

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Bc. Heda Křížková

Diverzita řas z červeného sněhu v Evropě: kombinace molekulárních a morfologických dat

The diversity of algae from red snow in Europe:
combination of molecular and morphological data

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Linda Nedbalová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Lenka Procházková

Praha, 2017

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 dne 2. 5. 2017

Podpis

Poděkování

Mé největší poděkování patří Lindě Nedbalové za vedení práce a maximální trpělivost, a Lence Procházkové, protože bez jejích rad, vědomostí a pomoci by tato práce neměla šanci vzniknout. Na mé práci mají také podíl přátelé a kolegové Tadeáš Gregor, Jan Smyčka, Jakub Žárský a Dan Vondrák, kteří mi ze svých cest ve Slovinsku, v Rumunsku, na Špicberkách a v Turecku dovezli vzorek cenného materiálu sněžných řas z daných lokalit.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, Josefu Kubištovi a rodině Kubištů za jejich důvěru a motivaci. V souvislosti s řešením nemalých technických problémů děkuji bratrovi Vojtovi Křížkovi, který zachránil cenná data této práce.

Abstrakt

Ve sněhu se vyskytuje mnoho mikroorganismů. Patří mezi ně i psychrofilní sněžné řasy z řádu Chlamydomonadales (Chlorophyta), které se přizpůsobily extrémním podmínkám v tomto habitatu a tvoří tzv. barevné sněhy. Druh *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille je považován za kosmopolitního původce červeného sněhu, který se vyskytuje během letního období ve vysokohorských a polárních oblastech. Ve vzorcích můžeme pozorovat červené kulovité buňky bez bičíků a bez jasných morfologických znaků použitelných pro determinaci. Dosud neexistuje laboratorní kultura a životní cyklus tohoto druhu není vyjasněný. Navíc se ukazuje, že červené zbarvení sněhu způsobuje více druhů dříve určovaných jako *Chlamydomonas nivalis*.

Cílem této práce bylo odebrat vzorky červeného sněhu v rámci Evropy, popsat variabilitu v morfologii sněžných řas typu *Chlamydomonas nivalis* v závislosti na lokalitě, pokusit se vyizolovat laboratorní kulturu původce červeného sněhu a popsat jeho postavení a rozšíření na základě fylogenetických analýz kultur i terénních vzorků.

Podařilo se získat vzorky červeně zbarveného sněhu z 30 evropských lokalit ve slovinských Alpách, Rumunsku, Dolomitech, Ötztalských, Walliských a Sarntalských Alpách, Vysokých Taurách, v masivu Ortleru, v Norsku, Turecku a na Svalbardu. Pomocí světelné a skenovací elektronové mikroskopie byly popsány morfologické charakteristiky buněk, které byly závislé na lokalitě původu.

Ze vzorku nasbíraného v Ötztalských Alpách byla vyizolována laboratorní kultura *Chlamydomonas* cf. *nivalis*. Na základě analýzy 18S rDNA je tato kultura součástí monofyletické skupiny, která obsahuje dosud publikované sekvence *Chlamydomonas nivalis* z terénních vzorků pocházející především ze Svalbardu. Další nově vyizolované kultury zelených řas patří do tříd Chlorophyceae a Trebouxiophyceae a jedná se pravděpodobně ve většině případů o druhy, pro které není sníh původním prostředím.

Z terénních vzorků nasbíraných v rámci této práce se podařilo z 9 lokalit osekvenovat úsek ITS2. Na základě porovnání sekundární struktury ITS2 jediné existující sekvence *Chlamydomonas nivalis* z Alp a nově získaných sekvencí bylo potvrzeno, že tento druh je původcem červeného sněhu v řadě evropských pohoří. Pozorovaná morfologická variabilita nepohyblivých buněk je tedy v těchto případech pravděpodobně dána odlišnými podmínkami prostředí.

Klíčová slova: sněžné řasy, červený sníh, *Chlamydomonas nivalis*, extrémní prostředí, 18S rDNA, ITS2, fylogeneze, morfologie

Abstract

We can find a lot of microorganisms living in snow including psychrophilic snow algae from the order Chlamydomonadales (Chlorophyta). They are adapted to the extreme conditions in this habitat and can cause the phenomenon of coloured snow. The species *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille is the most commonly associated with red snow in alpine and polar regions during summer season worldwide. In the field material, we can find red spherical cells without flagella and any morphological characteristics suitable for species determination. Until now, this species has not been isolated into laboratory culture and its life cycle is unclear. Furthermore it has been shown that red coloured snow can be caused by more species which used to be determined as *Chlamydomonas nivalis*.

The aim of this study was to collect samples of red snow from different parts of Europe, to describe the morphological variability of *Chlamydomonas nivalis*-like snow algae in relation to region of origin, to try to isolate laboratory strain of this species and to describe its position and distribution by phylogenetic analysis of laboratory strains and field samples.

Red snow samples were collected from 30 European localities in Slovenian Alps, Romania, Dolomites, Ötztal, Wallis and Sarntal Alps, High Tauern, Ortler massif, in Norway, Turkey and in Svalbard. Using light and scanning electron microscopy, morphological characteristics of cells were described and they were shown to be dependent on the locality of origin.

From a sample collected in Ötztal Alps, a laboratory strain of *Chlamydomonas* cf. *nivalis* was successfully cultivated. Based on analysis of 18S rDNA, this strain belong to the monophyletic group containing sequences of *Chlamydomonas nivalis* published up to now, which originate from field samples mainly from Svalbard. Other cultivated green algae strains are part of the families Chlorophyceae and Trebouxiophyceae and in most cases snow is probably not the original environment of these species.

From the collected field samples, ITS2 region of samples from 9 localities was sequenced. The comparison of the ITS2 secondary structure of the newly sequenced samples with the only known sequence of *Chlamydomonas nivalis* from the Alps revealed that this species is associated with red snow in many European mountain regions. The morphological variability of immotile cells observed is thus probably caused, at least in a part of the samples, by differences in environmental conditions.

Key words: snow algae, red snow, *Chlamydomonas nivalis*, extreme environment, 18S rDNA, ITS2, phylogeny, morphology

Obsah

1	Úvod.....	8
1.1	Cíle práce.....	9
2	Literární přehled	10
2.1	Výskyt sněžných řas, jejich zdroje a šíření	10
2.1.1	Výskyt sněžných řas	10
2.1.2	Zdroje a šíření	12
2.2	Prizpůsobení sněžných řas k životu v extrémních podmínkách.....	13
2.2.1	Teplota.....	13
2.2.2	Nedostatek vody a osmotický stres.....	15
2.2.3	UV záření a fotosynteticky aktivní záření (PAR)	16
2.2.3.1	Anorganické částice	16
2.2.3.2	Syntéza ochranných látek	17
2.2.4	Živiny.....	20
2.3	Životní cyklus.....	21
2.3.1	Bičíkatá stádia.....	22
2.3.2	Odpočívající stádia, cysty a spory	23
2.4	Vliv sněžných řas na okolí	24
2.5	Taxonomické zařazení a fylogenetické vztahy sněžných řas	25
2.6	Přehled druhů sněžných řas způsobujících červený sníh a jejich rozšíření.....	28
3	Materiál a metody	33
3.1	Terénní odběr vzorků, jejich transport a uchování	33
3.2	Kultivace	36
3.3	Optická mikroskopie a fotografická dokumentace.....	36
3.4	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	37
3.5	Statistické zpracování morfologických dat	38
3.6	Analýza DNA	39
3.6.1	Příprava a izolace DNA	39
3.6.1.1	Terénní vzorky	39
3.6.1.2	Laboratorní kultury	39
3.6.2	Amplifikace 18S rDNA	40
3.6.3	Amplifikace úseku ITS2 rDNA	42
3.6.4	Elektroforéza a vyhodnocení vzorků	43

	3.6.5	Fylogenetická analýza.....	43
	3.6.6	Sekundární struktura ITS2 rDNA	45
4		Výsledky	46
	4.1	Charakteristika lokalit	46
	4.2	Morfologie buněk z terénních vzorků	48
	4.3	Laboratorní kmeny	55
	4.3.1	Kultivace a morfologie buněk.....	55
	4.3.2	Fylogenetická analýza.....	59
	4.4	Sekundární struktura ITS2 z terénních vzorků.....	62
5		Diskuze	64
	5.1	Charakteristika lokalit	64
	5.2	Morfologie buněk z terénních vzorků	65
	5.3	Laboratorní kmeny	69
	5.3.1	Kultura druhu <i>Chlamydomonas cf. nivalis</i>	69
	5.3.2	Ostatní kultury	71
	5.4	Sekundární struktura ITS2 z terénních vzorků.....	74
6		Závěr	77
7		Seznam použité literatury	78
8		Přílohy.....	87

1 Úvod

I když se zdá, že sníh a led jsou nehostinnými habitaty, řada organismů se jim zvládla přizpůsobit včetně sněžných řas. Jedná se o skupinu zahrnující fotosyntetizující mikroorganismy, které obývají polární a vysokohorské oblasti po celém světě a způsobují vegetační zbarvení sněhu. Většina těchto kryobiontů, tedy organismů, které mají optimální životní podmínky v prostředí sněhu a ledu, jsou zelené řasy z tříd Chlorophyceae, Trebouxiophyceae a Zygnematophyceae. Méně často pak ve sněhu najdeme rozsivky (Bacillariophyceae), Euglenophyceae či obrněnky (Dinophyceae). Tzv. pravé sněžné řasy způsobují různá zbarvení sněhu od zelené přes nepřehlédnutelné červené až po hnědé či šedé. Díky své nápadnosti je červeně zbarvený sníh popisován od pradávna a do dnešní doby se stal předmětem mnoha studií. Díky nim je nyní známo, že sníh zbarvují především nepohyblivé buňky zelených řas z rodů *Chloromonas* (Cr.) a *Chlamydomonas* (Cd.) (Chlorophyceae), jejichž zbarvení je způsobeno vysokým obsahem sekundárních karotenoidů (Kol, 1966; Hoham, 1975a; Kawecka, 1986; Ling & Seppelt, 1990; Remias et al., 2005; Stibal et al., 2007; Komárek & Nedbalová, 2007; Remias et al., 2012; Lukeš et al., 2014).

Fenomén červeného sněhu byl popisován již od dob Aristotela (Hoham & Duval, 2001). První domněnky byly, že se jedná o anorganický materiál, ale už na začátku 19. století byla tato představa vyvrácena zjištěním, že se jedná o živý organismus (Ehrenberg, 1831). První podrobnější popis červeného sněhu publikoval F. Bauer v roce 1819, kdy nález z Grónska přirovnal nejprve k pylovým zrnům a poté ke rzím rodu *Uredo*, nález pojmenoval jako *Uredo nivalis* (Bauer, 1819). O pět let později C. A. Agardh uvedl, že červený sníh je způsobený řasou *Protococcus nivalis* (Ehrenberg, 1831). Konečné označení původce červeného sněhu bylo publikováno roku 1903 jako druh *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. Toto označení je platné dodnes, i když s jistými výhradami (Wille, 1903; Hoham et al., 2002; Algaebase, 2016). Především neexistuje věrohodný popis morfologie a životního cyklu tohoto druhu (Leya, 2013).

Průlomem ve studiu sněžných řas byly práce maďarské algoložky Erzsébet Kol, která shrnula druhovou diverzitu sněžných řas, jejich ekologii a popsala řasy způsobující zbarvení sněhu z různých koutů světa. Její poznatky jsou základem pro studium sněžných řas dodnes (Kol, 1966; Kol 1971). E. Kol také jako první uvedla, že červené zbarvení sněhu nezpůsobuje jen druh *Cd. nivalis*, ale nejspíše více taxonů, jsou takto označovány pouze na základě podobného vzhledu červených nepohyblivých buněk. *Cd. nivalis* je tak považován za sběrný

druh pro více taxonů (Kol, 1968). Že se jedná o rozdílné druhy obývající stejný habitat, bylo potvrzeno i pozdějšími studiemi a označení *Cd. nivalis* pro všechny tyto druhy způsobující červený sníh je chybné (Hoham et al., 2002). Původcem červeného sněhu tedy není jen *Cd. nivalis*, ale i další druhy z rodů *Chlamydomonas*, *Chloromonas* a *Chlainomonas* (Kawecka, 1986; Ling & Seppelt, 1993; Remias et al., 2005, Remias et al., 2006). Na základě analýz 18S rDNA z terénních vzorků již víme, že organismus označovaný jako *Cd. nivalis* tvoří samostatnou vývojovou větev v řádu Chlamydomonadales (Leya, 2003). Tyto vzorky však pocházejí především ze Svalbardu a není jasné, jak je tato linie rozšířena na evropských lokalitách s výskytem červeného sněhu. Červené buňky z terénních vzorků z různých lokalit jsou často velmi podobné, nicméně je pozorovaná poměrně značná variabilita ve velikosti buněk, jejich zbarvení a povrchové struktuře (Müller et al., 1998; Leya, 2003). Je tedy otázkou, zda všechny známé typy buněk patří k jednomu druhu.

1.1 Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo získat vzorky sněžných řas způsobující červený sníh z různých částí Evropy, porovnat morfologickou variabilitu buněk a pomocí analýzy DNA zjistit fylogenetické postavení nově vyizolovaných kmenů i buněk z terénních vzorků v rámci skupiny zelených řas (Chlorophyta).

Dílčí cíle:

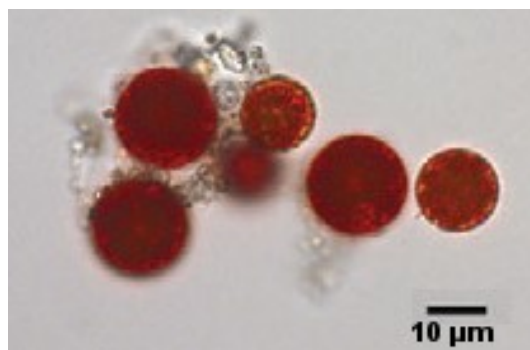
1. Na základě údajů v literatuře vyhledat obdobné lokality, kde se červený sníh může nacházet, a uskutečnit vlastní odběr vzorků.
2. Popsat morfologii buněk z terénních vzorků červeného sněhu pomocí světelné a skenovací elektronové mikroskopie a zjistit, zda existuje závislost morfologie buněk sněžných řas na lokalitě odběru vzorků.
3. Pokusit se vyizolovat laboratorní kulturu původce červeného sněhu, případně dalších doprovodných druhů zelených řas, popsat jejich morfologii a fylogenetické postavení na základě analýzy 18S rDNA.
4. Na základě analýzy sekvence ITS2 a její sekundární struktury z buněk pocházejících z terénních vzorků potvrdit či vyvrátit jejich příslušnost k nové linii řádu Chlamydomonadales, a ověřit, zda se jedná o jeden druh. To umožní zjistit, zda jsou pozorované morfologické rozdíly projevem vnitrodruhové či mezidruhové variability.

2 Literární přehled

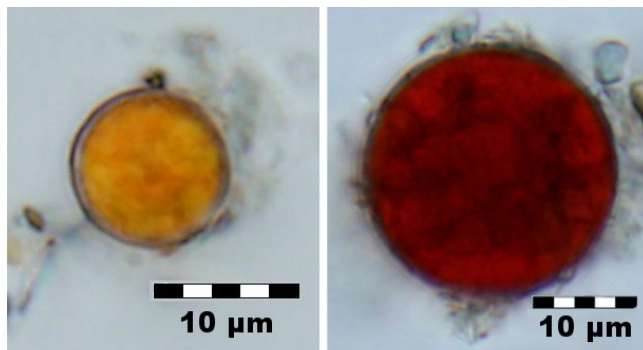
2.1 Výskyt sněžných řas, jejich zdroje a šíření

Sněžné řasy, které jsou popisovány z nálezů červeného sněhu, jsou v drtivé většině případů nepohyblivé kulaté buňky o průměru 5 až 40 μm označované jako *Chlamydomonas nivalis* (Gradinger & Nürnberg, 1996; obr. 1). Jejich barva dosahuje různých odstínů oranžové až po tmavě červenou, jak je vidět na obr. 2, což je ovlivněno stádiem životního cyklu a s tím související koncentrací ochranných sekundárních karotenoidů uvnitř buněk (Remias et al., 2005; Leya et al., 2009). Bičíkatá stadia jsou v červeném sněhu pozorována jen velmi vzácně, protože jejich výskyt je omezený na pravděpodobně velmi krátké období na začátku léta, kdy jsou pro ně vhodné podmínky (Remias et al., 2010).

Obr. 1: Červené buňky sněžných řas z okruhu *Chlamydomonas nivalis* (Remias et al., 2010a).



Obr. 2: Různě zbarvené buňky sněžných řas z okruhu *Chlamydomonas nivalis* (Kvíděrová, 2012).



2.1.1 Výskyt sněžných řas

Prostředí, kde se se sněžnými řasami setkáme, je sníh či led ve vysokých horách a polárních oblastech, kde sníh přetrvává celoročně, nebo v nižších horách, kde se sníh vyskytuje alespoň do letních měsíců např. jako v českých Krkonoších (Thomas, 1972; Remias et al. 2005; Nedbalová et al., 2008). Jedná se o extrémofilní řasy, které tvoří takzvané barevné sněhy a pro jejich výskyt je důležitá déle trvající přítomnost dostatečného množství kapalné vody (Komárek & Nedbalová, 2006). V horách a polárních oblastech jsou rozšířeny kosmopolitně. Nálezy červeně zbarveného sněhu, který způsobují sněžné řasy, jsou popisovány z hor celé Evropy včetně Svalbardu a Grónska (Kol, 1966; Remias et al., 2005; Kvíděrová, 2010; Remias et al., 2010a, Remias et al., 2010b), východní i západní části Severní Ameriky (Thomas, 1972; Hoham et al., 1993; Thomas & Duval, 1995), Austrálie a Nového Zélandu (Thomas & Broady, 1997), Asie (Yoshimura et al., 1997; Takeuchi, 2006),

Severní Afriky (Duval et al., 1999), Jižní Ameriky (Nedbalová & Sklenář, 2008), ale i z arktické oblasti (Gradinger et al., 1996; Kvíderová, 2012) a Antarktidy (Bidigare, 1993; Fujii et al., 2010).

Období, kdy se se sněžnými řasami způsobujícími červený sníh můžeme setkat, je na severní polokouli nejčastěji od května do října v ablační zóně ledovců či na odtávajících sněhových polích nad hranicí lesa (obr. 3). V horských oblastech se nejčastěji vyskytují v nadmořské výšce kolem 2000 m n. m. a výše. V případě ledovců i sněhových polí je můžeme v letních měsících pozorovat ve vodě mezi krystalkami ledu a sněhu v horní vrstvě na exponovaných místech s menším sklonem, např. v sedle či v rovné části výše položeného údolí, kde tolik nedochází k vyplavení řas stékající tající vodou. Často se kumulují v různých prohlubních, menších jezírkách vzniklých z odtávajícího sněhu či v kryokonitu, což je nahromaděný anorganický a organický materiál na povrchu ledovce, který je typický svou vysokou diversitou organismů, zejména bakterií, sinic a řas (Light & Belcher, 1968; Thomas, 1972; Wharton, 1985; Hoham, 1992; Takeuchi et al., 2001; Remias et al., 2005; vlastní pozorování).

Obr. 3: Odtávající sněhová pole v létě v horách typická pro výskyt červených sněžných řas (Spijkerman, 2012).



Celkově ale období, kdy se červené sněžné řasy v povrchové vrstvě sněhu objevují, závisí na klimatických podmínkách v daném roce (Nedbalová et al., 2008). Obecně je ve sněhu najdeme v době, kdy v něm panuje stabilní teplota kolem 0 °C a probíhá odtávání sněhu, zatímco teplota vzduchu se může v průběhu dne výrazně měnit (Kvíderová, 2010). V tuto dobu dochází ke změně fyzikálních vlastností sněhu, růstu intenzity slunečního záření a také ke změnám koncentrace živin. Všechny tyto faktory mají vliv na jednotlivá stadia životního cyklu a tím na výskyt sněžných řas v horních vrstvách sněhové pokrývky (Hoham, 1980; Hoham, 1989b). Pro ledovce obecně platí, že sněžné řasy způsobující červený sníh se nacházejí ve střední části ledovce, kde nepřibývá sněhová pokrývka a teplota neklesá pod 0 °C, dochází k tání a výskytu vody, ale zase ne v takové intenzitě jako níže v ablační zóně, aby nebyly řasy z povrchu hned odplaveny (Yoshimura et al., 1997).

2.1.2 Zdroje a šíření

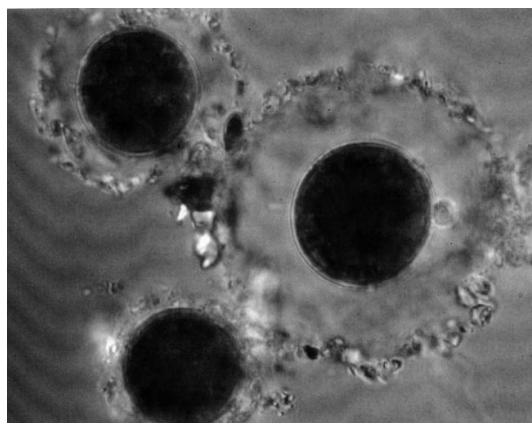
Zdrojem sněžných řas je primárně půda, ze které jsou roznášeny větrem i na dlouhé vzdálenosti nebo tající vodou stékající po povrchu ledovce či sněhového pole (Light & Belcher, 1968; Kvíderová, 2012). Spíše už sekundárním zdrojem může být kryokonit, agregát organického a anorganického materiálu s dalšími organismy, do kterého se sněžné řasy dostávají větrem nebo tající vodou. Zdrojem sněžných řas se stává, když dojde k jeho protátí sněhem, vzniku jamky a jejímu zamrznutí, na jejímž dně se kryokonit nachází, a jejím rozmrznutím následující sezónu (obr. 4). Poté může být obsah kryokonitu včetně sněžných řas dále transportován větrem a vodou. Vodou v případě, když dojde k rozrušení kryokonitové jamky a jejímu vypláchnutí na povrch ledovce (Wharton et al., 1985; Cameron et al., 2012; Lutz et al., 2014).

K šíření odolných stádií sněžných řas může docházet také prostřednictvím živočichů, například ptáků, ale i člověkem, a to na velké vzdálenosti. Buňky cyst mohou být obaleny slizovitým pouzdem (obr. 5), díky kterému lépe přilnou na povrch boty i lyže. Vzhledem k tomu, že jsou cysty velmi odolné, dokážou na lyžích přežít při pokojových teplotách do další sezóny, kdy pak mohou být přeneseny do jiného vysokohorského prostředí, kde začnou růst (Hoham et al., 1993).

Obr. 4: Kryokonitové jamky s největší koncentrací sněžných řas uvnitř a v jejich blízkosti (BizLife, 2016).

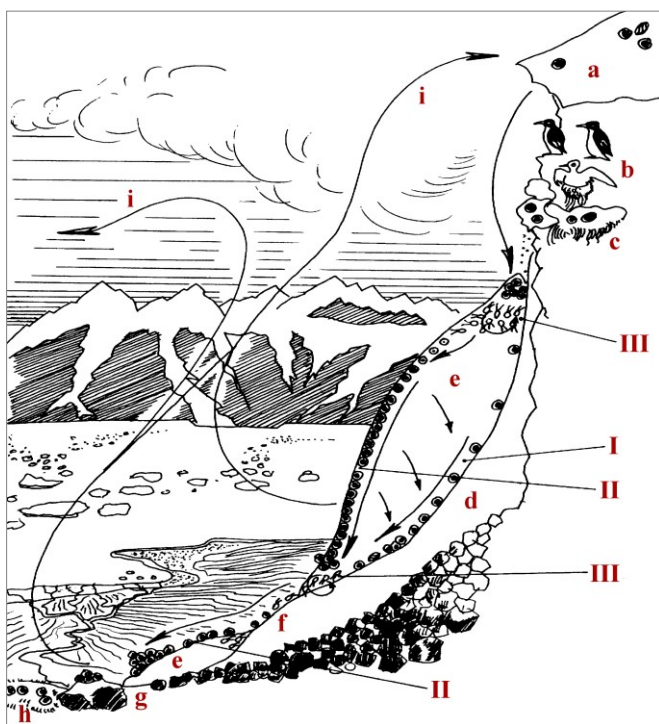


Obr. 5: Slizovitý obal buněk sněžných řas viditelný pod světelným mikroskopem (Duval et al., 1999).



Důležité je také zmínit hypotézu o možnosti cirkulace buněk sněžných řas v rámci lokality, která byla popsána z oblasti Svalbardu a je znázorněna na obr. 6. Předpokladem je, že v časném létě se odolná stadia vytvořená v předchozím roce nebo letech předtím dostanou pomocí tajícího sněhu z vyšších oblastí (a) na níže položené sněhového pole (e), kde se z odolných stádií tvoří vegetativní buňky způsobující zelené zbarvení sněhu (III). V průběhu léta se vegetativní buňky mění v odolná stadia (II) a jsou stékající vodou distribuovány dále

po sněhovém poli, kde tvoří výrazné zbarvení. Případně se buňky usadí na bázi sněhového pole (I), kde jako odolná stádia přečkají do další sezóny nebo do odtátí sněhového pole na konci léta. Buňky transportované po sněhovém poli se dostanu až na jeho hranici s půdou a skálou (e), kde vyschnou a odkud jsou pak transportovány vodou (h), větrem, případně ptactvem zpět do vyšších oblastí nebo na dlouhé vzdálenosti jinam (i). Zdrojem řas pro další sezónu je tak tento materiál (II) přenesený větrem či ptactvem anebo zmrzlá odolná stádia (I) uchovaná ve sněhu a ledu z předchozí sezóny (Müller et al., 2001).



Obr. 6: Hypotéza o možné cirkulaci sněžných řas na Svalbardu (Müller et al., 2001): I - odpočívající stádia buněk z loňské sezóny; II - odpočívající stádia buněk vzniklá v aktuálním roce; III - množící se buňky; a - výše položené sněhové pole; b - ptačí hnízdo zajišťující přísun živin; c - skála porostlá lišejníky a mechem; d - vrstva ledu; e - sněhové pole; f - obnažená ledová vrstva, po které stéká voda; g - skála s vyschlými buňkami řas; h - buňky řas odnášené stékající vodou; i - přenos buněk větrem.

2.2 Přizpůsobení sněžných řas k životu v extrémních podmínkách

Prostředí, které sněžné řasy obývají, tedy povrchová vrstva sněhu, je extrémním habitatem. Obecně ho charakterizují velmi nízké teploty, nízká koncentrace živin, střídání epizod zamrzání a tání, a vysoké a variabilní hodnoty viditelného i UV záření (Hoham & Duval, 2001; Remias et al., 2005; Kvíderová, 2010).

2.2.1 Teplota

Sněžné řasy jsou organismy schopné tolerovat nízkou teplotu prostředí, která se pohybuje kolem 0 °C během vegetační doby (Leya et al., 2009). Avšak dlouhodobé působení teplot mimo jejich teplotní optimum má za následek reverzibilní až trvalé změny v procesu syntézy ochranných látek a jejich degradaci (Lukeš et al., 2014).

Organismy žijící v chladném prostředí lze obecně rozdělit do dvou skupin dle teplotního optima jejich růstu na psychrofilní a psychrotrofní. Psychrofilní organismy mají optimální teplotu růstu 15 °C a nižší s tím, že minimální teplota růstu je 0 °C a maximální 20 °C. Oproti tomu psychrotrofní organismy mají daleko širší rozsah teplot, při kterých dokážou přežít a růst. Maximální růstové rychlosti vykazují při teplotě kolem 18 °C a jsou schopni růst i při teplotách nad 20 °C ale i 15 °C a níže. Některé druhy dokážou tolerovat i teploty pod bodem mrazu, ty lze označit jako psychrotolerantní (Morita, 1975; Zachariah & Liston, 1973; Morgan-Kiss et al., 2006). Mezi psychrofilní organismy můžeme zařadit i tzv. pravé sněžné řasy, které rostou v teplotách do 10 °C. Jejich ideální růstová teplota se často pohybuje těsně nad bodem mrazu kolem 2 °C. Zatímco sněžné řasy, které mezi ty „pravé“ zařadit nelze, rostou i ve sněhu, ale v porovnání s jiným substrátem s vyššími teplotami rostou ve sněhu pomaleji. Druhy z rodů *Chlamydomonas* a *Chloromonas*, které způsobují červeně zbarvený sníh, byly vždy řazeny mezi „pravé“ sněžné řasy s optimem růstu pod 10 °C (Hoham, 1975a).

Dle posledních výzkumů vykazují některé kmeny vyizolované ze sněhu přizpůsobení metabolismu a růstu k nízkým teplotám jako psychrofilní organismy, avšak jejich maximum růstu je mezi 5–15 °C a při zvýšení teploty prostředí k 20 °C vůbec nedochází k inhibici fotosyntézy a růstu, jako se u psychrofilních organismů předpokládá. Tyto řasy doprovázející druhy způsobující červené zbarvení sněhu lze dle těchto údajů zařadit spíše jako psychrotrofní nebo také kryotolerantní organismy s dobrým přizpůsobením fotosyntetického aparátu nízkým teplotám (Lukeš et al., 2014). Některá měření fotosyntézy terénních vzorků barevného sněhu v závislosti na teplotě naznačují, že ani „pravé sněžné řasy“ nemusí být striktně psychrofilní (Remias et al., 2005; Remias et al., 2010b).

Důležitým ochranným mechanismem sněžných řas je také schopnost přestavby složení mastných kyselin. Ve vzorcích barevného sněhu z antarktického ostrova Hermit zelené bičíkaté buňky obsahovaly větší podíl nasycených mastných kyselin, zatímco v červených cystách převažovaly estery astaxanthinu a nenasycené mastné kyseliny, např. kyselina olejová. Nenasycené mastné kyseliny snižují teplotu tuhnutí, zvyšují fluiditu a tím chrání buňku před zmrznutím. Spolu s estery astaxanthinu a přítomností v cytoplazmě ve formě granulí snižují objem vody v buňce a tím potenciální tvorbu ledových krystalů (Bidigare et al., 1993). Ve složení mastných kyselin cyst často dominují mononenasycené mastné kyseliny. Ty fungují jako prekurzory pro polynenasycené mastné kyseliny a jejich obsah je také závislý na stádiu životního cyklu, například před zimním obdobím dochází k jejich akumulaci v buňkách cyst (Spijkerman et al., 2012).

Řada organismů se nízké teplotě brání syntézou kryoprotektantů. Jedná se nejčastěji o sacharidy (glukóza, fruktóza), alkoholy (glycerol, manitol) i aminokyseliny, které svou přítomností zvyšují osmolaritu, brání tvorbě ledu v buňce a zároveň stabilizují proteiny (Storey, 1997; Chattopadhyay, 2006). Zajímavé ale je, že červené sněžné řasy tuto strategii pravděpodobně nevyužívají, protože v jejich buňkách bylo detekováno minimální množství sacharidů, alkoholů a aminokyselin, které by zvyšovaly osmolaritu jejich vnitřního prostředí (Roser et al., 1992). Tuto roli přebírají právě mastné kyseliny, karotenoid astaxanthin a jeho estery (Bidigare, 1993; Remias et al., 2005; Spijkerman et al., 2012).

