Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

studijní program: Biologie
studijní obor: Botanika

Bc. Lucie Vančurová

Diverzita fotobiontů ve stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon* (Lecanoromycetes, Ascomycota)

Photobiont diversity in the lichen genus *Stereocaulon* (Lecanoromycetes, Ascomycota)

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Pavel Škaloud, PhD.

Praha 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 27. 8. 2012

Lucie Vančurová

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především Pavlu Škaloudovi za jeho velkou ochotu a trpělivost při vysvětlování všech metod, které jsem při zpracování této práce potřebovala, za podnětné nápady a připomínky, ale i za to, že mě přivedl k velmi zajímavému tématu fotobiontů lišejníků. Děkuji rovněž Ondřeji Peksovi za množství důležitých rad a nápadů, za poskytnutí řady položek a určení mnoha dalších a jeho snahu mě naučit poznávat lišejníky. Za užitečné připomínky k textu práce a poskytnutí položek lišejníků děkuji Janě Steinové. Díky si zaslouží také Lucia Muggia za poskytnutí položek z Aljašky a především za pomoc a podporu nejen v molekulární laboratoři během mého pobytu v Grazu, stejně jako Toby Spribille, Barbara Klug a další. Za zapůjčení položek využitých při zpracování této práce děkuji Jiřímu Malíčkovi, Davidu Svobodovi, Zdeňku Palicemu, Františku Boudovi, Walteru Obermayerovi a Dietmaru Trauberovi. Můj velký dík patří celé mé rodině za podporu během studia.

Abstrakt

Tato práce se zabývá diverzitou fotobiontů lišejníků a jejich vztahem k mykobiontům a podmínkám prostředí. Za cíl si klade zmapovat diverzitu fotobiontů lišejníků rodu *Stereocaulon*, která byla do této chvíle v porovnání s příbuznými lišejníky *Cladonia* a *Lepraria* studována jen velmi málo.

Zkoumáno bylo celkem 92 položek náležících k dvanácti druhům rodu *Stereocaulon* pocházejících ze čtyř kontinentů, z nadmořských výšek od 50 do 2 900 m n. m. a z celé řady přírodních i umělých substrátů. Fylogenetické analýzy byly prováděny na základě sekvencí ITS rDNA, genu pro aktin typu I, 18S rDNA a rbcL.

Ve stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon* byli nalezeni fotobionti náležící ke dvěma nepříbuzným rodům v rámci třídy Trebouxiophyceae: *Asterochloris* a *Chloroidium*. Zatímco *Asterochloris* je jedním z nejčastějších fotobiontů lišejníků, *Chloroidium* bylo dosud jako fotobiont zaznamenáno poměrně vzácně. Určujícím faktorem pro jeho výskyt se zdá být obsah těžkých kovů v substrátu.

Na ostrově La Palma (Kanárské ostrovy) byla objevena nová linie sesterská k rodu *Asterochloris*, naopak se zde nevyskytovala žádná z hojných a celosvětově rozšířených linií tohoto rodu.

Ze zbývajících dvaceti linií rodu *Asterochloris*, byli fotobionti lišejníků rodu *Stereocaulon* zaznamenáni ve dvanácti, ale převážně patřili k druhu *A. irregularis*. Rovněž výskyt některých linií rodu *Asterochloris* byl určen přírodními podmínkami, jako je nadmořská výška či určitý typ substrátu.

Několik ze zkoumaných stélek obsahovalo více genotypů fotobiontů. Většinou se jednalo o zástupce dvou druhů rodu *Chloroidium*, v jednom případě dokonce o fotobionty obou rodů. Tato zjištění ukazují na nečekaně nízkou míru specifity ale poměrně silnou selektivitu vůči fotobiontům.

Klíčová slova: lišejník, *Stereocaulon*, fotobiont, diverzita, *Asterochloris*, *Chloroidium*, Trebouxiophyceae, ITS, La Palma

Abstract

This thesis is focused on the diversity of lichen photobionts and its relation to the mycobionts and environmental factors. The key objective is to map the diversity of lichen photobionts of the genus *Stereocaulon*, which has been insufficiently examined in comparison with related lichens *Cladonia* and *Lepraria*.

In total, 92 samples belonging to 12 species of genus *Stereocaulon* were examined, being found in four continents, at the altitude of 50 to 2 900 metres a. s. l., and variety of natural and artificial substrata. Phylogenetic analyses were inferred on the basis of ITS rDNA, actin type I, 18S rDNA and rbcL sequences.

Photobionts belonging to two unrelated genera within Trebouxiophyceae, *Asterochloris* and *Chloroidium*, were found in thalli of *Stereocaulon* lichens. While *Asterochloris* represents one of the most frequent photobionts of various lichens, *Chloroidium* has been until now recorded as a lichen photobiont very rarely. The content of heavy metals in substratum can be considered as a determinative factor for its occurrence.

A new lineage affiliated to genus *Asterochloris* was discovered on the island La Palma (the Canary Islands). Interestingly, none of common, widespread Asterochloris lineages has been found in this locality. The lichen photobionts of the genus *Stereocaulon* were discovered in 12 of remaining 20 lineages of the genus *Asterochloris*, but they belonged predominantly to the species *A. irregularis*. The occurrence of some *Asterochloris* lineages was probably determined by environmental factors as the altitude or a type of substratum.

Several of investigated thalli contained more than one genotype of photobionts. In most cases they belonged to two species of genus *Chloroidium*, in one case they belonged to both of genera. According to these findings it is becoming apparent that there is an unexpectedly low level of specificity, but a quite high level of selectvity to photobionts.

Key words: lichen, *Stereocaulon*, photobiont, diversity, *Asterochloris*, *Chloroidium*, Trebouxiophyceae, ITS, La Palma

Obsah

1. Seznam zkratek ... 7
2. Úvod ... 8
   2.1. Symbiózy sinic, řas a ostatních organismů ... 8
      2.1.1. Lišejníky ... 8
   2.2. Třída Trebouxiophyceae ... 12
   2.3. *Asterochloris* ... 14
   2.4. *Chloroidium* ... 14
   2.5. Lišejníky rodu *Stereocaulon* ... 15
   2.6. Metody studia diverzity fotobiontů lišejníků ... 17
   2.7. Molekulární metody ... 17
      2.7.1. ITS (internal transcribed spacer) ... 17
      2.7.2. Další jaderné molekulární markery ... 19
      2.7.3. Chloroplastové molekulární markery ... 19
   2.8. Cíle práce ... 20
3. Materiál a metody ... 21
   3.1. Izolace a kultivace fotobiontů ... 21
      3.1.1. Pozorování kultur a buněk fotobiontů ... 21
   3.2. Izolace DNA ... 22
   3.3. Amplifikace úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a sekvenování ... 22
   3.4. Sekundární struktury ITS ... 24
   3.5. Alignment ... 24
   3.6. Fylogenetické analýzy ... 26
4. Výsledky ... 28
   4.1. Fotobionti rodu *Asterochloris* ... 28
   4.2. Linie „Palma“ ... 34
      4.2.1. Sekundární struktura ITS1 a ITS2 ... 38
   4.3. Fotobionti rodu *Chloroidium* ... 40
      4.3.1. Sekundární struktury ITS1 a ITS2 ... 42
5. Diskuse ... 49
   5.1. Diverzita fotobiontů rodu *Asterochloris* ... 49
   5.2. Výskyt fotobiontů rodu *Chloroidium* ... 53
   5.3. Diverzita fotobiontů na ostrově La Palma ... 54
   5.4. Druhový koncept rodů *Asterochloris* a *Chloroidium* ... 56
      5.4.1. Sekundární struktury ITS1 a ITS2 ... 57
      5.4.2. Srovnání v rámci třídy Trebouxiophyceae ... 60
      5.4.3. Taxonomické posouzení linie „Palma“ ... 62
6. Závěr ... 64
7. Seznam literatury ... 66
8. Přílohy ... 72

1. Seznam zkratek

18S rDNA: gen kódující 18S rRNA, část malé jaderné ribosomální podjednotky

BI: Bayesova inference

CBC: Compensatory Base Change, změna nukleotidů na obou stranách párující se části helixu sekundární struktury ITS za podmínky zachování párování; hemi-CBC: jednostranná změna opět nevedoucí ke ztrátě párování

CAUP: Culture Collection of Algae of Charles University in Prague

CCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa

cf.: z latinského confer – porovnat; označuje nejisté nebo nepotvrzené určení

dNTP: deoxyribonukleotid trifosfát (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

ITS: Internal transcribed spacer, mezerníková oblast zahrnující ITS1, 5,8 S rDNA gen a ITS2

ML: Maximum likelihood

MP: Maximum parsimony

rbcL: gen pro velkou podjednotku RuBisCo (ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa)

PCR: Polymerázová řetězová reakce

SAG: Sammlung von Algenkulturen Göttingen

sp.: z latinského species – druh; za rodovým jménem značí fakt, že daný vzorek lze určit pouze do rodu

spp.: za rodovým jménem označuje více druhů daného rodu

UTEX: Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin

2. Úvod

2.1. Symbiózy sinic, řas a ostatních organismů

Mnoho bezobratlých, jako jsou mořské sasanky, koráli, ploštěnci, stejně jako mnoho prvoků vytvořilo mutualistické soužití s fotosyntetizujícími mikroorganismy. Fotobionti zajišťují svým hostitelům přísun živin, který jim dovoluje kolonizovat habitaty, ve kterých by jinak kvůli nedostatku vhodné kořisti nemohli žít (Paracer and Ahmadjian, 2000).

Tito fotobionti patří především k rodu *Chlorella* a jemu podobným organismům (tzv. zoochlorely) a mezi obrněnky (tzv. zooxanthely). Např. mořská sasanka *Anthopleura xanthogrammica* obsahuje dokonce oba typy symbiotických řas současně. Jejich vzájemný poměr závisí na teplotě, ve vyšší teplotě převažují obrněnky (Dimond et al., 2011). Zoochlorellou této mořské sasanky je *Elliptochloris marina* (Trebouxiophyceae; Letsch et al., 2009). Ostatní druhy rodu *Elliptochloris* jsou fotobionty lišejníků nebo žijí volně např. na kůře stromů (Eliáš et al., 2008).

Medúza *Cassiopeia xamachana*, jejíž životní cyklus zahrnuje asexuální stádium polypu, nedokáže dospět, pokud polyp nevytvoří spojení s obrněnkou *Symbiodinium microadriaticum*. Podobně obligátní je i soužití ploštěnce *Convoluta roscoffensis* a zelené řasy *Tetraselmis convolutae*. Dospělý jedinec vůbec nepřijímá potravu a je zcela závislý na živinách, které produkují řasy v jeho těle (Paracer and Ahmadjian, 2000).

Zooxanthely umožňují korálům život v tropických vodách chudých na živiny a stimulují jejich kalcifikaci a tedy tvorbu korálových útesů. Řasy zásobují hostitele kyslíkem a sloučeninami uhlíku a dusíku a přitom využívají (recyklují) jeho odpadní produkty (Marshall, 1996).

Příkladem sladkovodního bezobratlého živočicha žijícího v symbióze s řasami je polyp *Hydra viridis*, který stejně jako nálevník *Paramecium bursaria* žije v symbióze s fotobiontem *Chlorella*. Část fotobiontů *Paramecium bursaria* byla identifikována jako *Micractinium reisseri* blízce příbuzné rodu *Chlorella* (Hoshina et al., 2010).

Sinice vytvářejí mutualistické soužití s řadou rostlin, které využívají jejich schopnosti fixovat vzdušný dusík. Rostlina naopak často poskytuje sinici fotosyntetické produkty. Symbióza na tomto principu funguje např. u vodní kapradiny *Azolla* (se sinicí *Anabaena*), hlevíku *Anthoceros punctatus*, játrovky *Blasia pusilla* či cykasů (se sinicí *Nostoc*; Paracer and Ahmadjian, 2000).

2.1.1. Lišejníky

Lišejník je symbiotický organismus skládající se z houbového partnera (mykobionta) a jednoho nebo více fotosyntetizujících partnerů (fotobiontů), kterými jsou většinou zelené řasy nebo

sinice. Povaha lišejníkové symbiózy je široce diskutovanou a dosud nevyřešenou otázkou. Obecně je chápána především jako mutualismus (oba partneři mají ze soužití prospěch), ale může se jednat také o kontrolovaný parazitismus, čemuž nasvědčuje fakt, že fotobiont roste v lišejníku pomaleji, než když žije volně (Ahmadjian, 1993).

Stélka se svým typickým fenotypem a často charakteristickou kombinací sekundárních metabolitů, vznikne jedině za přítomnosti obou symbiontů. Skládá se z kůry (cortex) a dřeně (medulla), tvořených houbovou tkání, a řasové vrstvy sestávající z buněk fotobionta. Kůra chrání fotobionta před vysoušením a nadměrným zářením, dřeň umožňuje výměnu plynů. Existují tři hlavní typy stélky: korovitá, která je těsně spojena se substrátem a nemá spodní kůru, lupenitá, která není se substrátem spojena tak těsně a má svrchní i spodní kůru, a keříčkovitá (Ahmadjian, 1993). Některé lišejníky (např. *Collema*) mají tzv. homeomerickou stélku, ve které nejsou vrstvy mykobionta a fotobionta rozlišeny (Ahmadjian, 1987).

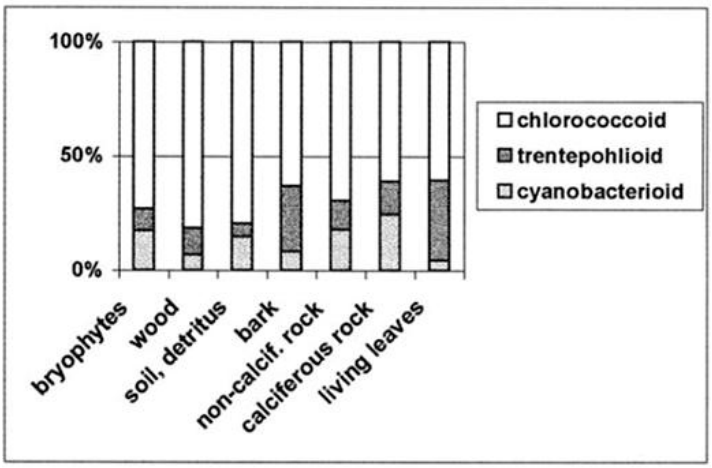
Odhad počtu druhů lišejníků se pohybuje od 13 500 do asi 17 000, a jelikož je mnoho oblastí na světě z hlediska diverzity lišejníků stále málo prozkoumáno, jako pravděpodobnější se jeví vyšší číslo (Nash III, 2008). Naprostá většina lišejníků patří mezi Ascomycota a tvoří téměř polovinu popsaných zástupců tohoto oddělení. Jednotlivé linie ale obsahují ve většině případů lichenizované i nelichenizované zástupce (Ahmadjian, 1987). Malé množství lišejníků patří také mezi Basidiomycota.

Lišejníky se vyskytují v široké škále terestrických prostředí na celém světě. Rostou jako epifyty na stromech a jiných rostlinách, na holé půdě a jako součást půdních krust v aridních a semi-aridních oblastech, na povrchu skal a kamenů (ale i endoliticky pod jejich povrchem (Thüs et al., 2011)) a staveb vytvořených člověkem (Guzow-Krzemińska, 2006). V mnoha polárních a sub-polárních oblastech jsou dominantními autotrofy v ekosystému (Romeike et al., 2002). Několik lišejníků obývá i vodní prostředí (Nash III, 2008).

Řada lišejníků osidluje nově vzniklé substráty a velkou měrou se podílí na jejich erozi, což z nich činí významné pionýrské organismy. Příkladem mohou být lávové proudy na ostrově Lanzarote, kde se nejúčinnějším erozním činitelem jeví být *Stereocaulon vesuvianum*, který dokáže zvětrávání urychlit asi dvacetkrát (Stretch and Viles, 2002). O tom, že lišejníky dokáží odolávat extrémům prostředí, svědčí fakt, že se zástupci druhu *Xanthoria elegans* nejlépe ze všech testovaných organismů vyrovnali s pobytem ve vesmíru, kde byly vystaveny extrémním výkyvům teploty, kosmickému záření, UV záření a vakuu (Hatton, 2010).

Ve stélkách lišejníků bylo zaznamenáno asi 100 druhů ze 40 rodů řas a sinic. Nejčastějšími fotobionty jsou zelené řasy *Trebouxia* a *Trentepohlia* a sinice *Nostoc* (Tschermak-Woess, 1988a;

Friedl and Büdel, 2008). Představu o zastoupení jednotlivých skupin fotobiontů si lze udělat např. z údajů o 822 druzích epifytických lišejníků v Itálii, ze kterých 625 mělo chlorokokálního fotobionta (76%), 61 sinicového fotobionta (cyanobionta; 7,5%) a 136 fotobionta *Trentepohlia* spp. (16,5%). Zastoupení *Trentepohlia* spp. pozitivně korelovalo s teplotou, což se odráží v širším měřítku jejím vyšším zastoupením v tropech (Marini et al., 2011). Nicméně četnost jednotlivých skupin fotobiontů se na různých substrátech liší (Obrázek 1 (Rambold et al., 1998)).



Obrázek 1: Typy fotobiontů ve stélkách lišejníků z oddělení Ascomycota podle substrátu. Převzato z (Rambold et al., 1998).

Nejvíce fotobiontů lišejníků je možné nalézt v rámci třídy Trebouxiophyceae. Fotobionty *Trebouxia* a *Asterochloris* především ve stélkách lišejníků řádu Lecanorales, *Coccomyxa* v Baeomycetaceae a Peltigeraceae, *Dictiochloropsis* v Peltigeraceae a Stictaceae, *Myrmecia* v *Dermatocarpon* (Verrucariales) a mnoho dalších (Friedl and Büdel, 2008). V čeledi Verrucariaceae byla objevena neobyčejná diverzita fotobiontů zahrnující celou řadu zástupců Trebouxiophyceae a Ulvophyceae a navíc rod *Heterococcus* (Xanthophyceae; Thüs et al., 2011).

Mezi oběma symbionty mohou existovat různé formy kontaktu. Nejčastěji to jsou haustoria, vlákna mykobionta pronikající přímo do řasových buněk. Další formou jsou zploštělé hyfy obklopující buňky fotobionta, tzv. appresoria. Haustoria a appresoria se mohou vyskytovat současně. Stupeň pronikání haustorií může záviset na prostředí. Do některých fotobiontů (např. *Myrmecia*, *Coccomyxa*) haustoria nepronikají vůbec, protože to nedovoluje složení jejich buněčné stěny. Kontakt může být rovněž zprostředkován nespecializovanými hyfami (Ahmadjian, 1987).

Vztah mezi symbionty je předmětem mnoha studií. Řada autorů testovala, zda se symbionti vyvíjejí společně a jejich genetická struktura je tedy kongruentní. Tato hypotéza se nepotvrdila (Piercey-Normore and DePriest, 2001; Yahr et al., 2006; Beiggi and Piercey-Normore, 2007; Nelsen and Gargas, 2008) až na jednu výjimku, kdy byl studován lišejník *Lobaria pulmonaria* a jeho symbiont *Dictyochloropsis reticulata* na populační úrovni (Werth and Scheidegger, 2012).

Lišejníky se mohou rozmnožovat vegetativně (pomocí isidií, soredií či fragmentací stélky) i generativně. V druhém případě musí mykobiont přijmout kompatibilního fotobionta z okolního prostředí (případně ze stélky jiného lišejníku (Lücking et al., 2009)), aby mohl vytvořit novou stélku (Beck et al., 1998). Nicméně se ukazuje, že i u převážně či výhradně vegetativně se rozmnožujících lišejníků dochází k horizontálnímu přenosu fotobiontů (Nelsen and Gargas, 2008; Dal Grande et al., 2012).

Výběr vhodného fotobionta se řídí mírou specifity a selektivity obou partnerů. Pojetí těchto pojmů, především pojmu specifita, se v různých pracích značně liší (shrnuto v Helms, 2003). V této práci je pojem specifita používán ve smyslu úzkého taxonomického rozpětí akceptovatelných partnerů, zatímco selektivita je definována jako preference určité skupiny. Symbiont tedy může být vůči druhému partnerovi např. nespecifický, ale vysoce selektivní, pokud dokáže koexistovat s různými nepříbuznými partnery, ale ve většině případů je pozorován ve spojení se zástupci pouze jedné skupiny (Rambold et al., 1998; Yahr et al., 2004).

Obecně lze říci, že mykobionti na úrovni podřádu, čeledi a rodu vykazují vůči fotobiontům vysokou specifitu, vhodnými symbiotickými partnery jsou pro ně příslušníci jednoho rodu či blízce příbuzných rodů. Příkladem jsou dva podřády řádu Lecanorales: skupina *Cladoniineae* preferuje fotobionty rodu *Asterochloris*, zatímco skupina Lecanorineae fotobionty rodu *Trebouxia* (Rambold et al., 1998).

Na nižších taxonomických úrovních se úroveň specifity a selektivity u jednotlivých skupin značně liší. Bačkor et al. (2010) zaznamenali vysokou míru selektivity mykobiontů ze skupiny *Cladonia coccifera* vůči fotobiontům dvou příbuzných druhů *Asterochloris glomerata* a *Asterochloris irregularis*. Naopak např. *C. macilenta* vykazovala velmi nízkou selektivitu, dokonce byl pozorován výskyt více nepříbuzných fotobiontů v jedné stélce.

Ramalina farinacea na několika geograficky vzdálených lokalitách obsahovala ve všech zkoumaných stélkách dvojici fotobiontů rodu *Trebouxia*, vykazovala tedy vůči oběma těmto fotobiontům velmi silnou selektivitu (Casano et al., 2011).

Většina druhů rodu *Lepraria* byla pozorována ve spojení s různými liniemi rodu *Asterochloris*. Selektivitu vůči určité linii vykazovaly druhy *Lepraria borealis*, *L. lobificans* a *L. rigidula* (Peksa and Škaloud, 2011). Zajímavé ale je také to, že všechny druhy rodu *Lepraria* vykazovaly negativní selektivitu vůči fotobiontům *Asterochloris glomerata* a *A. irregularis* (Nelsen and Gargas, 2008; Peksa and Škaloud, 2011).

Nižší specifita a selektivita vůči fotobiontům byla zaznamenána u různých skupin korovitých lišejníků (Helms, 2003; Blaha et al., 2006; Thüs et al., 2011). Helms (2003) má pro tuto

skutečnost dvě možná vysvětlení. Korovité lišejníky nemají spodní kůru a jsou v těsném kontaktu se substrátem, takže mohou snadno přijmout fotobionta z okolního prostředí či jiného lišejníku. Alternativním vysvětlením je fakt, že při izolaci DNA v rámci jeho práce pocházel vzorek korovitých lišejníků zpravidla z větší plochy než u jiných typů stélek.

Selektivita mykobionta může být výrazně ovlivněna podmínkami prostředí. Na základě zkoumání *Lepraria borealis* a dalších lišejníků v okolí a na antarktickém poloostrově Coal Nunatak (Engelen et al., 2010) a lišejníků rodu *Umbilicaria* rovněž v Antarktidě (Romeike et al., 2002) se ukazuje, že nízká selektivita může být adaptací na rychle se měnící podmínky v extrémním prostředí. Zvlášť výhodná se zdá být schopnost změnit fotobionta pro nepohlavně se množící lišejníky (Engelen et al., 2010).

Pohlavně se rozmnožujícím lišejníkům zase nízká selektivita usnadňuje kolonizaci nových habitatů. U lišejníků *Protoparmeliopsis muralis* byla pozorována zřetelně nižší selektivita vůči fotobiontům u položek rostoucích na antropogenních substrátech. Na 4 m^2 cihlové zdi bylo v sousedících stélkách nalezeno pět různých fotobiontů ze čtyř linií rodu *Trebouxia* (Guzow-Krzemińska, 2006).

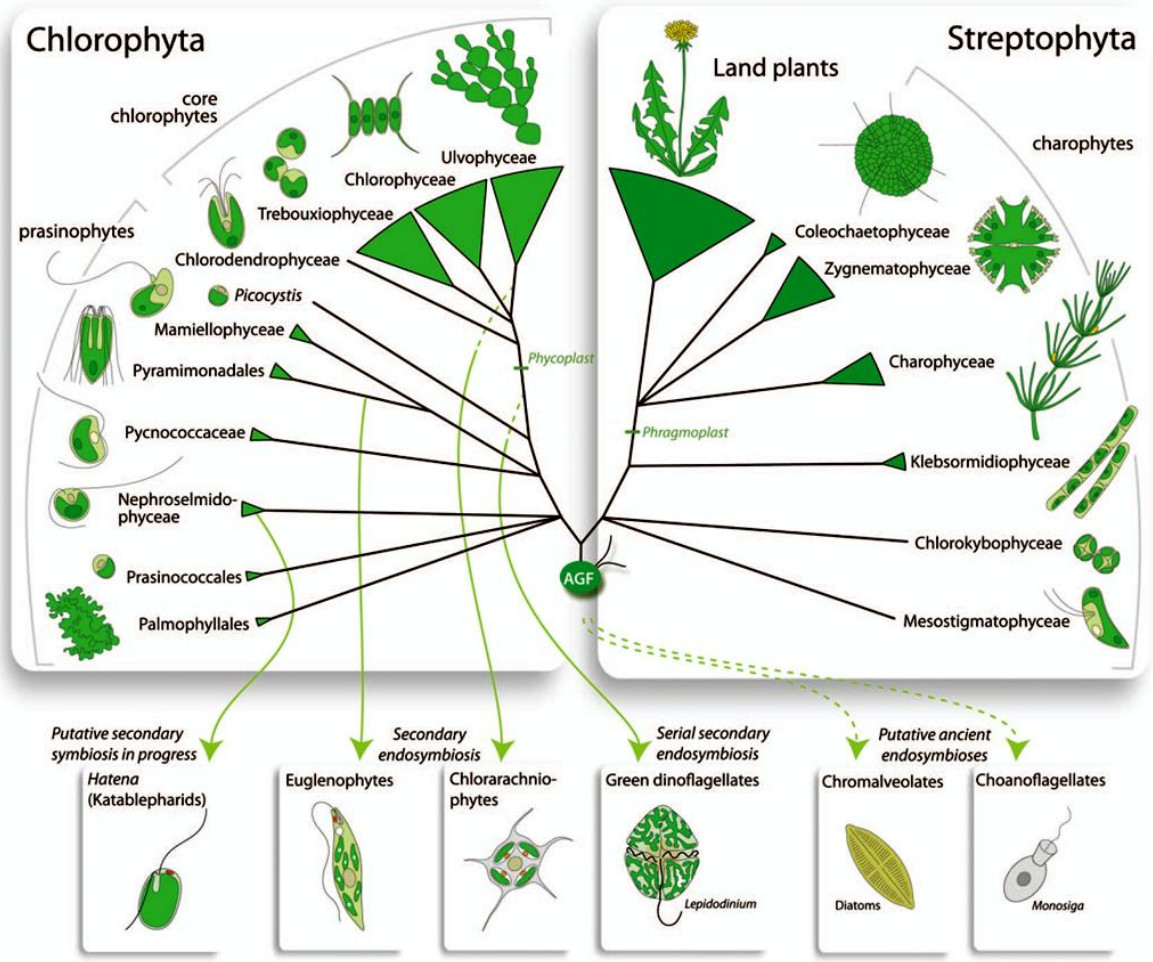
U jednotlivých linií fotobiontů byly zaznamenány různé preference vůči podmínkám prostředí. Dávají přednost vysoké nebo naopak nízké nadmořské výšce (Blaha et al., 2006; Peksa and Škaloud, 2011), jsou pozitivně nebo naopak negativně specifičtí vůči určitým substrátům (Beiggi and Piercey-Normore, 2007; Peksa and Škaloud, 2011) a jsou přizpůsobeni expozici slunci a dešti či naopak zastínění (Peksa and Škaloud, 2011). Výsledkem těchto adaptací může být, že stejné fotobionty sdílejí nepříbuzné lišejníky, které ale mají obdobné ekologické nároky (Lücking et al., 2009).

