

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Kateřina Procházková

**Diverzita a druhový koncept u komplexu *Vischeria/Eustigmatos*  
(Eustigmatophyceae)**

**Diversity and species concept of the *Vischeria/Eustigmatos* complex  
(Eustigmatophyceae)**

Diplomová práce

Supervisor: Mgr. Marek Eliáš, PhD.

Praha, 2012

Prohlá-uji, že jsem tuto práci vypracovala samostatn ě a s použitím citované literatury. Tato práce ani její podstatná ěst nebyla p edlofena k získání jiného ěi stejného akademického titulu.

V Praze, 16.8.2012

í í .í ..í í í í í í í í í í ..

Kateřina Procházková

Velmi ráda bych chtěla podkovat svému –koliteli, Marku Eliášovi, za vedení této práce, připomínky nejen k ní, ale také k tomuto textu. Děkuji mu také za to, že mi umožnil účast na dvou prestižních mezinárodních protistologických konferencích. Ráda bych podkovoala Katarínu Nemjové, která byla mojí konzultantkou, a dále také v–em len m algologické laborato e za jejich nad–ení, povzbuzování a n kterým pak zvlá–t za zajímavé, mnohdy afi dobrodružné společné výlety. Lence Flaškové děkuji za pomoc a trp livost při práci v DNA laborato i. M j nejv t–í dík potom pat í mé rodin a přátel m. Děkuji za obrovskou podporu b hem mého p tiletého studia a za víru, že studium biologie má smysl.

## Abstrakt

*Vischeria* a *Eustigmatos* jsou blízce příbuzné rody vyskytující se v terestrických habitatech. Tyto rody byly rozlišeny na základě rozdílů ve struktuře buněčného povrchu (výrůstky a hrany různého tvaru, resp. hladký povrch). Doposud byly popsány tři druhy rodu *Eustigmatos*. V rámci rodu *Vischeria* bylo popsáno dvanáct druhů, z nichž devět však bylo od doby svého popisu pozorováno vzácně nebo dokonce vůbec.

Tato práce je zaměřena na zhodnocení molekulární variability, diverzity a taxonomie komplexu *Vischeria/Eustigmatos*. Za tímto účelem bylo studováno devadesát sedm kmenů zahrnujících jak kmeny pocházející z veřejných sbírek, tak kmeny nově izolované z lokalit z celého světa. Sbírkové kmeny zahrnovaly typové kultury dvou druhů rodu *Eustigmatos* a tří druhů rodu *Vischeria*. Fylogenetické analýzy ITS2 rDNA a *rbcL* sekvencí ukázaly, že rody *Vischeria* a *Eustigmatos* nejsou fylogeneticky separované. Každý z pěti typových kmenů představuje samostatnou vývojovou linii. Některé z dalších nalezených linií svou morfologií odpovídají popisu *Eustigmatos magnus*. Některé z nově izolovaných kmenů jsou na základě zkoumaných genetických markerů nerozlišitelné od sbírkových kmenů, některé z nich naopak představují nové linie. Jen jedna z fylogenetických linií, ztotožnitelná s druhem *Vischeria stellata*, vykazuje dobře definovatelné a stabilní morfologické znaky odlišující ji od ostatních linií.

**Klíčová slova:** *Vischeria*, *Eustigmatos*, diverzita, internal transcribed spacer (ITS), *rbcL*

## **Abstract**

*Vischeria* and *Eustigmatos* are closely related genera occurring in terrestrial habitats. These genera were distinguished by the differences in the features of the cell wall (projections and ridges of different form, smooth surface respectively). Up to date three species of the genus *Eustigmatos* and twelve species of the genus *Vischeria* have been described, but nine of the *Vischeria* species have been rarely, if ever, observed since the original description.

This work is focused on evaluating molecular variability, diversity, and taxonomy of the *Vischeria/Eustigmatos* complex. Ninety seven strains, obtained from public algal collections or newly isolated from localities from all over the world, were studied, including the type strains of two *Eustigmatos* species and three *Vischeria* species. Phylogenetic analyses of the ITS2 rDNA and *rbcL* sequences showed that these genera are not genetically separated. The five types strains each represented a separate evolutionary lineage. Some of the additional lineages included strains morphologically corresponding to the species *Eustigmatos magnus*. Some of the newly isolated strains are according to the markers examined genetically indistinguishable from known strains from public algal collections. However, some of them are new lineages. Only one of the phylogenetic lineages, identifiable as the species *Vischeria stellata*, exhibits well defined and stable morphological features that distinguish it from the other lineages.

**Key words:** *Vischeria*, *Eustigmatos*, diversity, internal transcribed spacer (ITS), *rbcL*

## Obsah

<b>1. Úvodí</b>	<b>7</b>
1.1 Stručná charakteristika třídy Eustigmatophyceae	7
1.2 Rody <i>Vischeria</i> a <i>Eustigmatosia</i>	8
1.3 Taxonomie a charakteristika rodu <i>Vischeria</i>	10
1.4 Taxonomie a charakteristika rodu <i>Eustigmatosia</i>	11
1.5 Molekulární markery používané na druhové úrovni	15
1.6 Cíle práce	17
<b>2. Metodika</b>	<b>19</b>
2.1 Kultury	19
2.1.1 Pěstování kmenů	19
Izolace a kultivace kmenů	19
2.2. Molekulární analýzy	19
Izolace DNA	19
Amplifikace a sekvenování	20
Klonování	22
Testování přítomnosti heterogenity u kmenů, u nichž sekvenování ukázalo na výskyt pouze jedné varianty ITS2 rDNA	22
Zpracování a alignment sekvencí	23
Fylogenetická analýza	24
2.3 Morfologická analýza	25
Světelná mikroskopie (LM)	25
Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	26
<b>3. Výsledky</b>	<b>27</b>
3.1 Molekulární variabilita komplexu <i>Vischeria/Eustigmatosia</i>	27
Mezerníková oblast - ITS rDNA	27
3.2 Testování přítomnosti heterogenity u kmenů, u nichž při sekvenování ukázalo na výskyt pouze jedné varianty ITS2 rDNA	31
3.3 Sekundární struktura ITS2 rRNA	31
3.4 Gen kódující velkou podjednotku enzymu RUBISCO <i>rbcL</i>	33
3.5 Morfologická variabilita kmenů	34
3.6 Morfologické charakteristiky vybraných kmenů	37
<b>4. Diskuse</b>	<b>44</b>
4.1 Molekulární variabilita	44
4.2 Revize sbírkových kmenů provedené na základě morfologických a fylogenetických analýz	50
4.3 Morfologická a genetická vzdálenost	55
4.4 Intragenomová heterogenita ITS2 rDNA	55
<b>5. Závěry</b>	<b>60</b>
<b>6. Použitá literatura</b>	<b>61</b>
<b>7. Přílohy</b>	<b>68</b>

# 1. Úvod

## 1.1 Stručná charakteristika třídy Eustigmatophyceae

Třída Eustigmatophyceae je nepříliš známá skupina, která tvoří samostatnou linii v rámci heterokontních řas (Ochromyza, Stramenopiles) (např. Andersen 1998, 2004, Riisberg et al. 2009, Yang et al. 2011). Naše znalosti o této skupině řas jsou stále ještě nedostatečné. Jedná se o relativně malou skupinu v současnosti itající dvanáct rodů a více než dvacet druhů (Eliáš & Neustupa in press, Píbil et al. 2012). V jejich zástupci této třídy jsou jednobuněčné kokální řasy, které žijí buď jednotlivě, nebo vytvářejí malé kolonie. Vyskytují se převážně v terestrickém a sladkovodním prostředí a předpokládá se, že tato skupina řas vznikla právě v něm z těchto dvou prostředí (Eliáš & Neustupa in press). Některé zástupce obývá mořský plankton a jeden blíže neurčený eustigmatofyt dokonce žije symbioticky uvnitř sladkovodní řivořivé houby (Frost et al. 1997). Tyto organismy tedy nacházíme v poměrně širokém spektru habitatů, nikdy však netvoří dominantu daného společenstva řas.

V první polovině minulého století byly tyto organismy na základě typu stélky klasifikovány jako zástupci řádu Heterococcales v rámci heterokontních řas (Heterokonten) (Pascher 1939). Na počátku sedmdesátých let pak Hibberd & Leedale (1971) detailně zkoumali dvacet rodů kokálních zástupců xantofytních řas. Tito autoři zjistili, že některé zkoumané druhy mají zcela odlišnou strukturu buněk nežli buď ostatních druhů tradičně řazených do třídy Xanthophyceae (Hibberd & Leedale 1971, 1972). Nejvýznamnějším a nejvýraznějším znakem byla přítomnost pyrenoidu ve vegetativních buňkách a extraplastidiálního stigmatu v zoosporách. Tento objev vedl tyto autory k tomu, aby ustanovili zcela novou třídu Eustigmatophyceae (Hibberd & Leedale 1971). Odlišnost mezi oběma třídami byla později podpořena výsledky studií pigmentového složení plastidu (Whittle & Casselton 1975). Zástupce obou skupin lze navíc rozlišit pomocí fuchsinového barvení buněčných stěn (Neustupa 2002).

Velký pokrok v taxonomii eustigmatofytních řas nastal na počátku osmdesátých let. Hibberd (1981) provedl revizi veškeré do té doby známé diverzity eustigmatofytních řas. Jeho doposud platné systematické schéma zahrnuje jeden řád (Eustigmatales) a čtyři čeledi. Jednotlivé čeledi byly rozlišeny na základě přítomnosti či absence zoospor, podoby, tvaru buněk a presence či absence slizu. Tento systém však neodpovídá příbuzenským vztahům v rámci eustigmatofyt (Eliáš & Neustupa in press). Nové schéma, zjištěné na základě molekulárně-fylogenetických analýz, zahrnuje dva řády a několik nových definovaných čeledí.

Jednou z nov zji- t ných linií je *Vischeria* klade, který zahrnuje rody *Vischeria* a *Eustigmatos*, které byly v p vodním Hibberdov systému (Hibberd 1981) klasifikovány jako zástupci eledi Eustigmataceae. Do této linie pat í krom t chto rod také *Pseudocharaciopsis minuta* (UTEX 2113), *Ellipsoidion* spp. a n kolik doposud nepopsaných organism (Eliá- & Neustupa in press), které byly izolovány ze sladkovodního planktonu (Prior et al. 2009). Srovnávací morfologické studie na n kolika druzích ukázaly, fle se u v-ech zkoumaných druh vyskytuje polygonální pyrenoid, který vybíhá mimo plastid a je k n mu p ipojen pouze pomocí krátké stopky (Hibberd & Leedale 1972). Fi-erová (2012) pozd ji potvrdila, fle polygonální pyrenoid je unikátním znakem *Vischeria* kladu. Pyrenoid se v-ak b hem flivotního cyklu vyvíjí, a proto ho v n kterých bu kách v ur ítém stádiu nemusíme pozorovat (Fi-erová 2012, Santos 1996).

## 1.2 Rody *Vischeria* a *Eustigmatos*

*Vischeria* a *Eustigmatos* pat í mezi nejhojn j-í zástupce eustigmatofytních as (Hibberd 1981). Oba rody obývají terestrické habitaty, zároveň pat í k nej ast ji nalézaným zástupc m této t ídy v tomto prost edí (osobní pozorování). Vyskytují se v povrchových vrstvách p dy (Ettl 1978, Ettl & Gartner 1995, Khaybullina et al. 2010, Neustupa & N mcová 2001) a ventarolách (Tkaloud 2009) temperátního klimatu. Jejich výskyt byl zaznamenán také na rozkládajícím se d ev a borce strom tropických ekosystém (Neustupa & Tkaloud 2010). N které kmeny t chto rod byly izolovány také ze sladkovodních tekoucích vod (Poulton 1930). D vod, pro byly n které druhy nacházeny v plaveckých bazénech, je patn p sobení v tru, který nese áste ky p dy (Hibberd 1981).

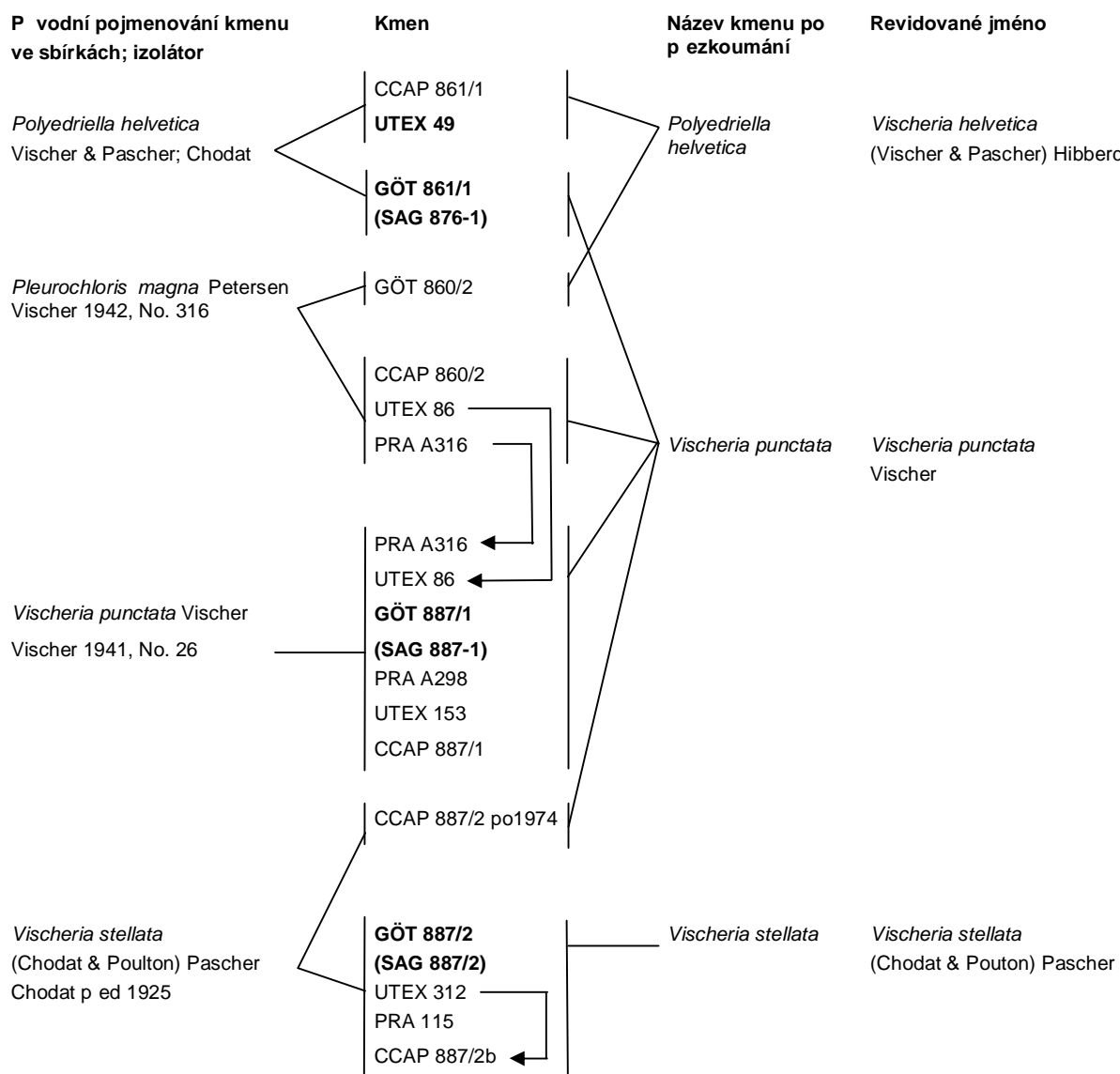
Vedle ekologických studií se na tyto rody zam ílo n kolik morfologických studií, a to zejména ty, které se soust edily na prozkoumání ultrastruktury bun k (Santos & Leedale 1991, 1992, Santos et al. 1996). Existuje také n kolik studií, které u n kterých druh tohoto komplexu zkoumaly obsah biochemicky zajímavých látek (Volkman et al. 1998, Volkman et al. 1999a, b). Zajímavým zji- t ním bylo, fle slofení t chto látek je podobné t m, jaké známe u mo ských zástupc eustigmatofyt. Ti jsou významní p edev-ím z biotechnologického hlediska. ada druh je pr myslov vyuffívána pro produkci tzv. omega-3 mastných kyselin, které jsou nezbytné pro vývoj lov ka, zejména v ranné fázi vývoje (Innis 1992).

Sou asná taxonomie na rodové úrovni je založena na morfologii vegetativních bun k. Hibberd (1981) považuje strukturu povrchu bun k za klí ový znak pro rozli- ení t chto dvou rod . Zatímco *Vischeria* má bun ný povrch modelovaný do podoby výr stk a hran r zného tvaru, *Eustigmatos* vytvá í bu ky pouze hladké. Nicmén jak ukázaly n které studie,



v kulturách rodu *Vischeria* se velmi často nacházejí bučky s hladkou buněnou stěnou, které jsou morfologicky totožné s bučkami rodu *Eustigmatos* (Poulton 1930, Hibberd 1981, Neustupa & Němcová 2001, Pascher 1939). Fakt, že mezi těmito dvěma rody nemusí existovat tak ostré hranice, podporují také výsledky srovnávacích analýz 18S rDNA. Ty naznačují, že na molekulární úrovni jsou oba rody velmi blízce příbuzné (Andersen et al. 1998). Výsledky několika předchozích studií tedy vedly k tomu, že jsem se na problematiku diverzity v rámci komplexu rodů *Vischeria/Eustigmatos* zaměřila ve své diplomové práci.

**Tab. 1.** Tabulka kmenů klastru rodů *Vischeria/Eustigmatos*, které studoval Hibberd (1981). Kmeny pocházejí ze tří sbírek - Cambridge (CCAP), Texas (UTEX), Göttingen (GÖT), která má dnes zkratku SAG a Praha (PRA) se svou zkratkou CAUP. V závorce je vždy uvedena zkratka kmene, jak je v současné době uvedena ve sbírkách. Typicky znázorňuji, že uvedená kultura přerostla kulturou jinou. Tu jsou vyznačeny kultury, které jsem využívala ve své práci. Upraveno podle Hibberd (1981).



Tab. 1. pokračování

P vodní pojmenování kmenu ve sbírkách; izolátor	Kmen	Název kmenu po zkoumání	Revidované jméno
<i>Pleurochloris commutata</i> sensu Vischer Vischer 1940, No. 241	CCAP 860/1a GÖT 860/1 PRA A295 UTEX 310	<i>Pleurochloris commutata</i>	<i>Eustigmatos vischeri</i> Hibberd
<i>Pleurochloris commutata</i> sensu Vischer Flint před 1974, No. 27	CCAP 860/1b		
<i>Pleurochloris magna</i> Petersen Flint, před 1974, No. 32	CCAP 860/4	<i>Pleurochloris magna</i>	<i>Eustigmatos magnus</i> (Petersen) Hibberd

### 1.3 Taxonomie a charakteristika rodu *Vischeria*

Rod *Vischeria* byl původně popsán jako zástupce skupiny organismů, které Pascher nazval Heterokonten (Pascher 1939). Pascher tento rod pojmenoval podle švýcarského algologa Wilhelma Vischera. Tento rod se vyznačuje kulovitými buňkami, jejichž povrch je tvořen výrůstky s známkou charakteru od malého po tu relativně velkých kulovitých výrůstky až po velké množství výrůstky ve tvaru kufle.

Typovým druhem tohoto rodu je *Vischeria stellata* (Chodat ex Poulton) Pascher (Obr. 1b). Tento druh byl původně popsán Poultonem pod jménem *Chlorobotrys stellata* (Poulton 1925). O pár let později vyizoloval Chodat (1930) tento druh z povrchu kamenů na dně potoka na několika místech v Connecticutu. Vyizolované buňky měly typický stelátní tvar a často se sdružovaly pospolu. Jednotlivé kmeny kultivoval a pozoroval, ale buňky kultivovaných kmenů jen zřídka vytvářejí typické výrůstky, většina buněk má hladkou buněnou stěnu. Ve své práci také uvádí, že se mu u fládného kmene nepodařilo pozorovat cysty nebo dokonce zoospory.

Stejný druh pozoroval v padesátých letech také Adolf Pascher, významný německý algolog, který působil také v prostorách naší fakulty (P F UK). Pascher (1939) vylenil pro tento organismus samostatný rod *Vischeria* a klasifikoval jej jako zástupce Polyedrielleae v rámci řádu Pleurochloridaceae (Heterococcineae, Heterokonten). Do tribu Polyedrielleae řadil zástupce s kulovitým, polyedrickým i miskovitým tvarem vegetativních buněk, které mají zvláštní skulpturu buněného povrchu. Ten je charakteristický přítomností vyboulenin, které mohou být navzájem propojeny, a buňka díky tomu získá mnohostěnný tvar. Pro takovéto buňky, které mají na povrchu malé množství výrůstků a díky tomu polygonální tvar, Pascher vymezil samostatný rod *Polyedriella*. Nicméně rozdíl mezi výrůstky u rodu

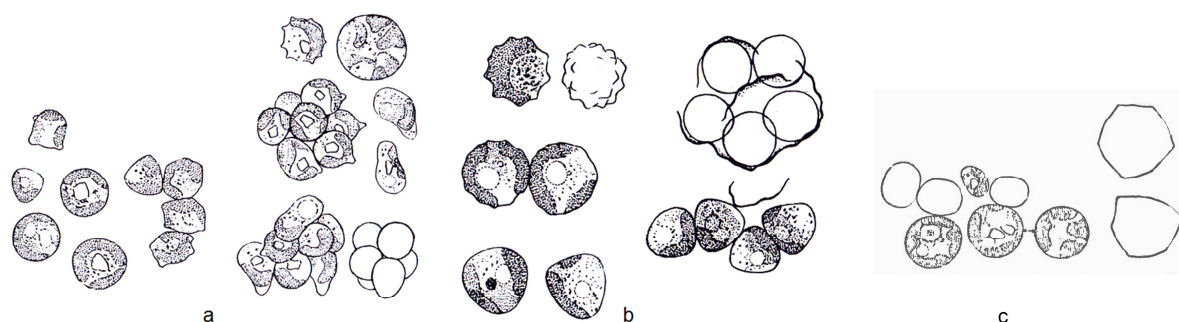
*Vischeria* a vybouleninami u rodu *Polyedriella* je pouze otázkou míry tohoto fenotypového znaku (Pascher 1939).

Vedle druhu *Vischeria stellata* Pascher do rodu *Vischeria* adil je-t dalších dev t nov popsaných druh tohoto rodu (Obr. 2) ó *V. globbosa*, *V. tetraedroides*, *V. regulalis*, *V. gemma*, *V. undulata*, *V. aster*, *V. aculeata*, *V. torta* a *V. rimoso* (Pascher 1939). Pascher v-ak ve své monografii (Pascher 1939) u t chto druh vykreslil pouze vn j-í obrisy, ne v-ak vnit ní strukturu bun k. Nane-t stí ve ve ejných sbírkách asových kultur neexistují fládné kultury t chto druh . Navíc, pouze n kolik t chto druh bylo vzácn , pokud v bec, od doby svého popisu pozorováno v p írod (Ettl 1978). Potvrzení existence t chto druh by vyfladovalo znovunalezení a izolaci t chto druh do kultur a jejich následné detailní p ezkoumání pomocí kombinace tradi ních a molekulárn -fylogenetických metod.

Dal-í druh popsal v první polovin minulého století Vischer (1945). Tento algolog se zabýval floristikou p dních as ve Tšvýcarském Národním Parku (Schweizerischen Nationalpark). Mezi nalezenými asami byl organismus, který vypadal jako p echodná forma mezi druhy *Vischeria stellata* a *Polydriella helvetica* na jedné stran a perfektn kulatými bu kami *Pleurochloris* spp. na stran druhé. Na základ detailních pozorování kultur pomocí sv telného mikroskopu Vischer p i adil tento druh do blízkosti prvn zmín ného druhu. Na rozdíl od n j se v-ak v kulturách tohoto druhu, který popsal jako *Vischeria punctata* (Obr. 1b), vyskytovala v t-ina bun k s hladkou bun nou st nou. Pouze malá ást bun k m la výr stky. Pozd ji v kulturách našel také bu ky, které m ly polyedrický tvar a výr stky na povrchu byly nepravideln uspo ádané. Ettl (1978) odli-nosti mezi ob ma druhy neuznával a do druhu *Vischeria stellata* zahrnul také druh *Vischeria punctata*. Hibberd (1981) v-ak usoudil, že mezi ob ma druhy existují zjevné rozdíly a kařdý druh tedy vy lenil samostatn . Pozoroval, že v t-ina bun k druhu *Vischeria punctata* má malou velikost (7-9  $\mu\text{m}$ ). V kulturách byly polygonální bu ky p ítomny velmi z ídka, a pokud takovouto bu ku vid l, tak se vřdy jednalo o bu ky nejmen-í velikosti (6,25-7,5  $\mu\text{m}$  v pr m ru). Tyto bu ky byly výrazn men-í neř kulovité bu ky stejné kultury. Takovýto velikostní rozdíl mezi sférickými a polygonálními bu kami odli-uje druh *Vischeria punctata* od ostatních druh stejného rodu. Naopak u druhu *Polyedriella helvetica* je mofné pozorovat, že bu ky s výr stky mají podobnou velikost jako bu ky s hladkým povrchem (Hibberd 1981).

Hibberd (1981) na po átku osmdesátých let zkoumal n které sbírkové kmeny, které se na základ d ív j-ích studií zdály být zástupci t ídy Eustigmatophyceae. Na základ detailních pozorování se rozhodl popis rodu *Vischeria* roz-í it a vymezit ho tak, že nyní zahrnuje eustigmatofyta s izodiametrickým tvarem bun k a bun nou st nou, která je modelována do

podoby výr stky nebo h eben . P e adil do n j jeden ze t í druh rodu *Polyedriella*, konkrétn druh *Polyedriella helvetica* Vischer et Pascher, kterou ufl sám Pascher považoval za blízce p íbuznou rodu *Vischeria*. Rozdíl vid l v tom, fle pouze malé množství bun k m lo polyedrický tvar nebo výr stky na povrchu (Pascher 1939). Hibberd (1981) vymezil tento druh stejným zp sobem jako Pascher. Krom toho také pozoroval, fle bu ky tohoto druhu byly o trochu v t-í nefl bu ky *Vischeria stellata* a *Vischeria punctata*. Také pyrenoid byl u t chto bun k v t-í nefl tomu bylo u zbylých dvou druh .

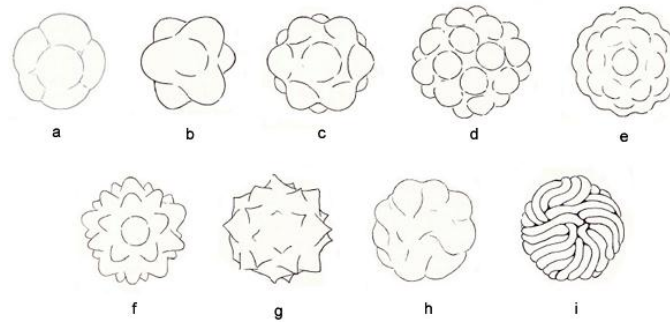


**Obr. 1.** *Vischeria* spp. a: *Vischeria punctata*; b: *Vischeria stellata*, c: *Vischeria helvetica*. Upraveno podle Ettl & Gartner (1995) a Vischer (1945)

Hibberd (1981) studoval kmeny vybraných eustigmatofytních a xantofytních zástupc , které pocházely z r zných asových sbírek. Izoláty jednoho kmenu byly postupn p evezeny do n kolika sv tových asových sbírek a ulofeny pod kódem dané sbírky. Hibberdovo porovnání t chto kmen poukázalo na zna né nesrovnalosti mezi p vodním ur ením kmenu a jeho vlastními pozorováními (Tab. 1). Za p í inu tohoto jevu je považována chyba p i p eo kování kultur a v jednom p ípad také ztráta a následné nahrazení tohoto kmene kulturou jiného rodu.