2.2.2 Nedostatek vody a osmotický stres

Nedostatek vody a nadbytek iontů má za následek osmotický stres buňky. Při teplotách kolem 0 °C totiž dochází k vymrzání vody ze sněhu a tvorbě krystalů, zatímco rozpuštěné ionty ze sněhu se hromadí ve vrstvičce vody mezi krystalkami ledu, kde se vyskytují i sněžné řasy. Kvůli vymrzání vody do ledových krystalků je nedostatek vody nejen ve sněhu samotném, ale také ve vzduchu, protože sníh má nízký výpar (Pomeroy & Brun, 2001; Leya et al., 2009). Proti hypertonickému prostředí tajícího sněhu se sněžné řasy brání změnou ve složení mastných kyselin. Dochází k syntéze nových lipidů, existující lipidy jsou stráveny a je upraveno množství a složení lipidů v buňce (Lu et al., 2012a). Při solném stresu dochází ke snížení množství nenasycených kyselin, jak je vidět v tabulce 1. Tím, že se poměr nenasycených kyselin k nenasyceným zvyšuje, dochází ke snížení fluidity a propustnosti membrán, takže nedochází k dehydrataci buňky vlivem osmózy (Lu et al., 2012b; Lu et al., 2012c). Je ale důležité si uvědomit, že ke změnu poměru mastných kyselin dochází v letním období, kdy sníh odtává a kdy je teplota sněhu stabilní a nedochází k výraznému poklesu teploty pod bod mrazu (Stibal et al., 2007). Podobný trend ve změně zastoupení mastných kyselin byl zjištěn i v případě snížení koncentrace živin především dusíku a fosforu (Lu et al., 2013).

Tabulka 1: Zastoupení mastných kyselin v buňkách sněžných řas před a po vystavení osmotickému stresu zvýšenou koncentrací NaCl v živném médiu po dobu 15 hodin (Lu et al., 2013c).

Mastná kyselina	Procentuální zastoupení dané MK ve vzorku	
	Kontrolní vzorek	Po působení 1.25% NaCl po dobu 15 hod.
C12:0	0.04 ± 0.010	0.08 ± 0.002
C14:0	0.40 ± 0.030	1.09 ± 0.004
C15:0	0.09 ± 0.010	0.00 ± 0.000
C16:0	20.69 ± 0.990	23.48 ± 0.020
C16:1	2.82 ± 0.110	4.56 ± 0.003
C16:2	4.95 ± 0.240	3.16 ± 0.004
C16:3	7.40 ± 0.150	4.75 ± 0.004
C18:0	1.52 ± 0.070	6.69 ± 0.010
C18:1	12.34 ± 0.760	15.87 ± 0.010
C18:2	12.03 ± 0.250	8.84 ± 0.003
C18:3	37.53 ± 2.050	31.49 ± 0.003
C20:0	0.18 ± 0.020	0.00 ± 0.000

2.2.3 UV záření a fotosynteticky aktivní záření (PAR)

Jelikož se sněžné řasy nejčastěji vyskytují ve vysokohorském nebo polárním prostředí, už samotná geografická poloha lokalit určuje vyšší intenzity UV záření, se kterými se musí organismy vypořádat oproti nižším nadmořským výškám (Grenfell et al., 1994). Také je nutné zmínit, že oproti půdě má sníh vyšší albedo, takže díky odrazu je na povrchu sněhu vyšší hodnoty UV i PAR záření. Záření, které není odraženo, je sněhem absorbováno a proniká přibližně do horních 30 cm sněhové pokrývky s tím, že nejdále proniká krátkovlnné záření, tedy UV (Pomeroy & Brun, 2001).

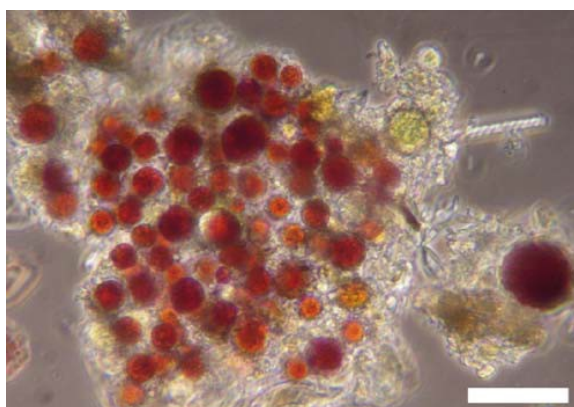
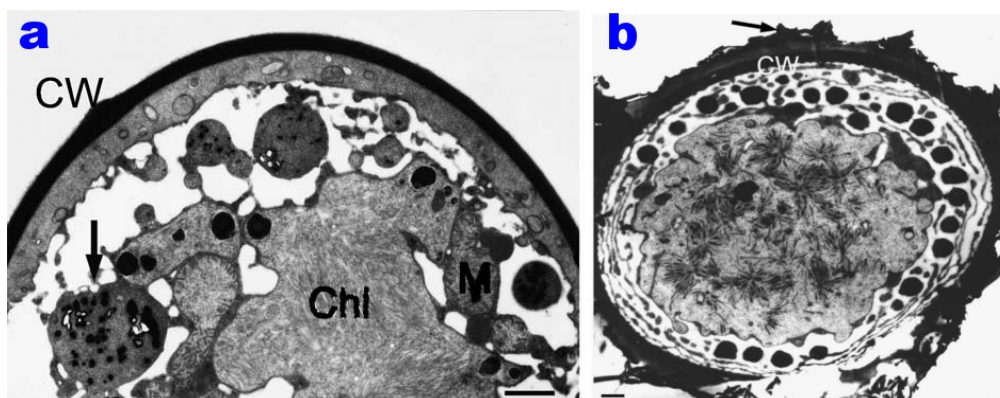
Sněžné řasy se vysokým intenzitám slunečního záření brání jednak aktivním pohybem ve sněhu pomocí bičíků, tvorbou odolných spor, ale i syntézou látek, které záření pohlcují, a látek bránící poškození fotosyntetického aparátu (Bidigare et al., 1993; Gorton & Vogelmann, 2003; Remias et al., 2005).

2.2.3.1 Anorganické částice

Jedním z prvních ochranných systémů, na které záření narazí, jsou anorganické částice na povrchu buněk. Ty tvoří nejrozumnější úlomky hornin, pylová zrna a sediment z povrchu sněhu, který se začlení do slizovité vrstvy povrchu cysty, jak je vidět na obr. 7, a buňku tak v podstatě zastíňují. Stejný princip je i v případě většího množství buněk, které tvoří shluky (obr. 8). Jednotlivé buňky se vzájemně zastíňují a tím snižují množství dopadajícího záření na jejich povrch (Light & Belcher, 1968; Remias et al., 2005; Lütz-Meindl & Lütz, 2006). Bičíkatá stadia sněžných řas mají oproti cystám tu výhodu, že se před nadměrným ozářením můžou schovat díky aktivnímu pohybu ve sloupci sněhu (Gorton et al., 2003; Kviderová,

2010) a získat tak lepší podmínky pro fotosyntézu. U buněk, které jsou na povrchu sněhu, totiž dochází kvůli příliš vysoké intenzitě PAR k fotoinhibici, a proto buňky, které jsou níže pod povrchem ve sloupci sněhu, vykazují vyšší rychlost fotosyntézy (Williams et al., 2003).

Obr. 7: Průřez buňkou sněžné řasy; a - cysta s hladkou buněčnou stěnou, b - cysta se začleněným materiálem z okolí ve slizovitém obalu kolem buňky; CW - buněčná stěna, Chl - chloroplast, M - mitochondrie (Holzinger & Lutz, 2006).



Obr. 8: Typický shluk buněk sněžných řas, které spojují slizovité obaly buněk a částice materiálu z okolí. Měřítko 50 μ m (Fujii et al., 2010).

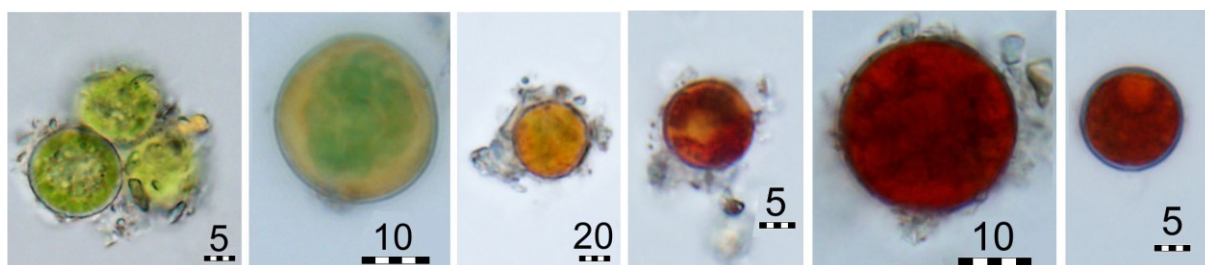
2.2.3.2 Syntéza ochranných látek

Pro sněžné řasy jsou jako ochranné látky velmi důležité karotenoidy. Jedná se o lipofilní organické látky, které jsou charakteristické uhlíkovým řetězcem s konjugovanými dvojnými vazbami, tzv. chromoforem, díky kterému jsou schopné absorbovat elektromagnetické záření nejčastěji ve viditelné nebo i v ultrafialové části spektra (Britton et al., 2004).

Dle umístění a funkce je lze rozdělit na primární a sekundární. Primární karotenoidy jsou součástí chloroplastu a přímo se účastní fotosyntézy jako pomocné pigmenty ve světlosběrných anténách a také jako ochrana fotosyntetického aparátu. Patří mezi ně karoteny či lutein. Sekundární karotenoidy bývají extraplastidiální a mají hlavně ochrannou funkci tím, že právě díky své struktuře absorbují záření v modré oblasti, které by mohlo poškodit fyziologické procesy v buňce včetně fotosyntézy. Mají také významnou roli

v deaktivaci reaktivních forem kyslíku (ROS), které při stresu z ozáření vznikají (Bidigare et al., 1993; Britton et al., 2004; Remias et al., 2005; Leya et al., 2009). Obsah sekundárních karotenoidů v buňce sněžné řasy může dosahovat až 90 % a ovlivnit výrazně barvu buňky (obr. 9). Jejich tvorba je odpovědí na extrémní podmínky prostředí jako je vysoké ozáření, nedostatek živin, oxidační stres z kyslíkových radikálů, vysoká salinita, změna pH či velké výkyvy teplot (Bidigare et al., 1993; Remias et al., 2010). Zajímavým poznatkem je, že v případě zvýšení působení UV záření dochází k zvýšené tvorbě sekundárních karotenoidů kvůli ochraně buňky, ale zároveň dochází k útlumu fotosyntézy. Zvyšuje se poměr karotenoidů ke chlorofylům a nastává tak „trade-off“ mezi ochranou proti UV záření na úkor fotosyntetické aktivity (Remias et al., 2010; Lutz et al., 2014).

Obr. 9: Nepohyblivé buňky Chlamydomonas cf. nivalis lišící se obsahem sekundárních karotenoidů. Červené buňky obsahují sekundárních karotenoidů nejvíce. Měřítko uvedeno v μm (Kvíděrová, 2012).

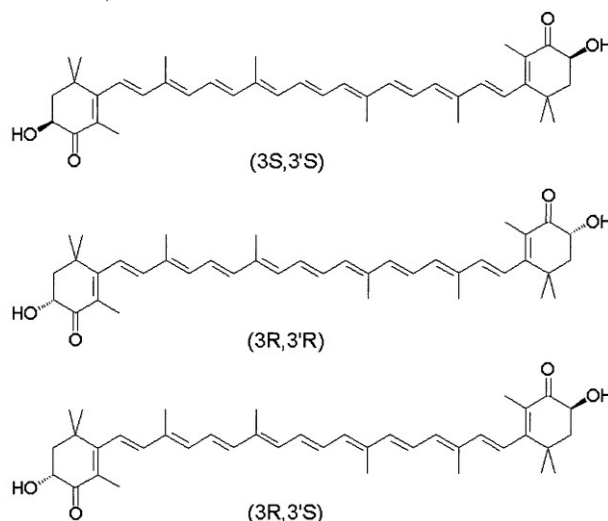


Astaxanthin

Nejčastějším sekundárním karotenoidem ve sněžných řasách, který zároveň způsobuje charakteristické červené zbarvení sněhu, je xantofyl astaxanthin (Bidigare et al., 1993; Gorton et al., 2003). Stejně jako stovky jiných karotenoidů i molekula astaxanthinu je optickým izomerem a existuje jako izomer 3R,3'R a 3S,3'S nebo jako přechodná forma mesoastaxanthin 3R,3'S a 3S,3'R (obr. 10). Astaxanthin z přírodních zdrojů se nejčastěji vyskytuje jako izomer 3S,3'S (Britton et al., 2004) a ve stejné formě bývá i ve sněžných řasách. Zajímavou výjimkou je ale nález červeného sněhu z bulharského Pirinu, který vykazoval jiný poměr izomerů astaxanthinu ve vzorku, než je obvyklé, a ve vzorku byl ve velkém poměru přítomný také izomer astaxanthinu 3R,3'R. Tato odlišnost může být zapříčiněna ekologickými faktory, ale může také souviset s fylogenetickým původem jednotlivých kmenů (Řezanka et al., 2013).

Astaxanthin je ve sněžných řasách nejčastěji přítomný ve formě derivátů např. diesteru, který vzniká esterifikací astaxanthinu mastnými kyselinami, převážně nenasycenými. V této formě se astaxanthin nachází především v odpočívajících stádiích (cystách) sněžných řas, kde je uložený v lipidických globulích v cytoplazmě (Bidigare et al., 1993; Řezanka et al., 2008).

Obr. 10: Izomery astaxanthinu (EspaceNet, 2016).



Mykosporinové aminokyseliny (MAA's)

Řada organismů včetně jednobuněčných zelených řas produkuje sekundární metabolity tzv. mycosporine-like amino acids, které je chrání proti UV záření (Xiong et al., 1999). Jedná se o nízkomolekulární ve vodě rozpustné látky se strukturou chromoforu, podobně jako u karotenoidů, díky které absorbují elektromagnetické záření v rozmezí 309 až 360 nm (Laurion et al., 2002). Kromě absorpce záření díky své chemické struktuře mají i další vlastnosti podobné karotenoidům, např. ochrana buňky proti kyslíkovým radikálům, součást světlosběrné antény pro maximální využití světla při fotosyntéze, syntéza při osmotickém či teplotním stresu (Oren & Gunde-Cimerman, 2007). Při bližším zkoumání však nebyl prokázán obsah MAAs v červených cystách sněžné řasy *Cd. nivalis* (Sommaruga & Garcia-Pichel, 1999). Nejbližší třídou zelených řas, kde byly MAAs detekovatelné je třída Trebouxiophyceae, ale obecně se v rámci skupiny Chlamydomonadales zřejmě nevyskytují. Tuto roli tak u sněžných řas kompenzují karotenoidy (Karsten et al., 2005; Remias et al., 2010).

Ostatní látky

Na nadměrné UV záření reagují sněžné řasy také zvýšenou tvorbou fenolických látek, aminokyseliny prolinu a vitamínu E. Všechny tyto látky mají společnou vlastnost a to, že fungují jako antioxidanty a jsou schopné zachytávat volné radikály, které při nadměrném ozáření v buňce vznikají (Duval et al., 2000; Alia et al., 2001; Remias et al., 2005). Bylo zjištěno, že UV záření, UVA i UVC, stimuluje v cystách červených sněžných řas tvorbu fenolických látek a samotné UVC záření pak tvorbu prolinu (Duval et al., 2000).

Vitamin E neboli α -tokoferol byl v dvojnásobném množství přítomen v mladých ještě zelených cystách oproti starším, u nichž je nižší obsah vitamínu E vyvážen zase větším množstvím sekundárních karotenoidů, kterých má mladší buňka naopak méně. To ukazuje na to, že buňky sněžných řas nemají jen jednu strategii ochrany proti nadměrnému záření, ale že se způsob ochrany mění v průběhu životního cyklu (Remias et al., 2005).

2.2.4 Živiny

Obecně je sníh prostředím s velmi nízkou koncentrací živin (Thomas, 1972), množství živin je tak klíčové pro výskyt sněžných řas a často určuje jejich nerovnoměrný a náhodný výskyt na povrchu sněhu, protože jejich výskyt a růst s ním koreluje (Williams et al., 2003).

Nejčastějšími zdroji živin na sněhu jsou ptačí kolonie u sněžných polí (zejména v polárních oblastech; Müller et al., 2001), materiál přenesený z okolí větrem a stékající vodou z tajícího sněhu (Newton, 1982; Stibal et al., 2012), úlomky hornin (Hoham, 1989a), opad z okolní vegetace (Kawecka, 1986) a okraje sněhových polí v kontaktu s půdou (Kvíděrová, 2010). Důležitým zdrojem živin jsou také aerosoly obsahující částičky půd bohaté na minerály obsahující fosfor, síru, draslík, křemík, vápník, hořčík, ale i mořskou sůl či saze vzniklé antropogenní činností a částičky organické hmoty s větrem transportovanými bakteriemi. Minerály z aerosolů byly nalezeny v biofilmu buněk sněžných řas, kde slouží jako zdroj živin v nehostinném prostředí, zatímco sůl a saze zase pomáhají snížit teplotu mrazu a tím ochránit buněčné struktury (Tazaki et al., 1994). Množství živin a hlavně makrobiogenních prvků, jako je dusík a fosfor, určuje nejen výskyt sněžných řas, ale také jejich druhové složení. Například oligotrofním sněhovým polím dominují červené cysty druhu *Cd. nivalis* a ostatní jemu podobné, zatímco v místech, kde jsou například hnízdiště tučňáků a díky nim i vysoký obsah fosforu, či na lesních lokalitách, převažují tzv. zelené sněžné řasy z rodu *Chloromonas* a *Chlamydomonas*, které ale netvoří odolné červené cysty (Komárek & Komárek, 2001).

Sněžné řasy svým růstem a vývojem jednotlivých vývojových stádií živiny ze sněhu vyčerpávají. V porovnání se sněhem bez populace sněžných řas jsou místa s jejich výskytem zhruba o 20 % chudší na výskyt živin, čímž snižují konduktivitu sněhu a zároveň zvyšují pH prostředí, protože spotřebovávají CO₂ pro fotosyntézu (Hoham 1989c; Jones, 1991; Yoshimura, 1997). Je však nutné zdůraznit, že to vše je v případě, kdy se sněžné řasy nachází ve své aktivní fázi růstu, jsou metabolicky aktivní a nedochází k nadměrnému přísunu živin a minerálů větrem či tající vodou. V tom případě pak mohou být místa se sněžnými řasami na živiny i bohatší než okolí, ale ne vlivem sněžných řas (Newton, 1982; Ling & Seppelt, 1993). V případě, že dochází k vyčerpání živin v okolí, dochází ke změně fáze životního cyklu. V buňkách sněžných řas se začnou akumulovat sekundární karotenoidy a lipidy, které fungují jako alternativní zdroj živin, a tvoří odolné červené cysty (Bidigare et al., 1993; Hoham, 1989b; Lu et al., 2013). Spolu s vysokou ozářeností jsou tak živiny důležitým faktorem, který ovlivňuje rozmístění a životní cyklus sněžných řas (Komárek & Nedbalová, 2007).

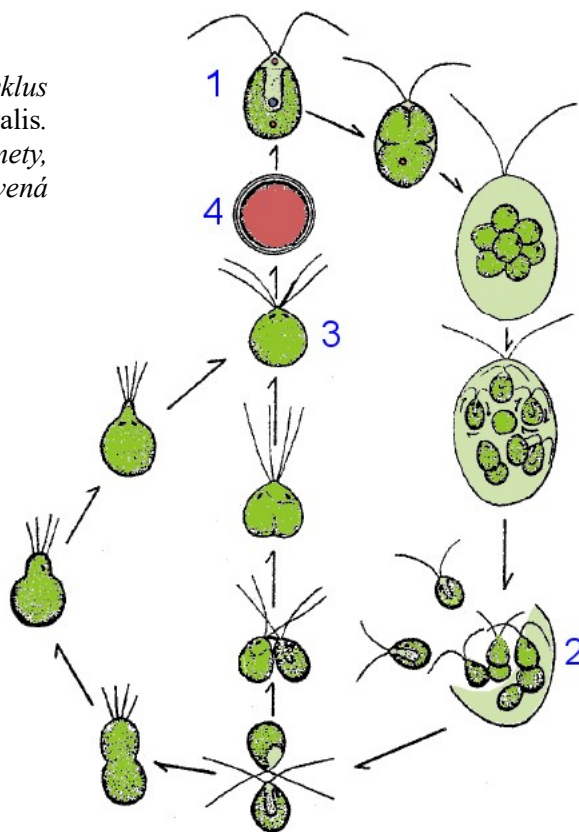
2.3 Životní cyklus

Životní cyklus sněžných řas z řádu Chlamydomonadales je poměrně složitý, což mělo dříve za následek různá pojmenování jednotlivých stádií životního cyklu jako samostatných druhů (Kol, 1968; Hoham et al., 1979; Hoham et al., 1983). Díky možnosti studia laboratorních kultur a s nástupem molekulárních metod je ale jasné, že se často jedná o jednotlivé druhy, které během svého životního cyklu projdou různými stádii, které jsou odpovědí na podmínky prostředí, např. intenzitu světla, přítomnost živin nebo okolní teplotu (Hoham, 1980; Hoham, 1989b).

Přibližně dva týdny po začátku intenzivního tání sněhové pokrývky se může objevit první zbarvení sněhu způsobené sněžnými řasami. To je doba, kdy vzrůstá intenzita slunečního záření, snižuje se výška sněhové pokrývky a dochází ke změně struktury sněhu v hutný těžký sníh s krystaly ledu a vodou mezi nimi. Všechny tyto faktory ovlivňují propustnost slunečního záření, které s letními měsíci vzrůstá a může tak proniknout až k rozhraní půdy se sněhem, nebo u trvalé sněhové pokrývky k rozhraní starého sněhu se sněhem z nové sezóny. V místě rozhraní půdy či starého sněhu s novou sněhovou pokrývkou se nachází odpočívající stadia sněžných řas. Vlivem působení pronikajícího slunečního záření, nejčastěji červeného světla s delší vlnovou délkou, přítomnosti rozpuštěných plynů ve sněhu a dostatečné koncentraci živin v tající vodě dochází k iniciaci tvorby bičíkatých buněk z odpočívajících cyst, které se pohybují roztátou vodou mezi krystaly ledu vzhůru k povrchu

sněhu (Curl et al., 1972; Hoham, 1975a; Hoham, 1989a; Hoham, 1992; Hoham, 1998). Vyčerpání živin ve sněhu v okolí buněk a vysoká intenzita slunečního záření má pak za následek tvorbu odolných buněk pohlavním či nepohlavním rozmnožováním. Tyto nepohyblivé buňky jsou schopné vydržet období vysychání, kolísající teploty vzduchu i vysokou intenzitu záření poté, co sníh odtaje (Hoham, 1989a; Hoham, 1989b). Přesný popis životního cyklu *Cd. nivalis* doposud neexistuje, ale jeho průběh je předpokládán dle nákresu na obr. 11 (Thomas, 1994).

Obr. 11: Předpokládaný životní cyklus druhu *Chlamydomonas cf. nivalis*. 1 - vegetativní bičíkatá buňka, 2 - gamety, 3 - pohyblivá zygota s bičíky, 4 - červená zygospora (Thomas, 1994; upraveno).



2.3.1 Bičíkatá stádia

Zoospory jsou haploidní dvoubičíkaté buňky, které vznikají meiotickým dělením z diploidních buněk po iniciaci slunečním zářením, které proniká sněhovou pokrývkou. Zoospory se aktivně pohybují vodou mezi krystaly ledu. Jejich distribuci ve sněhové pokrývce určuje množství živin, a hlavně sluneční záření, před jehož nadměrnou intenzitou se na rozdíl od cyst či spor mohou schovat v hlubších vrstvách sněhové pokrývky díky aktivnímu pohybu. To je také důvodem, proč bičíkatá stádia nemají takové ochranné mechanismy jako nepohyblivé buňky, např. ztlustěnou buněčnou stěnu či nahromaděné sekundární karotenoidy (Hoham et al., 1980; Gorton et al., 2003; Kvíderová, 2010). Zoospory jsou zpravidla buňky o velikosti cca 4-25 μm v závislosti na druhu a stáří, mají dva stejně dlouhé bičíky o přibližně stejné délce jako je samotná buňka. Většinu obsahu buňky vyplňuje

chloroplast, v přední části buňky se nachází dvě kontraktilní bakoaly a ve středu buňky je viditelné jádro. Jako zásobní látky slouží lipidy a škroby (Hoham et al., 1979; Hoham et al., 1998; Harris et al., 2009; Remias et al., 2010b).

Zoospory se dále dělí nepohlavně, vznikají dvě, čtyři až osm dceřiných buněk a tímto způsobem dochází k rychlému nárůstu populace zoospor, které mohou způsobovat lehce zelené zbarvení v profilu sněhové pokrývky (Hoham et al., 1979; Hoham & Duval, 2001). Zoospory se také mohou dělit na haploidní gamety (obr. 11, č. 2). Ty jsou vzhledově velice podobné zoosporám, ale v porovnání jsou velikostně menší v řádu jednotek μm . Toto dělení je většinou indukováno vyčerpáním živin, zejména dusíku, intenzitou ozáření, ale také spektrálním složením dopadajícího záření, které se mění v závislosti na denní i roční době (Hoham et al., 1998). Dále dochází k fúzi neboli syngamii dvou gamet tzv. isogamii či anisogamii. Při isogamii se párují dvě stejně velké gamety, zatímco při anisogamii dochází ke sloučení dvou nesejně velkých i tvarově odlišných gamet (Hoham et al., 1979; Hoham et al., 1998). Syngamii vzniká diploidní planozygota (obr. 11, č. 3), což je čtyřbičíkatá buňka se dvěma chloroplasty, které se brzy po syngamii sloučí v jeden. Ztrátou bičíků pak vzniká diploidní zygota, která se může dále dělit a je základem pro odolnou zygosporu (obr. 11, č. 4; Hoham et al., 1979).

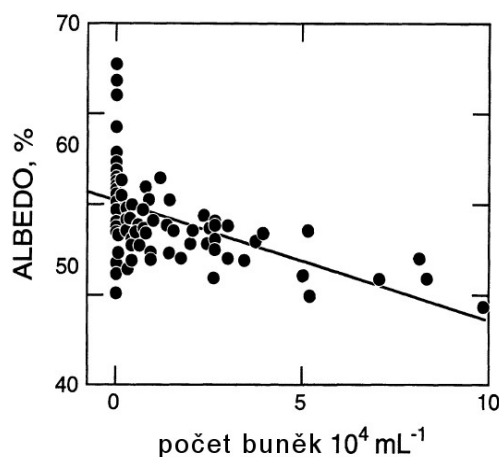
2.3.2 Odpočívající stádia, cysty a spory

Sněžné řasy většinu svého životního cyklu přetrvávají jako nepohyblivé buňky (obr. 11, č. 4), neboť jsou nejvíce odolné změnám prostředí. Cysty nebo zygospory jsou diploidní, jednobuněčná, kulatá odpočívající stádia o velikosti kolem 5–50 μm (Light & Belcher, 1968; Gradinger and Nürnberg, 1996; Fujii et al., 2010). Při jejich tvorbě hromadí zásobní látky, sacharidy a lipidy, a tvoří se sekundární karotenoidy mimo plastidy, které jsou taky důvodem, proč je u cyst vcelku složité rozeznat vnitřní struktury. Jsou totiž zakryté právě karotenoidy, nejvíce červeným astaxanthinem (Hoham et al., 1979; Remias et al., 2005). Povrch buněk bývá hladký nebo hrbolatý, buněčná stěna pak má různé výrůstky, žebra či začleněné anorganické materiály a další materiály z povrchu sněhu, které chrání buňku proti nadměrnému UV záření a zároveň jí poskytují anorganické látky v na živiny chudém prostředí jako je sníh (Lütz-Meindl & Lütz, 2006). Rozdíl ve vzhledu povrchu buněk může být způsoben fyziologickou odpovědí na podmínky prostředí nebo druhovou odlišností. Buňky jsou pokryty ještě slizovitým obalem, který často tvoří slizovité sítě spolu s bakteriemi nebo spojuje více cyst do shluků (Light & Belcher, 1968; Weiss, 1983; Gradinger and Nürnberg, 1996; Remias et al., 2010). Bakterie přidružené k cystám sněžných řas se

ve vzorcích z terénu vyskytují velmi často. Výskyt bakterií dokonce koreluje s výskytem sněžných řas. Je možné, že se jedná o mutualistické soužití obou organismů, kdy si vzájemně poskytují živiny v chudém prostředí sněhu, ale tato hypotéza nebyla zatím dostatečně potvrzena (Weiss, 1983; Hoham, 1989b; Hoham et al., 1993; Thomas, 1994). Podobně je to i s nalezenými druhy hub, které mohou být také přidruženy. Je možné, že si sněžné řasy s houbami vyměňují některé živiny, ale rozhodně se nejedná o lichenismus. Houby se do slizovitého obalu shluku cyst dostanou spíše náhodou při pohybu cysty s tající vodou po sněhu, ve kterém se tyto druhy extremofilních hub také vyskytují (Hoham et al., 1979).

2.4 Vliv sněžných řas na okolí

Sněžné řasy mají také vliv na tání sněhu a jeho celkové složení (Hoham et al., 1998). Spolu s ledovcovými řasami jsou prvními kolonizátory na povrchu sněhu a ledu, producenti uhlíku a svou přítomností ovlivňují nejen lokální procesy, ale i širší ekosystém, např. celého ledovce (Lutz et al., 2014). Svou přítomností, především v případě masivních nárostů, významně snižují albedo povrchu sněhu (obr. 12) a v případě vysoké koncentrace až o 40 %. Tím, že absorbují více slunečního záření, mají za následek, že přispívají k odtávání sněhu v místě, kde se nachází (Lutz et al., 2014; Lutz et al., 2015).



Obr. 12: Závislost albeda povrchu sněhu na koncentraci buněk sněžných řas (Thomas & Duval, 1995).

Spolu s anorganickým a organickým materiálem případně i jinými organismy mohou na povrchu ledovce tvořit kryokonit, který protává do ledovce a tvoří kryokonitovou jamku, má vysokou koncentraci živin, mikrobiální aktivitu a je tak považován za tzv. „hot spot“ diverzity a živin v oblasti ledovce. Kryokonit pohlcuje velkou část slunečního záření, tím se podílí na tání povrchu ledovce a ovlivňuje celkový stav a složení supraglaciálního ekosystému. Buňky sněžných řas bývají často spláchnuté tající vodou do kryokonitové jamky, kde jsou důležitým zdrojem organických látek v mikrobiálním společenstvu (Kohshima et al., 1993;

Hoham et al., 1998; Takeuchi et al., 2001; Hodson et al., 2008; Lutz et al., 2014). Sněžné řasy mají vliv na ekosystém, kde se vyskytují, nejen ve spojení s kryokonitem. Produkují totiž biofilm, extracelulární hmotu bohatou na sacharidy, která je v prostředí sněhu důležitým substrátem pro další organismy. Spolu s ledovcovými řasami, které dominují především ke konci letní sezóny, zatímco sněžné spíše v počátku sezóny, mohou mít významnější podíl v primární produkci více než kryokonit (Lutz et al., 2014).