2.2. Třída Trebouxiophyceae

Třída Trebouxiophyceae patří mezi Chlorophyta (Obrázek 2) a stejně jako příbuzné třídy Chlorophyceae a Ulvophyceae je druhově bohatá a morfologicky a ekologicky značně diverzifikovaná. Fylogenetické studie založené na úseku 18S, chloroplastových i mitochondriálních genech ani ultrastrukturní data nedokázala zatím jednoznačně určit vztah mezi těmito třemi liniemi (shrnuto v Leliaert et al., 2012).

Třída Trebouxiophyceae byla vymezena na základě ultrastrukturních znaků (orientace bičíkového aparátu, způsob mitózy a cytokineze) a později i molekulárních dat. Zahrnuje pohyblivé i nepohyblivé jednobuněčné, koloniální, vláknité a lupenité formy. Její zástupci obývají terestrické, sladkovodní a zřídka i brakické nebo mořské prostředí (Letsch et al., 2009; Leliaert et al., 2012). Dělí se na několik dobře vymezených linií (Chlorellales, Microthamniales,

Trebouxiales, Prasiola clade atd.), ale jejich vzájemný vztah zatím nebyl vyřešen (Leliaert et al., 2012).



Obrázek 2: Přehled fylogeneze zelené linie a rozšíření "zelených genů" mezi jiná eukaryota. Převzato z (Leliaert et al., 2012).

Jak již bylo uvedeno, zástupci této třídy jsou často fotobionty lišejníků či fotosyntetickými partnery řady dalších organismů mezi které patří sladkovodní i mořská protista, bezobratlí (mlži, *Hydra*, mořské sasanky aj. (Letsch et al., 2009; Hoshina et al., 2010)) i rostliny (*Ginkgo*). Symbióza řasy *Cocomyxa* s *Ginkgo*, která byla prokázána u řady jedinců po celém světě, je zvláštní v tom, že fotosyntetická aktivita řasy podle ultrastrukturních pozorování evidentně nehraje roli. Podstata tohoto soužití není zatím vysvětlena (Trémouillaux-Guiller and Huss, 2007).

Molekulární data svědčí o tom, že se tyto symbiotické interakce vyvinuly několikanásobně nezávisle (Friedl and Büdel, 2008; Leliaert et al., 2012). Někteří zástupci ztratili schopnost fotosyntézy a přizpůsobili se parazitickému způsobu života (např. *Prototheca*).

2.3. *Asterochloris*

Rod *Asterochloris* (Trebouxiophyceae) patří mezi nejhojněji se vyskytující fotobionty lišejníků. Byl zaznamenán ve stélkách asi 120 druhů lišejníků z 26 rodů (shrnuto v doplňující tabulce k publikaci Škaloud and Peksa, 2010). Původně byl považován za součást rodu *Trebouxia*. V roce 1980 byl popsán jeho typový druh *Asterochloris phycobiontica* z lišejníku *Anzina carneonivea* (Tschermak-Woess, 1980), ale i ten byl později přeřazen do rodu *Trebouxia* (Tschermak-Woess, 1989). V souladu s doporučením řady autorů (Rambold et al., 1998; Piercey-Normore and DePriest, 2001; Helms, 2003) byl nakonec na základě molekulárních i ultrastrukturních dat vyčleněn (Škaloud and Peksa, 2010).

Asterochloris se vyznačuje především parietální pozicí chloroplastu před buněčným dělením, typickou ultrastrukturou matrix pyrenoidu, hluboce laločnatým chloroplastem, spíše vejčitým, eliptickým nebo hruškovitým tvarem buňky a rozmnožováním pomocí aplanospor (typicky 64–128) a zoospor, zřídka autospor (shrnuto ve Škaloud, 2008).

V současnosti je formálně popsáno sedm druhů (*Asterochloris phycobiontica*, *A. glomerata*, *A. irregularis*, *A. magna*, *A. erici*, *A. excentrica*, *A. italiana*), ale dalších 12 linií je zřetelně vymezeno na základě molekulárních dat a v mnoha případech také na základě morfologie, specifity k určitému mykobiontovi či preferencí k různým parametrům prostředí (Piercey-Normore and DePriest, 2001; Nelsen and Gargas, 2008; Škaloud, 2008; Škaloud and Peksa, 2010; Peksa and Škaloud, 2011).

Lišejníky ze skupiny Cladoniineae vykazují silnou specifitu vůči fotobiontům *Asterochloris* spp. (Rambold et al., 1998), ale diverzita rodu byla studována hlavně ve stélkách lišejníků rodu *Cladonia* (Piercey-Normore and DePriest, 2001; Beiggi and Piercey-Normore, 2007) a *Lepraria* (Nelsen and Gargas, 2008; Peksa and Škaloud, 2011).

Stejně jako u příbuzného rodu *Trebouxia*, je existence volně žijících populací *Asterochloris* považována za nepravděpodobnou (Ahmadjian, 1987, 1993). Pro opak svědčí např. pozorování epifytických *Asterochloris* spp. a *Trebouxia* spp. na lišejnících z čeledi Verrucariaceae (Thüs et al., 2011). Velmi přesvědčivý je údaj o výskytu buněk *Trebouxia* spp. mezi prvními kolonizátory v oblasti kompletně sterilizované lesním požárem, mnohem dříve, než se objevil první lišejník (Mukhtar et al., 1994).

2.4. *Chloroidium*

Zástupci rodu *Chloroidium* (Trebouxiophyceae) jsou široce rozšířeni na přírodních i umělých terestrických i vodních stanovištích (Darienko et al., 2010). V několika případech byli zaznamenáni jako fotobionti lišejníků (Tschermak-Woess, 1948, 1978, 1988b; Beck, 2002).

K rodu byly recentně přeřazeny elipsoidní řasy podobné rodu *Chlorella* do té doby známé pod různými názvy (*Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella trebouxioides*, *Pseudochlorella aquatica, Chlorella saccharophila*, *Chlorocloster engadiensis*, *Chlorella angustoellipsoidea*) na základě morfologie, ekofyziologie a kombinace molekulárních markerů 18S a ITS (Darienko et al., 2010). Současně byly jako příslušníci rodu *Chloroidium* určeny některé kultury chybně zařazené ke *Glaphyrella trebouxioides* a *Elliptochloris* sp.. Momentálně jsou platně popsány čtyři druhy: *C. ellipsoideum*, *C. angustoellipsoideum*, *C. engadiensis* a *C. saccharophilum* (Darienko et al., 2010).

Rod *Chloroidium* patří do tzv. „*Watanabea* cladu" (Obrázek 11, obdobně jako např. Darienko et al. 2010; Neustupa et al. 2011). Vyznačuje se elipsoidním až vejčitým tvarem buňky, parietálním chloroplastem (laločnatým nebo nelaločnatým, nikdy hrncovitým), relativně tenkou buněčnou stěnou tloustnoucí s věkem a reprodukcí pomocí autospor nestejné velikosti. Dále je pro něj charakteristická produkce ribitolu, která jej odlišuje např. od rodu *Chlorella*, ale je rozšířeným jevem mezi terestrickými řasami (Darienko et al., 2010).

2.5. Lišejníky rodu *Stereocaulon*

Rod *Stereocaulon* má v současnosti 130–140 druhů (Högnabba, 2006). Tradičně do něj patří lišejníky mající korovitou primární stélku, ze které vyrůstá sekundární stélka. V poslední době navíc do rodu přibylo několik korovitých druhů na základě dalších morfologických charakteristik.

Do rodu *Stereocaulon* byl na základě fylogenetických analýz několika molekulárních markerů přiřazen i monotypický rod *Muhria* (Myllys et al., 2005; Högnabba, 2006). Díky tomu nyní tvoří monofyletickou skupinu rozlišenou na osm linií. Molekulární data však nepodporují mnoho tradičních druhů, mezi které patří např. *S. alpinum*, *S. incrustatum*, *S. saxatile*, *S. vesuvianum* a další (Obrázek 3 (Högnabba, 2006)).

Na rod *Stereocaulon* se upírá pozornost kvůli jeho výskytu v polárních oblastech, s tím související produkcí sekundárních metabolitů a jejich možnému praktickému využití (Paudel et al., 2008; Seo et al., 2008; Wilson and Brimble, 2009). Nicméně jeho rozšíření se zdaleka na tyto oblasti neomezuje.

Diverzita fotobiontů lišejníků rodu *Stereocaulon* byla studována jen ojediněle a pouze na malém množství vzorků (Nelsen and Gargas, 2006). Většinou byli fotobionti lišejníků tohoto rodu zkoumáni v rámci prací zaměřených na diverzitu fotobiontů rodu *Lepraria* ze stejné čeledi (*Stereocaulaceae*; Nelsen and Gargas, 2008; Peksa and Škaloud, 2011) či dalších lišejníků (Rambold et al., 1998; Piercey-Normore and DePriest, 2001; Bačkor et al., 2010; Škaloud and Peksa, 2010). Mykobionti rodu *Stereocaulon* mohou kromě zelených řas vytvářet symbiózu

Obrázek 3: MP fylogenetický strom vytvořený na základě ITS a genu pro β-tubulin. Hodnoty Bremerovy podpory (Decay Index) jsou vyznačeny na větvích. Uvedena je současná klasifikace druhů. Vyznačeno je osm linií a outgroup. Převzato z (Högnabba, 2006).

rovněž se sinicemi, které jsou v takovém případě soustředěny v tzv. cefalodiích (Lücking et al., 2009).

2.6. Metody studia diverzity fotobiontů lišejníků

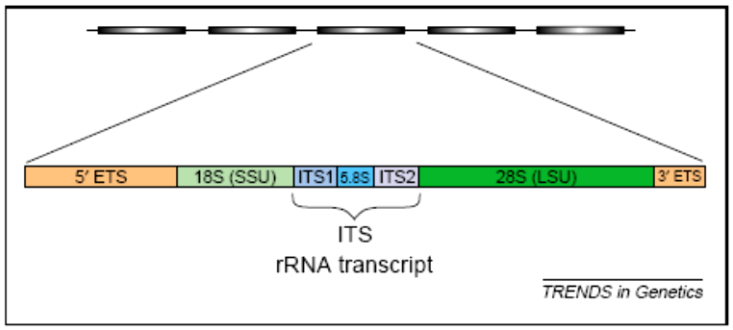
Určování fotobiontů na základě morfologie komplikuje fakt, že většina důležitých znaků jako je tvar a velikost buněk a morfologie chloroplastu se ve stélce lišejníku výrazně mění (Peksa and Škaloud, 2008). Vláknité řasy mohou být navíc redukovány na krátká vlákna nebo jednotlivé buňky (Friedl and Büdel, 2008). Proto tomuto určování musí předcházet kultivace fotobiontů, která je mnohdy obtížná a časově náročná (Helms, 2003).

S nástupem molekulárních metod se tento problém částečně vyřešil, jelikož lze DNA fotobionta izolovat přímo ze stélky, tedy bez potřeby kultivace, a následně za použití řasově specifických primerů amplifikovat příslušný úsek (Piercey-Normore and DePriest, 2001). Nicméně od kultivace fotobiontů se neupouští ani při využití molekulárních metod, jelikož v některých případech použití DNA izolované přímo ze stélky přináší další metodické obtíže (Thüs et al., 2011).

2.7. Molekulární metody

2.7.1. ITS (internal transcribed spacer)

Jako ITS je tradičně chápána celá oblast mezi jadernými geny pro malou ribosomální podjednotku a velkou ribosomální podjednotku: první mezerníková oblast ITS1, 5,8 RNA gen a druhá mezerníková oblast ITS2. Obě mezerníkové oblasti jsou odstraněny enzymy, které vytváří finální 18 S, 5,8S a 28 S RNA (Coleman 2007).



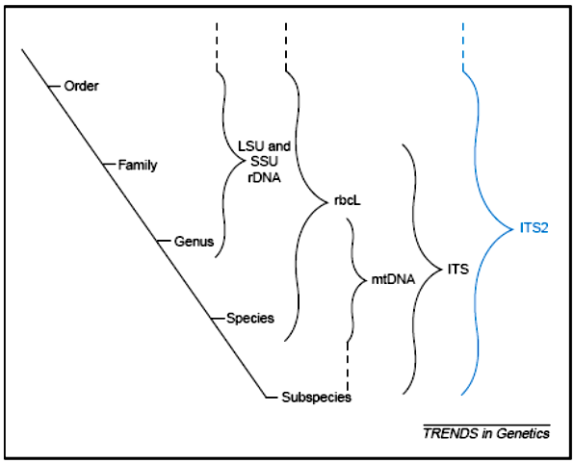
Obrázek 4: Diagram znázorňující organizaci nukleárních ribosomálních cistronů (šedé obdélníky) a jejich primární RNA transkript. Převzato z (Coleman, 2003).

Tato oblast je u rostlin jedním z nejpoužívanějších molekulárních markerů na rodové a nižší úrovni (Álvarez and Wendel, 2003). Využití této sekvence má řadu výhod, mezi které patří především biparentální dědičnost (díky tomu, že se jedná o jaderný marker), univerzálnost (existují univerzální primery použitelné pro celou řadu organismů (White et al., 1990)) a velké

množství kopií v genomu a malá délka umožňující snadnou amplifikaci pomocí PCR (s výjimkou nahosemenných rostlin, které mají tuto oblast enormně dlouhou (Campbell et al., 2005; Xian-Zhao et al., 2007)).

Álvarez a Wendel (2003) ovšem upozorňují na to, že některé z těchto výhod, mohou být současně i nevýhodami: např. při použití univerzálních primerů je značné nebezpečí kontaminace a vysoký počet kopií v genomu může u některých skupin vést k intragenomické variabilitě. Značná variabilita sekvence může navíc působit problémy při vytváření alignmentu, především mezi zkoumanou skupinou a sekvencemi zvolenými jakou outgroup.

Tento problém se z velké části vyřešil použitím sekundárních struktur (viz níže), které určují alignment párujících se pozic (Coleman 2007). Při založení alignmentu ITS2 na sekundárních strukturách, ho lze vytvořit v rámci taxonomické kategorie až do úrovně řádu (Coleman and Mai, 1997; Obrázek 5). Fylogenetický strom vytvořený na základě takovéhoto alignmentu v rámci řádu Fagales byl kongruentní s analýzami na základě 18S a chloroplastových genů (Coleman, 2003).



Obrázek 5: Diagram hiearchie taxonomických kategorií (řád, čeleď, rod, druh, poddruh). Závorky znázorňují přibližné rozpětí, ve kterém je určitá DNA sekvence běžně používána pro fylogenetické analýzy. Závorka ITS2 reprezentuje možné rozpětí při použití sekundární struktury ITS2. Převzato z (Coleman 2003).

Úseky RNA ITS1 a ITS2 tvoří sekundární struktury na základě komplementarity různých úseků sekvence (vlásenkové struktury). Ta díky tomu obsahuje konzervované úseky důležité pro tvorbu sekundární struktury a naopak smyčky na konci těchto vlásenkových struktur s častými insercemi, delecemi a substitucemi. Změny jednotlivých nukleotidů v konzervovaných úsecích ITS jsou vzácné z důvodu zachování párování v sekundární struktuře, ale jejich pravděpodobnost je výrazně vyšší, než pravděpodobnost oboustranných změn (Compensatory Base Change - CBC). Taková změna vyžaduje změny na dvou od sebe v primární struktuře vzdálených místech splňující požadavky na zachování vodíkových vazeb (Coleman, 2000).

Přítomnost těchto CBC mezi sekundárními strukturami především ITS2 označují Coleman et al. (Coleman et al., 1994) za známku toho, že jsou dané organismy rozdílnými biologickými druhy, naopak jejich nepřítomnost ale nelze považovat za důkaz toho, že se jedná o stejný druh (Müller et al., 2007).

2.7.2. Další jaderné molekulární markery

Nejčastěji využívaným markerem pro studie na vyšší taxonomické úrovni, než je rod (Obrázek 4, Obrázek 5), je sekvence 18S rDNA, genu kódujícího 18S rRNA, část malé jaderné ribosomální podjednotky. Na jeho základě byla např. definována třída Trebouxiophyceae (Friedl, 1995). Nicméně obsahuje velmi variabilní oblasti V4 a V5, které lze použít pro fylogenetické analýzy i na druhové úrovni (Friedl and Rokitta, 1997). Tato sekvence se často využívá také v kombinaci s ITS (Darienko et al., 2010; Luo et al., 2010) či chloroplastovým markerem rbcL (Sherwood et al., 2000; Thüs et al., 2011).

Jako alternativa k 18S může být využita část sekvence 26S rDNA (genu kódujícího 26 rRNA, část velké jaderné ribosomální podjednotky; Obrázek 4, Obrázek 5). Úsek asi 1 300 bp (asi 40 % celkové délky genu) na 5‘ konci sekvence, vykazoval v sekvencích *Trebouxia* spp. a zástupců příbuzných rodů asi 1,5x více variabilních pozic, než celý úsek 18S. Tento úsek zahrnuje rovněž dvě hypervariabilní oblasti D1 a D2 použitelné na nejnižší taxonomické úrovni (Friedl and Rokitta, 1997).

Pro fylogenetické analýzy na úrovni druhu se ukázala vhodná sekvence genu pro aktin. U rodu *Trebouxia* se potvrdila předchozí pozorování dvou typů tohoto genu, a proto byly vytvořeny specifické primery pro aktinový gen typu I, aby bylo možné analyzovat pouze orthology (Kroken and Taylor, 2000). Sekvence sestává ze dvou intronů a jednoho exonu. Má více variabilních pozic než ITS a fylogenetické stromy vytvořené pouze na základě genu pro aktin typu I či v kombinaci s ITS poskytují lepší rozlišení linií a vyšší podporu jednotlivých větví (Kroken and Taylor, 2000; Nelsen and Gargas, 2006; Škaloud and Peksa, 2010).

2.7.3. Chloroplastové molekulární markery

Plastidové markery jsou u fotobiontů lišejníků využívány výrazně méně, než u cévnatých rostlin (del Campo et al., 2010). V poměrně širokém rozpětí taxonomických kategorií se používá sekvence rbcL (Muggia et al., 2010; Thüs et al., 2011; Leliaert et al., 2012), která je kratší a variabilnější, než sekvence 18S. RbcL je protein kódující gen (velká podjednotka RuBisCo) a neobsahuje inserce/delece, proto je snadné vytvořit alignment získaných sekvencí. Evoluce tří pozic ve čtecím rámci probíhá různou rychlostí a na třetí pozici může docházet k saturaci. V takovém případě je možné provádět fylogenetické analýzy pouze na základě prvních dvou pozic (Sherwood et al., 2000).

2.8. Cíle práce

Cílem této práce je zmapovat diverzitu fotobiontů ve stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon* a dále odpovědět na následující otázky:

- Objeví se nové linie v rámci rodu *Asterochloris*?
- Jsou některé linie fotobiontů pozitivně či negativně specifické pro tohoto mykobionta?
- Jsou mykobionti rodu *Stereocaulon* selektivní vůči fotobiontům?
- Mohou stélky tohoto lišejníku obsahovat současně více druhů či rodů fotobiontů?
- Jakým způsobem diverzitu fotobiontů ovlivňují parametry prostředí jako je typ substrátu nebo nadmořská výška?

3. Materiál a metody

Bylo zpracováno celkem 92 položek lišejníků rodu *Stereocaulon* (Příloha 1), z nichž 30 byly vlastní sběry. Ostatní položky byly většinou zapůjčeny z jiných herbářů. Využit byl materiál z let 2008–2012. Sběr materiálu byl prováděn na různých lokalitách v České republice, v Rakousku, Německu, Finsku, v Rusku (na východní Sibiři), v USA (na Aljašce), na Kanárských ostrovech, v Grónsku, Argentině a Mexiku v nadmořských výškách od 50 do 2 900 m n. m. Materiál byl sbírán na různorodých přírodních i umělých substrátech, jako jsou různé kameny a skály (čedičové, žulové aj.), láva, půda, struska, textil, kov a pěnová izolace.

Pomocí konvenčních lichenologických metod se podařilo identifikovat 12 druhů mykobiontů[1]. Část položek bylo s jistotou možné určit pouze do rodu. Nejčastějším druhem mykobionta byl *Stereocaulon vesuvianum* (29 položek), dalšími hojnými druhy byly *Stereocaulon paschale*, *S. alpinum*, *S. tomentosum*, *S. nanodes*, jednou či dvěma položkami byly zastoupeny druhy *S. apocalypticum*, *S. condensatum*, *S. dactylophyllum*, *S. intermedium*, *S. pileatum*, *S. spathuliferum* a *S. symphycheilum*.

3.1. Izolace a kultivace fotobiontů

Z vybraných položek byli izolováni fotobionti do kultur metodou izolace z fragmentu stélky (Ahmadjian, 1993; Peksa and Škaloud, 2008): malé kousky stélky byly umístěny na 2% agarové modifikované BBM médium (Sigma) na Petriho miskách (o průměru 50 mm) a inkubovány při teplotě 18°C a osvětlení 20–30 $mmol.m^{-2}.s^{-1}$, 16 hodin světlo : 8 hodin tma. Misky byly pravidelně kontrolovány, zda se neobjevuje houbová kontaminace. V takovém případě byla kontaminovaná část média opatrně odstraněna, nebo byl fragment stélky přenesen na novou misku. Po přibližně třech týdnech byla kolonie fotobiontů narostlá vedle fragmentu stélky přenesena na novou misku (o průměru 30 mm) se stejným médiem a nadále kultivována při stejných podmínkách.

Tímto způsobem byli vyizolováni fotobionti z 52 stélek lišejníků (z každé průměrně dvě až tři kultury). Celkem z 25 kultur pocházejících ze 16 stélek byly získány sekvence ITS (Příloha1).

3.1.1. Pozorování kultur a buněk fotobiontů

Kultury byly průběžně pozorovány pomocí binokulární lupy. K pozorování jednotlivých buněk byl používán mikroskop Olympus BX 51. Buňky byly fotografovány při čtyřsetnásobném zvětšení fotoaparátem Olympus Z5060 instalovaném na tomto mikroskopu.

[1] Položky použité v této práci určovali Ondřej Peksa, Lucia Muggia, Zdeněk Palice, Jiří Malíček, David Svoboda, Dietmar Trauber a Walter Obermayer.

3.2. Izolace DNA

DNA ze stélky byla izolována dle modifikovaného protokolu CTAB (Cubero et al., 1999). Oproti tomuto protokolu nebyl materiál rozdrcen pomocí tekutého dusíku, nýbrž pomocí wolframových kuliček v mlýnku Retsch MM200 při 13 000 rpm. DNA byla resuspendována v 25 µL TE pufru a následně naředěna sterilní Milli-Q vodou v poměru 1:20.

DNA z buněk fotobiontů z kultur byla izolována pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) dle instrukcí výrobce s drobnými úpravami.

3.3. Amplifikace úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a sekvenování

Úsek ITS1-5,8S-ITS2 rDNA byl amplifikován pomocí řasově specifického primeru nr-SSU-1780-5‘ a univerzálního primeru ITS4-3‘. Část úseku 18S rDNA byla nejprve amplifikována pomocí primerů 18S SEQ 1122f-5‘ a ITS2N-3’. Na základě získané sekvence tohoto úseku byl vytvořen specifický primer Astero-vivi-3’. Zbývající část 18S rDNA byla amplifikována primery 18S F-5‘ a novým specifickým primerem Astero-vivi-3’. Pro úsek rbcL byla u různých vzorků použita jedna z následujících kombinací primerů: PRASF1-5’ a PRASR1-3’; a-ch-rbcL-203-5’-MPN-5’ a a-ch-rbcL-991-3’-MPN-3’ (Tabulka 1).

Tabulka 1: Přehled použitých primerů

Název	Použití	Úsek	Sekvence primeru	Zdroj
nr-SSU-1780-5‘	amplifikace/ sekvenace	ITS	5‘-CTGCGGAAGGATCATTGATTC-3‘	(Piercey-Normore and DePriest, 2001)
ITS4-3‘	amplifikace/ sekvenace	ITS	5‘-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3‘	(White et al., 1990)
PRASF1-5‘	amplificece/ sekvenace	rbcL	5’-ATGGTTCCACAAACAGAAAC-3’	(Sherwood et al., 2000)
PRASR1-3‘	amplificece/ sekvenace	rbcL	5‘-TTGTCAATAGTATCAAATTC-3‘	(Sherwood et al., 2000)
a-ch-rbcL-203-5’-MPN-5’	amplificece/ sekvenace	rbcL	5’-GAATCWTCWACWGGWACTT GGACWAC-3’	(Nelsen et al., 2011)
a-ch-rbcL-991-3’-MPN-3’	amplifikace	rbcL	5‘-CCTTCTARTTTACCWACAAC-3’	(Nelsen et al., 2011)
18S F-5‘	amplifikace	18S	5’-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3’	(Katana et al., 2001)
18S SEQ 1122f-5‘	amplifikace/ sekvenace	18S	5’-GGCTGAAACTTAAAGGAATTG-3’	(Thüs et al., 2011)
18S SEQ 34f-5‘	sekvenace	18S	5‘-GTCTCAAAGATTAAGCCATGC-3’	(Thüs et al., 2011)
ITS2N-3‘	amplifikace	18S	5’-TCGCTGCGTTCTTCATC-3’	(Beck et al., 1998)
Astero-vivi-3‘	amplifikace	18S	5‘-TCACCAGCACGTCCAAT-3‘	vlastní primer
18S 402-23F-5‘	sekvenace	18S	5’-GCTACCACATCCAAGGAAGGCA-3’	(Katana et al., 2001)
18S 895-916F-5‘	sekvenace	18S	5‘-GTCAGAGGTGAAATTCTTGGAT-3’	(Katana et al., 2001)
Al 1500af-5‘	sekvenace	18S	5‘-GCGCGCTACACTGATGC-3‘	(Helms et al., 2001)

Všechny PCR reakce probíhaly v objemu 20 µL reakční směsi. Pro amplifikaci úseku ITS byla použita následující reakční směs:

- 2 µL 10x PCR pufru (Sigma)
- 0,4 µL 10 µM dNTP
- 0,2 µL 25 mM $MgCl_2$
- 0,25 µL 25 pM/mL forward primeru
- 0,25 µL 25 pM/mL reverse primeru
- 0,5 µL Red Taq DNA polymerázy (Sigma)
- 1–5 µL DNA
- doplnění do objemu 20 µL sterilní Milli-Q vodou

Pro amplifikaci úseků 18S a rbcL byla použita následující reakční směs:

- 4 µL 5x MyTaq reakčního pufru (Bioline)
- 0,5 µL 25 pM/mL forward primeru
- 0,5 µL 25 pM/mL reverse primeru
- 0,2 µL MyTaq™ HS DNA polymerázy (Bioline)
- 3 µL DNA
- 11,8 µL sterilní Milli-Q vody

PCR reakce probíhala v termocykleru PCR Mastercycler Gradient (Eppendrorf). Pro amplifikaci fragmentu ITS byl využit následující program:

- iniciální denaturace 94°C, 5 minut
- 35 cyklů: denaturace 94°C, 1 minuta, annealing 50°C, 1 minuta, elongace 72 °C , 2 minuty
- finální elongace 72°C, 10 minut

Pro amplifikaci fragmentu 18 S byl využit následující program:

- iniciální denaturace 95°C, 1 minuta
- 35 cyklů: denaturace 95°C, 1 minuta, annealing 52°C, 1 minuta, elongace 72 °C , 2 minuty
- finální elongace 72°C, 10 minut

Pro amplifikaci fragmentu rbcL byl využit následující program (Thüs et al., 2011):

- iniciální denaturace 95°C, 5 minut
- 35 cyklů: denaturace 95°C, 45 sekund, annealing 47°C, 90 sekund, elongace 72°C, 2 minuty
- finální elongace 72°C, 10 minut

Přítomnost fragmentů DNA o předpokládané délce (v porovnání s markerem O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix) byla zjišťována pomocí elektroforézy. 2 µL PCR produktu bylo naneseno na 1% TAE

agarózový gel a značeno pomocí ethydiumbromidu. Zbývající objem PCR produktu byl přečištěn pomocí kitu GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma) nebo QIAquick Purification Kit (Qiagen) podle instrukcí výrobce s drobnými úpravami. Koncentrace přečištěného PCR produktu byla měřena na přístroji NanoDrop 1000.