Morfologické znaky, na základ kterých jsou v sou asné dob rozli-eny jednotlivé druhy, v-ak nejsou zcela jednozna né a dosta ující. Zatímco druh *Vischeria stellata* lze podle sou asné klasifikace rozli-ít na základ velkého množství bun k, které mají rovnom rn distribuované kufelovité výr stky na povrchu, u dvou dal-ích druh (*V. punctata* a *V. helvetica*) by m la být p ítomnost takovýchto bun k vzácná a jejich bu ky by m ly mít polygonální tvar. Nicmén , jak ufl bylo napsáno vý-ě, také v kultu e druhu *Vischeria stellata* m feme nalézt hladké kulovité bu ky, stejn tak jako ty polyedrické (Hibberd & Leedale 1972).

Lilia M.A. Santos s kolegy se v n kolika studiích zam íla na ultrastrukturální charakterizaci zoospor a vegetativních bun k tohoto rodu (Santos & Leedale 1991, Santos & Leedale 1992, Santos et al. 1996). Zoospory jsou jednobi íkaté, lahvicovitého tvaru a nerozli-íitelné od t ch, jaké známe u rodu *Eustigmatos*.



**Obr. 2.** Dal-ích dev t druh ů rodu *Vischeria*. a: *Vischeria globbosa*; b: *Vischeria teraedroides*; c: *Vischeria regularis*; d: *Vischeria gemma*; e: *Vischeria undulata*; f: *Vischeria aster*; g: *Vischeria aculeata*; h: *Vischeria torta*; i: *Vischeria rimosa*. Upraveno podle Pascher (1939).

#### 1.4 Taxonomie a charakteristika rodu *Eustigmatos*

*Eustigmatos* je typovým rodem t ídy Eustigmatophyceae (Hibberd 1981). Do tohoto rodu pat í organismy p vodn klasifikované do rodu *Pleurochloris*. Typovým druhem tohoto rodu je *Pleurochloris commutata*, který popsal Pascher ve dvacátých letech minulého století (Hibberd 1981). Pascher tento rod adil do tribu Pleurochlorideae, který je p íbuzný tribu Polyedrielleae, do kterého podle tehdej-í klasifikace pat íla také *Vischeria*. Pascher druh *P. commutata* popsal jako organismus, který má uvnit bun k (3-7  $\mu\text{m}$ ) kulovitého aíl oválného tvaru jeden miskovitý plastid; a hru-kovité zoospory se dv ma heterokontními bi íky a bez sv tlo ivné skvrny. Vischer (1945) pozd ji izoloval kmen, o n mfl se na základ charakteru vegetativních bun k domníval, fle jde o tentýfl druh, jaký popsal Pascher. Dal-í studie provedené na tomto kmenu v-ak ukázaly, fle zoospory mají lahvicovitý tvar, jeden bi ík na p edním konci a nápadné stigma umíst né mimo plastid (Hibberd & Leedale 1972). Vischer v izolát byl z ejm zcela jiný organismus nejl jaký popsal Pascher. Vzhledem k tomu, fle Vischer v kmen neodpovídal fládnému z do té doby známým taxon m, Hibberd (1981) pro n j vytvo il nové druhové jméno v nov ustanoveném rodu a nazval ho *Eustigmatos vischeri* (Obr. 3f).

Transfer tohoto organismu do jiného taxonu v-ak nebyl p íli- p ekvapivým ínem, proto fle sám Pascher (1939) zd raznil, fle vymezení skupiny Pleurochloridaceae, Pleurochlorideae, ale i samotného rodu *Pleurochloris* je um lé a provizorní. P ípustil, fle

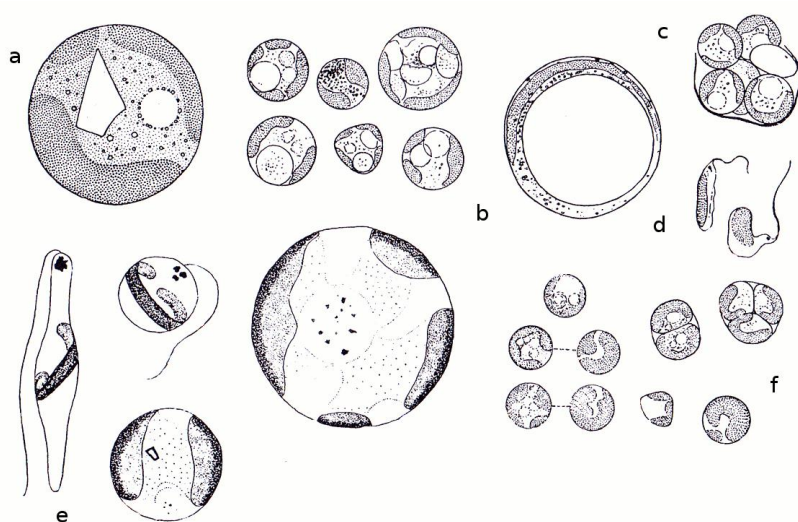
naposledy zmíněný taxon zahrnuje organismy sice s podobnou stavbou buněk, avšak vzájemně nepříbuzné, a jeho pojmenování se stane kvůli tomu asi nepoužívané.

Taxonomická pozice rodu *Pleurochloris* je však stále nejasná (Hibberd 1981). Na které znaky by sice mohly naznačovat jeho pozici v rámci třídy Eustigmatophyceae, avšak zcela klíčový znak, jakým je přítomnost extraplastidiálního stigma v zoosporách, pozorován nebyl. Dvoubířkaté zoospory jsou u eustigmatofyt zatím známy pouze u rodu *Botryochloropsis*, koloniálního sladkovodního rodu, jeho buňky jsou obaleny vrstvou slizu. Jeho pozice ve fylogenetickém stromu eustigmatofyt zůstává doposud neznámá (Eliáš & Neustupa in press). Takovéto zoospory se vyskytují také u dvou druhů rodu *Pseudocharaciopsis*, které mají oválný tvar buněk a pomocí krátké stopky jsou připojeny k substrátu. Předpokládá se, že tento rod je polyfyletický (Eliáš & Neustupa in press), u obou druhů bylo v zoosporách pozorováno extraplastidiální stigma (Hibberd 1981). Teprve opětovné nalezení druhu *Pleurochloris commutata* a jeho podrobnější studium by mohlo ukázat, zda rod *Pleurochloris* budeme dle taxonomických pravidel přidat k eustigmatofytům.

Nejmenším druhem je *Eustigmatos vischeri* Hibberd (Hibberd 1981). Relativně malá velikost buněk ho odlišuje od ostatních druhů stejného rodu. Velikost buněk se pohybuje mezi 7-9 μm, nikdy však nedosahuje velikosti 20 μm, jako tomu může být u dalších dvou druhů.

Nejtěsněji velikosti dosahují buňky druhu *Eustigmatos magnus* (Petersen) Hibberd (Obr. 3a-d). Tento druh byl převeden z rodu *Pleurochloris magna* Petersen do nově zřízeného rodu *Eustigmatos* Hibberd potom, co se ukázalo, že zoospory tohoto organismu jsou jednobířkaté, lahvicovitého tvaru a mají stigma na předním konci buňky (Hibberd 1981). Vischer (1945) vyizoloval z předního vzorku kmen, který porovnal s Petersenovým kmenem. Věnoval si, že velké buňky jeho izolátu jsou větší než ty, jaké zaznamenal Petersen při popisu tohoto druhu. Studium Vischerova izolátu odhalilo, že se v kultuře vyskytuje velká proporce buněk polyedrického tvaru, jaký známe u rodu *Vischeria* (Hibberd & Leedale 1972). Autoři zmíněné studie zvažují, že přítomnost těchto buněk v kultuře může být výsledkem působení určitých podmínek, za kterých tento druh může produkovat buňky takového tvaru. Hibberd (1981) zvažuje, že původní Vischer v kmen druhu *Pleurochloris magna* musel být ztracen a nahrazen kmenem druhu *Vischeria punctata*, která byla izolována a popsána ve stejnou dobu (Vischer 1945). Jak je znázorněno v Tab. 1., tak k této události zřejmě došlo ve dvou časových sbírkách (dnešní CAUP a SAG). Hibberd (1981) na druhé straně připouští také možnost, že druh *Eustigmatos magnus* má schopnost vytvářet tvar buněk typický pro *Vischeria punctata*. Petersen ani Vischer tak nemuseli tyto buňky vůbec pozorovat, nebo je mohli přehlédnout.

Velké buky je schopen vytvářet také *Eustigmatos polyphem* (Pitchmann) Hibberd. Tento druh byl stejně tak jako *Eustigmatos magnus* původně klasifikován do rodu *Pleurochloris* v rámci třídy Xanthophyceae. Pitchmann ho na konci šedesátých let vymezil primárně na základě charakteru zoospor, které byly v té době neznámé u ostatních druhů stejného rodu a měly také jiný tvar. Ettl (1978) rozdělil mezi tyto dva druhy neuznával a druh *Pleurochloris polyphem* ztotožnil s druhem *Pleurochloris magna*. Hibberd (1981) později kultivoval oba druhy při stejných podmínkách a zjistil, že je mezi nimi významný velikostní rozdíl. Bučky druhu *Eustigmatos polyphem* (Obr. 3e) jsou celkově menší (11-15 μm) nežli tomu bývá u druhu *Eustigmatos magnus* a pouze velmi vzácně dosahují velikosti v té době nejlépe 20 μm (Hibberd 1981).



**Obr. 3.** *Eustigmatos* spp. a, b, c, d: *Eustigmatos magnus*; e: *Eustigmatos polyphem*; f: *Eustigmatos vischeri*. Upraveno podle Ettl & Gartner 1995.

### 1.5 Molekulární markery používané na druhové úrovni

Mezerníková ribozomální DNA (ITS rDNA) je u mnoha skupin organismů jedním z nejčastěji používaných genetických markerů pro rekonstrukci fylogeneze na druhové úrovni. Tato oblast je nejvariabilnějším úsekem jaderné rDNA, který zahrnuje konzervované geny pro 18S (SSU) a 28S (LSU) a 5.8S rDNA (Coleman et al. 1994). Celá jednotka je pak transkribována najednou. ITS rDNA se skládá ze dvou samostatných částí: ITS1, který navazuje na 3' konec SSU rDNA a ITS2 připojený k 5' konci LSU rDNA. Mezi ITS1 a ITS2 se nachází 5.8S rDNA. Přítomnost konzervovaného 5.8S rDNA genu umožnila tvorbu alignmentu mezi odlišnými organismy, ověřením totožnosti získané sekvence a detekci případné kontaminantní DNA (Coleman et al. 1994, Coleman 2003). To, že jaderná rDNA

obsahuje jak vysoce konzervativní, tak vysoce variabilní úseky, má řadu výhod. Přítomnost konzervovaných úseků umožňuje použití universálních primerů, které v těchto oblastech iniciují amplifikaci. Variabilní oblasti zase poskytují informaci o fylogenetických vztazích na nižších taxonomických úrovních. Nespornou výhodou je také to, že fylogenetické analýzy založené na ITS rDNA jsou čím dál více využívány (Ávarez & Wendel 2003).

Jednotlivé ribozomální DNA jsou v typickém eukaryotickém genomu uspořádány v mnoha kopiích tandemově za sebou (Coleman 2003), avšak v mikronukleárním genomu nálevníka *Tetrahymena pyriformis* byla zjištěna tato kopie pouze jedna (Yao & Gall 1977). Tento případ je ale zcela výjimečný. Skutečnost, že se v genomu vyskytuje několik stovek kopií tohoto úseku, usnadňuje jeho amplifikaci pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Dlouhou dobu se předpokládalo, že ribozomální geny jsou subjektem tzv. concerted evolution, která zajišťuje, že jsou jednotlivé kopie více či méně identické. To je způsobeno procesem genové konverze, která způsobuje, že jednotlivé paralogy, z nichž každá akumuluje mutace nezávisle na ostatních, budou časem homogenizovány. Všechny kopie tedy budou mít identickou sekvenci. S takovou rDNA potom můžeme zacházet jako se single copy genem. Homogenizace způsobená eliminací variability mezi paralogy však nemusí být dostatečně efektivní a ribozomální DNA je díky tomu zatížena značným vnitrogenomovým polymorfismem (Ávarez & Wendel 2003).

Mezi paralogy se může vyskytovat délkový polymorfismus (inzerce-delece), což spolu s častými substitucemi znemožňuje určení sekvence pomocí sekvenování PCR produktu. Tento problém je potom nutné řešit klonováním produktu amplifikace do bakteriálních vektorů a sekvenováním samostatných klonů (např. Beszteri et al. 2005, Casteleyn et al. 2009, D'Álelio et al. 2009, Gribble & Anderson 2007, Hart et al. 2007).

Mezerníková oblast (ITS1 a ITS2 rDNA) jsou v jadérku vystihovány z RNA transkriptu, nejsou tedy součástí ribozomu (Coleman 2007). Sekundární struktura těchto úseků však hraje důležitou roli při jejich vyřiznutí. ITS2 sekvence jsou přítomněn méně variabilní než ITS1 sekvence. ITS2 je díky tomu v mnoha studiích využíván. Obsahuje totiž konzervativní úseky, které jsou nezbytné pro vytvoření sekundární struktury, což kromě jiného napomáhá rekonstrukci alignmentu. V těchto úsecích jsou substituce velmi vzácné, a pokud k nim dochází, nemohou by ovlivnit výslednou sekundární strukturu. Takovéto změny se označují CBC (Compensatory Base Changes), pokud k těmto změnám dochází na dvou od sebe vzdálených (v primární struktuře) místech a je zároveň zachováno párování těchto míst v sekundární struktuře. Jednostranné změny zachovávající párování (A-U na G-U a naopak; G-C na G-U a naopak) označujeme jako hemiCBC. U mnoha skupin organismů bylo



prokázáno, že přítomnost CBC v ITS2 rDNA je korelovaná s reprodukční izolací mezi studovanými organismy (Amato et al. 2007, Coleman 2000, Pouliková et al. 2010). Nicméně, to neznámá, že by byly CBC příinou speciace (Schultz & Wolf 2009). Jejich přítomnost pouze naznačuje, že během doby, kdy se sekvence ITS2 rDNA vyvíjely a vytvořily se CBC, došlo u předků zkoumaných organismů ke speciaci. CBC jsou tak dobrým kritériem pro rozlišení druhů (Müller et al. 2007), jejich absence však reprodukční kompatibilitu nezaručuje (Caisová et al. 2011).

Vedle jaderných markerů se hojně využívají také organelární molekulární markery. Z mitochondriálního genomu jde ve většině případů o gen *cox1*, který kóduje podjednotku cytochrom c oxidázy (Evans et al. 2007), z plastidového genomu jde o gen, který kóduje velkou podjednotku enzymu RUBISCO. Nespornou výhodou těchto markerů je především to, že: (1) jde o proteinkódující geny; (2) v genomu se vyskytují pouze v jedné kopii, což přechází problémům spojených s vnitrogenomovou variabilitou těchto úseků a (3) v případě plastidových genů se snižuje pravděpodobnost amplifikace DNA z případné kontaminace houbami i bezobratlými (Evans et al. 2007, Sonnesberg et al. 2007). Jejich nevýhodou však může být to, že kvůli relativně dlouhým sekvencím je k sekvenování celých těchto úseků nutné použít vnitřní primery (Amato et al. 2007, Prior et al. 2009).

Gen *rbcL* může být v některých případech variabilnější než jaderná ITS rDNA. U rozsivek v komplexech *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* a *P. delicatissima* bylo prokázáno, že jedinci stejného biologického druhu, vymezeného na základě sekvencí ITS2 rDNA a křížících pokusů, mohou mít rozdílné *rbcL* sekvence (Amato et al. 2007).

Rod *Nannochloropsis* je nejprostudovanějším zástupcem eustigmatofytních řas. Některými studiemi naznačeno, že z důvodu jednoduché stavby buněk by měl být pro diskriminaci druhů tohoto rodu užíván molekulární druhový koncept (Andersen et al. 1998, Krienitz et al. 2000). Přestože byly k tomuto účelu doposud využívány sekvence 18S rDNA (Andersen et al. 1998, Krienitz et al. 2000, Fawley & Fawley 2007, Prior et al. 2009), práce autorů Suda et al. (2002) ukazují, že substituční rychlost *rbcL* genu je více než třikrát větší než v případě 18S rDNA genu. To tedy znamená, že 18S rDNA není dostatečná pro stanovení hranic mezi druhy. Namísto ní by měl být použit variabilnější marker, jakým se v tomto případě ukazuje být *rbcL* (Fawley & Fawley 2007, Prior et al. 2009, Suda et al. 2002).

## 1.6 Cíle práce

Hlavním cílem této práce je pokusit se zodpovědět otázku na to, zda jsou asné taxonomické pojetí blízkých rodů *Vischeria* a *Eustigmatos*, které je založeno

výhradně na morfologických znacích vegetativních buněk, odpovídá skutečné diverzitě těchto dvou rodů. Snáhla jsem se zjistit, zda dva rody definované na základě povrchového charakteru buněk, vytvářejí samostatné monofyletické linie. Pro tyto účely jsem měla k dispozici sbírkové kmeny a zjistila, zda všechny kmeny určené do určitého druhu spadají na základě molekulárně-fylogenetických analýz do jedné samostatné evoluční linie. To by tedy znamenalo, že se ve sbírkách vyskytuje právě šest v současné době uznávaných druhů. Dále jsem zkoumala to, zda kmeny získané vlastní izolací nebo od spolupracovníků, tedy ty, které nebyly určeny do konkrétního druhu, klastrují společně se sbírkovými kmeny, nebo zda alespoň některý z nich vytváří novou linii. V poslední době mě zajímalo, zda je možné některé kmeny identifikovat s druhy rodu *Vischeria*, které popsal ve třicátých letech Adolf Pascher. Tyto otázky jsem řešila pomocí dvou dnes již běžně používaných metodických přístupů. Nejprve jsem se pomocí dvou variabilních genetických markerů (ITS rDNA, *rbcL*) snažila prozkoumat genetickou diverzitu komplexu rodů *Vischeria/Eustigmatos*. Snažila jsem se také zjistit, zda změně genetické variability odpovídá variabilita morfologická. Případná korelace mezi nimi by totiž znamenala, že k determinaci rodu nebo druhu můžeme využít tradiční morfologický přístup.

## 2. Materiál a metody

### 2.1 Kultury

**P vod kmen .** Menší část kmen , které byly použity v této studii, pochází z –estí –asových sbírek: Culture Collection of Algae at the University of Göttingen (SAG); Culture Collection of Algae of Charles University in Prague (CAUP); Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin (UTEX); Culture Collection of Algae and Protozoa in Agryll (CCAP); Culture Collection of Marine Phytoplankton (CCMP); a Culture Collection of Algae at the Botanical Institute of the University at Innsbruck (ASIB). Tyto kmeny zahrnují také p t typových kmen . V t–ina kmen byla získána vlastní izolací z p írodního materiálu nebo od tuzemských a zahrani ních spolupracovník . P ehled v–ech studovaných kmen je uveden v Tab. S1 v P íloze.

**Izolace a kultivace kmen .** V laborato i jsem část nasbíraného p írodního materiálu (p da, borka strom ) p enesla pomocí vysterilizované pinzety do sterilní mikroskopavky, do níž jsem p idala vysterilizované balontinky (pr m r 0,5 mm) a sterilní destilovanou vodu. Sm s jsem zvortexovala a nanesla na Petriho misky s pevným BBM médiem obohatým dvojnásobným množstvím dusí nanu (<http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media.html#BBM>). Sm snou kulturu jsem kultivovala p i denním osv tlení a laboratorní teplot . Po n kolika týdnech jsem narostlé kolonie as pozorovala pod sv etelným mikroskopem Olympus CX31. Sterilní jehlou jsem izolovala kolonie, jejíž bu ky morfologicky odpovídaly rod m *Vischeria* a *Eustigmatos*. Kmeny jsem kultivovala na –ikmém agarovém BBM médiu p i denním osv tlení a laboratorní teplot nebo v ledni ce p i teplot 15 °C a osv tlení 5-15 mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

### 2.2 Molekulární analýza

**Izolace DNA.** Dostate n narostlé kultury jsem pomocí ísté lopatky se–krábala z agarového média, bu ky jsem poté p enesla do sterilní mikroskopavky, resuspendovala ve sterilní destilované vod e a zkumavku zcentrifugovala. K izolaci genomové DNA jsem použila Invisorb Spin Plant Mini kit (Invitek). Nejprve jsem k bun é hmot v mikroskopavce p idala 100 µl Lysis Buffer a sklen é balontinky (0,5 mm v pr m ru, Sigma). Mikroskopavky jsem poté vlořila do rota ního mlýnku (Retsch Mixer Mill MM200) a nechala –asové bu ky drtit po dobu 5 minut p i 300 otá kách/s. Ke sm si jsem p idala 300 µl

Lysis Buffer a 20  $\mu$ l Proteinkinázy K (Sigma). Dále jsem postupovala podle protokolu p edepsaného výrobcem kitu. Vyizolovanou DNA jsem uchovávala v lednici p i 4 °C.

Koncentrace vyizolované DNA a produkt PCR (polymerázové et zové reakce) jsem m ěla pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Vyizolovanou DNA jsem na edila na koncentraci 5-10 ng/ $\mu$ l, a tu jsem pak pouffila do PCR reakce.

**Amplifikace a sekvenování.** Dva molekulární markery byly amplifikovány pomocí PCR: jaderný úsek ITS1-5.8S-ITS2 rDNA (ITS oblast) a chloroplastový gen *rbcL*. Pro PCR amplifikaci ITS oblasti byly pouffity tyto primery: forward primer ITS-F-Visch (5'-GCGCCGTTGGCTTCTAGCC-3'), specifický pro komplex *Vischeria/Eustigmatos*, a reverse primer ITS4-Eustig (5'-TCCTCCGCTTAGTTATATGC-3'). V n kolika p ípadech jsem jako forward primer pouffila EustigF2 (5'-TGCGTTCAACGAGTTTATAAC-3'). Slofení mastermixu bylo: 15,6  $\mu$ l sterilní Mili-Q vody, 2  $\mu$ l 10x JSTR pufru (Sigma), 1  $\mu$ l hov zího sérového albuminu (BSA; Sigma-Aldrich), 0,4  $\mu$ l dNTP (10  $\mu$ M), 0,25  $\mu$ l každého z primer (25 pmol/ml), 0,5  $\mu$ l JumpStart REDTaq DNA polymerázy (1U/ $\mu$ l; Sigma) a 1 $\mu$ l genomové DNA. Primery byly navrfeny na za átku studie podle dostupných sekvencí 18S rDNA (v p ípad ITS-F-Visch) a 28S rDNA (v p ípad ITS4-Eustig) v databázi GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), na jejichfl koncích, resp. za átcích tyto primery iniciují amplifikaci. Pro amplifikaci byl pouffit termocykler XP (Bioer) s cyklem - po áte ní denaturace: 3 min. p i 94 °C; 35 opakování cyklu: 1 min. p i 94 °C, 1 min. p i 53 °C a 2 min. p i 72 °C; záv re ná elongace: 10 min. p i 72 °C.

Na základ rekonstrukce fylogeneze zalofené na ITS2 rDNA jsem si vybrala kmeny, u nichfl jsem amplifikovala plastidový gen *rbcL*. Kmeny jsem si vybrala tak, aby (1) zastoupení kmen rovnom rn pokrývalo ITS2 rDNA fylogenetický strom a (2) byly zahrnuty typové kmeny. Pro amplifikaci *rbcL* byly pouffity primery: forward eustig-rbcLF (5'-GATCCRATTGAAGCTGC-3') a reverse DPrbcL7 (5'-AAASHDCCTTGTGTWAGTYTC-3'). Slofení mastermixu bylo: 12,6  $\mu$ l sterilní Mili-Q vody, 2  $\mu$ l Gold pufru 10x (Applied Biosystems), 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25  $\mu$ l), 0,4  $\mu$ l dNTP (10 mM), 0,25  $\mu$ l každého primeru, 2  $\mu$ l AmpliTaq GOLD DNA polymerázy (5 U/ $\mu$ l) a 0,5  $\mu$ l genomové DNA. K amplifikaci jsem pouffila termocykler XP (Bioer) cyklem podle Daubjerg & Andersen (1997) - po áte ní denaturace: 3 min. p i 94 °C; 30 cykl : 1 min. p i 94 °C, 1 min. p i 50 °C a 2 min. p i 72 °C; záv re ná elongace: 10 min. p i 72 °C.

Úsp -nost amplifikace byla vyhodnocena elektroforézou na 1% agarózovém gelu v TBA pufru s ethidiembromidem. Unikátní produkty byly p e -it ny pomocí kitu GenElute

PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). V n kterých p ípadech (p i amplifikaci ITS rDNA i *rbcL*) byly vedle produkt s o ekávanou velikostí p ítomny také vedlej-í produkty. V tom p ípad jsem celý objem PCR produktu smíchala se 2 µl 6x Orange DNA Loading Dye (Fermentas) a celé množství jsem nanesla na 1,8% TBE gel s ethidiembromidem. Prouflky, které svou délkou odpovídaly délce cílen amplifikovaného úseku, jsem pod UV lampou istých skalpelem vy ezala. Tyto fragmenty jsem p e istila pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen). Produkty PCR jsem uchovávala v mrazni ce p i teplot -20 °C.

Purifikované produkty byly sekvenovány v Laborato i sekvenace DNA na P F UK (<http://web.natur.cuni.cz/~seqlab>). Primery, pomocí nichfl byly osekvenovány jednotlivé úseky jsou uvedeny v Tab. 2.

Z d vodu neúsp -ného sekvenování genu *rbcL* pomocí primeru EUSrbcL-sF2 jsem si do stejného úseku tohoto genu podle alignmentu sekvencí navrhla primery EUSrbcL-sF3 a EUSrbcL-sR3 (Tab. 2). P ípadnou nefládnoucí tvorbu homodimer jsem otestovala v programu FastPCR v6.1.49 (Kalendar 2009).

**Tab. 2.** Seznam primer poufitych k amplifikaci (PCR) a sekvenaci (SEQ) ITS rDNA a *rbcL*.

Cílová oblast	Název primeru	Sekvence ve sm ru 5'-3'	Orientace	Použití	Zdroj
ITS	ITS-F-Visch	GCGCCGTTGGCTTCTAGCC	F	PCR, SEQ	Eliáz, nepubl.
ITS	ITS4-Eustig	TCCTCCGCTTAGTTATATGC	R	PCR	Eliáz, nepubl.
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	F	SEQ	White et al. 1990
ITS	ITS3N	GATGAAGAACGCAGCGA	F	SEQ	Beck et al. 1998
ITS	ITS2N	TCGCTGCGTTCTTCATC	R	SEQ	Beck et al. 1998
ITS	EustigF2	TGCGTTCAACGAGTTTATAAC	F	PCR	Eliáz, nepubl.
<i>rbcL</i>	eustig-rbcLF	GATCCRATTGAAGCTGC	F	PCR, SEQ	Prior et al. 2009
<i>rbcL</i>	DPrbcL7	AAASHDCCTTGTGTWAGTYTC	R	PCR, SEQ	Daugbjerg & Andersen 1997
<i>rbcL</i>	EUSrbcL-sF1	AACTCWCAACCWTTTCATGCGT	F	SEQ	Eliáz, nepubl.
<i>rbcL</i>	EUSrbcL-sR1	AACGCATGAAWGGTTGWGAGT	R	SEQ	Eliáz, nepubl.
<i>rbcL</i>	EUSrbcL-sF2	ACAAATGCACCAATTACTTAA	F	SEQ	Eliáz, nepubl.
<i>rbcL</i>	NDrbcL8	CCAATAGTACCACCACCAAT	R	SEQ	Daugbjerg & Andersen 1997
<i>rbcL</i>	EUSrbcL-sF3	AATTACCTTGGTGAAGACG	F	SEQ	Procházková
<i>rbcL</i>	EUSrbcL-sR3	CGTCTTCACCAAGGTAATT	R	SEQ	Procházková

**Klonování.** Na základě přímého sekvenování ITS rDNA jsem u nich kterých kmenů (BoF 114, CAUP Q 102, CAUP Q 201, CAUP H 4302, CCALA 514, MarT 13, SAG 876-1, SAG 887-1, ME 24, ATA 2-1 KH-12, ATA 3-4 Q, ATA 11-CQ-CV3, Baikal, BGPZ 6, BGPZ 91, K 1, K 10, GSE 6A, UTEX 49, WBN 7) zjistila vnitrogenomovou heterogenitu. U většiny těchto kmenů jsem byla schopna sekvence jednotlivých variant tohoto úseku odvodit vizuální analýzou sekvenovaných chromatogramů. To bylo možné udělat v případě, kdyby bylo podle chromatogramu zcela zřejmé, že jsou v genomu přítomné pouze dvě varianty. U několika kmenů (CCALA 514, Baikal, UTEX 49) však byla variabilita ITS rDNA mnohem větší, chromatogramy z přímého sekvenování nebyly zřetelné. PCR produkty z těchto kmenů jsem proto klonovala za účelem stanovení míry vnitrokmenové variability, která je v této oblasti jaderné DNA zastává. Při klonování jsem použila p-GEM-T Easy Vector System (Promega). Použila jsem při tom polovinu reakce, než je uvedeno v příloženém výrobním protokolu. Ligaci jsem provedla na dříve namnoženém PCR produktu. Za účelem vyhnutí se případné preferenci amplifikaci jedné konkrétní varianty jsem dva produkty PCR reakce smísila dohromady. Tento postup zvýšil šanci pro zachycení diverzity tohoto úseku v genomu těchto organismů (Griffin et al. 2011). Veškerý objem amplifikace jsem nanasla na 1,8% TBE gel s ethidiembromidem. Prouflky jsem vyčítala stejným skalpelem pod UV lampou a přečítala pomocí kitu MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen).