Bylo prokázáno, že přítomnost sněžných řas snižuje koncentraci SO_4^- , NO_3^- a NH_4^+ ve sněhu. Navíc sněžné řasy vykazují oproti okolnímu sněhu mnohonásobně vyšší koncentraci kovů, které se ve sněhu vyskytují ve stopovém množství (Hoham, 1989a; Hoham et al., 1998).

Sněžné řasy při své fotosyntéze spotřebovávají CO_2 . Jedním zdrojem je atmosféra a dalším sníh, ze kterého se uvolňuje vlivem respirace v něm či pod ním. Důsledkem fotosyntézy řas je tedy snížení množství CO_2 uvolněného ze sněhu. Tím pádem se obrací role sněhu jak producenta CO_2 spíše v jeho místo spotřeby, a to zejména v letních měsících, kdy je růst řas na sněhu nejintenzivnější. Rozloha sněžných polí pokrytých „květem“ sněžných řas je sice poměrně malá, ale vzhledem k velikosti plochy pokryté sněhem na Zemi můžou hrát sněžné řasy relativně významnou roli v cyklu uhlíku (Williams et al., 2003).

2.5 Taxonomické zařazení a fylogenetické vztahy sněžných řas

Jak už bylo nastíněno v úvodu, červené zbarvení sněhu nezpůsobuje pouze jeden druh řas, ale více druhů zejména z rodů *Chlamydomonas* a *Chloromonas* z řádu Chlamydomonadales.

Rody *Chlamydomonas* a *Chloromonas* se dříve rozlišovaly na základě pyrenoidu. Rod *Chlamydomonas* byl určován dle chloroplastu s přítomností pyrenoidu, zatímco u rodu *Chloromonas* pyrenoid chyběl (Ettl, 1976). Na základě molekulárních dat se ale ukázalo, že toto rozdělení neodpovídá fylogenezi. Taxonomické postavení jednotlivých druhů v rámci řádu Chlamydomonadales je často nejasné a stále se rychle se vyvíjí. Je ale jasné, že rod *Chloromonas* zahrnuje druhy jak s pyrenoidem, tak bez něj, protože jej v historii opakovaně získaly a ztratily (Pröschold et al., 2001; Hoham et al., 2002).

Buchheim et al. (1997) stanovili na základě analýzy úseku 18S rDNA, že organismy označované jako rod *Chloromonas* jsou polyfyletickou skupinou a vymezil novou monofyletickou skupinu obsahující rod *Chlamydomonas* i tři druhy z rodu *Chloromonas*.

Později Pröschold et al. (2001) sekvenoval 18S rDNA řady druhů třídy Chlorophyceae, ze kterých vzešlo 18 monofyletických skupin a jednou z nich je skupina

„*Chloromonas*“, která obsahuje souhrnný taxon *Chloromonas reticulata* odpovídající skupině, kterou určil již Buchheim et al. (1997). Na základě světelné mikroskopie byl také určen společný znak pro druhy rodu *Chloromonas*, kterým je tvar chloroplastu. Rod *Chlamydomonas* má pohárkovitý chloroplast bez výběžků a perforací a zygospora má hladký povrch, zatímco rod *Chloromonas* obsahuje pohárkovitý chloroplast, který je rozvětvený či perforovaný, jeho buněčná stěna může mít papilu a povrch zygospory může být strukturovaný (Pröschold et al., 2001).

Na základě sekvenace 18S rDNA a *rbcL* Hohamem et al. (2002) bylo zjištěno, že druhy rodů z *Chloromonas* a *Chlamydomonas* obývajících prostředí sněhu spadají do skupiny *Chloromonas*, v rámci které tvoří tři podskupiny, z nichž dvě (A1, A2) jsou zobrazené na kladogramu (obr. 13), což nasvědčuje, že sněžný habitat byl v historii těmito bičíkovci osídlen přinejmenším dvakrát (Hoham et al., 2002). Později se ukázalo, že některé kultury izolované ze sněhu i terénní vzorky barevného sněhu spadají také do skupiny *Monadina*, která byla nedávno přearažena do rodu *Microglена* (Demchenko et al., 2012).

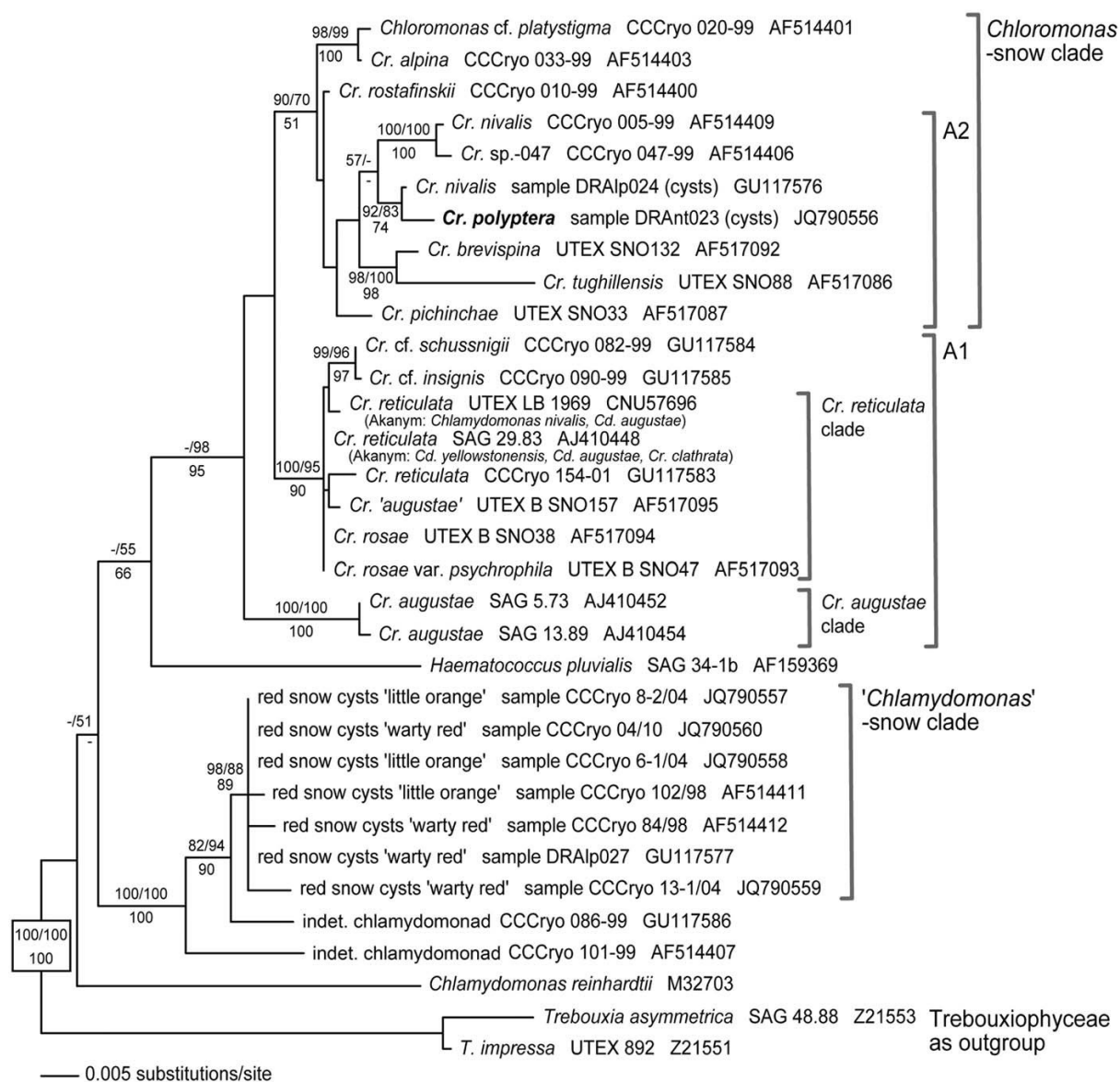
Do skupiny *Chloromonas* byl Novisem et al. (2008) začleněn další rod sněžné řasy způsobující červený sníh, kterým je *Chlainomonas*, který se ale od rodů *Chlamydomonas* a *Chloromonas* významně morfologicky liší, viz dále.

V roce 2012 Matsuzaki et al. publikovali taxonomickou revizi skupiny *Chloromonas reticulata*, kde na základě kombinace sekvencí 18S rDNA, ITS a *atpB*, *psaA*, *psaB* a morfologických dat vyčlenili čtyři druhy rodu *Chloromonas*, přičemž typové kmeny dvou druhů pocházejí ze sněhu – *Chloromonas typhlos* a *Chloromonas reticulata*. Tyto kmeny (SAG 26.86 a SAG 29.83) byly považovány za původce červeného sněhu (kmen SAG 26.86 dokonce figuroval ve sbírkách jako *Cd. nivalis*). Ukázalo se však, že se jedná o druhy, které se podaří často ze sněhu vyizolovat, ale červené sněhy nezpůsobují (Leya, 2013; Nedbalová, os. sdělení).

V současnosti tedy pravděpodobně neexistuje laboratorní kmen organismu, který označujeme jako *Cd. nivalis*, to platí též pro rod *Chlainomonas*. Z řas způsobujících červený sníh se tedy dosud podařilo kultivovat např. druh *Chloromonas nivalis*, který je ve srovnání s *Cd. nivalis* méně významný.

Molekulární data pro nepohyblivé buňky z okruhu *Cd. nivalis* jsou v současné době k dispozici pouze z malého množství terénních vzorků pocházejících především ze Svalbardu, které tvoří sesterskou skupinu k *Chloromonas* (na obr. 13 jako „*Chlamydomonas*“-snow clade).

Obr. 13: Kladogram části řádu Chlamydomonadales vytvořený na základě sekvenací úseku 18S rDNA. Označení skupin A1 a A2 je dle Hoham et al., 2002 (Remias et al., 2013).

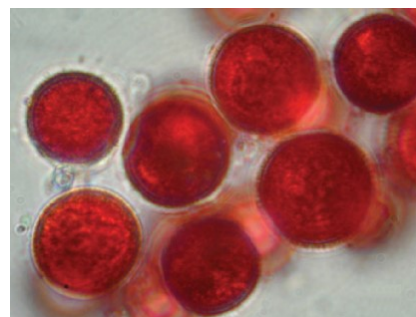


2.6 Přehled druhů sněžných řas způsobujících červený sníh a jejich rozšíření

Chlamydomonas nivalis (Bauer) Wille

Jak bylo zmíněno již v úvodu, jedná se pravděpodobně o sběrný druh pro více druhů, které vykazují stejné morfologické znaky: cysty jsou kulaté červené buňky s tenkou buněčnou stěnou, jejichž protoplast je vyplněn červeným karotenoidem astaxanthinem, který zastiňuje zelený chloroplast a další struktury buňky (obr. 14). Méně často vzorky obsahují také buňky s výrazně strukturovanou stěnou, která je někdy považována za zygosporu (Müller et al., 1998).

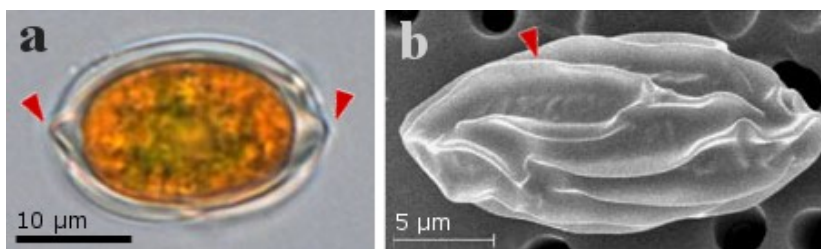
Vyskytuje se na exponovaných sněhových polích nad hranicí lesa a jeho nález byl zaznamenán z horských oblastí všech kontinentů a polárních oblastí (Kol, 1968; Remias et al., 2005).



Obr. 14: Charakteristické červené buňky cyst *Chlamydomonas nivalis* (Komárek & Nedbalová, 2006)

Chloromonas nivalis (Chodat) Hoham & Mullet

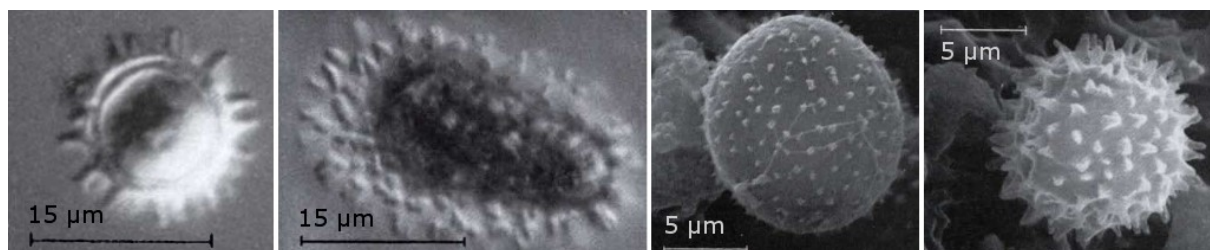
Odpočívající stádia, zygosporu, tohoto druhu byly dříve označovány jako kokální druh *Scotiella nivalis*. Způsobuje zelené, oranžové až růžové zbarvení sněhu dle obsahu sekundárních karotenoidů, spory jsou oválné buňky s papilami na koncích a výraznými žebry na svém povrchu (obr. 15 a, b). Tento druh je popisován z polárních a vysokohorských oblastí celého světa. Na základě výsledků analýz 18S rDNA se ale s největší pravděpodobností jedná o sběrný druh podobně jako je tomu u *Cd. nivalis* (Hoham & Mullet, 1978; Remias et al., 2010).



Obr. 15: Foto zygosporu *Chloromonas nivalis* ve světleném (a) a skenovacím elektronovém (b) mikroskopu. Papily (a) a žebra (b) jsou označena červenými šipkami (Remias et al., 2010).

Chloromonas brevispina (F.E.Fritsch) Hoham, Roemer & Mullet

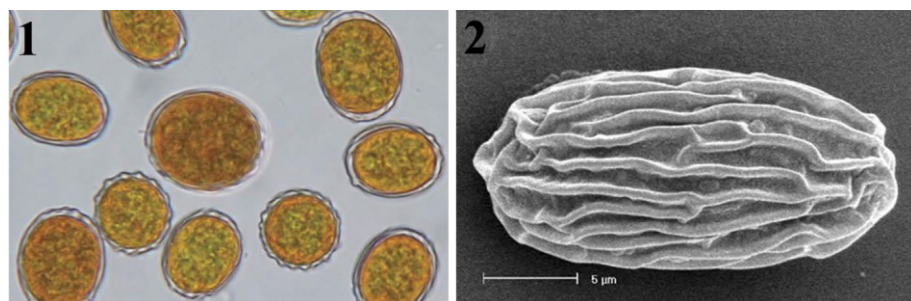
Vývojová stádia zygot tohoto druhu byly dříve chybně označovány jako *Cryocystis* Kol, *Trochiscia* Kütz, *Cryodactylon* Chod. a *Oocystis* Näg. Zygoty způsobují žluté, oranžové a růžové zbarvení sněhu. Jejich buňky jsou oválné i kulaté s charakteristickým členitým povrchem, který tvoří nápadné špičky (obr. 16; Hoham et al., 1979). Tento druh byl popsán z červeného sněhu vysokohorských oblastí USA, z Alp, Norska i Grónska (Kol, 1968; Hoham et al., 1979).



Obr. 16: Typické ostny zygot druhu *Chloromonas brevispina* ve světelném mikroskopu (první dvě zleva) a skenovacím elektronovým mikroskopu (Hoham et al., 1979).

Chloromonas polyptera (F.E.Fritsch) R.W.Hoham, J.E.Mullet & S.C.Roemer

Druh dříve označovaný také jako *Carteria nivalis* či *Scotiella polyptera* způsobuje oranžově zbarvený sníh. Jeho zygospory jsou podlouhlé buňky s žebry na svém povrchu (obr. 17), které vzhledem velmi připomínají *Chloromonas nivalis*, ale na rozdíl od něj je jejich výskyt popsán pouze z oblasti Antarktidy, kde se vyskytuje u pobřeží v blízkosti hnízdišť tučňáků, které tvoří specifické prostředí charakteristické mírně zásaditějším pH a vyšší konduktivitou. Od *Cr. nivalis* se také liší vyšším obsahem astaxanthinu, což má za následek výraznější zbarvení sněhu (Hoham et al., 1983; Remias et al., 2013).

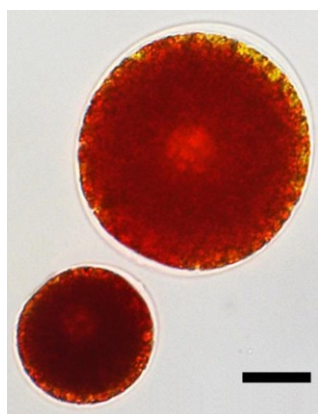


Obr. 17: Foto buněk *Chloromonas polyptera* z terénu pod světelným (1) a elektronovým mikroskopem (2; Remias et al., 2013).

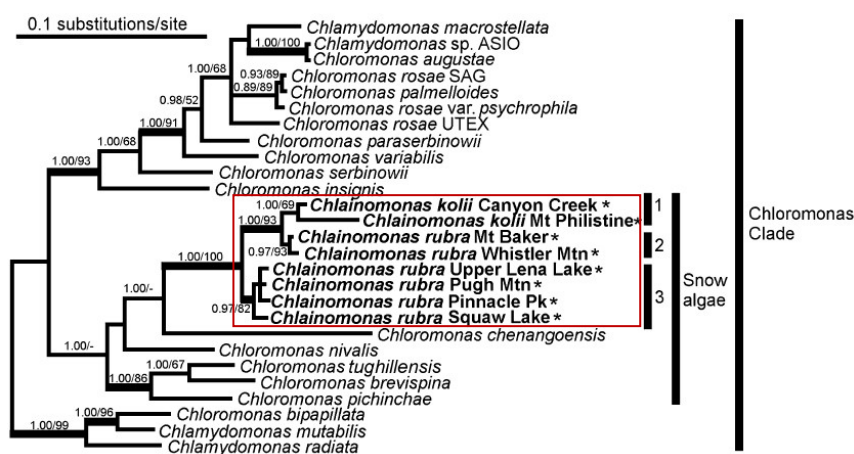
Chlainomonas H.R. Christen

V porovnání s buňkami *Chlamydomonas* cf. *nivalis* jsou nepohyblivé buňky rodu *Chlainomonas* větší a mívají kulatý až elipsoidní tvar. Výrazným znakem je tlustá buněčná stěna, která tvoří nápadný okraj, a protoplast je vyplněn lipidovými globulemi s červenými karotenoidy, mezi kterými uprostřed prosvítá jádro (obr. 18). Jejich vegetativní stadia mají čtyři bičíky. Taxonomicky spadá do větve rodu *Chloromonas*, kde je jako jediný čtyřbičíkatý organismus (obr. 19). Jeho zástupci jsou např. druhy *Chlainomonas rubra* (J.R.Stein & R.C.Brooke) Hoham s hladkým povrchem a *Chlainomonas kolii* (J.T.Hardy & H.C.Curl, Jr) Hoham s vnějším síťovitým povrchem spor. Výskyt rodu *Chlainomonas* je popsán ze Severní Ameriky, z Nového Zélandu, ale i z Alp, Svalbardu či bulharského Pirinu (Novis et al., 2008; Kvíderová, 2012; Cepák & Lukavský, 2013; Remias et al., 2016).

Obr. 18: Nepohyblivé buňky *Chlainomonas* sp. (Remias et al., 2016).



Obr. 19: Kladogram zobrazující taxonomické zařazení rodu *Chlainomonas* do větve *Chloromonas* (Novis et al., 2008).



Chlamydomonas sanguinea Lagerheim

Kosmopolitní druh popisovaný jako původce rudě až růžově zbarveného sněhu v Tatrách, Alpách, Skandinávii, ale i v Jižní Americe, Asii či na Novém Zélandu (Kol, 1968; Algaebase, 2016). Jeho bičíkaté buňky jsou oválné, červeně zbarvené, v klidovém stádiu kulovité s tlustou buněčnou stěnou a v průměru velké až 40 μm (Kol, 1968). Je však pravděpodobné, že se ve skutečnosti jedná o vývojové stadium řas z rodu *Chlainomonas* (Remias et al., 2016).

Chlamydomonas bolyaiana Kol

Druh popsáný ve sněhu z evropských Karpat či Severní Ameriky má kulaté až oválné rudé buňky se ztlustělou buněčnou stěnou často obalené rosolovitou vrstvou. Pyrenoid nebyl pozorovaný a od ostatních druhů jsou nápadně velké, zygoty měří až 60 μm v průměru (Kol,

1968). Podobně jako v předchozím případě se možná jedná ve skutečnosti o rod *Chlainomonas* (Remias et al., 2016).

Chloromonass pichincha Wille

Spory tohoto druhu jsou popsány jako červené či červeno-zelené kulovité buňky o průměru až 30 μm . Bunečná stěna je ztlustěná a hladká. Své označení získal od místa nálezu v Ekvádoru – vulkán Pichincha (Kol, 1968). Druh je také popisován ze zeleně až oranžově zbarveného sněhu, kde byly pozorovány jeho bičíkaté buňky (Hoham et al., 1975b; Algaebase, 2016).

Chloromonas rubroleosa Ling & Seppelt

Oválné buňky dlouhé až 33 μm s tenkou buněčnou stěnou, která se ztlušťuje směrem ke koncům buňky, byly popsány v červeném sněhu v Antarktidě. Vegetativní buňky se oproti jiným chlamydomonádám huře pohybují. Jejich dalším poznávacím znakem je dvojité papila, chloroplasty ve tvaru disku a velké množství olejových kapének s červeným pigmentem (Ling & Seppelt, 1993).

Chlorosarcina antarctica (Wille) Ling

Cysty tohoto druhu byly dříve označovány jako samostatný druh *Chlamydomonas antarctica* Wille. Jedná se o kulovité až oválné buňky o různé velikosti, které bývají obalené ve slizovité vrstvě, kterou mají i oválné vegetativní buňky. Červený pigment byl pozorován i u zoospor. Jejich výskyt je zatím zaznamenán jen z jižní polokoule, konkrétně z vytrvávajících sněhových polí v Antarktidě (Ling, 2002).

Smithsonimonas abbotii Kol

Druh prvně popsáný z Aljašky se také řadí mezi Chlamydomonadales. Bezbičíkatá stádia jsou kulaté až oválné buňky s hladkou buněčnou stěnou, na které se postupem času vytváří špičaté výrůstky. Buňky jsou poměrně malé, mají kolem 12 μm v průměru. Bičíkaté buňky mají bezbarvé pouzdro, které je netradičního zvonovitého tvaru dlouhé a široké až 21 μm , bičíky ústí v širší části pláště (Kol, 1942; Kol 1968).

Chloromonas reticulata (Goroschankin) Gobi, *Chloromonas typhlos* (Gerloff) Matsuzaki, Y. Hara & Nozaki (dříve označované jako *Chlamydomonas augustae*, *Chlamydomonas yellowstonensis*, *Chloromonas clathrata*)

Příbuzné druhy izolované ze sněhu vysokohorských a polárních oblastí např. na západě USA či na Islandu. Jejich detailní popis uvádí Matsuzaki et al. (2012), nejspíš se však nejedná o druhy způsobující červené zabarvení sněhu (viz kapitola 2.5).

3 Materiál a metody

3.1 Terénní odběr vzorků, jejich transport a uchování

Sběr vzorků jsem uskutečnila v letech 2013 a 2014 v letních měsících v různých částech evropských Alp a Skandinávie, které jsem vybrala na základě předchozí vlastní zkušenosti s nálezem červeně zbarveného sněhu a na základě dosud publikovaných dat. Část vzorků jsem obdržela od kolegů, kteří je získali vlastním sběrem na Špicberkách a ve vysokohorských oblastech v Rumunsku, Slovinsku, Itálii a v Turecku. Lokalitami sběru byla reziduální sněhová pole v rozmezí nadmořské výšky od 469 do 3422 m n. m. na exponovaných místech bez vegetace s menším sklonem terénu, např. jako na obr. 20 a 21 níže. V místě odběru jsem vždy zaznamenala nadmořskou výšku a souřadnice lokality pomocí Garmin GPSMAP 64st PRO a lokalitu vyfotila fotoaparátem Nikon D3000 s objektivem Nikon AF-S Nikkor 18-55mm 1:3.5-5.6G, editace fotografií byla provedena v programu Gimp 2.8.18 (GNU Image Manipulation Program, USA). Seznam všech lokalit sběru vzorků je uveden v tabulce 2 a jejich znázornění na mapě na obr. 22.

Obr. 20: Odběr vzorků ze sněhového pole v Dolomitech, Pas de le Selle (foto Martina Novotná).

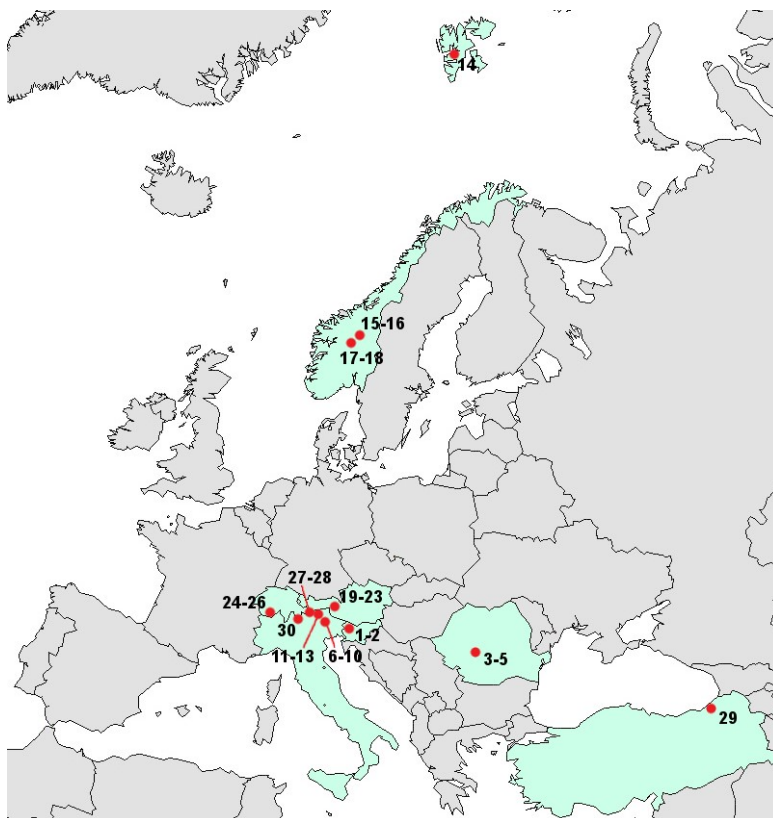


Obr. 21: Odběr vzorků na ledovci v Ötztálských Alpách, Similaun (foto Marek Stejskal).



Tabulka 2: Lokality sběru vzorků.

Datum sběru	Lokalita	GPS souřadnice	Nadmořská výška	Číslo na mapě
13. 6. 2013	Veliki Oltar, Julské Alpy, Slovinsko	46°26'23.2"N 13°49'49.5"E	2536 m	1
15. 6. 2013	Triglav, Julské Alpy, Slovinsko	46°22'44.8"N 13°50'01.4"E	2832 m	2
28. 6. 2013	Iezerul Muntinului, Parâng, Rumunsko	45°21'48.7"N 23°39'17.8"E	2079 m	3
28. 6. 2013	Lacul Mândra, Parâng, Rumunsko	45°20'22.4"N 23°32'53.7"E	2156 m	4
30. 6. 2013	Lacul Iezerul Mic, Cindrel, Rumunsko	45°34'55.7"N 23°46'54.2"E	1946 m	5
10. 7. 2013	Val Rosalia, Dolomity, Itálie	46°25'56.0"N 11°49'58.0"E	2453 m	6
11. 7. 2013	Pas de San Nicolo, Dolomity, Itálie	46°25'23.9"N 11°47'48.5"E	2298 m	7
12. 7. 2013	Forcella dal Pief, Dolomity, Itálie	46°24'43.4"N 11°45'58.3"E	2063 m	8
12. 7. 2013	Pas de le Selle, Dolomity, Itálie	46°24'08.3"N 11°45'10.1"E	2339 m	9
12. 7. 2013	Cima de Costabela, Dolomity, Itálie	46°24'11.2"N 11°47'09.0"E	2668 m	10
15. 7. 2013	Wannser Joch, Sarntalské Alpy, Itálie	46°47'52.0"N 11°21'41.8"E	2244 m	11
15. 7. 2013	Sailer Gruben, Sarntalské Alpy, Itálie	46°47'37.7"N 11°20'14.9"E	2134 m	12
17. 7. 2013	Steinwandseen, Sarntalské Alpy, Itálie	46°48'21.7"N 11°24'09.5"E	2353 m	13
2. 8. 2013	Longyearbyen, Špicberky, Norsko	78°09'05.7"N 16°02'50.7"E	469 m	14
17. 8. 2013	Rondslotett výstup, Rondane, Norsko	61°55'06.2"N 09°52'10.7"E	1660 m	15
17. 8. 2013	Rondslotett sestup, Rondane, Norsko	61°54'25.3"N 09°50'58.9"E	1939 m	16
19. 8. 2013	Besseggen, Jotunheim, Norsko	61°30'15.0"N 08°42'10.1"E	1453 m	17
19. 8. 2013	Memurubu, Jotunheim, Norsko	61°30'00.5"N 08°39'30.9"E	1438 m	18
5. 7. 2014	Alterpragerhütte, Vysoké Taury, Rakousko	47°06'57.5"N 12°24'52.6"E	2166 m	19
6. 7. 2014	Venedigerkees, Vysoké Taury, Rakousko	47°07'42.2"N 12°19'23.3"E	2709 m	20
6. 7. 2014	Kürsingerhütte, Vysoké Taury, Rakousko	47°07'20.3"N 12°18'04.8"E	2547 m	21
7. 7. 2014	Obersulzbachkees, Vysoké Taury, Rakousko	47°06'55.0"N 12°17'39.4"E	2270 m	22
8. 7. 2014	Simonyspitze, Vysoké Taury, Rakousko	47°03'44.3"N 12°17'06.6"E	2373 m	23
27. 7. 2014	Weissmeisshütte, Walliské Alpy, Švýcarsko	46°08'37.3"N 07°58'38.0"E	2715 m	24
29. 7. 2014	Triftbach, Walliské Alpy, Švýcarsko	46°08'52.8"N 07°58'52.1"E	2834 m	25
30. 7. 2014	Nufenen Pass, Walliské Alpy, Švýcarsko	46°28'35.3"N 08°23'11.0"E	2482 m	26
1. 8. 2014	Rif. Similaun, Ötztalské Alpy, Rakousko	46°46'34.5"N 10°51'14.3"E	2729 m	27
1. 8. 2014	Similaun, Ötztalské Alpy, Rakousko	46°46'16.9"N 10°52'23.9"E	3223 m	28
Srpen 2014	Kaçkar Dağı, Kaçkar, Turecko	40°49'13.1"N 41°09'36.6"E	3422 m	29
26. 9. 2014	Vedretta del Gran Zebbru, Ortler masiv, Itálie	46°28'04.0"N 10°35'08.0"E	3154 m	30



Obr. 22: Mapa s vyznačenými lokalitami sběru. Čísla lokalit odpovídají lokalitám dle tabulky 2.