Sekvenování provedla firma Macrogen Ltd. na sekvenátoru 3730XL DNA sequencer. Úsek ITS1-5,8S-ITS2 rDNA byl sekvenován pomocí primeru nr-SSU-1780-5‘, ITS4-3‘, nebo oběma primery. Úsek 18S rDNA byl sekvenován vzhledem k délce sekvence několika primery: 18S SEQ 34f-5‘, 18S 402-23F-5‘, 18S 895-916F-5‘, 18S SEQ 1122f-5‘ a Al 1500af-5’. Část úseku rbcL byla sekvenována buď primerem a-ch-rbcL-203-5’-MPN-5’ nebo kombinací primerů PRASF1-5’ a PRASR1-3’ (Tabulka 1). Pro prohlížení, úpravy a spojování sekvencí byl využit program SeqAssem (Hepperle, 2004).

3.4. Sekundární struktury ITS

Sekundární struktury ITS1 a ITS2 byly zkonstruovány u sekvencí, které to umožňovaly, na základě publikované struktury (Škaloud and Peksa, 2010). Zbývající sekundární struktury ITS1 byly vytvořeny s pomocí programu Mfold (Zuker, 2003) při teplotě 15°C. K vytvoření zbývajících sekundárních struktur ITS2 byla použita aplikace pro homologní modelování v rámci ITS2 database (Wolf et al., 2005) a program Mfold. Všechny sekundární struktury byly editovány a vizualizovány pomocí programů 4SALE (Seibel et al., 2006) a VARNA (Darty et al., 2009).

3.5. Alignment

Alignmenty úseku ITS byly sestaveny na základě sekundárních struktur, jejichž využití zlepšuje fylogenetické analýzy (Coleman and Mai, 1997; Wiemers et al., 2009; Keller et al., 2010), v programu MEGA verze 4 (Tamura et al., 2007).

Sekvence ITS fotobiontů zaznamenané ve zkoumaných položkách byly natolik rozdílné, že z nich nebylo možné sestavit jeden alignment. Byly tedy rozděleny do dvou souborů dat „ITS *Asterochloris*“ a „ITS *Chloroidium*“.

Alignment „ITS *Asterochloris*“ s 67 vlastními sekvencemi úseku ITS byl doplněn o sekvence ze studií zabývajících se fotobionty rodu *Asterochloris* včetně sekvencí genu pro aktin typu I, díky nimž bylo možné vytvořit lépe podpořený fylogenetický strom (Nelsen and Gargas, 2006; Škaloud and Peksa, 2010; Peksa and Škaloud, 2011). Dále byly přidány vybrané sekvence ITS z GenBanku (Benson et al., 2011) a šest sekvencí fotobiontů poskytnutých Terezou Řídkou (Příloha2).

Vybrány byly především sekvence, u kterých byla pomocí nástroje BLAST zjištěna vysoká míra shody s nově získanými sekvencemi (Altschul et al., 1990). Identické sekvence byly zařazeny v případě, že přispěly k zachycení diverzity mykobiontů dané linie, různých parametrů prostředí, či výskytu v různých geografických oblastech.

Po odstranění pozic, na kterých byly ve většině sekvencí mezery, měl výsledný alignment 1 141 znaků, z toho 519 tvoří úsek ITS a 622 gen pro aktin typu I (Tabulka 2). Z celkového počtu 146 sekvencí bylo v alignmentu ponecháno 76 unikátních.

Tabulka 2: Délka a vybraný substituční model jednotlivých částí alignmentu "ITS *Asterochloris*"

	ITS			aktin		
	ITS1	5,8 S	ITS2	intron 1	exon	intron 2
Délka alignmentu	161	154	204	208	123	291
Substituční model	GTR+Γ	JC	SYM+Γ	HKY+Γ	K80+I	HKY+Γ

Do alignmentu „ITS *Chloroidium*" byly ke 40 vlastním sekvencím přidány 3 sekvence fotobiontů poskytnuté Terezou Řídkou, publikované sekvence volně žijících zástupců (Darienko et al., 2010) a sekvence z GenBanku (Benson et al., 2011) (Příloha 3).

Z alignmentu byla na základě modelů sekundárních struktur odstraněna část odpovídající helixu IV struktury ITS2 u sekvencí *C. engadiensis* a *C. saccharophilum*, jelikož sekundární struktura ITS2 u zbývajících druhů tento helix postrádá. Naopak byla u těchto druhů ponechána velká inserce v oblasti ITS1. Po odstranění ostatních pozic, na kterých byly ve většině sekvencí mezery, měl výsledný alignment 626 znaků (Tabulka 3). Z celkového počtu 70 sekvencí bylo v alignmentu ponecháno 30 unikátních.

Tabulka 3: Délka a vybraný substituční model jednotlivých částí alignmentu "ITS *Chloroidium*"

	ITS1	5,8 S	ITS2
Délka alignmentu	288	159	179
Substituční model	GTR+I	K80+I	HKY+I

Alignment sekvencí genu pro malou jadernou ribosomální podjednotku (18 S rDNA) sestával ze tří vlastních sekvencí zástupců linie „Palma", ze sekvencí zástupců hlavních linií v rámci třídy Trebouxiophyceae (66 sekvencí) z GenBanku (Benson et al., 2011) a dvou sekvencí rodu *Nephroselmis* (Nephroselmidophyceae, Prasinophytina), které byly vybrány jako outgroup.

Z alignmentu byly odstraněny introny a další pozice, na kterých byly ve více než polovině sekvencí mezery či chybějící data. Po odstranění těchto pozic, byly sekvence L1616 a L1618 shodné (původně obě obsahovaly intron), byla tedy pro další analýzy v alignmentu ponechána pouze jedna z nich. Výsledný alignment obsahoval 70 unikátních sekvencí a byl dlouhý 1 763 znaků.

Do alignmentu sekvencí genu pro velkou podjednotku RuBisCo (rbcL) bylo ke třem vlastním sekvencím zástupců linie „Palma“ vybráno ze sekvencí dostupných v GenBanku (Benson et al., 2011) 40 sekvencí tak, aby pokryly pokud možno hlavní linie třídy Trebouxiophyceae. Nicméně se nepodařilo najít sekvence zástupců některých linií nebo byla z dané linie nalezena pouze jediná sekvence. Dále byly přidány dvě sekvence rodu *Nephroselmis* (Nephroselmidophyceae, Prasinophytina), které byly použity jako outgroup.

Jelikož byly sekvence různě dlouhé, byly z alignmentu odstraněny koncové úseky, na kterých bylo příliš mnoho (≥50 %) chybějících dat. Výsledný alignment obsahoval 45 unikátních sekvencí a měl 1 216 znaků (Tabulka 4).

Tabulka 4: Počet znaků a vybraný substituční model jednotlivých částí alignmentu rbcL

	1. pozice	2. pozice	3. pozice
Počet znaků	405	406	405
Substituční model	GTR + Γ + I	JC + Γ + I	GTR + Γ + I

3.6. Fylogenetické analýzy

Jelikož evoluce různých částí vybraných markerů probíhá různou rychlostí, byly substituční modely pro následující analýzy vypočteny v rámci úseku ITS zvlášť pro část ITS1, ITS2 a 5,8 S rDNA, v rámci úseku genu pro aktin typu I pro exon a každý z intronů (Tabulka 2, Tabulka 3) a v rámci úseku rbcL pro každou z pozic ve čtecím rámci (Tabulka 4). Substituční model byl určen podle Akaike Information Criterion pomocí programu PAUP/MrModeltest (Nylander, 2004).

Fylogenetický strom pro každý výše uvedený soubor dat byl nalezen metodou Bayesovy inference (BI) v programu Mr. Bayes verze 3.1.2. (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) pomocí Markov Chain Monte Carlo (MCMC) metody. Byly použity dva paralelní MCMC chody, každý se třemi horkými a jedním studeným řetězcem. Analýza běžela po 3 000 000 generací v případě souboru dat „ITS *Asterochloris*“, rbcL a 18S rDNA a po 8 000 000 generací v případě „ITS *Chloroidium*“. Stromy a parametry byly zaznamenány každých 100 generací.

Statistická podpora jednotlivých větví byla spočítána také metodou maximum likelihood v programu GARLI (Zwickl, 2006) a metodou maximum parsimony v programu PAUP (Swofford, 2003). ML analýza byla provedena podle modelu GTR + Γ + I pro soubor dat „ITS *Asterochloris*“, rbcL a 18 S rDNA a podle modelu GTR + I pro soubor dat „ITS *Chloroidium*“ na základě 100 opakování heuristické analýzy s automatickým ukončením po 100000 generacích bez signifikantního zlepšení topologie stromu.

Bootstrapová podpora a posteriorní pravděpodobnost byla interpretována jako slabá (<50%), střední (50–94 % pro BI, 50–79 % pro ML a MP) a vysoká (>94% pro BI, >79% pro ML a MP) (Peksa and Škaloud, 2011).

Výsledný fylogenetický strom byl dále zpracován v programu MEGA4 (Tamura et al., 2007).

4. Výsledky

4.1. Fotobionti rodu *Asterochloris*

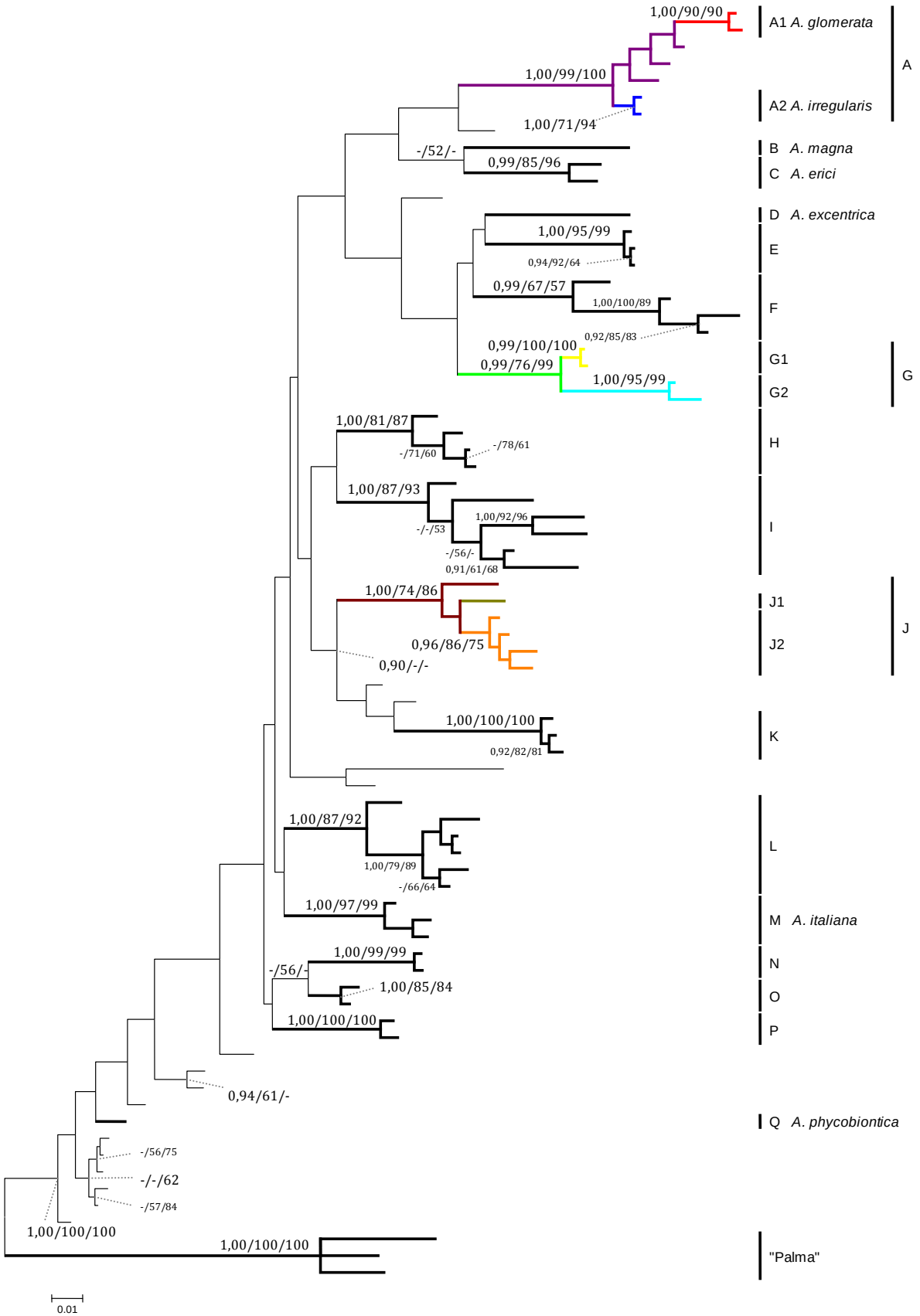
V 60 z celkového počtu 92 zkoumaných stélek lišejníků rodu *Stereocaulon* byli nalezeni fotobionti, z jejichž sekvence ITS dosahovala 99%–100% podobnosti s nejbližšími známými sekvencemi ITS příslušníků rodu *Asterochloris*, v dalších čtyřech stélkách byli nalezeni fotobionti se zřetelně odlišnou sekvencí ITS (pouze 86% podobnost sekvencím příslušníků rodu *Asterochloris* (Altschul et al., 1990; Benson et al., 2011)), nicméně bylo možné sestavit společný alignment označený jako „ITS Asterochloris“, na základě kterého byl vytvořen společný fylogenetický strom (Obrázek 6). Z celkového množství 146 sekvencí (76 unikátních), které byly do analýzy zahrnuty, bylo 67 vlastních, z nichž 59 bylo získáno z DNA izolované přímo ze stélky a osm z kultur fotobiontů.

Výše zmíněných 60 stélek lišejníků rodu *Stereocaulon* pocházelo z České republiky, Rakouska, Německa, Finska, Ruska (z východní Sibiře), z USA (z Aljašky), z ostrova La Palma (Kanárské ostrovy), z Grónska, Argentiny a Mexika (Příloha 1). Ostatní fotobionti, jejichž sekvence ITS byly do analýzy zařazeny (Příloha 2), mají rovněž rozmanitý původ, ať už geografický (Česká republika, Slovensko, Německo, Bulharsko, Rumunsko, Ukrajina, Itálie, Island, Španělsko, Rusko, USA, Kanada, Kostarika, Guyana, Čína, Indie, Tanzánie a Austrálie), nebo z hlediska substrátu (břidlice, čedič, pískovec, žula, půda, kůra stromů aj.). Především však mají různé mykobionty (*Anzina carneonivea*, *Cladia aggregata*, *Cladonia* spp., *Diploschistes muscorum*, *Lepraria* spp., *Pilophorus* spp., *Stereocaulon* spp., *Xanthoria parietina*).

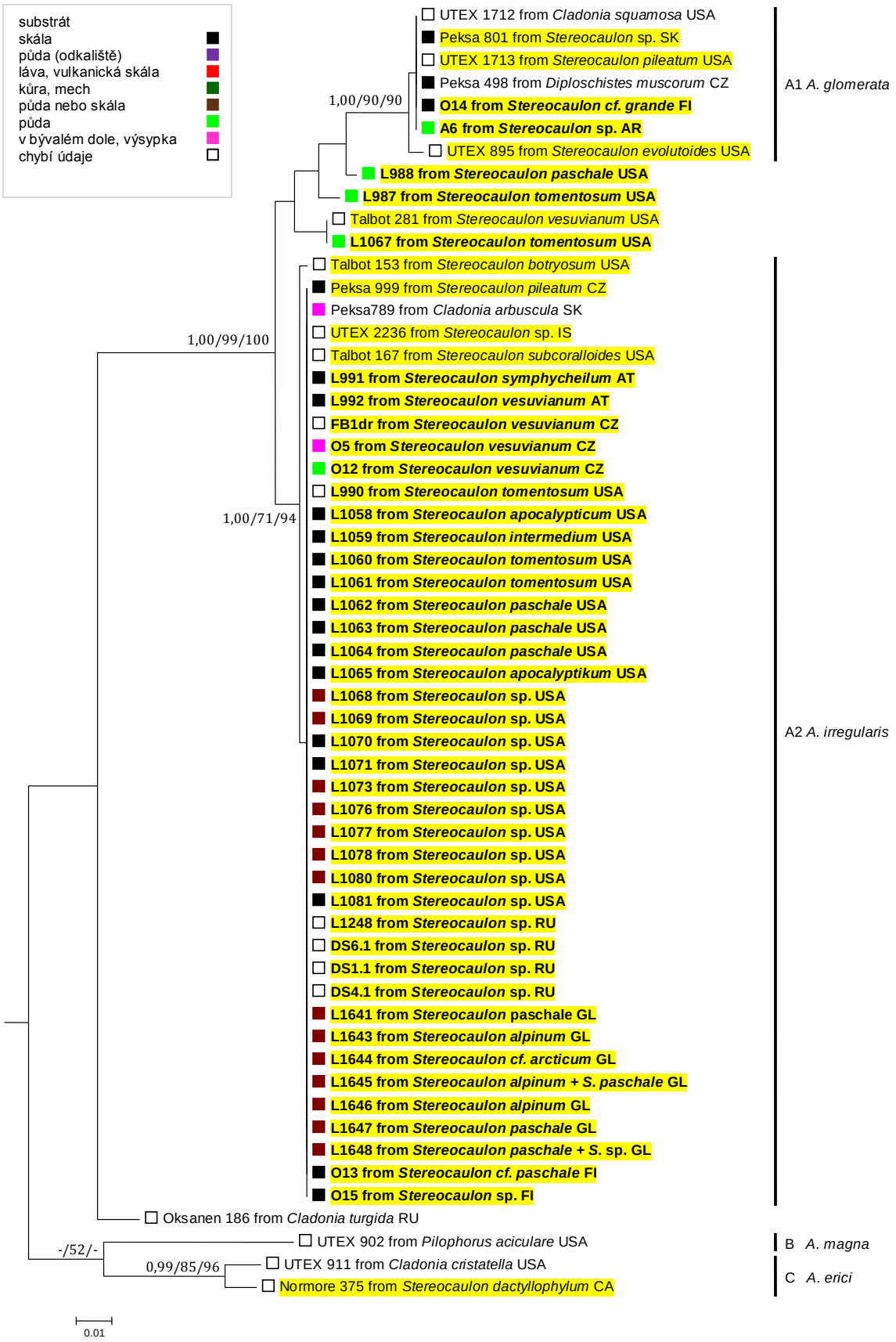
Celkem vzniklo 21 vysoce statisticky podpořených linií, z nichž 19 bylo známo již z minulosti (Piercey-Normore and DePriest, 2001; Nelsen and Gargas, 2008; Škaloud and Peksa, 2010; Peksa and Škaloud, 2011). Dvacátá linie O zahrnuje kromě nové sekvence sekvenci již známou (Hammer 7000 (Nelsen and Gargas, 2008)). Úplně novou linií je zřetelně oddělená linie „Palma“, pomocí které byl také strom zakořeněn.

Sekvence fotobiontů rodu *Stereocaulon* (Obrázek 7–Obrázek 9, vyznačeno žlutě) se vyskytují ve 13 z 21 linií, sekvence získané v rámci této práce (vyznačeno tučně) ale jen v devíti z nich (A1, A2, F, H, L, M, O, Q a „Palma“). V pěti z nich (F, H, M, O, Q) do této chvíle byli zaznamenáni pouze fotobionti jiných lišejníků.

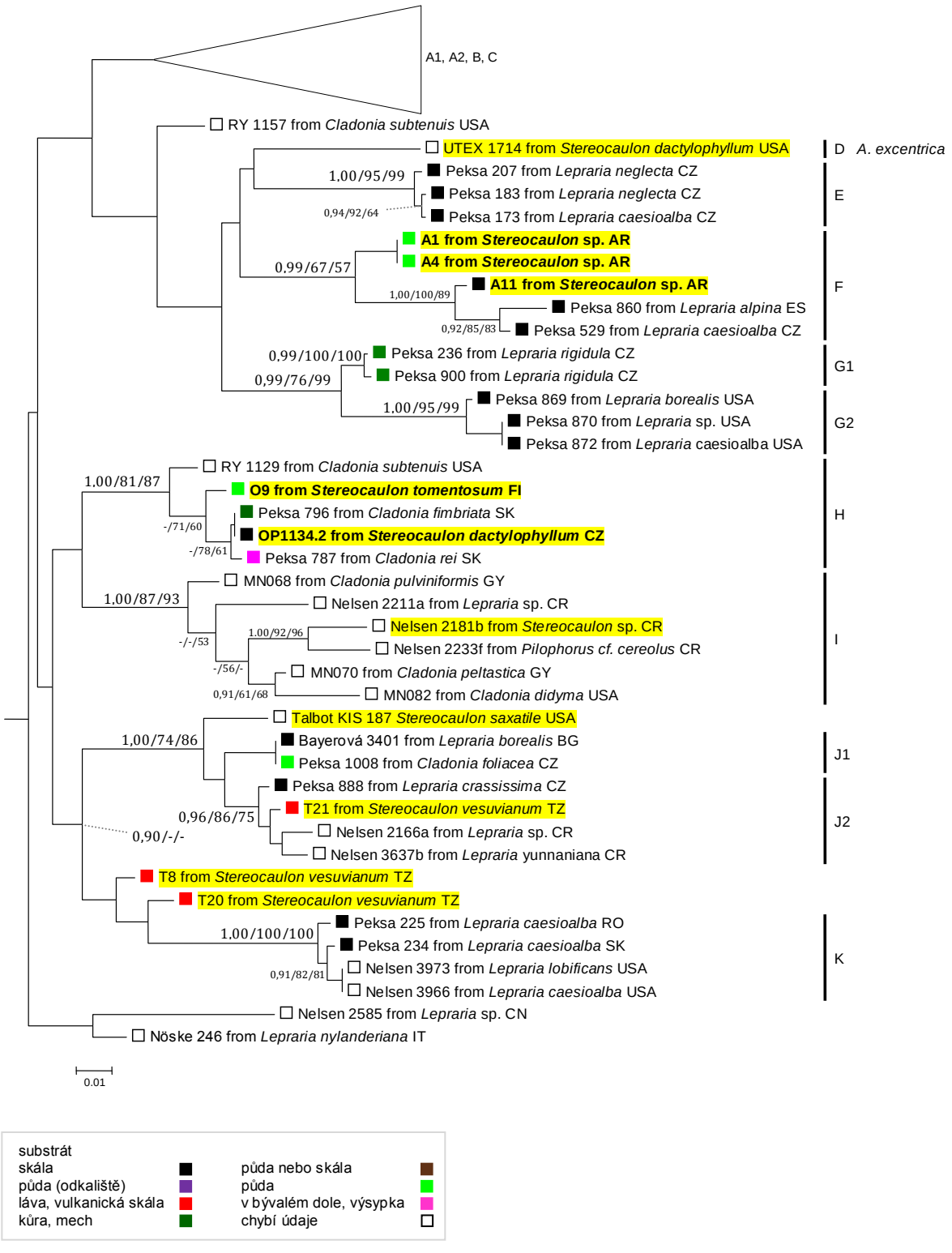
Fotobionti z většiny stélek (42) příslušeli k linii A (Obrázek 7), z toho dvě položky pocházející z Finska a Argentiny k linii A1 (*Asterochloris glomerata*) a 37 položek pocházejících z rakouských Alp, ČR (Jizerských hor, Krkonoš a Krušných hor), Aljašky, Jakutska (východní Sibiř, Rusko), Grónska a Finska přísluší k linii A2 (*Asterochloris irregularis*).



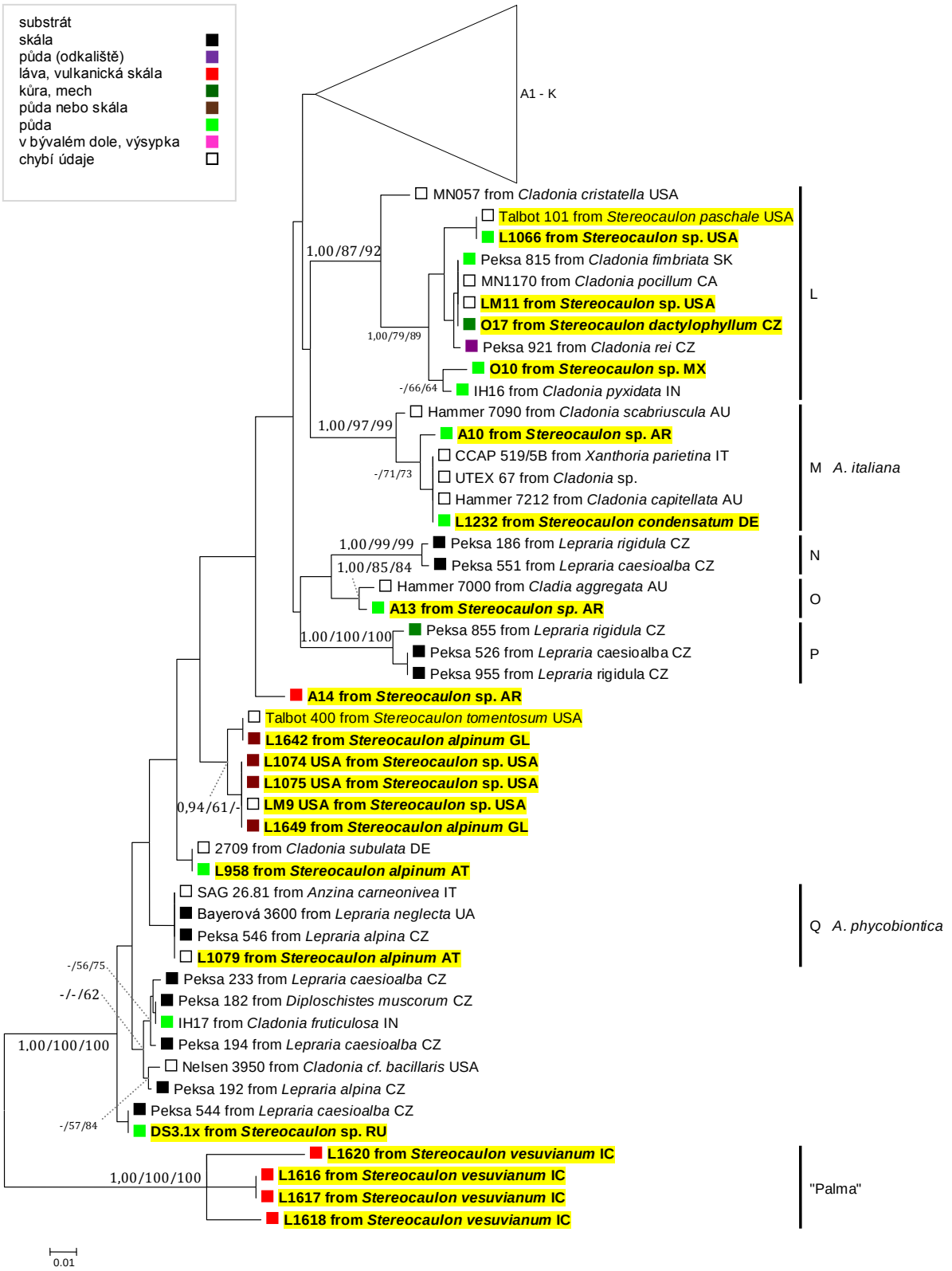
Obrázek 6: Nezakořeněný BI fylogenetický strom založený na kombinovaném souboru dat ITS rDNA a genu pro aktin typu I. Hodnoty v uzlech vyjadřují statistickou podporu určenou třemi metodami: MrBayes posteriorní pravděpodobnost/maximum likelihood bootstrap/maximum parsimony bootstrap. Zobrazeny jsou pouze hodnoty >0,89 pro BI a >49 pro ML/MP. Tučně jsou vyznačeny jednotlivé linie. Barevně jsou znázorněny tři velké linie A, G a J, ze kterých každá obsahuje dvě sublinie. Linie A a J obsahují i další sekvence s nejistou pozicí v rámci velké linie.



