale percento správne zaradených buniek nie je vysoké, len 59,33%.



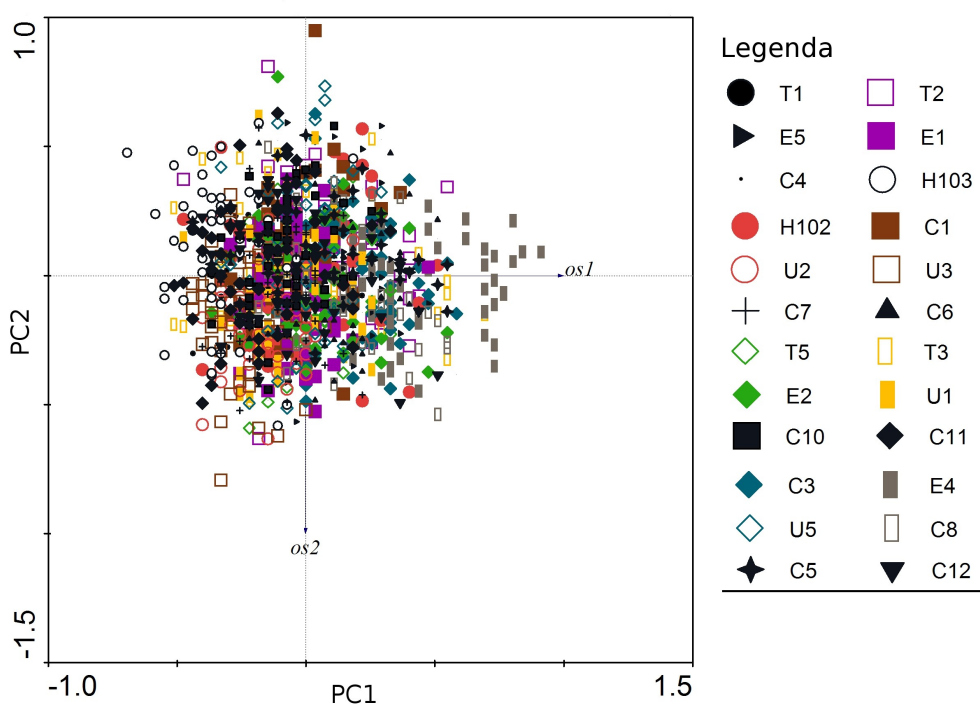
Obr. 26 PCA graf symetrizovaných objektov. Objekty sú označené podľa príslušnosti k fylogenetickej línii A (vrátane skupiny C a kultúry H103) a fylogenetickej línii B

Keď jednotlivým bunkám určíme príslušnosť ku kultúre, na PCA diagrame vidíme, že rozloženie tvarových preferencií je podľa normálneho rozdelenia. Väčšina buniek leží uprostred diagramu, len niekoľko buniek je výrazne naľavo alebo napravo. Prvá PCA osa odpovedá prvej ose relatívnych warpov (Obr. 26, Obr. 28). Viac vpravo na PCA ose ležia hlavne bunky kultúry E4. Na ľavej strane sú zase skôr bunky kmeňa H103. Tieto tvarové preferencie sú lepšie vidieť po zobrazení príslušnosti ku kultúre (Obr. 28). Podľa PCA diagramu centroidov kultúr je vidieť, že nielen H103 a E4 majú preferovaný tvar odlišný

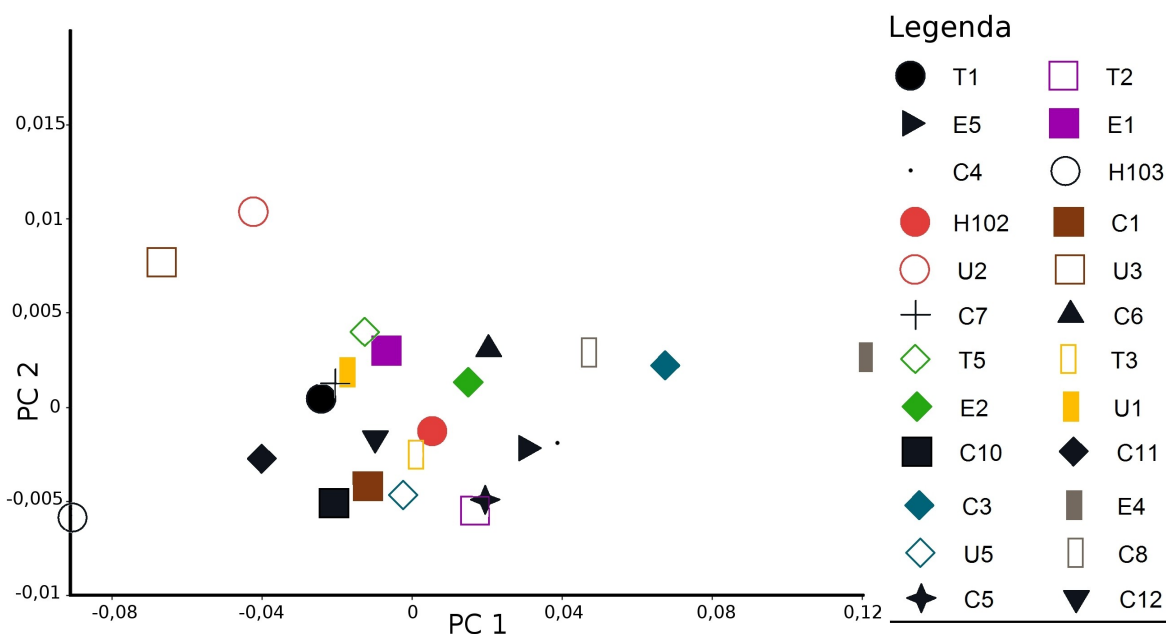
od konsenzuálneho, ale aj kultúry U2 a U3 (Obr. 29). Zaujímavé je, že kultúry U1, U2 a U3 izolované z jedného vzorku sa morfológicky od seba takto odlišujú, pritom molekulárna variabilita medzi týmito kmeňmi v študovaných markeroch nie je.



Obr. 27 Diskriminačná analýza v programe PAST. Správne zaradených buniek na základe diskriminačnej funkcie do fylogenetической línie A (vrátane C a kultúry H103) a fylogenetической línie B je 59,33%

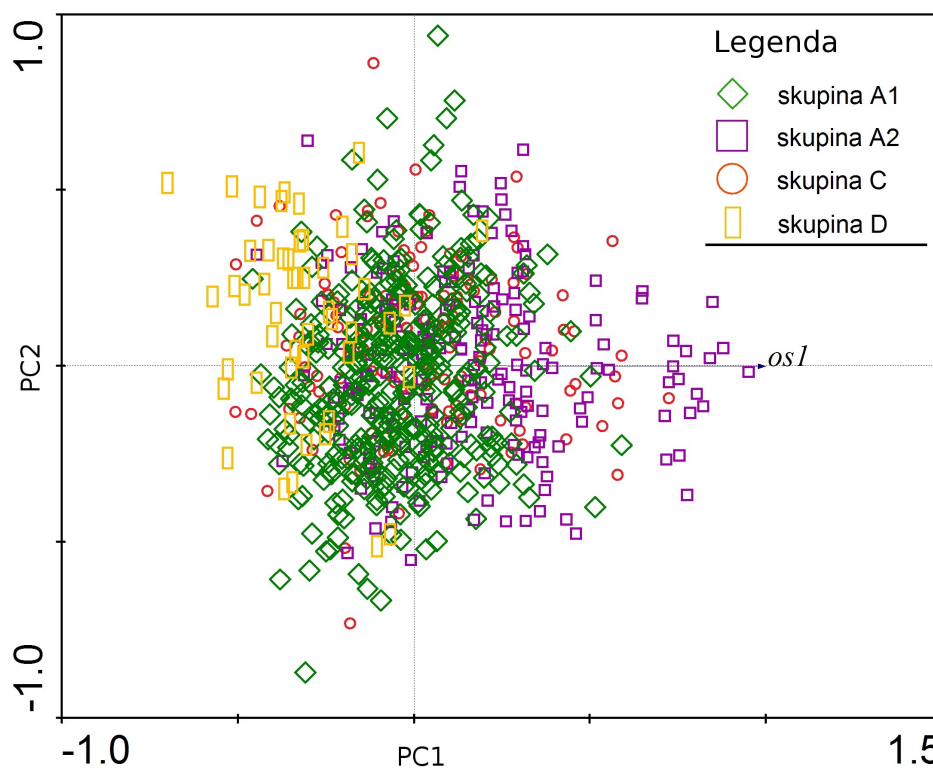


Obr. 28 PCA graf symetrizovaného súboru dat s označením objektov podľa príslušnosti ku kultúre