Vzorky byly sbírány do nových centrifugačních zkumavek se šroubovacím víčkem o objemu 15 ml a 50 ml, do odběrových nádobek se šroubovacím víčkem, do sterilních plastových zkumavek s uzávěrem určených primárně na odběr moči a do vymytých čistých PET lahví. Při odběru byla odhrnuta horní zhruba centimetrová vrstva sněhu se sedimentem a vzorek byl odebraný z červeně zabarveného sněhového sloupce. Uzavřené vzorky v nádobkách byly vloženy do termosky s trochou sněhu pro udržení optimální teploty během transportu. Vzorky byly v termosce 1–3 dny v závislosti na trase, v případě vícedenní trasy byl sníh v termosce měněn ráno a večer. Po sestupu do údolí jsem vzorky umístila do plastového chladicího boxu s PET lahvemi se zmraženou vodou pro zajištění nízké teploty během převozu, který trval dle vzdálenosti lokality od Prahy cca 10 hodin.

Hned po příjezdu byly vzorky z boxu přesunuty do chladicí vitríny Polar na katedře ekologie PřF UK v Praze, kde se teplota pohybovala kolem 5°C. Část z každého vzorku byla odebrána do 1,5 ml mikrozkušavky typu Eppendorf a zmrazená na -18°C jako záložní zdroj materiálu. Zbytek vzorků byl ponechán v odběrových nádobkách a umístěn do pro světlo nepropustného igelitového pytle do chladničky o teplotě 4–8 °C. Při manipulaci se vzorky z terénu byl brán zřetel, aby nebyly dlouho vystavené okolní pokojové teplotě a byly vždy co možná nejdříve vráceny zpět do chladu.

3.2 Kultivace

Každý vzorek byl co nejdříve od data sběru (nejpozději do dvou měsíců) nasazen ke kultivaci do živného média BBM – Bold's Basal Medium (Bold, 1949; Andersen, 2005). Medium bylo připraveno v objemu 1 litr v širokohrdlé Erlenmeyerově baňce a přelito do dvou lahví se šroubovacím uzávěrem o objemu 500 ml. Lahve s mediem byly vysterilizovány v autoklávu Tuttnauer 2840EL (Nizozemsko) při teplotě 121 °C. Kultivace probíhala ve skleněných zkumavkách, v Petriho miskách a nejčastěji v úzkohrdlých Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml. Veškeré laboratorní sklo bylo vždy před použitím vysterilizováno v autoklávu a necháno zchladnout na pokojovou teplotu. Vysterilizované médium zchlazené na pokojovou teplotu bylo v lahvích umístěno do chladicí vitríny Polar a vždy používáno chlazené na teplotu zhruba 8 °C.

Zkumavky a Petriho misky byly naplněny médiem do poloviny jejich objemu, do Erlenmeyerových baněk 50 ml. Médium bylo dále naočkováno daným vzorkem pomocí Pasteurovy pipety. Zkumavky a Erlenmeyerovy baňky byly uzavřeny vysterilizovanou zátkou z buničité vaty, která ještě byla překryta alobalem. Petriho misky s vzorky byly přikryty jejich druhým horním dílem. Po nasazení byly kultivované vzorky umístěny do osvětlené chladicí vitríny Polar s teplotou 4–10 °C a ozářeností $\sim 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Během kultivace byly vzorky kontrolovány pod světelným mikroskopem Nikon Eclipse E400 (Japonsko) nebo Olympus BX51 (Japonsko) kvůli případné kontaminaci. V případě kontaminace byly vzorky přesazeny do plastové mikrotitrační destičky do čerstvého média. Pokud v jedné z jamek destičky narostla čistá kultura řas morfologicky odpovídající řádu Chlamydomonadales, případně zelených řas obecně, byl obsah jamky přesazen do Erlenmayerovy baňky s 50 ml čerstvého média.

Jakmile měl kultivovaný obsah výrazně zelenou až tmavě zelenou barvu, bylo v případě Erlenmeyerových baněk přidáno cca 50 ml média, v případě Petriho misek byl narostlý obsah přesazen do 50 ml média v Erlenmeyerově baňce.

Takto získané laboratorní kultury byly dále použity k fotografické dokumentaci a k izolaci DNA.

3.3 Optická mikroskopie a fotografická dokumentace

Mikrofotografie vzorků z terénu i z laboratorních kultur byly pořízeny pomocí mikroskopu Nikon Eclipse E400 (Japonsko), fotoaparátu Nikon EOS 650D (Japonsko) a prostřednictvím programu Quick PhotoCamera 3.1. (Promicra, Česká republika). Jelikož vzorky z terénu byly ve všech případech nepohyblivé cysty, nebyly nijak fixovány.

Laboratorní kultury byly na podložním skle fixovány kapkou formaldehydu nebo Lugolovým roztokem pro znehybnění pohyblivých bičíkatých buněk. Pořízené mikrofotografie byly zpracovány pomocí Gimp 2.8.18 (GNU Image Manipulation Program, USA).

3.4 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Před vlastním pozorováním bylo nutné vzorky z terénu připravit následujícím způsobem. Ze vzorku z terénu byla odebrána biomasa červených buněk sněžných řas v takovém množství, aby byla v mikrozkuhavce o objemu 1,5 ml okem viditelná peleta. K té bylo přidáno 0,5 ml fixačního roztoku z 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M kakovylátovém pufru a obsah mikrozkuhavky byl řádně promíchán pomocí vortexu. Fixace probíhala maximálně 24 hodin. V případě, že byla biomasa cyst ve vzorku roztroušena, byl vzorek zcentrifugován rychlostí 2000 rpm po dobu 5 minut a poté byl pelet odebrán do fixačního roztoku.

Po fixaci byly vzorky postupně dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou (od nejnižší koncentrace 35%, 50%, 70%, 80%, 96% a 100% po 15 minutách). Fixovaný vzorek byl centrifugován, supernatant odsát, do eppendorfky se vzorkem přidáno 0,5 ml 35% roztoku ethanolu, promícháno pomocí vortexu a následovala 10 minut inkubace. Poté byl stejný postup opakován i pro vyšší koncentrace ethanolu. V případě koncentrace ethanolu 96% a 100% byly vzorky v ethanolu ponechány pouze 5 minut. V průběhu doby dehydratace vzorku v roztoku ethanolu byl vzorek ještě 1–2x promíchán pomocí vortexu.

Po uplynutí doby dehydratace v 100% alkoholu byl vzorek opět centrifugován a pelet byl kápnut na filtrační papír s póry o velikosti 3 μ m, který byl získán vylomením z membránového filtračního nástavce, nebo byl aplikován na 1x1 cm čtverec filtračního papíru pro běžné použití v laboratoři. Filtrační papír se vzorkem byl zabalen do 4x4 cm čtverce bankovního papíru, aby se vzorek neodrolil a nekontaminoval jiným, a umístěn do nádoby se šroubovacím víčkem s cca 20 ml acetonu. Aplikace vzorku na filtrační papír, zabalení do bankovního papíru a vložení do acetonu byla provedena co nejrychleji, aby vzorek nevyschl a buňky nepopraskaly.

Takto připravené vzorky byly předány technikovi v laboratoři elektronové mikroskopie PřF UK, který provedl vysušení pomocí kritického bodu, při kterém jsou vzorky v tlaku vzdorné komoře zality kapalným oxidem uhličitým, promyty od acetonu a poté zvýšením teploty a tlaku dochází ke zplynění oxidu uhličitého a jeho vypuštění z komory. Takto vysušený vzorek byl vyjmut z obalu z bankovního papíru a opatrně přilepen oboustrannou lepicí páskou na nosný terčik, který je pak předán technikovi elektronové mikroskopie k pokovení. Při něm je vzorek pokryt tenkou vrstvičkou zlata, která je dobře

elektricky i tepelně vodivá a je schopná odvést elektrický náboj a teplo vznikající v preparátu po dopadu elektronů (Juračka & Nebesářová, 2010).

Takto připravené vzorky byly pozorovány v Laboratoři elektronové mikroskopie biologické sekce PřF UK pod skenovacím elektronovým mikroskopem JEOL 6380 LV (Japonsko) s velikostí stopy (spot size) 27–43 a urychlovacím napětím (accelerating voltage) 20–30 kV. Pomocí softwaru Smile Shot byly z pozorování SEM pořízeny mikrofotografie.

3.5 Statistické zpracování morfologických dat

Z každého vzorku jsem změřila průměr 40 náhodně vybraných buněk v programu Quick PhotoCamera 3.1. (Promicra, Česká republika). Do analýzy nebyl zařazen vzorek Iezerul Muntinului, kde se vyskytovaly oválné buňky výrazně odlišné od kulovitého tvaru převažujícího v ostatních vzorcích. Z naměřených hodnot byla vypočtená průměrná hodnota, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota pomocí programu Excel (MS Office 2016, USA). Data byla dále zpracována v programu GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Pro zjištění rozdílu v rozměrech buněk mezi jednotlivými lokalitami, mezi a v rámci geografických oblastí jsem vzhledem k tomu, že data neměla normální rozdělení, používala Kruskal-Wallisův případně Mann-Whitney neparametrický test.

Dle vzhledu buněk v optickém mikroskopu byla určena jejich barva a dle pozorování ve skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM) charakter povrchu buněk. Tyto kategoriální proměnné byly kódovány jako indikátorové proměnné („dummy variables“). Parametr barva buněk jako tři proměnné (oranžová, červená, vínová), ze kterých byla pro každý vzorek vybrána jedna, která ve vzorku dominovala a té byla přiřazena hodnota 1, ostatním pak hodnota 0. Parametr povrch buněk byl také kódován jako tři proměnné (hladký s výrůstky a s výraznými výrůstky). Pro každý vzorek byly těmto proměnným přiřazeny hodnoty 0 až 3 dle zastoupení buněk s daným povrchem (hodnotou hladký, s výrůstky, s výraznými výrůstky) tímto způsobem: 0 – buňky s tímto povrchem nebyly ve vzorku zastoupeny, 1 – buňky s tímto povrchem byly ve vzorku zastoupeny minimálně, 2 – buňky s tímto povrchem byly ve vzorku přítomny často, nikoliv však dominantně, 3 – buňky s tímto povrchem ve vzorku dominovaly.

Mnohorozměrné analýzy byly zpracovány pomocí programu Canoco 5.01 (Microcomputer Power, USA). Analýzou hlavních komponent (PCA) byly zjištěny hlavní směry variability v morfologických znacích (barva, průměr buněk a charakter povrchu buněk), jejich vzájemné vztahy a jejich rozložení v závislosti na geografické poloze lokalit. Pomocí přímé gradientové analýzy (redundanční analýza, RDA) jsem pak pomocí testu všech kanonických

os zjišťovala závislost těchto morfologických znaků na oblasti původu vzorku, geografické poloze a nadmořské výšce lokality (Ter Braak & Šmilauer, 2012). Pro tento účel byla oblast původu vzorků překódována do 11 indikátorových proměnných.

3.6 Analýza DNA

Součástí byla příprava vzorku, izolace DNA, amplifikace molekulárních markerů pomocí PCR, kontrola úspěšnosti amplifikace pomocí gelové elektroforézy, odeslání vzorků na sekvenaci do laboratoře firmy Macrogen v Nizozemí, fylogenetická analýza a analýza sekundární struktury úseku ITS2 rDNA. U laboratorních kultur byl sekvenován nukleární marker 18S rDNA. U vzorků z terénu byl sekvenován nukleární marker ITS2 rDNA.

3.6.1 Příprava a izolace DNA

3.6.1.1 Terénní vzorky

Pod optickým mikroskopem byly pomocí skleněné pipety do kapky destilované vody vybrány jednotlivé buňky morfologicky odpovídající druhu *Chlamydomonas cf. nivalis*. Vybírány byly pouze takové buňky, které byly co nejméně obalené anorganickým materiálem a jinak znečištěné. Pro další postup bylo z každého vzorku vybráno min. 50 buněk, které byly umístěny do destilované vody o objemu 200 μ l v mikrozkuhavce typu eppendorf o objemu 2 ml.

Vybrané buňky v destilované vodě byly centrifugovány po dobu 5 minut rychlostí 10 000 rpm a supernatant odsát. Do každého vzorku jsem přidala 20 μ l Instagene Matrix (Bio-Rad Laboratories, USA) a 5 skleněných kuliček o průměru 1 mm. Poté byly vzorky umístěny do přístroje Mixer Mill na katedře botaniky PřF UK, kde byly drceny 15 minut při frekvenci míchání 30 Hz. Následně byly vzorky umístěny na 15 minut do -80 °C. Poté se nechaly při pokojové teplotě roztát a byly krátce stočeny na centrifuze. Dále byly vzorky umístěny na 1 minutu do teploty 95 °C bez míchání, poté na 30 minut do teploty 56 °C za stálého míchání 700 rpm a poté na 8 minut do 99 °C bez míchání. Na závěr byly vzorky inkubovány při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Kvalita získaného vzorku byla spektrofotometricky ověřena pomocí přístroje NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.6.1.2 Laboratorní kultury

Kultury jsem nejprve zkontrolovala pod světelným mikroskopem Nikon Eclipse E400 (Japonsko) nebo Olympus BX43 (Japonsko), že nejsou kontaminovány a jedná se o jednodruhovou kulturu zelených řas. Obsah Erlenmeyerovy baňky byl poté přelit do 50 ml centrifugační zkuhavky a zcentrifugován po dobu 6 minut rychlostí 2000 rpm. Vzniklý

supernatant byl opatrně odlit, aby nedošlo k porušení pelety na dně, a pokud v Erlenmeyerově baňce byl ještě zbytek kultury, byl nalit do centrifugační zkumavky k vzniklé peletě a centrifugace opakována. Z centrifugační zkumavky byl opět odlit supernatant, ale cca 0,5 ml bylo ponecháno, aby v něm byla rozmíchána vzniklá peleta vzorku na dně centrifugační zkumavky a přemístěna do předem zvážené 1,5 ml eppendorf mikrozukavky. Mikrozukavka s materiálem byla zcentrifugována rychlostí 2000 rpm po dobu 5 minut a odebrána oddělaná voda z povrchu. Postup zvážení materiálu byl stejný jako u vzorků z terénu uvedený v 3.6.1.1.

Izolace DNA odpovídá postupu, který je součástí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo), ale je prodloužen čas inkubací s jednotlivými chemikáliemi a liší se v několika počátečních krocích. K odváženému vzorku k mikrozukavce bylo přidáno 100 μ l pufru AP1, 4 μ l RNasy A a méně než polovina objemu směsi ve zkumavce skleněné kuličky o průměru 3 mm. Vše bylo promícháno pomocí vortexu a poté buňky drceny pomocí přístroji Mixer Mill MM 400 (Retsch, Německo) po dobu 5 minut frekvencí 30 Hz. Po rozdrcení buněk bylo do směsi přidáno 300 μ l pufru AP1, promícháno pomocí vortexu a inkubováno 30 minut při 65 °C, během té doby byl obsah mikrozukavek 3x promíchán vortexem. Následující kroky jsou shodné s manuálem od výrobce kitu jen s tím rozdílem, že byly prodlouženy časy některých inkubací s pufrů.

Inkubace na ledě s pufrů AP2 probíhala 15 minut. V posledním kroku byl přidán pufr AE, který byl zahřát na 65 °C, inkubace probíhala 15 minut při pokojové teplotě a vzorek byl centrifugován 1 minutu rychlostí 8000 rpm. Tím bylo získáno 100 μ l izolátu DNA, jehož kvalita byla spektrofotometricky ověřena. Pokud byla koncentrace DNA v izolátu vyšší než 50 μ g/l, přidala jsem opět 100 μ l pufru AP2 o teplotě 65 °C na membránu kolonky, vzorek jsem inkubovala 15 minut při pokojové teplotě a centrifugovala 1 minutu rychlostí 8000 rpm. Tím byl izolát naředěn na 200 μ l a jeho kvalita opět změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.6.2 Amplifikace 18S rDNA

K PCR úseku 18S rDNA byly použity vybrané izoláty o koncentraci DNA v rozmezí 10-80 μ g/l a primery uvedené s označením v tabulce 3. K naředění izolátů DNA do požadované koncentrace a k přípravě master mixů vždy byla použita sterilizovaná destilovaná voda. Izolát DNA byl naředěn takovým množstvím destilované vody, aby výsledná koncentrace DNA v 5 μ l jeho roztoku byla 5 μ g/l. Množství master mixu bylo připraveno dle

počtu vzorků pro PCR, soupis použitých látek a jejich množství je uveden v tabulce 4, vždy je připočítána 8 % rezerva.

Připravený master mix a naředěný izolát byl promíchán pomocí vortexu a krátce zcentrifugován. Poté bylo napipetováno 5 µl naředěného izolátu a 15 µl master mixu do jedné 0,5 ml mikrozkušavky. Stripy s napipetovaným izolátem DNA a master mixem byly před PCR ještě krátce zcentrifugovány. Cyklus PCR byl následující:

- *Iniciální denaturace*: 10 minut při teplotě 95 °C.
- *Denaturace*: 1 minuta při teplotě 95 °C.
- *Annealing*: 1 minuta při teplotě 56 °C, 59 °C, 61 °C nebo 64 °C.
- *Extenze*: 2 minuty při teplotě 72 °C.
- *Finální extenze*: 10 minut při teplotě 72 °C.

Proces denaturace, annealingu a extenze byl opakován 35x, ostatní kroky pouze 1x. Vzorky byly po průběhu PCR uchovány maximálně 1 týden v chladničce při teplotě 4 °C, nebo byly rovnou zmrazeny a uchovány při teplotě -18 °C.

Tabulka 3: Přehled použitých primerů.

Název primerů		Sekvence primeru 5' – 3'	Zdroj
Primery pro 18S rDNA			
F1 + R1	F1	CTGCTTTATACTGCGAAACTGC	Hoham et al. 2002
	R1	CTTCACCAGCACACCCAATC	Hoham et al. 2002
F2 + R2	F2	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Katana et al. 2001
	R2	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG	Katana et al. 2001
P2 + P4	P2	CTGGTTGATTCTGCCAGT	De Wever et al., 2009
	P4	TGATCCTTCYGCAGGTTAC	De Wever et al., 2009
Primery pro ITS2 rDNA			
LR3 + AL1000	LR3	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Vilgalys & Hester, 1990
	AL1000	GCGCGCTACACTGATGC	Helms et al., 2001
AB + TW	AB28	GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCG	Goff et al. 1994
	TW81	GGGATCCGTTTCCGTAGGTGACCTGC	Goff et al. 1994
ITS5 + ITS4	ITS5	GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990
LSU + SSU	LSU	AGTTCAGCGGGTGGTCTTG	Piercey-Normore & DePriest, 2001
	SSU	CTGCGGAAGGATCATTGATTC	Piercey-Normore & DePriest, 2001
ITS1 + ITS4	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990

Tabulka 4: Složení master mixu pro amplifikaci 18S rDNA.

	<i>Koncentrace</i>	<i>Objem</i>
Destilovaná voda	-	8,86 µl
MgCl ₂	25 mM	1,73 µl
Pufr	10x	2,16 µl
dNTP	2 mM	1,63 µl
Primer forward	10 µM	0,86 µl
Primer reverse	10 µM	0,86 µl
Taq DNA polymeráza (Thermoscientific)	5 U/µl	0,11 µl
Celkem	-	16,2 µl

3.6.3 Amplifikace úseku ITS2 rDNA

K PCR byly použity izoláty, které měly dle Nanodropu naměřenou kladnou hodnotu výtěžku. Na každý vzorek jsem použila 1 µl izolátu DNA a 19 µl master mixu, který byl připraven pro jeden vzorek z látek v objemech s 8 % rezervou dle tabulky 5 a dvojicí primerů z tabulky 3.

Tabulka 5: Složení master mixu pro amplifikaci ITS2.

	<i>Koncentrace</i>	<i>Objem</i>
Destilovaná voda	-	13,82 µl
MyTaq Red Reaction Buffer (Bioline)	-	4,32 µl
Primer forward	10 µM	1,08 µl
Primer reverse	10 µM	1,08 µl
MyTaq™ HS Red DNA polymeráza (Bioline)	5U/µl	0,22 µl
Celkem	-	20,52 µl

Master mix byl poté promíchán pomocí vortexu a krátce zcentrifugován. Do každé mikrozkušavky o objemu 0,5 ml pak bylo napipetováno 19 µl master mixu a 1 µl izolátu DNA, který byl předtím také promíchán vortexem a zcentrifugován. Mikrozkušavka pak byla krátce zcentrifugována a umístěna do cycleru s tímto nastavením:

- *Iniciální denaturace*: 3 minuty při teplotě 95 °C.
- *Denaturace*: 15 vteřin při teplotě 95 °C.
- *Annealing*: 30 vteřin při teplotě 61 °C
- *Extenze*: 40 vteřin při teplotě 72 °C.
- *Finální extenze*: 7 minut při teplotě 72 °C.

Proces denaturace, annealingu a extenze byl opakován 35x, ostatní kroky pouze 1x. Vzorky po průběhu PCR byly uchovány maximálně 1 týden v chladničce při teplotě 4 °C, nebo byly rovnou zmrazeny a uchovány při teplotě -18 °C.

3.6.4 Elektroforéza a vyhodnocení vzorků

Kvalita získaných PCR produktů byla poté ověřena elektroforézou na 1.5% agarovém gelu, pro jehož přípravu byla použita agarosa, fluorescenční látka GelRed (Biotium, Fremont, USA) a pufr TBE (Tris(hydroxymethyl)aminometan + kyselina boritá + EDTA). Do jedné jamky gelu byl napipetován roztok složený z 2 µl PCR produktu vzorku a 2 µl „loading dye“ (bromfenolová modř + xylen cyanol). Elektroforéza byla spuštěna na 45 minut s nastavením 120 V a 500 mA. Vzorky vyhodnocené pomocí elektroforézy jako vhodné, byly odeslány k sekvenaci do laboratoře firmy Macrogen (Amsterdam, Nizozemí).

3.6.5 Fylogenetická analýza

Sekvence byly sestaveny a upraveny v programu FinchTV 1.4.0. (Geospiza, USA). Po vizuálním zhodnocení byly vybrány kvalitní úseky sekvencí, ve kterých byly upraveny pozice, kde byla velmi pravděpodobná přítomnost obou bazí. Tyto pozice byly označeny příslušným IUPAC kódem (<http://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>) pro dvojznačnou bazi tímto způsobem: A/G - R, C/T - Y, G/C - S, A/T - W, G/T - K, A/C - M. S pomocí online dostupné databáze BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) jsem našla podobné sekvence. Pro tvorbu fylogenetického stromu byly použity vlastní sekvence, nejpodobnější sekvence dle BLAST a vybrané sekvence z předchozích fylogenetických studií.

V programu MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) byly sekvence zarovnány pomocí algoritmu ClustalW (Thompson et al., 1994). Alignment byl pečlivě zkontrolován, případně dodatečně manuálně editován. Počáteční a koncové úseky byly ořezány tak, aby měla každá sekvence stejný počet pozic. Pokud měla některá ze sekvencí v porovnání s ostatními chybějící počáteční či koncový úsek, byla v těchto pozicích doplněna jako „N“ (not known). Následně byly z alignovaných sekvencí odstraněny introny a pozice, kde u více jak poloviny sekvencí byla mezera. Pokud byly některé ze sekvencí identické, byla použita vždy pouze jedna a identické sekvence byly doplněny až při grafické úpravě fylogenetického stromu.

Pro tvorbu fylogenetického stromu Chlorophyceae bylo použito 41 sekvencí včetně vlastních 4 sekvencí s délkou 1578 nukleotidů po úpravě. Jako outgroup byly zvoleny zástupci z čeledi Prasinophyceae dle Pröschold et al. (2001) a to *Pseudoscourfieldia* a *Nephroselmis olivacea*.

Pro tvorbu fylogenetického stromu Trebouxiophyceae bylo použito 68 sekvencí včetně 4 vlastních a s délkou 1762 nukleotidů po úpravě. Jako outgroup byly zvoleny druhy *Oocystis marssonii* a *Oocystis heteromucosa* dle Darienko et al. (2016).

Pro další postup bylo nejprve nutné zjistit nejvhodnější substituční model, který byl zjištěn pomocí programu jModelTest 2.0.1 (Posada et al., 2008). Pro fylogenetický strom třídy Chlorophyceae byl na základě kritéria AIC (Akaikeho informační kritérium) vybrán model TIM1+G+I, pro třídu Trebouxiophyceae byl dle stejného kritéria vybrán model TIM2+G+I.

Fylogenetický strom byl vytvořený dvěma fylogenetickými analýzami: metodou Bayesiánské inference (BI) a maximální věrohodnosti (ML – Maximum likelihood). Pro fylogenetickou analýzu metodou ML byl použit program Garli 2.0 (Zwickl, 2006). Nejlepší fylogenetický strom byl určen na základě 5 nezávislých replikací s nastavením gentreshfortopoterm = 100000 (automatické ukončení po 100000 generacích bez významného zlepšení topologie stromu) a nastavením pro model TIM1+G+I (datatype = nucelotide, ratematrix = (0 1 2 2 3 0), statefrequencies = estimate, ratehetmodel = gamma, numratecats = 4, invariantsites = estimate) a pro model TIM2+G+I (datatype = nucelotide, ratematrix = (0 1 0 2 3 2), statefrequencies = estimate, ratehetmodel = gamma, numratecats = 4, invariantsites = estimate). Výběr nejlepšího stromu byl ještě prověřen v programu PAUP 4.0 (Swofford, 2003), kde proběhl výpočet neoptimalizovaných a optimalizovaných skóřů. Nejlepší strom pak byl použit pro vypočítání statistické podpory větví („bootstraps“) s nastavením gentreshfortopoterm = 100000, searchreps = 1 a bootstrapreps = 100. V nastavení modelu zůstaly parametry stejné kromě parametru ratematrix = fixed. V programu PAUP byl vytvořen konsenzuální strom na základě majoritního pravidla (>50%) a byly zobrazeny hodnoty bootstrapové podpory větví. Fylogenetický strom uvedený v kapitole 4 byl vytvořen metodou Bayesiánské inference v programu MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) s nastavením čtyř paralelních analýz MCMC (Markov Chain Monte Carlo; nruns=4), které běželi po dobu 9 999 999 generací (ngen=9999999) každá s jedním studeným a sedmi teplými řetězci (nchains=8). Nalezené stromy byly ukládané každou tisícátou generací (samplefreq=1000). Prvních 25% uložených stromů bylo odstraněných jako „burn-in“ (Burninfrac=0.25) a posteriorní pravděpodobnosti tak byly spočítané ze zbylých 75% uložených stromů.

Jako program pro zobrazení fylogenetických stromů a jejich export byl použit FigTree 1.4.2 (Rambaut, 2014). Grafické úpravy stromu byly provedeny v programu Gimp 2.8.18 (GNU Image Manipulation Program, USA).

Bootstrapové podpory a posteriorní pravděpodobnosti byly interpretovány jako slabé (BI, ML: < 50 %), střední (BI: 50-94 %, ML: 50-79%) a vysoké (BI: > 94 %, ML: > 79 %) dle Peksa & Škaloud (2011).

3.6.6 Sekundární struktura ITS2 rDNA

Pro tvorbu sekundární struktury úseku ITS2 rDNA transkriptu jsem vycházela ze sekvence terénního vzorku *Chlamydomonas. nivalis*, označení v GenBank GU117577. Úsek ITS2 rDNA byl vymezen pomocí webové aplikace ITS2 database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) a dle porovnání se sekvencí GU117577 v BLASTu. Sekundární struktura úseku ITS2 pak byla složena pomocí webové aplikace Mfold 3.6 (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>; Zuker, 2003) při nastavení teploty skládání na 2 °C. Výsledná sekundární struktura byla zobrazena a exportována pomocí programu VARNA 3.9 (Darty et al., 2009). Tuto strukturu jsem porovnávala se sekvencemi ITS2 rDNA z terénních vzorků a hledala jsem přítomnost kompenzačních záměn bází (CBC, změna nukleotidů na obou pozicích, které se párují v dvouřetězcovém helixu) a hemi-CBC (h-CBC, dochází k záměně jen jedné z párujících bází) na konzervativních částech sekundární struktury ITS2 na základě konsenzuálního modelu struktury ITS2 pro třídu Chlorophyceae (Caisova et al, 2013). Grafickou úpravu a doplnění záměn bází ve struktuře jsem provedla v programu Gimp 2.8.18 (GNU Image Manipulation Program, USA).

4 Výsledky

4.1 Charakteristika lokalit

Odběr vzorků proběhl vždy v letním období, kdy bylo červené zbarvení povrchu sněhu okem viditelné (obr. 23 a 24). Lokality byly nalezeny dle předpokladu na základě popsaných lokalit v literatuře nebo vybrány na základě vlastní zkušenosti s červeným sněhem v daných oblastech (vzorky z Alp). Přehled lokalit sběru vzorků znázorněn na mapě (obr. 22). V drtivé většině se jednalo o sněhová pole, v případě vzorků Obersulzbachkees (v tabulce 2 č. 22) a Similaun (č. 28) o více sezón přetrvávající sníh na ledovcích, které byly plně exponované slunečnímu záření bez zastínění vegetací, jak je vidět na obr. 25.

Sklon sněhového pole či části ledovce byl mírný, v případě strmějšího sněhového pole se sněžné řasy nacházely v prohlubni jako je vidět na obr. 23 z příkřejšího sněhového pole u jezer Steinwandseen, kde je nejvyšší koncentrace v místě prohlubni po odtékající vodě. Charakter sněhu byl podobný firnu, tedy hrubozrnný sníh s většími krystalky ledu a s velkým množstvím vody vzniklé táním sněhu (obr. 24). Někdy voda tvořila na povrchu sněhu i menší kaluže, u kterých byly sněžné řasy koncentrované po jejich obvodu. Červené zbarvení sněhu bylo znatelné jak na povrchu, tak ve sloupci sněhu. U hodně červených sněhových polí dosahovalo zbarvení až do hloubky 15 cm od povrchu, u lehce zbarveného sněhu zas bylo většinou patrné jen v horních 3-5 cm sněhu.

Nejsevernějším místem odběru byly Špicberky (číslo lokality 14), které jsou zároveň nejnižše položenou lokalitou odběru, co se nadmořské výšky týče. Naopak nejjižněji položenou oblastí byl turecký Kaçkar Dağı (č. 29), který byl i nejvýše položenou lokalitou (tabulka 2). Výskyt sněžných řas se tak odvíjel od zeměpisné polohy a nadmořské výšky, jejichž kombinace určuje podmínky prostředí (teplota, výskyt a přetrvání sněhu, charakter sněhu), které jsou pro jejich růst vhodné.



Obr. 23 Kumulace sněžných řas v proláclině sněhového pole na strmějším svahu (Steindwandseen, Itálie).

Obr. 24: Typický hrubozrnný charakter sněhu, kde se vyskytují sněžné řasy. Jako měřítko je použita 50 ml centrifugační zkumavka (Dolomity, Itálie).