Obrázek 7: Část BI fylogenetického stromu z obrázku 1 založeného na kombinovaném souboru dat ITS rDNA a genu pro aktin typu I. Hodnoty v uzlech vyjadřují statistickou podporu určenou třemi metodami: MrBayes posteriorní pravděpodobnost/maximum likelihood bootstrap/maximum parsimony bootstrap. Popisky sekvencí obsahují označení sekvence, druh mykobionta a geografické označení: USA, SK (Slovensko), CZ (Česká republika), FI (Finsko), AR (Argentina), IS (Island), AT (Rakousko), RU (Rusko), GL (Grónsko), CA (Kanada). Sekvence pocházející z lišejníků rodu *Stereocaulon* jsou označeny žlutě. Vlastní sekvence jsou označeny tučně.



Obrázek 8: Část BI fylogenetického stromu z obrázku 1 založeného na kombinovaném souboru dat ITS rDNA a genu pro aktin typu I. Hodnoty v uzlech vyjadřují statistickou podporu určenou třemi metodami: MrBayes posteriorní pravděpodobnost/maximum likelihood bootstrap/maximum parsimony bootstrap. Popisky sekvencí obsahují označení sekvence, druh mykobionta a geografické označení: USA, CZ (Česká republika), AR (Argentina), ES (Španělsko), FI (Finsko), SK (Slovensko), GY (Guyana), CR (Kostarika), BG (Bulharsko), TZ (Tanzánie), RO (Rumunsko), CN (Čína), IT (Itálie). Sekvence pocházející z lišejníků rodu *Stereocaulon* jsou označeny žlutě. Vlastní sekvence jsou označeny tučně.



Obrázek 9: Část BI fylogenetického stromu z obrázku 1 založeného na kombinovaném souboru dat ITS rDNA a genu pro aktin typu I. Hodnoty v uzlech vyjadřují statistickou podporu určenou třemi metodami: MrBayes posteriorní pravděpodobnost/maximum likelihood bootstrap/maximum parsimony bootstrap. Popisky sekvencí obsahují označení sekvence, druh mykobionta a geografické označení: USA, SK (Slovensko), CA (Kanada), CZ (Česká republika), MX (Mexiko), IN (Indie), AU (Austrálie), AR (Argentina), IT (Itálie), DE (Německo), GL (Grónsko), AT (Rakousko), UA (Ukrajina), IN (Indie), RU (Rusko), IC (Kanárské ostrovy). Sekvence pocházející z lišejníků rodu *Stereocaulon* jsou označeny žlutě. Vlastní sekvence jsou označeny tučně.

Tři sekvence z Aljašky v rámci linie A nepřipadly ani k linii A1, ani k linii A2 pravděpodobně proto, že sekvence ITS bez přidání sekvence genu pro aktin nedokáže tyto linie od sebe odlišit (Škaloud and Peksa, 2010).

Fotobionti ze tří položek z Argentiny (provincie Santa Cruz a Tierra del Fuego) rozšířili linii F (Obrázek 8). Sekvence A11 náležela k této linii s velmi vysokou pravděpodobností (1,00/100/89)[2], zbývající dvě sekvence se střední až vysokou pravděpodobností (0,99/67/57). Jedná se o první zaznamenané fotobionty lišejníků rodu *Stereocaulon* v této linii.

Další vysoce statisticky podpořenou linií, do které nově přibyli fotobionti ze stélek lišejníků rodu *Stereocaulon*, je linie H (Obrázek 8). Jednalo se o položku *Stereocaulon tomentosum* z Finska a *Stereocaulon dactylophyllum* z České republiky.

Do linie L (Obrázek 9) přibyly položky z České republiky (Slavkovský les), Aljašky a Mexika. Kromě geografické různorodosti v této skupině (fotobionti rodu *Cladonia* pocházejí ze Slovenska, Kanady a Indie), zde bylo patrné také velké rozpětí v nadmořských výškách jednotlivých sběrů (350 – 2900 m n. m. v rámci rodu *Stereocaulon*, v rámci celé linie dokonce 250 – 3118 m n. m.). Naopak byl zřejmý vliv substrátové specifity (půda u většiny položek, u jedné mech).

Do linie M (*Asterochloris italiana*, Obrázek 9) přibyla sekvence fotobionta *Stereocaulon condensatum* z Německa (300 m n. m.) a *Stereocaulon* sp. z Argentiny (provincie Tierra del Fuego, 100 m n. m.). Stejně jako u přechozí linie byla u obou těchto položek substrátem půda, nicméně u jiných mykobiontů, u kterých údaj chybí, se dá předpokládat jiný substrát (např. *Xanthoria parietina*).

Sekvence A13 z Argentiny (provincie Tierra del Fuego) vytvořila novou vysoce statisticky podpořenou linii O (Obrázek 9) spolu se sekvencí Hammer 7000 pocházející z lišejníku *Cladia aggregata* z Austrálie.

Do linie Q (*Asterochloris phycobiontica*, Obrázek 9) přibyla sekvence fotobionta lišejníku *Stereocaulon alpinum* z Rakouska, která byla totožná s typovým kmenem druhu *Asterochloris phycobiontica* SAG 26.81 pocházejícím z lišejníku *Anzina carneonivea*.

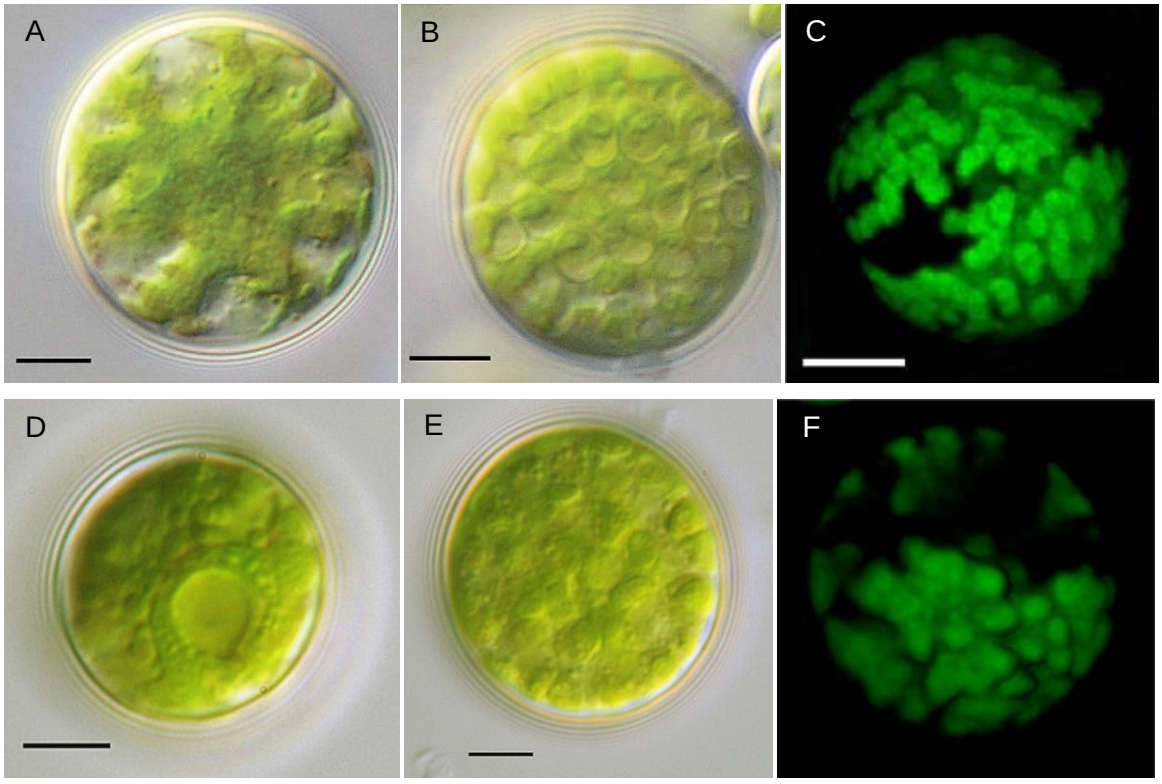
Dvě sekvence fotobiontů pocházejích z Grónska a tři sekvence z Aljašky připadly k sekvenci Talbot 400 (Obrázek 9) pocházející rovněž z Aljašky, ale statistická podpora této linie je střední až nízká (0,94/61/38[3]; není tedy ve fylogenetickém stromu vyznačena).

[2] hodnoty Mr. Bayes posteriorní pravděpodobnosti/bootstrapu ML/bootstrapu MP
[3] hodnoty Mr. Bayes posteriorní pravděpodobnosti/bootstrapu ML/bootstrapu MP

Sekvence DS3.1x z kultury fotobiontů pocházející ze stélky lišejníku *Stereocaulon* sp. z pouště Charskiye pisky z Ruska byla totožná se sekvencí Peksa 544 (Obrázek 9) z lišejníku *Lepraria caesioalba* z České republiky, nicméně jejich pozice v rámci fylogenetického stromu je nejasná. Podobně sekvence L958 fotobionta lišejníku *Stereocaulon alpinum* z Rakouska byla totožná se sekvencí 2709 z lišejníku *Cladonia subulata* z Německa. Sekvence A14 z Argentiny (provincie Neuquén) se nepřipojila k žádné ze známých sekvencí.

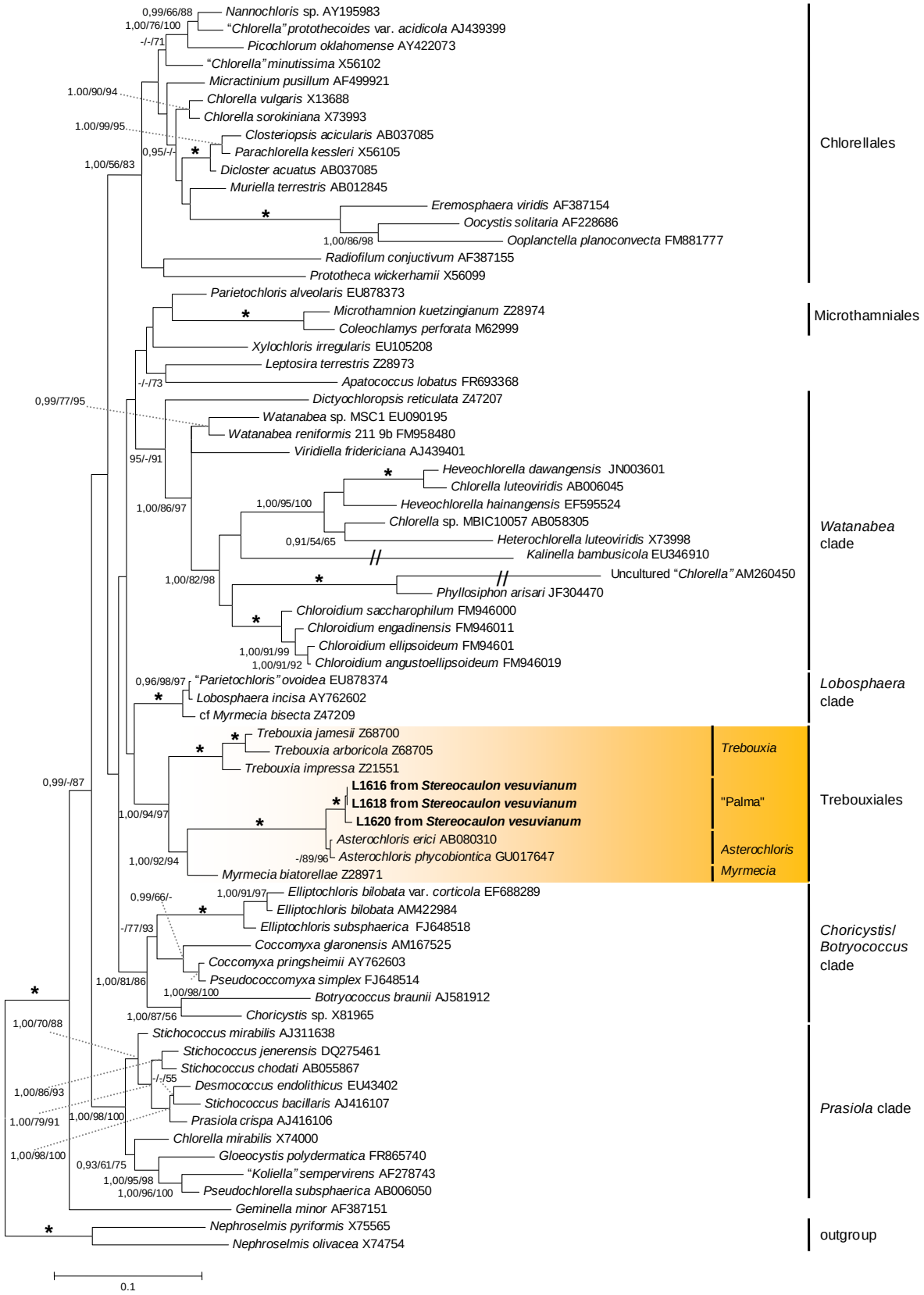
4.2. Linie „Palma“

Ve čtyřech položkách lišejníku *Stereocaulon vesuvianum* ze svahů vulkánů San Antonio a Teneguía z jižní části ostrova La Palma (28°28’23–55“ s. š., 17°50‘44“–51‘05“ z. d., 330–630 m n. m.; Kanárské ostrovy) byl zaznamenán dosud neznámý fotobiont (Obrázek 10 D–F), který je na základě sekvencí ITS, 18 S rDNA a rbcL blízce příbuzný rodu *Asterochloris*, ale zřetelně odlišný od všech jeho známých příslušníků.

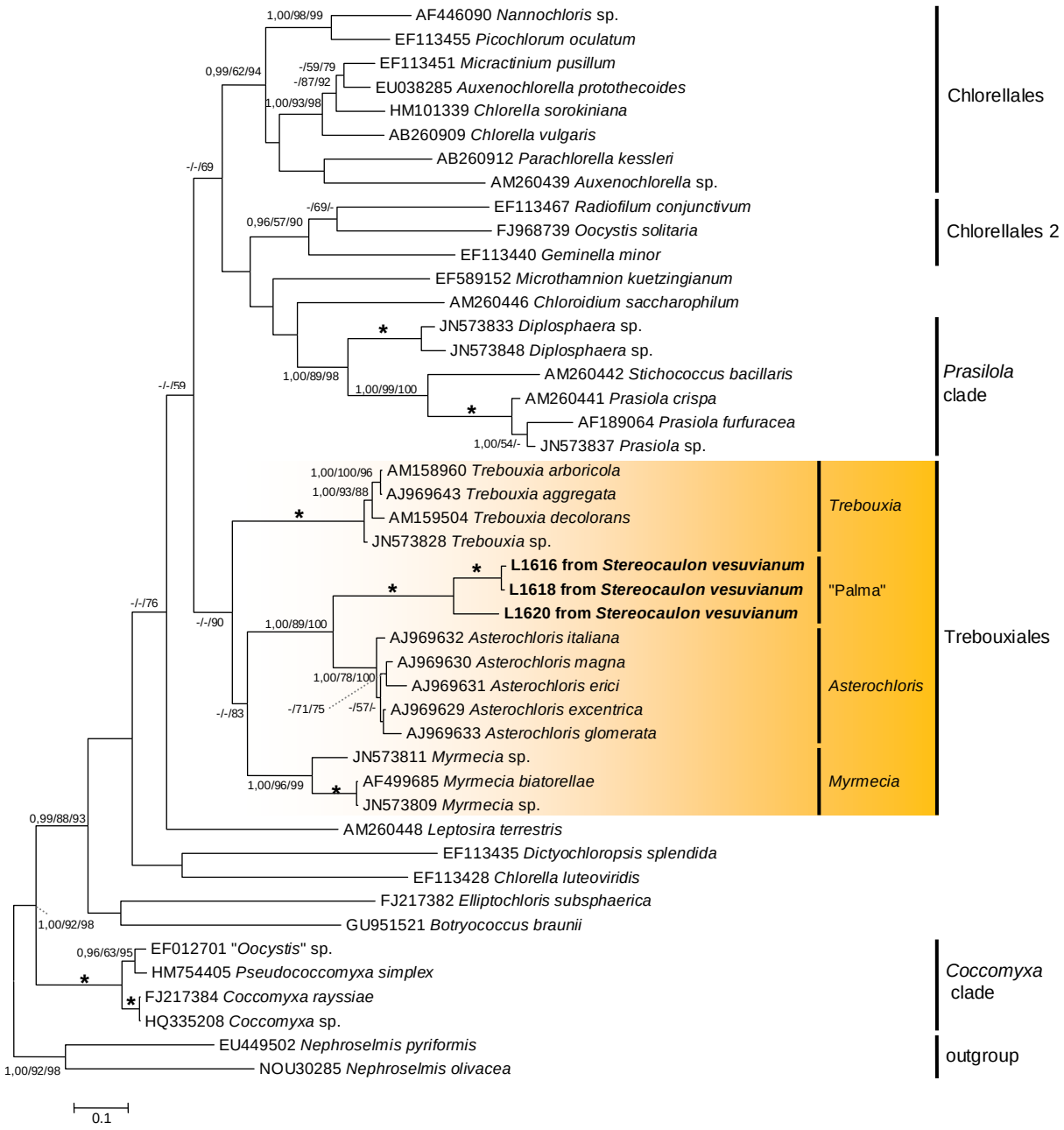


Obrázek 10: A: *Asterochloris* sp., kmen CAUP H1010 (Škaloud and Peksa, 2010); B: *Asterochloris glomerata*, kmen UTEX 1712, zralé aplanosporangium obsahující velké množství dceřiných buněk (Škaloud and Peksa, 2010); C: 3D model chloroplastu vytvořený z řezů zaznamenaných pomocí konfokálního mikroskopu na základě autoflorescence chlorofylu (Škaloud and Peksa, 2008); D: buňka z kultury LV18 odpovídající sekvenci L1620, linie “Palma”; E: LV18, aplanosporangium; F: LV18, 3D model chloroplastu vytvořený z řezů zaznamenaných pomocí konfokálního mikroskopu na základě autoflorescence chlorofylu (Škaloud, 2012); měřítko odpovídá ve všech případech 5 µm.

Všechny čtyři stélky rostly přímo na lávě, ve všech případech však na menších kamenech, které mohly pocházet z blízkého okolí. Basaltová láva, která v této oblasti tvoří podloží, není starší než 20 000 let (Carracedo et al., 2001). Na mnoha místech se zde však vyskytují horniny pocházející dokonce ze 17. a 20. století (Příloha 4).



Obrázek 11: BI fylogenetický strom založený na souboru sekvencí 18S rDNA zástupců třídy Trebouxiophyceae. Hodnoty v uzlech vyjadřují statistickou podporu určenou třemi metodami: MrBayes posteriorní pravděpodobnost/maximum likelihood bootstrap/maximum parsimony bootstrap. Zobrazeny jsou pouze hodnoty >0,89 pro BI a >49 pro ML/MP. Hvězdička značí plnou statistickou podporu (1,00/100/100). Tučně jsou vyznačeny vlastní sekvence, oranžově je vyznačena linie Trebouxiales. Jako outgroup byly vybrány sekvence rodu *Nephroselmis* (Nephroselmidophyceae, Prasinophytina). Dlouhé větve vedoucí k sekvencím EU346910 a AM260450 byly z důvodu snadnějšího zobrazení zkráceny o 30 %.



Obrázek 12: BI fylogenetický strom založený na souboru sekvencí rbcL zástupců třídy Trebouxiophyceae. Hodnoty v uzlech vyjadřují statistickou podporu určenou třemi metodami: MrBayes posteriorní pravděpodobnost/maximum likelihood bootstrap/maximum parsimony bootstrap. Zobrazeny jsou pouze hodnoty >0,89 pro BI a >49 pro ML/MP. Hvězdička značí plnou statistickou podporu (1,00/100/100). Tučně jsou vyznačeny vlastní sekvence, oranžově je vyznačena linie Trebouxiales. Jako outgroup byly vybrány sekvence rodu *Nephroselmis* (Nephroselmidophyceae, Prasinophytina).

Do 17. století je datována přímo lokalita položky L1620 (Carracedo et al., 2001). V důsledku nedávné vulkanické činnosti i díky dalším faktorům prostředí, není v této lokalitě téměř žádná vegetace. Jedná se spíše o roztroušené jednotlivé rostliny.

Linie „Palma“ byla ve fylogenetickém stromě rodu *Asterochloris* vytvořeném na základě sekvencí ITS (Obrázek 6 a Obrázek 9) plně statisticky podpořena a zřetelně odlišná od všech ostatních sekvencí. Na základě sekvencí ITS rDNA tvořila tři odlišné genotypy.

Aby bylo možné zjistit pozici této linie v rámci třídy Trebouxiophyceae, byly získány sekvence 18S rDNA a rbcL pro zástupce každého z těchto tří genotypů (L1616, L1818, L1620). Z celkového počtu 1763 znaků v alignmentu úseku 18S, bylo 667 (37,8 %) variabilních. Z tohoto počtu bylo 489 znaků (27,7 %) parsimonně informativních.

Sekvence 18S rDNA L1616 a L1618 obsahovaly na rozdíl od sekvence L1620 intron, který byl v jednom případě 368 a v druhém 369 bází dlouhý. Tyto dvě sekvence se lišily v intronu a dále asi v 0,5 % znaků mimo intron, nicméně byly posuzovány jako identické (viz kapitola Materiál a metody). Spolu se sekvencí L1620 tvořily ve fylogenetickém stromě sestaveném na základě úseku 18S rDNA (Obrázek 11) plně statisticky podpořenou sesterskou linii k rodu *Asterochloris*.

Společná poměrně dlouhá větev *Asterochloris* a „Palma" byla opět plně statisticky podpořena. S vysokou statistickou podporou k nim byla sesterskou sekvence *Myrmecia biatorellae* a společně s rodem *Trebouxia* vytvořily tyto sekvence vysoce statisticky podpořenou linii Trebouxiales. Vztah řádu Trebouxiales k ostatním liniím třídy Trebouxiophyceae nebylo na základě tohoto fylogenetického stromu možné určit.

Z celkového počtu 1216 znaků v alignmentu úseku rbcL, bylo 552 (45,4 %) variabilních. Z tohoto počtu bylo 474 znaků (39 %) parsimonně informativních. Do řádu Trebouxiales připadla linie „Palma" rovněž ve fylogenetickém stromě sestaveném na základě tohoto markeru (Obrázek 12). Linie měla opět plnou statistickou podporu a s vysokou statistickou podporou byla sesterská k rodu *Asterochloris*, od kterého ji ale v tomto případě v souladu s výsledky analýz na základě sekvence ITS dělila poměrně dlouhá větev.

Topologie stromu uvnitř řádu Trebouxiales byla v případě tohoto fylogenetického stromu stejná jako ve fylogenetickém stromě vytvořeném na základě úseku 18S rDNA, ale její statistická podpora byla nižší. Nicméně monofylie jednotlivých rodů měla plnou nebo vysokou statistickou podporu.

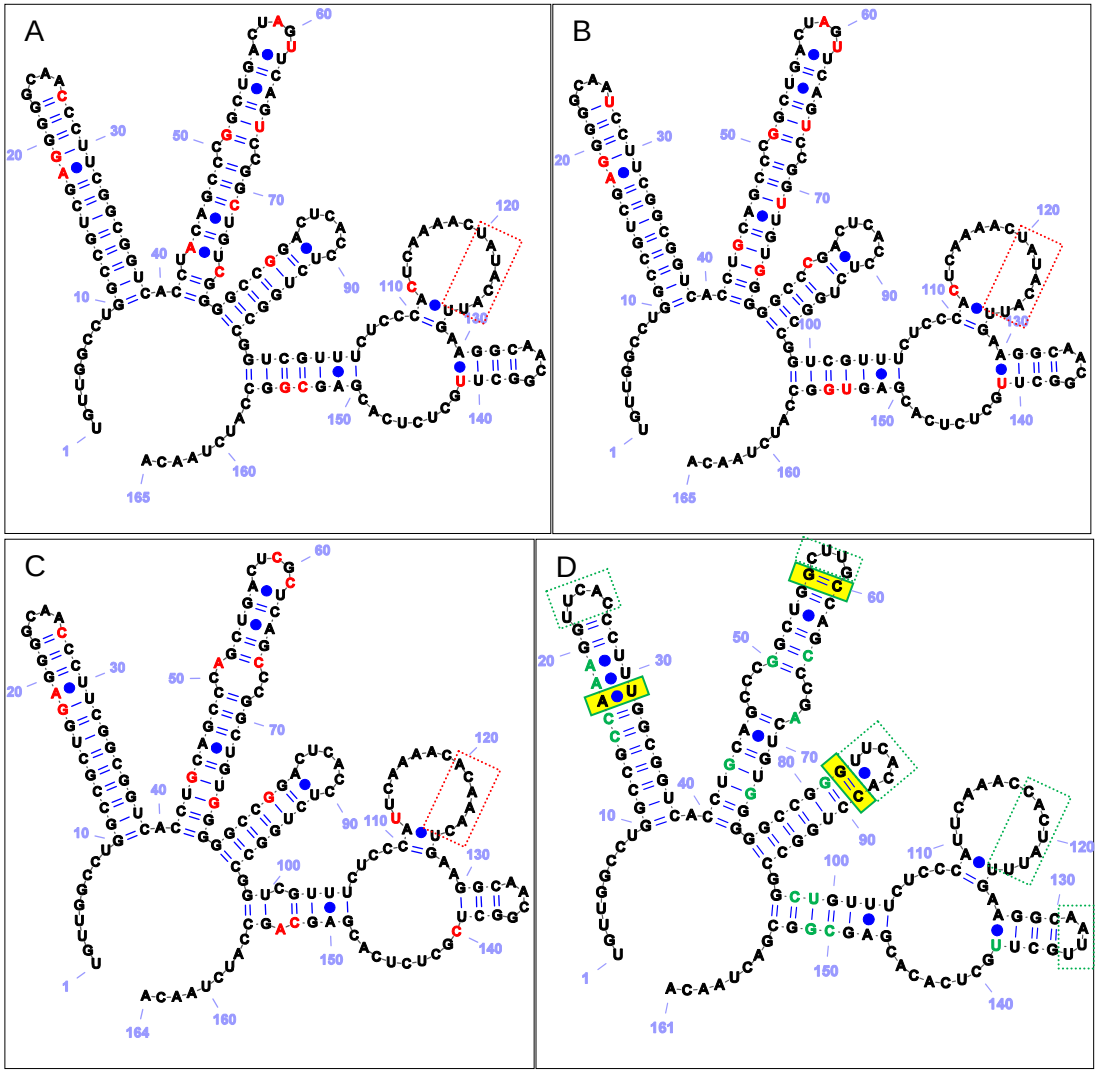
Vzhledem k tomu, že sekvencí rbcL bylo k dispozici menší množství, než sekvencí 18S a zástupci některých linií úplně chyběli nebo byl z dané linie přítomen pouze jediný zástupce (např. *Microthamnion*), nelze jednoznačně porovnat topologii celého stromu, avšak některé změny, jako je rozdělení Chlorellales na dvě zřetelně odlišené linie, jsou zřejmé. Také podpora hlavních linií byla výrazně nižší. Nicméně pozice linie „Palma" v rámci třídy Trebouxiophyceae i uvnitř řádu Trebouxiales je jednoznačná. Mezi stromy vytvořenými na základě úseků 18S rDNA a rbcL se liší pouze vzdáleností od sekvencí rodu *Asterochloris*.