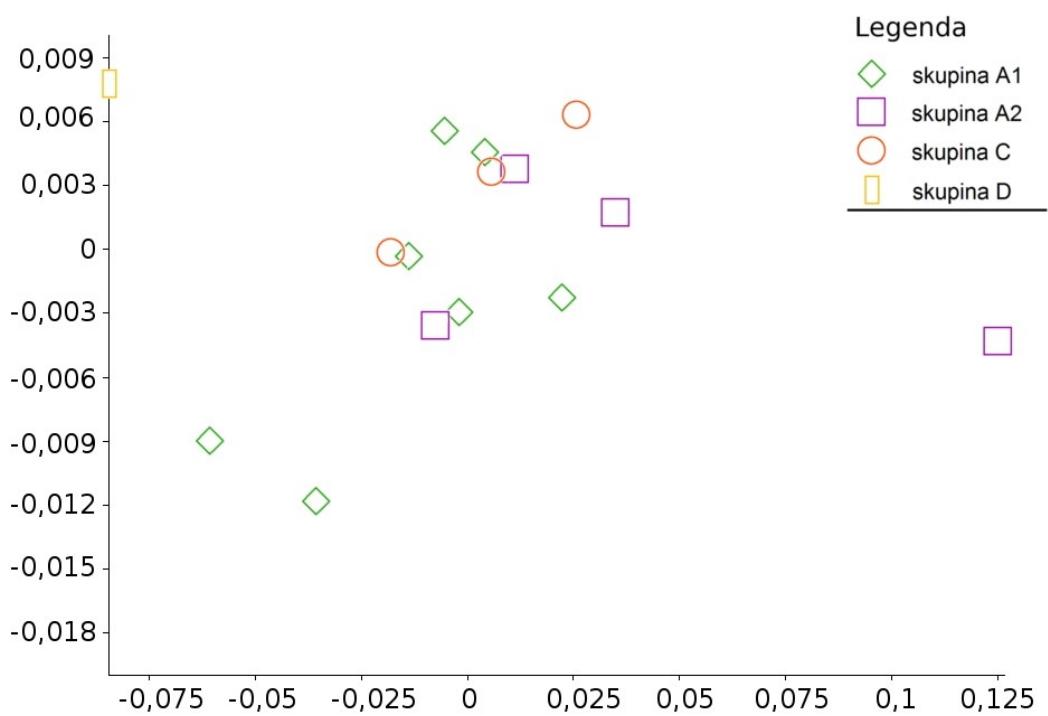


Obr. 29 PCA graf relatívnych warpov so zobrazenými centroidami kultúr

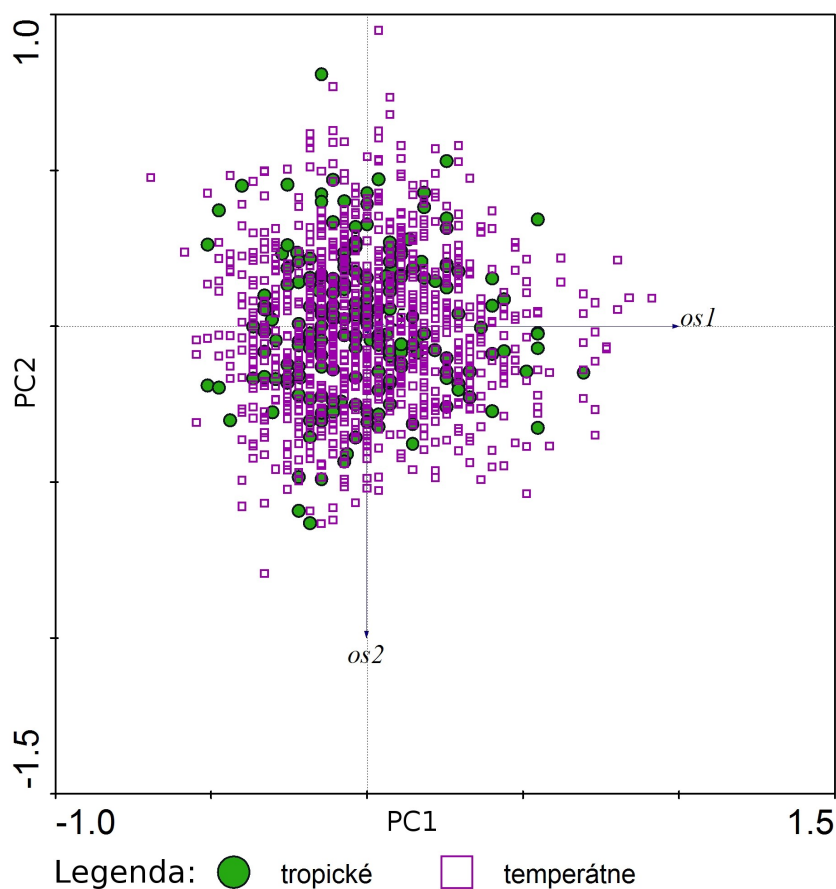
Morfologická variabilita sa v študovaných kmeňoch sa prekrýva a pre fylogenetické línie A (vrátane C a D) a B sa nedajú určiť žiadne tvarové preferencie. Skúmala som, či sa aspoň určité tvarové preferencie vyskytujú medzi skupinami v rámci fylogenetickej línie (Obr. 30). V skupine A, vrátane skupiny C a kultúry H103, PCA osy vysvetlia rovnaké percento variability ako pri zahrnutí všetkých buniek. Rozdiely medzi skupinami sú hlavne v umiestnení centroidov skupín pozdĺž prvej PCA osy. Variancia pozdĺž druhej osy je u všetkých skupín približne rovnaká. Zobrazením len centroidov kmeňov v 2D priestore prvej a druhej PCA osy (Obr. 31), vidíme, že skupiny A1 a A2, majú odlišné tvarové preferencie, ale z väčšej časti sa prekrývajú. Za tieto rozdiely môžu hlavne kmene U2 a U3, ktoré sú vzdialené od väčšiny kmeňov patriacich do skupiny A1 a kultúra E4, vzdialená od ostatných členov skupiny A2. Táto variabilita môže poukazovať na skrytú variabilitu v rámci skupín, ktorú som možno nezachytila malým samplingom kmeňov zahrnutých do analýz. Tropická skupina C má oproti skupinám A1 a A2 malú varianciu v centroidoch kultúr patriacich do skupiny (Obr. 31).



Obr. 30 PCA graf len pre objekty patriace do fylogenetickej línie A. Objekty sú označené podľa príslušnosti k fylogenetickej skupine podľa ITS2



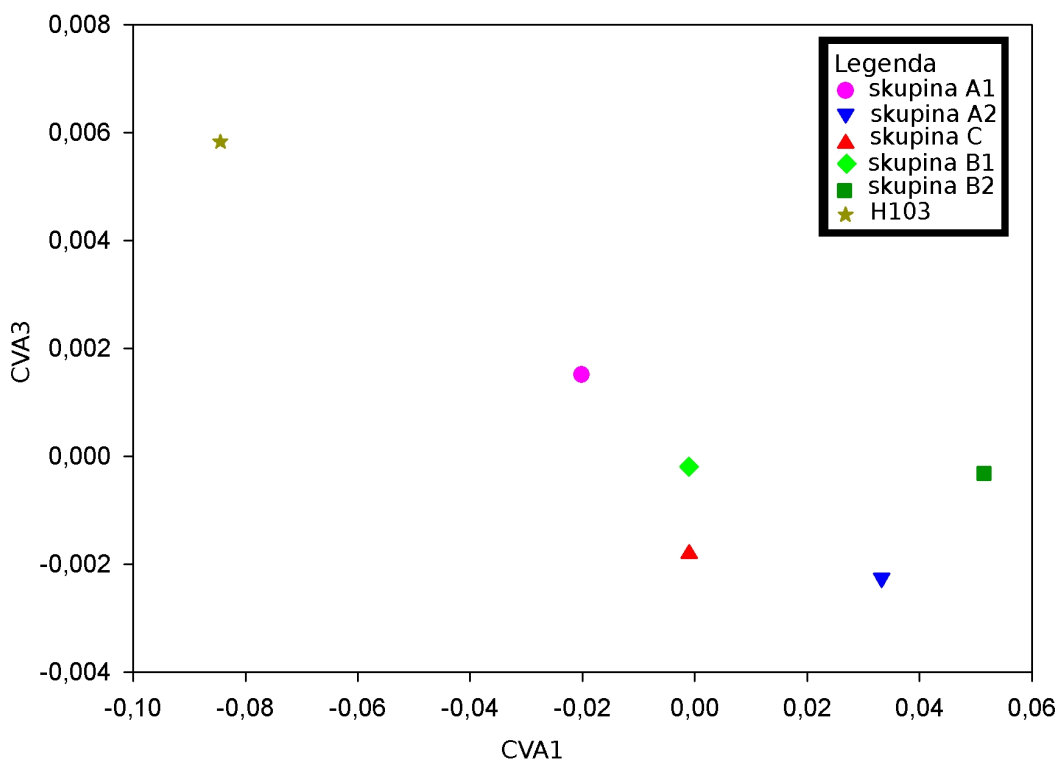
Obr. 31 PCA graf so zobrazenými centroidami kmeňov podľa príslušnosti k fylogenetickej skupine podľa ITS2



Obr. 32 PCA diagram so zobrazením príslušnosti objektov podľa klimatického pásma

Pretože sa zdá, že morfológickú variabilitu v kmeňoch vysvetľuje príslušnosť k fylogenetickej skupine iba z časti, snažila som sa zobraziť variabilitu kmeňov na PCA diagrame podľa ekologických charakteristík. Na PCA diagrame všetkých buniek som zobrazila pôvod kmeňov, podľa klimatického pásma (Obr. 32). Relatívne vlhkosťné kritérium lokality takisto nekorelovalo s rozložením tvarových zmien. Jediné čo sa z týchto diagramov dá vyčítať je mierna pozitívna korelácia lichenizovaného spôsobu života s prvou osou PCA (a teda súčasne s prvou osou relatívnych warpov) (Obr. 29). Tento vzťah som testovala diskriminačnou analýzou, kde vyšiel signifikantne s p -hodnotou $2,75E-25$ v Hottelingovom teste. Diskriminačnou funkciou sa takto správne zaradí 66,1% buniek z celého súboru dát.

Aj keď podľa PCA diagramov sa zdá, že rozdiely medzi skupinami nie sú zreteľné, CVA analýza potvrdila morfometrické rozdiely medzi fylogenetickými skupinami. Vzdialenosti medzi jednotlivými skupinami som hodnotila pomocou Mahalanobisových vzdialeností (Tab. 9). Skupiny sa od seba signifikantne líšili, okrem skupín C a E, ktoré sa signifikantne nelíšili. Centroidy skupín C a E sa podľa prvej, druhej, štvrtej a piatej osy CVA neodlišovali.



Obr. 33 Grafický výstup analýzy CVA. Na obrázku sú znázornené centroidy skupín podľa príslušnosti k fylogenetickej skupine na základe ITS2

Najväčšie rozdiely medzi skupinami C a E zobrazuje tretia CVA osa (Obr. 33). Pretože kmeň H103 sa od ostatných kmeňov odlišoval nielen molekulárne, ale aj morfológicky, skúsila som ho z analýz vyradiť, pretože jeho odľahlé hodnoty mohli ovplyvniť štatistickú významnosť rozdielu medzi skupinami (Obr. 34). Vylúčenie kultúry H103, však na významnosť testu nemala vplyv. Obe analýzy boli významné na 1% hladine spoľahlivosti.

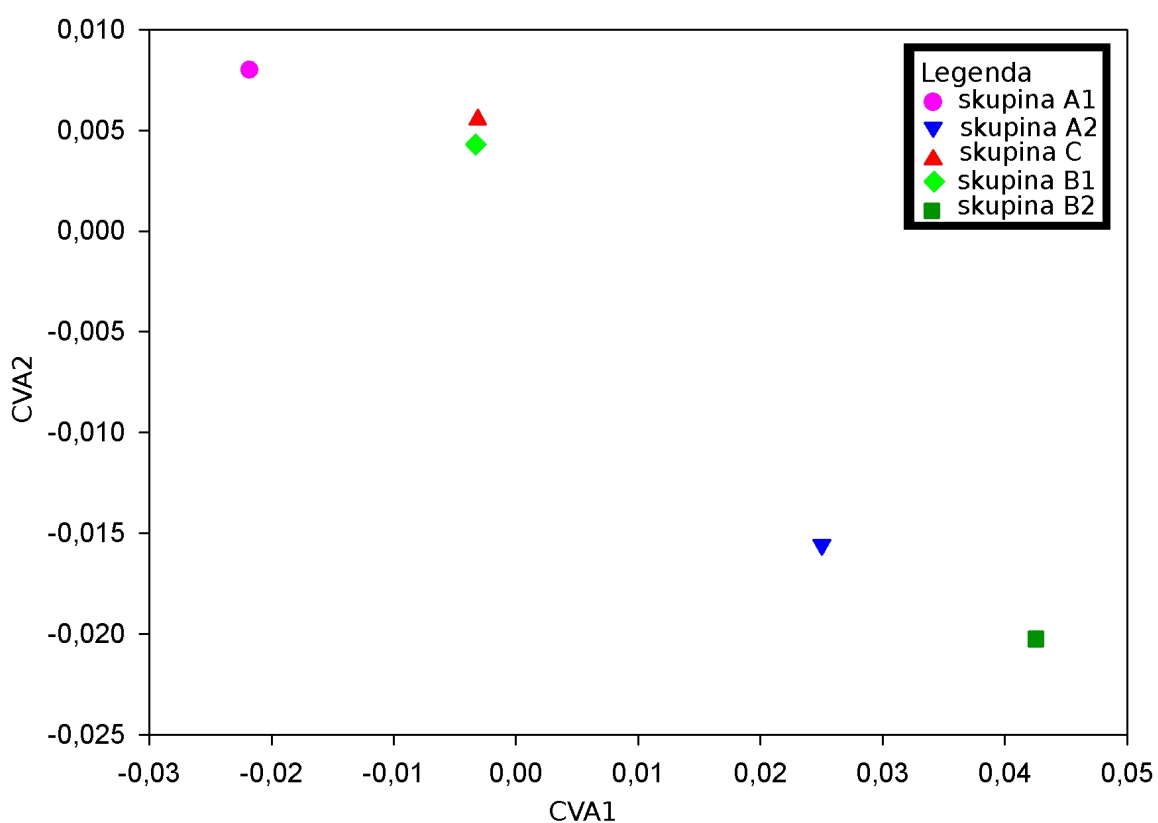
Druhou nulovou hypotézou bolo, že kmene sa morfológicky líšia podľa typu biotopu z akého pochádzajú. V CVA analýze som rozlíšila päť typov mikrobiotopov: pôda, ihličie, kôra stromu, rozkladajúce sa drevo a symbionti (Obr. 35). Kultúru H103 som z analýz vylúčila pre jej morfológickú, fylogenetickú a mikrobiotopovú odlišnosť od všetkých ostatných študovaných kmeňov. Rozdiely medzi jednotlivými biotopami podporili aj párové permutačné testy, pri ktorých som zistila Mahalanobisove vzdialenosti medzi skupinami (Tab. 10).

Mahalanobisove vzdialenosti medzi biotopami boli menšie než medzi fylogenetickými skupinami (Tab. 9 a Tab. 10). Vzdialenosť medzi kôrou a pôdou nevyšla významne na 5% hladine možnosti chyby I. druhu pri permutačných testoch s 1000 opakovaniami. Pri použití 2000 permutácií pre porovnanie týchto dvoch skupín sa vzdialenosť ukázala významná s p-hodnotou 0,0005. Zo zobrazenia centroidov jednotlivých kultúr nie sú zreteľné rozdiely ani

medzi fylogenetickými ani medzi mikrobiotopovými skupinami (Obr. 35). Dve kultúry majú veľmi výrazne odlišné bunky od priemerného (konsenzuálneho) tvaru bunky. Kmeň E4, symbiont z *Peltigera aptosa* má bunky skoro okrúhle, s pomerom dĺžka/šírka 1,6, čím sa výrazne odlišuje (Obr. 36).