Transformované kompetentní buňky *E. coli* jsem kultivovala na miskách s agarovým LB médiem obsahujícím antibiotikum ampicilin (Sigma), na které jsem rozetela IPTG a X-gal. Kultivace probíhala 16 hodin při 37 °C v inkubátoru Nüve EN055.

Všechny narostlé kolonie jsem vypichovala párátkem, uložila do stripů s 20 µl sterilní Mili-Q vody, vzorek na 10 min. zdenaturovala při 95 °C a uchovávala v mrazničce při -20 °C. Z každé misky jsem vybrala maximálně pět kolonií (Orsini et al. 2004). Do PCR reakce jsem pak použila 1 µl této suspenze. Plasmidová DNA byla znovu amplifikována kombinací primerů, které byly použity k amplifikaci zaklonovaného PCR produktu. Vyhodnocení úspěšnosti amplifikace, přečištění PCR produktu a sekvenování jsem provedla stejným způsobem jako u produktu z přímé amplifikace.

### **Testování přítomnosti heterogenity u kmenů, u nichž sekvenování ukázalo na výskyt pouze jedné varianty ITS2 rDNA.**

Výsledky sekvenování ITS rDNA ukázaly, že se v genomu některých zástupců komplexu *Vischeria/Eustigmatos* vyskytuje více než jedna varianta ITS2 rDNA. Zároveň sekvenování u

ady kmen ukázalo na přítomnost pouze jedné varianty, i když některé kmeny se stejnou variantou mají kromě této varianty ještě variantu další. Pro účely posouzení přítomnosti další varianty u kmen se zjevně jedinou variantou ITS2 rDNA, jsem si nadesignovala specifické primery pro různé varianty, jejichž přítomnost jsem se pokoušela detekovat tam, kde nebyla patrná na základě sekvenování PCR produktu. V alignmentu sekvencí ITS rDNA jsem vybrala místa, ve kterých se obě varianty jednoho kmene lišily. Primery, které jsem do těchto oblastí nadesignovala, byly specifické právě pro jednu variantu. Pozice, ve kterých se varianty lišily, byly komplementární s 3'-koncem primeru. Při náhodnou neřádnou tvorbu dimerů jsem otestovala v programu FastPCR v6.1.49 (Kalender 2009). Primery jsem testovala na všech kmenech, u kterých dříve sekvenování ukázalo na přítomnost pouze jedné varianty, která se současně vyskytovala u kmene, který měl také druhou variantu, na níž jsem daný primer navrhla.

Pro amplifikaci specifických úseků jsem vždy použila forward primer ITS-F-Visch (Tab. 2) a k němu jeden ze čtyř nově nadesignovaných reverse primerů (Tab. 3). Reakční směs obsahovala stejné komponenty včetně jejich množství jako v případě amplifikace ITS rDNA. Během testování jsem použila pozitivní kontrolu - kmen se specifickou sekvencí ITS2 rDNA, pro níž jsem přisloužný reverse primer navrhla. Tímto způsobem jsem zkontrolovala správný průběh PCR reakce a všech použitých komponent (především genomové DNA). PCR reakce probíhala ve stejném termocykleru a za stejných podmínek jako při ITS rDNA amplifikaci. Výsledek amplifikace jsem zkontrolovala na 1% agarózovém gelu v TBE pufru s ethidiembromidem. Dva produkty úspěšné amplifikace jsem pečlivě čistila a nechala osekvenovat stejným způsobem jako produkty ITS2 rDNA amplifikace.

**Tab. 3.** Přehled primerů, které byly použity při testování specifity ITS2 rDNA sekvencí.

Název primeru	Sekvence ve směru 5'-3'
BoF114maj-ITS	AGGCTCACACGAAGCTTGTTT
ME24maj-ITS	CCTTCAGAGATAGACGGAGGT
CAUP-Q-201maj-ITS	TTCGTCACGTCTATCAGGCAT
WBN7min-ITS	TCGACAGCCATGGAGGTTAAC

**Zpracování a alignment sekvencí.** Získané sekvence byly zobrazeny, zkontrolovány, případně manuálně upraveny v programu FinchTV v1.4.0. (Geospisa). Sekvence genu *rbcL*, které jsem nechala osekvenovat různými primery, jsem sestavila v programu SeqAssem v.09/2004

(Hepperle 2004). Nejednoznané báze s překryvajícími se píky jsem hodnotila podle kritérií: (1) –umu na pozadí, (2) relativní velikostí píků – do velikosti 2/3 majoritního píku jsem považovala daný píků za –um i artefakt sekvenování (Beszteri et al. 2005) a (3) v případě vnitrogenové variability podle bazí okolních píků . Pozice, kde byla přítomnost více bazí pravděpodobná, jsem podle UIPAC kódování nukleových kyselin označila symbolem pro víceznámou bázi. Na přípravu alignment (ITS2 rDNA, *rbcL*) jsem vedle svých vlastních sekvencí použila také již publikované sekvence, které jsem stáhla z celosvětové databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Tyto homologické sekvence byly rozpoznány na základě algoritmu BLAST. Padesátitis (z toho ne všechny byly použitelné) amplicon ITS rDNA mi poskytla ruská biologička, Lira A. Gaysina, která na získání ITS rDNA sekvencí ze svých vlastních kmenů spolupracovala s Markem Eliášem –em bhem stáffe na P F UK v Praze. Sedm ampliconů *rbcL* sekvencí mi pak poskytl Marvin Fawley (podrobnosti viz níže). V programu MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007) byly nalezeny homologní sekvence a pomocí algoritmu ClustalW byl vytvořen alignment. Alignmenty jsem v případě ITS2 rDNA manuálně upravila na základě sekundární struktury vytvořené v programu RNAstructure v5.3 (Reuter & Mathew 2010). Sekundární strukturu byla nezávisle spočítána také v programu MFold v2.3, kdy jsem teplotu sbalení primárního transkriptu do sekundární struktury nastavila na 25 °C (Zuker 2003). Strukturu jsem upravovala v Adobe Photoshop.

**Fylogenetická analýza.** Nezároveň fylogenetický strom byl zrekonstruován pomocí metody maximum likelihood (ML) s použitím nástroje RAxML 7.3.0 (Stamatakis 2006), který je k dispozici na portálu CIPRES ([http://www.phylo.org/sub\\_sections/portal](http://www.phylo.org/sub_sections/portal)). Tato strategie je vysoce efektivní při hledání stromů s nejvyšším likelihoodem (Stamatakis et al. 2008). Jako substituční model pro finální hledání ML byl použit GTRGAMMAI model. Fylogenetický strom byl nalezen také metodou Bayesiánské inference (BI) v programu MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Dva paralelní MCMC (Markov Chain Monte Carlo) běhly po 3 miliony generací; každý s jedním studeným a třemi horkými cíci. Nalezené stromy spolu se souvisejícími parametry byly ukládány každou stou generací. Prvních 7501 stromů bylo odstraneno jako „burn-in“ a posteriorní pravděpodobnosti byly spočítány na základě shody zbývajících stromů . Posteriorní pravděpodobnosti a bootstrapové podpory byly hodnoceny jako: slabé (BI < 0.5, ML < 50 %), střední (BI 0.54-0.94, ML 50-79 %) a vysoké (BI > 0.94, ML > 79 %) (Skaloud & Peksas 2010). Fylogenetický strom jsem zrekonstruovala také pomocí distanční metody neighbour-joining (NJ). Analýzu jsem prováděla v programu MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007). Jako substituční model jsem zvolila



Kimura dvouparametrický model. Bootstrapové hodnoty v tví byly spo ítány na základ 1000 replikací.

Jako outgroup jsem k zako en ní fylogenetického stromu zrekonstruovaném na základ *rbcL* sekvencí pouffila sekvence druh , které náleffí do ádu Eustigmatales stejn tak jako zástupci *Vischeria/Eustigmatos* komplexu (Eliá–, nepubl.). Tyto sekvence mi poskytl m j –kolitel, Marek Eliá–, který na jejich získání spolupracoval s americkým algologem, Marwinem Fawleyem. Konkrétn jde o sekvence kmen : UTEX 86, UTEX 310, UTEX 312, UTEX 153, UTEX 49, CCALA 279, CCALA 514, CAUP H 4302. N které sekvence jsem si stáhla z ve ejné databáze GenBank. Pro zako en ní ITS2 rDNA stromu jsem pouffila metodu midpoint rooting. Fylogenetické stromy jsem zobrazila v programu FigTree v.1.3.1 (Rambaut 2009) a graficky upravovala v Adobe Illustrator CS3.

### 2.3 Morfologická analýza

**Sv telná mikroskopie (LM).** Na základ fylogenetických analýz ITS2 rDNA sekvencí jsem vybrala kmemy, na kterých jsem provedla morfologickou analýzu. Kmeny jsem vybrala tak, aby (1) byla dostate n pokryta genetická diverzita komplexu *Vischeria/Eustigmatos* a (2) bylo zahrnuto v–ech p t typových kultur, které jsou k dispozici. Analyzované kmemy tedy byly geneticky odli–né. Pro srovnání jsem v–ak zahrnula n kolik kmen s identickou sekvencí ITS2 rDNA.

Tyto kmemy jsem kultivovala ve zkumavkách s erstv p ipraveným 2N BBM médiem (<http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media.html#BBM>). Kultury bez houbové kontaminace jsem nechala první týden r st p i pokojové teplot a denním osv tlení. Po týdnu jsem kultury kultivovala p i stejné teplot a trnáctihodinovém osv tlení (14:10 sv tlo:tma cyklus), které m lo napodobit denní letní sv tlo a synchronizovat kultury, o intenzit  $15 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Kmeny jsem po trnácti dnech vyfotografovala fotoaparátem Olympus Z5060 na sv telném mikroskopu Olympus BX51 (Olympus Corp., Tokyo, Japonsko). U kafdého kmene jsem v programu ImageJ 1.45s (Rasband W., National Institute of Health, USA) m íla velikost 200 náhodn vybraných bun k. M íla jsem pr m r bun k a sledovala výskyt bun k, které m ly na svém povrchu výr stky. Vyhnula jsem se m ení velikosti autosporangií. Jejich charakter a velikost jsem si pouze zaznamenávala. Kmeny jsem pozorovala dal–í týden, trnáct dní a t i týdny po m ení. Velikosti bun k jsem si v–ak jen zaznamenávala ó velikost nejmen–ích a nejv t–ích bun k a velikost v t–iny bun k v kultu e. Snaffila jsem se zachytit p ípadné zm ny ve velikosti bun k, tvaru, charakteristice bun ného povrchu (p ítomnost/absence výr stk ) a dal–ích znak bun k.

Univariální analýzu naměřených velikostí (průměr) buněk vybraných kmenů spolu s dalšími porovnáními v rámci komplexu *Vischeria/Eustigmatos* jsem provedla v programu PAST v2.14 (Hammer et al. 2001). Výsledek rozsahu velikostí buněk u jednotlivých kmenů jsem znázornila pomocí krabicových grafů. To, zda se mediány dvou kmenů liší, jsem testovala pomocí párového porovnání (t-testem). Testovala jsem také souvislost těchto morfologických parametrů (průměr, medián a variance) s fylogenetickou pozicí zkoumaných kmenů. Rozdílnosti mezi testovanými kmeny jsem v obou případech vyjádila pomocí Euklidovské vzdálenosti, která nabývá kladných hodnot od 0. Pro posouzení významnosti vztahu mezi fylogenetickou a morfologickou vzdáleností jsem použila neparametrický Mantelův test. Ten porovnává podobnost dvou matic a testuje nulovou hypotézu (významnost jakékoli odchylky od nulové korelace; mezi maticemi není žádný vztah). Každý datový soubor jsem permutačně testovala (10 000 permutací).

Výpočet evolučních vzdáleností mezi morfologicky studovanými kmeny byl založen na Kimura-2 parametrické vzdálenosti zahrnující jak transice, tak transverze. Tyto genetické distance jsem spočítala v programu MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007). Výpočet genetických vzdáleností odvozených z ITS2 rDNA sekvencí jsem prováděla tak, že jsem z celkového alignmentu vymazala ty pozice, ve kterých se lišily jednotlivé varianty daného kmene. Tímto způsobem jsem se tedy omezila na mezikmenové porovnání.

**Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).** Pro detailní studium povrchu buněk jsem se zaměřila na zástupce, kteří vytvářejí výrůstky. Vybrala jsem všechny tři typové kmeny rodu *Vischeria*, které pocházely z časové sbírky v Göttingenu (SAG 876-1, SAG 887-1 a SAG 887-2). Kultury, které byly zaočkovány tři týdny před samotnou přípravou pro SEM, jsem nejprve resuspendovala ve sterilní destilované vodě. Kapku buněčné suspenze jsem nanasla na krycí sklíčko, na které jsem předtím nanasla tři vrstvy poly-L-lysinu (zředěný 1:10 v deionizované vodě). Poly-L-lysin zajišťuje vyčnívadcezi buněk ke sklíčku a redukuje ztráty materiálu během dalšího zpracování. Buňky jsem nechala sedimentovat několik hodin, poté jsem filtračním papírem odsála přebytečnou tekutinu. Vzorek jsem dehydratovala v acetonové řadě: 10 min. v 30% acetonu (odvodněný kuličkami Nalsit), 10 min. v 50% acetonu, 10 min. v 70% acetonu, 10 min. v 90% acetonu, 20 min. v 99% acetonu a dvakrát ve 100% acetonu po dobu 20 min. Další kroky (vysušení pomocí CO<sub>2</sub> a pozlacení vzorku) provedla Laboratoř elektronové mikroskopie na Přírodovědecké fakultě UK (<http://web.natur.cuni.cz/~lem>). Buňky jsem pozorovala pomocí skenovacího elektronového mikroskopu JOEL 6380 LV.

### 3. Výsledky

#### 3.1 Molekulární variabilita komplexu *Vischeria/Eustigmatos*

Molekulární analýza odhalila značnou genetickou variabilitu v rámci morfologicky definovaného komplexu rod *Vischeria/Eustigmatos*. Tato variabilita je tedy v t-í nejlé doposud známá variabilita morfologická. Za účelem poznání molekulární variability tohoto komplexu jsem se z jednotlivých kmenů snažila získat ITS2 rDNA sekvence a z nich kterých z nich potom také sekvence genu *rbcL*. Celkem se podařilo získat 29 sekvencí *rbcL* genu a 124 sekvencí ITS2 rDNA. Uvedený počet ITS2 sekvencí však pocházel ze 97 kmenů (viz dále). Fylogenetické vztahy zrekonstruované na základě dvou genetických markerů ukazují shodný pattern klastrování jednotlivých kmenů. Oba fylogenetické stromy jsou tedy kongruentní.

Alignment ITS2 rDNA o délce 255 bp má 197 variabilních pozic (38,04 %), zatímco alignment genu *rbcL* o délce 902 bp má těchto pozic 216 (23,95 %). Úsek ITS2 rDNA je tedy mnohem variabilnější, v rámci něj se navíc vyskytuje vnitrogenomová heterogenita (viz níže).

#### Mezerníková oblast - ITS rDNA

**a) Nekódující ITS1 rDNA.** Sekvenování ITS rDNA prokázalo, že se v genomu některých kmenů vyskytuje vnitrogenomová heterogenita ITS1 oblasti. U většiny kmenů, které mají heterogenitu v ITS1 rDNA, byla heterogenita také v ITS2 rDNA. Jednalo se o kmeny ATA 2-1 KH, ATA 3-4 Q, Baikal, BGPZ 6, BGPZ 9, BoF 114, CAUP H 4302, CAUP Q 102, CCALA 514, GSE 6A a UTEX 49. Méně kmenů mělo heterogenitu pouze v ITS2 rDNA (viz níže). U jednoho kmene, GSM 204, se vyskytovala heterogenita pouze v ITS1 rDNA oblasti.

**b) Kódující 5.8S rDNA.** Tato oblast je jedním z konzervovaných úseků rDNA. Důkazem je také to, že v úseku o délce 152 bp se nacházejí pouze dvě variabilní pozice.

**c) Nekódující ITS2 rDNA.** Délka úseku ITS2 rDNA se lišila mezi kmeny (od 252 do 260 bp). Při sériovém sekvenování PCR produktu poskytlo elektroforetogramy, ve kterých se vyskytovala místa s překrývajícími se páry. Přítomnost vzájemně se překrývajících sekvencí, byla způsobena výskytem více než jedné varianty ITS2 rDNA (Obr. 4). U většiny kmenů se za daných PCR podmínek v genomu dala detekovat jedna varianta ITS2 rDNA. Z celkového

po tu devadesáti sedmi studovaných kmenů (Tab. S1 v příloze) se u dvaceti dvou vyskytovala vnitrogenomová variabilita. U většiny kmenů s tímto vnitrogenomovým polymorfismem se v genomu vyskytovaly dvě odlišné kopie ITS2 rDNA. U dvou kmenů (CCALA 514 a UTEX 49) se v genomu vyskytovaly více než dvě různé varianty tohoto úseku. Tyto varianty se mezi sebou lišily nejen substitucemi, ale také indely (inzercemi/delecemi).

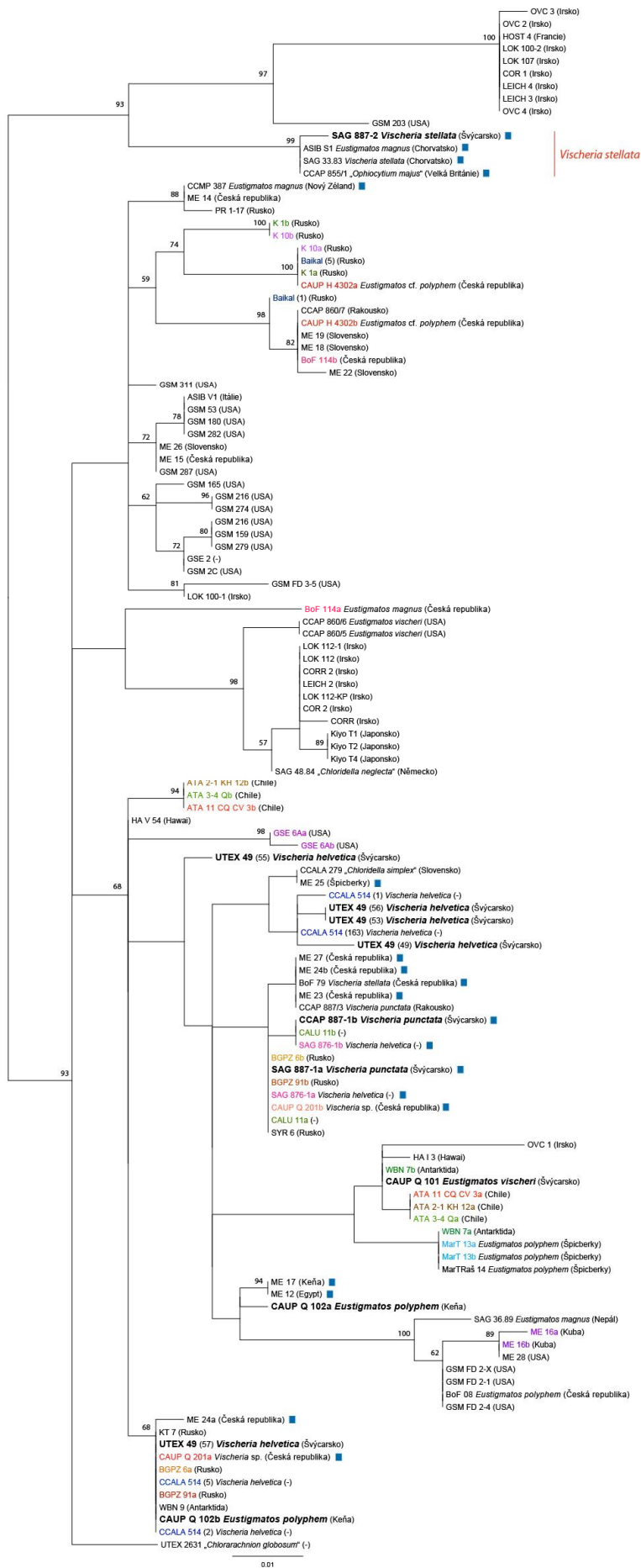
U kmenu CCALA 514 jsem pomocí klonování získala šest odlišných variant ITS2 rDNA. U dvou z nich bylo na základě porovnání se sekvencemi ITS2 z ostatních kmenů možno usoudit, že se pravděpodobně jedná o chiméry vzniklé během PCR reakce (i když formálně lze jen obtížně vyloučit, že se nejedná o autentické ITS2 varianty existující fyzicky v genomech zmíněných dvou kmenů a vzniklé genetickou rekombinací provodních variant). Tyto sekvence jsem vyloučila z analýz.

Analýza ITS2 sekvencí ukázala na přítomnost velkého množství linií v rámci komplexu rodů *Vischeria/Eustigmatos* (Obr. 4). Tyto typové kmene mají heterogenitu ITS2 oblasti. Typové kmene druhu *Eustigmatos vischeri* (CAUP Q 101) a *Vischeria stellata* (SAG 887-2) tuto heterogenitu nemají. Ukázalo se, že sekvence ITS2 rDNA z typového kmenu *Vischeria helvetica* (SAG 887-1) je identická se sekvencí z typového kmenu *Vischeria punctata* (SAG 876-1). Nicméně, sekvence z UTEX 49, která by ve skutečnosti měla být identická se SAG 876-1, protože jde o tytéž izoláty, které jsou ale udržované ve dvou různých sbírkách. Sekvence z kmenu UTEX 49 sice padají do několika linií, žádná z nich však není identická ani s jednou z variant ITS2 rDNA z kmenu SAG 876-1.

Sekvence z jednoho kmenu (2 až 5) neklastrují vždy kmen společně (Obr. 4). Kupříkladu i sekvence kmenu UTEX 49 o UTEX 49 (49, 53, 56) o klastrují společně, avšak další dvě sekvence o UTEX 49 (52, 57) spadají do odlišných linií. Stejně tak je tomu v případě kmenu CCALA 514, jehož dvě sekvence klastrují společně, zatímco další dvě sekvence tohoto kmenu náleží do jiného klastru. Naopak, sekvence z jednoho kmenu si mohou být velmi podobné. Například, sekvence kmenu SAG 887-1 se liší v ITS2 rDNA úseku pouze jednou substitucí (guanin u SAG 887-1a, cytosin u SAG 887-1b). Naprosto stejně to vypadá u kmenu SAG 876-1 a CALU 11. Substituce (G na C) se mezi dvěma variantami jednoho kmenu nachází dokonce na stejném místě. Velmi malý rozdíl mezi sekvencemi ITS2 v rámci jednoho kmenu se vyskytuje také u MarT 13. Minoritní varianta (ta, jejíž píky v elektroforetogramu jsou menší než větší, majoritní píky) se od majoritní varianty liší delecí jednoho nukleotidu (cytosinu). Takovéto sekvence, které si jsou vzájemně velmi podobné a klastrují společně (v rámci stejného kladu). Zaznamenala jsem však kmene, jejichž majoritní a minoritní varianty se vzájemně lišily. Jde například o kmene ATA 11-CQ-CV3,

ATA 2-1 KH-12 a ATA 3-4 Q. Jednotlivé majoritní varianty těchto kmenů klastrují společně. Minoritní varianty těchto kmenů také klastrují společně, avšak každá varianta náleží do jiné linie.

Hodnoty genetických distancí vypočítané na základě Kimura 2-parametrického modelu ukázaly, že vzdálenost mezi ITS2 rDNA sekvencemi jednoho kmenu se pohybuje mezi 0-0,04 (nezobrazeno). Například hodnota genetické distance mezi majoritní a minoritní sekvencí kmenu ME 24 činí 0,04. Tyto hodnoty v některých případech dokonce převyšují hodnoty genetických vzdáleností mezi liniemi. Kupříkladu hodnota genetické divergence mezi kmeny SYR 6 a ME 15 je 0,036. Každý z těchto kmenů patří do odlišných linií (Obr. 4).



**Obr. 4.** Fylogenetický strom sekvencí ITS2 rDNA zrekonstruovaný metodou maximum likelihood (ML). Čísla uvedená u nodů znamenají hodnoty bootstrapové podpory (ukázány jsou hodnoty nad 50). Druhová označení u sbírkových kmenů odrážejí původní určení kultury kurátorem sbírky. Typové kmeny jsou vyznačeny tučným písmem. Barevně jsou označeny kmeny, u nichž se vyskytuje vnitrogenomová variabilita ITS2 rDNA oblasti. Písmeno a u těchto kmenů značí majoritní variantu, písmeno b pak minoritní variantu. Čísla v závorkách, která jsou uvedená za označením kmenu, značí číslo klonů během klonování. Modré čtverce značí kmeny, u nichž jsem pozorovala výrůstky na bučkách. U jednotlivým kmenům je také připojena informace o místě (stát), ze kterého byl daný kmen izolován. Kmeny, které svou morfologií odpovídají popisu buněk komplexu *Vischeria/Eustigmatos*, avšak v různých sbírkách jsou drženy pod jinými názvy, jsou uvedeny v uvozovkách. Červenou barvou je vyznačen druh *Vischeria stellata*, který má stabilní morfologické znaky, díky nimž je dobře rozlišitelný od ostatních linií.