4.2.1. Sekundární struktura ITS1 a ITS2

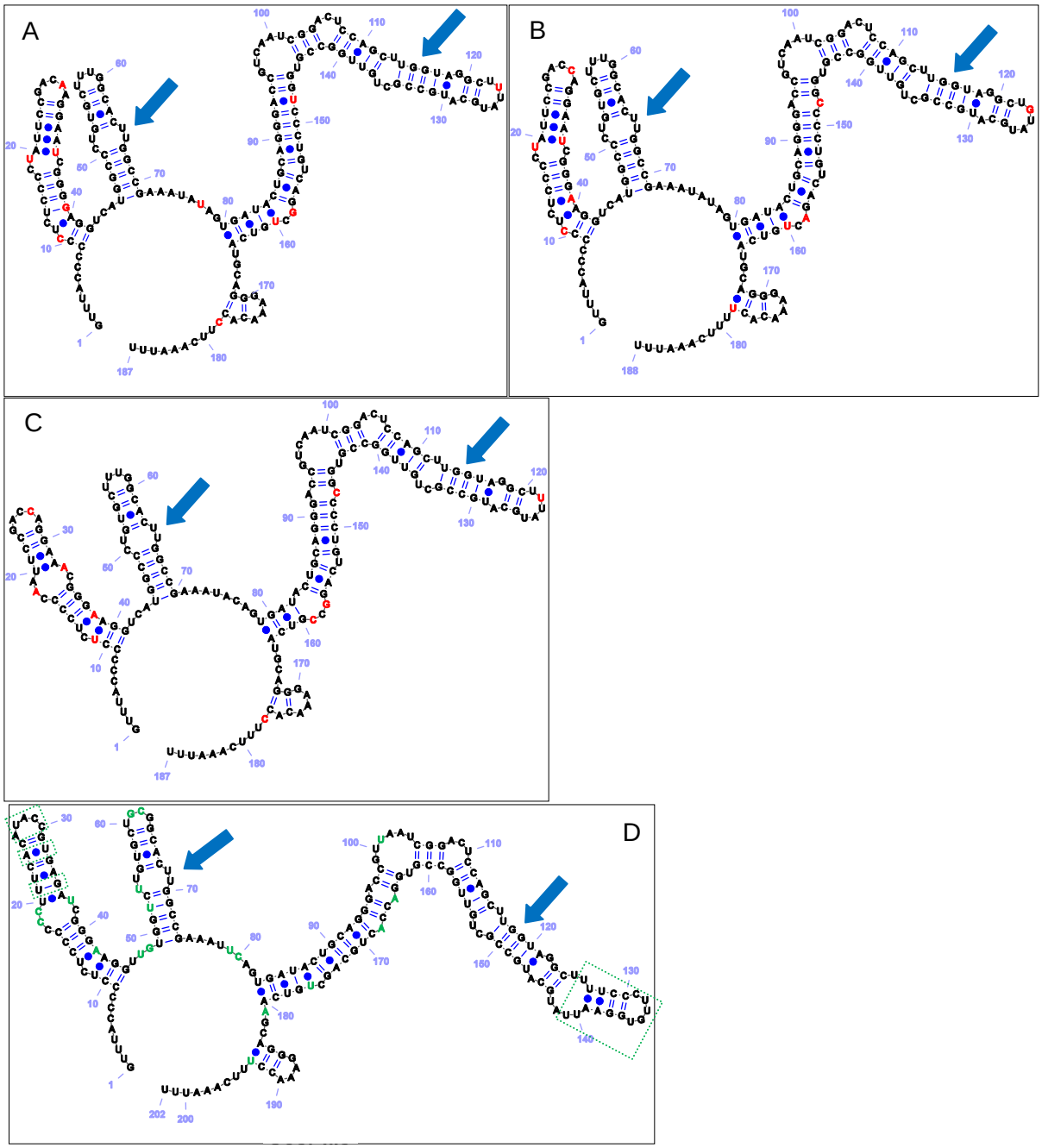
Podle publikované sekundární struktury ITS1 a ITS2 *Asterochloris phycobiontica* (Škaloud and Peksa, 2010) byly vytvořeny sekundární struktury pro každý z genotypů linie „Palma“ (Obrázek 13 a Obrázek 14).

Sekundární struktura ITS1 (Obrázek 13) sestává ze čtyř helixů. Čtvrtý, největší helix se větvil na dvě části. Struktura byla velmi podobná jednak uvnitř linie „Palma“ jednak v porovnání se strukturou *Asterochloris phycobiontica*. Velmi odlišné byly především smyčky na konci helixů. Mezi strukturou *Asterochloris phycobiontica* a všemi genotypy linie „Palma“ byly zaznamenány tři CBC (změny nukleotidů na obou párujících se řetězcích) a tři až šest hemi-CBC (změna pouze jednoho nukleotidu při zachování párování; Tabulka 5). V rámci linie „Palma“ bylo nejvíce variabilních pozic v helixu II, naopak nejkonzervovanější byl helix III.

V rámci linie „Palma“ nebyla zaznamenána žádná CBC, ale poměrně hodně hemi-CBC (4 – 6).



Obrázek 13: Predikce sekundární struktury ITS1. A–C: genotypy L1616, L1618 a L1620 linie “Palma”, červeně vyznačeny variabilní pozice v rámci této linie, rámeček označuje delší variabilní úsek. D: *Asterochloris phycobiontica* podle Škalouda a Peksy (2010), CBC ve žlutých rámečcích, ostatní pozice odlišné od některého z příslušníků linie “Palma” zeleně, zelené rámečky značí delší odlišné úseky.



Obrázek 14: Predikce sekundární struktury ITS2. A–C: genotypy L1616, L1618 a L1620 linie "Palma", červeně vyznačeny variabilní pozice v rámci této linie. D: *Asterochloris phycobiontica* podle Škalouda a Peksy (2010), pozice odlišné od některého z příslušníků linie "Palma" vyznačeny zeleně, zelený rámeček značí delší velmi odlišné nebo úplně chybějící úseky. Konzervované motivy GGU (UGGU) a "pyrimidinové neshody" (Mai and Coleman, 1997) jsou vyznačeny modrou šipkou.

Tabulka 5: Počet CBC (pravý horní roh) a hemi-CBC (levý dolní roh) v sekundárních strukturách ITS1/ITS2

	A. phycobiontica	L1616	L1618	L1620
A. phycobiontica		3/0	3/0	3/0
L1616	6/2		0/0	0/0
L1618	6/1	4/1		0/0
L1620	3/1	4/1	6/0	

Sekundární struktura ITS2 sestávala ze čtyř helixů (Obrázek 14), tj. tvořila tzv. „čtyřprstou ruku" typickou pro tento úsek. Čtvrtý helix byl velmi krátký, třetí naopak nejdelší. Příslušníci linie

„Palma“ koncový úsek třetího helixu oproti rodu *Asterochloris* postrádali (Obrázek 14D, zelený rámeček). V rámci linie byl helix II naprosto totožný, ale oproti struktuře *Asterochloris* na něm byly čtyři změny, z toho dvě v koncové smyčce a jedna v konzervované struktuře „pyrimidinové neshody“ (Mai and Coleman, 1997), která ale nebyla touto záměnou (U/C) porušena. Konzervovaná struktura UGGU (Mai and Coleman, 1997) v koncové části helixu III na 5‘ konci zůstala ve všech případech zachována.

Změny se vyskytovaly také v krátkém helixu IV. Oproti *Asterochloris* v něm byla na 3‘ konci inserce nepárujícího se nukleotidu A. V rámci linie došlo u genotypů L1616 a L1620 (Obrázek 14A a C) ke změně z U na C, což mělo za následek ztrátu párování. V ITS2 nebyla zaznamenána žádná CBC. Oproti struktuře *Asterochloris* se vyskytovaly jedna až dvě hemi-CBC a v rámci linie žádná až jedna hemi-CBC (Tabulka 5).

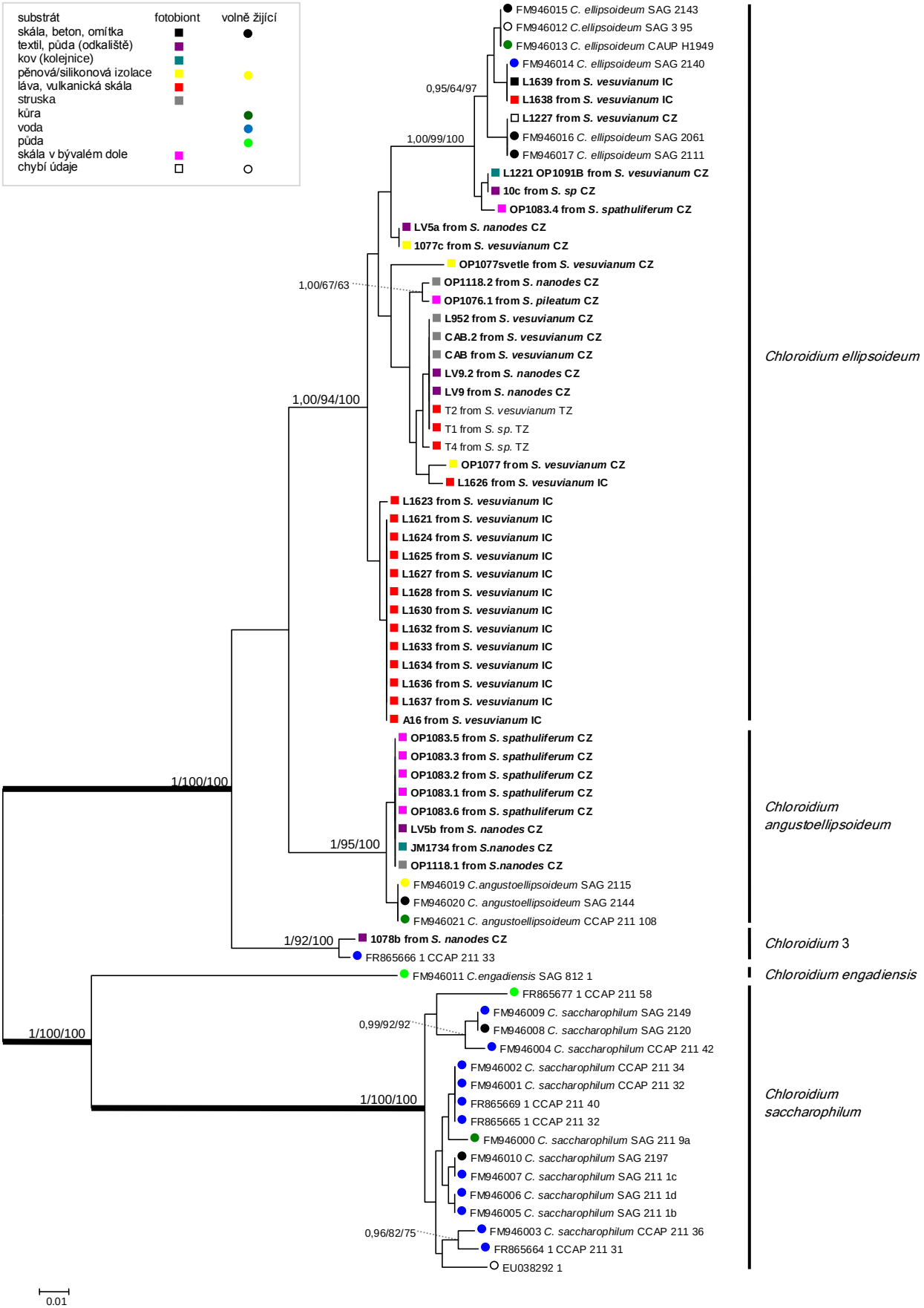
Úsek ITS2 je oproti úseku ITS1 konzervovanější, ale změny v sekundárních strukturách jsou srovnatelné, jelikož u úseku ITS1 je nejvíce variability soustředěno ve smyčkách na koncích helixů. Velký rozdíl je ovšem v počtu CBC a hemi-CBC, ten je v případě ITS1 znatelně vyšší (Tabulka 5), ačkoliv se jedná o kratší úsek.

4.3. Fotobionti rodu *Chloroidium*

Ve 28 z celkového počtu 92 zpracovaných stélek lišejníků rodu *Stereocaulon* byli nalezeni fotobionti rodu *Chloroidium* namísto obvyklých fotobiontů rodu *Asterochloris* (např. Nelsen and Gargas 2006; Piercey-Normore and Depriest 2001; Peksa and Škaloud 2011). Jednalo se o položky z České republiky a Kanárských ostrovů. Navíc se vyskytovali fotobionti tohoto rodu také ve třech stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon* z Tanzánie. Celkem bylo zpracováno 43 sekvencí ITS fotobiontů tohoto rodu, ze kterých 25 bylo získáno izolací DNA přímo ze stélky a 18 z kultur fotobiontů. Ve dvou případech jsou k dispozici sekvence získané oběma způsoby.

Do analýzy bylo zařazeno také 27 sekvencí ITS volně žijících zástupců rodu *Chloroidium* pocházejících z vodního i suchozemského prostředí a různých substrátů (půda, kůra stromů, umělé substráty jako betonové tašky, omítka nebo silikonová izolace) (Příloha 3).

Na základě těchto dat byl vytvořen fylogenetický strom (Obrázek 15) tvořený pěti vysoce statisticky podpořenými liniemi, z nichž čtyři odpovídají druhům *Chloroidium ellipsoideum*, *C. angustoellipsoideum*, *C. engadiensis* a *C. saccharophilum*, jak je definovali Darienko et al. (2010). Pátá linie pracovně označená „*Chloroidium* 3“ zahrnuje fotobionta lišejníku *Stereocaulon nanodes* ze sedimentační nádrže v Horním Slavkově (Česká republika) a kmen CCAP 211/33 pocházející ze sladkovodního prostředí z Itálie.



Obrázek 15: Nezakořeněný BI fylogenetický strom založený úseku ITS rDNA. Hodnoty v uzlech vyjadřují statistickou podporu určenou třemi metodami: MrBayes posteriorní pravděpodobnost/maximum likelihood bootstrap/maximum parsimony bootstrap. Zobrazeny jsou pouze hodnoty >0,89 pro BI a >49 pro ML/MP. Popisky sekvencí fotobiontů obsahují označení DNA, druh mykobionta a geografický původ (CZ – Česká republika, IC – Kanárské ostrovy, TZ – Tanzánie). Popisky sekvencí volně žijících zástupců obsahují číslo sekvence v GenBanku, druh dle (Darienko et al., 2010) a číslo sbírkového kmene.

Nejvíce sekvencí obsahovala linie *Chloroidium ellipsoideum*, v rámci které lze odlišit ještě zřetelně oddělenou a vysoce statisticky podpořenou podlinii obsahující jak volně žijící zástupce, tak fotobionty. Zbytek linie *C. ellipsoideum* obsahovala pouze sekvence fotobiontů. V rámci této linie pochází z jedné stélky až tři různí fotobionti (1077c, OP1077svetle a OP1077), naopak v jiných případech jsou všechny sekvence z jedné stélky totožné (L952, CAB, CAB2).

Fotobionti ze čtyř stélek připadli do linie *Chloroidium angustoellipsoideum*. Jednalo se však pouze o jeden genotyp reprezentovaný osmi sekvencemi. Zajímavostí je, že ve třech z těchto čtyř stélek byl přítomen i fotobiont z linie *C. ellipsoideum*, v každé jiný genotyp.

Linie *C. engadiensis* má pouze jediného zástupce, který byl vyizolován z půdy ve švýcarském Unterengadinu. Naopak linie *C. saccharophilum* má sice řadu zástupců, nicméně do ní nepřipadl žádný z fotobiontů. Možným vysvětlením může být to, že naprostá většina jejích zástupců byla získána z vodního prostředí, nicméně do ní připadají i někteří suchozemští, např. z kůry stromů.

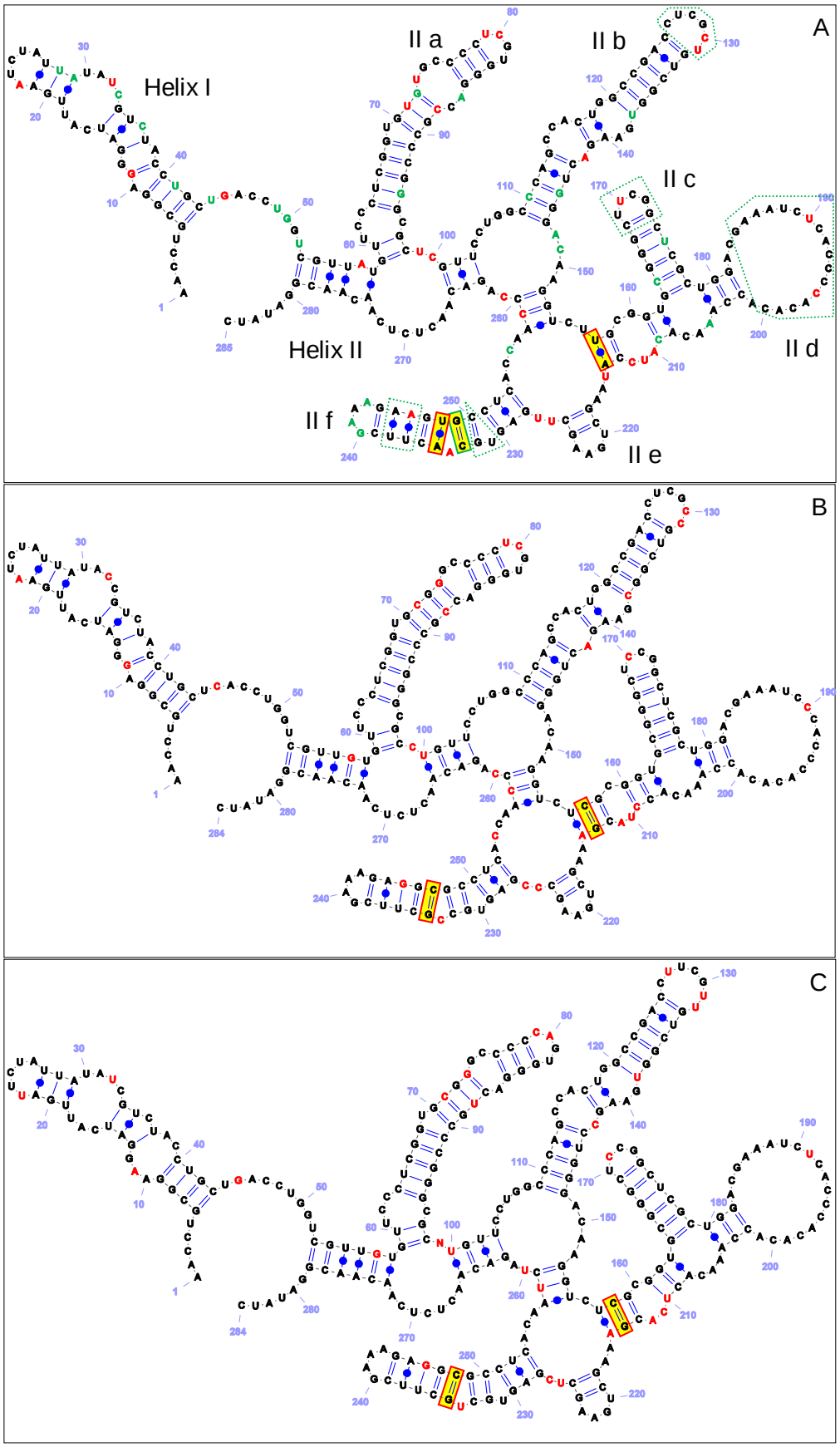
Vlastnosti substrátu rovněž pravděpodobně vysvětlují přítomnost fotobionta rodu *Chloroidium* v některých stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon*. Na první pohled jsou sice poměrně různorodé (textil, pěnová izolace, kolejnice, láva aj.), ale spojuje je možná přítomnost těžkých kovů. Na tu lze usuzovat buď z charakteru substrátu (např. kolejnice) nebo prostředí (např. skála v bývalém dole).

Dalším sledovaným parametrem prostředí je nadmořská výška. Zatímco fotobionti z linie *C. ellipsoideum* se vyskytovali v nadmořských výškách od 300 do 4500 m n. m., fotobionti z linie *C. angustoellipsoideum* v nižších nadmořských výškách s podstatně menším rozpětím 170–620 m n. m. Fotobionti z této linie pocházeli pouze z České republiky, volně žijící zástupci z Německa. Jedná se ale o příliš malé množství vzorků na to, aby bylo možné hovořit o ekologických preferencích této linie.

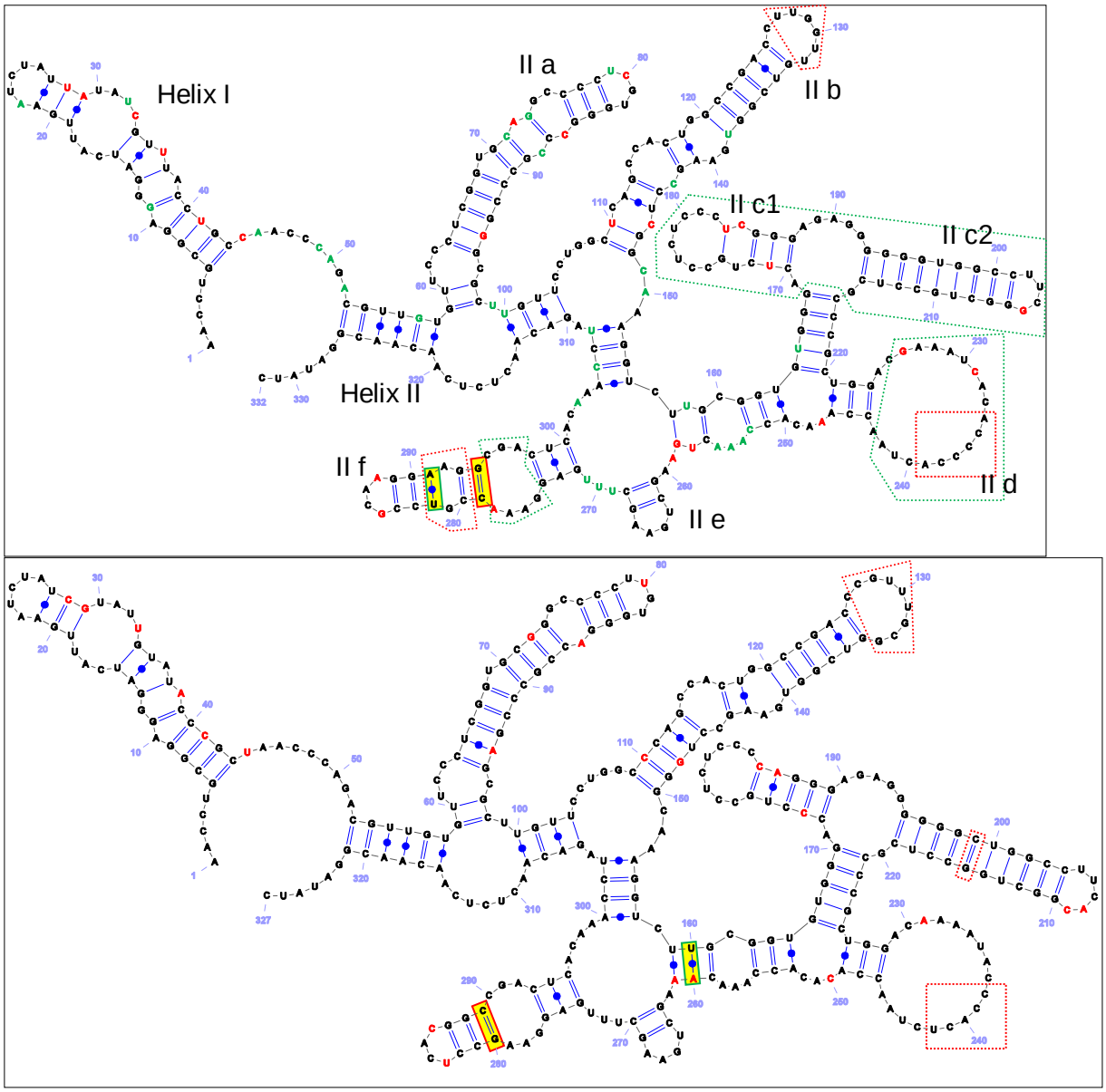
4.3.1. Sekundární struktury ITS1 a ITS2

Sekundární struktury ITS1 a ITS2 (Obrázek 16–Obrázek 19) *Chloroidium ellipsoideum* (sekvence FM946018), *C. angustoellipsoideum* (FM946021), *C. engadiensis* (FM946011), *C. saccharophilum* (FM946010) a linie „*Chloroidium* 3“ (OP1078) byly vytvořeny s použitím programu Mfold (Zuker, 2003). K vytvoření sekundárních struktur ITS2 byla navíc využita aplikace pro homologní modelování v rámci ITS database (Wolf et al., 2005).

Sekundární struktura ITS1 sestávala ze dvou helixů. Helix II se dále několikanásobně větvil. Struktura se především v terminálních částech helixu II značně lišila. Zatímco sekundární struktury ITS1 *Chloroidium ellipsoideum*, *Chloroidium angustoellipsoideum* a „*Chloroidium* 3“ (Obrázek 16) si byly velmi podobné, sekundární struktury *Chloroidium engadiensis*



Obrázek 16: Predikce sekundární struktury ITS1. A: *Chloroidium ellipsoideum*. B: *Chloroidium angustoellipsoideum*. C: "*Chloroidium* 3". Červeně vyznačeny variabilní pozice mezi těmito třemi sekundárními strukturami. Žlutými rámečky s červeným okrajem vyznačeny CBC mezi těmito třemi strukturami. Žlutým rámečkem se zeleným okrajem(Obrázek 16A, pozice 233-248) vyznačena CBC mezi každou z těchto struktur a strukturou *C. engadiensis*. Zeleně a zelenými rámečky (v případě delších variabilních úseků či oblastí, které úplně chybí) jsou vyznačeny pozice odlišné od struktury *C. engadiensis* a/nebo *C. saccharophilum* (pouze Obrázek 16A).



Obrázek 17: Predikce sekundární struktury ITS1. A: *Chloroidium engadiensis*. B: *Chloroidium saccharophilum*. Červeně a červenými rámečky (v případě delších variabilních úseků nebo úseků které úplně chybí) jsou vyznačeny variabilní pozice mezi těmito dvěmi sekundárními strukturami. Žlutým rámečkem s červeným okrajem vyznačena CBC mezi těmito dvěmi strukturami (Obrázek 17A pozice 279-294, Obrázek 17B pozice 280-289). Žlutými rámečky se zeleným okrajem vyznačeny CBC mezi *C. engadiensis* a *C. ellipsoideum*, *C. angustoellipsoideum* a "*Chloroidium* 3" (Obrázek 17A pozice 282-291) a mezi *C. saccharophilum* a *C. angustoellipsoideum* a "*Chloroidium* 3" (Obrázek 17B pozice 160-260). Zeleně a zelenými rámečky (v případě delších variabilních úseků či oblastí, které úplně chybí) jsou vyznačeny pozice odlišné od struktury *C. ellipsoideum*, *C. angustoellipsoideum* a/nebo "*Chloroidium* 3" (pouze Obrázek 17A).

a *Chloroidium saccharophillum* (Obrázek 17) se od nich zřetelně odlišovaly. Největším rozdílem mezi těmito dvěma skupinami byla přítomnost velké inserce tvořící dva dílčí helixy v helixu II (Obrázek 17A, zelený rámeček, helix II c1 a II c2).

Dalším rozdílem byla délka a struktura helixu II f. Konzervované oblasti se nacházely na bázi obou hlavních helixů, na bázích některých dílčích helixů a dalších vnitřních párujících se úsecích helixu II. Další konzervovanou oblastí byla terminální část dílčího helixu II b a celý dílčí helix II e. Naopak smyčky na konci helixů patřily mezi variabilní oblasti.