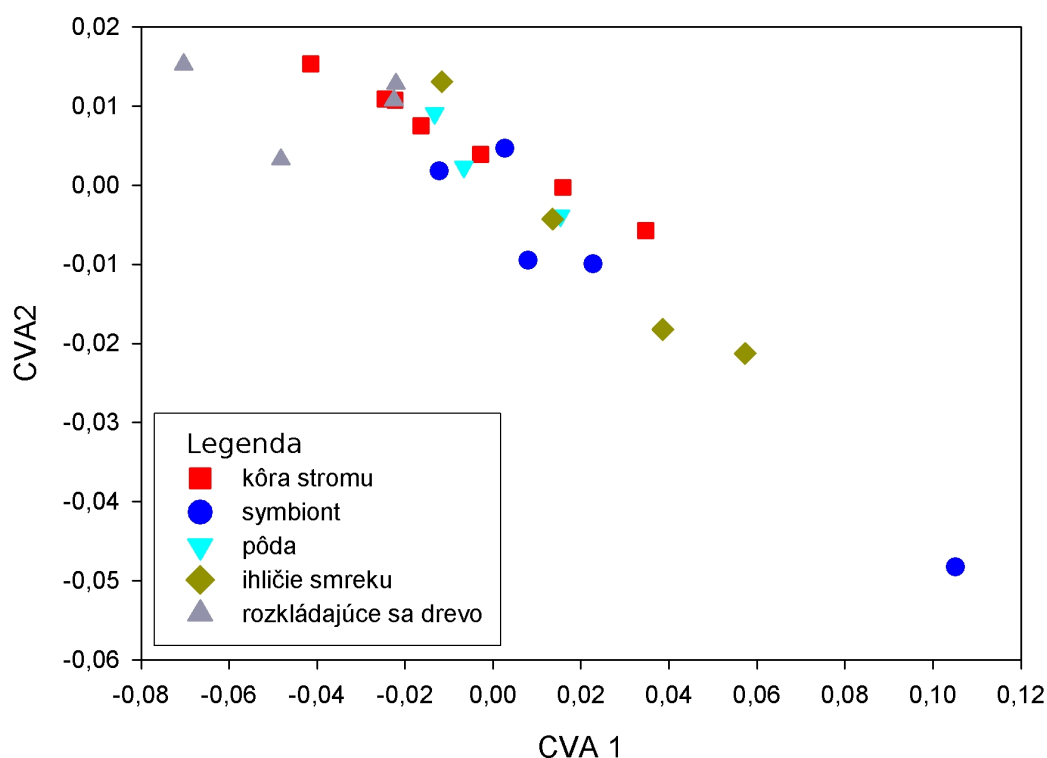
	A1	A2	B1	B2	C	H103
A1		0,04617	0,02525	0,08294	0,03146	0,09890
A2	<0,001		0,02452	0,04026	0,03210	0,12020
B1	<0,001	<0,001		0,05143	0,01027	0,08212
B2	<0,001	<0,001	<0,001		0,66770	0,25250
C	<0,001	<0,001	0,37000	<0,001		0,11330
H103	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Tab. 9 Mahalanobisove vzdialenosti pre fylogenetické skupiny. Nad diagonálou sú uvedené vzdialenosti. Pod diagonálou sú uvedené p-hodnoty, pri permutačných testoch s 1000 opakovaniami



Obr. 34 Grafický výstup analýzy CVA na fylogenetické skupiny po vylúčení kultúry H103

CVA analýza maximalizuje rozdiely medzi skupinami. Zaradenie alebo vyradenie kultúry H103 do analýz na výsledok rozlíšenia medzi skupinami ako fylogenetickými tak mikrobiotopovými nemalo vplyv. CVA vždy preukázala signifikantné rozdiely na 1% hladine chyby I. druhu medzi definovanými skupinami.

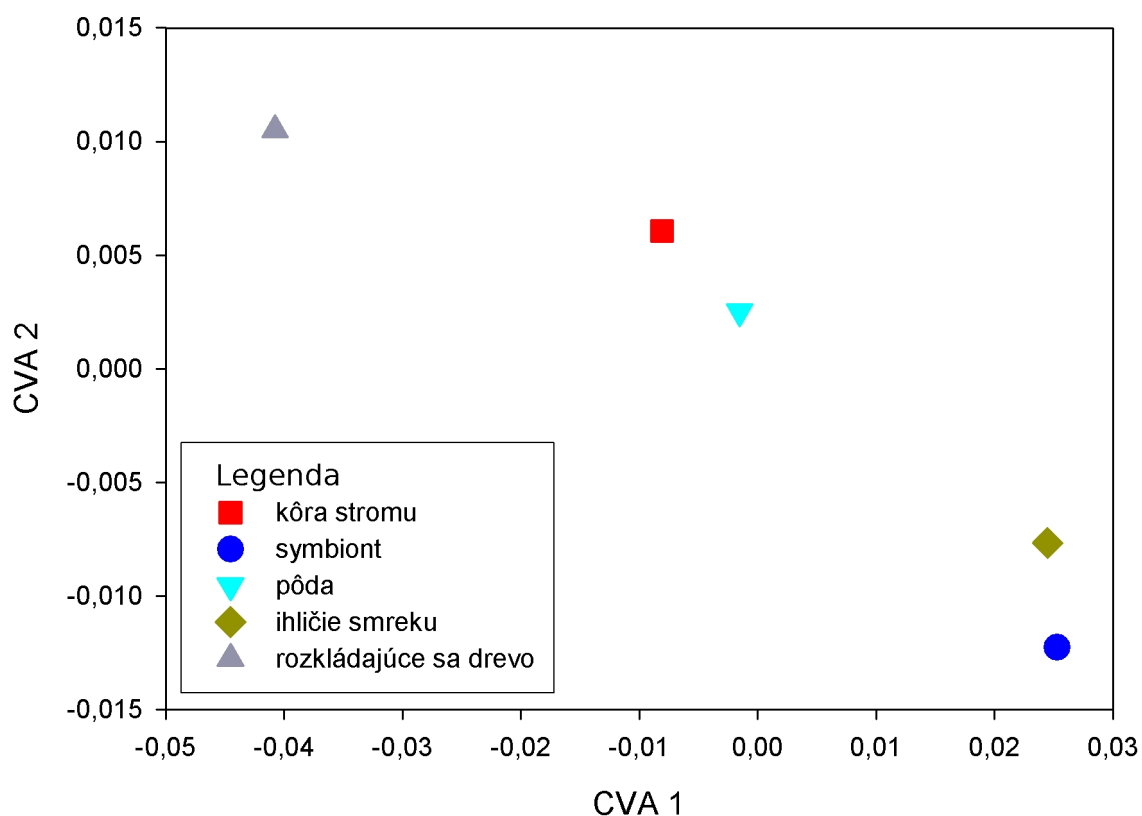


Obr. 35 CVA analýza na mikrobiotopové skupiny. Zobrazené sú centroidy jednotlivých kultúr

CVA maximalizuje rozdiely aj medzi lokalitami zberu daných kultúr. Dané skupiny sa od seba vzájomne líšia aj na základe výpočtu Mahalanobisových vzdialeností. Z analýz CVA so skupinami lokalita som vylúčila kultúru H102, pretože jej pôvod nie je jednoznačný. Kultúra H102 bola izolovaná z kultúry *Paramecium bursaria*, ale pôvod tejto čievičky už nie je známy. Zaradenie alebo vyradenie kultúry H103 do analýz na výsledok rozlíšenia medzi skupinami nemalo vplyv. Všetky skupiny sa na základe Mahalanobisových vzdialeností signifikantne líšili (Tab. 11). Zaradením H103 do analýz sa však zmenšila vzdialenosť medzi lokalitami z Čiech a Ukrajiny a z Čiech a JV Ázie, vzdialenosť medzi Čechami a Španielskom sa zväčšila (Tab. 11).

	kôra	symbiont	pôda	ihličie	drevo
kôra		0,02834	0,01326	0,02552	0,03836
symbiont	<0,001		0,02900	0,01815	0,05903
pôda	0,09100	<0,001		0,02746	0,05427
ihličie	<0,001	0,00500	<0,001		0,07071
drevo	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Tab. 10: Mahalanobisove vzdialenosti jednotlivých mikrobiotopov pri porovnaní párovými testami s 1000x permutovaným súborom dat. Nad diagonálou sú uvedené Mahalanobisove vzdialenosti, pod diagonálou sú p-hodnoty



Obr. 36 Grafický výstup CVA analýzy pre mikrobiotopové skupiny. Zobrazené sú iba centroidy skupín

bez H103	JV Ázia	Špan	Čechy	Ukrajina
JV Ázia		0,04252	0,01584	0,04837
Špan	<0,001		0,03155	0,06408
Čechy	0,001	<0,001		0,04191
Ukrajina	<0,001	<0,001	<0,001	

s H103	JV Ázia	Špan	Čechy	Ukrajina
JV Ázia		0,04252	0,01422	0,04837
Špan	<0,001		0,03332	0,06408
Čechy	0,001	<0,001		0,03893
Ukrajina	<0,001	<0,001	<0,001	

Tab. 11 Mahalanobisove vzdialenosti a p-hodnoty párových testov medzi lokalitami (1000x permutované)

4 Diskusia

Cieľom diplomovej práce bolo zistiť molekulárnu variabilitu v morfológicky definovanom komplexe druhov *Coccomyxa/Pseudococcomyxa*. Súčasne bolo cieľom pomocou metód geometrickej morfometriky charakterizovať molekulárne definované skupiny a skupiny určené mikrobiotopom.

4.1 Fylogenetická pozícia a vzťahy medzi skupinami

Analýzy 18S rDNA sekvencií začlenili celý študovaný komplex do triedy Trebouxiophyceae do kladu *Botryococcus/Choricystis*, kam sa *Coccomyxa* molekulárne radila už v predošlých štúdiách (KARSTEN ET AL. 2005, LOHTANDER ET AL. 2003). Študovaný komplex *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* tu tvorí monofyletickú skupinu. Pretože som sa v rámci práce snažila hlavne o poznanie molekulárnej diverzity a variability v rámci komplexu, z fylogenetických stromov 18S rDNA sa nedá vyvodzovať na skutočnú evolučnú príbuznosť medzi skupinami použitými ako outgroup. Na týchto stromoch sa ukazuje, že *Botryococcus* a *Choricystis* sú najbližšou evolučnou líniou k línii *Coccomyxa/Pseudococcomyxa*. Toto priradenie však nemá vysokú bootstrapovú podporu a v skutočnosti na základe iných prác sa zdá byť pravdepodobnejšie, že najbližším príbuzným fylogenetickú líniu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* je rod *Elliptochloris* (ELIÁŠ ET AL. 2007, FRIEDL ET AL. 2007). Tento artefakt plynúci z prezentovaných 18S rDNA stromov má zrejme príčinu v malom počte osekvenovaných zástupcov línie *Elliptochloris* (dva), ktoré sú si veľmi podobné. Pokiaľ by sme chceli riešiť príbuzenské vzťahy komplexu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* bol by potrebný alignment väčšieho počtu trebouxiofytných zástupcov, nielen z kladu *Botryococcus/Choricystis*. Predkládaná práca je zameraná hlavne na vnútrokomplexovú variabilitu a použitie najbližších známych príbuzných, ktorí nepatria do študovanej skupiny sa odporúča vo fylogenetických učebniciach (HALL 2008, SALEMI & VANDAMME 2004), pretože u bližších príbuzných si môžeme byť istejší homológiou použitých sekvencií než u vzdialených príbuzných.