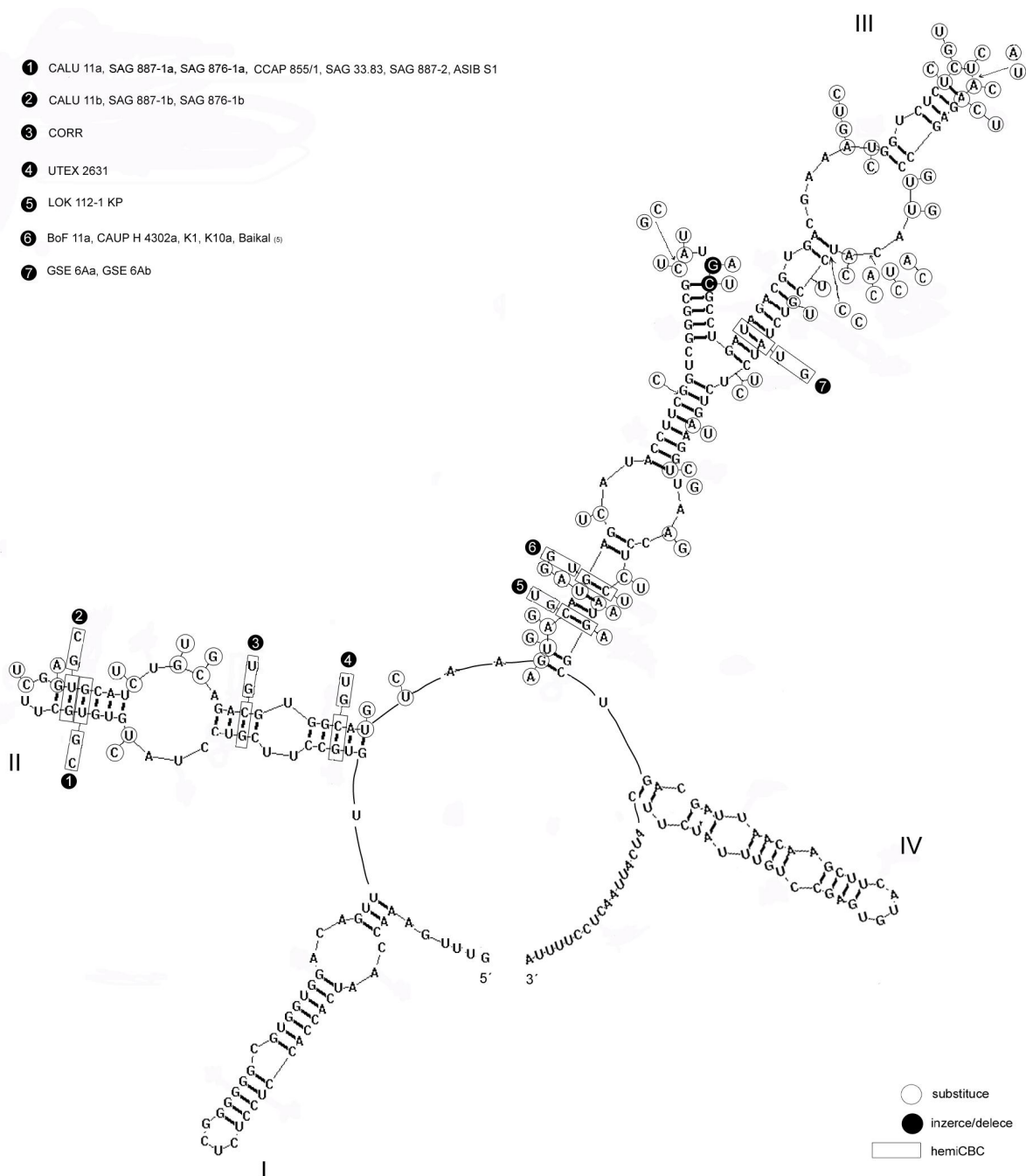
### 3.2 Testování přítomnosti heterogenity u kmenů, u nichž primární sekvenování ukázalo na výskyt pouze jedné varianty ITS2 rDNA

Při použití kombinace forward primeru a jednoho z nově navržených reversních primerů, došlo u většiny testovaných kmenů k amplifikaci PCR produktu. U všech kmenů, u nichž byly k amplifikaci použity specifické primery: BoF114maj-ITS (kmeny ME 18, ME 19 a CCAP 860/7) a ME24maj-ITS (kmeny ME 23, ME 27, CCAP 887/3 a BoF 79), docházelo k amplifikaci. Naopak, při použití WBN7min-ITS primeru u kmenu MarTra-14 k amplifikaci nedošlo. K amplifikaci ITS2 rDNA pomocí CAUP-Q-201maj-ITS primeru došlo u dvou, tedy u poloviny testovaných kmenů. Sekvenování dvou kmenů od každého z testovaných kmenů daným reverse primerem ukázalo, že se ve všech případech amplifikovala primární varianta, jejíž sekvence byla již přetena pomocí primárního sekvenování. Nadesignované primery tak nebyly při použitých podmínkách PCR specifické pro určitou variantu.

### 3.3 Sekundární struktura ITS2 rRNA

Sekundární struktura je tvořena typicky dlouhými helixy (Obr. 6). Helix III je nejdelší a zároveň větvený. Ve všech případech, které jsem testovala (rozdílné teploty sbalení primárního transkriptu do sekundární struktury atd.), se větvení helixu III vyskytovalo. Většina substitucí, kterými se sekvence kmenů odlišovaly, se nacházela ve smyčkách, tedy v nepárovaných oblastech. Inzerce a delece (indely) se v těchto oblastech vyskytovaly stejně tak. Nejvíce změn se ovšem nacházelo na prvním, zvláště pak na čtvrtém helixu (neukázáno). Sekundární struktury ITS2 rRNA byly porovnány mezi všemi zkoumanými kmeny komplexu *Vischeria/Eustigmatos* z důvodu nalezení tzv. compensatory base changes (CBC) a hemiCBC podle Coleman (2000, 2003). Substituce změn v konzervovaných oblastech (CBC) mohou poukázat na nemobilitu vzájemného křížení mezi kmeny, a tedy na použití biologického

druhového konceptu (Coleman 2003, 2007, 2009). Vzhledem k tomu, že (1) reprodukční izolace by měla souviset pouze s přítomností CBC na druhém a třetím raménku a (2) helixy I a IV jsou velmi variabilní, CBC jsem hledala pouze na druhém a třetím helixu. Přítomnost bodových mutací, které zachovávají párování, poukázalo pouze na přítomnost hemiCBC (Obr. 6). CBC se mezi zkoumanými kmeny nevyskytovaly. Nalezeno bylo celkem 23 hemiCBC. Sedm z nich se vyskytovalo na helixu II a III. Minoritní a většinové varianty kmenů CALU 11, SAG 887-1 a SAG 876-1 se od sebe liší dvěma hemiCBC vyskytující se na druhém a třetím helixu.

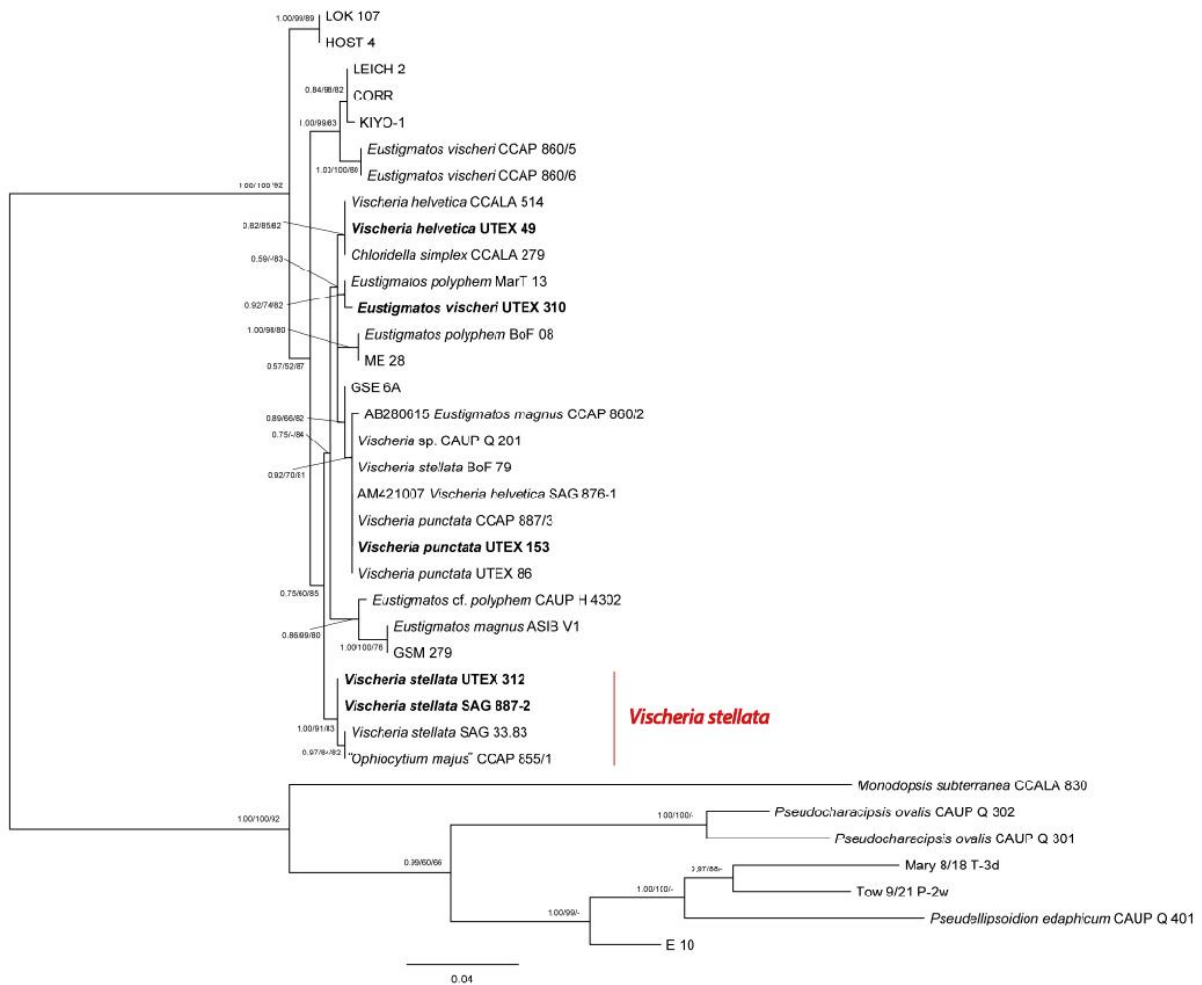




**Obr. 6.** Předpokládaná sekundární struktura ITS2 transkriptu typového kmenu *Vischeria punctata* (kmen SAG 887-1). Pro zjednodušení jsou zobrazeny pouze změny na helixu II a III. Změny bazí mezi jednotlivými genotypy jsou naznačeny: páry bazí v obdélnících oznaují hemiCBC; jednotlivé změny nukleotid jsou vyznačeny v kroufcích o substituce v prázdných kroufcích, indely v kroufcích s černou výplní. Číslo vedle hemiCBC označuje kmene (příp. ITS2 variantu určitého kmene), u nichž se daná změna vyskytuje; v legendě je uvedeno, o jaké kmene se jedná.

### 3.4 Gen kódující velkou podjednotku enzymu RUBISCO - *rbcL*

Fylogenetická analýza provedená na základě *rbcL* sekvencí ukázala, že komplex rod *Vischeria/Eustigmatos* tvoří monofyletickou linii v rámci eustigmatofytních řas (Obr. 5). Oddělení celého komplexu je podpořeno vysokou hodnotou posteriorní pravděpodobnosti (BI) - 1.00. Vysokou bootstrapovou hodnotu dostal tento komplex také v maximum likelihood - 100 a neighbour-joining analýze - 92. Na základě sekvencí tohoto *rbcL* genu je možné v rámci studovaného komplexu rozpoznat minimálně devět fylogenetických linií. (Obr. 5). Tyto z devíti linií mají vysokou hodnotu BI (> 0.94), jsou také vysokou podporu v ML analýze (> 79 %). Nízké hodnoty podpory některých linií by mohly být způsobeny nedostatečným samplíngem. Tyto rozpoznávané linie zahrnují tyto i linie s typovými kmeny. Pozice typové kultury *Eustigmatos polyphem* (CAUP Q 102) nebyla z důvodu příliš krátké sekvence do fylogenetické analýzy zahrnuta, a tak *rbcL* sekvence z tohoto kmene není ani zobrazena. Fylogenetická rekonstrukce, do níž byla zahrnuta krátká *rbcL* sekvence z tohoto kmene však ukázala, že tato typová kultura je součástí další samostatné linie. Typová kultura *Vischeria stellata* ze sbírky z Göttingenu (SAG 887-2) má stejnou *rbcL* sekvenci jako identická kultura ze sbírky v Texasu (UTEX 312). Typová kultura *Vischeria helvetica* z göttingenské sbírky (SAG 876-1) má stejnou sekvenci *rbcL* genu jako typová kultura *Vischeria punctata* (UTEX 153). Sekvence *rbcL* genu kultury SAG 876-1 by přitom měla být identická s kulturou *Vischeria helvetica* z texaské sbírky (UTEX 49). Kultura UTEX 49 má však tuto sekvenci jinou, a tvoří tak samostatnou linii.



**Obr. 5.** Fylogenetický strom zrekonstruovaný metodou maximum likelihood (ML) na základě *rbcL* sekvencí. Stromy byly nezávisle spojitány metodou Bayesiánské inference (BI) a dále metodou neighbour-joining (NJ). Statistické podpory jednotlivých větví jsou uvedeny v procentech - posteriorní pravděpodobnost/ML bootstrap/NJ bootstrap. Autentické kmeny jsou vyznačeny tučným písmem. Název taxonu u jednotlivých kmenů je uveden dle toho, jak je pojmenován ve sbírkách. Kmen CCAP 855/1, který je v časové sbírce CCAP uveden pod názvem *Ophiocytiium majus* odpovídá popisu zástupce komplexu *Vischeria/Eustigmatos*. Z tohoto důvodu je název tohoto kmene uveden v uvozovkách. Červenou barvou je vyznačen druh *Vischeria stellata*, který má stabilní morfologické znaky, a díky tomu je dobře rozlišitelný od ostatních linií.

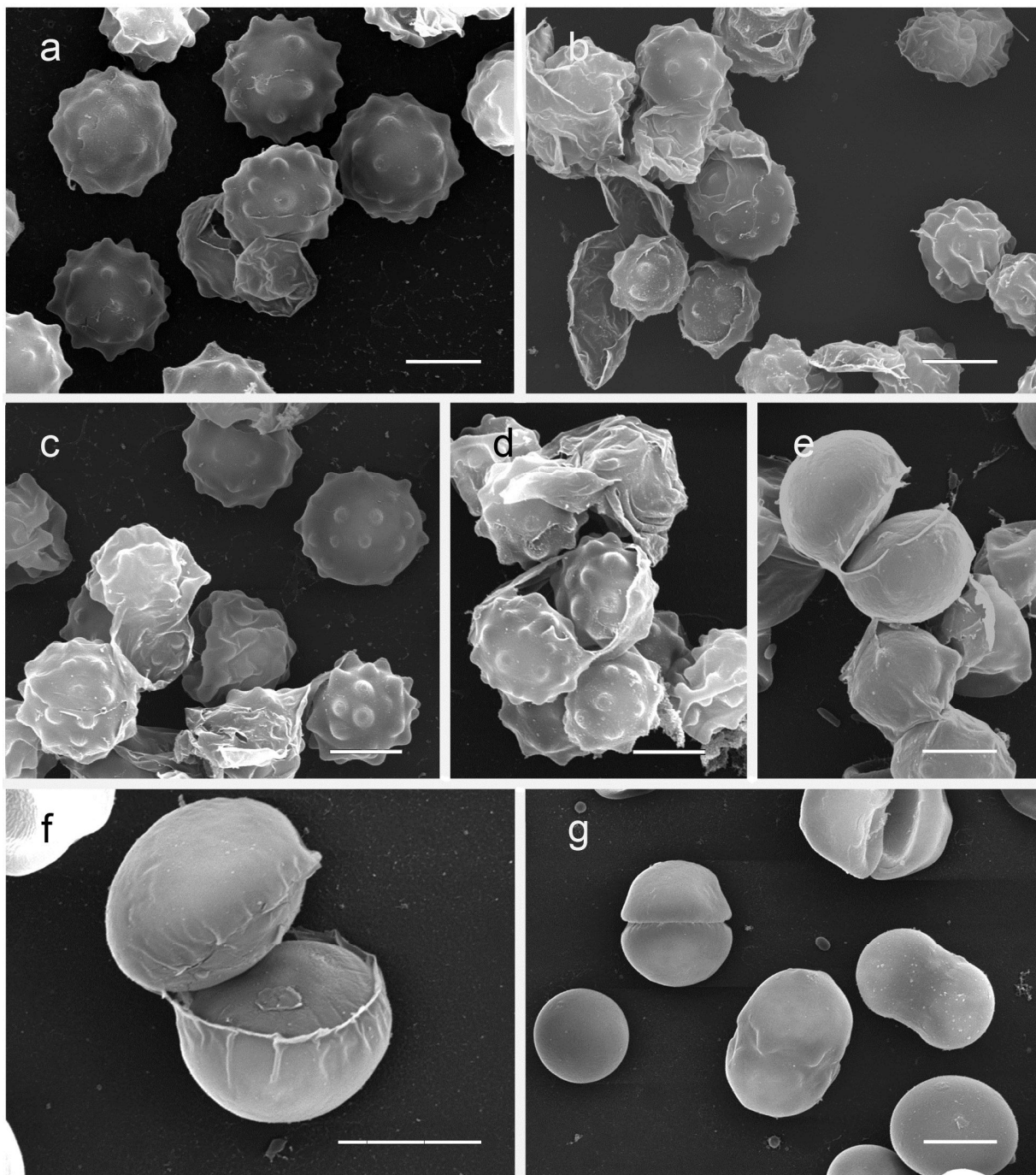
### 3.5 Morfologická variabilita kmenů

Ti kmeny kultury, u kterých si Alena Lukešová (Ústav pro studium biologie Akademie věd České republiky, České Budějovice) původně nebyla jistá s druhovým určením, a proto je označila jako *Eustigmatos* sp./*Vischeria* sp. (ME 12, ME 17, ME 27) jsem sledovala po třinácti dnech kultivace pod světelným mikroskopem. U těchto buněk jsem pozorovala velké množství buněk s výrůstky. Stejně tak tomu bylo u kmene ME 23, který Alena Lukešová určila jako *Eustigmatos magnus* nebo *Vischeria* sp. Také u tohoto kmene jsem pozorovala buňky s výrůstky. Takovéto buňky jsem pozorovala také u kmene ME 25, který byl určen jako

*Eustigmatos* sp. a u kmenu CCMP 387, který byl určen jako *Eustigmatos magnus*. Potvrdila jsem také přítomnost výrstků buněk u kmenu ME 24, který byl určen jako *Vischeria* sp.

Kmeny CCAP 855/1 určený jako *Ophiocyrtium majus* a ASIB V1 určený jako *Eustigmatos magnus* mají buňky s typickou stelární strukturou jako je tomu u typového kmenu *Vischeria stellata* (SAG 887-2) a dalšího kmenu určeného také jako *Vischeria stellata* (SAG 33.83). Takovéto buňky je možné v kultuře pozorovat během exponenciální fáze růstu. Stelární buňky typového kmenu *Vischeria stellata* (SAG 887-2) jsem pozorovala metodou skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Výrůstky byly distribuované téměř rovnoměrně po celém povrchu buňky (Obr. 7a-d). V této buňce byly tyto výrůstky obecně méně výrazné, jen málo vyčnívající z povrchu buňky. Menší buňky naopak tyto výrůstky nápadně vyčnívají. Zajímavé je, že i buňky ve sporangiiach takovéto výrůstky na svém povrchu mají. Jak se buňka dělí a následně zvětšuje, dochází k napínání mateřské buněčné stěny a vzniklé autospory se uvolní z mateřského sporangia (Obr. 7d). Na jejich povrchu často zůstává část mateřské buněčné stěny. Stelární buňky se vytvářejí také v pozdějších stádiích kultivace. Změna morfologie buněk nastává u senescentních kultur, kdy vlna buněk v kultuře má hladký povrch bez výrstků.

Pomocí SEM jsem studovala také typový druh *Vischeria punctata* (SAG 887-1; Obr. 7f-g) a *Vischeria helvetica* (problém, viz Diskuse) (SAG 876-1; Obr. 7e). V kultuře se nacházely jak hladké buňky, tak buňky s výrstkami. Výrůstky se vyskytovaly především na buňkách, které se dělily. U takovýchto buněk se výrůstky nacházely v okrajové části, kde se obě buňky od sebe navzájem oddělily. Na dělicích se buňkách bylo patrné, že při cytokinezi buňky k sobě drží pomocí jednoho okraje oddávajících se buněk (Obr. 7e). Po jejich oddělení vzniká v místě jejich spojení stopa po odtržení. Na uvolněných buňkách zůstává mateřská buněčná stěna (Obr. 7f).



**Obr. 7.** Morfologie typových kmenů rodu *Vischeria* pozorovaná pomocí SEM. a-d: *Vischeria stellata* (SAG 887-2); e: *Vischeria helvetica* (problém, viz Diskuse) (SAG 876-1); f-g: *Vischeria punctata* (SAG 887-1). a-b: buňky, které se právě uvolnily ze sporangia, na jejich povrchu zůstávají zbytky mateřské buněčné stěny; c: vegetativní buňky s výrůstky na povrchu; d: autospory stále uzavřené ve sporangiu; e: autospory zachycené během konečné fáze dělení; d: detailní pohled na dělič se autospory, v místě oddělení buněk se zachovává viditelná stopa po jejich spojení; mateřská buněčná stěna zůstává na povrchu autospor; g: dělič a nedělič se buňky. Měřítko 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.6 Morfologické charakteristiky vybraných kmen

V tomto oddílu jsou uvedeny morfologické znaky kmen , které jsem si na základ výsledk fylogenetické rekonstrukce sekvencí ITS2 rDNA vybrala pro detailn j-í studium jejich morfologie. Kultury jsem kultivovala za stejných podmínek a sledovala po dobu –esti týdn . V následující ásti jsem uvedla morfologické charakteristiky jednotlivých kmen , které jsem zaznamenala b hem tohoto období. Rozp tí velikosti bun k u jednotlivých kmen (velikost nejmen-ích a nejv t-ích bun k spolu se sm rodatnou odchylkou) jsou uvedeny v Tab. 4. Rozp tí velikostí bun k jsem navíc pro p ehlednost zobrazila pomocí box plot (Obr. 4).

**HOST 4** (Obr. 1 v p íloze S1). V t-ina bun k m la velikost 10-12  $\mu\text{m}$ . Nejmen-í bu ky dosahovaly velikosti 6  $\mu\text{m}$ . Nejv t-í bu ky nej ast ji dosahovaly velikosti 18-22  $\mu\text{m}$ . Uvnit bun k se vyskytoval jeden pyrenoid, velké bu ky obsahovaly pyrenoid více.

Po m síci kultivace jsem v kultu e pozorovala p iblifn stejné velikostní rozložení bun k. Bu ky se d lily po dvou, ale p ítomna byla také osmibun ná sporangia.

**LEICH 2** (Obr. 2 v p íloze S1). Velikostní variabilita tohoto kmene byla zna ná. Nejmen-í bu ky byly velké 7-8  $\mu\text{m}$ , nejv t-í bu ky dosahovaly 15-20  $\mu\text{m}$ . Na-la jsem v-ak bu ky o velikosti 24  $\mu\text{m}$ . Uvnit bun k se nacházela kulovitá vakuola bez zjevného obsahu uvnit . Obecn se dá íci, že velikost t chto vakuol korelovala s velikostí bun k (v t-í bu ky mají v t-í vakuoly), neplatilo to v-ak úpln .

Po více jak m síci kultivace jsem v kultu e našla bu ky, jejichž velikost byla 8-11  $\mu\text{m}$ . Rozdíly mezi velikostí malých a velkých bun k byly nápadné. Velké bu ky dosahovaly velikosti 17-18  $\mu\text{m}$ . Na-la jsem v-ak bu ku o extrémní velikosti 35  $\mu\text{m}$ . Ve vakuolách se nacházel materiál s Brownovým pohybem.

**CCAP 860/5** (Obr. 3 v p íloze S1). V t-ina bun k byla 10-12  $\mu\text{m}$  velká. Uvnit takto velkých bun k byl p ítomen z eteln viditelný pyrenoid, ve v t-ích bu kách jsem našla pyrenoidy dva. Nejv t-í bu ky byly 13  $\mu\text{m}$  velké. V bu kách se nacházel volný prostor, v n mfl byla umíst na vakuola.

Po m síci kultivace jsem u tohoto kmenu našla bu ky p iblifn stejné velikosti jako p í edchozích sledováních. Uvnit v t-iny bun k jsem nacházela jeden nebo dva pyrenoidy.

**CCAP 860/6** (Obr. 4 v příloze S1). Většina buněk měla kulovitý tvar. Menší bučky (9 µm) měly také tvar oválný. Uvnitř buněk jsem našla více pyrenoidů. Bučky se vzhledově podobaly bučkám předchozího kmene. Obsahovaly totiž vakuoly s kapkami uvnitř, které se pohybovaly Brownovým pohybem. Velikost buněk tohoto kmene však byla o trochu větší než u CCAP 860/5. Většina buněk byla 8-10 µm velká. Největší bučky dosahovaly 13-16 µm. Stejně velikostní proporce buněk jsem nacházela také po měsíci kultivace. Sporangia byla složená ze dvou i ze čtyř autospor.

Po měsíci kultivace jsem nacházela bučky, jejichž velikost byla 12-15 µm, největší bučka měla velikost 17 µm.

**UTEX 49** (Obr. 5 v příloze S1). Naprostá většina buněk měla velikost okolo 8-10 µm. Největší bučky dosahovaly 13-16 µm, ty nejmenší pak 6-7 µm. Většina buček však neměla výrůstky. Ty jsem nepozorovala ani po měsíci kultivace. U prvních velkých buněk pozorovala plastid polomírného tvaru, větší bučky často obsahovaly prázdné prostory. Šreggish globule se vyskytovala ve velkých bučkách, velmi výjimečně jsem ji našla v bučkách normální velikosti. Pyrenoid byl přítomen v bučkách pouze jeden. Sporangia byla dvoubuněčná a čtyřbuněčná.

U této kultury jsem pozorovala zoospory. Došlo k tomu po třech týdnech kultivace. Část kultury jsem suspendovala v kapce vody, přifiltra krytí sklíčko a pozorovala pod světelným mikroskopem. Zoospory se objevily po několika minutách, během pěti minut došlo k jejich přisednutí a jejich následnému zakulacení. Tvar těchto zoospor byl protáhlý. Jejich velikost byla přibližně 1,5krát větší než velikost vegetativních buněk. Na předním konci bučky bylo zřetelné viditelné stigma, bílé jsem pozorovala jeden. Plastid měla velmi jednoduchou strukturu. Zoospory se mi nepodařilo zaznamenat v pohyblivém stádiu. Vyfotografovala jsem pouze jejich přisedlé zoospory (Obr. 1, 2 v příloze S3).

**MarT 13** (Obr. 6 v příloze S1). Většina buněk měla velikost 8-10 µm, velikost těch největších byla 12-15 µm. Větší bučky často měly více pyrenoidů. V bučkách byl přítomen zřetelný viditelný polygonální pyrenoid. Autosporangia byla dvoubuněčná a čtyřbuněčná.

Po třinácti dnech kultivace jsem pozorovala bučky stejné velikosti jako při prvním pozorování. Ostatní charakteristiky byly také podobné.

**CAUP Q 101** (Obr. 7 v příloze S1). Velikost většiny buněk se pohybovala okolo 10 µm. Největší bučky měly velikost 11-12 µm, avšak při prohlížení kultury jsem našla bučky o

velikosti 15  $\mu\text{m}$ . Velikost v t-iny bun k tak byla p iblifn stejná. Vnit ní struktura bun k byla jiná neff u ostatních kmen . Pozorovala jsem p ítomnost malých vakuol. To mohlo být zp sobeno tím, fle v kultu e nacházela bakteriální kontaminace, která se mi bohuffel ani p i n kolika p eo kováních nepoda ıla eliminovat. V bu kách se nacházel pyrenoid. Nebylo v-ak snadné ho ani celý vnit ní obsah bun k pozorovat. Stejn tomu bylo v p ípad šreggish globuleõ, která nem la svou charakteristickou barvu.

Po m síci kultivace jsem pozorovala naprosto stejné velikostní slofení bun k jako p i trnáctidenní kultivaci.