Obr. 25: Fotografie lokalit sběru vzorků sněžných řas. Číslování odpovídá označení lokalit v tabulce 2.



4.2 Morfologie buněk z terénních vzorků

Při pozorování vzorků pod světelným mikroskopem byly mezi buňkami sněžných řas z jednotlivých lokalit patrné určité odlišnosti v jejich velikosti, tvaru, zbarvení, charakteru buněčné stěny a v její povrchové struktuře (možná přítomnost výrůstků). Veškeré hodnoty jsou uvedeny v tabulce v Příloze 1, rozměry buněk jsou graficky znázorněny na obr. 26 a mikrofotografie buněk ze všech lokalit jsou na obr. 27 a v Příloze 2.

Tvar buněk byl ve většině vzorků kulatý, výjimkou byly nápadně protáhlé buňky s výraznou povrchovou strukturou z oblasti Iezerul Muntinului (číslo lokality 3 dle tabulky 2), ty bylo možné místy pozorovat i ve vzorku Vedretta del Gran Zebru (č. 30). Mírně oválným tvarem se vyznačovaly i buňky z oblastí Wannser Joch (č. 11) a Sailer Gruben (č. 12). V ostatních vzorcích byly pozorovány pouze kulaté buňky.

Variabilita rozměrů kulovitých buněk v závislosti na lokalitách je znázorněna pomocí krabicových grafů (obr. 26). Průměr buněk se pohyboval v rozmezí 14–43 μm v průměru. Vzorek s nejmenším průměrem buněk pocházel z Ötztálských Alp z oblasti Similaun (průměr 14,43 μm ; č. 28), následoval rumunský Lacul Mândra (č. 4), italský Steinwandseen (č. 13) a slovinský Veliki Oltar (č. 1). Naopak největších rozměrů dosahovaly vzorky ze švýcarských Walliských Alp (č. 24–26), jejichž průměrná velikost přesahovala 30 μm . Rozdíly mezi lokalitami i jednotlivými oblastmi byly statisticky významné ($p < 0,0001$). V rámci oblastí se rozměry buněk také lišily (obr. 26), pouze v Dolomitech a Walliských Alpách nebyl rozdíl mezi vzorky na hladině $p = 0,05$ signifikantní.

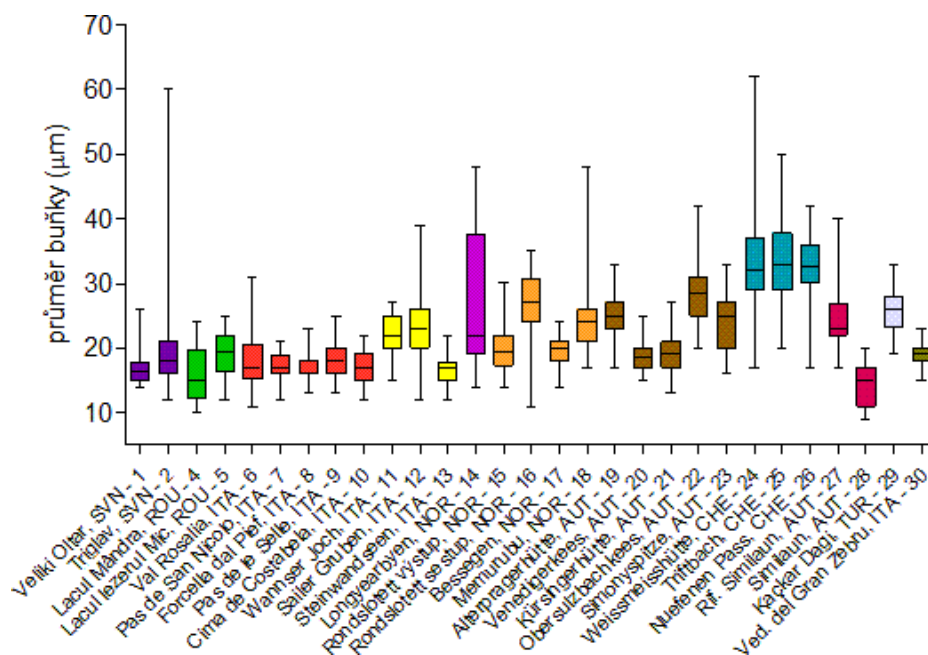
Z hlediska rozměrů buněk byl nejméně variabilní vzorek Vedretta del Gran Zebru z italského Ortleru (č. 30), dále následuje italské Steinwandseen (č. 13) či rakouský Venedigerkees (č. 20). Z pohledu oblastí byly nejméně variabilní vzorky z Dolomit (č. 6–10; průměrná směrodatná odchylka průměrů buněk 2,82 μm). Naopak s největší rozptýleností hodnot byl charakteristický pro vzorek Triglav (č. 2), kde byla směrodatná odchylka 12,8 μm , a Longyearbyen (č. 14) s 9,8 μm . U vzorku Triglav je ale vidět, že jsou ve vzorku přítomné dva typy buněk – jedny výrazně menší a druhé větší s nápadným průhledným okrajem (přehled mikrofotografií vzorků, Příloha 2). Z pohledu oblastí měly velký rozptyl hodnot vzorky ze Švýcarska (č. 24–26).

Co se týče barvy buněk, ve vzorcích z rumunského Iezerul Muntinului (č. 3), italského Wannser Joch (č. 11) a Sailer Gruben (č. 12) ze Sarntálských Alp a z Vedretta del Gran Zebru z italského masivu Ortler (č. 30) se vyskytovaly pouze oranžově zbarvené buňky. U ostatních vzorků měly buňky červenou až vínovou barvu.

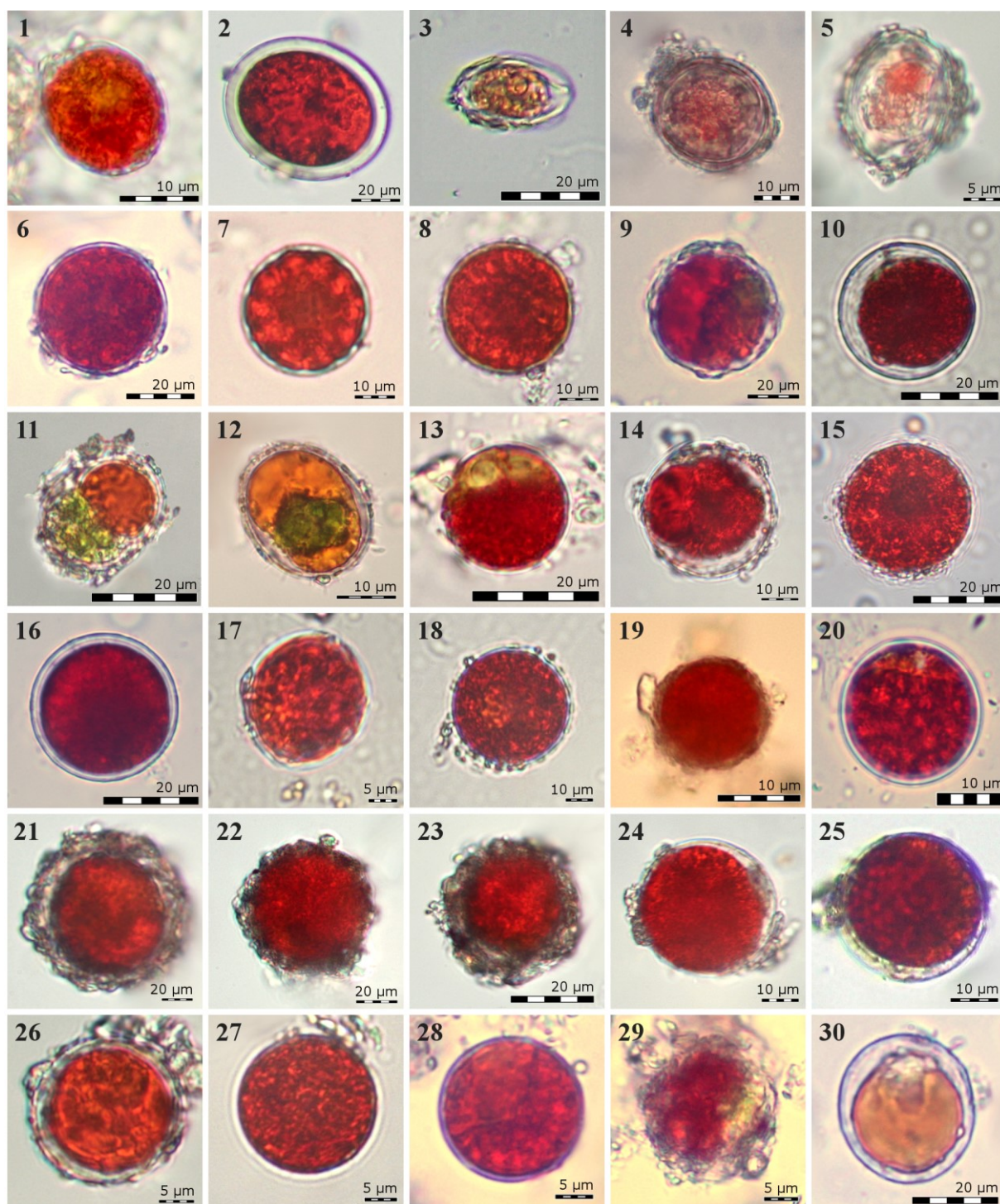
Zbarvení buněk bylo nejvíce homogenní ve vzorcích z Dolomit (č. 6–10). Ve vzorcích ze Slovinska (č. 1–2) měly velké buňky s průhledným okrajem vínovou barvu oproti menším kulatým buňkám (mikrofotografie 1 a 2 v Příloze 2). S rostoucí velikostí byly tmavší buňky ve vzorku Rondslettet sestup (mikrofotografie 16, Příloha 2). U řady vzorků bylo možné pozorovat různá zbarvení morfologicky a velikostně podobných buněk. Například u vzorků Rondslettet sestup (č. 16), Alterpragerhütte (č. 19), Nufenen Pass (č. 26) a Similaun (č. 28) jsou na mikrofotografiích zaznamenány červeně zbarvené buňky souběžně s buňkami oranžovými či zelenými. Červené zbarvení ale převládalo (Příloha 2).

Povrchová struktura buněk z jednotlivých vzorků byla zaznamenána pomocí SEM a její variabilita je znázorněna na obr. 28. Nejvýraznější povrchové struktury byly pozorovány u norského vzorku Bessegen (č. 17). Zároveň ale byly v tomto vzorku zastoupeny i hladké buňky a buňky s různými tvary výběžků a zvrásněním (obr. 29, 30). Dalším vzorkem s výrazným vrásněním povrchu byl Longyearbyen ze Svalbardu (obr. 28, č. 14) a Forcella dal Pief z Dolomit (obr. 28, č. 8). U posledního jmenovaného vzorku byly přítomné půlkulaté výběžky, které se objevují i u dalších vzorků nejen z Dolomit (obr. 31). Nejvíce homogenní byly vzorky ze švýcarských Walliských Alp, u kterých převažoval hladký povrch a velký průměr buněk (obr. 28, č. 24–26; obr. 32a). Naopak obecně u vzorků z Norska a Svalbardu byly přítomné různé povrchové struktury (obr. 28, č. 14–18). Ve vzorcích z rakouských Vysokých Taur byly zase buňky hojně obaleny vrstvou materiálu z okolí, která ztěžovala pozorování případných povrchových struktur (obr. 28, č. 24–26).

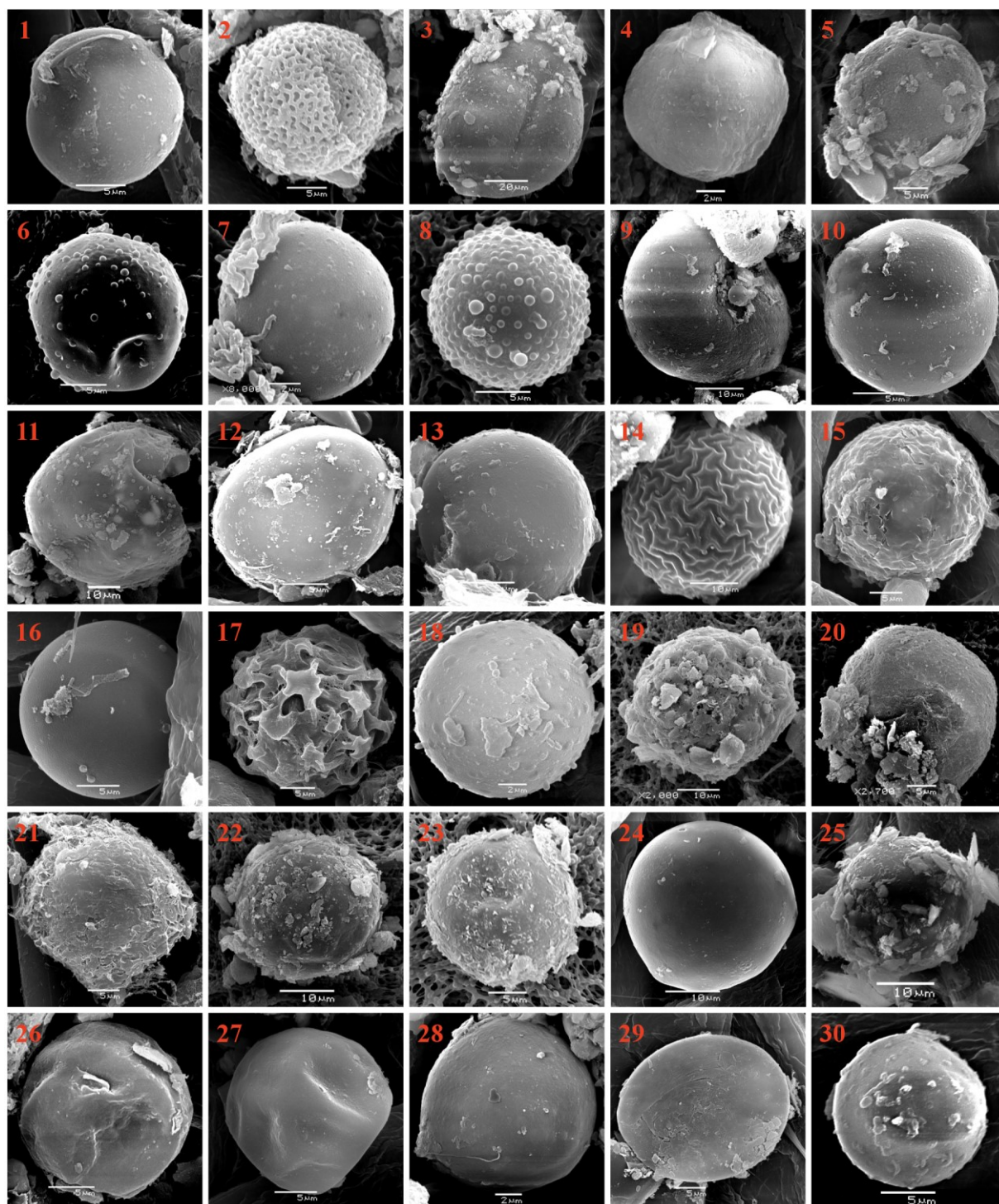
Obr. 26: Krabicové grafy průměrů buněk z jednotlivých lokalit seřazených dle tabulky 2. V názvu na ose x je uveden název lokality, kód země a číslo lokality dle tabulky 2. Podélnou čarou je označen medián, box zahrnuje hodnoty 2. až 3. kvartilu, „vousy“ zahrnují hodnoty 1. a 4. kvartilu. Barvy odpovídají členění dle oblastí.



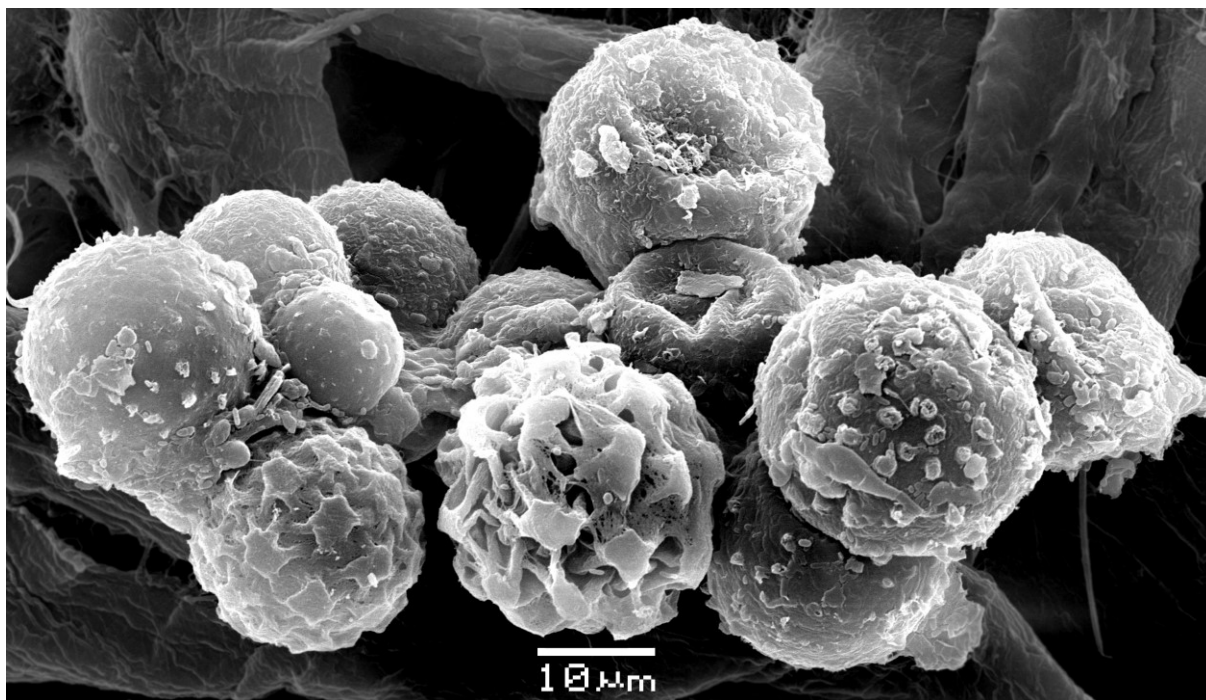
Obr. 27: Mikrofotografie buněk sněžných řas ze všech studovaných lokalit. Číslování odpovídá označení lokalit v tabulce 2, kapitola 3.1.



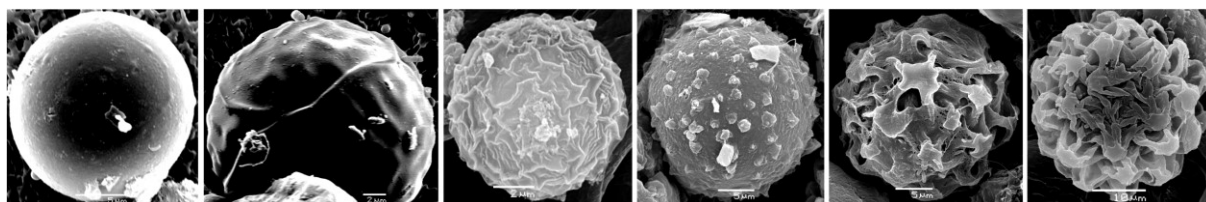
Obr. 28: Povrchová struktura buněk sněžných řas ze všech studovaných lokalit zobrazená pomocí SEM. Číslování odpovídá označení lokalit v tabulce 2, kapitola 3.1.



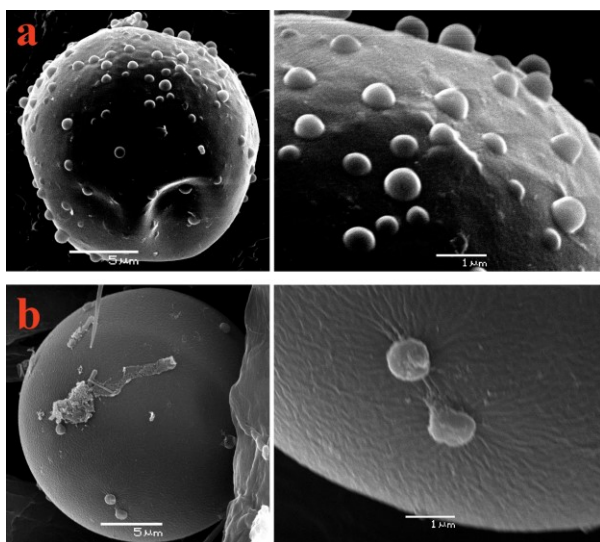
Obr. 29: Shluk buněk s různě výraznými povrchovými strukturami ve vzorku Bessegen.



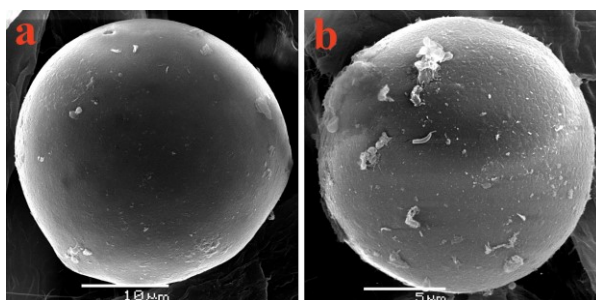
Obr. 30: Pozorované typy buněk dle povrchové struktury u vzorku Bessegen, Norsko.



Obr. 31: Půlkulaté výběžky na povrchu buněk (detail na fotografii vpravo), a - Val Rosalia, b - Ronslottet sestup.



Obr. 32: Hladký povrch buněk bez zjevných výběžků. Na povrchu je znatelný pouze okolní materiál ze vzorku. a - Weissmeisshütte, b - Cima de Costabella.



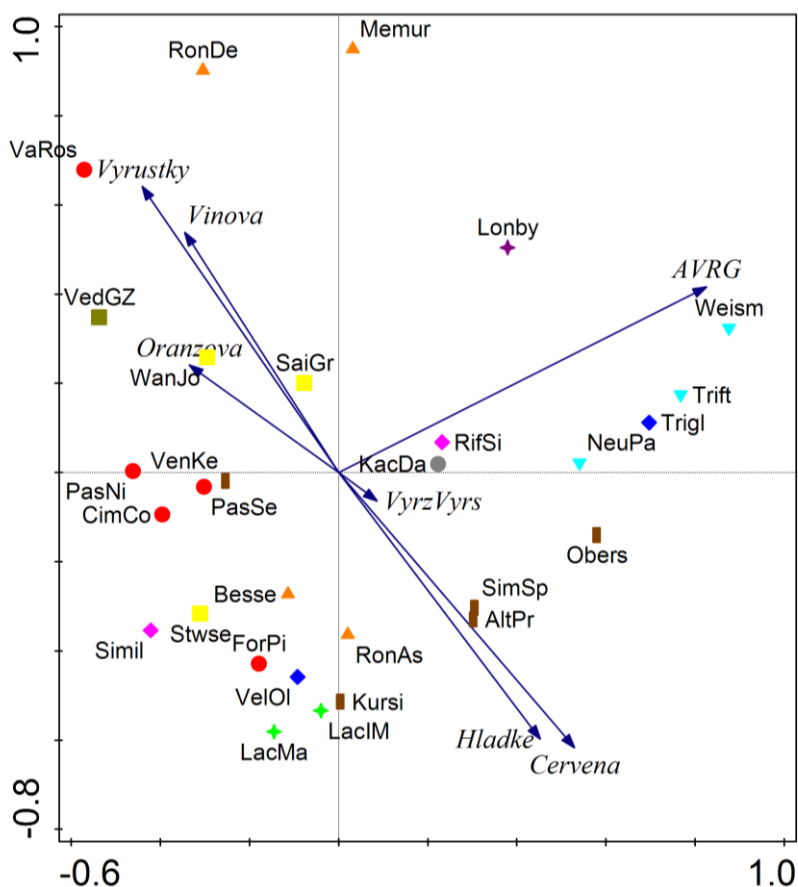
Variabilita v morfologických vlastnostech buněk a jejich korelace s lokalitou sběru byla analyzována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a redundanční analýzy (RDA). Z analýzy byl vyjmut vzorek Iezerul Muntinului (číslo lokality 3) kvůli výrazné morfologické odlišnosti od ostatních vzorků a předpokládané příslušnosti k jinému rodu.

První dvě osy PCA analýzy vysvětlily 53,6 % variability (tabulka 6). Z výsledků je zřejmá silná korelace mezi barvou buněk a jejich povrchem (obr. 33). Buňky, které měly oranžové či tmavší vínové zbarvení, byly většinou povrchově strukturované a měly nejružnější výběžky či pravidelně plastický povrch (nejednalo se tak o náhodnou deformaci buněk vlivem fixace pro SEM). Buňky s červeným zbarvením zase měly hladký povrch bez znatelných výběžků, či naopak převažovaly buňky s výrazně členitou povrchovou strukturou (např. vzorek Bessegen, č. 17, či Forcella dal Pief, č. 8).

Poměrně homogenní vzorky pocházely ze švýcarských Walliských Alp (č. 24–26), které byly díky velkým rozměrům buněk v kombinaci s hladkým povrchem výrazně odlišné od ostatních. Podobné byly také buňky ze dvou rumunských lokalit. Naopak velké rozdíly v morfologii povrchu buněk i jejich velikostí vykazovaly norské vzorky, kde dokonce vzorky z blízkých sněhových polí byly odlišné – vzorek Rondsletta výstup (č. 15) je ze severovýchodního úpatí hory Rondsletta a buňky jsou menší, červené a převažují ty s hladkým povrchem, zatímco buňky ze vzorku z jižního úpatí (č. 16) byly větší, vínové a byly přítomné pouze buňky s bradavičkatými výrůstky. Rozměry buněk byly také odlišné vzorky Ötztálských Alp (č. 27, 28), které však měly velmi podobnou povrchovou strukturu buněk. Naopak podobné rozměry buněk byly charakteristické pro vzorky z Dolomit (č. 6–10), povrchová struktura buněk zde ale byla variabilní.

Analýza RDA potvrdila statisticky významnou závislost morfologických charakteristik buněk na oblasti původu vzorku, geografické poloze a nadmořské výšce lokality (tabulka 7, test všech kanonických os: $p=0.004$). Tyto proměnné vysvětlily 63.6 % celkové variability.

Obr. 33: Ordinační diagram PCA (první dvě osy analýzy). Vzorky z jednotlivých lokalit a jejich morfologické vlastnosti (barva – oranžová, červená, vínová; průměrná hodnota rozměru buňky – AVRG; vnější morfologie buňky – hladké, s výrůstky, s výraznými výrůstky).



Symbol oblasti	Oblast	Lokality (v závorce uvedeno číslo lokality dle tabulky 2)
◆	Slovinsko - Julské Alpy	VelOI - Veliko Oltar (1), Trigl - Triglav (2)
★	Rumunsko - Parâng, Cindrel	LacMa - Lacul Mândra (4), LacIM - Lacul Iezerul Mic (5)
●	Itálie - Dolomity	VaRos - Val Rosalia (6), PasNi - Pas de San Nicolo (7), ForPi - Forcella dal Pief (8), PasSe - Pas de le Selle (9), CimCo - Cima de Costabela (10)
■	Itálie - Sarntalské Alpy	WanJo - Wannser Joch (11), SaiGr - Sailer Gruben (12), Stwse - Steinwandseen (13)
✦	Špicberky	Lonby - Longyearbyen (14)
▲	Norsko - Rondane, Jotunheimen	RonAs - Rondsletttet výstup (15), RonDe - Rondsletttet sestup (16), Besse - Bessegen (17), Memur - Memurubu (18)
▬	Rakousko - Vysoké Taury	AltPr - Alterpragerhütte (19), VenKe - Venedigerkees (20), Kursi - Kürsingerhütte (21), Obers - Obersulzbachkees (22), SimSp - Simonyspitze (23)
▼	Švýcarsko - Walliské Alpy	Weism - Weissmeishütte (24), Trift - Triftbach (25), NeuPa - Nuefenen Pass (26)
◆	Rakousko - Ötztálské Alpy	RifSi - Rif. Similaun (27), Simil - Similaun (28)
●	Turecko - Kaçkar Dağları	KacDa - Kaçkar Dağı (29)
■	Itálie - Ortler masiv	VedGZ - Vedretta del Gran Zebro (30)

Tabulka 6: Výstup z analýzy PCA.

Statistic	Osa 1	Osa 2	Osa 3	Osa 4
Eigenvalues	0.3228	0.2130	0.1554	0.1248
Explained variation (cumulative)	32.28%	53.58%	69.12%	81.60%

Tabulka 7: Výstup z analýzy RDA.

Statistic	Osa 1	Osa 2	Osa 3	Osa 4
Eigenvalues	0.2571	0.1443	0.1073	0.0549
Explained variation (cumulative)	25.71%	40.13%	50.87%	56.35%
Pseudo-canonical correlation	0.8884	0.8903	0.8238	0.5491
Explained fitted variation (cumulative)	42.99%	67.11%	85.06%	94.24%

4.3 Laboratorní kmeny

4.3.1 Kultivace a morfologie buněk

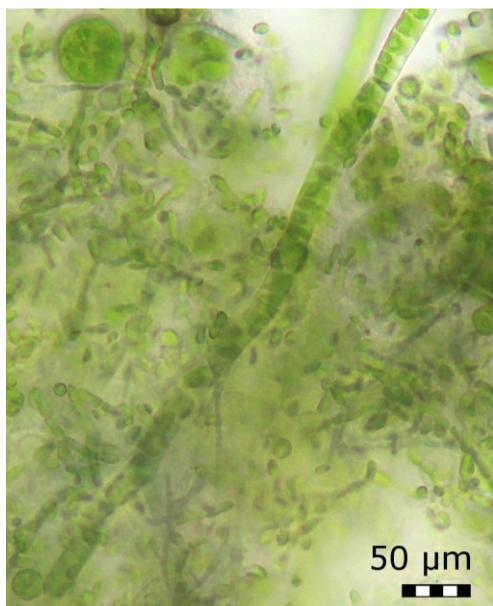
Kultivace buněk typu *Chlamydomonas* cf. *nivalis* v laboratorních podmínkách celkově nebyla úspěšná. Zprvu byly vzorky naočkovány do média BBM ve zkumavkách, kde však v drtivé většině vždy narostly vláknité řasy (obr. 34). Poté byla kultivace prováděna v Petriho miskách kvůli jejich větší ploše dna a tím lepšímu rozložení vzorku a přístupu světla k jednotlivým buňkám. Zde však bylo nutné přibližně dvakrát do týdne kontrolovat možné vyschnutí živného média. V případě růstu buněk zelených řas byly vzorky přeočkovány do Erlenmayerových baněk s čerstvým médiem BBM.

Celkově se podařilo udržet pouze jednu kulturu s buňkami podobnými *Cd.* cf. *nivalis* z terénních vzorků, která pocházela z lokality Rif. Similaun (lokalita č. 27). Ta se vyznačovala přítomností kulatých nepohyblivých buněk o průměru cca 18 µm, jejímž nápadným znakem byl protoplast oddělený od buněčné stěny a výrazná papila (obr. 35). Ve vzorku nebyly pozorovány bičíky buněk a některé buňky tvořily vcelku pravidelné shluky připomínající svým tvarem morulu.