V rámci tohto kladu tvorí morfológicky definovaný komplex *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* monofyletickú skupinu. Na základe 18S rDNA sa mi podarilo v tejto skupine rozlíšiť štyri fylogenetické skupiny. Dve fylogenetické skupiny A a B sú od seba jasne odlišiteľné, ale bootstrapy na ich konároch nie sú vysoké. Táto nízka podpora tejto topológie môže byť

spôsobená nejednoznačnou pozíciou skupín C a D. Maximum likelihood a Bayesovská analýza 18S rDNA skupinu C priradili ku skupine B, ale toto priradenie má nízku bootstrapovú podporu (43/0.70). Strom vypočítaný na základe podobností pomocou metódy neighbor-joining zase priradí túto skupinu ku skupine A, ale tiež toto priradenie nemá dostatočnú bootstrapovú podporu. Dôvodom je pravdepodobne aj odlišná rýchlosť evolúcie v determinovaných skupinách, kde členovia skupiny A majú relatívne kratšie konáre oproti skupine B. Konáre v skupine A sú na základe 18S rDNA skoro nerozlišiteľné a vzťahy v rámci tejto skupiny sa na základe 18S rDNA nedajú posudzovať. Naproti tomu v skupine B bola mutačná rýchlosť vyššia. Skupina C zrejme diverguje takisto rýchlejšie než skupina A. Rýchlosť fixácie mutačných zmien však nebola tak intenzívna ako v skupine B. Oproti skupine B sú sekvencie v skupine C navzájom diverzifikovanejšie. Táto rôznorodosť v porovnaní s konzervovanosťou sekvencií v jednotlivých skupinách môže svedčiť o rýchlejšej schopnosti adaptácie tejto skupiny. Tú istú variabilitu pozorujeme aj u ITS2 sekvencií, kde v skupine C je možné rozlíšiť tri typy u štyroch kmeňov, v ostatných skupinách je nielen sekundárna štruktúra, ale aj primárna sekvencia konzervovaná.

Skupina A môže byť parafyletická, pretože má príliš krátke konáre oproti fylogenetickému líniu B. Efekt LBA (efekt priťahovania dlhých konárov) mohol spôsobiť, že dlhé konáre sú si podobnejšie, ale nie príbuznejšie, pretože na pozíciách sú možné len štyri rôzne substitúcie. A zámenny sa mohli diať opakovane u rôznych skupín. Kvôli tomuto efektu boli zároveň evolučne pomalšie skupiny vtlačené do jednej fylogenetickému línie, ale to nemusí znamenať ich monofýliu (FELSENSTEIN 1978). Nízke bootstrapové hodnoty medzi konármi rozlišujúcimi skupiny A a C, prípadne B a C môžu tiež len poukazovať na parafyletické vzťahy kvôli zrýchlenej evolúcii v skupinách B a C. Tento jav môžeme pozorovať aj porovnaním neighbor-joining dendrogramu a maximum likelihood, maximum parsimony či Bayesovského stromu, kde maximum likelihood a Bayesovská analýza priradujú skupinu C ku skupine B, ale na základe matice podobností (neighbor-joining) je skupina C priradená ku skupine A. Na bližšiu príbuznosť skupín C a A ukazujú aj analýzy ITS2 sekvencií, aj keď tieto stromy sú nezakorenené, a preto nemôžeme posudzovať smer evolúcie. O bližšej príbuznosti skupín C a A však môžeme uvažovať aj na základe sekundárnej štruktúry. Sekundárna štruktúra ITS2 oblasti skupiny C je podobnejšia so sekundárnou štruktúrou ITS2 v skupine A než so skupinou B. Tieto fylogenetické línie A, C a B sa od seba odlišujú umiestnením loopu v helixe III, kde u skupiny B je pred loopom v prvej polovici helixu III inzercia štyroch alebo piatich párov báz a na konci tohto loopu v skupine B zase oproti skupine A chýbajú dve páry báz. Skupina B má ešte na konci helixu III inzerciu štyroch/piatich párov báz, ktoré predlžujú

helix III. Skupiny sa odlišujú aj indelmi dvoch párov báz v helixe III. Inzercie niekoľkých párov báz na konci a do stredovej časti helixu III nie sú ničím neobvyklým u eukaryot (MAI & COLEMAN 1997, COLEMAN 2009). Podobne v koncovej časti helixu III je na rovnakom mieste ako u skupiny B u kmeňa T4 inzertovaná oblasť 12 nukleotidov. Inzertovaná oblasť u skupiny B je však iná než u kmeňa T4.

Skupina A sa na základe ITS2 a ITS1 rozdelila na dve podskupiny A1 a A2, Podskupina A2 nemá vysokú bootstrapovú podporu na ML strome ITS1 ani na ITS2 strome z Bayesovskej analýzy. Maximum likelihood analýza markeru ITS2 však podporila oddelenie tejto skupiny. Oddelenie skupín A1 a A2 okrem toho podporujú aj rozdiely v sekundárnej štruktúre ITS2 a to v helixoch I, kde sa líšia jednou CBC a ďalšími rozdielmi, ktoré ale pre skupiny nie sú konštantné (rozdiely v rámci skupiny A1). Žiaden z týchto rozdielov sa nedá považovať za CBC alebo hCBC. V helixoch II a III sa líšia tromi CBC a jedným hCBC. V helixe IV sa u skupiny A2a inzertovala oblasť piatich párov adenín-tymín. To svedčí o divergencii nielen medzi skupinami A1 a A2, ale aj medzi podskupinami A2a a A2b.

Pokiaľ línie obsahujú jediné CBC v konzervovanom úseku helixu III, tieto skupiny sa vzájomne nekrížia (COLEMAN 2003, COLEMAN 2009) a tým by odpovedali konceptu biologických druhov (MAYR 1982). Preto je zaujímavé pozrieť sa na túto charakteristiku medzi skupinami A2a a A2b, ktoré sú si blízko príbuzné, ale skupina A2b sa od A2a mierne odlišuje. Na základe 18S rDNA sa medzi týmito dvoma skupinami nedá rozlíšiť. V sekundárnej štruktúre ITS2 síce drobné rozdiely sú, žiadna z nich však nie je CBC alebo hCBC. Za zváženie stojí či rozdiely v helixe IV sú dostatočné na to aby sa tieto skupiny vzájomne nekrížili, alebo je inercia na konci tohto helixu v skupine A2a v tomto ohľade bezvýznamná, kde rozdiely sú na prvý pohľad zrejmé, ale nejedná sa o CBC. Je veľmi pravdepodobné, že skupiny A2a a A2b sa vyvíjali dlhšiu dobu oddelene. Koncové oblasti stemu v helixe IV nahromadili väčšie počty mutácií, v rámci skupiny A2, než medzi skupinami A2b a A1. Táto oblasť však u eukaryot patrí k najvariabilnejším a rýchlo evolvujúcim (COLEMAN 2003, COLEMAN 2007).

Do skupiny A2b patrí aj kultúra H102, ktorá je typovou kultúrou rodu *Pseudococcomyxa*. Typová kultúra rodu *Coccomyxa* neexistuje. FRIEDL ET AL. (2007) na medzinárodnej konferencii prezentoval predbežné výsledky analýz 18S rDNA, ITS2 a AFLP na kultúrach rodu *Coccomyxa*, kde navrhol vyčleniť dva rody *Pseudococcomyxa* a *Avernensia*. Do týchto dvoch rodov navrhuje preklasifikovať všetky súčasne popísané *Coccomyxa* druhy a organizmy, ktoré patria do tohto kladu, práve na základe neexistencie typovej kultúry rodu *Coccomyxa*. Tieto rody pravdepodobne odpovedajú fylogenetickým líniam A a B z mojej

práce. Je však otázne, či skutočne vyčleňovať dva nové rody, keď podpora týchto fylogenetických línií nie je vysoká. Súčasne je možné, že rozdelenie na dve fylogenetické línie je len artefaktom efektu priťahovania dlhých konárov.

Ako najbližšie príbuznou skupinou ku skupine A sa na základe SSU markeru vyčlenila skupina D, tvorená kmeňmi C15 a H103. Príbuznosť skupín D a A však nie podporená vierohodnou bootstrapovou podporou. Samostatnú pozíciu skupiny D podporuje sekundárna štruktúra ITS2, kde sa kultúra H103 líši od skupín A1, A2, C vždy o jedno CBC v konzervovanej oblasti helixu III. Skupina C s menším počtom OTU (operačných taxonomických jednotiek) je divergovanejšia než skupina A2. V konzervovanej 5'oblasti helixu III sa medzi kmeňmi T1, T2, T3, T4 nachádzalo jedno hCBC (odlišovalo kmene T2 a T4 od kmeňov T1 a T3), okrem toho sa u kmeňa T4 v tejto oblasti nachádzali dve inzercie. V tejto konzervovanej oblasti sa nenachádzalo žiadne CBC, takže na základe tejto práce COLEMAN (2009) sa dá povedať, že medzi kmeňmi T1, T2, T3 a T4 môže aspoň teoreticky dochádzať ku kríženiu.

Marker 18S rDNA v rámci fylogenetickej línie B s vysokou bootstrapovou podporou vyčlenil parazitických zástupcov rodu *Coccomyxa*. Ďalej sa signifikantne oddelili aj skupiny B1 a B2 (definované na základe sekundárnej štruktúry ITS2). Vzťahy medzi týmito skupinami sa na základe použitých molekulárných markerov nedali jednoznačne definovať. K parazitickým zástupcom chýbajú data o sekvenciách ITS oblasti. Rovnako je to aj pre endofyty z *Ginkgo biloba*. Preto som vzťahy medzi týmito zástupcami rodu *Coccomyxa* ďalej neštudovala. Endofyty z *Ginkgo biloba* sa už na základe SSU rDNA priradili do práve nejasne definovaných skupín študovaných kmeňov C4 a C10 spolu s *C. glaronensis*. Stromy ITS2 oblasti skupiny B1 a B2 odlišili. Jasne definovaná je iba skupina B1, ktorá je podporená posteriornou pravdepodobnosťou 1.00 a bootstrapovou hodnotou 89%. Obe analýzy (maximum likelihood a Bayesovská analýza) včleňujú skupinu B1 do skupiny B2. Zdá sa, že jej predok oddivergoval omnoho rýchlejšie než je divergencia medzi členmi skupiny B2 (vytvorenej na základe ITS2 sekundárnej štruktúry). Pokiaľ by sme chceli vyčleniť skupinu B1, skupina B2 bude parafyletická, pretože do nej nebudú zahrnutí všetci potomci spoločného predka. Preto asi nemá zmysel vyčleňovať samostatné podskupiny B1 a B2. Skupina B1 je monofyletická a dobre podporená v oboch analýzach. Jednotnú skupinu B podporuje aj sekundárna štruktúra ITS2, kde v konzervovanej oblasti helixu III nie je jediné CBC, ktorým by sa tieto skupiny vzájomne odlišovali.

Rozdiely v CBC v konzervovanej oblasti helixu III sú vzájomne medzi všetkými skupinami okrem skupín A1 a C. Skupina A1 a C sa však líšia množstvom iných štruktúrnych zmien,

žiadna z týchto zmien však neodpovedá CBC v konzervovanej oblasti 5' helixu III.

Otázka o schopnosti vzájomného kríženia medzi fylogenetickými skupinami komplexu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* je len teoretická, pretože v tejto skupine organizmov dosiaľ nebolo pozorované pohlavné rozmnožovanie a tieto organizmy sú považované za výhradne autosporinné (JAAG 1933, Ettl & GÄRTNER 1995, KOSTIKOV ET AL. 2002c). To, že pohlavné rozmnožovanie nebolo pozorované však neznamená, že k nemu v skutočnosti nemôže dochádzať. Často je problémom, že sa pri kultivácii nepodarí navodiť podmienky, ktoré by viedli k pohlavnému rozmnožovaniu. Podobne pohlavné rozmnožovanie nikdy nebolo pozorované u rodu *Micromonas*, ale v genóme týchto organizmov sa objavili funkčné geny podieľajúce sa na pohlavnom rozmnožovaní (WORDEN ET AL. 2009).