**CAUP Q 102** (Obr. 8 v p íloze S1). Bu ky v této kultu e byly nápadn veliké. Jejich maximální velikost se pohybovala okolo 18  $\mu\text{m}$ , ale pozorovala jsem n kolik bun k o velikosti 20  $\mu\text{m}$ . Uvnit bun k se nacházel pyrenoid, u t ch v t-ích bun k jsem plastid pozorovala více. Ve v-ech bu kách byla p ítomna kulovitá vakuola se zrní ky materiálu uvnit .

Po dal-ích trnácti dnech kultivace jsem v kultu e pozorovala bu ky, jejich velikost byla 10-12  $\mu\text{m}$ . Narazila jsem na velké množství bun k, jejichff velikost byla 20  $\mu\text{m}$  a pozd ji také 25  $\mu\text{m}$ . Tyto bu ky obsahovaly obrovskou vakuolu, která zaujímala v t-ínu prostoru bu ky.

**BoF 08** (Obr. 9 v p íloze S1). Nejv t-í bu ky dosahovaly velikosti 14-17  $\mu\text{m}$ . V t-í bu ky obsahovaly více nápadných pyrenoid . N které bu ky, které byly men-í neff ostatní bu ky v kultu e a m ly oválný tvar. Plastid zabíral velkou ást bu ky, volné prostory v bu ce tak ka nebyly vid t.

Po m síci kultivace jsem zaznamenala podobné velikosti a charakteristiky bun k jako b hem p edchozích pozorování. Na-la jsem v-ak bu ky o velikosti 15-16  $\mu\text{m}$ .

**GSE 6A** (Obr. 1 v p íloze S2). V t-ina bun k m la velikost 7-8  $\mu\text{m}$ . Nejv t-í bu ky dosahovaly velikosti 15  $\mu\text{m}$ . Jejich tvar byl kulovitý, oválný, ale i nepravidelný. V kultu e jsem pozorovala velké množství ty bun ných i výcebun ných sporangií, mén asto dvoubun ná. Bu ky tohoto kmenu se podobaly bu kám kmenu CAUP Q 101. Pyrenoid a šreggish globuleõ nebyly z eteln viditelné. To by mohlo být op t zp sobeno kontaminací kultury ze strany bakterií.

**CAUP Q 201** (Obr. 2 v p íloze S2). V t-ina bun k m la velikost 8-12  $\mu\text{m}$ . Velikost nejv t-ích bun k se pohybovala okolo 12-14  $\mu\text{m}$ , zaznamenala jsem v-ak také bu ku o

velikosti 17  $\mu\text{m}$ . Nejmenší buňky (o velikosti 7  $\mu\text{m}$  na kratší straně) měly v nich kterých případech oválný tvar. V kulturách se vyskytovaly buňky s výrůstky, jejich umístění na povrchu buňky bylo nerovnoměrné. Velikost těchto buněk byla okolo 5 a 10  $\mu\text{m}$ . Jejich velikost tedy byla přibližně stejná jako velikost ostatních hladkých buněk v kultuře. Buňky obsahovaly šreggish globule a jeden či několik pyrenoidů. V buňkách jsem pozorovala vakuolu kulovitěho tvaru a bez viditelného obsahu uvnitř.

Po měsíci kultivace jsem pozorovala podobné velikostní zastoupení buněk v kultuře. Narazila jsem ale na buňky o velikosti 17-19  $\mu\text{m}$ . Později jsem našla buňky o velikosti 22  $\mu\text{m}$ . Uvnitř takto velkých buněk jsem pozorovala více pyrenoidů. Při pozorování kultur jsem v tomto období ani později žádné buňky s výrůstky nepozorovala. Pozorovala jsem však, že uvnitř vakuoly se nachází materiál s Brownovým pohybem.

**BoF 79** (Obr. 3 v příloze S2). Nejmenší buňky měly velikost 7  $\mu\text{m}$ . Většina buněk v kultuře byla právě takovéto velikosti (7 až 9  $\mu\text{m}$ ). Největší buňky byly velké 11-13  $\mu\text{m}$ . V buňkách byl přítomen jeden dobře viditelný pyrenoid. Pozorovala jsem také přítomnost vakuoly. Jejich vnitřek se zdál být prázdný. Šreggish globule jsem v buňkách sice rozpoznala, neměla však typickou červeně-oranžovou barvu. Žádné buňky s výrůstky jsem bohužel nepozorovala, a to i přes to, že kultura byla izolátorem tohoto kmene určená jako *Vischeria stellata*.

**SAG 887-1** (Obr. 4 v příloze S2). Velikost většiny buněk se pohybovala mezi 8-10  $\mu\text{m}$ . Buňky byly kulovité, s nástanným plastidem a dobře viditelným pyrenoidem. Největší buňky měly velikost 12-13  $\mu\text{m}$ . Nejmenší buňky (5-7  $\mu\text{m}$ ) měly v nich kterých případech oválný tvar. Oválný tvar buněk však byl viditelný také u větších buněk. Většina buněk byla bez výrůstku na povrchu, avšak v kultuře jsem našla několik buněk, které výrůstky měly. Výrůstky nebyly rozmístěny na buňce rovnoměrně, ale byly přítomny jen na polovině buňky. Velikost těchto buněk byla podobná velikosti většiny buněk v kultuře, tedy okolo 8  $\mu\text{m}$ . Autosporangia byla dvoubuněná, méně často buňková.

Po těchto týdnech kultivace jsem pozorovala buňky, které velikostně odpovídaly rozměru buněk po třinácti dnech kultivace. Buňky s výrůstky jsem však nepozorovala.

**CAUP H 4302** (Obr. 5 v příloze S2). Většina buněk byla 9-11  $\mu\text{m}$  velká. V kultuře jsem našla nejmenší buňky o velikosti 7  $\mu\text{m}$ , ty největší naopak dosahovaly 17  $\mu\text{m}$ . Tvar buněk byl nejčastěji kulovitý, ale byl i oválný či jiný. V buňkách se nacházel zřetelně viditelný pyrenoid a vakuola.



Po m síci kultivace jsem nalezla bu ku o velikosti 24  $\mu\text{m}$ . Pozorovala bu ky, které obsahovaly vakuolu s materiálem pohybujícím se Brownovým pohybem.

**GSM 216** (Obr. 6 v p íloze S2). V t-ina bun k byla 10-11  $\mu\text{m}$  velká. Nejv t-í bu ky dosahovaly 16  $\mu\text{m}$ . V bu kách byla p ítomna vakuola kulovitého tvaru bez zjevného obsahu uvnit . Pyrenoid byl dob e viditelný. Povrch bun k byl hladký.

**ASIB V1** (Obr. 7 v p íloze S2). V t-ina bun k byla 9-10  $\mu\text{m}$  velká. Nejmen-í bu ky byly 6  $\mu\text{m}$  velké, ty nejv t-í dosahovaly velikosti 18  $\mu\text{m}$ . V kultu e jsem pozorovala velké množství sporangií, nej ast ji ty bun ná i vícebun ná. Uvnit bun k byl p ítomen jeden pyrenoid, ty nejv t-í bu ky m ly pyrenoid více.

Po dal-ích trnácti dnech kultivace jsem v kultu e pozorovala podobné rozm ry, jaké m ly bu ky po trnácti dnech kultivace. Ty nejv t-í bu ky dosahovaly velikosti 20 a 22  $\mu\text{m}$ .

**CCMP 387** (Obr. 8 v p íloze S2). V t-ina bun k byla 5-7  $\mu\text{m}$  velká. Velikost pr m rn velkých bun k byla 7-9  $\mu\text{m}$ . Nejv t-í bu ky, které jsem objevila, dosahovaly 15  $\mu\text{m}$ . Plastid lefel k jedné stran , nebyl lalo natý. V bu kách byl p ítomen jeden pyrenoid.

**SAG 887-2** (Obr. 9 v p íloze S2). V t-ina bun k m la velikost 9-11  $\mu\text{m}$ . Nejv t-í bu ky dosahovaly 19-20  $\mu\text{m}$ . V kultu e se vyskytovaly bu ky s výr stky na povrchu. Bu ky s takovouto morfologií byly v t-inou men-í i pr m rné velikosti. Nejv t-í bu ky m ly povrch v t-inou hladký, ale na-la jsem n kolik velkých bun k, které výr stky m ly také. Výr stky v-ak byly malé a nebyly tak výrazné jako u bun k malé velikosti. Bu ky obsahovaly šreggish globuleõ slofenou z n kolika kapi ek asto odli-né velikosti a jeden i dva výrazné polygonální pyrenoidy. V bu kách jsem pozorovala malou vakuolu kulovitého tvaru. Autosporangia byla nej ast ji dvoubun ná, výjime n ty bun ná. Autospory m ly povrch modelovaný do podoby výr stk .

Po trnácti dnech jsem pozorovala bu ky s podobnou velikostí jako p i prvním m ení. Navíc, bu ky s výr stky byly stále p ítomny v kultu e, a to i p i dal-ích pozorováních. Nebyly v-ak tak výrazné, jak jsem m la možnost pozorovat p i pozorováních, které nesouvisely s morfologickou studií.

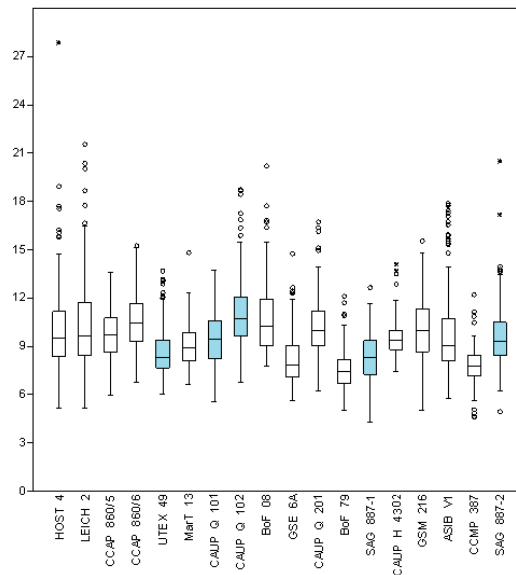
**Tab. 4.** Výsledky tradiční morfometrické analýzy u vybraných kmenů po trinácti dnech kultivace. V prvním sloupci je uveden rozsah naměřených hodnot (minimum a maximum); ve druhém pak průměrná hodnota v etní směrné hodnotě odchylky. Hodnoty jsou uvedeny v  $\mu\text{m}$ .

Kmen	Druhový název kmene	Rozsah hodnot ( $\mu\text{m}$ )	Průměr $\pm$ směrná odchylka
HOST 4	-	5,2 - 27,9	10,0 $\pm$ 0,18
LEICH 2	-	5,2 - 21,6	10,3 $\pm$ 0,20
CCAP 860/5	<i>Eustigmatos vischeri</i>	5,9 - 13,6	9,8 $\pm$ 0,11
CCAP 860/6	<i>Eustigmatos vischeri</i>	6,8 - 15,3	10,5 $\pm$ 0,12
UTEX 49	<i>Vischeria helvetica</i>	6,2 - 16,7	10,1 $\pm$ 0,13
MarT 13	<i>Eustigmatos polyphem</i>	6,6 - 14,8	9,1 $\pm$ 0,09
CAUP Q 101	<i>Eustigmatos vischeri</i>	5,6 - 13,7	9,6 $\pm$ 0,12
CAUP Q 102	<i>Eustigmatos polyphem</i>	6,8 - 18,7	11,1 $\pm$ 0,15
BoF 08	<i>Eustigmatos polyphem</i>	7,8 - 20,2	11,0 $\pm$ 0,14
GSE 6A	-	5,6 - 14,8	8,6 $\pm$ 0,11
CAUP Q 201	<i>Vischeria</i> sp.	6,5 - 13,7	8,9 $\pm$ 0,11
BoF 79	<i>Vischeria stellata</i>	5,0 - 12,1	7,3 $\pm$ 0,8
SAG 887-1	<i>Vischeria punctata</i>	4,3 - 12,7	8,3 $\pm$ 0,09
CAUP H 4302	<i>Eustigmatos</i> cf. <i>polyphem</i>	7,4 - 14,1	9,5 $\pm$ 0,08
GSM 216	-	5,3 - 15,6	9,9 $\pm$ 0,13
ASIB V 1	<i>Eustigmatos magnus</i>	5,7 - 17,9	9,8 $\pm$ 0,19
CCMP 387	<i>Eustigmatos magnus</i>	4,6 - 12,2	7,6 $\pm$ 0,08
SAG 887-2	<i>Vischeria stellata</i>	4,9 - 20,5	9,59 $\pm$ 0,13

Variabilita ve velikosti buněk u jednotlivých kmenů se mezi kmeny lišila (Obr. 4). Rozpětí velikosti buněk u kmenů BoF 79, CAUP H 4302 a CCMP 387 patilo k nejmenším. Buňky kmenů BoF 79 a CCMP 387 však patily k nejmenším. Kmeny CCAP 860/5 a CCAP 860/6, popsané jako *Eustigmatos vischeri* se signifikantně lišily ve velikostech buněk ( $p < 0,001$ ). Tyto kultury mají identickou ITS2 rDNA sekvenci. Dva kmeny (BoF 79 a CAUP Q 201), které měly stejnou *rbcL* sekvenci, se signifikantně lišily ve velikostech buněk ( $p < 0,001$ ). ITS2 rDNA sekvenci však měl každý kmen jinou.

Kultury by se daly rozdělit na ty, jejichž velikost překročila 15  $\mu\text{m}$ , a na ty, jejichž velikost nepřekročila tuto hodnotu pouze zřídka nebo vůbec. Velikosti 20  $\mu\text{m}$  a více dosahovaly buňky kmenů LEICH 2 a HOST 4. Tyto dva kmeny měly také největší rozpětí velikosti buněk. Velký rozdíl ve velikosti buněk v kultuře jsem pozorovala také u kmenů CAUP Q 102, BoF 08, ASIB V1 a SAG 887-2. Kultury typových kmenů *Eustigmatos*

*polyphem* (CAUP Q 102) a *Eustigmatos vischeri* (CAUP Q 101) se významně lišily ve velikostech buněk ( $p < 0.001$ ). U kmenu CAUP Q 101 jsem nepozorovala bučky větší než 15  $\mu\text{m}$ . Významně se lišila také velikost buněk typového kmene *Vischeria stellata* (SAG 887-2) od typového kmene *Vischeria punctata* (SAG 887-1) a *Vischeria helvetica* (UTEX 49). Nicméně, velikost buněk dvou posledně zmíněných kmenů (SAG 887-1 a UTEX 49) se významně nelišila ( $p > 0.001$ ).



**Obr. 4.** Porovnání velikosti buněk vybraných kmenů komplexu *Vischeria/Eustigmatos*. Modrou barvou jsou znázorněny typové kmeny.

U vybraných kmenů jsem testovala, zda v rámci komplexu *Vischeria/Eustigmatos* spolu koreluje genetická a morfologická vzdálenost (Tab. 5). Analýza ukázala, že vzdálenost genetická (Tab. S2) nekoreluje se vzdáleností morfologickou ( $p > 0,001$ ). To platí jak pro genetickou vzdálenost vypočítanou na základě ITS2 rDNA dat, tak pro *rbcL* data. Medián se chová podobně jako průměr (Tab. 5, S3, S4). Naopak variance se chová jinak (Tab. S5).

**Tab. 5.** Korelace mezi rozdílnými maticemi, které jsou získané z odlišných typů markerů.

	ITS2 rDNA	<i>rbcL</i>
Morfologie - průměr	0,9895	0,7419
Morfologie - medián	0,9896	0,3858
Morfologie - variance	0,2806	0,0535
ITS2 rDNA	-	-

## 4. Diskuse

### 4.1 Molekulární variabilita

Moje práce byla primárně zaměřena na posouzení diverzity a molekulární variability v rámci komplexu *Vischeria/Eustigmatos*. Tento morfologicky definovaný komplex vytváří monofyletickou linii v rámci eustigmatofytních řas. Na základě sekvencí ITS2 rDNA se mi podařilo zjistit, že se v rámci tohoto komplexu vyskytuje velká skrytá diverzita. Úsek ITS2 rDNA je však heterogenní (podrobněji dále v diskusi). Jeho použití pro budoucí vymezení taxonomických jednotek proto není příliš vhodné. Lepším genetickým markerem by mohl být gen *rbcL*. Přítomnost některých kmenů v rámci tohoto markeru nenáleží do více než jedné linie. Tento marker byl navíc doporučen některými autory k vymezení druhů eustigmatofytních řas (Fawley & Fawley 2007, Prior et al. 2009, Suda et al. 2002).

Cílem této práce nebylo detailně prozkoumat morfologickou variabilitu v rámci studovaných kmenů. Ve své práci jsem vzhledem k morfologické variabilitě sbírkových kmenů komplexu *Vischeria/Eustigmatos* akceptovala druhové určení kultur, které provedli kurátoři sbírek. Kmeny, které jsem izolovala sama nebo získala od spolupracovníků, jsem také neurčila do druhu a pracovala jsem pouze s pracovními názvy kmenů.

Výsledky této práce potvrzují to, co minulosti naznačilo několik studií. Jiří Pascher (1939) poukázal na to, že rod *Vischeria* spolu s rodem *Polyedriella*, z nichž byly do rodu *Vischeria* v minulosti přeazeny dva druhy, jsou blízce příbuzné s rodem *Pleurochloris*, z nichž byly dva druhy převedeny do rodu *Eustigmatos*. Pascher tedy tyto tři rody (*Vischeria*, *Polyedriella* a *Pleurochloris*) zařadil do řádu Pleurochloridaceae. Andersen et al. (1998) analyzovali sekvence 18S rDNA eustigmatofytních řas, kde byl zastoupen jeden druh rodu *Vischeria* a jeden druh rodu *Eustigmatos*. Ukázalo se, že tyto rody tvoří velmi těsný klastr. Neustupa & Němcová (2001) studovali flivotní cyklus neidentifikovaného druhu rodu *Vischeria*. Nápadná morfologická podobnost tohoto rodu s rodem *Eustigmatos* vedla tyto autory dokonce k závěru, že v budoucnu dojde ke sloučení obou rodů. Moje práce ukázala, že morfotypy *Eustigmatos* a *Vischeria* nejsou monofyletické. První z nich nevytváří samostatnou vývojovou linii, která by byla separována od druhého morfotypu. Dalo by se tedy říci, že *Vischeria* je vnitřní skupinou rodu *Eustigmatos*, nebo naopak. To by tedy znamenalo, že jeden rod je parafyletický a druhý polyfyletický. Nedá se však vyloučit ani to, že jsou polyfyletické oba rody, tedy že v rámci jedné linie určitého morfotypu druhotvorně vznikl převodní morfotyp.

Vzhledem k tomu, že podle taxonomických pravidel má při pojmenování jedinstvé jméno taxonu, který byl popsán dříve, prioritu pro pojmenování –í eji pojatého rodu zde má *Vischeria*. Prvním popsáným taxonem tohoto komplexu je *Vischeria stellata*. Tento druh v roce 1925 popsal Poulton jako *Chlorobotrys stellata* (Poulton 1925). Pascher (1939) později přeřadil tento druh do rodu *Vischeria*. Naproti tomu prvním popsáným druhem rodu *Eustigmatos* je *Eustigmatos magnus*. Tento druh byl původně popsán Petersenem v roce 1932 jako *Pleurochloris magna* (Petersen 1932). Převezení těchto doposud popsáných druhů rodu *Eustigmatos* (*E. magnus*, *E. polyphem* a *E. vischeri*) do rodu *Vischeria* by tak mohlo vést k vytvoření nových kombinací *Vischeria magna*, *V. polyphem* a *V. vischeri*.

Výsledky této práce poukázaly na obrovskou skrytou diverzitu v rámci komplexu rod *Vischeria/Eustigmatos*. Množství linií je možné ztotožnit s dříve popsánými druhy, a to *Eustigmatos vischeri*, *E. polyphem*, *E. magnus*, *Vischeria stellata*, *V. helvetica* a *V. punctata*. Každá z typových kultur vytváří samostatnou evoluční linii. Je zřejmé, že zde existuje velký stupeň kryptické diverzity. Navíc zcela jistě se dá očekávat, že s rozšířeným samplingem dojde k nárůstu počtu doposud neznámých linií. Tato studie je tak jednou z nejstajících po tu studií, které ukazují, že se u mnoha morfologicky definovaných taxonů vyskytuje kryptická nebo pseudokryptická diverzita. Některé takových studií v posledních letech přispěly k objevu genetické variability a skryté diverzity u několika rodů rozsovek (Amato et al. 2007, Pouliková et al. 2010), chrysofytních (Kynlová et al. 2010) nebo zelených řas (Kroken & Taylor 2010). Morfologické znaky tak u protistních organismů nemusí být vhodným kritériem, na kterém by se dala založit druhová determinace a zároveň odhalit druhová diverzita těchto řas. Stejně tak tomu je u zástupců *Vischeria/Eustigmatos* komplexu.

Zástupci třídy Eustigmatophyceae jsou kvůli své zelené barvě a tvaru buněk často zaměňováni se zelenými nebo xantofytními řasami (Hegewald et al. 2001, Eliáš & Neustupa in press). Ke konvergentní evoluci dochází také v rámci Eustigmatophyceae. Sekvenování 18S rDNA z dvou druhů rodu *Pseudocharaciopsis* ukázalo, že tento rod je polyfyletický. Moje práce vedle toho přispěla k objevení kryptické diverzity v rámci této třídy řas.

Izoláty, které byly v minulosti určeny jako *Eustigmatos magnus*, byly nalezeny u několika linií. Tento druh tak netvoří monofyletickou linii, geneticky separovanou od ostatních linií. Tuto skutečnost dokazuje to, že tento morfotyp jsem našla nejméně u dvou vzájemně nepříbuzných kmenů (HOST 4 a LEICH 2). Tento morfotyp je charakteristický tvorbou buněk o velikosti 9-18 μm (Hibberd 1981). Ty nejvíce mohou dosahovat 20-50 μm. *Eustigmatos magnus* je tak zřejmě obecným morfotypem, který se v evoluci komplexu rod *Vischeria/Eustigmatos* objevuje opakovaně. Je také možné, že tvorba buněk obrovských

velikostí by mohla být plesiomorfním znakem komplexu *Vischeria/Eustigmatos*. Linie, v nichž jsou zastoupeny kmeny HOST 4 a LEICH 2, na základě fylogenetické rekonstrukce *rbcL* sekvencí spadají na bázi tohoto komplexu. Nicméně vzhledem k tomu, že zde jako outgroup byly použity *rbcL* sekvence ostatních eustigmatofyt, které jsou ale fylogeneticky velmi vzdálené, nemůžeme si být jisti, že kořen evoluce komplexu *Vischeria/Eustigmatos* leží zrovna zde. Statistická podpora pro bazální pozici linie zahrnující kmen HOST 4 není vysoká. Na základě fylogenetických analýz ITS2 rDNA sekvencí, kdy byl výsledný fylogram založen metodou midpoint rooting, se linie zahrnující kmen HOST 4 ukázala být spolu s těmi dalšími liniemi sesterská ke všem ostatním liniím.

Typová kultura *Eustigmatos magnus* se ve veřejných sbírkách nedochovala. V případě, že pro vodní dokladový materiál chybí, pravidla Mezinárodního nomenklatorického kódu pro řasy, houby a rostliny (International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, ICN) dovolují zvolit si tzv. epityp, tedy takovou živou kulturu, která bude odpovídat pro vodnímu popisu taxonu, který se nezachoval. Tímto neotypem by u druhu *Eustigmatos magnus* mohl být kmen LEICH 2. Alternativně by jím mohl být také kmen HOST 4, jehož buňky dosahují velikosti přes 27 μm.

Vedle linií, které mohou být ztotožněny s pěti typovými kmeny, je tedy *Eustigmatos magnus* jediným druhem, který lze rozeznat v doposud popsané diverzitě těchto řas. Naproti tomu řádnu z linií nelze ztotožnit s žádnou z devíti popsaných *Vischeria* spp., které popsal Pascher ve třicátých letech minulého století (Pascher 1939). Tyto druhy jsou charakteristické přítomností výřstkové rýhy tvaru a četností na buňce. Od řádného z těchto devíti druhů bohužel neexistuje typová kultura. Pouze některé druhy byly, pokud v době svého popisu nalezeny v přírodě (Ettl 1978). Vzhledem k tomu, že jsem řádný z morfotypů, který by odpovídal některému z těchto druhů, nezaznamenala, je otázkou, zda Pascher tyto morfotypy skutečně pozoroval. Pokud ale připustíme, že se výřstky ztrácí nejen během kultivace, ale také v přírodě, mohly tyto druhy své charakteristické výřstky ztratit. Změny morfologie by tak mohly být častým fenoménem těchto řas.

Morfologická kritéria, na nichž je postavena současná klasifikace těchto řas, nejsou dostatečná pro určení jednotlivých kmenů do druhu. Jednotlivé rody se rozlišují na základě charakteru buněčného povrchu (buňky s výřstky a hrany u rodu *Vischeria*, hladké buňky u rodu *Eustigmatos*), konkrétní druhy pak především na základě velikosti buněk. Morfologické kritérium by však mohlo být velmi dobře aplikováno u druhu *Vischeria stellata*. Tento druh, který definoval Pascher na základě pravidelně uspořádaných kufelovitých výstupků na povrchu (Pascher 1939), se dá velmi snadno rozpoznat od ostatních linií. Takovýto morfotyp

se vyskytuje u všech kmenů, které náleží do stejné linie jako typový kmen SAG 887-2. Tento druh se tedy dá rozeznat nejen pomocí molekulárních znaků, ale také tradiční morfologie.

Ukázalo se, že předpokládaná typová kultura *Vischeria helvetica* získaná ze sbírky SAG (SAG 876-1) má identickou ITS2 rDNA sekvenci jako typová kultura *Vischeria punctata* (SAG 887-1). Obě tyto kultury mají heterogenitu v ITS2 rDNA, a to navíc ve stejných pozicích tohoto úseku. Obě tyto kultury mají své ekvivalenty v asové sbírce v Texasu. Kultura SAG 876-1 je v texaské sbírce uložena jako UTEX 49, kultura SAG 887-1 jako UTEX 153. Sekvence 18S rDNA obou typových kmenů pocházejících ze sbírky v Texasu jsou navzájem odlišné. Vzhledem k tomu, že je 18S rDNA velmi konzervovaná, vyuffívá se při rekonstrukci fylogeneze na vyšších taxonomických úrovních (Alverson et al. 2008). Naproti tomu mezerníkové oblasti se vyvíjejí rychle, a tak se pouffívají na řešení fylogeneze na úrovni druhů a nižší (Amato et al. 2007, Vanormelingen et al. 2008). Sekvence ITS2 rDNA kultur ze sbírky SAG by tedy mohly být odlišné. Namísto toho jsou identické. Z tohoto důvodu se lze domnívat, že původní kultura SAG 876-1 byla v této sbírce kontaminovaná nebo zaměněná s kulturou SAG 887-1. Velmi zajímavé je, že Hibberd (1981) ve své taxonomické studii pracoval s Chodatovým kmenem drfěným ve sbírce SAG jako SAG 876-1 a revidoval ho jako *Vischeria punctata*. Tuto domněnku podporuje také skutečnost, že *rbcL* ze SAG 876-1 a UTEX 153 jsou identické, zatímco UTEX 49 tvoří samostatnou linii. Skutečnou typovou kulturu *Vischeria helvetica* tedy představuje UTEX 49. SAG 887-1 a UTEX 153 jsou subkultury jednoho izolátu *Vischeria punctata*, které vyizoloval Vischer. Každý z typových kmenů *Vischeria punctata* (SAG 887-1, UTEX 153) a *Vischeria helvetica* (UTEX 49) vytváří samostatnou linii. Buňky s výrůstky na povrchu by se mohly u obou druhů vyskytovat velmi vzácně (Hibberd 1981). První zmíněný druh byl definován přítomností převážně 7-9 μm velkých buněk. Tento druh by mohl vytvářet buňky penta- i hexagonálního tvaru, které jsou však v kultuře velmi vzácné. Oproti tomu, u druhu *Vischeria helvetica* by se mohly vyskytovat převážně 9-12 μm buňky kosodelníkového nebo pentagonálního tvaru, které jsou velikostně podobné hladkým buňkám v kultuře (Hibberd 1981). Rozeznat však jeden druh od druhého není možné. Ve své studii jsem zjistila, že typová kultura *Vischeria helvetica* (UTEX 49) nevytváří během kultivace výrůstkaté buňky, zatímco u *Vischeria punctata* (SAG 887-1) se výrůstkaté buňky během kultivace (po těchto týdnech) postupně ztrácí. Mezi oběma kulturami navíc není velikostní rozdíl. Rozlišení těchto druhů pomocí morfologie proto není možné. Zajímavé je, že v této linii kmenů náležících do linie *V. punctata* je pod tímto označením uvedena také ve sbírkách. Podobně tomu je u linie *V. helvetica*. Přestože jsem mezi kulturami žádný rozdíl nezaznamenala, zdá se, že morfologie těchto druhů je pro izolátory a kurátory

sbírek relativně dobře uchopitelná. Morfologie kmenů se tak mohla během let, po které byly kultury přestovány v kultuře, změnit.