Ačkoliv si byly první tři sekundární struktury (Obrázek 16) podobné i v těchto variabilních oblastech, mezi strukturou *C. ellipsoideum* a oběma zbývajícími se vyskytovaly dvě CBC. Naopak mezi *C. ellipsoideum* a *C. angustoellipsoideum* nebyla žádná CBC zaznamenána (Tabulka 6).

Sekundární struktury *C. engadiensis* a *C. saccharophilum* (Obrázek 17) se vzájemně nejvíce odlišovaly insercí 3 párů bází v dílčím helixu II f u *C. engadiensis* a jednoho páru bází v dílčím helixu II c2 u *C. saccharophilum*. Velké množství variabilních pozic se nacházelo v helixu I. V dílčím helixu II f měly jednu CBC. Sekundární struktura *C. engadiensis* měla s ostatními strukturami jednu až dvě CBC, *C. saccharophilum* maximálně jednu CBC. Počet hemi-CBC se pohyboval od dvou mezi *C. ellipsoideum* a *C. angustoellipsoideum* až po devět mezi *C. saccharophilum* a „*Chloroidium* 3“ (Tabulka 6).

Tabulka 6: Počet CBC (pravý horní roh) a hemi-CBC (levý dolní roh) v sekundárních strukturách ITS1

	Chloroidium ellipsoideum	*Chloroidium angustoellipsoideum*	*„Chloroidium* 3“	*Chloroidium engadiensis*	*Chloroidium saccharophilum*
C. ellipsoideum		2	2	2	0
C. angustoellips.	2		0	2	1
„Chloroidium 3“	4	4		2	1
C. engadiensis	3	5	6		1
C. saccharoph.	7	7	9	8	

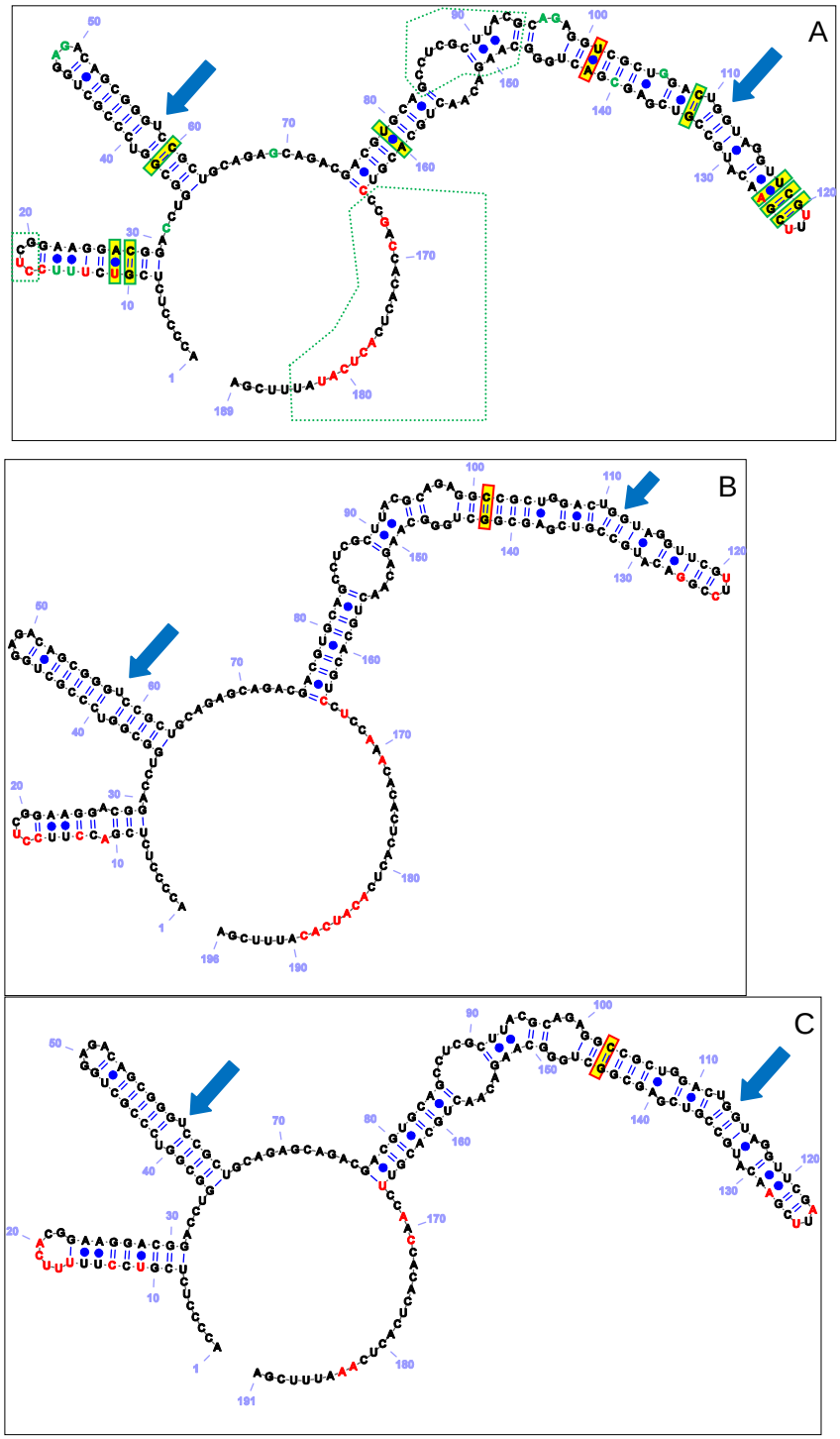
Sekundární struktury ITS2 pěti linií rodu *Chloroidium* byly podobně jako struktury ITS1 v rámci celého rodu poměrně rozdílné, naopak velmi podobné si byly struktury *Chloroidium ellipsoideum*, *C. angustoellipsoideum* a „*Chloroidium* 3“ (Obrázek 18). Tyto tři sekundární struktury především shodně postrádaly helix IV. Zbývající dvě struktury (Obrázek 19) byly tvořeny obvyklými čtyřmi helixy (Coleman, 2007).

Nejkonzervovanější byl helix II, který byl u prvních tří struktur naprosto shodný, oproti strukturám *C. engadiensis* a *C. saccharophilum* se v něm vyskytovala jedna CBC a dvě záměny ve smyčce na konci helixu (dvěmi záměnami ve smyčce na konci helixu se lišily i posledně jmenované struktury navzájem). Ve všech případech byl přítomen univerzálně konzervovaný motiv „pyrimidinové neshody“ (Coleman, 2007), v tomto případě jeden pár U-U.

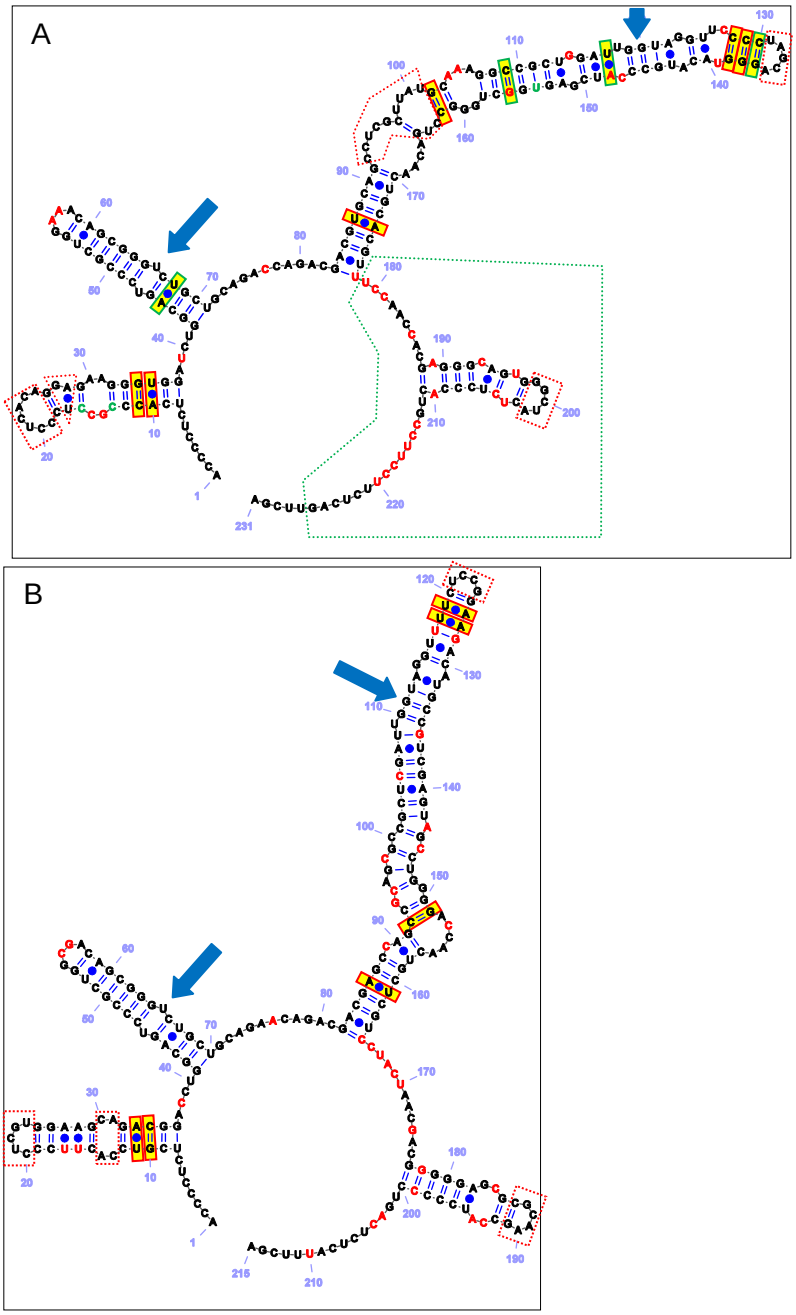
Mezi strukturami *Chloroidium ellipsoideum*, *C. angustoellipsoideum* a „*Chloroidium* 3“ byla rovněž konzervovaná 3‘ strana helixu I a většina helixu III, ve kterém se ale mezi strukturou *C. ellipsoideum* a dvěmi zbývajícími vyskytovala jedna CBC (Tabulka 7).

Sekundární struktury ITS2 *C. engadiensis* a *C. saccharophilum* se podstatně odlišovaly jak od tří výše jmenovaných struktur, tak od sebe navzájem. Vyskytovalo se mezi nimi šest CBC, z toho dvě v helixu I a čtyři v helixu III, který navíc obsahoval dvě hemi-CBC (Tabulka 7) a četné inserce

a delece, největší z nich u *C. saccharophillum* ve střední části helixu III (vyznačena červeným rámečkem).



Obrázek 18: Predikce sekundární struktury ITS2. A: *Chloroidium ellipsoideum*. B: *Chloroidium angustoellipsoideum*. C: "*Chloroidium* 3". Červeně vyznačeny variabilní pozice mezi těmito třemi sekundárními strukturami. Žlutým rámečkem s červeným okrajem vyznačena CBC mezi těmito třemi strukturami (Obrázek 18A, pozice 101-143). Žlutými rámečky se zeleným okrajem vyznačeny CBC mezi některou z těchto struktur a strukturami *C. engadiensis* a/nebo *C. saccharophilum*. Zeleně a zelenými rámečky (v případě delších variabilních úseků či oblastí, které úplně chybí) jsou vyznačeny pozice odlišné od struktury *C. engadiensis* a/nebo *C. saccharophilum* (pouze Obrázek 18A). Modrými šipkami jsou označeny univerzálně konzervované motivy "pyrimidinové neshody" v helixu II a GGU (UGGU) na 5' straně helixu III (Mai and Coleman, 1997).



Obrázek 19: Predikce sekundární struktury ITS2. A: *Chloroidium engadiensis*. B: *Chloroidium saccharophilum*. Červeně a červenými rámečky (v případě delších variabilních úseků či oblastí, které úplně chybí) jsou vyznačeny variabilní pozice mezi těmito dvěmi sekundárními strukturami. Žlutými rámečky s červeným okrajem vyznačeny CBC mezi těmito dvěmi strukturami. Žlutými rámečky se zeleným okrajem vyznačeny CBC mezi některou z těchto struktur a strukturami *C. ellipsoideum*, *C. angustoellipsoideum* a/nebo *"Chloroidium* 3*"*. Zeleně a zelenými rámečky (v případě delších variabilních úseků či oblastí, které úplně chybí) jsou vyznačeny pozice odlišné od struktury *C. ellipsoideum*, *C. angustoellipsoideum* a/nebo *"Chloroidium* 3*"* (pouze Obrázek 19A). Modrými šipkami jsou označeny univerzálně konzervované motivy "pyrimidinové neshody" v helixu II a GGU (UGGU) na 5' straně helixu III (Mai and Coleman, 1997).

Tabulka 7: Počet CBC (pravý horní roh) a hemi-CBC (levý dolní roh) v sekundárních strukturách ITS2

	Chloroidium ellipsoideum	*Chloroidium angustoellipsoideum*	*„Chloroidium* 3*"*	*Chloroidium engadiensis*	*Chloroidium saccharophilum*
C. ellipsoideum		1	1	7	5
C. angustoellips.	2		0	4	5
„Chloroidium 3*"*	3	3		6	5
C. engadiensis	3	3	2		6
C. saccharoph.	3	2	4	2	

Konzervovanou strukturu UGGU (Mai and Coleman, 1997) na 5‘ straně terminární části helixu III (vyznačeno modrou šipkou) obsahovaly všechny sekundární struktury. Velké množství variabilních pozic bylo soustředěno ve smyčkách na koncích všech čtyř helixů. Mezi jednotlivými sekundárními strukturami ITS2 se vyskytovalo až sedm CBC a dvě až čtyři hemi-CBC (Tabulka 7).

5. Diskuse

5.1. Diverzita fotobiontů rodu *Asterochloris*

Ve většině stélek lišejníků rodu *Stereocaulon* (60 z 92) byli v rámci této práce nalezeni fotobionti rodu *Asterochloris*, stejně jako v předchozích pracích zabývajících se fotobionty tohoto lišejníku (např. Nelsen and Gargas 2006; Peksa and Škaloud 2011). Jejich sekvence ITS příslušely většinou k některé ze známých linií rodu *Asterochloris*, nicméně v řadě z nich byli dosud zaznamenáni pouze fotobionti jiných lišejníků (především *Cladonia* spp. a *Lepraria* spp.). Část sekvencí nepřipadla k žádné známé linii (viz stranu 28).

Topologie fylogenetického stromu sestaveného na základě sekvencí ITS a genu pro aktin typu I (Obrázek 6) byla v souladu s dříve publikovanými pracemi založenými na některé z těchto sekvencí či na kombinaci obou. Patrným rozdílem oproti některým z nich (Piercey-Normore and DePriest, 2001; Yahr et al., 2004, 2006; Cordeiro et al., 2005; Beiggi and Piercey-Normore, 2007; Nelsen and Gargas, 2008) je fakt, že používají druh *Asterochloris erici* (syn. *Trebouxia erici*) jako outgroup. Tento postup označili Škaloud a Peksa (2010) za chybný. V této práci je tedy prezentován nezakořeněný fylogenetický strom.

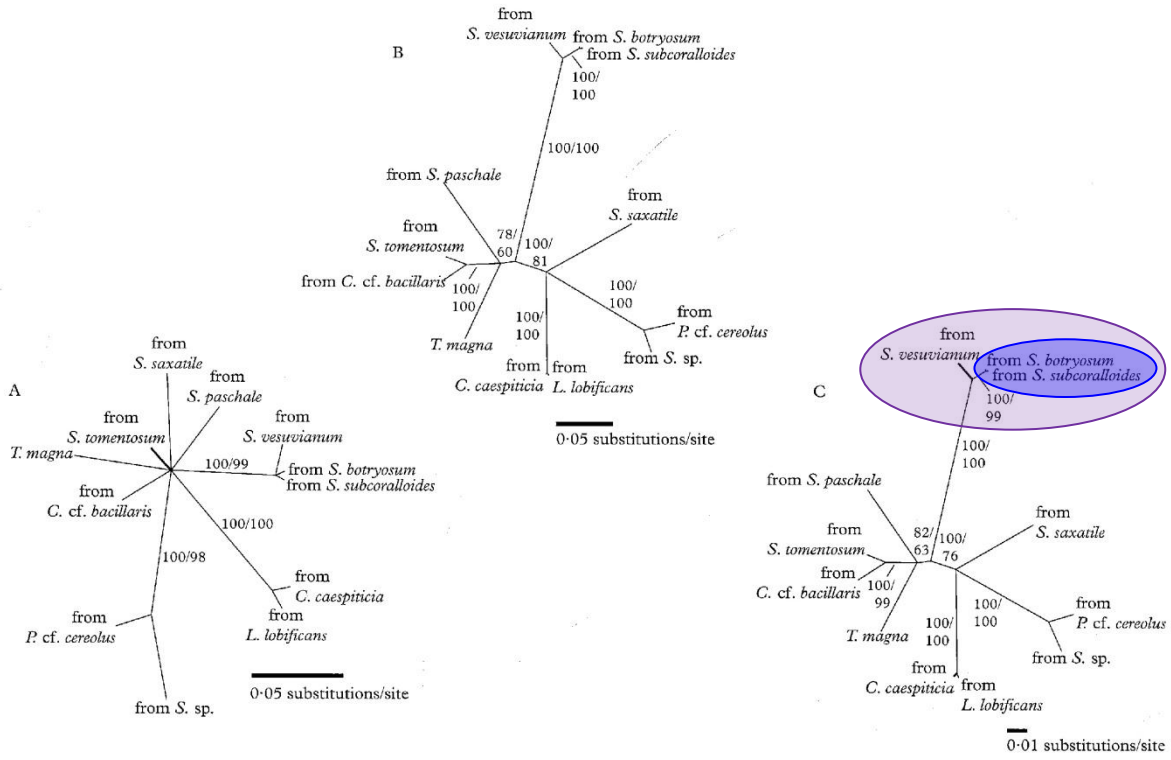
Linie A je jedna z mála, která byla zastoupena, jasně vymezena a vysoce statisticky podpořena ve všech publikacích zabývajících se fylogenezí rodu *Asterochloris* (jako „clade I“ (Piercey-Normore and DePriest, 2001; Yahr et al., 2004, 2006; Cordeiro et al., 2005; Beiggi and Piercey-Normore, 2007; Nelsen and Gargas, 2008) či pod jiným označením nebo bez označení (Nelsen and Gargas, 2006; Bačkor et al., 2010; Škaloud and Peksa, 2010; Peksa and Škaloud, 2011). Tato linie byla současně nejvíce zastoupena mezi fotobionty lišejníků rodu *Stereocaulon* (42 stélek, tj. 70 % všech stélek, ve kterých byl v rámci této práce prokázán výskyt fotobionta rodu *Asterochloris*).

Linie se dále dělí na dvě statisticky vysoce podpořené podlinie A1 (*A. glomerata*) a A2 (*A. irregularis*). Toto dělení odpovídá např. práci Škalouda a Peksy (2010), podle které jsou tyto dvě linie společně s liniemi B (*A. magna*) a C (*A. erici*) součástí velkého „cladu A“. Ten bylo sice možné najít i na fylogenetickém stromě v této práci, ale neměl žádnou statistickou podporu (0,22/-/-)[4]. Příbuznost linií B a C, která byla v jejich publikaci opět plně statisticky podpořena, měla ve fylogenetickém stromě prezentovaném zde velmi nízkou nebo žádnou statistickou podporu (0,74/52/-). Tyto a další podobné rozdíly, jako je např. nepodpoření linie 16 sensu Škaloud&Peksa 2010, je možné vysvětlit vyšším zastoupením sekvencí genu pro aktin typu I

[4] hodnoty Mr. Bayes posteriorní pravděpodobnosti/bootstrapu ML/bootstrapu MP

v jejich alignmentu a preciznějším zpracováním alignmentu pomocí metod, které v této práci nebyly využity.

Naopak oddělení linií A1 a A2 mělo v některých dřívějších studiích slabší podporu (Piercey-Normore and DePriest, 2001; Beiggi and Piercey-Normore, 2007). Nelsen a Gargas (2006) názorně ukázali, jak k jejich oddělení přispívá přidání sekvence genu pro aktin typu I: na základě ITS jsou tři sekvence náležící k linii A s vysokou podporou odděleny od ostatních, ale jejich vzájemný vztah je nejasný, zatímco na základě sekvence genu pro aktin typu I stejně jako na základě kombinovaného souboru dat jsou dvě sekvence náležící k linii A2 jasně odděleny (Obrázek 20).

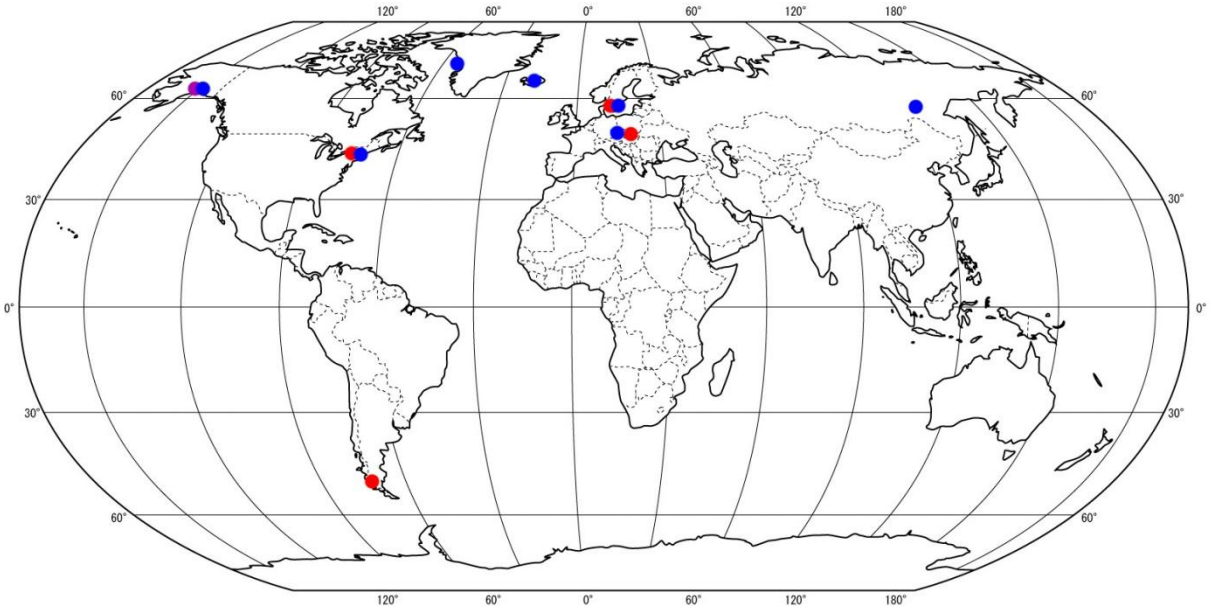


Obrázek 20: Nezakořeněné BI fylogenetické stromy. Podpora jednotlivých větví je vyjádřena Mr. Bayes posteriorní pravděpodobností/MP bootstrapem. A: ITS, B: aktin, C: kombinovaný soubor dat. Falově: linie A, modře: podlinie A2. Upraveno podle (Nelsen and Gargas, 2006).

V rámci linie A se nejvíce nových sekvencí vyskytovalo v podlinii A2 (*A. irregularis*). Naopak v publikacích zaměřených na fotobionty lišejníků rodu *Cladonia* (např. Beiggi and Piercey-Normore 2007), připadla většina do podlinie A1 (*A. glomerata*), která obsahuje fotobionty řady dalších rodů lišejníků. To ukazuje na selektivitu rodu *Stereocaulon* vůči *Asterochloris irregularis*. Zástupci tohoto druhu se vyskytovali ve 39,1 % všech stélek (ale v 60 % stélek, ve kterých byl zaznamenán fotobiont rodu *Asterochloris*).

Tento stav nasvědčuje tomu, že výběr fotobionta je ovlivněn především prostředím (viz níže) a mezi fotobionty přizpůsobenými podmínkám prostředí dochází k selekci geneticky kompatibilních fotobiontů.

Fotobionti z linie A byli široce geograficky rozšířeni, ale podlinie A2 (*Asterochloris irregularis*) se dle v současnosti známých údajů jak u rodu *Stereocaulon* (Obrázek 21; Nelsen and Gargas, 2006; Peksa and Škaloud, 2011), tak u rodu *Cladonia* (Piercey-Normore and DePriest, 2001; Beiggi and Piercey-Normore, 2007; Škaloud and Peksa, 2010) omezuje pouze na temperátní a boreální pásmo severní polokoule. *A. irregularis* byl zaznamenán rovněž na základě morfologického pozorování jako fotobiont lišejníku *Squamarina lentigera* z jižní Francie (Beck et al., 2002), nicméně na podle znaků uvedených v publikaci ho nelze jednoznačně určit.



Obrázek 21: Geografické rozšíření fotobiontů lišejníků rodu *Stereocaulon* z linie A: červeně: linie A1, *Asterochloris glomerata*; modře: linie A2, *Asterochloris irregularis*; fialově: sekvence s nejasnou pozicí v rámci linie A.

Do linií B a C nespadá žádná ze sekvencí získaná v rámci této práce, ačkoliv v linii C již byl dříve fotobiont lišejníku rodu *Stereocaulon* zaznamenán. Linie A, B a C spojuje fakt, že v nich dosud nebyl zaznamenán žádný fotobiont lišejníku rodu *Lepraria* příbuzného rodu *Stereocaulon* (Nelsen and Gargas, 2008; Peksa and Škaloud, 2011).

Naopak v linii K, která zahrnuje téměř výhradně fotobionty lišejníků rodu *Lepraria* (Nelsen and Gargas, 2008), nepřibyl žádný fotobiont lišejníku rodu *Stereocaulon*. Nicméně je možné, že se k linii K v budoucnu po doplnění sekvencí genu pro aktin typu I připojí sekvence T8 a T20 pocházející ze *Stereocaulon vesuvianum* z Tanzánie. Druhou možností je, že se připojí k linii J, jejíž součástí již jedna sekvence fotobionta lišejníku *S. vesuvianum* z Tanzánie je.

Podobně velká linie G a menší linie E, N a P zahrnující pouze fotobionty lišejníků rodu *Lepraria* (Peksa and Škaloud, 2011) zůstaly specifické k tomuto mykobiontovi. Oproti tomu k linii F, která byla dříve tvořena pouze fotobionty lišejníků rodu *Lepraria*, přibyly tři sekvence fotobiontů lišejníků rodu *Stereocaulon* z Argentiny.

Rod *Lepraria*, ačkoliv patří do stejné čeledi jako *Stereocaulon* (Stereocaulaceae), má naprosto odlišný typ stélky (práškovitou stélku). Množství linií pozitivně nebo negativně (především linie A, B a C, tj. „clade A" sensu Škaloud&Peksa 2010) specifických vůči rodu *Lepraria* může nasvědčovat tomu, že někteří fotobionti tento typ stélky preferují či naopak.

Některé z linií specifické pro rod *Lepraria* (G1, P) výrazně preferují kůru stromů jako substrát a dávají přednost stanovištím, která jsou zastíněná a chráněná proti dešti (Peksa and Škaloud, 2011). To může být v rosporu s ekologickými nároky mykobionta *Stereocaulon*. Linie G2, která rovněž zůstala specifická pro rod *Lepraria*, právě naopak na kůře stromů nebyla téměř nikdy nalezena a preferuje stanoviště vystavená slunci a dešti (Peksa and Škaloud, 2011). Důvody pro tuto specifitu mohou být pravděpodobně různé, případně se může jednat o kombinaci více faktorů.

Linie J (Nelsen and Gargas, 2008; Škaloud and Peksa, 2010; Peksa and Škaloud, 2011) a G (Peksa and Škaloud, 2011) rozdělené na podlinie byly přítomny již v dřívějších publikacích, byly však většinou prezentovány jako samostatné linie. Tento fakt označení použité v této práci, stejně jako v případě linie A, nikterak nepopírá, pouze vyjadřuje prokázanou příbuznost těchto linií.