4.2 Intragenomová variabilita v jednotlivých fylogenetických líniách

Okrem kryptickej diverzity medzi kmeňmi v morfológicky definovanom komplexe *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* som zistila aj vnútrogenomovú variabilitu v 18 kmeňoch. Takáto variabilita je vo väčšine prípadov eliminovaná procesom zvaným „concerted evolution“ (GANLEY & KOBAYASHI 2007). Kópie rDNA sú v eukaryotickej bunke v počtoch od 30 do 30 000 kópií (PROKOPOWICH ET AL. 2003) a sú usporiadané v tandeme za sebou na jednom alebo niekoľkých miestach v genóme (COLEMAN 2007). Mutácia sa stochasticky môže objaviť kdekoľvek v cistróne. Na túto mutáciu nepôsobí žiadny selekčný tlak, pretože množstvo kópií rDNA je redundantných. Táto mutácia sa buď môže udržať a rozšíriť v genóme, alebo sa stratí. Mutované rDNA sa obyčajne deletujú alebo duplikujú (stochasticky). Škodlivé mutácie sa takto môžu šíriť iba do medzného počtu, kým sa nezačnú prejavovať na funkčnosti bunky. Až v tejto fázi nastupuje prírodný výber, ktorý selektuje medzi jednotlivými kópiami (GANLEY & KOBAYASHI 2007). Výskyt rôznych kópií rDNA v bunke môže byť dôsledkom práve tejto náhodnej mutácie, kde sa jedna kópia nestihla ešte dostatočne rozšíriť. U kmeňa C8 prevládajú kópie klonu A nad klonmi B (klony B majú deletovaný jeden adenín). U kmeňov C10 a H103 nie je možné posúdiť pomery výskytu jednotlivých klonov v bunkách, pretože získaný počet klonov je na určenie tohto pomeru príliš malý. Štyri typy klonov pre C10 pravdepodobne nepokrývajú ani celú variabilitu v rámci kultúry. FRIEDL ET AL. (2007) získal deväť rôznych klonov ITS oblasti pre *Coccomyxa elongata* SAG 216-3c.

Viac rôznych kópií rDNA oblastí však rovnako dobre môže byť podkladom pre otvorenie

otázky o pohlavnom rozmnožovaní u tohto komplexu. Viac kópií ITS bolo zistených práve u hybridov, kde potomok má jeden typ kópie od jedného rodiča a druhý typ od druhého rodiča, súčasne sa môžu v jadre vyskytovať ďalšie typy, ktoré pochádzajú z crossing-overu rodičovských aliel (COLEMAN 2007). Ďalšou možnosťou je že sa jedná o pseudogeny a len jeden typ kópie sa podieľa na fungovaní bunky. Kópie zistené v tejto práci však nepovažujem za pseudogeny. Pretože by sa za pseudogén musel považovať celý cistrón, alebo najmenej celá oblasť ITS1+5.8S+ITS2, a tu by sa pseudogenizácia dala poznať podľa imperfektnej 5.8S rDNA a absencie niektorých relatívne konzervovaných oblastí ITS2 (COLEMAN 2007). To som v získaných klonoch v žiadnej z kultúr H103, C8, C9 a C10 nepozorovala. Klony sa síce líšili väčšími indelmi o veľkosti až 11 nukleotidov, šlo však o úseky v ITS1. Väčšina klonov sa v súlade so súčasnou literatúrou (COLEMAN 2003, COLEMAN 2009), líšili v nepárujúcich sa oblastiach. Výnimkou v tomto ohľade sú klony kultúry H103, ktoré sa líšili jedným hCBC v helixe II a ďalšími zmenami nepodporujúcimi párovanie v stemoch helixu I a III. Táto variabilita síce neodporuje teórii o možnom krížení (v rámci skupiny), ale táto variabilita sa vymyká známym pozorovaniam vnútrogenomovej variability, kde sa kópie nelíšia v stemoch (COLEMAN 2007). Variabilita v kultúre H103 môže byť buď dôsledkom hybridizácie, alebo takisto pokiaľ vezmeme do úvahy, že genómová DNA nebola izolovaná z jednej bunky, ale z celej populácie buniek, môže byť rovnako dobre príkladom vnútro populačnej variability, ktorá však rovnako ako vnútrogenomová variabilita podlieha homogenizácii procesom „concerted evolution“ (GANLEY & KOBAYASHI 2007).

Prítomnosť viacerých kópií rDNA v tejto kultúre a v kultúrach C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11 a C12 implikuje možnosť pohlavného rozmnožovania v organizmoch, u ktorých pohlavné rozmnožovanie nikdy nebolo pozorované. Vnútrogenomová variabilita či vnútro populačná variabilita okrem toho môže byť dôkazom schopnosti prispôbiť sa vonkajším podmienkam rýchlejšie než organizmy bez tejto variability. Je otázkou ako veľmi sú tieto rôzne kópie časté v genóme, pravdepodobne sa vďaka redundancii rDNA ani neprejavajú. Súčasne je otázkou ako veľmi typ ITS ovplyvňuje fitness bunky. Pokiaľ by mali byť funkčné všetky kópie bunka by musela mať niekoľko typov endonukleáz, ktoré by boli schopné tieto intróny vystrihávať. Pravdepodobnejšie je, že sa v bunke transkribuje len jeden typ rDNA a ten potom podlieha „RNA processingu“ (MUIR ET AL. 2001). „RNA processing“ je proces vystrihávania intrónov a úpravy RNA predtým než sa zabuduje do ribozómov. Presné fungovanie tohto procesu je dosiaľ neznáme, predpokladá sa, že prvé štiepenie ITS2 prebieha niekde medzi helixom II a helixom III (COLEMAN 2007). Klony v skupine A1 sa líšili vždy iba o jeden nukleotid v loope. Klony kultúr patriacich do skupiny B sa líšili väčšími indelmi v oblasti ITS1. Väčšina

kmeňov u ktorých som zaznamenala vnútrogenomovú variabilitu patria do skupiny B.

4.3 Ekologické charakteristiky jednotlivých línií

Intragenómová variabilita môže tiež súvisieť s ekologickými nárokmi skupiny. Kmene, ktoré obsahujú viac kópií ITS boli izolované ako voľne žijúce z ihličia, kôry, pôdy a dreva. Kultúra H103 bola takisto izolovaná ako voľne žijúca z pieskovcových skal v Adršpachu. Podľa ekologických preferencií by sa mohlo zdať, že vnútrogenomová variabilita v ITS by skutočne mohla súvisieť s prispôsobivosťou prostrediu. Do skupiny B okrem študovaných voľne žijúcich kmeňov patria aj organizmy endofytické a parazitické a jeden lichenizovaný kmeň *C. glaronensis* CICALA 306 (AY333646.1). Skupina A naproti tomu je tvorená predovšetkým zástupcami lichenizovanými, aj keď niekoľko voľne žijúcich zástupcov sa tu nájde. Rod *Coccomyxa* je známy práve mutualistickými vzťahmi s lišajníkmi, len niekoľko druhov bolo popísaných ako voľne žijúcich (JAAG 1933). Až do súčasnosti sa pozornosť venovala práve týmto lichenizovaným zástupcom. ZOLLER A LUTZONI (2003) urobili rozsiahlu štúdiu na lichenizovaných *Coccomyxa* zástupcoch z rôznych druhov kalichovky *Omphalina* z Grónska a Kanady. Táto štúdia ukázala, že symbionti kalichovky sú veľmi geneticky stáli a že tvoria jeden klad s *C. subellipsoidea* SAG 216-13. Tento kmeň však nie je typový, a tak vytvárať druhové závery na základe tejto podobnosti nejde. V tejto štúdii sa ukázalo, že lichenizované spoločenstvá s rodom *Coccomyxa* vznikli najmenej dvakrát v evolúcii. Raz pre Basidiomycota (*Omphalina*) a druhýkrát pre Ascomycota (v štúdii použili niektoré typové kmene popísané zo symbióz s lišajníkmi *Solorina* a *Peltigera*). Už práca LOHTANDER ET AL. (2003) tento predpoklad nabúrara, keď zistila variabilitu v sekvenciách získaných z *Peltigera britannica*, ktoré neboli podobné s ostatnými sekvenciami z *Nephroma* a *Peltigera* fotobiontov, ktoré vykazovali veľmi malú variabilitu (jediný nukleotid). Bohužiaľ v tejto práci zavrhl túto variabilitu a ďalej sa venovali už len štúdii 18S rDNA. Použitím týchto sekvencií sa ukázalo, že symbiont z *Peltigera britannica* patrí do skupiny symbiontov z *Omphalina*, rovnako ako izoláty z lišajníkov rodu *Solorina* E1, E2, E3 (v práci označené ako skupina A1). Tým sa ukazuje, že symbióza s lišajníkmi vznikla najmenej pre skupinu Ascomycota viackrát. Za tento nekongruentý vývoj hostiteľa a symbionta môže pravdepodobne horizontálny prenos symbionta (HERRE ET AL. 1999). Do skupiny A1 súčasne patria kmene zbierané ako slizový povlak na dreve alebo na pôde. Na lokalitách, kde bol zbieraný prírodný materiál pre izoláciu kmeňov U1 až U4 boli pozorované kalichovky *Omphalina*. To otvára možnosť, že takto izolovaní zástupcovia boli len počiatočnou formou vývoja tohto mutualistického

spoločenstva. Skupina A2a je charakterizovaná takisto lichenizovanými zástupcami, kam patria zatiaľ iba symbionti z Ascomycota, z rádu Peltigerales, a jeden voľne žijúci zástupca, izolovaný z kôry (kultúra T5). Je otázkou či je skutočne voľne žijúci, alebo bol asociovaný s nejakým lišajníkom rastúcim na borke stromu, pretože niektoré druhy rodov *Nephroma* a *Peltigera* sú schopné rásť na tomto substráte. Tento kmeň T5 bol izolovaný z tropického pralesa a ako jediný zástupca patrí do skupiny, kde sú dosiaľ len temperátne kmene. Ostatné izoláty (T1, T2, T3, T4) získané z tropického pralesa tvoria samostatnú skupinu C. Do tejto skupiny nepatrí žiaden temperátny kmeň. Tieto izoláty považujem za voľne žijúce. Skupina C je typicky tropická, môže to znamenať, že táto línia v rámci kladu *Coccomyxa* je výhradne tropická, alebo každopádne, že sa v temperátnej zóne vyskytuje v omnoho menších frekvenciách než iné fylogenetické skupiny. Podobný vzťah platí aj pre ostatné skupiny, že sú skôr temperátne a ich zástupcovia sa môžu s veľmi nízkou frekvenciou vyskytovať aj v tropickej oblasti. Medzi 32 skúmanými kmeňmi z temperátnej oblasti sa nenašiel ani jeden, ktorý by patril do príbuznosti k týmto tropickým izolátom (do skupiny C). Avšak jeden tropický kmeň (T5) patrí do kladu A2. Do skupiny A2 patrí ešte podskupina A2b, do ktorej patria len voľne žijúci zástupci. Títo zástupci sú však pravdepodobne schopní vstupovať do mutualistických vzťahov, pretože kultúry A1 a H102 boli získané subizoláciou z kultúr iných organizmov. Zaujímavé je, že do tejto skupiny patria voľne žijúce organizmy (*C. raysisiae*, *C. chodatii*) a kmene získané z kultúr (kde pôvodným biotopom bola voda) a takisto sekvencia získaná z endosymbionta *Paramecium bursaria*. Do tejto symbiôzy sú pravdepodobne schopní vstupovať iba niektorí zástupci a to práve tí, ktorí žijú vo vodnom prostredí. O príbuznosti voľne žijúcich, epifytických a fotobiontov z rádu Peltigerales špekuloval už JAAG (1933) na základe pozorovaní kultúr pestovaných na cukornatom médiu s peptónom.

Je otázne či skupina A preferuje lichenizovaný spôsob života alebo má isté predispozície k tomu, aby bola vhodná pre lichenizáciu. Prítomnosť zástupcov, ktorí boli izolovaní ako voľne žijúci v skupine A implikuje, že pomalá mutačná rýchlosť v skupine A nielen oproti ostatným skupinám, favorizuje túto skupinu pre vstup do lichenizovaného stavu. Genotypová uniformita a spomalenie genetickej zmeny priamo súvisí so sexuálnym rozmnožovaním, ktoré je u symbiontov potlačené (ZOLLER & LUTZONI 2003, LUTZONI & PAGEL 1997, HERRE ET AL. 1999). To podporuje aj malý počet kmeňov (tri), u ktorých bola detekovaná vnútrogenomová variabilita v tejto skupine. Súčasne je táto vnútrogenomová variabilita veľmi nízka oproti klonom zo skupiny voľne žijúcich (skupina B). To podporuje hypotézu, že táto fylogenetická línia má predispozície pre lichenizáciu. Súčasne sa, ale zo známych dát nedá nájsť žiadny

argument, ktorý by vyvrátil teóriu o preferencii tohto spôsobu života. Voľne žijúci zástupcovia mohli byť počiatočnými štádiami lišajníkov alebo len utiekli zo symbiôzy. Nízke substitučné rýchlosti u fotobionta *Trebouxia* zistili aj u dutohlávky *Cladonia* (PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST 2001). Zrýchlená evolúcia by mala prebiehať len u mykobionta, ktorí sa musí prispôsobovať vonkajšiemu prostrediu (ZOLLER & LUTZONI 2003, PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST 2001, LUTZONI & PAGEL 1997). Pri endosymbiotických vzťahoch je to so substitučnou rýchlosťou naopak (HERRE ET AL. 1999). U mitochondrií a endosymbiotických baktérií sa zistilo, že sa vyvíjajú omnoho rýchlejšie než ich voľne žijúci príbuzní (MORAN 1996, HERRE ET AL. 1999). Tomu by odpovedala zrýchlená evolúcia v skupine B, ktorá má okrem voľne žijúcich zástupcov aj endosymbionty z *Ginkgo biloba*. Súčasne voľne žijúci zástupcovia sa musia prispôsobovať vonkajšiemu prostrediu, a tak substitučná rýchlosť je vyššia než u skupín, ktoré žijú v stálom prostredí mykobionta. Súčasne je v skupine B aj zvýšená vnútrogenomová variabilita, ktorú by asi skôr vysvetľovala schopnosť prispôbiť sa zmenám vo vonkajšom prostredí. Príčina zvýšenej intragenómovej variability v tejto fylogenetickej línii nie je jasná a táto diverzita si zasluhuje väčšiu pozornosť, než jej bola doteraz venovaná.