Molekulárním markerem, který se často využívá pro rozlišení odlišných druhů, je porovnání ITS2 sekundárních struktur z blízkce příbuzných organismů. U většiny testovaných eukaryot, u nichž je známo pohlavní rozmnožování, se ukázalo, že přítomnost jifi jen jedné CBC v konzervovaných oblastech helixu II a III ITS2 rDNA poukazuje na absolutní neschopnost vzájemného křížení (Coleman 2000, 2003, 2009, Müller et al. 2007). Naproti tomu změny v méně konzervovaných oblastech (na helixu I a IV), stejně tak jako přítomnost hemiCBC v konzervovaných oblastech, nekorelují s neschopností křížení. Coleman (2000) definovala seskupení organismů s absencí CBC v konzervovaných ITS2 oblastech jako CBC klade. Tento CBC klade je rozlišitelný od dalších CBC kladů přítomností minimálně jedné CBC v konzervovaných částech ITS2. Moje studie ukázala, že se v ITS2 struktuře kmenů komplexu *Vischeria/Eustigmatos* nevyskytují žádné CBC. Celý komplex bychom tedy mohli považovat za jeden samostatný CBC klade. Tento CBC by mohl být potenciálně považován za jeden druh. Podle pravidla priority jméno tohoto druhu znělo *Vischeria stellata*. Tu totiž popsal Poulton v roce 1925 jako *Chlorobotrys stellata* (Poulton 1925).

Dlouhou dobu se nevědělo, zda se CBC nemohou vytvářet postupně vznikající hemiCBC. Studie zabývající se řasami řádu Ulvales ukázala, že CBC a hemiCBC se vyvíjejí zcela nezávisle (Caisová et al. 2011). Jen vyjímek nám fme tyto změny nalézt na stejné pozici ITS2 struktury. HemiCBC tak nepříspívají k tvorbě CBC. Jednotlivé CBC se vyvíjejí postupně se vyskytující nepárující se mezistupně (Caisová et al. 2011). Nelze tedy očekávat, že hemiCBC, které lze u komplexu *Vischeria/Eustigmatos* nalézt, jsou jakýmsi mezičlánkem vedoucím ke vzniku CBC.

Nicméně absence CBC nemusí znamenat, že se studované organismy mezi sebou kříží (Müller et al. 2007). Bylo zjištěno, že pokud se mezi dvěma taxony nevyskytují žádné CBC, pouze v 76 % případů náležejí tyto taxony ke stejnému biologickému druhu. Frekvence výskytu CBC koreluje s evoluční divergencí mezi dvěma ITS2 sekvencemi. Neexistuje zde však žádný příinný vztah mezi výskytem CBC a speciálními událostmi. Přítomnost CBC je tak spíše mřítkem evolučního času, který byl dostatečně dlouhý na to, aby během této doby došlo ke speciální události. CBC jsou tak dostatečným, ne však nezbytným kritériem pro rozlišení druhů (Müller et al. 2007). Je tedy možné, že ITS rDNA jsou u komplexu *Vischeria/Eustigmatos* relativně konzervované a nemusí reflektovat speciální události.

CBC koncept je v kombinaci s fylogenetickou analýzou a morfologickými znaky hojně používán k vymezení druhů zelených řas (Bock et al. 2011, Krienitz et al. 2011). Použití CBC



konceptu v-ak není vhodné za situace, kdy víme, že mezi populacemi nemusí existovat biologická bariéra a m-že docházet k popula-nímu toku. To, že se mezi sekvencemi ITS2 rDNA nevytv-íly CBC, nemusí znamenat, že bychom m-li považovat celý komplex za jeden druh. Jak bylo zmín-eno výše, *Vischeria stellata* je druhem, který lze snadno rozpoznat na základ-ě morfologie bun-ek. Fylogenetické analýzy *rbcL* sekvencí ukazují, že *Vischeria stellata* není bazální linií tohoto komplexu. Pokud by tomu tak bylo, mohli bychom její sesterskou linii považovat za druh *Vischeria magna*. Druhým nejstar-ším taxonem tohoto komplexu je totiž *Eustigmatos magnus*, p-řevodně popsán Petersenem v roce 1932 jako *Pleurochloris magnus* (Petersen 1932). Poufityý outgroup je v-ak hodn-ě divergentní, proto si nem-žeme být zcela jisti, zda ko-ene evoluce *Vischeria/Eustigmatos* leží v míst-ě, ve kterém se odv-ětvuje linie zahrnující kmeny LOK 107 a HOST 4 od ostatních. Pozice jednotlivých kmen-ů ve fylogenetickém stromu totiž závisí na pozici ko-ene. *Vischeria stellata* by tak mohla být monofyletickou linií, což je základní požadavek sou-časné taxonomie pro vytvá-ění nových taxon-ů. Pokud bychom ale cht-ěli rozli-šovat pouze druhy *V. stellata* a *V. magna*, genetická diverzita by v rámci nich byla p-řev-ě velká. Bylo by vhodné, kdyby stupe-ň fylogenetické vzdálenosti mezi liniemi byl relativn-ě stejný. Otázkou tedy je, jak bychom m-li vymezit druhy, aby toto roz-člen-ění odpovídalo zji-š-ené fylogenetické diverzit-ě. Na druhou stranu, kdybychom m-li každou nalezenou linii popsat jako samostatný druh, diverzita této skupiny by výrazn-ě vzrostla v-ě tomu, kolik druh-ů rozeznáváme dnes. Popis každé nové linie by vyžadoval detailní studium životního cyklu p-řev-ě nových kmen-ů. Prozatím tak z-ejm-ě z-ane otázkou, jakým zp-ůsobem by m-ly být jednotlivé druhy roz-člen-ěny. Je také možné, že existuje jiný, nám prozatím neznámý fenotypový znak, který koreluje s evolu-ční strukturou tohoto komplexu. Eustigmatofytin-asy jsou známy svým neobvyklým biochemickým složením (Volkman et al. 1999a). Je možné, že by tyto látky mohly sloužit jako dobré taxonomické markery. Podobným zp-ůsobem byly vymezeny některé druhy zelené asy rodu *Chlorella* (Huss et al. 1999, Kessler & Huss 2004).

To, jak vymezit druhy je již dlouhou dobu v biologii aktuálním tématem. Podle de Queiroze (2007) jsou druhy pro-člov-ka natolik komplexními jednotkami, které existují na vyš-ší úrovni organizace, než je-člov-ek schopen vnímat pouhým pohledem a d-ěle-šující, než je-člov-ek schopen zaznamenat, že je-člov-ek nem-ůže vnímat pouze na základ-ě tradi-čních druhových kritérií. Druhy jsou podle něj samostatn-ě vyvíjející metapopula-ční linie. Vedle druhového vymezení pomocí druhového konceptu tak existuje roz-člen-ění na základ-ě mnohorozm-ěrných analýz odli-šných vlastností mezi jedinci uvnit-ř populací (Hart 2010). V sou-časné době panuje

také názor, že druhy ve skutečnosti neexistují a jsou pouze umělým konstruktem taxonomie (Boenigk et al. 2012).

Nepřítomnost CBC v helixu II a III by mohla známit, že mezi jednotlivými kmeny dochází ke vzájemnému křížení. Pohlavní rozmnožování však doposud nebylo u tohoto rodu, stejně tak jako u fládného eustigmatofytního zástupce, pozorováno (Hibberd 1980, 1981, Eliáš & Neustupa in press). S podobnou situací se setkáváme u naprostě většiny protistních organismů (Schurko et al. 2008). Nicméně během předchozích dvou let byly osekvenovány genomy dvou mořských zástupců rodu *Nannochloropsis* (Pan et al. 2011, Radakovits et al. 2012). U druhu *Nannochloropsis oceanica* byly nalezeny dva homology meiotických genů (Pan et al. 2011). Tyto geny jsou přítomny konzervovaně u řas, rostlin, hub a některých protistů (Malik et al. 2008). Podobné sekvenování genomu *Nannochloropsis gaditana* ukázalo na přítomnost genů kódujících homology známých meiotických proteinů (Radakovits et al. 2012). Zjistilo se, že mnoho z těchto genů nebylo při použití různých kultivačních podmínek exprimováno. Přítomnost většiny z nalezených genů (98 %) byla při těchto podmínkách transkribována. Autoři této studie se přesto domnívají, že k expresi genů kódujících meiotické proteiny může docházet, avšak kultivační podmínky by musely být jiné než ty, které byly zkoumány. Další možností je, že tyto geny nejsou transkribovány z důvodu, že tento organismus již dlouhou dobu nepodstupuje meiotickou rekombinaci a že tyto geny již nejsou funkční (Radakovits et al. 2012). Není tedy jasné, zda se eustigmatofytní řasy rozmnožují pohlavně, nebo zda během evoluce tuto schopnost zcela ztratily.

#### **4.2 Revize sbírkových kmenů provedené na základě morfologických a fylogenetických analýz**

Během morfologických pozorování kultur jsem zjistila, že u kmenu CCMP 387, který byl původně určen jako *Eustigmatos magnus*, se vyskytují buď velmi malé velikosti (5-7 μm). Buď velmi velké (20 μm) jsem nepozorovala. Tato kultura by tak spíše odpovídala definici druhu *E. vischeri* (Hibberd 1981). Buď velmi velkých rozměrů by ale mohly vznikat během pozdějších stádií kultivace. U tohoto kmenu jsem ale již dříve, nezávisle na morfologických pozorováních vybraných kultur, pozorovala buď velmi velké výrůstky. Takovéto buďky jsem pozorovala také u některých kmenů, u nichž si původní autorka, která je izolovala a určila (Alena Lukešová, Ústav pro dějiny biologie Akademie věd České republiky, České Budějovice), nebyla jista rodovým nebo druhovým zařazením (ME 12, ME 17, ME 23, ME 24, ME 25 a ME 27). Moje pozorování odhalila, že po těchto týdnech kultivace dochází ke změně morfologie buněk. Buďky, které mají povrch modelovaný do podoby výrůstků, jsou zejména

přítomny pouze v ranných fázích kultivace. Postupem času se tyto výrůstky ztrácejí a v kultuře jsou přítomny pouze hladké buňky. To, že u některých z těchto kmenů dochází ke změně morfologie, není překvapivé, protože kmeny ME 23, ME 24 a ME 27 jsou blíže příbuzné typovému kmenu *Vischeria punctata* (SAG 887-1), u kterého jsem tuto morfologickou změnu také pozorovala. Míra genetické odlišnosti je stejná jako v případě vnitrogenomové variability typového kmenu *Vischeria punctata*.

U druhu *Vischeria stellata* jsou výrůstky na buňkách přítomny dlouhou dobu po zaočkování kultury. Pouze u velmi starých kultur se vyskytují buňky s hladkým povrchem. Nicméně u ostatních kmenů, u kterých jsem výrůstky pozorovala, se výrůstky ztrácejí mnohem dříve (po těchto týdnech). Otázkou je, zda ke ztrátě výrůstků dochází pouze v důsledku kultivačních podmínek, nebo k tomu dochází také v přírodě. Dlouhodobé drfění kmenů v kultivačních podmínkách by teoreticky mohlo změnit morfologii buněk. Neustupa (2005) zkoumal možnou fenotypovou plasticitu zelené sladkovodní řasy *Keratococcus bicaudatus*. Porovnání mezi 11 týdny starou kulturou a kulturou drfěnou v kultivačních podmínkách po dobu pěti let ukázalo, že si kultura ponechává morfologické znaky, na základě nichž byl tento druh popsán. Výsledky této studie však nemusí platit u eustigmatofytních řas. Neustupa & Němcová (2001) zkoumali životní cyklus tří terestrických řas třídy Eustigmatophyceae. Tito autoři zjistili, že *Pseudocharaciopsis ovalis* je schopen vytvářet dva odlišné morfotypy v závislosti na kultivačních podmínkách. Kmen pěstovaný na pevném médiu vytváří kapičkovitý tvar buněk, zatímco v kapalném médiu vytváří přisedlá stádia. Studován byl také druh *Pseudellipsoidion edaphicum*, který vytváří buňky eliptického tvaru a po nich se vytvářejí buňky kulovitěho tvaru. Rod *Vischeria* také vytváří několik morfotypů buněk, které zahrnují kulovité, polyedrické a u starých kultur také protáhlé eliptické buňky. Polyedrické buňky se vyskytují nejprve v izolovaných vzorcích než v kultuře. Neustupa & Němcová (2001) se domnívají, že variabilita tvaru buněk eustigmatofytních řas je způsobena ontogenetickou posloupností různých stádií životního cyklu, ne však v důsledku fenotypové plasticity. To by znamenalo, že stádia nebo morfotypy, které pozorujeme, jsou schopny tyto organismy reálně vytvářet také v přírodě. Hegewald et al. (2007) pozorovali, že tvar lalok buněk eustigmatofytní řasy *Pseudotetraëdriella kamillae* závisí na kultivačních podmínkách. Tato sladkovodní řasa je charakteristická čtyřmi laloky, které se však v kultuře nevytvářejí (vlastní pozorování).

Morfologie kmenů by se tedy mohla v důsledku kultivačních podmínek změnit. Druh *Vischeria helvetica* byl přechodně popsán na základě polyedrických buněk. Pascher (1939) dokonce považoval tento typ buněk za natolik odlišný od výrůstků buněk rodu *Vischeria*,

Je tento druh přidán do rodu *Polyedriella*. Já sama jsem však polyedrické buňky v kultuře typového kmenu UTEX 49 nepozorovala, a to ani u jiných kmenů linie *V. helvetica*. Někdy s takovýmto morfotypem jsem však pozorovala v kulturách jiných kmenů (např. BoF 79, původně určený jako *V. stellata*). Tento fakt by mohl naznačovat, že kmeny plasticky reagují na různé kultivační podmínky. Skutečné rozdíly, které existují mezi kmeny v přírodě, tak nemusíme pozorovat, pokud daný kmen kultivujeme delší dobu. Rozdílná doba, po kterou jsou kmeny drženy v kultuře, by nám mohla bránit ve správném rozlišení kmenů.

Někdy sbírkových kmenů, které jsem studovala, je v různých podmínkách udržováno více než 40 let. Chodit v kmen SAG 887-2 je udržován v těchto podmínkách dokonce více než 80 let. Tento kmen si však, jak už bylo zmíněno, výrůstky na buňkách ponechává po dlouhou dobu kultivace. Schopnost tvorby výrůstků na povrchu buňky mohl mít jistě i celý studovaný komplex. Původně mohly být pravidelně distribuovány po celém povrchu buňky, tak jak je tomu u *Vischeria stellata*. Některé kmeny mohly z nějakého důvodu ztratit schopnost tvořit výrůstky. Jiné kmeny si mohly tuto schopnost ponechat, avšak po určitém čase se schopnost jejich tvorby ztrácí. Nelze vyloučit, že schopnost jejich tvorby se mohla vyvinout několikrát nezávisle. Výrůstky by mohly být uzpůsobením proti sedimentaci v kapalném prostředí. To však zřejmě není tím pravým důvodem, protože tyto struktury na buňkách vznikají, nebo pouze u zkoumaných kmenů bylo izolováno z vodního prostředí, do něhož byly zřejmě zaneseny prostřednictvím v trů (Hibberd 1981). Otázkou tedy nadále zůstává, z jakého důvodu se výrůstky vytvářejí a proč se během kultivace ztrácejí.

Typový kmen *Eustigmatos polyphem* (CAUP Q 102) také vytváří vlastní linii. Hibberd (1981) tento druh definoval na základě přítomnosti hladkých buňek, které jsou ve velmi vzácných případech větší než 20 μm. Výsledky mého pozorování se tak shodují s Hibberdovým pozorováním stejného typového kmenu. Nápadný rozdíl ve velikostech buňek jsem zjistila mezi typovou kulturou *E. polyphem* (CAUP Q 102) a *E. vischeri* (CAUP Q 101). Má pozorování kmenu CAUP Q 101 se shodují s Hibberdem (1981), který nepozoroval buňky větší než 20 μm.

Hibberd (1981) ve své taxonomické revizi studoval Vischer v izolát *Pleurochloris magna*. Tento kmen byl později uložěn do typových sbírek pod známým označením. Jedna subkultura tohoto kmenu jím byla revidována jako *Vischeria helvetica*, zatímco další subkultury pak jako *Vischeria punctata*. V případě subkultury CCAP 860/2, z níž jsem měla k dispozici *rbcL* sekvenci, se ukázalo, že tento kmen skutečně náleží do linie *V. punctata*. Tento fakt by tak mohl potvrzovat Hibberdovu domněnku, že původní Vischer v kmen *P. magna* byl v některých sbírkách ztracen a nahrazen kulturou *V. punctata*, která je blíže příbuzná

typovému kmenu UTEX 153. Nedá se sice vyloučit, že tato kultura zminilá zhem padesáti let kultivace svou morfologií a základními vlastnostmi. Hibberd (1981) tak uvádí, že *Eustigmatos magnus* je schopen výrůstky na povrchu vytvářet, Petersen ani Vischer je však nepozorovali.

Do linie *Vischeria punctata* podle mých analýz patří také kmen UTEX 86, který má identickou *rbcL* sekvenci jako typová kultura Vischerova kmenu UTEX 153. Hibberd (1981) zjistil, že plovoucí Vischer v kmen druhu *Pleurochloris magnus* se dostal do sbírky v Texasu. Hibberd u tohoto kmenu pozoroval výrůstky a přerušil ho jako *V. punctata*. Jeho závěry o identitě tohoto kmene jsem tedy potvrdila ve své práci. Hibberd (1981) také studoval kmen ASIB S1, který byl v innsbrucké sbírce evidován jako *Pleurochloris magnus*. Morfologická pozorování tohoto kmene ho vedla k závěru, že tento kmen je ve skutečnosti *Vischeria stellata*. Tento kmen podle výsledků mých morfologických a fylogenetických analýz skutečně odpovídá popisu druhu *Vischeria stellata*.

Dva izoláty, které jsem studovala, jsou ve veřejných sbírkách udržovány jako zástupci rodu *Chloridella*. *C. neglecta* je typovým druhem rodu *Chloridella*. Plovoucí byla popsána Pascherem a Geitlerem v roce 1925 jako *Chlorobotrys neglecta* (Guiry & Guiry 2012). Pascher ho v roce 1932 převedl do rodu *Chloridella*. Pascher (1939) zařadil tento rod do tribu Pleurochlorideae společně s rodem *Pleurochloris*, jehož dva zástupci byly v minulosti převedeny do rodu *Eustigmatos* (Hibberd 1981). Pascher rozlišil tyto rody na základě toho, zda jsou či nejsou schopny vytvářet zoospory. *Pleurochloris* tuto schopnost má, zatímco *Chloridella* se rozmnožuje pouze pomocí autospor. Ve své studii jsem pracovala s kmenem, který byl určen jako *C. neglecta* (SAG 48.84), dále pak jako *C. simplex* (CCALA 279). Tyto druhy se liší počtem plastidů. Zatímco *C. simplex* má plastid jeden, *C. neglecta* jich má 4 až 6 (Ettl & Gartner 1995). Avšak kmene, které jsem studovala, mají vždy plastid pouze jeden. Udržování kmenu SAG 48.84 pod názvem *Chloridella neglecta* je nejspíše způsobeno nesprávným taxonomickým určením této řasy. Zástupci komplexu *Vischeria/Eustigmatos* totiž mají v buňce vždy pouze jeden plastid. Určení kultury CCALA 279 jako *C. simplex* by mohlo být způsobeno tím, že u tohoto kmene nebyly pozorovány zoospory. Indukovat tvorbu zoospor přitom není snadnou záležitostí. Některá autorům se podařilo indukovat produkci zoospor přidáním prvního plovoucího tekutého média do kultury, která se nacházela ve stacionární fázi růstu (asi měsíc stará) a jejím následným ponecháním pár dní ve tmě (Hibberd & Leedale 1972, Santos & Leedale 1992). Mě se zoospory podařilo indukovat pouze u jediného kmenu (UTEX 49) po třech týdnech kultivace při pozorování kultury ve světelném

mikroskopu. Vzhledem k tomu, že se zoospory nevytváří tak často, jejich absence je tak jako kritérium pro vymezení rodu *Chloridella* nevhodné.

V časových sbírkách je také udržován kmen CCAP 855/1, který je v této sbírce uveden pod pseudonymem jako *Ophiocytium majus*. Pseudokultura tohoto druhu byla nejspíše kontaminována druhem z komplexu *Vischeria/Eustigmatos*, protože její na základě světelné mikroskopie je zřejmé, že tato řasa je zástupcem právě tohoto komplexu. *Ophiocytium* je kokální řasa válekovitého tvaru s protaženými konci buněk, která náleží do třídy Xanthophyceae (Maistro et al. 2007). Kultura CCAP 855/1 je však kokální řasa s pravidelně uspořádanými výrůstky na povrchu. Analýza ITS2 rDNA sekvencí potvrdila, že tento kmen náleží do linie *Vischeria stellata*. Ve stejné sbírce (CCAP) jako tento kmen se nachází typový kmen druhu *Vischeria stellata* (CCAP 887/2B), kterou Chodat vyizoloval před rokem 1925. Vzhledem k tomu, že je kmen CCAP 855/1 eustigmatofytní řasou, je možné spekulovat, že právě v této sbírce došlo ke kontaminaci pseudokultury xanthofytní řasy *Ophiocytium majus* kulturou *Vischeria stellata* (CCAP 887/2B). To poukazuje na problém, že kmene v časových sbírkách nemusí být vždy správně taxonomicky určení. Navíc případy záměny i kontaminací jinými kulturami nejsou nijak vzácné.

Kmen UTEX 2631 je v texaské časové sbírce uveden jako *Chlorarachnion globosum*. Již dříve již fylogenetické studie zaměřené na zástupce chlorarachniofytních řas odhalily, že se ve skutečnosti jedná o eustigmatofytní řasu (Gile et al. 2010). Když jsem publikovanou ITS2 rDNA sekvencí z tohoto kmenu porovnávala k souboru sekvencí, které jsem získala z dalších kmenů komplexu *Vischeria/Eustigmatos*, ukázalo se, že tato sekvence je zcela odlišná. Tento kmen byl proto ze sbírky UTEX objednan. Porovnání mnou získané a publikované ITS2 sekvence ukázalo, že se tyto sekvence liší o jeden nukleotid, což je zřejmě způsobeno sekvenční chybou. Tato chyba však neměla na výsledek fylogenetické analýzy žádný vliv a ukázala, že tento kmen je opravdu odlišný od všech ostatních kmenů. Samotné nesprávné určení této kultury by mohlo být způsobeno morfologickou podobností druhu *C. globosum* k eustigmatofytům. Typová kultura druhu *C. globosum*, který byl převeden do rodu *Lotharella*, se totiž v životním cyklu vyskytuje ve formě kokálních stádií (Ishida et al. 1996). Buňky obsahují více plastidů a z každého z nich vyčnívá pyrenoid (Ishida & Hara 1994). Polygonální pyrenoid vybíhající z jediného plastidu, který je v buňce přítomen, je typickým znakem ředy Eustigmatataceae, do které se řadí zástupci komplexu *Vischeria/Eustigmatos* (Fišerová 2012). Staré kultury druhu *L. globosum* vedle toho mohou v cytoplasmě obsahovat červené zástřešky (Ishida & Hara 1994), které by mohly připomínat tzv. reddish globules u eustigmatofytů.

### 4.3 Morfologická a genetická vzdálenost

Zástupci komplexu *Vischeria/Eustigmatos* obývají především terestrické habitáty (Ettl 1978, Ettl & Gartner 1995). Převládá v tomto prostředí ovlivněná morfologie těchto kokálních organismů. Terestrické organismy se na toto prostředí snažily přizpůsobit snížením poměru povrch/objem, což často vede ke konvergentní evoluci morfologie stélek. Morfologické znaky tak často s fylogenetickými vztahy nesouvisí (Rindi et al. 2009). Ke stejnému závěru jsem dospěla ve své diplomové práci. Velikost buněk, na základě které se v současné době rozlišují druhy, neodrážejí přímé vztahy těchto druhů. Změny morfologie, ke kterým dochází v krátkých časových obdobích, jsou velmi malé. Tyto změny se během těchto změn zřejmě pohybují v omezeném tvaroprostoru. Buněk si ponechávají kulovitý tvar. Významnější změny, probíhají na úrovni velikostí buněk. Buněk se zvětšují nebo zmenšují nezávisle na změnách genetických.

### 4.4 Intragenomová heterogenita ITS2 rDNA

Mezerníkové oblasti se ukázaly být dobrým genetickým markerem pro řešení fylogenetických hypotéz u mnoha skupin protistních organismů (Amato et al. 2007, Kynčlová et al. 2010, Logares et al. 2009, Sorhannus et al. 2009, Vanormelingen et al. 2008). Výsledky mé práce zaměřené na molekulární variabilitu komplexu rodů *Vischeria/Eustigmatos* ukázaly, že se v genomu některých kmenů vyskytuje vnitrogenomová variabilita ITS2 rDNA oblasti. Jak se zdá, přítomnost heterogenity ITS2 rDNA není omezená pouze na tento komplex. Sekvenování ITS rDNA z několika rodů Eustigmatophyceae poukázalo na přítomnost heterogenity v tomto úseku DNA (Eliáš, osobní sdělení). Z tohoto důvodu tento úsek DNA není vhodný pro použití v taxonomii k řešení druhového konceptu jak u komplexu *Vischeria/Eustigmatos*, tak zejména u ostatních druhů Eustigmatophyceae.

Z celkového množství 97 zkoumaných kmenů, jsem u 22 zjistila vnitrogenomovou heterogenitu v ITS2 rDNA. Tato sekvenční variabilita ribozomálních genů je v eukaryotických genomech velmi nízká, navzdory přítomnosti homogenizačního procesu tzv. concerted evolution (Álvarez & Wendel 2003). Jednotlivé rDNA jsou v počtu desítek až několika desítek tisíc kopií uspořádány v buňce tandemově za sebou na jednom nebo několika místech (na jednom i více chromosomech) v genomu (Coleman 2007). Mutace se může stochasticky vyskytnout kdekoli v tandemově se opakující jednotce (Ganley & Kobayashi 2007). Vzhledem k tomu, že rDNA je značně redundantní, flákný selekční tlak na tyto mutace nepůsobí a v genomu tak mohou udržitelně přetrvávat. Tato mutace se může buď udržet a

duplikací rozšířit v genomu, nebo se ztratí. <sup>T</sup> Kodlivé mutace se mohou šířit až do doby, než se začnou projevovat na funkčnosti buňky. Vysoká míra heterogenity se vyskytuje v nekódujících oblastech (např. ITS), které jsou nejméně omezené selekcí (Ganley & Kobayashi 2007). Všechny ostatní sekvenční variability rDNA jsou málo zastoupeny. Tato skutečnost naznačuje, že změny v těchto variantách pravděpodobně vznikly v nedávné době, anebo že takto mutované varianty nejsou schopny se rozšířit do vysokého počtu kopií z důvodu jejich funkčních omezení. V konečné fázi by mělo dojít k fixaci, kdy mutovaná varianta nahradí v genomu převládající varianty. Výskyt různých kopií by tak mohl být výsledkem toho, že určitá varianta je schopna převládnout nad ostatními variantami. Je také možné, že některé varianty jsou v genomu přítomny v tak malém množství, že se jejich efekt vůbec neprojevuje. Mohlo by to být ale také tak, že buňka je schopna eliminovat minimálně jednu z variant, které se v ní vyskytují. Na druhé straně je možné, že se v buňce transkribuje pouze jedna varianta rDNA a ta potom podléhá dalším procesům (Muir et al. 2001).