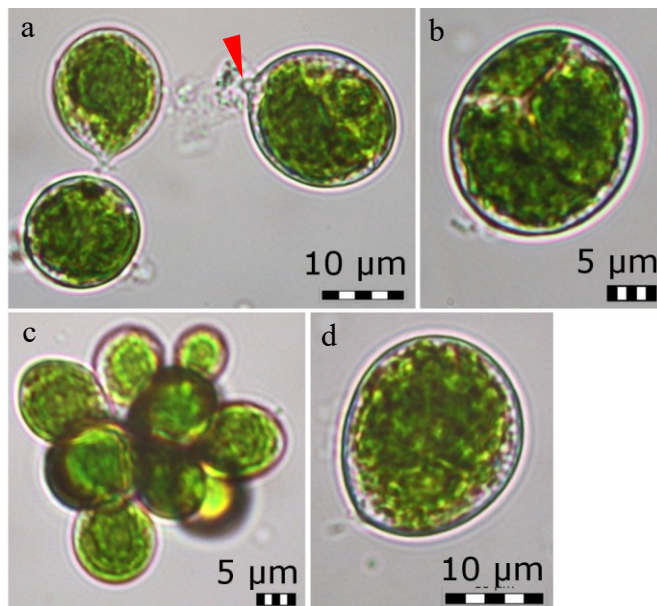
V ostatních případech červeně zbarvené buňky *Cd.* cf. *nivalis* z původních vzorků v kulturách zůstávaly bez morfologických změn, případně docházelo k jejich postupné degradaci. V řadě kultivací se však objevily jiné jednobuněčné zelené řasy, které jsem vyizolovala do čistých kultur. Podle morfologických charakteristik se jednalo převážně o bičíkovce z čeledi Chlamydomonadaceae (kultury z lokalit Veliki Oltar, č. 1, Triglav, č. 2, Lacul Mândra, č. 4) a kokální řasy typu *Coccomyxa* sp. (kultury z lokalit Cima de Costabella,

č. 10, Bessegen, č. 17, a Kürsingerhütte, č. 21), případně další (Pas de San Nicolo, č. 7, Kaçkar Dagi, č. 29). Z kultury Rif. Similaun a z dalších osmi kmenů zelených řas se podařilo izolovat a sekvenovat DNA.

Obr. 34: Mikrofotografie směsné kultury ze vzorku Nufenen Pass vyrostlé ve zkumavce.



Obr. 35: Mikrofotografie kultury Rif. Similaun s buňkami podobnými *Chlamydomonas nivalis*. Červená šipka označuje papilu.



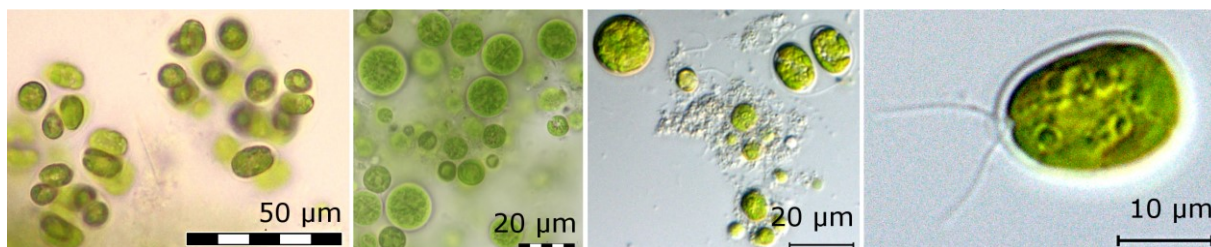
V kultuře z lokality Triglav jsem pozorovala jak oválné pohyblivé buňky s dvěma bičíky o délce přibližně 30 µm (typ *Chlamydomonas*), tak kulaté nepohyblivé buňky o velikosti kolem 15 µm (obr. 36). Některé nepohyblivé buňky byly spojené po dvou průhledným obalem. Podobný vzhled měly také buňky v kulturách z lokalit Veliki Oltar a Lacul Mândra. V kultuře Veliki Oltar nebyly pozorovány pohyblivé bičíkaté buňky, ale převažovaly kulaté nepohyblivé buňky, které měly průměr také cca 15 µm a dvojice buněk spojených slizovým obalem (obr. 37). V kultuře Lacul Mândra nebyly pozorované dvojice buněk, ale byly přítomné dvoubičíkaté buňky o délce cca 30 µm a dominovaly nepohyblivé kulaté buňky o průměru až 20 µm (obr. 38). U bičíkatých buněk bylo dobře viditelné stigma (obr. 38, označeno červenou šipkou) a pyrenoid chloroplastu (označen fialovou šipkou).

Buňky kmene z lokality Pas de San Nicolo se vyznačovaly široce oválným tvarem (obr. 39). Kultury z lokalit Cima de Costabella (obr. 40), Bessegen (obr. 41) a Kürsingerhütte (obr. 42) svou morfologií odpovídaly rodu *Coccomyxa*. Jednalo se o oválné buňky bez bičíků o délce až 8 µm a šířce do 4 µm. Jejich protoplast byl zčásti vyplněn zeleným chloroplastem a buněčná stěna byla tenká bez dalších obalů. Výrazněji protáhlé buňky byly ve srovnání

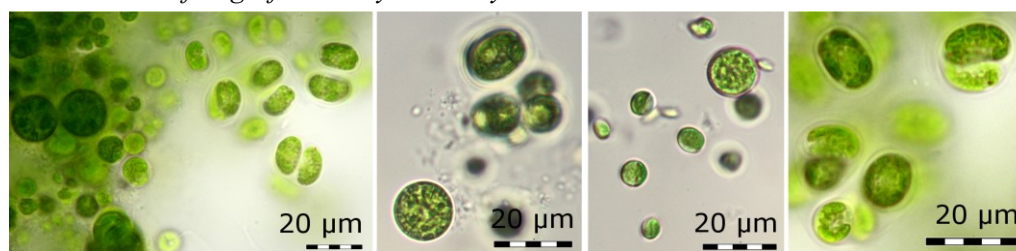
s kulturou Cima de Costabella charakteristické pro kmeny z lokalit Bessegen a Kürsingerhütte.

Nápadně odlišná byla kultura morfologicky odpovídající čeledi Scenedesmaceae z lokality Kaçkar Dagı. Buňky měly oválný až výrazně protáhlý tvar se zašpičatělými výběžky na obou pólech buňky a délce až 13 μm (obr. 43). Buňky byly v kultuře samostatně, ale nejčastěji tvořily čtyř- nebo osmibuněčná cenobia.

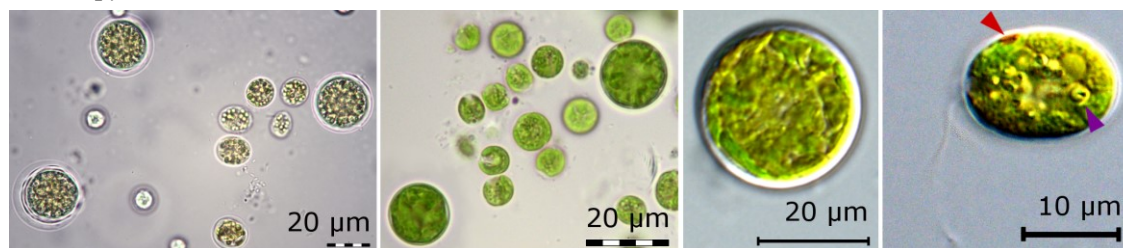
Obr. 36: Mikrofotografie kultury z lokality Triglav.



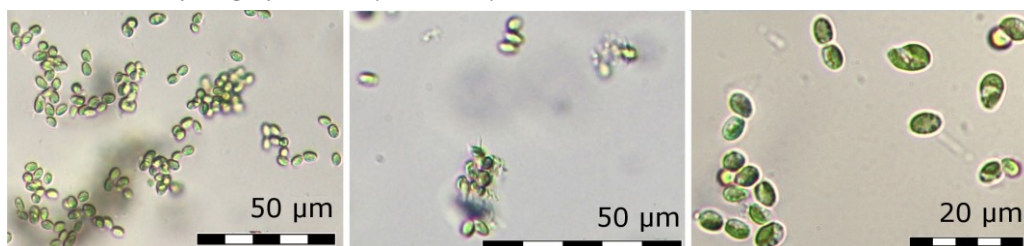
Obr. 37: Mikrofotografie kultury z lokality Veliki Oltar.



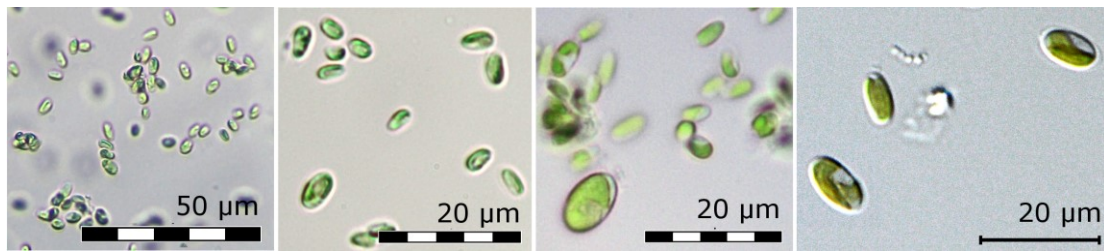
Obr. 38: Mikrofotografie kultury z lokality Lacul Mandra. Červená šipka označuje stigma, fialová pyrenoid.



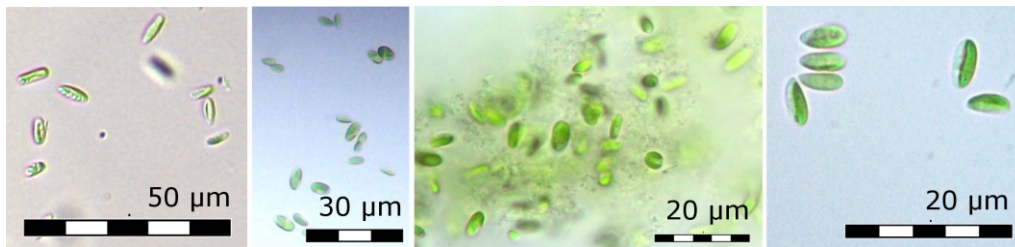
Obr. 39: Mikrofotografie kultury z lokality Pas de San Nicolo.



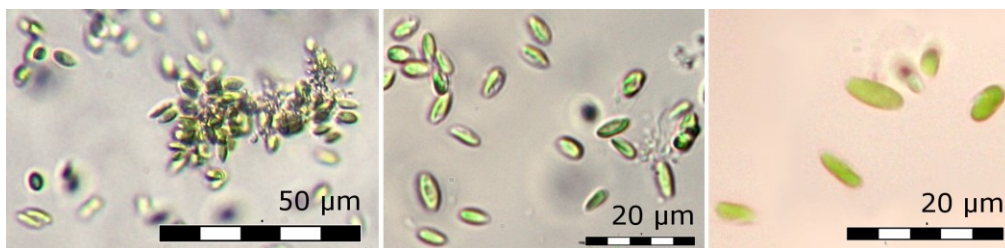
Obr. 40: Mikrofotografie kultury z lokality Cima de Costabella.



Obr. 41: Mikrofotografie kultury z lokality Bessegen.



Obr. 42: Mikrofotografie kultury z lokality Kürsingerhütte.



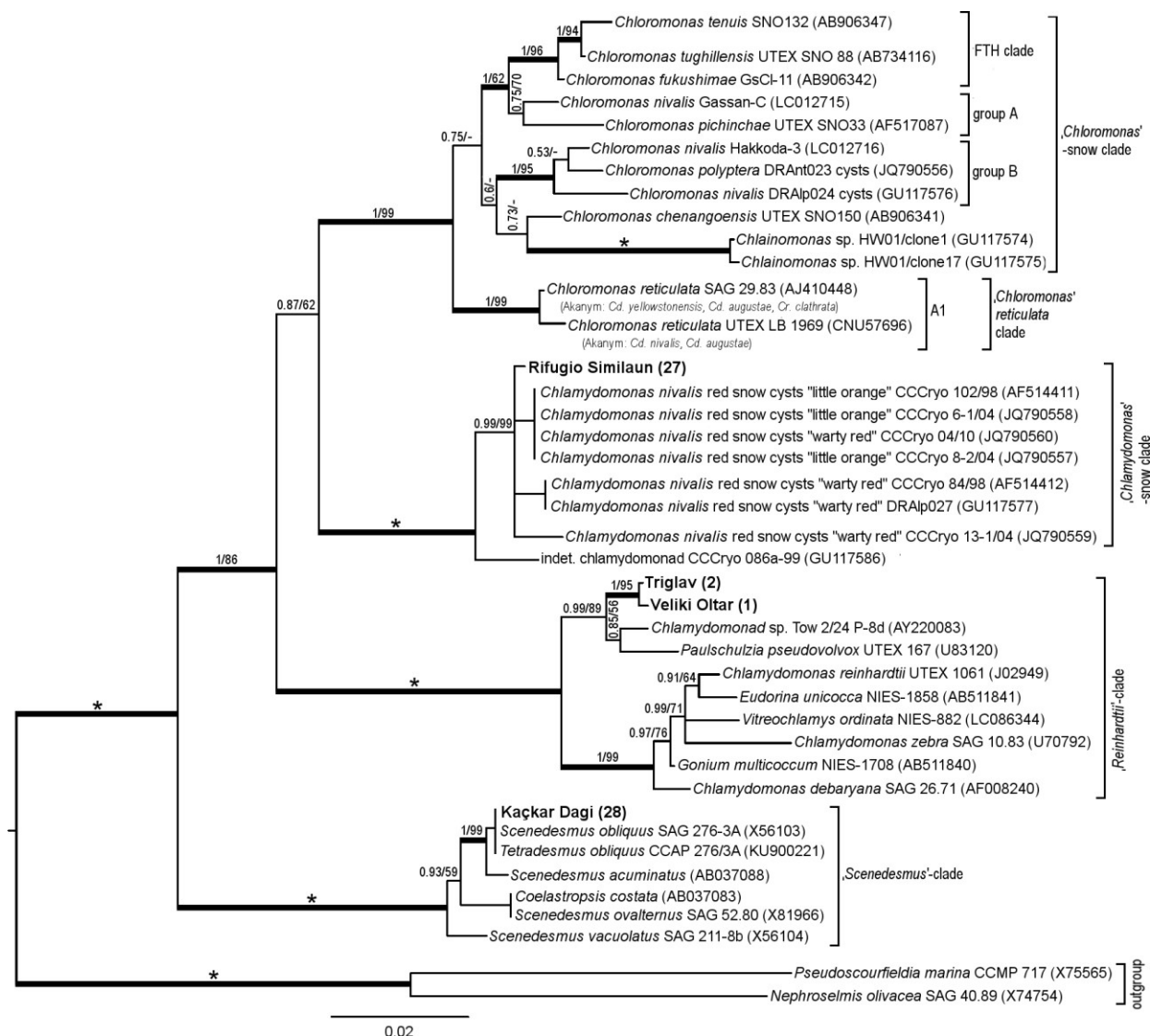
Obr. 43: Mikrofotografie kultury z lokality Kackar Dagi.



4.3.2 Fylogenetická analýza

Sekvence 18S rDNA kultur zelených řas vyobrazených v kapitole 4.3.1 jsou uvedeny v Příloze 3. Nalezení nejbližších sekvencí pomocí BLAST ukázalo, že tyto kmeny patří do tříd Chlorophyceae nebo Trebouxiophyceae. Výsledkem fylogenetických analýz sekvencí 18S rDNA jsou tedy dva stromy – první zahrnuje izolované kmeny patřící do třídy Chlorophyceae (obr. 44) a druhý zahrnuje kmeny řadící se do třídy Trebouxiophyceae (obr. 45). Topologie stromů získaných metodou Bayesiánské inference (BI) a maximální věrohodnosti (ML) byly stejné a zde jsou uvedeny stromy získané metodou BI.

Obr. 44: Bayesiánský fylogenetický strom založený na analýze sekvencí 18S rDNA. Nad větvemi jsou uvedené hodnoty posteriorní pravděpodobnosti a bootstrapové podpory. Plná statistická podpora větve je vyznačena hvězdičkou (*), větve s nejvyšší posteriorní pravděpodobností (1) jsou zvýrazněny tučně. Tučně vyznačené kmeny jsou nové sekvence získané v rámci této práce, v závorce je uvedeno číslo lokality dle tabulky 2. Za ostatními je uvedené přístupové číslo z databáze GenBank. Označení skupiny A1 je dle Hoham et al., 2002. Označení skupin „Chloromonas“, „snow clade“, „Chloromonas reticulata“-clade a „Chlamydomonas“-snow clade je dle Remias et al. (2013). „Reinhardtii“-clade a „Scenedesmus“-clade je dle Pröschold et al. (2001).



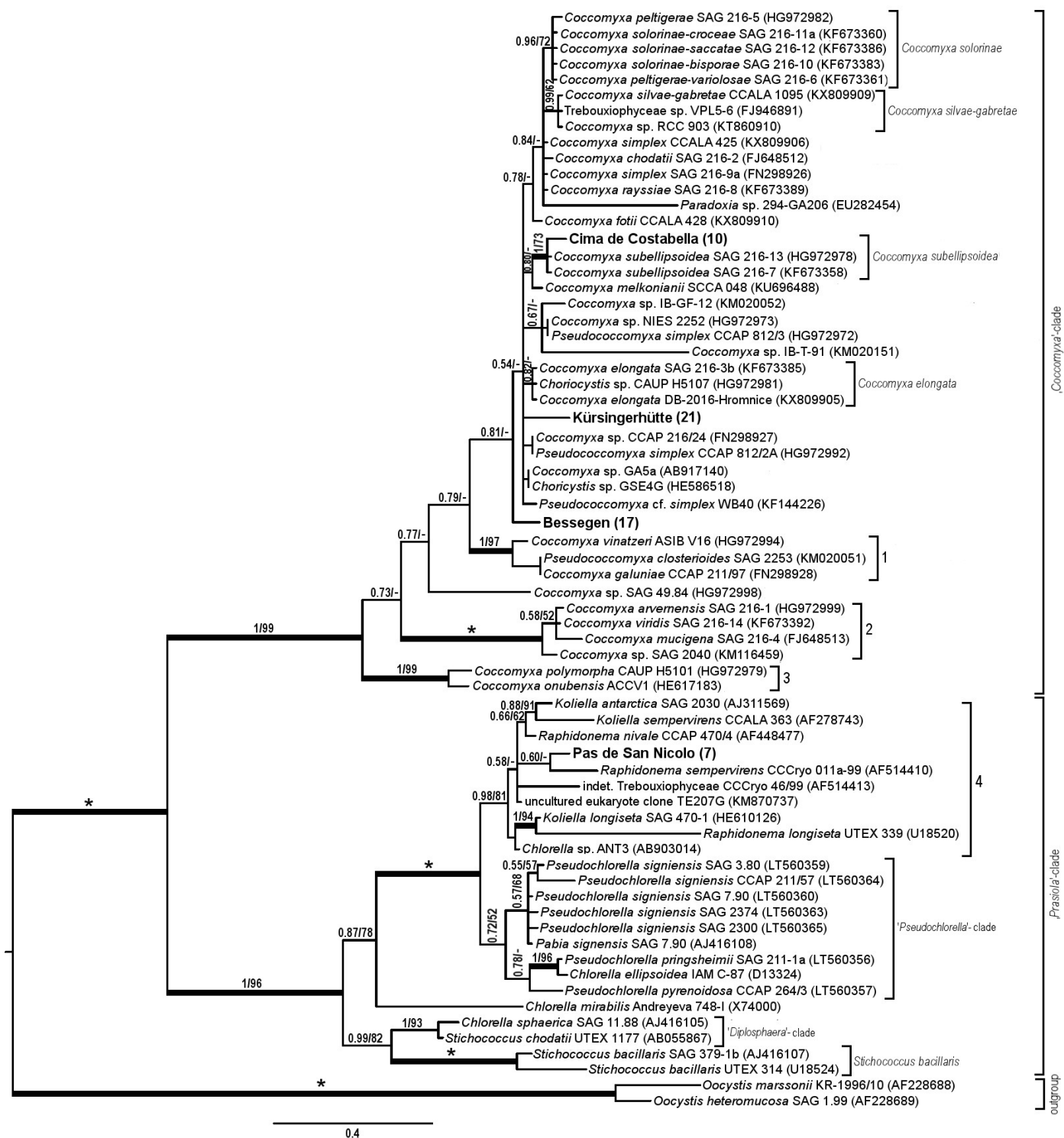
Fylogenetická analýza úseku 18S rDNA kmenů z třídy Chlorophyceae zahrnuje sekvence s délkou 1578 bází. Na základě této analýzy jsou tři nově izolované kmeny součástí čeledi Chlamydomonadaceae a jeden nový kmen součástí čeledi Scenedesmaceae.

Z fylogenetického stromu na obr. 44 je zřejmé, že kmen Rifugio Similaun je příbuzný se sporami *Cd. nivalis* získanými z přírodních vzorků a patří do monofyletické skupiny ‚*Chlamydomonas*‘-snow clade, která zahrnuje sekvence ze Svalbardu a z rakouských Alp. U kmene Rifugio Simiaun se podařilo amplifikovat pouze část úseku 18S rDNA ve směru reverse (směr 3' → 5') o délce 671 bází. V této části není identická s žádnou dosud publikovanou sekvencí 18S rDNA *Cd. nivalis*. Od kmenů *Cd. nivalis* CCCryo 6-1/04 (GenBank: JQ790558), CCCryo 04/10 (JQ790560), CCCryo 8-2/04 (JQ790557) a DRAlp027 (GU117577) se liší v sedmi nukleotidech. U všech sedmi pozic se u kmene Rifugio Similaun jednalo o dvojznačné baze.

Kmeny Veliki Oltar a Triglav jsou součástí ‚*Reinhardtii*‘-clade. V rámci této skupiny ale tvoří samostatnou dobře podpořenou vývojovou linii, která je příbuzná kmenům *Chlamydomonad* sp. Tow 2/24 P-8d a *Paulschulzia pseudovolvox* UTEX 167. Sekvence kmene Veliki Oltar a Triglav se liší jednou nukleotidovou změnou (na úseku 1602 bází). Sekvence kmene Veliki Oltar je z 99 % identická s kmenem *Chlamydomonad* sp. Tow 2/24 P-8d, shoda Veliki Oltar vs. *Chlamydomonad* sp. Tow 2/24 P-8d je 1589/1603 (liší se v sedmi nukleotidech). Sekvence kmene Triglav je také z 99 % identická s *Chlamydomonad* sp. Tow 2/24 P-8d, shoda sekvence Triglav vs. *Chlamydomonad* sp. Tow 2/24 P-8d je 1602/1615 (liší se ve 14 nukleotidech). Do analýzy nebyl zahrnut rumunský kmen Lacul Mândra, který byl sice 100 % identický s kmeny Veliki Oltar a Triglav, ale chyběla velká část středu sekvence, kde byly slovinské kultury odlišné jednou pozicí, takže nebylo možné určit jejich vzájemnou příbuznost.

Kmen Kaçkar Dagi je součástí dobře podpořené skupiny ‚*Scenedesmus*‘-clade (Sphaeropleales, Scenedesmaceae). Na úseku 18S rDNA zahrnutém do fylogenetické analýzy byl identický s kmeny *Scenedesmus obliquus* SAG 276-3a a *Tetradesmus obliquus* CCAP 276/3A. Při porovnání celého rozsahu sekvence Kaçkar Dagi se sekvencí *Tetradesmus obliquus* CCAP 276/3A je shoda v 1642/1645 pozic a liší se ve třech nukleotidech.

Obr. 45: Bayesiánský fylogenetický strom založený na analýze sekvencí 18S rDNA. Nad větvemi jsou uvedené hodnoty posteriorní pravděpodobnosti a bootstrapové podpory. Plná statistická podpora větve je vyznačena hvězdičkou (*), větve s nejvyšší posteriorní pravděpodobností (1) jsou zvýrazněny tučně. Tučně vyznačené kmeny jsou nové sekvence získané v rámci této práce, v závorce je uvedeno číslo lokality dle tabulky 2. Za ostatními je uvedené přístupové číslo z databáze GenBank. Označení skupin „Coccomyxa“-clade je dle Malavasi et al. (2016). Označení skupin „Prasiola“-clade je dle Hodač et al. (2016). Skupiny 1, 2, 3 a 4 jsou názvy kladů, které jsou vymezeny v této práci.



Fylogenetická analýza 18S rDNA zástupců třídy Trebouxiophyceae zahrnuje sekvence s délkou 1762 bází. Na základě těchto analýz jsou tři nově izolované laboratorní kmeny součástí kladu „*Coccomyxa*“ a jeden nový kmen je blízce příbuzný s organismy v kladu „*Prasiola*“.

Z Bayesiánského stromu na obr. 45 je zřejmé, že kmen Cima de Costabella z Dolomit (Itálie) je součástí skupiny *Coccomyxa subellipsoidea*. S vysokou statistickou podporou je příbuzný s kmeny *Coccomyxa subellipsoidea* SAG 216-13 a *Coccomyxa subellipsoidea* SAG 216-7. Při porovnání celého úseku sekvence 18S rDNA kmene Cima de Costabella s kmenem *Coccomyxa subellipsoidea* SAG 216-13 je shoda v nukleotidech 1819/1872 (shoda 97 % a liší se v 53 nukleotidech). Při porovnání celého úseku sekvence kmene Cima de Costabella s kmenem *Coccomyxa subellipsoidea* SAG 216-7 je shoda stejná jako v předchozím případě (1819/1872). U kmene Cima de Costabella byl při tvorbě fylogenetického stromu vyřiznut intron na pozici 371. Intronová část je v sekvenci v Příloze 3 označena modře kurzívou. Tato intronová oblast je přítomná i u sekvencí kmenů *Coccomyxa subellipsoidea* SAG 216-13 a *Coccomyxa subellipsoidea* SAG 216-7.

Další kmen, Kürsingerhütte z Vysokých Taur (Rakousko), tvoří samostatnou vývojovou větev. Z jeho umístění není možné usuzovat na příbuznost se známými liniemi v rámci *Coccomyxa simplex* sensu Darienko et al. (2015).

Kmen Bessegen z Norska je také součástí kladu „*Coccomyxa*“, v rámci kterého tvoří samostatnou vývojovou linii s nízkou statistickou podporou.

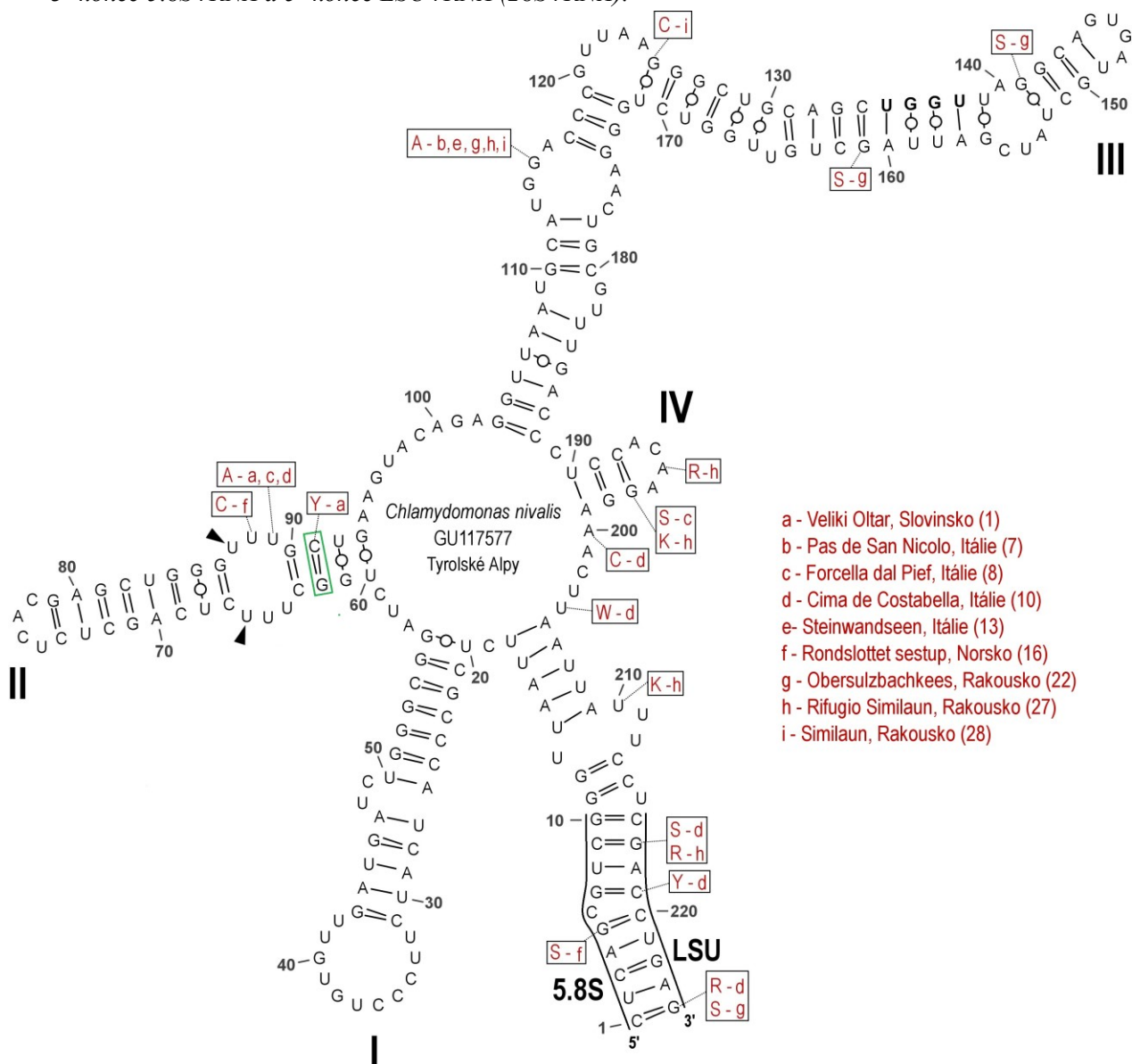
Jediný nově izolovaný kmen, který je součástí kladu „*Prasiola*“, je Pas de San Nicolo. Spadá do statisticky dobře podpořené skupiny 4. Je příbuzný s kmenem *Raphidonema sempervirens* CCCryo 011a-99, se kterým je z 99 % identický, shoda je 1433/1437 (liší se ve 4 nukleotidech).

4.4 Sekundární struktura ITS2 z terénních vzorků

Podařilo se osekvenovat devět celých úseků ITS2 z šesti různých evropských pohoří (v závorce uveden počet vzorků): Slovinské Alpy (1), Dolomity v Itálii (3), Sarntalské Alpy v Itálii (1), Norsko (1), Vysoké Taury v Rakousku (1) a Ötztálské Alpy v Rakousku (2). U vzorku z Walliských Alp ve Švýcarsku (lokalita 25) se úspěšně sekvenoval jen částečný úsek ITS2 a proto do analýzy sekundární struktury nebyl zahrnut (identita 152/159 bází s GU117577). Získané sekvence ITS2 jsou uvedeny v Příloze 5 (pro účely složení stemu sekundární struktury byl zahrnut konec 5.8S rRNA a začátek 26S rRNA). Sekundární

struktura ITS2 byla porovnána s *Chlamydomonas nivalis* (GenBank: GU117577, Remias et al. 2010). Jak je vidět na obr. 46, sekundární strukturu *Cd. nivalis* tvoří čtyři helixy, z nichž nejdelší je helix III. Při porovnání sekundární struktury ITS2 všech devíti nových sekvencí se sekvencí *Cd. nivalis* byly nukleotidové rozdíly zaznamenány na II., III., IV. helixu a mezi IV. helixem a stemem. Ve všech případech nebyla v konzervativních oblastech nalezená žádná CBC, ale byla zjištěna přítomnost jedné hCBC na II. helixu u vzorku Veliki Oltar (zelený rámeček na obr. 46). Na této pozici byla detekována dvojznačná báze Y (velmi pravděpodobná přítomnost cytosinu a thyminu na jedné pozici v sekvenci DNA).