4.4 Porovnanie tradičných morfológických a morfometrických charakteristík v komplexe *Coccomyxa/Pseudococcomyxa*

Morfologické kritérium na rozoznávanie druhov sa zdá byť podľa výsledkov fylogenetických analýz veľmi nepresné. Organizmy, ktoré boli zaradené do rôznych druhov sa na základe ITS2 analýz zdajú byť rovnakými a teda jedným organizmom. Je to prípad hlavne Chodatom a Jaagom popísaných variet izolovaných z lišajníkov *Solorina* a *Peltigera* (JAAG 1933). JAAG (1933) predpokladal, že každý lišajník má vlastný druh symbionta. Fylogenetické analýzy ITS1 a ITS2 však ukazujú, že to tak nie je a osekvenované typové kultúry *C. solorinae* var. *bisporae*, *C. solorinae* var. *croceae*, *C. peltigerae* var. *variolosae* a ďalšie kultúry určené ako druhy a variety izolované z *Peltigera* a *Solorina* patria do jedinej skupiny A2, do ktorej súčasne patria aj voľne žijúce druhy *C. chodatii* a *C. rayssiae*. Druhy *C. solorinae* var. *bisporae*, *C. solorinae* var. *croceae*, *C. peltigerae* var. *variolosae* nie sú žiadnymi distinktnými druhmi pretože tvoria jednu skupinu so zhodnými sekvenciami ITS1 a ITS2 markeru. Súčasne sa iní zástupci izolovaní z lišajníka *Solorina* na základe molekulárnych dát zaradili do skupiny A1. JAAG (1933) medzi týmito „druhmi“ rozlišoval nielen na základe pôvodu z rôznych lišajníkov, ale aj na základe morfológie. Z analýz geometrickej

morfometriky však vyplýva, že rozdiely medzi kultúrami a kmeňmi sú, ale žiadna tvarová zmena neodpovedá konkrétne žiadnej fylogenetickej skupine. CVA analýza síce medzi fylogenetickými skupinami našla signifikantné rozdiely, ale ako je vidieť z PCA a CVA diagramov, skupiny sa z väčšej časti prekrývajú, a preto je diskriminácia na základe tvaru buniek nie celkom jednoznačná. Rovnako je to aj pre biotopy, či lokality. Medzi skupinami je veľký prekryv v tvare, a tak sa skupiny ťažko diskriminujú. Jediný mierny trend sa dá vypočítať v lichenizovaných zástupcoch a voľne žijúcich. Tento trend však nie je veľmi zreteľný (66,1% správne zaradených buniek) možno kvôli malému samplingu lichenizovaných kmeňov podrobených morfometrickej analýze. Do morfometrických analýz bolo použitých 24 kmeňov z toho len štyri kmene boli lichenizované. Kmeň E4 je výrazne odlišný od buniek ostatných kmeňov. Väčšinu buniek mal skoro okrúhlu ($D/S=1,6$), naproti tomu kmeň izolovaný z *Peltigera leucophlebia* (E5) mal priemer pomeru dĺžky a šírky bunky približne 2. Podobne sú na tom aj kmene izolované z lišajníkov rodu *Solorina* (E1, E2). Na základe dát o veľkosti buniek sa však zdá, že tieto kultúry majú skôr menšie bunky než ostatné kultúry, čo je však potrebné overiť analýzami na väčšom počte lichenizovaných zástupcov. Súčasne sa táto charakteristika môže pri dlhodobých kultiváciách strácať (JAAG 1933). Tieto pozorovania súhlasia s JAAGOVÝMI (1933) popismi izolátov z týchto lišajníkov. *C. peltigerae* bola popísaná na základe štyroch kmeňov ktoré sa vzájomne líšili morfológiou, ale všetky boli izolované z *Peltigera aphtosa* a priemerný pomer dĺžky a šírky Jaag uvádza o trochu menší než mnou pozorovaný (1,4). Uvádzané rozmery u *C. solorinae croceae* odpovedajú pozorovaným hodnotám v tejto práci (u kultúry E2).

Zistené rozdiely medzi kultúrami môžu súvisieť aj s tvarovými zmenami spojenými s dlhodobou kultiváciou v umelých podmienkach. Kvôli tomu sa napríklad môže odlišovať kultúra H103, táto kultúra sa však odlišuje nielen vekom (v kultúre od roku 1970), ale aj fylogeneticky a ekologicky. Takže rozdiely sa nedajú vysvetliť len jedným faktorom. Pokiaľ by na tvar buniek mala vplyv dlhodobá kultivácia, tieto zmeny by sa zrejme prejavili aj na kultúre H102. Kultúra však nevykazuje okrem väčšej veľkosti žiadne odchýlky od priemerného tvaru.

Fylogenetické skupiny ani izoláty z rôznych substrátov sa vzájomne tvarovo neodlišujú, to však neznamená, že nemôže existovať iné morfológické kritérium, ktoré by odlišilo fylogenetické línie. FRIEDL ET AL. (2007) rozdelenie kladu *Coccomyxa/Pseudococcomyxa* na dva navrhované rody *Pseudococcomyxa* a *Avernensia* podporuje aj rozdielmi v tvare bunky. Rod *Pseudococcomyxa* by mal mať heteropolárne bunky a rod *Avernensia* isopolárne bunky. Tento tvarový trend by mohol odpovedať druhej, tretej a štvrtej PCA ose v analýze

relatívnych warpov v tejto práci. Kvantitatívne zhodnotenie rozdielov medzi fylogenetickými líniami A a B (pravdepodobne odpovedajú navrhovaným rodom *Pseudococcomyxa* a *Avernensia*) však rozdiely medzi líniami nepodporilo. FRIEDL ET AL. (2007) súčasne uvádza ešte ďalšie morfologické kritéria ako tvar chloroplastu, tvorbu agregátov buniek a typ slizovitých štruktúr. KOSTIKOV ET AL. (2002b) na základe týchto morfologických znakov zrevidoval skupinu Radiococcaceae, kde preklasifikoval niekoľko druhov *Coccomyxa* do nových rodov, práve podľa morfologických charakteristík. Tieto závery je však potrebné overiť fylogenetickými analýzami typových kultúr.

Rozsiahlejšia morfometrická štúdia na kmeňoch *Pseudococcomyxa/Coccomyxa* ukázala, že potenciál diskriminovať molekulárne definované skupiny morfometrickými charakteristikami nie je veľký a pri zahrnutí väčšieho počtu kmeňov do analýz sa fylogenetické ani mikrobiotopové rozdiely nedajú použiť na klasifikáciu týchto skupín. Do analýz boli zahrnuté aj kmene použité v práci NEUSTUPA & NEMJOVÁ (2008). Kmeň Ps-2, v tejto práci označený ako T3, mal veľmi malé bunky, v tejto štúdii sa táto vlastnosť nepotvrdila a kmeň T3 mal podobné rozmedzie centroid size ako kmeň T2 (resp. Ps-1). Preto som mala podozrenie na kontamináciu kultúry inou kultúrou pri očkovaní. Túto hypotézu som ale vyvrátila resekvenáciou tohto kmeňa, ktorá ukázala úplne zhodnú sekvenciu s pôvodne izolovanou z kmeňa Ps-1 (T3). Táto alometrická zmena sa dá vysvetliť buď vekom kultúry, alebo trochu inými podmienkami kultivácie, kde v práci NEUSTUPA & NEMJOVÁ (2008) boli kmene kultivované pri laboratórnej teplote a dennom osvetlení a v tejto práci boli kmene kultivované pri 15°C a konštantnom osvetlení 6W/m². Súčasne boli kultúry v tejto práci kultivované kratšiu dobu. Prvá PCA os v tejto práci vysvetlila variabilitu popisovanú pomerom dĺžky a šírky buniek, podobne ako vo vyššie citovanej publikácii.

Problém pri rozlišovaní tvarových preferencií medzi skupinami mohol byť spôsobený aj tým, že k diskriminácii som používala len symetrickú variabilitu, ktorá tvorila len 1/2 z celkovej variability. Nesymetrická časť variability je možno schopná vysvetliť rozdiely medzi fylogenetickými, či mikrobiotopom určenými skupinami, podobne ako to bolo vo práci NEUSTUPA & NEMJOVÁ (2008). Táto variabilita je však ťažko postihnuteľná v niektorých kmeňoch, kde sú bunky konvexné na vrchnej a spodnej strane bunky („bruško“ a „chrbát“). Podľa druhého komponentu v analýze relatívnych warpov na nesymetrizovanom súbore sa však zdá, že 1/3 z celkovej variability bola do datového súboru vnesená arbitrárne práve týmto nerozoznaním, a preto nebolo možné pracovať s touto variabilitou. K jej správne použitiu by bolo nutné použiť lepšie kritérium na rozlíšenie vrchnej a spodnej strany bunky než subjektívne hľadisko.

5 Záver

Široko morfológicky definované rody *Coccomyxa* a *Pseudococcomyxa* tvoria monofyletickú líniu v triede Trebouxiophyceae. Na základe analýz 18S rDNA je v rámci tohto komplexu možné rozlíšiť štyri fylogenetické skupiny. Na základe markerov ITS1 a ITS2 sa v rámci týchto skupín dajú rozoznať menšie podskupiny, ktoré odpovedajú ekologickým preferenciám. V skupine preferujúcej voľný spôsob života s tendenciou vstupovať do endosymbiotických a parazitických vzťahov s inými organizmami som detekovala vyššiu intragenomovú variabilitu než u skupiny tvoriacej skôr symbiózy s lišajníkmi.

Morfometrické charakteristiky jednotlivých kmeňov sa síce medzi sebou líšia, ale žiadny výrazný tvarový trend nerozlišuje medzi fylogeneticky definovanými skupinami, ani medzi mikrobiotopami.