U multigenových rodin, které jsou v genomu přítomny ve stovkách nebo tisících kopiích, byla pozorována větší podobnost jednotek těchto multigenových rodin v rámci jednoho druhu nežli podobnost mezi kopiemi z odlišných druhů. Takovýto fenomén je znám jako concerted evolution (Álvarez & Wendel 2003). Tento proces, během něhož dochází k eliminaci sekvenční variance uvnitř genomu, je způsoben dvěma mechanismy. U pohlavně se rozmnožujících organismů k tomu dochází během pohlavního rozmnožování prostřednictvím crossing-overu. Dalším mechanismem homologické rekombinace, který vede k unifikaci sekvenčních variant, je genová konverze, ke které dochází jak během meiotické rekombinace, tak během vegetativní fáze životního cyklu (Álvarez & Wendel 2003, D'Allelio et al. 2009). Během tohoto procesu dochází k přenosu genetického materiálu z donorové sekvence do homologního akceptoru (Chen et al. 2007). Samotné nahromadění vnitrogenomové sekvenční diverzity nastane, pokud je frekvence genové konverze nízká a rychlost nebo speciace (Gribble & Anderson 2007).

Přítomnost více různých kopií rDNA v genomu některých kmenů by také mohla být způsobena hybridizací mezi kmeny, kdy potomek má jednu variantu od jednoho rodiče, druhou od druhého (Coleman 2007). To by tedy znamenalo, že k upříkladu mezi kmenem BoF 114 a některým z kmenů linie zahrnující kmeny ME 18, ME 19, CCALA 860/7 dochází k hybridizaci. Dvě zaznamenané varianty v genomu kmene BoF 114 by tak mohly pocházet z těchto rodičovských kmenů. Vzhledem k tomu, že takovéto případy by se daly nalézt mezi kmeny dalších linií, nelze vyloučit, že hybridizace je procesem, který formuje diverzitu této



skupiny as. Vedle dvou rodičovských variant se v jádru mohou vyskytovat další varianty, které vznikají díky rekombinaci (Álvarez & Wendel 2003, D'Álelio et al. 2009). Takovýto případ jsem v rámci své práce nezaznamenala. To může být způsobeno tím, že sekvence ITS2 rDNA jsou velmi podobné a málo variabilní. Výběrem jiného markeru by se případně dalo zjistit, zda mezi kmeny dochází ke křížení (Casteleyn et al. 2009).

V rámci studovaného komplexu máme najít kmeny, jejichž varianty ITS2 rDNA kladují uvnitř stejného kladu. Takovým příkladem by mohl být kmen MarT13, jehož dvě zjištěné varianty náleží do stejného kladu. Majoritní varianta se od té minoritní liší insercí jednoho nukleotidu. To by mohlo naznačovat, že výskyt těchto variant v genomu těchto kmenů není výsledkem hybridizačního procesu. Přítomnost více než jedné kopie ITS2 rDNA v genomu některých kmenů by mohla být způsobena ancestrálním polymorfismem. Ten nastává u blízkých druhů, u kterých nedošlo k úplnému sortování sekvencí (Ward et al. 2002). Předešlý komplex mohl mít v jádru všechny z nalezených variant, které se udržely po mnoha speciálních událostech. Postupně došlo k vymizení několika povodních variant a naprostému převládání jedné z nich. Takovýto stav, kdy v genomu kmenů jedné linie dominuje pouze jedna varianta ITS2 rDNA, lze pozorovat například u linie *Vischeria stellata*. Některé kmeny si však ponechaly více než jednu z ancestrálních variant. Jako příklad si máme vzít kmen CAUP Q 201, který má dvě varianty ITS2 úseku. Majoritní varianta tohoto kmenu je identická s majoritními variantami kmenů BGPZ6 a BGPZ 91. Minoritní varianty těchto tří kmenů jsou také shodné a zároveň identické s majoritními variantami kmenů CALU 11, SAG 887-1 a SAG 876-1, jejichž minoritní varianty jsou identické. Zajímavé tedy je, že majoritní varianty některých kmenů jsou identické s minoritními variantami kmenů jiných a naopak. To tedy znamená, že neexistuje žádné pravidlo, podle kterého by se u kmenů dané linie ztrácel pouze jeden typ varianty (majoritní i minoritní). Ztráta určité varianty je tak zejména výsledkem náhody.

Přímé sekvencování ukázalo, že se v genomu některých kmenů vyskytuje více než jedna varianta ITS2 rDNA. Součástí některých kmenů může být pouze jedna z těchto variant. Pokusila jsem se tedy zjistit, zda je v genomu kmenů s jednou zjevnou variantou nenachází ještě další varianta. Výsledky tohoto testování nenaznačily, že by se v genomu těchto kmenů vedle varianty zjištěným sekvencováním, mohla vyskytovat další varianta. Avšak vzhledem k tomu, že během tohoto testování byly použity stejné podmínky PCR jako při běžné amplifikaci ITS rDNA, nelze vyloučit, že se varianta, jejíž přítomnost jsem u daných kmenů testovala, v genomu těchto kmenů vyskytuje. Zvolení jiných PCR podmínek by mohlo vést k

amplifikaci cílových variant. K upřesnění teploty během annealingu vedoucí ke zvýšení specificity, by mohlo vést k amplifikaci dané varianty (Bartlett & Stigling 2003).

Další možností by mohlo být to, že některé varianty jsou pseudogeny a funkční je pouze jedna varianta. Stále funkční sekvence jsou charakteristické vzájemnou vysokou podobností, zatímco pseudogeny jsou méně konzervované a obsahují větší počet indelů (Gribble & Anderson 2007). Za pseudogen by ale musela být považována celá rDNA, anebo minimálně celá oblast ITS (ITS1-5.8S-ITS2) rDNA, což by se dalo poznat podle heterogenity v 5.8S oblasti (Coleman et al. 2007). Potencionální pseudogeny by se daly také poznat na základě strukturních analýz sekundárních ITS2 struktur, kdy některé varianty mohou mít v porovnání s funkčními variantami takové substituce bází nebo indely, které mohou být narušeny tvarem sbalení těchto molekul (Thornhill et al. 2007). Ve srovnání s funkčními geny jsou pseudogeny charakteristické nízkou stabilitou sekundárních struktur, deaminací způsobené zvýšením poměru AT bází a vyšší substituční rychlostí v konzervovaných oblastech (Buckler et al. 1997). Vzhledem k tomu, že jsem heterogenitu v 5.8S rDNA ani jiné znaky (chybné sbalení ITS2 rDNA, nízký poměr GC bází) ITS2 molekul, jež by naznačily pseudogenní povahu daných variant, nezaznamenala, nalezené varianty nepovažuji za pseudogeny. Nelze však vyloučit možnost, že se v případě některých variant jedná o pseudogeny, které jsou v pozdějších fázích vývoje směřující k degradaci.

Vnitrogenomová heterogenita některých kultur, jako je K 1, K 10, BGPZ 6, BGPZ 91, ATA 3-4 Q, ATA 11-CQ-CV 3 a ATA 2-1 KH-12, by mohla být způsobena kontaminací jinou kulturou během pěstování ve sbírkách nebo chybou v naší laboratoři (izolaci DNA, PCR). Tyto kultury tak nemusí být monoklonální. Vzhledem k tomu, že jsem s těmito kmeny v laboratoři nepracovala, nemohu tuto možnost s jistotou vyloučit. Za účelem ověření, zda přítomnost více variant v genomu značí skutečnou vnitrogenomovou heterogenitu, by DNA musela být izolována z jedné buňky pomocí single-cell PCR (Hart et al. 2007).

Bolehlým jevem, který výrazně zvyšuje sekvenci diverzitu, je chybovost PCR reakce (Gribble & Anderson 2007, Thornhill et al. 2007). Chyby mohou vznikat během PCR reakce za vstupu nesprávného nukleotidu DNA polymerázou při amplifikaci. Přestože takto vzniklé chyby sekvencováním neodhalíme, protože se opíráme o *Taq* DNA polymerázu na polymerázu s menší chybovostí (Gribble & Anderson 2007). Během PCR může také docházet k rekombinaci mezi dvěma nebo více sekvencemi studovaného kmene. Přítomnost dvou chimerických sekvencí, které zřejmě vznikly tímto způsobem, jsem skutečně ve své práci zaznamenala při klonování ITS úseku některých kmenů; tyto pravděpodobně chimérické sekvence jsem z analýz zcela vyloučila.

Většina variant studovaných kmenů je v souladu s dosavadními poznatky, kdy se jednotlivé varianty liší v nepárujících se oblastech (Coleman 2003, 2009). Výjimkou jsou kmeny SAG 876-1, SAG 887-1, CALU 11, BoF 114, CAUP H 4302, K1 a K10, Baikal a GSE 6A. Jednotlivé varianty těchto kmenů se mezi sebou liší výskytem hemiCBC v párujících se oblastech stemů na druhém a třetím raménku. Tato skutečnost se vymyká doposud známým pozorováním, kdy se jednotlivé kopie neliší v párujících se oblastech stemů (Coleman 2007).

## 5. Závěr

Moje práce byla zaměřená na molekulární variabilitu a diverzitu v rámci komplexu rod *Vischeria/Eustigmatos*. Půbuznost těchto rodů byla již v minulosti navrhována na kterými autory. Výsledky mé práce jasně potvrdily, že tyto dva morfologicky definované rody nejsou geneticky separované a jejich rozlišení tedy není do budoucna udržitelné. Celá skupina by tedy měla být chápána jako jeden rod. Vzhledem k tomu, že rod *Vischeria* s typovým druhem *Vischeria stellata* byl popsán dříve, má tedy přednost při generickém pojmenování této skupiny před rodem *Eustigmatos*. Molekulární fylogenetická analýza odhalila neočekávanou kryptickou diverzitu jednotlivých druhů. Pojmenování druhů sbírkových kmenů tedy nereflakuje souasnou druhovou diverzitu tohoto komplexu. Každý z pěti typových kmenů představuje samostatnou evoluční linii. Vedle těchto pěti linií se zde vyskytuje velký počet dalších linií, z nichž pouze druh *Eustigmatos magnus* je jediným druhem, který lze mezi těmito liniemi identifikovat. Naopak, žádnou z nalezených linií nelze ztotožnit s devíti popsány mi druhy rodu *Vischeria*, které popsal Pascherem ve třicátých letech dvacátého století. Některé z nově izolovaných kmenů jsou geneticky nerozlišitelné od sbírkových kmenů, na které naopak představují nové linie.

Moje práce také ukázala, že použití morfologických znaků k vymezení taxonu *Vischeria/Eustigmatos* komplexu není vhodné. Struktura buněčného povrchu se mění během kultivace. Velikost buněk je stejně tak nevhodným kritériem pro distriminaci linií. Jediným druhem, který by se dal rozlišit na základě morfologie buněk, je druh *Vischeria stellata*. Tento druh je charakteristický pravidelně uspořádanými výrůstky na buněčném povrchu. *Eustigmatos magnus* představuje morfotyp, který se objevuje v evoluci tohoto komplexu velmi často. Jedná se tedy buď o konvergentní stádium, do kterého postupně dospějí buď některé z linií, nebo se jedná o pleziomorfní znak.

To, na základě čeho vymezit jednotlivé taxony, zůstává otázkou. Absence CBC v ITS2 rDNA mezi páry kmenů by mohla naznačovat, že mezi liniemi neexistuje žádná reprodukční bariéra a celý komplex by tedy měl být chápán jako jeden druh. ITS2 rDNA se však u této skupiny nevyvíjí dostatečně rychle. Nepřítomnost CBC tedy nemusí reflektovat sexuální kompatibilitu linií a použití CBC konceptu pro vymezení taxonu nemusí být vhodné. Linie by se však daly vymezit na základě sekvencí *rbcL* genu. Kmeny tohoto komplexu vytvářejí těsné klastry, které bychom potenciálně mohli považovat za samostatné druhy. Formální revize taxonomie komplexu *Vischeria/Eustigmatos* však zjevně vyžaduje hlubší studium s využitím dalších genetických markerů.

## 6. Pouffítá literatura

- Álvarez I & Wendel JF (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434
- Alverson AJ (2008): Molecular systematics and the diatom species. *Protist* 159: 339-353
- Amato A, Kooistra WHCF, Ghiron JHL, Mann DG, Pröschold T & Montresor M (2007): Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158: 193-207
- Andersen RA (2004): Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. *American Journal of Botany* 91: 1508-1522
- Andersen RA, Brett RW, Potter D & Sexton JP (1998): Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist* 149: 61-74
- Bartlett JMS & Stigling D (2003): PCR protocols (Methods in Molecular Biology). Humana Press. 556 pp.
- Beck A, Friedl T & Rambold G (1998): Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytologist* 139:709-720
- Beszteri B, Ács É & Medlin LK (2005): Ribosomal DNA sequence variation among sympatric strains of the *Cyclotella meneghiniana* complex (Bacillariophyceae) reveals cryptic diversity. *Protist* 156: 317-333
- Bock C, Pröschold T & Krienitz L (2011): Updating the genus *Dictyosphaerium* and description of *Mucidosphaerium* gen. nov. (Trebouxiophyceae) based on morphological and molecular data. *Journal of Phycology* 47: 638-652
- Boenigk J, Ereshefsky M, Hoef-Emden K, Mallet J & Bass D (2012): Concepts in protistology: Species definitions and boundaries. *European Journal of Protistology* 48 : 96-102
- Buckler IV ES, Ippolito A & Holtford TP (1997): The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* 145: 821-832
- Caisová L, Marin B & Melkonian M (2011): A close-up view on ITS2 evolution and speciation - a case study in the Ulvophyceae (Chlorophyta, Viridiplantae). *BMC Evolutionary Biology* 11: 262
- Casteleyn G, Adams NG, Vanormelingen P, Debeer A-E, Saabe K & Vyverman W (2009): Natural hybrids in the marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): genetic and morphological evidence. *Protist* 160: 343-354
- Chen J-M, Cooper DN, Chuzhanova N, Férec C & Patrinos GP (2007): Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. *Nature Reviews Genetics* 8: 762-775
- Coleman AW (2000): The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist* 151: 1-9
- Coleman AW (2003): ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* 19: 370-375

- Coleman AW (2007): Pan-eucaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* 35: 3322-3329
- Coleman AW (2009): Is there a molecular key to the level of biological species in eucaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 50: 197-203
- Coleman A, Suarez A & Goff LJ (1994): Molecular delineation of species and syngens in volvocacean green algae (Chlorophyta). *Journal of Phycology*: 30: 80-90
- D'Alelio D, Amato A, Kooistra WHCF, Procaccini G, Casotti R & Montresor M (2009): Internal transcribed spacer polymorphism in *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in the Gulf of Naples: recent divergence or intraspecific hybridization? *Protist* 160: 9-20
- Daugbjerg N & Andersen RA (1997): A molecular phylogeny of the heterokont algae based on analyses of chloroplast-encoded *rbcL* sequence data. *Journal of Phycology* 33: 1031-1041
- de Queiroz K (2007): Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56: 879-886
- Eliáš M & Neustupa J (2012): Phylum Eustigmatophyta. In: Margulis L (ed.): *Handbook of Protozoa*, 2nd edition. Jones & Bartlett Learning. in press
- Ettl H (1978): Xanthophyceae. In: Ettl H, Gerloff J, Heynig H (eds.): *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Band 3, 1. Teil. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 530 pp.
- Ettl H & Gärtner G (1995): *Sylabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. G. Fischer. Verlag. Stuttgart. 721 pp.
- Evans K, Wortley AH & Mann DG (2007): An assessment of potential diatom barcode genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationship in *Sellaphora* (Bacillariophyceae). *Protist* 158: 349-364
- Fawley KP & Fawley MW (2007): Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protist* 158: 325-336
- Fišerová M (2012): Ultrastruktura eustigmatofytních řas. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. 102 pp.
- Frost TM, Graham LE, Elias JE, Haase MJ, Kretzmer DW, Kranzfelder JA (1997): A yellow-green algal symbiont in the freshwater sponge, *Corvomeyenia everetti*: convergent evolution of symbiotic associations. *Freshwater Biology*: 38: 395-399
- Ganley ARD & 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
- Gile GH, Stern RF, James ER & Keeling PJ (2010): DNA barcoding of chlorarachniophytes using nucleomorph ITS sequences. *Journal of Phycology* 46: 743-750
- Gribble KE & Anderson D (2007): High intraindividual, intraspecific, and interspecific variability in large subunit ribosomal DNA in the heterotrophic dinoflagellates *Protoeridinium*, *Diplopsalis*, and *Preperidinium* (Dinophyceae). *Phycologia* 46: 315-324

- Griffin PC, Robin C, & Hoffmann AA (2011): A next-generation sequencing method for overcoming the multiple gene copy problem in polyploid phylogenetics, applied to *Poa* grasses. *BMC Biology* 9: 19
- Guiry MD & Guiry GM (2012): AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 11 July 2012
- Hammer Ø, Harper DAT & Ryan PD (2001): PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1-9
- Hart MC, Green DH, Bresnan E & Bolch CJ (2007): Large subunit ribosomal RNA gene variation and sequence heterogeneity of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Scottish coastal waters. *Harmful Algae* 6: 271-287
- Hart MW (2010): The species concept as an emergent property of population biology. *Evolution* 65: 613-616
- Hegewald E, Padisák J & Friedl T (2007): *Pseudotetraedriella kamillae*: taxonomy and ecology of a new member of the algal class Eustigmatophyceae (Stramenopiles). *Hydrobiologia* 586: 107-116
- Hepperle D (2004): SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. <http://www.sequentix.de>
- Hibberd DJ (1980): Eustigmatophyceae. In: Cox ER (ed.): *Phytophagellates: Form and Functions*: 319-334. New York, Elsevier North Holland
- Hibberd DJ (1981): Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 82: 93-119
- Hibberd DJ & Leedale GF (1971): A new algal class of the Eustigmatophyceae. *Taxon* 20: 523-525
- Hibberd DJ & Leedale GF (1972): Observations on the cytology and ultrastructure of the new algal class, Eustigmatophyceae. *Annals of Botany* 36: 49-71
- Huss VAR, Frank C, Hartmann EC, Hirmer M, Kloboucek A, Seidel BM, Wenzeler P & Kessler E (1999): Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 35: 587-598
- Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755
- Innis SM (1992): n-3 Fatty acid requirements of the newborn. *Lipids* 27: 879-885
- Ishida K-I & Hara Y (1994): Taxonomic studies on the Chlorarachniophyta. I. *Chlorarachnion globosum* sp. nov. *Phycologia* 33: 351-358
- Ishida K-I, Nakayama, T. & Hara Y (1996): Taxonomic studies on the Chlorarachniophyta. II. Generic delimitation of the chlorarachniophytes and description of *Gymnochlorella stellata* gen. et sp. nov. and *Lotharella* gen. nov. *Phycological Research* 44: 37-45
- Kalendar R, Lee D & Schulman AH (2009): FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics* 3: 1-14

- Kessler E & Huss VAR (2004): Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the culture collection of the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology* 28: 550-553
- Khaybullina LS, Gaysina LA, Johansen JR & Krautová M (2010): Examination of the terrestrial algae of the Great Smoky Mountains National Park, USA. *Fottea* 10: 201-215
- Krienitz L, Hepperle D, Stich H-B & Weiler W (2000): *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 39: 219-227
- Kreinitz L, Bock C, Dadheech PK & Pröschold T (2011): Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species. *Phycologia* 50: 89-106
- Kroken S & Taylor JW (2010): Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *The Bryologist* 103: 645-660
- Kynlová A, Tkaloud P & Tkaloudová M (2010): Unveiling hidden diversity in the *Synura petersenii* species complex (Synurophyceae, Heterokontophyta). *Nova Hedwigia, Beiheft* 136: 283-298
- Logares R, Boltovskoy A, Bensch, S, Laybourn-Parry J & Rengefors K (2009): Genetic diversity patterns in five protist species occurring in lakes. *Protist* 160: 301-317
- Maistro S, Broady PA, Andreoli C & Negrisola E (2007): Molecular phylogeny and evolution of the order Tribonematales (Heterokonta, Xanthophyceae) based on analysis of plastidial genes *rbcL* and *psaA*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 407-417
- Malik S-B, Pightling AW, Stefaniak LM, Schurko AM & Logsdon JMJr (2008): An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS ONE* 3: 2879
- Muir G, Fleming CC & Schlötterer C (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
- Müller T, Philippi N, Dandekar T, Schultz J & Wolf M (2007): Distinguishing species. *RNA* 13: 1469-1472
- Neustupa (2002): An easy method for light microscopic distinguishing of xanthophycean and eustigmatophycean strains. *Czech Phycology* 2: 43-46
- Neustupa J & Neustupová Y (2001): Morphological and taxonomic study for three terrestrial eustigmatophycean species. *Nova Hedwigia* 123: 373-386
- Neustupa J & Tkaloud P (2010): Diversity of subaerial algae and cyanobacteria growing on bark and wood in the lowland tropical forests of Singapore. *Plant Ecology and Evolution* 143: 51-62
- Orsini L, Procaccini G, Sarno D & Montresor M (2004): Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Marine Ecology Progress Series* 271: 87-98
- Pan K, Qin J, Li S, Dai W, Zhu B, Jin Y, Yu W, Yang G & Li D (2011): Nuclear monoploidy and asexual propagation of *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) as revealed by its genome sequence. *Journal of Phycology* 47: 1425-1432



- Pascher A (1939): Heterokonten. In: L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreichs und der Schweiz. Aufl. 2. Bd. XI. Leipzig: Akad. Verlagsges. 1092 pp.
- Petersen JB (1932): Einige neue Erdalgen. Archiv für Protistenkunde 76: 395-408
- Pouliková A, Veselá J, Neustupa J & Chaloud P (2010): Pseudocryptic diversity versus cosmopolitanism in diatoms: a case study on *Navicula cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and morphologically similar taxa. Protist 161: 353-369
- Poulton EM (1925): Étude sur les Heterokontes. These No. 777, Université de Genève. Geneva: Imprimerie Jent Société Anonyme. [Bulletin de la Société botanique de Genève. Ser. 2. 17: 33-121, 1926].
- Poulton EM (1930): Further studies on the Heterokontae: some Heterokontae of New England, U.S.A. New Phytologist 29: 1-26
- Prior SE, Fawley MW & Fawley KP (2009): DNA sequence analysis of freshwater Eustigmatophyceae, a potential source of essential fatty acids. Journal of the Arkansas Academy of Science 63: 139-144
- Příbyl P, Eliáš M, Cepák V, Lukavský J & Kaštánek P (2012): Phylogenetic position, ultrastructure, pigment composition and zoosporogenesis of *Trachydiscus minutus* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta). Journal of Phycology 48: 231-242
- Radakovits R, Jinkerson RE, Fuerstenberg SI, Tae H, Settlage RE, Boore JL & Posewitz MC (2012): Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. Nature Communications 3: 686
- Rambaut A (2009): FigTree v. 1.3.1. Computer program and documentation distributed by the author at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>.
- Reuter JS & Mathews DH (2010): RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. BMC Bioinformatics 11: 129
- Riisberg I, Orr RJS, Kluge R, Shalchian-Tabrizi K, Bowers HA, Patil V, Edvardsen B & Jakobsen KS (2009): Seven gene phylogeny of heterokonts. Protist 160: 191-204
- Rindi F, Lam DW & López-Bautista JM (2009): Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta). Molecular Phylogenetics and Evolution 52: 329-339
- Santos LMA & Leedale GF (1991): *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae): ultrastructure of the zoospores, with special reference to the flagellar apparatus. Protoplasma 164: 160-167
- Santos LMA & Leedale GF (1992): First report of a Golgi body in a uniflagellate eustigmatophycean zoospore. Phycologia 31: 119-124
- Santos LMA (1996): Eustigmatophyceae: Actual knowledge and research perspectives. Nowa Hedwigia 112: 391-405

- Santos LMA, Melkonian M & Kreimer K (1996): A combined reflection confocal laser scanning, electron and fluorescence microscopy analysis of the eyespot in zoospores of the *Vischeria* spp. (Eustigmatales, Eustigmatophyceae). *Phycologia* 35: 299-307
- Schultz J & Wolf M (2009): ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: a how-to manual for molecular systematics. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 52: 520-523
- Schurko AM & Logsdon JMJr (2008): Using a meiosis detection toolkit to investigate ancient asexual scandals and the evolution of sex. *BioEssays* 30: 579-589
- Skaloud P & Peksa O (2010): Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 36-46
- Sonnesberg R, Nolte AW & Tautz D (2007): An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology* 4: 6
- Sorhannus U, Ortiz JD, Wolf M & Fox MG (2010): Microevolution and speciation in *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta). *Protist* 161: 237-249
- Stamatakis A (2006): RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690
- Stamatakis A, Hoover P & Rougemont J (2008): A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57: 758-771
- Suda S, Atsumi M & Miyashita H (2002): Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41: 273-279
- Skaloud P (2009): Species composition and diversity of aero-terrestrial algae and cyanobacteria of the Bore Hill ventaroles. *Fottea* 9: 65-80
- 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
- Thornhill DJ, Lajeunesse TC & Santos SR (2007): Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. *Molecular Ecology* 16: 5326-5340
- Vanormelingen P, Chepurinov VA, Mann DG, Sabbe K & Vyverman W (2008): Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyta). *Protist* 159: 73-90
- Vischer W (1945): Heterokonten aus alpinen böden, speziell dem schweizerischen nationalpark. *Ergebnisse der wissenschaftlichen Untersuchung der Schweizerischen Nationalparks* 1: 481-510
- Volkman JK, Barrett SM, Blackburn SI, Mansour MP, Sikes EL & Gelin F (1998): Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. *Organic Geochemistry* 29: 1163-1179

- Volkman JK, Barrett SM & Blackburn SI (1999a): Eustigmatophyte microalgae are potential sources of C<sub>29</sub> sterols, C<sub>22</sub>-C<sub>28</sub> *n*-alcohols and C<sub>28</sub>-C<sub>32</sub> *n*-alkyl diols in freshwater environments. *Organic Geochemistry* 30: 307-318
- Volkman JK, Barret SM & Blackburn SI (1999b): Fatty acids and hydroxy fatty acids in three species of freshwater eustigmatophytes. *Journal of Phycology* 35: 1005-1012
- Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E & O'Donnell K (2002): Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9278-9283
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DJ, Sninsky JJ & White TJ (eds.). *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, California, 315-322 pp.
- Whittle SJ & Casselton PJ (1975): The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae. *British Phycological Journal* 10: 179-191
- Yang EC, Boo GH, Kim HJ, Cho SM, Andersen RA & Yoon HS (2011): Supermatrix data highlight the phylogenetic relationships of photosynthetic Stramenopiles. *Protist* 163: 217-231
- Yao M-C & Gall JG (1977): A single integrated gene for ribosomal RNA in a eucaryote, *Tetrahymena pyriformis*. *Cell* 12: 121-132
- Zuker M (2003): Mfold web server for nucleic acids folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31: 3406-3415