Obr. 46: Grafické znázornění sekundární struktury transkriptu ITS2 *Chlamydomonas nivalis* (GenBank: GU117577). Změny ve struktuře u nově sekvenovaných vzorků jsou znázorněny červeně v rámečku: velká písmena označují odlišné báze, malá písmena odkazují na příslušnou lokalitu (legenda je vpravo od struktury, číslo lokality v závorce se odkazuje na tabulku 2). Pozice hemi kompenzační záměny bází (hCBC) objevená v konzervovaném úseku sekundární struktury je označena zeleným rámečkem. Římské číslice označují čtyři helixy. Šipkami je vyznačena pyrimidin-pyrimidin neshoda na helixu II, motiv UGGU na 5' straně u konce helixu III je označen tučnými písmeny. Struktura zahrnuje 3' konec 5.8S rRNA a 5' konec LSU rRNA (28S rRNA).



5 Diskuze

5.1 Charakteristika lokalit

Charakter lokalit, kde byly vzorky nasbírány, ve všech případech souhlasil s popisem lokalit výskytu sněžných řas z čeledi Chlamydomonadaceae, které způsobují červený sníh (Gradinger & Nürnberg, 1996; Remias et al., 2005; Stíbal et al., 2007; Remias et al., 2010). Jednalo se o sněhová pole s menším sklonem, zpravidla v údolích nebo na úpatí svahů, kde byla možnost kumulace vody z tání sněhu a zároveň byla lokalita téměř celý den vystavena přímému slunečnímu záření. Tyto podmínky jsou považovány za optimální prostředí pro výskyt sněžných řas vzhledem k přítomnosti kapalné vody s rozpuštěnými živinami, jejichž zdrojem je zejména horninové podloží (Newton, 1982; Lütz-Meindl & Lütz, 2006; Remias et al., 2005).

Dobře rozpoznatelným byl také vektor přenosu řasových buněk, kterým může být především vítr a stékající voda (Light & Belcher, 1968; Hoham et al., 1998; Kvíderová, 2012). U sněhových polí se sklonem se červené zbarvení koncentrovalo hlavně v okolí stružek, které stékající voda ve sněhových polích vytvořila. Červené zbarvení se často vyskytovalo kolem různorodého materiálu přineseného větrem z okolí. Pravděpodobně z toho důvodu, že tento materiál může být zdrojem inokula sněžných řas (Light & Belcher, 1968), ale především proto, že v oligotrofním prostředí sněhu (Hoham & Duval, 2001) je materiál pro organismy bohatým zdrojem živin (Lutz et al., 2014). U menších sněhových polí v přímém kontaktu s půdou, např. Sailer Gruben (Itálie), Memurubu (Norsko), byla patrným zdrojem řas půda a stékající voda, zatímco u rozsáhlých oblastí výskytu jako jsou po celý rok přetrvávající ledovce, např. vzorek Similaun (Rakousko), byl hlavním zdrojem sněžných řas pravděpodobně materiál transportovaný větrem z okolí či odolná stadia buněk z předchozích sezón (Müller et al., 2001).

V místech s vysokou koncentrací červeně zbarvených řas na povrchu se tvořily nápadné jamky a prohlubně, které byly důsledkem zvýšené absorpce slunečního záření řasami. V těchto jamkách se dále akumulovala voda, se kterou byly přinášeny další řasy a materiál z okolí, který také absorboval sluneční záření a snižoval tak albedo povrchu sněhu. Snížení albeda sněhu a absorpce slunečního záření řasami tak má přímý podíl na zrychlení odtávání sněhu a ledovců (Kohshima et al., 1993; Takeuchi et al., 2001; Lutz et al., 2014).

U výrazně zbarvených polí byla také často nápadná horizontální stratifikace zbarvení sněhu, kdy výrazné zbarvení bylo přímo na povrchu, a poté až 3-4 cm pod povrchem.

Důvodem je reakce sněžných řas na nadměrné sluneční záření (Gorton & Vogelmann, 2003) v kombinaci se změnami výšky sněhové pokrývky (Hoham et al., 1980; Stibal et al., 2007). Pohyblivé zoospory totiž migrují ve sněhovém sloupci, kde se pak vlivem vyčerpání živin přemění v odolné zygospor. Poté naroste výška sněhové pokrývky a část zoospor bude opět migrovat k povrchu sněhu, kde se pak také přemění v odolné zygospor či cysty. Část sněhu pak odtaje, sluneční záření prostoupí níže do sněhové pokrývky a buňky na povrchu i ve sněhovém sloupci začnou produkovat ochranné sekundární karotenoidy, které jsou důvodem nápadného zbarvení ve vrstvách (Hoham, 1989a; Hoham, 1989b; Hoham & Duval, 2001; Stibal et al., 2007). Větší koncentrace nepohyblivých buněk sněžných řas, která byla často patrná až cca 4 cm pod povrchem sněhu, je tedy způsobená migrací pohyblivých zoospor níže ve sněhovém sloupci v důsledku ochrany před nadměrným slunečním zářením, přeměnou zoospor v nepohyblivé cysty, odtáním částí povrchu sněhu a následnou ochranou cyst proti nadměrnému slunečnímu záření indukci sekundárních karotenoidů, především červeného astaxanthinu (Bidigare et al., 1993; Gorton et al., 2003; Stibal et al., 2007).

5.2 Morfologie buněk z terénních vzorků

Pozorování na základě světelné mikroskopie ukázala, že nejrozšířenějším typem řas v červeném sněhu byly nepohyblivé buňky odpovídající popisu *Chlamydomonas nivalis*, který je z terénních vzorků obecně charakterizován jako kulaté červené až vínové buňky s jednovrstevnou buněčnou stěnou, od které není protoplast oddělen (Remias et al., 2005). Buňky mohou být obalené materiálem z okolí a díky slizovité vrstvě spojené do shluku (Gradinger & Nürnberg, 1996). Tomuto popisu odpovídala většina vzorků, konkrétně vzorky z Dolomit (v tabulce 2 označené jako 6–10), z italského Steindwandseen (13), Svalbardu (14), Norska (15–18), Vysokých Taur (19–23), Švýcarska (24–26), Ötztálských Alp (27–28) i z Turecka (29). Je ale nutné zmínit, že rozlišení na bázi světelné mikroskopie je nedostačující a pouze orientační, protože odpočívající stádia (hypnoblasty) sněžných řas jsou si v optickém mikroskopu velmi podobné a většinu struktur včetně chloroplastu překrývá červený astaxanthin (Remias et al., 2005). Navíc, jak uvádí již Kol (1968), *Cd. nivalis* je považován za sběrný druh, který zahrnuje morfologicky podobné druhy.

Ve vzorcích s buňkami typu *Cd. nivalis* bylo možné na základě skenovací elektronové mikroskopie pozorovat čtyři základní typy povrchu buněk, které odpovídají pozorování, které publikoval Leya (2003). Prvním typem jsou buňky s hladkou buněčnou stěnou bez dalších struktur, maximálně mírně zvlněnou (např. Cima de Costabella na obr. 32b; Nufenen Pass na obr. 28, č. 26). Dalším typem jsou buňky s tzv. bradavičkami, na které poukazoval

už Müller et al. (1998). Bradavičky jsou na buňkách řídce (Rondslottet sestup, obr. 28, č. 16) či hustěji zastoupené (Forcella dal Pief, obr. 28, č. 8). Třetím typem jsou buňky s vrstveným povrchem jakoby se odlupujícím (Rondslottet výstup, obr. 28, č. 15; Kürsingerhütte, obr. 28, č. 21). Posledním a nejvýraznějším typem jsou buňky s výrazným strukturováním povrchu připomínající broušený rubín, které byly pozorované jen u lokality Bessegen (obr. 29, obr. 30 první dvě fotky zprava). Stejně jako v publikaci Müller et al. (1998) i zde je patrný vývoj profilace těchto struktur, které se nejspíše mění se stářím buněk. Je však důležité zmínit, že některá stadia vývoje těchto povrchových struktur jsou nápadně podobná těm, co publikoval Hoham et al. (1979) u druhu *Chloromonas brevispina* ze Severní Ameriky ze zeleného a červeného sněhu. Nejvíce je to patrné u špičatých výběžků povrchu buněk (obr. 29). Je tedy otázkou, zda se opravdu jedná jen o jeden druh buněk, který se liší svým stářím, nebo je ve vzorku zastoupeno více druhů s odlišnou morfologií povrchu.

Zajímavý povrch měly některé buňky ve vzorku ze Svalbardu. Jejich povrch byl výrazně zvrásněný (obr. 28, č. 14) a nelze jej připodobnit ani k jednomu typu povrchu buněk dle Leya (2003), ani k jinému povrchu buněk řas ze sněhu, které byly zachyceny SEM a publikovány.

Buňky morfologicky odlišné od typu *Cd. nivalis*, jsem pozorovala ve vzorcích ze Slovinska (obr. 27, č. 1–2), Rumunska (obr. 27, č. 3–5), části Sarntalských Alp (obr. 27, č. 11–12) a z italského Ortleru (obr. 27, č. 30).

Ve vzorcích ze Slovinska byly patrné dva typy buněk – kulaté červené až červenooranžové buňky s hladkým nebo členitým povrchem s přidruženým materiálem z okolí a větší oválné buňky se zřetelným tlustým průhledným okrajem. První typ buněk odpovídá obecně popsanému *Cd. nivalis* (Kol, 1968; Remias et al., 2005). Druhý typ buněk odpovídá popisu druhu *Chlainomonas* sp. (Novis et al., 2008; Remias et al., 2016), který je nápadný svou velikostí, a hlavně výrazným průhledným okrajem, může mít i protoplast oddělený od buněčné stěny na rozdíl od *Cd. nivalis* (Remias et al., 2016). Dle elektronové mikroskopie byly v prvním vzorku, Veliki Oltar, zastoupeny pouze buňky s hladkým povrchem bez dalších struktur. Na základě menší velikosti (cca 15 µm) je možné předpokládat, že se pravděpodobně jednalo o buňky *Cd. cf. nivalis* (Remias et al., 2005). Naopak ve druhém vzorku, Triglav, je na snímku jasně patrný strukturovaný povrch připomínající síťovanou schránku (obr. 28, č. 2), který byl popsán u druhu *Chlainomonas kolii* (Novis et al., 2008). Sněžné řasy z rodu *Chlainomonas* byly doposud popsány z lesních lokalit či vázané na těžký mokřý sníh povrchu zamrzlých jezer či ledovců, kde pak buňky přečkávají do další sezóny, protože jsou více náchylné k vysychání a vyšším teplotám než *Cd. nivalis* (Remias et al., 2016). Vzorky ze Slovinska jsou ale ze sněhových polí, které v daném místě celoročně nepřetržují. Trvalá

sněhová pole se však vyskytují poblíž v nižších ne tolik exponovaných místech (TNP, 2017; Tadeáš Gregor osobní sdělení), kam můžou být buňky *Chlainomonas* přeneseny stékající vodou z tajících polí, kde přetrvávají a poté jsou rozneseny větrem podobně jako v hypotéze o přenosu buněk na Svalbardu (Müller et al., 2001).

Popisu rodu *Chlainomonas* jsou podobné i některé buňky ve vzorcích Rondslettet sestup, Bessegen, Memurubu a Venedigerkees (mikrofotografie 16, 17, 18 a 20 v Příloze 2). Na rozdíl od výrazně větších buněk, které byly ve vzorku Triglav, se tyto buňky od ostatních ve vzorku výrazně velikostně neliší, ale od popisu typické buňky *Cd. nivalis* se odlišují průhledným okrajem a odděleným protoplastem od buněčné stěny. Jelikož byly fotografie pořízené v různém časovém období, můžu se však také jednat pouze o projev degradace buněk. U vzorku Venedigerkees je však patrná mírně oválná buňka s odděleným protoplastem od buněčné stěny na pólech a výrazně světlejší oblast jádra, jak u *Chlainomonas* sp. popisuje Remias et al. (2016).

Již na první pohled odlišné svým tvarem i zbarvením byly buňky z rumunského vzorku Iezerul Muntinului. Buňky mají žlutohnědé až oranžové zbarvení, výrazně protáhlý tvar a u některých buněk byla patrná podélná žebra, která se však na SEM snímcích nepodařilo zachytit. Podobné byly zygosporu druhu *Chloromonas nivalis* z balkánské Staré Planiny včetně žlutooranžované olejové kapénky a špičatého výrůstku na každém konci (Lukavský & Cepák, 2010), z Vitoše (Lukavský et al., 2009) i z Alp (Remias et al., 2010b). Balkánské lokality (Lukavský et al., 2009; Lukavský & Cepák, 2010) se také nacházely ve výšce kolem 2000 m. n. m., vzorky byly odebrány během května a června jako rumunské vzorky a nachází se v podobné geografické poloze. S velkou pravděpodobností by se tak mohlo jednat o tento druh.

Buňky s oranžovým zbarvením, oválným až protáhlým tvarem byly pozorovány i ve vzorcích Wannser Joch (obr. 27, č. 11), Sailer Gruben (obr. 27, č. 12) a z Ortleru (obr. 27, č. 30). Dle světelné mikroskopie také odpovídají druhu *Chloromonas nivalis* (Lukavský et al., 2009; Remias et al., 2010b). Na SEM snímcích se ale podařilo zachytit jen kulaté a mírně oválné buňky s hladkou buněčnou stěnou nebo buňky s výstupky „bradavičkami“, jak je popisuje Müller et al. (1998) ale pro druh *Cd. nivalis*. Možným vysvětlením je, že v rámci lokalit bylo ve vzorcích více druhů způsobující červeně zbarvený sníh (Kvíděrová, 2012; Lutz et al., 2016), ale fixací došlo k porušení buněk s žebry, protože postup fixace buněk pro SEM byl odlišný, než měl např. Remias et al., 2010b pro buňky *Chloromonas nivalis*, a proto vzhled buněk ze světelného mikroskopu neodpovídá pozorování v SEM.

Barevná odlišnost buněk v rámci jednoho vzorku je dána buď zastoupením více druhů řas, jako je tomu například u vzorku Veliki Oltar a Triglav popsanych výše, nebo různým obsahem sekundárních karotenoidů (Bidigare et al., 1993; Remias et al., 2010; Řezanka et al., 2013). Ty jsou reakcí na extrémní podmínky prostředí, jako je především vysoká intenzita ozáření. Při vysoké hodnotě ozáření reagují nepohyblivá stadia sněžných řas zvýšenou tvorbou sekundárních karotenoidů, které jim dávají až vínové zbarvení. Je tak jasná závislost obsahu karotenoidů, který vede k zbarvení buňky, a hodnotou intenzity záření v místě výskytu, která může být u vínově zbarvených buněk až 5x vyšší než u oranžových buněk (Stibal et al., 2007). Ve shluku buněk je často patrné, že zastíněné buňky jsou oproti těm v horní vrstvě světlejší. To může být dáno právě tím, že intenzita záření u těchto buněk je nižší a buňka tak nemá potřebu se chránit vyšší produkcí sekundárních karotenoidů.

Největších rozměrů dosahovaly buňky z terénních vzorků ze Švýcarska (lokality 24–26), jejichž průměrná velikost dosahovala až 34 μm (maximum 62 μm). Pro druh *Cd. nivalis* jsou publikované většinou menší rozměry (Gradinger & Nürnberg, 1996; Remias et al., 2005; Stibal et al., 2007), ale zmiňované jsou i rozměry až 50 μm (Kol, 1942; Ettl, 1976; Gorton et al., 2001; Leya, 2003). Menší rozměr buněk je většinou popisován u oranžově a světle červeně zbarvených buněk, zatímco větší průměr u tmavě červeně a vínově zbarvených buněk, což pravděpodobně souvisí se stářím buněk a se zvyšujícím se obsahem sekundárních karotenoidů (Müller, 1998; Leya, 2003; Remias et al., 2005).

Dle PCA analýzy (obr. 33) je vidět, že lokality z určité oblasti nejsou rozmístěny v celém ordinačním grafu, ale jsou jen v určité oblasti na základě morfologických znaků. Dobře je to vidět například na vzorcích z Itálie (Dolomity 6–10, Sarntalské Alpy 11–13), z Rumunska (4–5), či ze Švýcarska (24–26), což napovídá tomu, že morfologie vzorků je ovlivněna lokalitou původu. To potvrdila i RDA analýza, ze které je patrné, že 63,6 % morfologické variability vysvětluje oblast původu, geografickou polohu a nadmořská výška. Tyto rozdíly mezi jednotlivými lokalitami mohou být způsobeny tím, že ve vzorcích se vyskytuje více druhů, ale charakter vzorků pravděpodobně také ovlivňují rozdíly v klimatických podmínkách lokalit a termín odběru vzorků. Pro porovnání vzorků by tedy bylo vhodné odebrat vzorky ve stejný rok a při plánování termínu zohlednit nadmořskou výšku zeměpisnou šířku lokality. To je však z logistických důvodů velmi obtížné.

5.3 Laboratorní kmeny

5.3.1 Kultura druhu *Chlamydomonas cf. nivalis*

Neúspěšnost kultivace čisté kultury sněžných řas podobných *Chlamydomonas nivalis* byla z velké části zapříčiněna heterogenitou vzorků z terénu. Ve vzorcích byl často pozorován anorganický materiál v podobě úlomků hornin a spad nejrůznějších organických částic jako jsou pylová zrna. I přes filtraci vzorků jemným sítkem mohl být tento materiál zdrojem dalších druhů řas. Pro lepší úspěšnost kultivace bych navrhla následující postup. Jednotlivé červeně zbarvené buňky vybrat pod mikroskopem skleněnou pipetou a umístit je do mikrotitrační destičky s živným médiem. Vybrány by byly buňky s minimálním, ideálně žádným, agregovaným anorganickým a organickým materiálem. Mikrotitrační destička by byla umístěna do chladničky, kde by byly zajištěny co možná nejbližší podmínky sněhu, tedy teplota 0–2 °C (Hoham et al., 1975a) a ozáření odpovídající sněhu, kde byly pozorované vegetativní stádia sněžných řas (Stibal et al., 2007).

Je však nutné zmínit, že celkově je problematické udržet kulturu *Cd. nivalis*, a proto ani není k dispozici v žádné ze sbírek kultur např. UTEX nebo CCCryo. Její životní cyklus je doposud nevyjasněný, protože většina popisů jednotlivých fází životního cyklu je přímo z terénu nikoliv z laboratorní kultury (Leya, 2013).

Jediný laboratorní kmen, který se na základě fylogenetické analýzy úseku 18S rDNA zařadil mezi dosud známé linie sněžné řasy z čeledi Chlamydomonadaceae, je Rifugio Similaun. Vzhledem k tomu, že všechny sekvence z „*Chlamydomonas*“ snow clade dle Remias et al. (2013) dosud pocházejí přímo z červených buněk z terénních vzorků a nová sekvence je z kultury, je velmi pravděpodobné, že se podařilo vypěstovat buňky sněžné řasy typu *Cd. nivalis*. V terénním vzorku byly pozorovány červené kulaté buňky o průměrném rozměru 24 µm, což odpovídá rozměrům buněk typu *Cd. nivalis*, které publikoval Müller et al. (1998) či Gorton et al. (2001). Na rozdíl tomu ale Remias et al. (2005) uvádí rozměr je 14 µm a rozměr 24 µm pro buňky rodu *Chlainomonas* (Remias et al., 2016). Vzhled buněk v mém vzorku ale rodu *Chlainomonas* neodpovídá, protože ve vzorku nebyly pozorovány žádné kulaté či oválné buňky s nápadným průhledným okrajem, ale odpovídá popisu *Cd. nivalis* řadou autorů (Kol, 1968; Gradinger & Nürnberg, 1996; Gorton et al., 2001; Leya, 2003). Dle pozorování v SEM byly ve vzorku přítomné jak buňky s hladkým povrchem, tak buňky s výběžky připomínající „bradavičky“.

V kultuře Rifugio Similaun byly pozorovány jen nepohyblivé zelené kulaté až mírně oválné buňky, jejichž protoplast byl nápadně oddělen od buněčné stěny (obr. 35). Stejný popis

buněk uvádí i Kawecka (1981), dle které jsou tyto buňky přechodným stádiem mezi bičíkatými buňkami a odolnými sporami. Jejich vznik popisuje oddělením protoplastu od buněčné stěny a ztrátou bičíků u bičíkatých buněk. Ukazuje se však, že typy buněk popisované v této práci patří pravděpodobně ke sněžným řasám z rodu *Chlainomonas*, které tvoří podobně jako *Cd. nivalis* červený sníh v alpinských lokalitách (Remias et al., 2016). V kultuře Rifugio Similaun nebyly bičíkaté buňky pozorovány, ale vzhledem k přítomnosti papily (obr. 35a), kterou u buněk typu *Cd. nivalis* na bázi bičíků popisuje i Kol (1968), je pravděpodobné, že bičíkaté buňky kulovitěho tvaru byly v kultuře přítomné, ale bičíky byly vlivem stresových faktorů při pozorování mikroskopem, jako je vysoká intenzita záření, teplota a manipulace s buňkami, odloučeny. Také je možné, že byly bičíkaté buňky přítomné po velmi krátkou dobu, protože většinu svého životního cyklu přetrvává *Cd. nivalis* ve stádiu kulatých nepohyblivých buněk (Remias et al., 2010a). Pokud budeme předpokládat, že buňky ztratily svůj bičík během pozorování je jejich kulatý tvar a přítomnost papily odlišný od pozorování Ettla (1976). Ten bičíkaté buňky popisuje jako oválné a bez papily. Oválný tvar bičíkatých buněk uvádí i Müller et al. (1998), který se ale o přítomnosti papily nezmiňuje. Je však třeba zdůraznit, že dosud neexistuje jasný popis druhu *Cd. nivalis*. Se širším zavedením molekulárních metod se také ukázalo, že kmeny označované dříve jako *Cd. nivalis* byly mylně identifikovány a patří ve skutečnosti k jiným druhům, které netvoří barevné sněhy (např. *Cr. reticulata*; Leya, 2013).

V případě kultury Rifugio Similaun se podařilo sekvenací 18S rDNA prokázat její příslušnost k terénním vzorkům označeným jako *Cd. nivalis*, které tvoří klad „*Chlamydomonas*“-snow (Remias et al., 2013). Tento klad má vysokou statistickou podporu (BI 0.99/ ML 99, obr. 44), tudíž by mohl být v budoucnu popsán jako nový rod, protože typový druh rodu *Chlamydomonas* je *Cd. reinhardtii*, který patří do jiné vývojové větve v rámci řádu Chlamydomonadales. Také by bylo vhodné detailněji popsat kmen Rifugio Similaun včetně různých stadií životního cyklu, získat kompletní úsek 18S rDNA (prozatím se podařilo získat úsek o délce 671 bazí) a osekvenovat ITS2 pro bližší popis kmene. Problém však je velmi pomalý růst kultury.

Z obr. 44 je také zřejmá příbuznost kladu „*Chlamydomonas*“-snow s kmenem CCCryo 086a-99, který byl vyizolován ze sněhového pole na Svalbardu. Ten je zatím popsán jako blíže neurčená chlamydomonáda s teplotním optimem 8 °C, takže se pravděpodobně jedná o „pravou sněžnou řasu“. Jeho bičíkaté buňky jsou mírně oválné, mají viditelný slizovitý obal a tvoří shluk po čtyřech i více buňkách. Na rozdíl od buněk v kultuře Rifugio Similaun, které

měly rozměr kolem 18 μm , jsou tyto buňky poměrně malé (6 μm dlouhé, 4 μm široké; Leya, 2003).

5.3.2 Ostatní kultury

Další dvě kultury z čeledi Chlamydomonadaceae, Veliki Oltar a Triglav, jsou součástí tzv. „Reinhardtii“-clade dle Pröschold et al. (2001) a nejbližší příbuzné jim jsou sekvence blíže neidentifikované chlamydomonády (*Chlamydomonad* sp.), která byla izolována z jezera na severu USA (Fawley et al., 2004), a druhu *Paulschulzia pseudovolvox*, která je také součástí sladkovodního planktonu (Lukavský, 1970). Buňky *Paulschulzia pseudovolvox* jsou popsány jako kulaté buňky s velmi dlouhými tenkými bičíky bez přítomnosti stigmatu, které tvoří kolonie ve slizovitém pouzdru (Wujek, 1968; Lukavský, 1970). Oproti tomuto popisu byly mnou pozorované bičíkaté buňky v kulturách odlišné. Jejich buňky byly oválné, bičíky byly přibližně stejně dlouhé nebo kratší než délka buňky a u kultury Lacul Mândra, která měla shodnou sekvenci úseku 18S rDNA s kulturami Veliki Oltar a Triglav, ale chyběla jí střední část sekvence, bylo pozorované stigma (obr. 38). Vzhled buněk ve všech třech kulturách odpovídal spíše popisu buněk *Chlamydomonas* sp. z kultur sbírkových kmenů CCCryo, které však dle úseku 18S rDNA spadají do skupiny „Monadina“-clade (Leya, 2003). Bohužel nelze posoudit, zda jsou buňky mých laboratorních kmenů morfologicky shodné s buňkami vzorku *Chlamydomonad* sp., se kterým jsou příbuzné, protože morfologický popis těchto řas nebyl publikován.

Vzhledem k tomu, že je *Cd. reinhardtii* popisován jako kosmopolitní druh sladkovodního fytoplanktonu (John et al., 2002) a Kol (1968) zmiňuje tento druh jako fakultativní kryoseston ve sněhu, je reálné, že zástupci této skupiny byli v daných lokalitách přítomní. Sice ne jako původce červeného sněhu, ale byly součástí jeho mikrobiálního společenstva. Je také nutné poznamenat, že na rozdíl od kmenu Rifugio Similaun, který s největší pravděpodobností obsahoval buňky typu *Cd. nivalis*, byly v těchto třech kulturách pozorované bičíkaté buňky, které vydržely bez změn pozorování mikroskopem a lišily se nepohyblivými kulatými buňkami, jejichž protoplast přilehal na buněčnou stěnu. Pravděpodobně se ale nebude jednat o zástupce „pravých sněžných řas“, které mají růstové teplotní optimum kolem 0 °C, ale o psychrotrofní organismy, které jsou schopné nízké teploty tolerovat, ale jejich růstové teplotní optimum je vyšší (Leya, 2013).

Kmen Kaçkar Dagı svým fylogenetickým postavením i morfologií odpovídá druhu *Tetrademus obliquus* (Turpin) M.J.Wynne. Dle fylogenetického stromu (obr. 44) je kmen příbuzný s kmeny *Tetrademus obliquus* CCAP 276/3A a *Scenedesmus obliquus* SAG 276-3a,

ve skutečnosti se ale jedná o stejný druh *Tetradesmus obliquus* (Turpin) M.J.Wynne, každý z jiné sbírky řas, protože označení *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing je nově uváděno jako homotypické synonymum pro *Tetradesmus obliquus* (Turpin) M.J.Wynne a jedná se tak o tentýž druh (Wynne & Hallan, 2016).

Morfologie buněk kmenu Kaçkar Dagı odpovídá popisu buněk *Tetradesmus obliquus*. Jejich tvar je oválný až vřetenovitý, zužující se na svých koncích. Buňky tvoří coenobia po dvou až osmi buňkách, které se ale snadno rozpadají, takže se mohou v kultuře nacházet i samostatné buňky (Lukavský, 1991). Tvar buněk je velmi variabilní vzhledem k jejich morfologické plasticitě dle podmínek prostředí (Lürling, 2003). Nález druhu *Tetradesmus* (*Scenedesmus*) nebyl z prostředí sněhu doposud popsán, jeho výskyt je v kultuře možný, protože kmen byl izolován z lokality v pohoří Kaçkar Dagı, která se nacházela v těsné blízkosti jezera, a druh *Tetradesmus obliquus* je ve sladkovodních ekosystémech kosmopolitně rozšířen (Algaebase, 2016). Ale stejně jako u vzorků Veliki Oltar a Triglav je nutné zmínit, že není původcem červeně zbarveného sněhu, protože v terénních vzorcích Veliki Oltar, Triglav i Kaçkar Dagı byly zřetelně pozorovány červené buňky typu *Cd. nivalis* a *Chlainomonas*.

Další kmeny, které se podařilo z prostředí sněhu izolovat, patří dle sekvenace úseku 18S rDNA do třídy Trebouxiophyceae (obr. 45). Kmeny Cima de Costabella, Kürsingerhütte a Besegen patří do rodu *Coccomyxa*, který je součástí kladu ‚*Elliptochloris*‘, pouze kmen Pas de San Nicolo je součástí kladu, který je dle Darienko et al. (2016) označen jako ‚*Prasiola*‘-clade.

Kmen Cima de Costabella je s vysokou statistickou podporou příbuzný se dvěma kmeny *Coccomyxa subellipsoidea* (SAG 216-13 a SAG 216-7) a je součástí stejnojmenné skupiny, kterou rozlišují Darienko et al. (2015) a Malavasi et al. (2016). Sekvence kmenů Kürsingerhütte a Besegen nejsou identické s žádnou známou sekvencí a v rámci fylogenetického stromu na obr. 45 tvoří samostatné vývojové linie, jejichž postavení v rámci rodu *Coccomyxa* je však nejasné.

Přítomnost zástupců rodu *Coccomyxa* v prostředí sněhu není překvapující. Tento rod jednobuněčných řas je totiž celosvětově rozšířený a vyskytuje se v nejrozličnějších habitatech terestrických i vodních ekosystémů včetně těch s extrémními podmínkami (John et al., 2002; Malavasi et al., 2016) a jsou také fotobionti mnoha lišejníků (Zoller & Lutzoni, 2003; Verma et al., 2009). Co se týče extrémních habitatů, je rod *Coccomyxa* nejčastěji popisován z kyselých vod (Verma et al., 2009; Malavasi et al., 2016), ale z prostředí s extrémně nízkými

teplotami méně. Příkladem přítomnosti rodu *Coccomyxa* v chladném prostředí je sbírkový kmen *Coccomyxa subellipsoidea* NIES 2166, který byl izolovaný z vysušené biomasy řas z Antarktidy (Blanc et al., 2012), či *Coccomyxa gleobotrydioformis* popsána ze vzorku půdy z Antarktidy (Cavacini, 2001). Avšak přímo z prostředí sněhu rod *Coccomyxa* dosud popsán nebyl. Vzhledem k tomu, že Blanc et al. (2012) uvádí, že se v případě *Coccomyxa subellipsoidea* NIES 2166 jedná o psychrotolerantní organismus, který dokáže přežít i v teplotách pod 0 °C, ale roste v teplotách nad 18°C (Morgan-Kiss et al., 2006), předpokládám, že nově izolované kmeny budou mít podobné ekofyziologické vlastnosti. V prostředí sněhu jsou tyto organismy schopné přežít, ale barevné sněhy netvoří a jejich optimální teplota pro růst bude podstatně vyšší než ta, která je pro prostředí sněhu charakteristická.