6 Literatúra

- ADL S. M., SIMPSON A. G. B. FARMER M. A. ANDERSEN R. A., ANDERSON O. R., BARTA J. R., BOWSER S. S., BRUGEROLLE G., FENSOME R. A., FREDERICQ S., JAMES T. Y., KARPOV S., KUGRENS P., KRUG J., LANE CH., LEWIS L. A., LODGE J., LYNN D. H., MANN D. G., MCCOURT R. M., MENDOZA L., MOESTRUP Ø., MOZLEY-STANDRIDGE S. E., NERAD T. A., SHEARER C. A., SMIRNOV A. V., SPIEGEL F. W. & TAYLOR M. F. J. R. (2005): The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5): 399-451
- ALTSCHUL S. F., GISH W., MILLER W., MYERS E. W & LIPMAN D. J. (2004): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-410
- BARGAGLI R., BROADY P. A. & WALTON D. W. H. (1996): Preliminary investigation of the thermal biosystem of Mount Rittmann fumaroles (northern Victoria Land, Antarctica). *Antarctic Science* 8 (2): 121-126
- BECK A, FRIEDL T. & RAMBOLD G. (1998): Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytologist* 139 (4): 709- 720
- BEIGGI S. & PIERCEY-NORMORE M. D. (2007): Evolution of ITS Ribosomal RNA Secondary Structures in Fungal and Algal Symbionts of Selected Species of *Cladonia* sect. *Cladonia* (Cladoniaceae, Ascomycotina). *Journal of Molecular Evolution* 64: 528-542
- BISCHOFF H. & BOLD H. C. (1963): Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycological Studies IV. -Univ. Texas Publ.* 6318: 1-95
- BRÄKENHJELM S. & QINGHONG L. (1995): Spatial and temporal variability of algal and lichen epiphytes on trees in relation to pollutant deposition in Sweden. *Water, Air and Soil Pollution* 79: 61-74
- BRITTON T., SVENNBLAD B. ERIXON P. & OXELMAN B. (2007): Bayesian support is larger than bootstrap support in phylogenetic inference: a mathematical argument. *Mathematical Medicine and Biology* 24: 401-411
- BROADY P. A. (1979): Qualitative and quantitative observations in green and yellow-green algae in some english soils. *British Phycological Journal* 14: 151-160
- BROADY P. A. (1987): The Morphology, Distribution and Ecology of *Pseudococcomyxa simplex* (Mainx) Fott (Chlorophyta, Chlorellaceae), a Widespread Terrestrial Antarctic Alga. *Polar Biology* 7: 25-30
- BRÜCK H. (1983): Der Einfluss der Grosstadt auf die Verbreitung rindenbewohnender

- Grünalgen am Beispiel von Köln. *Decheniana* (Bonn) 136: 1-4
- COLEMAN A. W. (2003): ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* 19 (7): 370-375
- COLEMAN A.W. (2007): Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* 35 (10): 3322-3329
- COLEMAN A.W. (2009): Is there a molecular key to the level of „biological species“ in eukaryotes? *Molecular Phylogenetics and Evolution* (50): 197-203
- ELIÁŠ M., NEUSTUPA J. & ŠKALOUD P. (2008): *Elliptochloris bilobata* var. *corticola* var. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccal green alga. *Biologia* 63 (6): 791-798
- ETTL H. & GÄRTNER G. (1995): *Syllabus der Boden-, Luft-, und Flechtenalgen*, Gustav Fischer, Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- FELSENSTEIN J. (1978): Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* 27 (4): 401-410
- FOTT B. (1974): Taxonomie der palmelloiden Chlorococcales (Familie Palmogloeaceae). *Preslia* 46: 1-31
- FOTT B. (1981): Nomenklatorische Änderungen bei einigen Chlorokokkalalgen. *Preslia* 53: 1-7
- FOTT B. & KOMÁREK J. (1958): Über eine häufig übersehene Grünalge: *Pseudococcomyxa adhaerens* Koršikov. *Preslia* 30: 76-77
- FRIEDL T. (1995): Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, cl. nov.). *Journal of Phycology* 31: 632-639
- FRIEDL T. (1996): Evolution of the polyphyletic genus *Pleuastrum* (Chlorophyta): inferences from nuclear-encoded ribosomal DNA sequences and motile cell ultrastructure. *Phycologia* 35 (5): 456-469
- FRIEDL T., KOSTIKOV I., MÜLLER M., BECK A., ZUFALL-ROTH E. & HOFFMANN L. (2007): A re-investigation of *Pseudococcomyxa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): morphology, rDNA sequencing and AFLP fingerprinting to define species. In: Hindák F. (ed.): *Biology and Taxonomy of Green Algae V., International Symposium, Programme & Abstracts*, p. 23, Slovak Bot. Soc., Bratislava
- GANLEY A. R. D. & KOBAYASHI T. (2007): Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Research* 17: 184-191

- GÄRTNER G. & SCHRAGL A. (1988): Zur Taxonomie von *Coccomyxa brevis* nov. comb. (Chlorophyceae, Chlorococcales) früher *Nephrodiella brevis* VISCHER (Xanthophyceae, Mischococcales). Nova Hedwigia 46 (3-4): 511-517
- GÖRRASSON A. (1998): Luftalger och lavar indikerar luftföroreningar. Summary Airborne algae and lichens indicate air pollutants. Statens naturvårdsverket Rapport 3562. Swedish Environmental Protection Agency, Laboratory of Environmental Control, uppsala, pp. 1-17 ex POIKOLAINEN J., LIPPO H., HONGISTO M., KUBIN E., MIKKOLA K., LINDGREN M. (1998): On the abundance of epiphytic green algae in relation to the nitrogen concentrations of biomonitors and nitrogen deposition in Finland. Environmental Pollution 102, S1: 85-92
- GRAHAM L. E. & WILCOX L. W. (2000): Algae. Prentice-Hall, Upper Saddle river, New Jersey
- GRAY A. P., LUCAS I. A. N., SEED R. & RICHARDSON C. A. (1999): *Mytilus edulis chilensis* infected with *Coccomyxa parasitica* (Chlorococcales, Coccomyxaceae). Journal of Molluscan Studies 65: 289-294
- GROSS W. (2000): Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. Hydrobiologia 433: 31-37
- GUIDON S. & GASCUEL O. (2003): A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology 52 (5): 696-704
- GUIRY M. D. & GUIRY G. M. (2009): Algaebase version World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 18 April 2009
- HAMBY R. K., SIMS L., ISSEL L. & E. ZIMMER (1988): Direct ribosomal RNA sequencing: optimization of extraction and sequencing methods for work with higher plants. Plant Molecular Biology Reporter 6 (3):175-192.
- HALL (2008): Phylogenetic trees made easy. A how-to manual. Third Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, USA
- HAMMER Ø. HARPER D. A. T., RYAN P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Paleontologia Electronica 4 (1): 9
- HEPPLERLE D. (2004): SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualisation tool for molecular sequences. http://www.sequentix.de/software_seqassem.php
- HERRE E.A., KNOWLTON N., MUELLER U.G. & REHNER S.A. (1999): The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. Tree 14 (2): 49-53
- HINDÁK F. (1984): Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae). III. Biologické Práce 30, Veda, Bratislava

- HOEK C. VAN DEN (1963): Nomenclatural Typification of some Unicellular and Colonial Algae. Nova Hedwigia 6, Band IV: 277-296
- HOFFMANN L., ECTOR L. & KOSTIKOV I. (2007): Algal flora from limed and unlimed soils in the Ardenne (Belgium). Systematics and Geography of Plants 77: 15-90
- HOSHINA R. & IMAMURA N. (2008): Multiple origins of Symbioses in *Paramecium bursaria*. Protist 159: 53-63
- HUELSENBECK J. P. & RONQUIST F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17: 754-755
- CHODAT R. (1913): Monographies d'algues en culture pure. Berne, K.-J. WYSS, Libraire-éditeur: 224-234
- JAAG O. (1933): *Coccomyxa* Schmidle Monographie einer Algengattung, Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz, Bern Buchdruckerei Buehler & Co.
- KALENDAR R. (2009): FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. [www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm]
- KALINA T. (1994): Laboratorní kultivace sinic a řas in Sběr, preparace a konzervace rostlinného materiálu. Kolektiv autorů. Reprodukční a knihářské pracoviště PpF UK Praha: 39-41
- KALINA T. & VÁŇA J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organizmy v současné biologii. . Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum
- KARSTEN U., FRIEDL T., SCHUMANN R., HOYER K. & LEMBCKE S. (2005): Mycosporine-like aminoacids and phylogenies in green algae: *Prasiola* and its relatives from the Trebouxiophyceae (Chlorophyta). Journal of Phycology 41 (3): 557-566
- KATANA A., KWIATOWSKI J., SPALIK K. & ZAKRYŠ B. (2001): Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. Journal of Phycology 37: 443-451
- KIPP V. (2004): Biodiversität und phylogenetische Stellung eukaryotischer Algen in kalzifizierenden Biofilmen. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- KLINGENBERG C. P., BARLUENGA M. & MEYER A. (2002): Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. Evolution 56 (10): 1909-1920
- KOMÁREK J. & FOTT B. (1983): Das Phytoplankton des Süßwassers, Stuttgart, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchner (Nägele u. Obermiller)
- KORŠIKOV O. A. (1953): Vyznačnik prsnovodnich vodorostej ukrajinskoj rsr V, Kiev
- KOSTIKOV I., DARIENKO T. & HOFFMANN L. (2002a): Taxonomic revision of the genus *Pseudococcomyxa* with comments the genus *Coccomyxa*. Proc. Int. Symp. „Biology and Taxonomy of Green Algae IV“. Smolenice-Castle, Slovakia, June 28, 2002: 47

- KOSTIKOV I., DARIENKO T., LUKEŠOVÁ A. & HOFFMANN L. (2002b): Revision of the classification of Radiococcaceae FOTT ex KOMÁREK (except the subfamily Dictyochlorelloideae) (Chlorophyta). *Algological Studies* 104: 23-58
- KOSTIKOV I. & HOFFMANN L. (2002): What is *Nephrodiella brevis* VISCHER? *Algological Studies* 104: 1-21
- KRIENITZ L., USTINOVA I., FRIEDL T. & HUSS V. A. R. (2001): Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 37: 852-865
- LEWIS L. A. & MULLER-PARKER G. (2004): Phylogenetic Placement of „Zoochlorellae“ (Chlorophyta), Algal Symbiont of the Temperate Sea Anemone *Anthopleura elegantissima*. *The Biological Bulletin* 207: 87-92
- LOHTANDER K., OKSAKEN I. & RIKKONEN J. (2003): Genetic diversity of green algal and cyanobacterial photobionts in *Nephroma* (Peltigerales). *Lichenologist* 35 (4): 325-339
- LÖYTENOJA A. & MILINKOVITCH M.C. (2001): SOAP, cleaning multiple alignments from unstable blocks. *Bioinformatics* 17: 573-574
- LUKEŠOVÁ A. (2001): Soil Algae in Brown Coal and Lignite Post-Mining Areas in Central Europe (Czech Republic and Germany). *Restoration Ecology* 9 (4): 341-350
- LUTZONI F. & PAGEL M. (1997): Accelerated evolution as a consequence of transitions to mutualism. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 94: 11422- 11427
- MAI J.C. & COLEMAN A.W. (1997): The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *Journal of Molecular Evolution* 44: 258-271
- MAINX F. (1928): Einige neue Chlorophyceen (Tetrasporales und Protococcales). *Archiv für Protistenkunde* 64: 93-95
- MARHOLD K. & SUDA J. (2002): Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum
- MATHEWS D. H., SABINA J., ZUKER M. & TURNER D. H. (1999): Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. *Journal of Molecular Biology* 288: 911-940
- MAYR E. (1982): *The growth of biological thought*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge
- MORAN N. A. (1996): Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the national academy of Sciences of the United States of America* 93 (7): 2873-2878