## **7. P íloha**

**Tab. S1.** Seznam kmenů použitých v této studii. Názvy druhů jsou uvedeny podle, jak jsou uvedeny ve sbírkách.

Kmen	Druh	Lokalita	Izoloval	Datum izolace
CCMP 387*	<i>Eustigmatos magnus</i>	sladká voda, Bealey, Nový Zéland	Flint	-
SAG 48.84	<i>Chloridella neglecta</i>	půda z květináče, Göttingen, Německo	Groß	1984
SAG 36.89	<i>Eustigmatos magnus</i>	půda, Langtang Valley, Pemdang Karpo Glacier, Nepál	Schlösser	1989
ASIB S 1	<i>Eustigmatos magnus</i>	půda, ostrov Lavsa, Chorvatsko	Schwarz	1975
ASIB V 1*	<i>Eustigmatos magnus</i>	půda, Dolomity, Jižní Tyrolsko, Itálie	Vinatzer	1975
CAUP H 4302*	<i>Eustigmatos cf. polyphem</i>	Zlaté návrší, Krkonoše, Česká republika	Desortová	06/1967
¶CAUP Q 101*	<i>Eustigmatos vischeri</i>	půda, oblast Unterengadin, Švýcarsko	Vischer	1940
CCAP 860/5*	<i>Eustigmatos vischeri</i>	bazén, Phoenix, Arizona, USA	Adamson	před 1977
CCAP 860/6*	<i>Eustigmatos vischeri</i>	bazén, USA	Adamson	před 1977
CCAP 860/7	<i>Eustigmatos vischeri</i>	půda, Brixen, Rakousko	Trenkwalder	1975
¶CAUP Q 102*	<i>Eustigmatos polyphem</i>	půda, Mt. Kenya, Keňa	Pitschmann	1969
CCALA 279	<i>Chloridella simplex</i>	sníh, detritus, Veľký štít, Belianské Tatry, Slovensko	Hindák	1962
CCALA 514	<i>Vischeria helvetica</i>	-	Petrová	-
¶SAG 876-1	<i>Vischeria helvetica</i>	půda, Ženeva, Švýcarsko	Chodat	-
¶UTEX 49	<i>Vischeria helvetica</i>	půda, Ženeva, Švýcarsko	Chodat	-
¶SAG 887-1*	<i>Vischeria punctata</i>	půda, oblast Unterengadin, Švýcarsko	Vischer	1941
CCAP 887/3	<i>Vischeria punctata</i>	půda, Brixen, Rakousko	Trenkwalder	1975
¶SAG 887-2*	<i>Vischeria stellata</i>	půda, Švýcarsko	Chodat	před 1925
SAG 33.83	<i>Vischeria stellata</i>	půda, ostrov Lavsa, Chorvatsko	Schwarz	1975
CCAP 855/1	<i>Ophiocytium majus</i>	sladkovodní, Trumpington, Cambridge, Velká Británie	Pringsheim	1940

CAUP Q 201*	<i>Vischeria</i> sp.	p da, bukový les, poblí0 Bochrvalovské strán , eská republika	Neustupa	1998
BoF 79*	<i>Vischeria stellata</i>	ventarola . p da, Bore , eská republika	¥kaloud	2003
BoF 114	<i>Eustigmatos magnus</i>	ventarola - mech, su ového pole kopce Kamenec, eská republika	¥kaloud	02/2003
BoF 08*	<i>Eustigmatos polyphem</i>	ventarola . p da, Bore , eská republika	¥kaloud	02/2003
UTEX 2631	<i>Chlorarachnion globosum</i>	sporangiofory lizejníkové houby <i>Multiclavula corynoides</i>	Lewin	08/1984
MarTraz 14	<i>Eustigmatos polyphem</i>	vyma kaný mech, kope ková tundra, zátoka Petunia, ¥picberky, Norsko	Pichrtová & Elster	2009
MarT 13*	<i>Eustigmatos polyphem</i>	p da, kope ková tundra, zátoka Petunia, ¥picberky, Norsko	Pichrtová & Elster	2009
ME 12	<i>Eustigmatos</i> sp./ <i>Vischeria</i> sp.	botanická zahrada, Minia University, Minia, Egypt	Lukezová	03/2003
ME 14	<i>Eustigmatos</i> sp.	pís itá p da, mladé sukcesní stadium, Vroutek, eská republika	Lukezová	04/2002
ME 15	<i>Eustigmatos</i> sp.	orná p da, Benezov nad ernou, eská republika	Lukezová	04/2002
ME 16	<i>Eustigmatos</i> sp.	tropický les, Havana, Kuba	Lukezová	04/1989
ME 17	<i>Eustigmatos</i> sp./ <i>Vischeria</i> sp.	jílová p da, poblí0 Lake Naivasha, Naivasha, Ke a	Lukezová	2002 i 09/2004
ME 18	<i>Eustigmatos</i> sp.	popel, vypálený smrkový les, Malacky, Slovensko	Lukezová	10/1992 i 03-06/1993
ME 19	<i>Eustigmatos</i> sp.	smrkový les, Malacky, Slovensko	Lukezová	03/1995
ME 22	<i>Eustigmatos</i> sp.	popel, vypálený smrkový les, Malacky, Slovensko	Lukezová	05/1995
ME 23	<i>Eustigmatos magnus/Vischeria</i> sp.	výsypka, Sokolov, eská republika	Lukezová	05/1995
ME 24	<i>Vischeria</i> sp.	orná p da, Net ebice, eská republika	Lukezová	05/1995
ME 25	<i>Eustigmatos</i> sp.	p da, ¥picberky, Norsko	Lukezová	09/1988
ME 26	<i>Eustigmatos</i> sp.	z korýze <i>Mesoniscus graniger</i> , jeskyn Domico, Moravský kras, Slovensko	Lukezová	2002
ME 27	<i>Eustigmatos</i> sp./ <i>Vischeria</i> sp.	sediment, Zbrázovské jeskyn , Teplice nad Be vou, eská republika	Lukezová	10/2007
ME 28	<i>Eustigmatos</i> sp.	výsypka, Laurel Grove, Tennessee, USA	Lukezová	05/2007

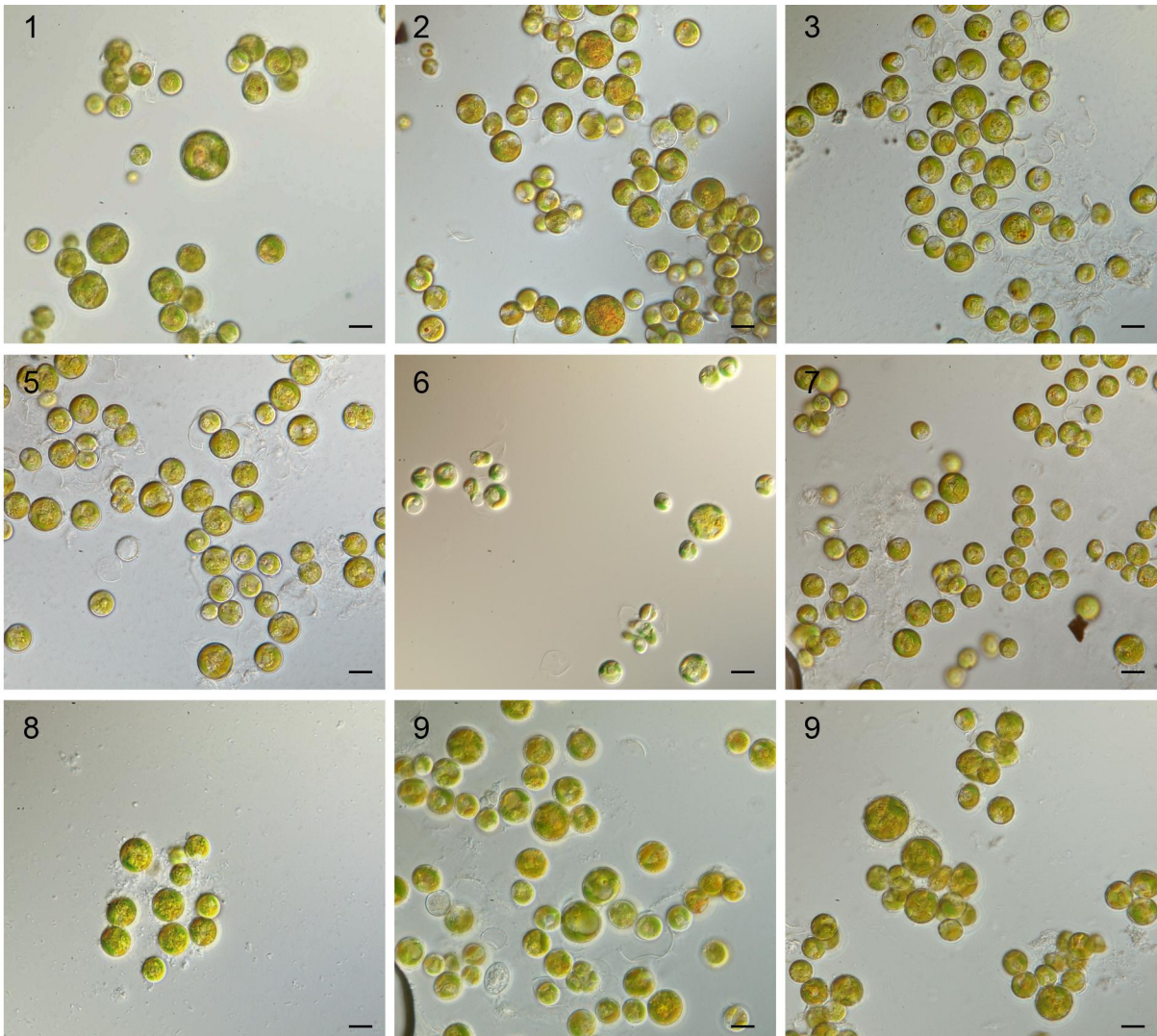
LOK 112	-	p da, jezírko Lough Owen, County Kerry, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
LOK 112-1	-	p da, jezírko Lough Owen, County Kerry, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
LOK 112-KP	-	p da, jezírko Lough Owen, County Kerry, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
COR 1	-	p da, Lough Nambrackkeagh, County Mayo, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
COR 2	-	p da, Lough Nambrackkeagh, County Mayo, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
CORR	-	p da, Lough Nambrackkeagh, County Mayo, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
CORR 2	-	p da, Lough Nambrackkeagh, County Mayo, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
LOK 107*	-	p da, Caha Mountains, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
OVC 1	-	p da, Caha Mountains, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
OVC 2	-	p da, Caha Mountains, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
OVC 3	-	p da, Caha Mountains, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
OVC 4	-	p da, Caha Mountains, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
LEICH 2*	-	p da, Lough Inchiquin, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
LEICH 3	-	p da, Lough Inchiquin, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
LEICH 4	-	p da, Lough Inchiquin, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
LOK 100-1	-	p da, County Kerry, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
LOK 100-2	-	p da, County Kerry, Irsko	Procházková & Pichrtová	03/2010
HOST 4*	-	p da, 11 Route d'Hostens, Gironde, Aquitaine, Francie	Procházková & Pichrtová	02/2010
KIYO-1	-	cedrová borka, Kiyomizu temple (Kijomizu-dera), Japonsko	Procházková	2010
KIYO-2	-	cedrová borka, Kiyomizu temple (Kijomizu-dera), Japonsko	Procházková	2010
KIYO-4	-	cedrová borka, Kiyomizu temple (Kijomizu-dera), Japonsko	Procházková	2010
ATA 11-CQ-CV 3	-	p da, pouz Atacama, Chile	Vaccarino	2009

ATA 2-1 KH-12	-	p da, pouz Atacama, Chile	Hr ková	2009
ATA 3-4 Q	-	p da, pouz Atacama, Chile	Vaccarino	2009
Baikal	-	p da, Frolikhinskiy Federal Rerserve near lake Baikal, Rusko	Hr ková & Vaccarino	2009
BGPZ 6	-	p da, Bashkir State Natural Reserve, Rusko	Bakieva	10/2008
BGPZ 91	-	p da, Bashkir State Natural Reserve, Rusko	Bakieva	10/2008
CALU 11	-	Collection of Algal Cultures of Saint-Petersburg University, p vodn ze sbírky v eské republice, AV R, Praha	Czurda-Denk	1960
GSE 2	-	Collection of Algal Cultures of Saint-Petersburg University, p vodn ze sbírky v eské republice, AV R, Praha	-	-
GSE 6A*	-	p da, Grand Stairkaise-Escalante NP, Utah, USA	Kahybullina et al.	09/2006
GSM 159	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 165	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 180	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 204	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 214	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 216*	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 274	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 279	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 282	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 287	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 2C	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 311	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008
GSM 53	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee-Severní Carolina, USA	Gaysina	08/2008

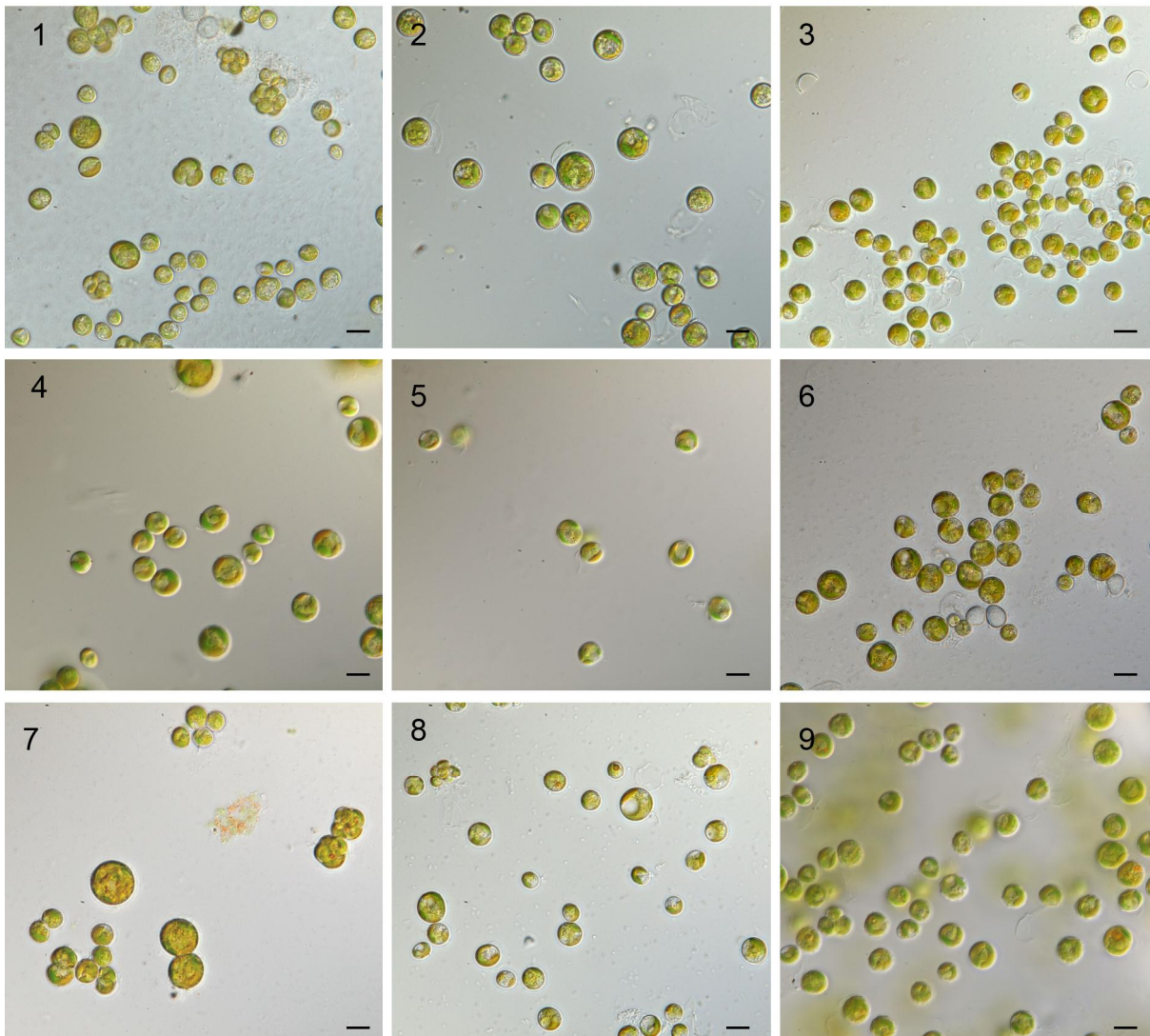


GSM FD 2-1	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee, USA	Gomez & Johansen	2001
GSM FD 2-4	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee, USA	Gomez & Johansen	2001
GSM FD 2-X	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee, USA	Gomez & Johansen	2001
GSM FD 3-5	-	p da, Great Smoky Mountains NP, Tennessee, USA	Gomez & Johansen	2001
HA I 3	-	p da, Mauna Kea Observatory Access Road, Hawaj, USA	Johansen & Bukieva	04/2010
HA V 54	-	p da, Maui, Hawaj, USA	Johansen & Bukieva	04/2010
K 1	-	vulkanický prach poblí0 vulkánu Mutnovskiy, ka on eky Vulkannaya, Kamchatka, Rusko	Gaysina & Safiullina	04/2011
K 10	-	vulkanický popel poblí0 vulkánu Mutnovskiy, ka on eky Vulkannaya, Kamchatka, Rusko	Gaysina & Safiullina	09/2010
KT 7	-	p da, borovicová výsadba, poblí0 Krasnousolks, Republic of Bashkortostan, Rusko	Gaysina	05/2011
PR 1-17	-	p da, Primorskiy region, Rusko	Gaysina & Safiullina	09/2010
SYR 6	-	p da, South-Ural State Natural Reserve, Rusko	Gaysina & Safiullina	05/2010
WBN 7	-	p da, King George Island, Antarktída	Gaysina & Safiullina	02/2011
WBN 9	-	p da, King George Island, Antarktída	Gaysina & Safiullina	02/2011

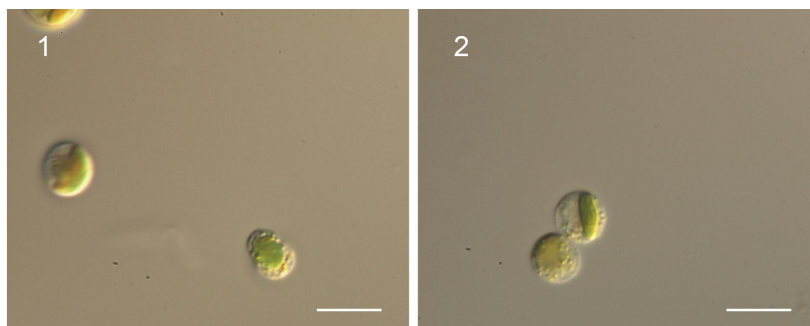
Poufilité zkratky: ¶ typové kmeny; \* morfometricky studované kmeny



**Obr. S1.** Vybrané kmeny komplexu *Vischeria/Eustigmatos*, které jsem morfometricky studovala. 1: HOST4; 2: LEICH 2; 3: CCAP 860/5; 4: CCAP 860/6; 5: UTEX 49; 6: Mart 13; 7: CAUP Q 101; 8: CAUP Q 102; 9: BoF 08. M ítko je 10  $\mu\text{m}$ .



**Obr. S2.** Vybrané kmeny komplexu *Vischeria/Eustigmatos*, které jsem morfometricky studovala. 1: GSE 6A; 2: CAUP Q 201; 3: BoF 79; 4: SAG 887-1; 5: CAUP H 4302; 6: GSM 216; 7: ASIB V1; 8: CCMP 387; 9: SAG 887-2. M ítko je 10  $\mu$ m.



**Obr. S3.** P isedající zoospory kmenu UTEX 49. M ítko zna í 10  $\mu$ m.

**Tab. S2.** Matice párových porovnání genetických vzdáleností (Kimura 2-parametrický substituční model) mezi kmeny, které byly morfometricky analyzovány zkoumány za účelem stanovení vztahu genetické a morfologické variability.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	SAG 887-1	-																
2	CAUP Q 201	0.000	-															
3	BoF 79	0.000	0.000	-														
4	CAUP Q 102	0.000	0.000	0.000	-													
5	CAUP Q 101	0.017	0.017	0.017	0.017	-												
6	MarT 13	0.026	0.026	0.026	0.026	0.009	-											
7	GSE 6A	0.013	0.013	0.013	0.013	0.031	0.040	-										
8	BoF 08	0.017	0.017	0.017	0.017	0.035	0.044	0.031	-									
9	LEICH 2	0.031	0.031	0.031	0.031	0.049	0.058	0.044	0.044	-								
10	CCAP 860/5	0.040	0.040	0.040	0.040	0.058	0.068	0.054	0.054	0.017	-							
11	CCAP 860/6	0.040	0.040	0.040	0.040	0.058	0.068	0.054	0.054	0.017	0.000	-						
12	CAUP H 4302	0.017	0.017	0.017	0.017	0.035	0.044	0.022	0.031	0.040	0.049	0.049	-					
13	CCMP 387	0.017	0.017	0.017	0.017	0.035	0.044	0.031	0.031	0.040	0.049	0.049	0.009	-				
14	GSM 216	0.026	0.026	0.026	0.026	0.044	0.054	0.040	0.040	0.049	0.058	0.058	0.017	0.017	-			
15	ASIB V 1	0.017	0.017	0.017	0.017	0.035	0.044	0.031	0.031	0.040	0.049	0.049	0.009	0.009	0.017	-		
16	HOST 4	0.063	0.063	0.063	0.063	0.082	0.092	0.077	0.068	0.087	0.097	0.097	0.067	0.068	0.073	0.067	-	
17	SAG 887-2	0.054	0.054	0.054	0.054	0.073	0.082	0.068	0.059	0.078	0.088	0.088	0.063	0.063	0.063	0.063	0.068	-

**Tab S3.** Distanční matice párových porovnání průměru mezi zkoumanými kmeny založená na Euklidovských vzdálenostech. Výsledkem Mantelova testu, který porovnává data genetické (Tab. S2) a morfologické matice (průměr), je hodnota  $p = 0,9895$ . Matice se od sebe tedy značně liší a nekorelují spolu.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	SAG 887-1	-																
2	CAUP Q 201	1,870	-															
3	BoF 79	0,856	2,726	-														
4	CAUP Q 102	2,783	0,914	3,639	-													
5	CAUP Q 101	1,204	0,666	2,060	1,579	-												
6	MarT 13	0,737	1,133	1,593	2,046	0,467	-											
7	GSE 6A	0,098	1,968	0,758	2,882	1,303	0,836	-										
8	BoF 08	2,339	0,469	3,195	0,445	1,135	1,602	2,437	-									
9	LEICH 2	1,976	0,106	2,832	0,808	0,772	1,238	2,074	0,363	-								
10	CCAP 860/5	1,447	0,423	2,303	1,337	0,243	0,710	1,545	0,892	0,529	-							
11	CCAP 860/6	2,181	0,311	3,037	0,603	0,976	1,443	2,279	0,158	0,205	0,734	-						
12	CAUP H 4302	1,152	0,718	2,008	1,631	0,052	0,415	1,251	1,187	0,824	0,295	1,028	-					
13	CCMP 387	0,545	2,414	0,311	3,328	1,749	1,282	0,446	2,883	2,520	1,991	2,725	1,697	-				
14	GSM 216	1,602	0,268	2,458	1,182	0,398	0,865	1,700	0,737	0,374	0,155	0,579	0,450	2,146	-			
15	ASIB V 1	1,428	0,442	2,284	1,356	0,223	0,690	1,526	0,911	0,548	0,019	0,753	0,275	1,972	0,174	-		
16	HOST 4	1,706	0,164	2,562	1,078	0,502	0,968	1,804	0,633	0,270	0,259	0,475	0,554	2,250	0,104	0,278	-	
17	SAG 887-2	1,247	0,623	2,103	1,536	0,043	0,510	1,346	1,092	0,728	0,200	0,933	0,095	1,792	0,355	0,180	0,458	-

**Tab. S4.** Distanční matice párových porovnáání mediánů mezi zkoumanými kmeny založená na Euklidovských vzdálenostech. Výsledkem Mantelova testu, který porovnává data z genetické (Tab. S2) a morfologické matice (medián), je hodnota  $p = 0,9896$ . Matice spolu tedy nekoreluje.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	SAG 887-1	-																
2	CAUP Q 201	1,672	-															
3	BoF 79	0,866	2,538	-														
4	CAUP Q 102	2,455	0,783	3,320	-													
5	CAUP Q 101	1,181	0,492	2,046	1,274	-												
6	MarT 13	0,625	1,047	1,491	1,830	0,556	-											
7	GSE 6A	0,457	2,129	0,409	2,912	1,638	1,082	-										
8	BoF 08	1,971	0,299	2,836	0,484	0,790	1,346	2,428	-									
9	LEICH 2	1,385	0,287	2,251	1,070	0,205	0,760	1,842	0,586	-								
10	CCAP 860/5	1,392	0,281	2,257	1,063	0,211	0,767	1,849	0,579	0,007	-							
11	CCAP 860/6	2,152	0,480	3,017	0,303	0,971	1,527	2,609	0,181	0,767	0,760	-						
12	CAUP H 4302	1,053	0,619	1,919	1,402	0,128	0,428	1,510	0,918	0,332	0,339	1,099	-					
13	CCMP 387	0,505	2,177	0,361	2,960	1,686	1,130	0,048	2,476	1,890	1,897	2,657	1,558	-				
14	GSM 216	1,725	0,053	2,591	0,730	0,545	1,100	2,182	0,246	0,340	0,334	0,427	0,672	2,230	-			
15	ASIB V 1	0,757	0,916	1,622	1,698	0,424	0,132	1,214	1,214	0,629	0,635	1,395	0,297	1,262	0,969	-		
16	HOST 4	1,256	0,417	2,121	1,199	0,075	0,631	1,713	0,715	0,130	0,136	0,896	0,203	1,761	0,470	0,499	-	
17	SAG 887-2	1,018	0,655	1,883	1,437	0,163	0,393	1,475	0,953	0,368	0,374	1,134	0,036	1,523	0,708	0,261	0,238	-

**Tab. S5.** Distanční matice párových porovnávaní variancí mezi zkoumanými kmeny založená na Euklidovských vzdálenostech. Výsledkem Mantelova testu, který porovná data z genetické (Tab. S2) a morfologické matice variance, je hodnota  $p = 0,2806$ . Matice spolu tedy nekoreluje.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	SAG 887-1	-																
2	CAUP Q 201	1,415	-															
3	BoF 79	0,789	2,204	-														
4	CAUP Q 102	2,594	1,179	3,383	-													
5	CAUP Q 101	0,895	0,520	1,684	1,699	-												
6	MarT 13	0,510	1,925	0,278	3,104	1,405	-											
7	GSE 6A	0,363	1,052	1,151	2,232	0,532	0,873	-										
8	BoF 08	2,083	0,668	2,872	0,511	1,188	2,593	1,721	-									
9	LEICH 2	6,327	4,911	7,115	3,732	5,431	6,837	5,964	4,243	-								
10	CCAP 860/5	0,330	1,086	1,118	2,265	0,566	0,840	0,033	1,754	5,997	-							
11	CCAP 860/6	0,864	0,551	1,653	1,730	0,031	1,374	0,501	1,219	5,462	0,535	-						
12	CAUP H 4302	0,832	2,247	0,044	3,427	1,727	0,322	1,195	2,916	7,159	1,162	1,697	-					
13	CCMP 387	0,822	2,237	0,033	3,416	1,717	0,312	1,185	2,905	7,148	1,151	1,686	0,010	-				
14	GSM 216	1,591	0,176	2,380	1,003	0,696	2,101	1,228	0,492	4,735	1,262	0,727	2,423	2,413	-			
15	ASIB V 1	5,026	3,611	5,815	2,432	4,131	5,536	4,663	2,943	1,300	4,697	4,162	5,858	5,848	3,435	-		
16	HOST 4	4,776	3,361	5,565	2,182	3,881	5,286	4,414	2,693	1,550	4,447	3,912	5,609	5,598	3,185	0,250	-	
17	SAG 887-2	1,422	0,007	2,211	1,172	0,527	1,932	1,059	0,661	4,904	1,093	0,558	2,254	2,244	0,169	3,604	3,354	-