V liniích M a O, jejichž diverzitu v rámci této práce obohatily sekvence z Argentiny, Řídká (2012) nalezla fotobionty rodu *Cladonia* rovněž z Argentiny (provincie Santa Cruz a Tierra del Fuego) a z Chile (provincie Capitán Prat).

Sekvence L1079 ze *Stereocaulon alpinum* z Tyrolska potvrzuje preferenci vysokohorských lokalit této linie (Škaloud, 2008; Peksa and Škaloud, 2011).

Z dvanácti druhů mykobiontů zařazených do této práce vykazovalo přítomnost fotobionta rodu *Asterochloris* devět: *Stereocaulon vesuvianum*, *S. paschale*, *S. alpinum*, *S. tomentosum*, *S. apocalypticum*, *S. condensatum*, *S. dactylophyllum*, *S. intermedium* a *S. symphychelium*. *Stereocaulon pileatum* s fotobiontem rodu *Asterochloris* byl zaznamenán jinými autory (např. Peksa and Škaloud 2011). *Stereocaulon spathuliferum* byl zastoupen pouze jedinou položkou obsahující fotobionta rodu *Chloroidium* stejně jako čtyři položky *Stereocaulon nanodes*. Posledně jmenovaný mykobiont byl již v minulosti ve dvou případech pozorován ve spojení s fotobiontem rodu *Chloroidium* (Beck, 2002).

Stereocaulon nanodes se ukázal jako monofyletický druh (Obrázek 3, linie 8b), ačkoliv je mnoho druhů rodu *Stereocaulon* nemonofyletických (Högnabba, 2006). Nicméně řada položek byla určena pouze do úrovně rodu, a proto by na potvrzení specifity tohoto druhu vůči fotobiontům rodu *Chloroidium* byl potřeba rozsáhlejší výzkum.

5.2. Výskyt fotobiontů rodu *Chloroidium*

V rámci této práce byl ve velkém počtu stélek (28) lišejníků rodu *Stereocaulon* prokázán výskyt fotobiontů rodu *Chloroidium*. Tito fotobionti náleženi na základě sekvencí ITS do tří linií (*C. ellipsoideum*, *C. angustoellipsoideum* a „*Chloroidium* 3"; Obrázek 15). Zástupci druhu *Chloroidium ellipsoideum* (syn. *Chlorella saccharophila* var. *ellipsoidea*) byli již dříve zaznamenáni jako fotobionti jiných lišejníků: *Trapelia coarctata* (Tschermak-Woess, 1948, 1978), *Trapelia obtegens* (Beck, 2002) a *Bacidia arnoldiana* (syn. *Woessia fusarioides*; Tschermak-Woess 1988).

Beck (2002) zaznamenal ve stélkách lišejníků *Stereocaulon nanodes*, *Psilolechia leprosa* a *Lecidea inops* také přítomnost fotobionta *Chloroidium saccharophilum*, který v rámci této práce ani nikdy dříve nebyl nalezen v žádné stélce lišejníku. Nicméně na základě sekvence úseku 18S rDNA se tito fotobionti od typové kultury SAG 211-9a značně odlišovali, což činí jejich příslušnost k tomuto druhu přinejmenším nejistou.

Thüs et al. (2011) nalezli *Chloroidium sp.* jako „přídatného fotobionta" (pravděpodobně epifyt) lišejníku *Verrucaria praetermissa*, jehož standardním fotobiontem je *Diplosphaera* spp.. Jeho sekvence 18S rDNA neodpovídala ani jednomu ze čtyř popsaných druhů, což nasvědčuje, stejně jako výsledky této práce, tomu, že část diverzity uvnitř tohoto rodu zůstává zatím neobjevena.

Již v minulosti bylo prokázáno u lišejníku *Lecidea inops*, že *Asterochloris irregularis*, nejčastější fotobiont ve stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon*, není příliš tolerantní k přítomnosti těžkých kovů a při koncentraci mědi nad 400 μg/g byl nahrazen fotobionty rodu *Trebouxia* a *Chloroidium* (Beck, 2002). Rovněž stélky lišejníků rodu *Stereocaulon*, ve kterých byla v rámci této práce zaznamenána přítomnost fotobiontů rodu *Chloroidium* (Obrázek 15, Příloha 1), pocházely z lokalit nebo substrátů, o kterých je možné se domnívat, že obsahovaly zvýšené množství těžkých kovů (viz strana 42).

Bačkor et al. (2010) ovšem neprokázali rozdíly v diverzitě fotobiontů mezi lokalitami, které byly zatíženy vysokou koncentrací těžkých kovů (především mědi), lokalitami s nízkou koncentrací a neznečištěnými lokalitami. Současně ale zjistili, že u lišejníků *Cladonia* spp. (které představují většinu zkoumaných položek) je koncentrace mědi ve stélce mnohonásobně nižší, než v substrátu. Např. stélka *Cladonia arbuscula*, která jako jediná v jejich studii obsahovala

fotobionta druhu *Asterochloris irregularis*, měla obsah mědi pouze 28,5 ± 11,4 μg/g, ačkoliv substrát měl 1 486 ± 457 μg/g.

Oproti tomu koncentrace mědi ve stélce lišejníku *Lecidea inops* ze substrátu s koncentrací okolo 17 000 μg/g byla přibližně 13 000 μg/g (Beck, 2002). Mezi různými lišejníky tedy existuje obrovský rozdíl ve schopnosti zabránit pronikání těžkých kovů do stélky a tedy k fotobiontovi.

Mezi stélkami, které Bačkor et al. (2010) sbírali v České republice a na Slovensku na lokalitách znečištěných těžkými kovy, byly rovněž dvě náležící k rodu *Stereocaulon*: *Stereocaulon tomentosum* s fotobiontem *Asterochloris* sp. (linie 16 sensu Škaloud&Peksa 2010) a *Stereocaulon* sp. s fotobiontem *Asterochloris glomerata*. Množství mědi v těchto stélkách bohužel není v dané práci uvedeno. Je ale možné, že tito dva fotobionti jsou k přítomnosti těžkých kovů tolerantnější, než *A. irregularis*, což by odpovídalo tomu, že stejný genotyp fotobionta obsahovalo velké množství stélek nalezených na znečištěných lokalitách.

Rovněž mezi druhy příbuzného rodu *Trebouxia*, lze najít fotobionty, kteří jsou vůči těžkým kovům velmi citliví (*T. jamesii*) a naopak druhy velmi odolné (*T. simplex*; Beck 2002). Známy jsou taktéž linie tolerantní k jiným druhům znečištění (Piercey-Normore, 2009).

Přítomnost fotobiontů rodu *Chloroidium* ve stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon* tedy může mít přímou souvislost s typem substrátu, přinejmenším s obsahem těžkých kovů, protože se tato řasa jeví k jejich koncentraci tolerantní na rozdíl od fotobionta *Asterochloris irregularis* výrazně preferovaného v jiných prostředích.

5.3. Diverzita fotobiontů na ostrově La Palma

Ve stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon* na ostrově La Palma (Kanárské ostrovy) byla zaznamenána přítomnost fotobiontů druhu *Chloroidium ellipsoideum* (16 stélek, pět lokalit, čtyři genotypy ITS) a z linie "Palma" (čtyři stélky, tři genotypy ITS). Řídká (2012) navíc zaznamenala ve stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon* (jedna stélka) a *Cladonia* (10 stélek, tři lokality) dva genotypy ITS fotobiontů rodu *Asterochloris*, které společně se sekvencemi fotobiontů rodu *Cladonia* z ostrova Korfu tvořily novou vysoce statisticky podpořenou linii.

Za pozornost stojí fakt, že na ostrově nebyl nalezen žádný z běžných zástupců rodu *Asterochloris*, kterými je např. *A. glomerata* (linie A1) zaznamenaná v řadě lišejníků nebo linie I, do které se řadí velké množství fotobiontů rodu *Cladonia* z celého světa (Řídká, 2012).

Všechny zaznamenané výskyty fotobiontů rodu *Asterochloris* na ostrově La Palma (Řídká, 2012) spadaly do severní, výrazně starší části ostrova (stáří hornin 0,4–1 milion let, oblast dna Caldera de Taburiente dokonce z doby vzniku ostrova v pliocénu; Příloha 4; (Carracedo et al., 2001;

Calvet et al., 2003)), naopak lokalita linie "Palma" se nachází na nejjižnější části ostrova (stáří hornin cca 40–20 000 let (Carracedo et al., 2001)).

Stélky rodu *Cladonia* pocházely z nadmořských výšek 700–1 350 m n. m. ze zalesněných oblastí. Lokality, ze kterých byli zaznamenáni fotobionti *Chloroidium ellipsoideum*, leží téměř na celém severojižním gradientu v nadmořských výškách 900–2 360 m n. m., ve třech případech v lese, ve zbývajících 13 případech byly bez vegetace nebo s velmi řídkou vegetací.

Jediným případem, kdy byl z jedné lokality zaznamenán výskyt fotobiontů *Asterochloris* i *Chloroidium* je oblast bezlesí v blízkosti vrcholu Fuente Nueva (okolo 2 300 m n. m.). Oba rody byly nalezeny dokonce v jedné stélce lišejníku *Stereocaulon vesuvianum*. Sekvence KO25 (Řídká, 2012) pochází ze stejné stélky jako sekvence A16 získaná v rámci této práce, ale ze vzorku DNA izolovaného nezávisle.

Výskyt více druhů fotobiontů v jedné stélce byl pozorován jak v rámci této práce u rodu *Chloroidium*, tak již v minulosti u rodu *Asterochloris*. Dva fotobionti v jedné stélce byli zaznamenáni u čtyř druhů rodu *Cladonia*, u druhu *C. macilenta* dokonce tři fotobionti. Při následné izolaci DNA z malých fragmentů těchto stélek, byl vždy nalezen v každém vzorku pouze jeden fotobiont (Bačkor et al., 2010).

Casano et al. (2011) prokázali výskyt dvou výrazně odlišných genotypů *Trebouxia* dokonce ve všech zkoumaných stélkách lišejníku *Ramalina farinacea* v geograficky oddělených populacích na Pyrenejském poloostrově, Kanárských ostrovech a v Kalifornii. Tito fotobionti se lišili nejen na základě molekulárních analýz, ale i svojí velikostí (ve stélce i kultuře) a nároky na teplotu a radiaci. Ve stélce se tito fotobionti vyskytovali nejčastěji v oddělených shlucích, někdy byli ale navzájem promícháni.

Výskyt více fotobiontů *Trebouxia* spp. v jedné stélce byl zjištěn rovněž u řady zástupců čeledi Physciaceae (Helms, 2003).

Ve stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon* na ostrově La Palma se vyskytovali v 80 % případů fotobionti rodu *Chloroidium*, ve 20 % případů fotobionti linie "Palma" prozatím zaznamenané pouze z této lokality a v jednom případě fotobiont rodu *Asterochloris* (Řídká, 2012) současně s fotobiontem *Chloroidium ellipsoideum*.

Takto omezené zastoupení fotobionta rodu *Asterochloris*, který byl dosud považován za nejčastějšího či dokonce jediného fotobionta lišejníků rodu *Stereocaulon* (např. Piercey-Normore and Depriest 2001; Nelsen and Gargas 2006; Peksa and Škaloud 2011), nasvědčuje

tomu, že fotobionti rodu *Asterochloris*, ač se na ostrově vyskytovali, nejsou životu na vulkanickém substrátu dobře přizpůsobeni a lišejníky s jiným fotobiontem jsou tedy ve výhodě.

Podobnou tendenci lze pozorovat i na jiných lokalitách s vulkanickým substrátem. Vzorky T1, T2 a T4 pocházející z lokalit Mt. Meru a Mt. Kilimandjaro (Tanzánie, 4 100–4 500 m n. m.) vykazovaly přítomnost fotobionta *Chloroidium ellipsoideum* (dva genotypy, z toho jeden shodný s položkami z České republiky), vzorky T8, T20 a T21 (ze stejných lokalit) naopak fotobionta rodu *Asterochloris*.

Poslední jmenovaný náležel k linii J2 (Obrázek 8) společně s fotobionty lišejníků *Lepraria* spp. z České republiky a Kostariky. Linie J obsahovala navíc fotobionty lišejníků *Stereocaulon saxatile* (USA), *Lepraria borealis* (Bulharsko) a *Cladonia foliacea* (Česká republika). Sekvence T8 a T20 měly nejasnou pozici v rámci rodu *Asterochloris*.

Fotobionti rodu *Asterochloris* byli v této oblasti zaznamenáni také u tří položek *Cladonia* spp. Jednalo se o tři různé genotypy ITS nenáležející k žádné z dosud známých linií. Jedna z nich vytvořila společnou linii se střední až vysokou statistickou podporou se sekvencí T20 (Řídká, 2012).

Všechny položky rodu *Stereocaulon* z ostrova La Palma byly určeny jako *Stereocaulon vesuvianum*. Jedná se o běžný druh, který je často jedním z mála pionýrských druhů lišejníků rostoucích na mladých vulkanických substrátech (Grasso et al., 1999; Stretch and Viles, 2002; Cutler et al., 2008).

5.4. Druhový koncept rodů *Asterochloris* a *Chloroidium*

Dle biologického pojetí druhu by měly druhy představovat reprodukčně izolované jednotky. Definice biologického druhu podle Mayra (1970) je následující: „Druhy sestávají z populací a mají vnitřní genetickou soudržnost. Organismy v rámci druhu tvoří reprodukční jednotku, mohou se vzájemně křížit a vyhledávají se za účelem reprodukce. Druh také tvoří ekologickou jednotku interagující s ostatními druhy v daném prostředí. Členové druhu tvoří genetickou jednotku sdílející společný genofond. Druhy jsou skupiny navzájem se křížících přírodních populací, které jsou reprodukčně izolované od jiných podobných druhů."

Vymezení druhů např. v rámci rodu *Asterochloris* podle této definice však není možné vzhledem k tomu, že pohlavní rozmnožování bylo pozorováno pouze u některých jeho příslušníků, a to jen velmi vzácně (Škaloud, 2008).

Jako vhodné propojení mezi biologickým pojetím druhu a v současnosti široce využívanými molekulárními markery, se ukazují sekundární struktury ITS, především ITS2. Vzhledem k tomu,

že všechny úseky ITS2 se nevyvíjejí stejnou rychlostí, nelze na evoluční vzdálenost usuzovat čistě z počtu změn v sekvenci, naopak množství CBC mezi sekundárními strukturami jsou dobrým měřítkem porovnatelným napříč mnoha skupinami eukaryotických organismů. Mezi organismy, jejichž gamety úspěšně interagují (tzn. nejsou mezi nimi prezygotické reprodukční bariéry), se nevyskytují žádné CBC (Coleman, 2000).

5.4.1. Sekundární struktury ITS1 a ITS2

Sekundární struktury ITS byly v rámci této práce využity jednak k porovnání linie „Palma" a rodu *Asterochloris*, jednak k vzájemnému srovnání pěti linií rodu *Chloroidium*.

Sekundární struktury ITS1 a ITS2 příslušníků linie „Palma" byly vytvořeny na základě publikovaných struktur *Asterochloris phycobiontica* (Škaloud and Peksa, 2010) a s nimi byly také porovnávány (Obrázek 13). Nicméně pro představu o odlišnostech linie „Palma" je třeba zohlednit i další linie rodu *Asterochloris* (Tabulka 8).

Tabulka 8: Počet CBC (pravý horní roh) a hemi-CBC (levý dolní roh) mezi 16 liniemi rodu *Asterochloris* (Sensu Škaloud&Peksa 2010) zjištěných porovnáním sekundárních struktur ITS1 a ITS2 . Názvy pro odpovídající linie použité v této práci jsou uvedeny v prvním řádku. Počet CBC a hemi-CBC mezi linií Q (*A. phycobiontica*) a ostatními liniemi je zvýrazněn červeně. Upraveno podle (Škaloud and Peksa, 2010).

	A1	A2	B	C	D	E	G1	H	I	J1	K	L	M	N	Q	
	#1	**#2**	**#3**	**#4**	**#5**	**#6**	**#7**	**#8**	**#9**	**#10**	**#11**	**#12**	**#13**	**#14**	**#15**	**#16**
#1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#2	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#3	7	6		0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
#4	4	3	3		0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
#5	6	5	3	4		0	1	0	0	0	2	0	1	1	0	1
#6	4	3	3	0	2		0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
#7	3	2	4	3	3	3		0	1	0	0	0	0	0	1	1
#8	4	3	7	4	6	4	3		0	0	0	0	0	0	0	0
#9	7	6	2	3	3	3	4	7		1	2	0	1	2	0	1
#10	3	2	6	3	5	2	4	4	4		0	0	0	0	0	0
#11	4	3	3	3	2	2	3	6	3	3		0	0	0	0	1
#12	3	2	6	3	5	3	2	3	6	4	5		0	0	0	0
#13	5	4	4	1	3	1	4	5	4	4	3	4		0	0	0
#14	5	4	4	1	3	1	4	5	2	2	3	4	2		0	0
#15	4	3	3	2	2	2	1	4	3	3	3	3	3	3		0
#16	5	4	2	1	1	1	2	5	2	4	1	4	2	2	1	

Sekundární struktury ITS1 jednotlivých linií rodu *Asterochloris* v publikaci Škalouda a Peksy (2010) jsou nejvariabilnější v helixu I, ve kterém je také CBC mezi *A. phycobiontica* a linií G1 (7 sensu Škaloud&Peksa 2010). Tato CBC je přítomna i mezi všemi zástupci linie „Palma" a linií G1. Naopak CBC v tomto helixu mezi linií „Palma" a *A. phycobiontica* chybí při porovnání s jinými liniemi *Asterochloris*, u kterých na této pozici dochází ke ztrátě párování. Zajímavostí je, že variabilní pozice 18 (G/A) mezi strukturami linie „Palma" se vyskytuje rovněž v rámci struktur rodu *Asterochloris* (linie D (G) oproti ostatním liniím (A)).

V helixu II, kde je hemi-CBC mezi linií H a ostatními liniemi *Asterochloris*, je CBC mezi touto linií a sekvencí L1616 (Obrázek 13A; A-U, pozice 44-74). Zbývající dvě CBC v helixech II a III vůči linii „Palma" jsou společné všem liniím rodu *Asterochloris*. Ve velké smyčce na konci helixu IV, jejíž 3' strana je velmi rozdílná mezi strukturami linie „Palma" a strukturou *A. phycobiontica*, je velká variabilita rovněž v rámci rodu *Asterochloris*.

Mezi sekundárními strukturami ITS2 *Asterochloris* je nejvíce variability soustředěno v helixu I. Druhý pár bází směrem ke konci helixu za nepárující se oblastí se mění z C-G (linie B, C, K, M, N a „16") přes U-G (A1, A2, G1, H, J1, L, Q) na U-A (D, E, I)[5]. Mezi první a třetí skupinou je tedy přítomna CBC (jediná ve struktuře ITS2), mezi druhou skupinou a ostatními liniemi hemi-CBC. Tato pozice spolu s dalším párem nukleotidů v helixu I v sekundárních strukturách linie „Palma" úplně chybí. K několika oboustranným insercím/delecím došlo v koncové části helixu I i v rámci rodu *Asterochloris*.

Zatímco úsek ITS2 byl u rodu *Chloroidium* zhruba obdobně dlouhý jako u rodu *Asterochloris*, úsek ITS1 byl téměř dvakrát delší a tvořil podstatně složitější strukturu. Variabilita v délce této sekvence je obecně vyšší, než v úseku ITS2 (který je jen výjimečně delší než 350 bází (Coleman, 2007)). U *Picea* spp. má úsek ITS1 2747–3271 bází, což z něj činí nejdelší mezi rostlinami (Campbell et al., 2005).

Sekundární struktury ITS1 i ITS2 (Obrázek 16–Obrázek 19) pěti zkoumaných linií rodu *Chloroidium*, vykazovaly výrazně větší variabilitu, než sekundární struktury rodu *Asterochloris*. Na jejich základě se jeví jako nejblíže příbuzné linie *Chloroidium angustoellipsoideum* a „*Chloroidium* 3", které mezi sebou v sekundární struktuře ITS2 nemají žádnou CBC (Tabulka 7). Naopak velmi odlišné od ostatních i od sebe navzájem jsou linie *C. engadiensis* a *C. saccharophilum*.

Toto zjištění je v souladu s fylogenetickým stromem vytvořeným na základě ITS (Obrázek 15). Žádná podobná tendence nebyla u rodu *Asterochloris* při porovnání sekundárních struktur a fylogenetického stromu pozorována s výjimkou oddělení linie „Palma". Poměrně výrazně se liší i počet CBC a hemi-CBC zjištěný v rámci těchto dvou rodů.

Mezi šestnácti liniemi rodu *Asterochloris* (Škaloud and Peksa, 2010) byly zaznamenány maximálně dvě CBC a jedna až sedm hemi CBC (v součtu ITS1 a ITS2; Tabulka 8). Mezi typovým druhem rodu *Asterochloris* (*A. phycobiontica*) a zástupci všech známých genotypů ITS linie „Palma" byly zaznamenány tři CBC a čtyři až osm hemi-CBC (Tabulka 5). Uvnitř této linie

[5] Tato formulace je použita pouze pro názornost. Samozřejmě není známo, v jakém pořadí se popisované změny udály.

se nevyskytovala žádná CBC, ale pět až šest hemi-CBC. Mezi pěti liniemi rodu *Chloroidium* bylo zaregistrováno až devět CBC a čtyři až třináct hemi-CBC (Tabulka 6, Tabulka 7).

Rozdíl v diverzitě sekundárních struktur je evidentní. Nicméně vysokým počtům CBC a hemi-CBC nelze přikládat příliš velký význam. Jednak je složité vytvořit jednoznačný alignment velmi rozdílných struktur, jednak mohou některé části struktur kvůli rozsáhlým insercím/delecím chybět a velmi odlišné struktury pak mohou mít menší počet CBC nebo hemi-CBC, než struktury příbuznější, mezi kterými se mohou vyskytovat na těchto chybějících částech.

Mai a Coleman (1997) zaznamenaly v sekundárních strukturách ITS2 určité motivy konzervované mezi zelenými řasami i krytosemennými rostlinami. Jsou jimi především „pyrimidinová neshoda" v helixu II a motiv GGU (UGGU pro krytosemenné rostliny stejně jako pro zástupce třídy Trebouxiophyceae; Tabulka 9) na 5' straně terminální části helixu III. Tyto motivy byly přítomny ve všech sekundárních strukturách ITS2 prezentovaných v této práci.

Coleman (2007) později upozornila na úsek GGUAGGY ve stejné oblasti, který by měl být společný pro celé oddělení Chlorophyta. Tato sekvence byla přítomna u všech linií rodu *Chloroidium* v podobě GGUAGGU a u rodu Asterochloris a linie „Palma" v podobě GGUAGGC.

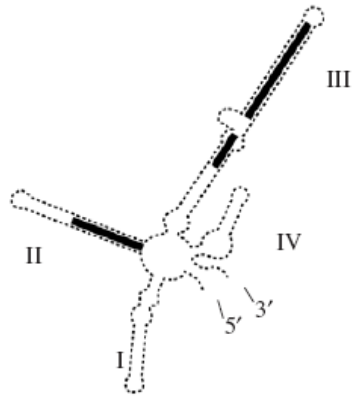
Tabulka 9: Srovnání sekvence 11 nukleotidů nacházejících se na 5' straně helixu III sekundární struktury ITS2 mezi vybranými zelenými řasami a krytosemennými rostlinami. Motiv GGU je univerzálně konzervovaný. Motiv UGGU je zachován u všech krytosemenných rostlin, stejně jako u zástupců třídy Trebouxiophyceae. Upraveno podle Mai a Coleman (1997).

Chlamydomonas reinhardtii	CUACUG**GGU**AG
Volvox spermatosphaera	CUACUA**GGU**AG
Acrosiphonia arcta	CAGCAA**GGU**AG
Trebouxia spp. (Piercey-Normore, 2009)	CGAUUU**GGU**AG
Asterochloris spp. (Škaloud and Peksa, 2010)	CAGCUU**GGU**AG
Linie „Palma"	CAGCUU**GGU**AG
Chloroidium ellipsoideum, *C. angustoellipsoideum*, „*Chloroidium* 3"	UGGACU**GGU**AG
Chloroidium engadiensis	UGGAUU**GGU**AG
Chloroidium saccharophilum	UCGAUU**GGU**AG
Chlorella vulgaris (Krienitz et al., 2004)	UGGCUU**GGU**AG
Lycopersicon esculentum (Solanaceae)	AGUGGU**GGU**UG
Calycadenia oppositifolia (Asteraceae)	AGUGGU**GGU**UG
Dubautia arborea (Asteraceae)	UGUGGU**GGU**UG
Photinia pyrifolia (Rosaceae)	AUCGGU**GGU**UG
Daucus carota (Apiaceae)	AUCGGU**GGU**UG
Vifia faba (Fabaceae)	GAUGGU**GGU**UG
Cucumis melo (Cucurbitaceae)	UACGGU**GGU**UG
Populus deltoides (Salicaceae)	AGCGGU**GGU**UG
Arabidopsis thaliana (Brassicaceae)	UGCGGU**GGU**GA
Gossypium hirsutum (Malvaceae)	AUCGGU**GGU**AA
Alnus incana (Betulaceae)	AUCGGU**GGU**UG
Ranunculus enysii (Ranunculaceae)	AGCGGU**GGU**UG
Oryza sativa (Poaceae)	GCGCAU**GGU**GG

Zajímavé je srovnání 11 nukleotidů obsahujících univerzálně konzervovaný motiv GGU (Tabulka 9). Zatímco u rodu *Asterochloris* a linie „Palma“ byla tato sekvence shodná (stejně jako např. u *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) a *Calycadenia oppositifolia* (Asteraceae)), v rámci rodu *Chloroidium* se vyskytovaly tři varianty vzájemně se lišící v jednom nukleotidu.

Nejběžnější podobou sekundární struktury ITS2 je tzv. „čtyřprstá ruka“, ale prakticky ve všech případech (v rámci eukaryot) je přítomen zpravidla krátký helix II a naopak nejdelší helix III. Koncová oblast helixu III považována za velmi konzervovanou na rozdíl od ostatních helixů, u kterých jsou méně variabilní bazální části. Další velmi konzervovanou oblastí je bazální část helixu II (Obrázek 22 (Coleman, 2007)).

V rámci rodu *Chloroidium* se v obou oblastech vyskytovaly CBC, nicméně vykazovaly nižší míru variability, než zbytek struktury. Helix II byl v sekundárních strukturách linie „Palma“ totožný a terminální část helixu III obsahovala jednu záměnu vedoucí ke ztrátě párování. V rámci rodu *Asterochloris* se v bazální části helixu II vyskytovaly dvě hemi-CBC, ale párující se části koncové části helixu III byly naprosto totožné (Škaloud and Peksa, 2010).



Obrázek 22: Univerzálně konzervované oblasti sekundární struktury ITS2 (Coleman, 2007).

Na základě mnoha výše uvedených znaků a zejména porovnání konzervovaných oblastí ITS2 („konzervovaného jádra“ zahrnujícího mimo výše zmíněné úseky především dva bazální páry helixu I a 5‘ stranu helixu IV) podle Mai a Coleman (1997) by linie „Palma“ pravděpodobně byla součástí rodu *Asterochloris*.

5.4.2. Srovnání v rámci třídy Trebouxiophyceae

Díky omezenému množství znaků, které mnohdy jednoduchá morfologie mnoha zástupců třídy Trebouxiophyceae poskytuje (Letsch et al., 2009), se na základě molekulárních dat ukazuje, že řada tradičních druhů či dokonce rodů, obsahuje organismy náležící do několika vzdálených linií (Huss et al., 1999; Eliáš et al., 2008; Darienko et al., 2010).