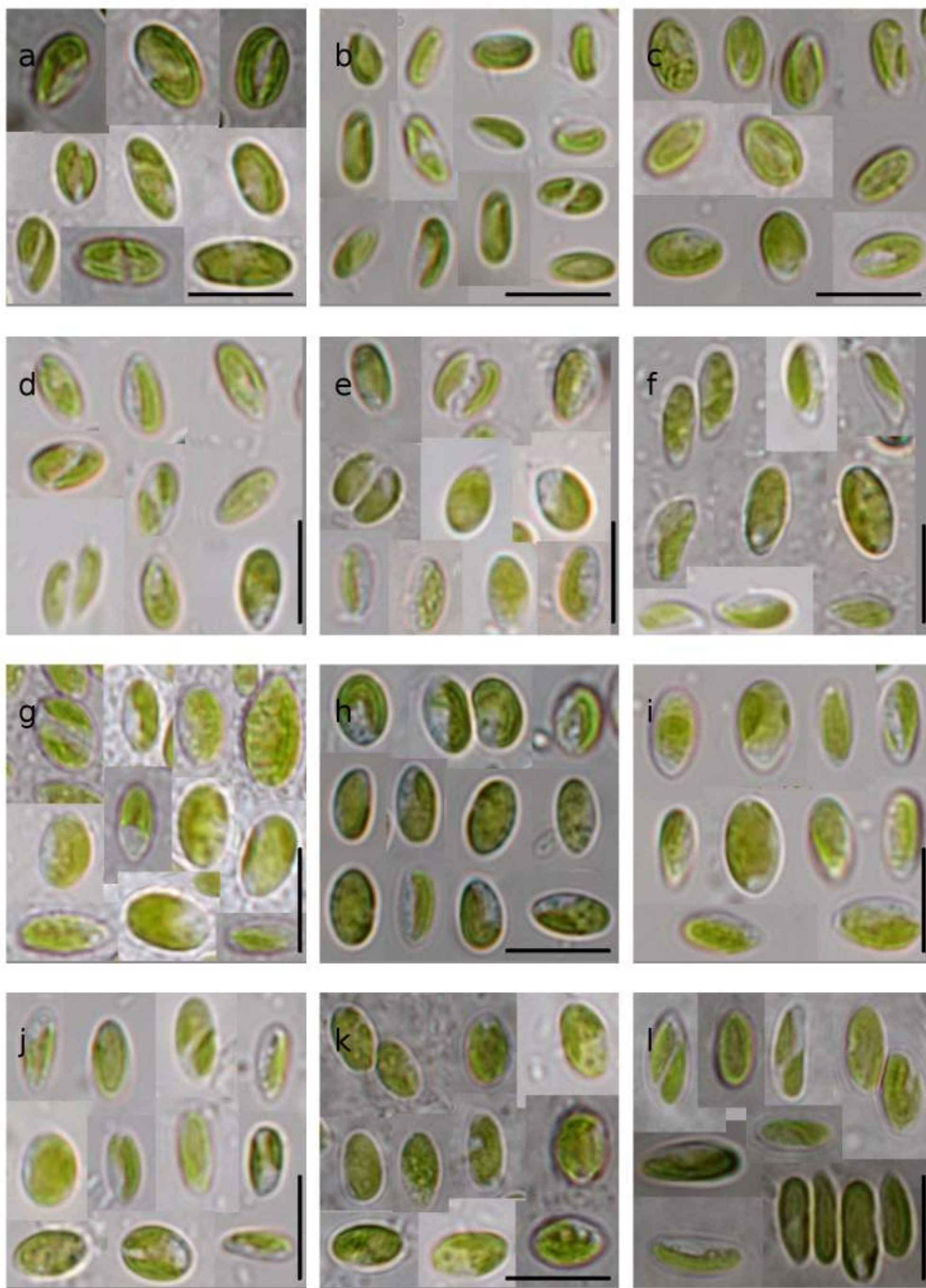
- MUIR G., FLEMING C. C. & SCHLÖTTERER CH. (2001): Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Molecular Biology and Evolution* 18: 112-119
- NEUSTUPA J. & ALBRECHTOVÁ J. (2003): Aerial algae on spruce needles in the Krušné Hory Mts., Czech Republic. *Czech Phycology* 3: 161-167
- NEUSTUPA J. & NEMJOVÁ K. (2008): Quantitative assessment of morphological variation of six *Pseudococcomyxa* strains by geometric morphometrics descriptors. *Fottea* 8(2):111-116
- NYLANDER J. A. A. (2004): MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. <http://www.abc.se/~nylander/>
- PAGE R. D. M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358
- PAŽOUTOVÁ M. (2008): Phylogenetic diversity and generic concept in the family Radiococcaceae, Chlorophyta. - Diplomová práce, Katedra botaniky, Univerzita Karlova
- PEVELING E. & GALUN M. (1976): Electron-microscopical studies on the phycobiont *Coccomyxa* Schmidle. *New Phytologist* 77 (3): 713-718
- PIERCEY-NORMORE M.D. & DEPRIEST P.T. (2001): Algal switching among lichen symbioses. *American Journal of Botany* 88 (8): 1490-1498
- PRINTZ H. (1927): Chlorophyceen in Engler-Prantl: Die natürlichen Pflanzenfamilien. 3 Bd. 2. Auflage ex JAAG O. (1933): *Coccomyxa* Schmidle Monographie einer Algengattung, Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz, Bern Buchdruckerei Böhler & Co.
- PROKOPOWICH C.D., GREGORY T.R. & CREASE T.J. (2003): The correlation between rDNA copy number and genome size in eukarotes. *Genome* 46: 48-50
- RIJK P. DE, WUYTS J. & WACHTER R. DE (2003): RnaViz2: an improved representation of RNA secondary structure. *Bioinformatics* 19(2): 299-300
- RODRÍGUEZ F., FEIST S. W., GUILLOU L., HARKESTAD L. S., BATEMAN K., RENAULT T. & MORTENSEN S. (2008): Phylogenetic and morphological characterization of the green algae infesting blue mussel *Mytilus edulis* in the North and South Atlantic oceans. *Diseases of aquatic organisms* 81: 231-240
- ROHLF F. J. (2008): Tps series software. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook, Available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- RONQUIST F. & HUELSENBECK J. P. (2003): MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574
- SALEMI M. & VANDAMME A.-M. (2004): The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to

DNA and Protein Phylogeny. Cambridge University Press

- SEIBEL P. N., MÜLLER T., DANDEKAR T., SCHULTZ J. & WOLF M. (2006): 4SALE – A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinformatics* 7: 498
- SEIBEL P. N., MÜLLER T., DANDEKAR T. & WOLF M. (2008): Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. *BMC Research Notes* 1: 91
- SELIG C., WOLF M., MÜLLER T., DANDEKAR T. & SCHULTZ J. (2008): The ITS2 Database II: homology modelling RNA structure for molecular systematics. *Nucleic Acids Research* 36:377-380
- SIMPSON A. G. B. & ROGER A. J. (2004): The real „kingdoms“ of eukaryotes. *Current biology* 14 (17): 582-593
- SCHMIDLE W. (1901): Ueber drei Algengenera. *Berichte des Deutschen Botanisches Gessellschaft* 19: 10-24
- SCHULTZ J., MÜLLER T., ACHTZIGER M., SEIBEL P.N., DANDEKAR T. & WOLF M. (2006): The internal transcribed spacer 2 database - a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. *Nucleic Acids Research* 34: 704-707
- SLÁDEČKOVÁ A. (1959): On the Spontaneous Growth of *Pseudococcomyxa adhaerens* (Chlorophyceae) in Chemical Solution. *Ecology* 40 (4): 732-733
- SØCHTING U. (1997): Epiphylllic cover on spruce needles in Denmark. *Annales Botanici Fennici* 34: 157-164
- STEVENSON R. N. & SOUTH G. R. (1974): *Coccomyxa parasitica* sp. nov. (Coccomyxaceae, Chlorococcales), a parasite of giant scallops in Newfoundland. *British Journal of Phycology* 9: 319-329
- SWOFFORD D. L. (2003): PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- ŠESTÁK Z. (1963): Použití papírové chromatografie chlorofylů a karotenoidů v algologii. *Preslia* 35: 123-134
- TAMURA K., DUDLEY J, NEI M. & KUMAR S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599
- TER BRAAK C. J. F. & SMILAUER P. (1997): Canoco for Windows Version 4.5. Centre for Biometry, Wageningen, The Netherlands
- THOMPSON J. D., HIGGINS D. G. & GIBSON T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position

- specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680
- TRÉMOUILAX-GUILLER J., ROHR T., ROHR R. & HUSS V. A. R. (2002): Discovery of an endophytic alga in *Ginkgo biloba*. *American Journal of Botany* 89 (5): 727-733
- TRÉMOUILAX-GUILLER J. & HUSS V. A. R. (2007): A cryptic intracellular green alga in *Ginkgo biloba*: ribosomal markers reveal worldwide distribution. *Planta* 226: 553-557
- WHITE T. J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York
- WOLF M., HEPPELLE D. & KRIENITZ L. (2003): On the phylogeny of *Radiococcus*, *Planktosphaeria* and *Schizochlamydelia* (Radiococcaceae, Chlorophyta). *Biologia* 58 (4): 759-765
- WORDEN A. Z., LEE J.-H., MOCK T., ROUZÉ P., SIMMONS M. P., AERTS A. L., ALLEN A. E., CUVELIER M. L., DERELLE E., EVERETT M. V., FOULON E., GRIMWOOD J., GUNDLACH H., HENRISSAT B., NAPOLI C., McDONALD S. M., PARKER M. S., ROMBAUTS S., SALAMOV A., DASSOW P. VON, BADGER J. H., COUTINHO P. M., DEMIR E., DUBCHAK I., GENTEMANN CH., EIKREM W., GREARY J. E., JOHN U., LANIER W., LINDQUIST E. A., LUCAS S., MAYER K. F. X., MOREAU H., NOT F., OTILLAR R., PANGILINAN O. P. J., PAULSEN I., PIEGU B., POLIAKOV A., ROBBENS S., SCHMUTZ J., TOULZA E., WYSS T., ZELENSKY A., ZHOU K., ARMBRUST E. V., BHATTACHARYA D., GOODENOUGH U. W., PEER Y VAN DEN, GRIGORIEV I. V. (2009): Green Evolution and Dynamic Adaptations Revealed by Genomes of the Marine Picoeukaryotes *Micromonas*. *Science* 324 (5924):268-272
- ZELDITCH M. L., SWIDERSKI D. L., SHEETS H. D. & FINK W. L. (2004): Geometric morphometrics for biologists. A primer. Elsevier (USA), 443 pp.
- ZOLLER S. & LUTZONI F. (2003): Slow algae, fast fungi: exceptionally high nucleotide substitution rate differences between lichenized fungi Omphalina and their symbiotic green algae *Coccomyxa*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 629-640
- ZUCKER M. (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3406-3415

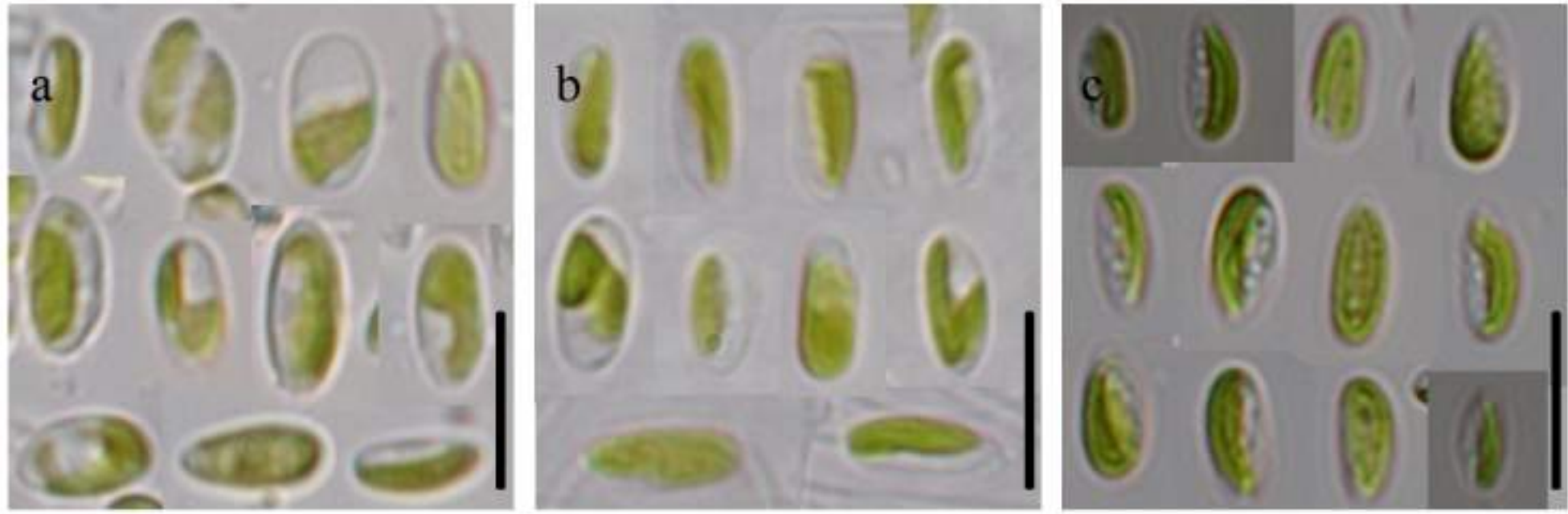
7 Príloha



Tabuľa 1 Fotografie kultúr: a kmeň A1, b kmeň C1, c kmeň C3, d kmeň C4, e kmeň C5, f kmeň C6, g kmeň C7, h kmeň C8, i kmeň C10, j kmeň C11, k kmeň C12, l kmeň E1



Tabuľa 2 Fotografie kultúr: a kmeň E2, b kmeň E4, c kmeň E5, d kmeň H102, e kmeň H103, f kmeň S1, g kmeň S2, h kmeň T1, i kmeň T2, j kmeň T3, k kmeň T5, l kmeň U1, mierka 10 μ m



Tabuľka 3 Fotografie kultúr: a kmeň U2, b kmeň U3, c kmeň U5, mierka 10µm