Způsob vymezení rodů u kokálních zelených řas je však i při použití molekulárních markerů stále předmětem diskusí. Otázka, zda jsou skutečné přirozené linie lépe definovány „malými“, či „velkými“ rody, zůstává nevyřešena. V této věci by měla spíše rozhodovat specifická situace v každé skupině (Luo et al., 2010). Proto je na místě porovnat druhový koncept jednotlivých zkoumaných skupin s vybranými liniemi třídy Trebouxiophyceae.

Diverzita ITS sekvencí *Asterochloris* odpovídá zhruba diverzitě jedné ze čtyř linií rodu *Trebouxia*, ale i mezi těmito liniemi se diverzita značně liší. To ukazuje na rozdílnou mutační rychlost i v rámci jednoho rodu (Helms, 2003). Čtyři linie rodu *Trebouxia* jsou od sebe dobře odlišené a poměrně vzdálené. Helms (2003) je dále dělí na 31 sublinií, které zhruba odpovídají úrovni druhu.

Platně popsaných druhů tohoto rodu je v současnosti 25 (Guiry and Guiry, 2012). Jednotlivé blízce příbuzné druhy jsou na základě několika molekulárních markerů (ITS, 23S plastidové rDNA (del Campo et al., 2010), genu pro aktin typu I (Muggia et al., 2010)) vzájemně přibližně stejně odlišné jako druhy rodu *Asterochloris*.

Na základě sekvencí 18S (Obrázek 11) jsou v současnosti popsané druhy rodu *Chloroidium* asi stejně diverzifikované jako čtyři hlavní linie rodu *Trebouxia*. Nová linie „*Chloroidium* 3“ blízká druhům *C. ellipsoideum* a *C. engustoellipsoideum* i velký nárůst známé diverzity v rámci *C. ellipsoideum* naznačuje, že by v budoucnosti mohlo být objeveno více druhů v rámci jednotlivých linií reprezentovaných současnými druhy. Tomu nasvědčuje i zaznamenání pravděpodobně epifytické řasy blízké *C. ellipsoideum* na stélce *Verrucaria praetermissa* (Thüs et al., 2011).

Ještě šířeji definované druhy, než *Chloroidium* má rod *Elliptochloris*. *Elliptochloris bilobata* var. *bilobata* a *Elliptochloris bilobata* var. *corticola* se nejen značně liší v sekvenci i sekundární struktuře 18S, ale také v morfologii (Eliáš et al., 2008). Jako fotobiont lišejníku *Verrucaria sublobulata* byl zaznamenán další zástupce tohoto druhu, který není v sekvenci 18S shodný ani s jednou z popsaných variet, nicméně je blízký *E. bilobata* var. *corticola* (Thüs et al., 2011). V rámci tohoto rodu byl objeven také mořský zástupce *E. marina* (Letsch et al., 2009). Skutečná diverzita tohoto rodu tedy patrně teprve čeká na své odhalení.

Ještě nápadnější je situace u druhu *Botryococcus braunii*, na který se v poslední době upírá pozornost kvůli jeho praktickému využití při výrobě paliv. Jednotlivé kmeny tohoto druhu jsou na základě 18S obdobně diverzifikované jako druhy či dokonce rody v jiných liniích. Zaznamenány byly i podstatné fyziologické odlišnosti (Senousy et al., 2004).

Dalším příkladem „velkého“ rodu v rámci třídy Trebouxiophyceae je rod *Coccomyxa*. Na základě molekulárních markerů i sekundárních struktur ITS2 jsou jeho zástupci značně diverzifikováni. Morfometrické analýzy ukazují na značnou morfologickou variabilitu, ta ale nejeví žádnou souvislost s fylogenetickou pozicí jednotlivých linií (Nemjová, 2009).

Druhový i rodový koncept v rámci třídy Trebouxiophyceae je v současné době, jak je patrné z uvedených příkladů, značně nejednotný. Morfologické charakteristiky se mohou ukázat jako nedostatečné či nejednoznačné (Hoshina et al., 2010) a ani molekulární či jiné metody mnohdy neposkytují jasné odpovědi. Proto zatím nebyl nalezen přístup ke klasifikaci rodů a druhů univerzálně vhodný pro všechny skupiny.

5.4.3. Taxonomické posouzení linie „Palma“

Příbuznost linie „Palma“ a rodu *Asterochloris* byla potvrzena fylogenetickými analýzami na základě dvou jaderných (ITS, 18S) a jednoho chloroplastového (rbcL) molekulárního markeru. Podle všech těchto analýz se jedná o sesterskou linii (Obrázek 6, Obrázek 11, Obrázek 12).

Otázky vyvolává nestejná míra odlišení této linie od rodu *Asterochloris* na základě různých sekvencí. Ve fylogenetickém stromě rbcL se linie „Palma“ jeví jako nový rod, zatímco na základě 18S spíše jako dobře vymezený nový druh rodu *Asterochloris*.

Z fylogenetického stromu na základě úseku 18S vyplývá, že vzdálenost linie „Palma“ od rodu *Asterochloris* je srovnatelná se vzdálenostmi hlavních linií rodu *Trebouxia* (*T. jamesii* z linie A a *T. impressa* z linie I sensu Helms 2003). Pokud by tedy linie „Palma“ byla novým druhem rodu *Asterochloris*, nebyla by přítomnost více vzdálených linií v jednom rodu, z nichž jedna se dále dělí na množství malých druhů, výjimkou.

Rozdílná relativní délka větví stejně jako inkongruence fylogenetického stromu na základě chloroplastových a jaderných markerů, pozorovaná v rámci této práce, je poměrně častým jevem (Nyati et al., 2007; del Campo et al., 2010; Assunção et al., 2011). V extrémním případě byl řád Prasiolales na základě rbcL a 18S zařazen dokonce do rozdílných tříd (Sherwood et al., 2000).

Morfologicky jsou buňky z kultury LV18 odpovídající genotypu L1620 podobné buňkám rodu *Asterochloris* (Obrázek 10) a hluboce laločnatý chloroplast se jeví prakticky shodný s chloroplastem *Asterochloris phycobiontica*. Pozorována byla rovněž obdobná aplanosporangia obsahující velké množství aplanospor.

Při pozorování světelným mikroskopem se jeví pyrenoid jako značně odlišný, nicméně pro posouzení této struktury jsou nutná ultrastrukturní data, která v současnosti nejsou k dispozici.

Typ pyrenoidu je jak u rodu *Asterochloris*, tak u příbuzného rodu *Trebouxia* důležitým určovacím znakem jak na úrovni druhu, tak rodu (Helms, 2003; Škaloud and Peksa, 2010).

Vzhledem k tomu, že jsou fotobionti linie „Palma“ známi pouze ze čtyř stélek lišejníků z jedné lokality, lze těžko posoudit např. jejich ekologické charakteristiky, které by je mohly odlišit od rodu *Asterochloris*.

V každém případě, pro popis nového rodu nebo druhu, bude nutné provést detailnější morfologická pozorování a to i na ultrastrukturní úrovni. Velmi vhodné by bylo také nalézt další zástupce linie „Palma“ na jiných lokalitách.

6. Závěr

Tato práce se jako první v tomto rozsahu zabývala fotobionty lišejníků rodu *Stereocaulon*. Ve stélkách těchto lišejníků pocházejících z různorodých lokalit a substrátů byla zaznamenána neočekávaná diverzita fotobiontů. Ta nyní zahrnuje třináct linií rodu *Asterochloris* včetně nové linie „Palma“, která je na základě ITS, 18S a rbcL sekvencí sesterská ke všem známým příslušníkům tohoto rodu, a tři linie rodu *Chloroidium* včetně jedné dosud neznámé.

Rod *Chloroidium* je široce rozšířen v mnoha terestrických i vodních prostředích, ale jeho zástupci byli dosud jako fotobionti pozorováni pouze ojediněle. V souladu s předchozími záznamy se zdá být pravděpodobné, že výskyt tohoto fotobionta určuje zvýšený obsah těžkých kovů v substrátu.

V rámci rodu *Asterochloris* nebyla kromě linie „Palma“ žádná další z vysoce statisticky podpořených linií specifická čistě pro lišejníky rodu *Stereocaulon*. Ty se ale ukázaly být selektivní vůči *A. irregularis*, ke kterému patřilo 39 % všech zkoumaných položek. Další linie obsahující fotobionty lišejníků rodu *Stereocaulon* vykazovaly různé ekologické preference: linie L upřednostňovala jako substrát půdu a u *A. phycobiontica* se potvrdil výskyt ve vysokohorských oblastech.

Na ostrově La Palma byli ve stélkách lišejníků rodu *Stereocaulon* zaznamenáni převážně fotobionti druhu *Chloroidium ellipsoideum* stejně jako na další lokalitě s vulkanickým substrátem v Tanzánii. Nicméně ani na jiných typech substrátu a ve spojení s jinými mykobionty nebyli na ostrově La Palma pozorováni zástupci žádné z běžných a celosvětově rozšířených linií rodu *Asterochloris*.

Opakovaně byl prokázán výskyt více rozdílných genotypů fotobiontů v jedné stélce, v jednom případě dokonce *Asterochloris* sp. a současně *Chloroidium ellipsoideum*.

Nízká specifita vůči fotobiontům, která byla v rámci této práce zjištěna, může zástupcům rodu *Stereocaulon* stejně jako jiným lišejníkům obývajícím extrémní rychle se měnící či nově vzniklé (např. antropogenní) prostředí, usnadňovat kolonizaci a přežití v těchto habitatech. Fotobionti rodu *Chloroidium* navíc patří mezi běžně se vyskytující aerofytické řasy, takže je jejich dostupnost snazší, než (téměř) výhradně symbioticky žijících fotobiontů. Jsou také na nové lokalitě pravděpodobně přítomni déle než lišejníky, a tak jsou již přizpůsobeni lokálnímu prostředí, např. substrátu.

Nově objevené linie „Palma“ a „*Chloroidium* 3“ budou muset být podrobeny dalšímu zkoumání předtím, než budou formálně popsány jako nové taxony. „*Chloroidium* 3“ bude popsáno

pravděpodobně jako nový druh, u linie „Palma“ zatím není jasné, zda se bude jednat o nový rod či druh rodu *Asterochloris*.

7. Seznam literatury

Ahmadjian V., 1987. Coevolution in Lichens. Annals of The New York Academy of Sciences. 503, 307-315.

Ahmadjian V., 1993. The Lichen Symbiosis., John Wiley and Sons, Inc., New York.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. Jounal of molecular biology. 215, 403-410.

Álvarez I., Wendel J.F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution. 29, 417-434.

Assunção P., Jaén-Molina R., Caujapé-Castells J., Jara A., Carmona L., Freijanes K., Mendoza H., 2011. Phylogenetic position of *Dunaliella acidophila* (Chlorophyceae) based on ITS and rbcL sequences. Journal of Applied Phycology. 24, 635-639.

Bačkor M., Peksa O., Škaloud P., Bačkorová M., 2010. Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on ITS rDNA sequences. Ecotoxicology and environmental safety. 73, 603-12.

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.

Beck A., Kasalicky T., Rambold G., 2002. Myco-photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. New Phytologist. 153, 317-326.

Beck A., 2002. Selektivität der Symbionten schwermetalltoleranter Flechten. Disertační práce. 196 pp.

Beiggi S., Piercey-Normore M.D., 2007. Evolution of ITS Ribosomal RNA Secondary Structures in Fungal and Algal Symbionts of Selected Species of *Cladonia* sect . *Cladonia*. Journal of Molecular Evolution. 64, 528-542.

Benson D. a, Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W., 2011. GenBank. Nucleic acids research. 39, D32-7.

Blaha J., Baloch E., Grube M., 2006. High photobiont diversity associated with the euryoecious lichen-forming ascomycete *Lecanora rupicola* (Lecanoraceae , Ascomycota). Biological Journal of the Linnean Society. 88, 283-293.

Calvet F., Cabrera M.C., Carracedo J.C., Mangas J., Pérez-Torrado F.J., Recio C., Travé A., 2003. Beachrocks from the island of La Palma (Canary Islands, Spain). Marine Geology. 197, 75-93.

Campbell C.S., Wright W. a, Cox M., Vining T.F., Major C.S., Arsenault M.P., 2005. Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) in *Picea* (Pinaceae): sequence divergence and structure. Molecular phylogenetics and evolution. 35, 165-85.

del Campo E.M., Casano L.M., Gasulla F., Barreno E., 2010. Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming *Trebouxia* algae. Molecular phylogenetics and evolution. 54, 437-44.

Carracedo J.C., Badiola E.R., Guillou H., de la Nuez J., Pérez-Torrado F.J., 2001. Geology and volcanology of La Palma and El Hierro , Western Canaries. Estudios Geológicos. 57, 175 - 273.

Casano L.M., del Campo E.M., García-Breijo F.J., Reig-Armiñana J., Gasulla F., Del Hoyo A., Guéra A., Barreno E., 2011. Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus competition? Environmental microbiology. 13, 806-818.

Coleman A.W., Mai J.C., 1997. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. Journal of molecular evolution. 45, 168-77.

Coleman A.W., Suarez A., Goff L.J., 1994. Molecular delineation of species and syngens in volvocean green algae (Chlorophyta). Journal of Phycology. 30, 80-90.

Coleman A.W., 2000. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. Protist. 151, 1-9.

Coleman A.W., 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. Trends in genetics : TIG. 19, 370-5.

Coleman A.W., 2007. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. Nucleic acids research. 35, 3322-9.

Cordeiro L.M.C., Reis R. a, Cruz L.M., Stocker-Wörgötter E., Grube M., Iacomini M., 2005. Molecular studies of photobionts of selected lichens from the coastal vegetation of Brazil. FEMS microbiology ecology. 54, 381-90.

Cubero O.F., Crespo A., Fatehi J., Bridge P.D., 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. Plant Systematics and Evolution. 216, 243-249.

Cutler N.A., Belyea L.R., Dugmore A.J., 2008. Spatial patterns of microsite colonisation on two young lava flows on Mount Hekla, Iceland. Journal of Vegetation Science. 19, 277-286.

Darienko T., Gustavs L., Mudimu O., Menendez C.R., Schumann R., Karsten U., Friedl T., Pröschold T., 2010. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). European Journal of Phycology. 45, 79-95.

Darty K., Denise A., Ponty Y., 2009. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. Bioinformatics. 25, 1974-1975.

Dimond J.L., Bingham B.L., Muller-Parker G., Wuesthoff K., Francis L., 2011. Seasonal stability of a flexible algal-cnidarian symbiosis in a highly variable temperate environment. Limnology and Oceanography. 56, 2233-2242.

Eliáš M., Neustupa J., Škaloud P., 2008. *Elliptochloris bilobata* var. *corticola* var. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccal green alga. Biologia. 63, 791-798.

Engelen A., Convey P., Ott S., 2010. Life history strategy of *Lepraria borealis* at an Antarctic inland site, Coal Nunatak. The Lichenologist. 42, 339-346.

Friedl T., Büdel B., 2008. Photobionts., in: Nash III T.H.(Eds.), Lichen Biology, Cambridge University Press, New York, pp. 9-26.

Friedl T., Rokitta C., 1997. Species Relationships in the Lichen Alga *Trebouxia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): Molecular Phylogenetic Analyses of Nuclear-Encoded Large Subunit rRNA Gene Sequences. Symbiosis. 23, 125-148.

Friedl T., 1995. Inferring taxonomic positionsand testing genus level assignmentsin coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.). Journal of Phycology. 31, 632–639.

Dal Grande F., Widmer I., Wagner H.H., Scheidegger C., 2012. Vertical and horizontal photobiont transmission within populations of a lichen symbiosis. Molecular ecology. 21, 3159-72.

Grasso M.F., Clocchiatti R., Carrot F., Deschamps C., Vurro F., 1999. Lichens as bioindicators in volcanic areas: Mt. Etna and Vulcano Island (Italy). Environmental Geology. 37, 207-217.

Guiry M.D., Guiry G.M., 2012. Available from http://www.algaebase.org.

Guzow-Krzemińska B., 2006. Photobiont flexibility in the lichen *Protoparmeliopsis muralis* as revealed by ITS rDNA analyses. The Lichenologist. 38, 469-476.

Hatton J., 2010. Available from http://www.esa.int/esaCP/SEM72XRJR4G_index_0.html.

Helms G., Friedl T., Rambold G., Mayrhofer H., 2001. Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. The Lichenologist. 33, 73-86.

Helms G., 2003. Taxonomy and Symbiosis in Associations of Physciaceae and *Trebouxia*. Disertační práce. 156 pp.

Hepperle D., 2004. SeqAssem© A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualisation tool for molecular sequences. .

Hoshina R., Iwataki M., Imamura N., 2010. *Chlorella variabilis* and *Micractinium reisseri* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae): Redescription of the endosymbiotic green algae of *Paramecium bursaria* (Peniculia, Oligohymenophorea) in the 120th year. Phycological Research. 58, 188-201.

Huelsenbeck J.P., Ronquist F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics (Oxford, England). 17, 754-755.

Huss V.A.R., Frank C., Hartmann E.C., Hirmer M., Kloboucek A., Seidel B.M., Wenzeler P., Kessler E., 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). Journal of Phycologynal. 35, 587-598.

Högnabba F., 2006. Molecular phylogeny of the genus *Stereocaulon* (Stereocaulaceae , lichenized ascomycetes). Mycological research. 110, 1080-1092.

Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakryś B., Szalacha E., Szymańska H., 2001. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. Journal of Phycology. 37, 443-451.

Keller A., Förster F., Müller T., Dandekar T., Schultz J., Wolf M., 2010. Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. Biology direct. 5, 4.

Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D., Huss V.A.R., Rohr T., Wolf M., 2004. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Phycologia. 43, 529-542.

Kroken S., Taylor J.W., 2000. Phylogenetic Species , Reproductive Mode, and Specificity of the Green Alga *Trebouxia* Forming Lichens with the Fungal Genus *Letharia*. Thy Bryologist. 103, 645-660.

Leliaert F., Smith D.R., Moreau H., Herron M.D., Verbruggen H., Delwiche C.F., De Clerck O., 2012. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. Critical Reviews in Plant Sciences. 31, 1-46.

Letsch M.R., Muller-Parker G., Friedl T., Lewis L. a., 2009. *Elliptochloris marina* sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), Symbiotic Green Alga of the Temperate Pacific Sea Anemones *Anthopleura xanthogrammica* and *A. elegantissima* (Anthozoa, Cnidaria). Journal of Phycology. 45, 1127-1135.

Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L., 2010. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Plant biology (Stuttgart, Germany). 12, 545-53.

Lücking R., Lawrey J.D., Sikaroodi M., Gillevet P.M., Chaves J.L., Sipman H.J.M., Bungartz F., 2009. Do lichens domesticate photobionts like farmers domesticate crops? Evidence from a previously unrecognized lineage of filamentous cyanobacteria. American journal of botany. 96, 1409-18.

Mai J.C., Coleman A.W., 1997. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. Journal of molecular evolution. 44, 258-71.

Marini L., Nascimbene J., Nimis P.L., 2011. Science of the Total Environment Large-scale patterns of epiphytic lichen species richness: Photobiont-dependent response to climate and forest structure. Science of the Total Environment, The. 409, 4381-4386.

Marshall A.T., 1996. Calcification in Hermatypic and Ahermatypic Corals. Science. 271, 637-639.

Mayr E., 1970. Population, Species, and Evolution: An Abridgment of Animal Species and Evolution., Harvard University Press, Cambridge, MA, U.S.A.,

Muggia L., Zellnig G., Rabensteiner J., Grube M., 2010. Morphological and phylogenetic study of algal partners associated with the lichen-forming fungus *Tephromela atra* from the Mediterranean region. Symbiosis. 51, 149-160.

Mukhtar A., Garty J., Galun M., 1994. Does the lichen alga *Trebouxia* occur free-living in nature: further immunological evidence. Symbiosis. 17, 247-253.

Myllys L., Högnabba F., Lohtander K., Thell A., Stenroos S., Hyvönen J., 2005. Phylogenetic Relationships of Stereocaulaceae Based on Simultaneous Analysis of Beta-Tubulin, GAPDH and SSU rDNA Sequences. Taxon. 54, 605-618.

Müller T., Philippi N., Dandekar T., Schultz J., Wolf M., 2007. Distinguishing species. RNA. 13, 1469-72.

Nash III T.H., 2008. Introduction., Lichen Biology, Cambridge University Press, New York, pp. 1-8.

Nelsen M.P., Gargas A., 2006. Actin type I introns offer potential for increasing phylogenetic resolution in *Asterochloris* (Chlorophyta: Trebouxiophyceae). The Lichenologist. 38, 435-440.

Nelsen M.P., Gargas A., 2008. Dissociation and horizontal transmission of codispersing lichen symbionts in the genus *Lepraria* (Lecanorales: Stereocaulaceae). The New phytologist. 177, 264-275.

Nelsen M.P., Plata E.R., Andrew C.J., Lücking R., Lumbsch H.T., 2011. Phylogenetic Diversity of Trentepohlialean Algae Associated with Lichen-Forming Fungi. Journal of Phycology. 47, 282-290.

Nemjová K., 2009. Molekulárna fylogenetika a geometrická morfometrika aerofytických zelených rias komplexu Coccomyxa/Pseudococcomyxa s.l. Diplomová práce. 87 pp.

Neustupa J., Eliáš M., Škaloud P., Němcová Y., Šejnohová L., 2011. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga. Phycologia. 50, 57-66.

Nyati S., Beck A., Honegger R., 2007. Fine structure and phylogeny of green algal photobionts in the microfilamentous genus *Psoroglaena* (Verrucariaceae, lichen-forming ascomycetes). Plant biology (Stuttgart, Germany). 9, 390-9.

Nylander J.A.A., 2004. MrModeltest v2. http://www.abc.se/~nylander/mrmodeltest2 .

Paracer S., Ahmadjian V., 2000. Symbiosis: An Introduction to Biological Associations., Oxford University Press, Inc., New York.

Paudel B., Bhattarai H.D., Lee J.S., Hong S.G., Shin H.W., Yim J.H., 2008. Antibacterial potential of Antarctic lichens against human pathogenic Gram-positive bacteria. Phytotherapy research. 22, 1269-1271.

Peksa O., Škaloud P., 2008. Changes in chloroplast structure in lichenized algae. Symbiosis. 46, 153-160.

Peksa O., Škaloud P., 2011. Do photobionts influence the ecology of lichens? A case study of environmental preferences in symbiotic green alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae). Molecular ecology. 20, 3936-48.

Piercey-Normore M.D., DePriest P.T., 2001. Algal Switching among Lichen Symbioses. American Journal of Botany. 88, 1490-1498.

Piercey-Normore M.D., 2009. Vegetatively reproducing fungi in three genera of the Parmeliaceae share divergent algal partners. The Bryologist. 112, 773-785.

Rambold G., Friedl T., Beck A., 1998. Photobionts in Lichens: Possible Indicators of Phylogenetic Relationships? Bryologist, The. 101, 392-397.

Romeike J., Friedl T., Helms G., Ott S., 2002. Genetic Diversity of Algal and Fungal Partners in Four Species of *Umbilicaria* (Lichenized Ascomycetes) Along a Transect of the Antarctic Peninsula. Molecular Biology. 19, 1209-1217.

Seibel P.N., Müller T., Dandekar T., Schultz J., Wolf M., 2006. 4SALE--a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. BMC bioinformatics. 7, .

Senousy H.H., Beakes G.W., Hack E., 2004. Phylogenetic Placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) and *Botryococcus sudeticus* Isolate Utex 2629 (Chlorophyceae). Journal of Phycology. 40, 412-423.

Seo C., Sohn J.H., Park S.M., Yim J.H., Lee H.K., Oh H., 2008. Usimines A-C, bioactive usnic acid derivatives from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. Journal of natural products. 71, 710-2.

Sherwood A.R., Garbary D.J., Sheath R.G., 2000. Assessing the phylogenetic position of the Prasiolales (Chlorophyta) using rbcL and 18S rRNA gene sequence data. Phycologia. 39, 139-146.

Stretch R.., Viles H.., 2002. The nature and rate of weathering by lichens on lava flows on Lanzarote. Geomorphology. 47, 87-94.

Swofford D.L., 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). .

Škaloud P., Peksa O., 2008. Comparative study of chloroplast morphology and ontogeny in *Asterochloris* (Trebouxiophyceae , Chlorophyta). Biologia. 63, 873-880.

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

Škaloud P., 2008. Polyphasic approaches in the taxonomy of green aerophytic algae. Disertační práce. 113 pp.

Škaloud P., 2012. Nepublikováno.

Řídká T., 2012. Biogeografie a specifita fotobiontů rodu *Asterochloris*. Diplomová práce. 63 pp.

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.

Thüs H., Muggia L., Pérez-Ortega S., Favero-Longo S.E., Joneson S., Brien H.O., Nelsen M.P., Grube M., Friedl T., Brodie J., Andrew C.J., Lutzoni F., Gueidan C., 2011. Revisiting photobiont diversity in the lichen family Verrucariaceae (Ascomycota). European Journal of Phycology. 46, 399-415.

Trémouillaux-Guiller J., Huss V.A.R., 2007. A cryptic intracellular green alga in *Ginkgo biloba*: ribosomal DNA markers reveal worldwide distribution. Planta. 226, 553-7.

Tschermak-Woess E., 1948. Über wenig bekannte und neue Flechtengonidien. I. *Chlorella ellipsoidea* Gerneck, als neue Flechtenalge. Österreichische botanische Zeitschrift. 95, 341-343.

Tschermak-Woess E., 1978. Über den *Chlorella-Phycobionten* von *Trapelia coarctata*. Plant Systematics and Evolution. 130, 253-263.

Tschermak-Woess E., 1980. *Asterochloris phycobiontica*, gen. at spec. nov., der Phycobiont der Flechte *Varicellaria carneonivea*. Plant systematics and evolution. 135, 279-294.

Tschermak-Woess E., 1988a. The algal partner., in: Galun M.(Eds.), CRC Handbook of Lichenology, CRC Press, Inc., pp. 39-92.

Tschermak-Woess E., 1988b. New and known taxa of *Chlorella* (Chlorophyceae): Occurrence as lichen phycobionts and observations on living dictyosomes. Plant Systematics and Evolution. 159, 123-139.

Tschermak-Woess E., 1989. Developmental studies in trebouxioid algae and taxonomical consequences. Plant Systematics and Evolution. 164, 161-195.

Werth S., Scheidegger C., 2012. Congruent Genetic Structure in the Lichen-Forming Fungus *Lobaria pulmonaria* and Its Green-Algal Photobiont. Molecular Plant-Microbe Interactions. 25, 220-230.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics., in: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.(Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

Wiemers M., Keller A., Wolf M., 2009. ITS2 secondary structure improves phylogeny estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatus). BMC evolutionary biology. 9, 300.

Wilson Z.E., Brimble M. a., 2009. Molecules derived from the extremes of life. Natural Product Reports. 26, 44.

Wolf M., Achtziger M., Schultz J., Dandekar T., Müller T., 2005. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. RNA (New York, N.Y.). 11, 1616-1623.

Xian-Zhao K., Shan-Shan W., Xin D., Xiao-Quan W., 2007. Structural evolution of nrDNA ITS in Pinaceae and its phylogenetic implications. Molecular phylogenetics and evolution. 44, 765-77.

Yahr R., Vilgalys R., DePriest P.T., 2006. Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. The New phytologist. 171, 847-60.

Yahr R., Vilgalys R., Depriest P.T., 2004. Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia lichens*. Molecular ecology. 13, 3367-3378.

Zuker M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research. 31, 3406-3415.

Zwickl D.J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. .

8. Přílohy

1. Tabulka sekvencí fotobiontů získaných v rámci této práce

2. Tabulka publikovaných sekvencí rodu *Asterochloris* zahrnutých do fylogenetických analýz

3. Tabulka publikovaných sekvencí rodu *Chloroidium* zahrnutých do fylogenetických analýz

4. Geologická mapa ostrova La Palma (Carracedo et al., 2001)