Vzhledem k tomu, že je rod *Coccomyxa* celosvětově rozšířen, morfologie buněk různých druhů je velmi podobná a může být ovlivněna podmínkami prostředí (Darienkov et al., 2015; Malavasi et al., 2016), lze druhy rodu *Coccomyxa* rozlišit jedině na základě sekvenace úseků DNA. Jak je zřejmé i z mé studie, pouze sekvenace úseku 18S rDNA není dostačující, protože neobjasnila přesnější postavení kmenů Kürsingerhütte a Bessegen v rámci kladu „*Coccomyxa*“ a jejich příbuznost k dosud popsaným druhům rodu *Coccomyxa*. Je to z toho důvodu, že sekvence 18S rDNA jsou konzervativní a analýza pouze tohoto úseku nedokáže rozlišit blízké příbuzné druhy (Pigeneau et al., 2011). Pro přesnější určení fylogenetického postavení kmenů by tak bylo vhodné ještě provést sekvenaci úseku ITS2 a objasnit jeho sekundární strukturu, která je vhodnější pro rozlišení zelených řas na úrovni druhů. Základem je tzv. CBC koncept (compensatory base changes), který definuje oblasti sekundární struktury, kde se nacházejí páry bazí, ve kterých jsou jednotlivé druhy s vysokou pravděpodobností odlišné (Coleman, 2003; Wolf et al., 2013). Detailní studium druhů doprovázejících původce červeného sněhu však nebylo primárním cílem této práce.

Dle fylogenetického stromu na obr. 45 je kmen Pas de San Nicolo součástí větve kladu „*Prasiola*“, která obsahuje rody *Koliella* a *Raphidonema*, a je příbuzný s kmenem *Raphidonema sempervirens* CCCryo 011a-99 (izolát ze sněhového pole na Svalbardu), i když s nízkou statistickou podporou. Součástí větve jsou také blíže neurčené kmeny, které pocházejí z chladných habitatů. Sekvence „indet. Trebouxiophyceae“ byla získána ze vzorku CCCryo 46/99, který podobně jako CCCryo 011a-99 pochází ze sněhového pole na Svalbardu a ze kterého byl izolován i kmen *Chloromonas* sp.-046 (Leya, 2003). Kmen „uncultured eukaryote clone TE207G“ byl izolován z úlomků hornin na aljašském ledovci (Schmidt

& Darcy, 2015). Tato větev však obsahuje nejen organismy z chladných habitatů, jak dokládá kmen CCALA 363 izolovaný z rybníka na Slovensku.

Rody *Koliella* a *Raphidonema* popisuje ze zeleného sněhu již Kol (1968). Jedná se většinou o výrazně protáhlé buňky, které bývají spojené po dvou a více buňkách a tvoří krátká vlákna (Katana, 2001). Oba rody jsou popsány jako pleiomorfické, tzn. tvar, velikost a počet buněk ve vláknu je velmi variabilní a mění se v závislosti na podmínkách prostředí (Hoham, 1973; Stibal & Elster, 2005), proto bývají oba rody často zaměňovány, a i jejich fylogenetické postavení není doposud upřesněno (Katana et al., 2001).

Buňky morfologicky odpovídající rodům *Raphidonema* či *Koliella* nebyly v kultuře Pas de San Nicolo pozorovány, ale přesto získaná sekvence patří do této skupiny. Pokud jsou buňky z těchto rodů ve sněhu přítomné, jejich zastoupení většinou není nijak hojné. Podobně je tomu i při mikroskopickém pozorování izolovaných laboratorních kultur, kde nebývá počet buněk nijak hojný (Stibal & Elster; 2005). Vzhledem k tomu je tedy pravděpodobné, že se buňky rodu *Raphidonema* v kultuře nacházely, ale byly postupně přerostlé jiným rodem, konkrétně buňkami podobnými rodu *Pseudochlorella*, které jsou zachyceny na mikrofotografii kultury na obr. 39. Buňky rodu *Pseudochlorella* jsou oválné, zřídka kulaté, a mohou zůstat k sobě spojené zbytkem buněčné stěny sporangia (Darienkov et al., 2016), což je patrné z obr. 39. Výskyt rodu *Pseudochlorella* ve vysokohorském a polárním prostředí je zaznamenán, ale z půdy, nikoliv však ze sněhu (Darienkov et al., 2016).

Půdní řasy jsou nejspíše i rody *Raphidonema* a *Koliella* či druh *Stichococcus bacillaris* a do prostředí sněhu jsou přineseny větrem či vodou spolu s částicemi půdy z okolního prostředí (Novis, 2002; Stibal & Elster; 2005). Navíc kmeny z rodu *Raphidonema* mají vyšší teplotní optimum než psychofilní organismy, mohou sice v prostředí sněhu přežívat, ale už nejsou adaptovány na ostatní extrémní podmínky sněhu jako jsou např. vysoké intenzity záření a deficit živin (Stibal & Elster; 2005). To vše jsou ukazatele, které určují, že kmeny ze skupiny *Raphidonema/Koliella* a díky příbuznosti s ní i mnou izolovaný kmen Pas de San Nicolo, jsou spíše půdní organismy než psychofilní „pravé sněžné řasy“, jako jsou některé druhy z čeledi Chlamydomonadaceae.

5.4 Sekundární struktura ITS2 z terénních vzorků

ITS2, tzv. internal transcribed spacer 2, je úsek eukaryotické jaderné DNA mezi oblastmi 5.8S rRNA a 28S rRNA, který se hojně využívá k fylogenetickým analýzám na úrovni druhů u nejrozličnějších taxonomických skupin včetně zelených řas (Coleman, 2003;

Caisová et al., 2013). Složení a délka primární sekvence ITS2 se může mezi druhy značně lišit, ale pokud je transkribován na RNA, jeho sekundární struktura si zachovává znaky, které jsou konzervativní a shodné napříč eukaryotickými organismy (Mai & Coleman, 1997; Coleman, 2007 a 2009). Těmito znaky jsou u eukaryotních organismů tvar sekundární struktury připomínající dlaň, přítomnost čtyř helixů, ze kterých je nejdelší helix III obsahující na svém konci na straně 5' konzervativní úsek UGGU, a neshoda pyrimidin-pyrimidin ve II. helixu (Mai & Coleman, 1997; Coleman, 2003). Tyto znaky jsou patrné i na sekundární struktuře ITS2 *Cd. nivalis* na obr. 46. Může být také rozvětven I. helix, ale s tím se lze v rámci tříd Chlorophyceae a Ulvophyceae setkat pouze u řádu Sphaeropleales (Caisová et al., 2013). Na úrovni druhů bývají nejvariabilnější helixy I a IV. Na úrovni rodů jsou zase nejkonzervativnější páry nukleotidů na bázi helixu I, II a IV a na konci helixu III (Coleman, 2007).

Důležitým znakem pro rozlišení organismů na úrovni druhů pomocí sekundární struktury ITS2 je přítomnost tzv. CBC (compensatory base change) a hCBC (hemi-compensatory base change). CBC je záměna párujících nukleotidů na obou stranách řetězce, hCBC je záměna pouze jednoho z páru nukleotidů (Coleman, 2003). Pokud se dva organismy liší v CBC, jedná se s vysokou pravděpodobností o dva různé druhy bez ohledu na pohlavní či nepohlavní způsob rozmnožování (Müller et al., 2007; Wolf et al., 2013). Mezi nově osekvenovanými osmi vzorky (Pas de San Nicolo, Forcella dal Pief, Cima de Costabella, Steinwandseen, Rondslettet sestup, Obersulzbachkees, Rifugio Similaun a Similaun) a jedinou dosud publikovanou sekvencí *Cd. nivalis* z Evropy (Remias et al. 2010) nebyla nalezena žádné CBC ani hCBC v konzervovaných oblastech na základě konsenzuálního modelu sekundární struktury ITS2 pro třídu Chlorophyceae dle Caisová et al. (2013), proto se s nejvyšší pravděpodobností bude jednat o stejný druh. Jediný kmen Veliki Oltar má přítomnou jednu hCBC na helixu II (obr. 46, zelený rámeček). Jedná se o záměnu z páru G-C na G-Y, proto by bylo vhodné opětovnou sekvenací úseku ITS2 ověřit, zda se kmen opravdu liší v dané pozici, nebo se jednalo pouze o chybu sekvenace. Ale vzhledem k tomu, že CBC a hCBC jsou nezávislé evoluční procesy a nebyl prokázán vznik CBC dvěma za sebou následujícími hCBC (Caisová et al., 2011), tak i kdyby byla hCBC (zde změna z G-C na G-U v sekundární struktuře transkriptu ITS2) potvrzena, bylo by velmi pravděpodobně možné i kmen Veliki Oltar považovat za stejný druh jako všechny ostatní sekvence zahrnuté do porovnání sekundární struktury ITS2.

Jak jsem již zmínila, první molekulárně podložený důkaz přítomnosti *Chlamydomonas nivalis* v Evropě pochází z Tyrolských Alp v Rakousku (Remias et al. 2010). V mé práci se

tedy poprvé podařilo na základě molekulárních dat jednoznačně potvrdit rozšíření původce červeného sněhu *Cd. nivalis* i v řadě dalších evropských pohoří (Slovinské Alpy, Dolomity, Sarntalské Alpy, Vysoké Taury v Rakousku, Ötztálské Alpy) včetně Norska.

Při porovnání morfologie buněk z terénních vzorků, pro které se podařilo získat sekvence ITS2, je patrné, že charakter povrchu buněk nebyl jednotný. Buňky z některých lokalit měly hladký povrch a z jiných lokalit měly výběžky ve tvaru bradaviček. Na základě výsledků analýzy sekundární struktury ITS2 je tak pravděpodobné, že morfologická variabilita pozorovaná v rámci nově osekvenovaných vzorků je pouze projevem vnitrodruhové variability a netvoří tak odlišující znaky mezi druhy. Pro lepší podporu výsledků by ještě bylo vhodné získat sekvenci ITS2 ze vzorků, ve kterých se vyskytovaly buňky s výrazně odlišnými morfologickými znaky (obr. 27), konkrétně z oblasti Triglav (číslo lokality 2, Slovinsko, tam se ale pravděpodobně dle morfologie jednalo o rod *Chlainomonas*), z dalších míst v Sarntalských Alpách (lokalita 11 a 12, zde se pravděpodobně jednalo o rod *Chloromonas*), ze Svalbardu (14) a z Besseghenu (17, Norsko).

6 Závěr

- Podařilo se získat vzorky červeného sněhu z 30 evropských lokalit. Nejvíce vzorků jsem získala z Alp (rakouské, švýcarské, italské i slovinské). Ostatní lokality se nacházely ve Skandinávii a ve východní Evropě (Rumunsko, Turecko).
- Ve vzorcích červeného sněhu byly pozorovány především buňky typu *Cd. nivalis*, ale i další druhy sněžných řas jako *Chloromonas* cf. *nivalis* či *Chlainomonas* sp.
- Na základě světelné a skenovací elektronové mikroskopie byla zjištěná morfologická variabilita buněk typu *Cd. nivalis*. Barva buněk měla odstín od oranžové až po tmavě vínovou a povrch buněk byl hladký, s výrůstky až po výrazně strukturovaný. Analýzy PCA a RDA potvrdily, že morfologie buněk je závislá na lokalitě původu.
- Z jednoho vzorku z rakouských Alp se podařilo vyizolovat laboratorní kulturu, která na základě analýzy 18S rDNA patří do monofyletické skupiny v řádu Chlamydomonadales, která dosud obsahuje pouze sekvence z terénních vzorků ze Svalbardu a z Alp. Jelikož morfologie buněk neodpovídá známému popisu druhu, je kulturu možné označit jako *Cd.* cf. *nivalis*.
- Pro další nově vyizolované kmeny zelených řas z tříd Chlorophyceae a Trebouxiophyceae sních pravděpodobně není původním prostředím. Konkrétně se jednalo o organismy z rodů *Chlamydomonas*, *Tetradismus*, *Coccomyxa* a *Raphidonema/Koliella*, které se do sněhu dostaly pravděpodobně z okolí, např. z půdy.
- Z buněk typu *Cd. nivalis* z terénních vzorků z deseti lokalit se podařilo získat úsek ITS2. Porovnání jeho sekundární struktury s publikovanou sekvencí *Cd. nivalis* potvrdilo přítomnost druhu *Cd. nivalis* v červeném sněhu v řadě evropských pohoří (Alpy, Norsko) a jeho příslušnost k linii řádu Chlamydomonadales tzv. „*Chlamydomonas*“-snow clade.
- Na lokalitách, kde byl pomocí analýzy ITS2 potvrzen druh *Cd. nivalis*, jsou pozorované rozdíly v morfologii buněk pravděpodobně způsobené odlišnými podmínkami prostředí, případně časováním termínu sběru vzorků (různá stadia vývoje buněk).

7 Seznam použité literatury

- Alia, Mohanty, P. and Matysik, J.** (2001): Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, 2, pp. 195–200.
- Andersen, R. A.** (2005): Algal culturing techniques. *Academic Press*, ISBN: 0120884267, 9780120884261, pp. 578.
- Barcyte, D. and Nedbalová, L.** (2016): *Coccomyxa*: a dominant planktic alga in two acid lakes of different origin. *Extremophiles*, 21, 245–257.
- Bauer, F.** (1819): Microscopical observations on the red snow. *The Quarterly Journal of Science, Literature and the Arts*, VII, pp. 222–229.
- Blanc, G., Agarkova, I., Grimwood, J., Kuo, A., Brueggeman, A., Dunigan, D. D., Gurnon, J., Ladunga, I., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Pröschold, T., Salamov, A., Schmutz, J., Weeks, D., Yamada, T., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Claverie, J. M., Grigoriev, I. V. and Van Etten, J. L.** (2012): The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genom Biology*, 25, pp. 12.
- Bold, H. C.** (1949): The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, sp. nov. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76, pp. 101–108.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H.** (2004): Carotenoids: Handbook. *Springer Science & Business Media*, ISBN: 9783764361808, pp. 647.
- Buchheim, M. A., Buchheim, J. A. and Chapman, R. L.** (1997): Phylogeny of *Chloromonas* (Chlorophyceae): A study of 18S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Phycology*, 33, pp. 286–293.
- Caisová, L., Marin, B., and Melkonian, M.** (2011): A close-up view on ITS2 evolution and speciation – a case study in the Ulvophyceae (Chlorophyta, Viridiplantae). *BMC Evolutionary Biology*, 11, pp. 24.
- Caisová, L., Marin, B. and Melkonian, M.** (2013): A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. *Protist*, 164, pp. 482–496.
- Cameron, A. K., Hodson, A.J. and Osborn, M.** (2012): Structure and diversity of bacterial, eukaryotic and archeal communities in glacial cryoconite holes from the Arctic and the Antarctic. *FEMS Microbiology Ecology*, 82, pp. 254–267.
- Cavacini, P.** (2001): Soil algae from northern Victoria Land (Antarctica). *Polar Bioscience*, 14, pp. 45–60.
- Cepák, V. and Lukavský, J.** (2013): Cryoseston of the Pirin Mountains, Bulgaria. *Acta Botanica Croatica*, 72, pp. 257–268.
- Chattopadhyay, M. K.** (2006): Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *Journal of Bioscience*, 31, pp. 157–165.
- Coleman, A. W.** (2003): ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *TRENDS in Genetics*, 19, pp. 370–375.
- Coleman, A. W.** (2007): Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, 35, pp. 3322–3329.
- Coleman, A. W.** (2009): Is there a molecular key to the level of „biological species“ in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50, pp. 197–203.
- Curl, H., Jr., Hardy, J. T. and Ellermeier, R.** (1972): Spectral absorption of solar radiation in alpine snowfields. *Ecology*, 53, pp. 1189–1194.
- Darienko, T., Gustavs, L., Eggert, A., Wolf, W. and Pröschold, T.** (2015): Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PLoS ONE*, 10, pp. 31.

- Darienko, T., Gustavs, L. and Pröschold, T.** (2016): Species concept and nomenclatural changes within the genera *Eliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an interactive approach. *Journal of Phycology*, 52, pp. 1125–1145.
- Darty, K., Denise, A. and Ponty, Y.** (2009): VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*, 25, pp. 1974.
- Demchenko, E., Mikhailyuk, T., Coleman, A. W. and Proschöld, T.** (2012): Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *European Journal of Phycology*, 47, pp. 264–290.
- De Wever, A., Leliaert, F., Verleyen, E., Vanormelingen, P., Van derGucht, K., Hodgson, D. A., Sabbe, K. and Vyverman, W.** (2009): Hidden levels of phylodiversity in Antarctic green algae: further evidence for the existence of glacial refugia. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 276, 3591–3599.
- Duval, B., Duval, E. and Hoham, R. W.** (1999): Snow algae of the Sierra Nevada, Spain, and High Atlas mountains of Morocco. *International Microbiology*, 2, pp. 39–42.
- Duval, B., Shetty, K., and Thomas, W. H.** (2000): Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology*, 11, pp. 559–566.
- Ehrenberg, C. G.** (1831): New observations on the blood-like phenomena observed in Egypt, Arabia, and Siberia, with a view and critique of the early accounts of similar appearances. *The Edinburgh New Philosophical Journal*, 10, pp. 122–136.
- Ettl, H.** (1976): Die Gattung *Chlamydomonas* Ehrenberg (*Chlamydomonas* und die nächstverwandten Gattungen I). *Nova Hedwigia*, 49, pp. 1122.
- Fawley, M. W., Fawley, K. P. and Buchheim, M. A.** (2004): Molecular diversity among communities of freshwater microchlorophytes. *Microbial Ecology*, 48, pp. 489–499.
- Fujii, M., Takano, Y., Kojima, H., Hoshino, T., Tanaka, R. and Fukui, M.** (2010): Microbial community structure, pigment composition, and nitrogen source of red snow in Antarctica. *Microbial Ecology*, 59, pp. 466–475.
- Goff, L. J., Moon, D. A. and Coleman, A. W.** (1994): Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *Journal of Phycology*, 30, pp. 521–537.
- Gorton, H. L., and Vogelmann, T. C.** (2003): Ultraviolet radiation and the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Photochemistry and Photobiology*, 77, pp. 608–615.
- Gradinger, R. and Nürnberg, D.** (1996): Snow algal communities on Arctic pack ice floes dominated by *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Proc. NIPR Symp. Polar Biology*, 9, pp. 35–43.
- Grenfell, T. C., Warren, S. G., and Mullen, P. C.** (1994): Reflection of solar radiation by the Antarctic snow surface at ultraviolet, visible, and near-infrared wavelengths. *Journal of Geophysical Research*, 99, pp. 18669–18684.
- Harris, E. H.** (2009): The *Chlamydomonas* sourcebook: Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use, volume 1. *Academic Press*, ISBN 9780080919553, pp. 480.
- Helms, G., Friedl, T., Rambold, G. and Mayrhofer, H.** (2001): Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequences. *Lichenologist*, 33, pp. 73–86.
- Hodač, L., Hallmann, C., Spitzer, K., Elster, J., Faßhauer, F., Brinkmann, N., Lepka, D., Diwan, V. and Friedl, T.** (2016): Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, pp. 16.
- Hodson, A. J., Anesio, A. M., Tranter, M., Fountain, A., Osborn, M., Priscu, J., Laybourn-Parry, J., and Sattler, B.** (2008): Glacial ecosystems. *Ecological Monographs*, 78, pp. 41–67.
- Hoham, R. W.** (1975a): Optimum temperatures and temperature ranges for growth of snow algae. *Arctic and Alpine Research*, 7, pp. 13–24.
- Hoham, R. W.** (1975b): The life history and ecology of the snow alga *Chloromonas pichinchae* (Chlorophyta, Volvocales). *Phycologia*, 14, pp. 213–226.

- Hoham, R. W.** (1980): Unicellular chlorophytes – snow algae. – In: Hoham, R. W. (1989): Snow microorganisms and their interaction with the environment. *Proceedings 44th Annual Eastern Snow Conference*, pp. 73–80.
- Hoham, R. W.** (1989a): Snow microorganisms and their interaction with the environment. In *Proc. 44th Annual Eastern Snow Conference*, pp. 73–80.
- Hoham, R. W.** (1989b): Snow as a habitat for microorganisms. *NASA, Ames Research Center, Exobiology and Future Mars Missions*; pp. 32–33.
- Hoham, R. W.** (1989c): Recent discoveries of snow algae in upstate New York and Quebec Province and preliminary reports on related snow chemistry. – In: Hoham, R. W. (1992): Environmental influences on snow algal microbes. *Proceedings 60th Annual Western Snow Conference*, pp. 78–83.
- Hoham, R. W.** (1992): Environmental influences on snow algal microbes. *Proceedings 60th Annual Western Snow Conference*, pp. 78–83.
- Hoham, R. W. and Duval, B.** (2001): Microbial ecology of snow and freshwater ice with emphasis on snow algae. – In: Jones, H. G., Pomeroy, J. W., Walker, D. A. and Hoham, R. W. (2001): Snow ecology: An interdisciplinary examination of snow-covered ecosystems, *Cambridge University Press, Cambridge, U. K.*, pp. 166–226.
- Hoham, R. W. and Mullet, J. E.** (1978): *Chloromonas nivalis* (Chod.) Hoh. & Mullet. comb. nov., and additional comments on the snow alga *Scotiella*. *Phycologia*, 17, pp. 106–107.
- Hoham, R. W., Roemer, S. C. and Mullet, J. E.** (1979): The life history and ecology of the snow alga *Chloromonas brevispina* comb. nov. (Chlorophyta, Volvocales). *Phycologia*, 18, pp. 55–70.
- Hoham, R. W., Roemer, S. C. and Mullet, J. E.** (1983): The life history and ecology of the snow alga *Chloromonas polyptera* comb. nov. (Chlorophyta, Volvocales). *Canadian Journal of Botany*, 61, pp. 2416–2429.
- Hoham, R. W., Laursen, A. E., Clive, S. O. and Duval, B.** (1993): Snow algae and other microbes in several alpine areas in New England. *Proceedings of the 50th Annual Eastern Snow Conference*, pp. 165–173.
- Hoham, R. W., Schlag, E. M., Kang, Y. J., Hasselwander, A. J., Behrstock, A. F., Blackburn, I. R., Johnson, R. C. and Roemer, S. C.** (1998): The effects of irradiance levels and spectral composition on mating strategies in the snow alga, *Chloromonas* sp.-D, from the Tughill Plateau, New York State. *Hydrological Processes*, 12, pp. 1627–1639.
- Hoham, R. W., Bonome, T. A., Martin, C. W. and Leebens-Mack, J. H.** (2002): A combined 18S rDNA and rbcL phylogenetic analysis of *Chloromonas* and *Chlamydomonas* (Chlorophyceae, Volvocales) emphasizing snow and other cold-temperature habitats. *Journal of Phycology*, 38, pp. 1051–1064.
- Holzinger, A. and Lütz, C.** (2006): Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron*, 37, pp. 190–207.
- John, D. M., Whitton, B. A. and Brook, A. J.** (2002): The freshwater algal flora of the British Isles: An identification guide to freshwater and terrestrial algae. *Cambridge University Press, Cambridge, UK*, pp. 714.
- Jones, H. G.** (1991): Snow chemistry and biological activity: a particular perspective on nutrient cycling. *Seasonal Snowpacks*, 28 of the series *NATO ASI Series*, pp. 173–228.
- Juračka, P. J., and Nebesářová, J.** (2010): Skenovací elektronový mikroskop (SEM) ve službách biologie. *Moderní zobrazovací metody v biologii, PrF OU, verze 16.12.2010*, pp. 18.
- Karsten, U., Friedl, T., Schumann, R., Hoyer, K., and Lembecke, S.** (2005): Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae: *Prasiola* and its relatives from the Trebouxiphyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 41, pp. 557–566.
- Katana, A., Kwiatowski, J., Spalik, K. and Zakryś, B.** (2001): Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. *Journal of Phycology*, 37, pp. 443–451.
- Kawecka, B.** (1981): Biology and ecology of snow algae. *Acta Hydrobiologica*, 23, pp. 211–215.

- Kawecka, B.** (1986): Ecology of snow algae. *Polish Polar Research*, 7, pp. 407–415.
- Kohshima, S., Seko, K., and Yoshimura, Y.** (1993): Biotic acceleration of glacier melting in Yala glacier, Langtang region, Nepal Himalaya. *Snow and Glacier Hydrology, IAHS Publication*, 218, pp. 309–316
- Kol, E.** (1942): The snow and ice algae of Alaska. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 101, pp. 36.
- Kol, E.** (1966): Snow algae from the valley of the Morskie Oko Lake in the High Tatra. *Annales historico-naturales musei nationalis Hungarici, pars Botanica*, 58, pp. 161–168.
- Kol, E.** (1968): Kryobiologie. Biologie und Limnologie des Schnees und Eises. 1. Kryovegetation. *E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart*, pp. 216.
- Kol, E.** (1971): Green snow and ice from the Antarctica. *Annales historico-naturales musei nationalis Hungarici, pars Botanica*, 63, pp. 51–56.
- Komárek, O. and Komárek, J.** (2001): Contribution to the taxonomy and ecology of green cryosestic algae in the summer season 1995-1996 at King George Island, S. Shetland Island. *Nova Hedwigia*, 123, pp. 121–140.
- Komárek, J. and Nedbalová, L.** (2007): Green cryosestic algae. In: Seckbach, J. (ed.): Algae and cyanobacteria in extreme environments. *Springer*, pp. 321–342.
- Kvíděrová, J.** (2010): Characterization of the community of snow algae and their photochemical performance *in situ* in the Giant Mountains, Czech Republic. *Arctic, Antarctic and Alpine Research*, 42, pp. 210–218.
- Kvíděrová, J.** (2012): Research on cryosestic communities in Svalbard: the snow algae of temporary snowfields in Petuniabukta, Central Svalbard. *Czech Polar Reports* 2, pp. 8–19.
- Laurion, I., Lami, A. and Sommaruga, R.** (2002): Distribution of mycosporine-like amino acids and photoprotective carotenoids among freshwater phytoplankton assemblages. *Aquatic Microbial Ecology*, 26, pp. 283–294.
- Leya, T.** (2003): Feldstudien und genetische Untersuchungen zur Kryophilie der Schneeealgen Nordwestspitzbergens. *Disertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin*, pp. 145.
- Leya, T.** (2013): Snow algae: adaptation strategies to survive on snow and ice. – In: Seckbach, J., Oren, A. and Stan-Lotter, H.: Polyextremophiles: Life under multiple forms of stress. *Dordrecht, the Netherlands, Springer*, pp. 401–423.
- Leya, T., Rahn, A., Lütz, C. and Remias, D.** (2009): Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment composition and applied aspects for biotechnology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, pp. 432–443.
- Light, J. J. and Belcher, J. H.** (1968): A snow microflora in the Cairngorm Mountains, Scotland. *British Phycology Bulletin*, 3, pp. 471–473.
- Ling, H. U.** (2002): Snow algae of the Windmill Islands, continental Antarctica: *Chlorosarcina antarctica* comb. nov. (Chlorophyceae, Chlorophyta) from pink snow, with discussion of *Chlorosarcina* and allied genera. *Phycologia*, 41, pp. 9.
- Ling, H. U., and Seppelt, R. D.** (1990): Snow algae of the Windmill Islands, continental Antarctica. *Mesotaenium berggrenii* (Zygnematales, Chlorophyta) the alga of grey snow. *Antarctic Science*, 2, pp. 143–148.
- Ling, H. U., and Seppelt, R. D.** (1993): Snow algae of the Windmill Islands, continental Antarctica. *Chloromonas rubroleosa* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyta), an alga of red snow. *European Journal of Phycology*, 28, pp. 77–84.
- Lu, N., Wei, D., Chen, F. and Yang, S.** (2012a): Lipidomic profiling and discovery of lipid biomarkers in snow alga *Chlamydomonas nivalis* under salt stress. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, pp. 253–265.
- Lu, N., Wei, D., Jiang, X., Chen, F., and Yang, S.** (2012b): Regulation of lipid metabolism in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* in response to NaCl stress: An integrated analysis by cytomic and lipidomic approaches. *Process Biochemistry*, 47, pp. 1163–1170.

- Lu, N., Wei, D., Jiang, X., Chen, F. and Yang, S.** (2012c): Fatty acids profiling and biomarker identification in snow alga *Chlamydomonas nivalis* by NaCl stress using GC/MS and multivariate statistical analysis. *Analytical Letters*, 45, pp. 1172–1183.
- Lu, N., Wei, D., Chen, F., and Yang, S.** (2013): Lipidomic profiling reveals lipid regulation in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* in response to nitrate or phosphate deprivation. *Process Biochemistry*, 48, pp. 605–613.
- Lukavský, J.** (1970): Two interesting algae from czech reservoirs. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 5, pp. 209–212.
- Lukavský, J.** (2001): Motile cells in *Scenedesmus obliquus* in outdoor mass culture. *Archiv für Protistenkunde*, 140, pp. 345–348.
- Lukeš, M., Procházková, L., Shmidt, V., Nedbalová, L. and Kaftan, D.** (2014): Temperature dependence of photosynthesis and thylakoid lipid composition in the red snow alga *Chlamydomonas cf. nivalis* (Chlorophyceae). *FEMS Microbiology Ecology* 89, pp. 303–315.
- Lürling, M.** (2003): Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *International Journal of Limnology*, 39, pp. 85–101.
- Lutz, S., Anesio, A. M., Jorge Villar, S. E. and Benning, L. G.** (2014): Variations of algal communities cause darkening of a Greenland glacier. *FEMS Microbiology Ecology*, 89, pp. 402–414.
- Lutz, S., Anesio, A., Raiswell, R., Edwards, A., Newton, R. J., Gill, F. and Benning L. G.** (2015): The biogeography of red snow microbiomes and their role in melting arctic glaciers. *Nature Communications*, DOI: 10.1038/ncomms11968, pp. 9.
- Lütz-Meindl, U. and Lütz, C.** (2006): Analysis of element accumulation in cell wall attached and intracellular particles of snow algae by EELS and ESI. *Micron* 37, pp. 452–458.
- Mai, J. C. and 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, pp. 258–271.
- Malavasi, V., Škaloud, P., Rindi, F., Tempesta, S., Paoletti, M. and Pasqualetti, M.** (2016): DNA-based taxonomy in ecologically versatile microalgae: A re-evaluation of the species concept within the coccoid green algal genus *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *PLoS ONE* 11, pp. 25.
- Matsuzaki, R., Hara, Y. and Nozaki, H.** (2012): A taxonomic revision of *Chloromonas reticulata* (Volvocales, Chlorophyceae), the type species of the genus *Chloromonas*, based on multigene phylogeny and comparative light and electron microscopy. *Phycologia*, 51, pp. 74–85.
- Matsuzaki, R., Kawai-Toyooka, H., Hara, Y. and Nozaki, H.** (2015): Revisiting the taxonomic significance of aplanozygote morphologies of two cosmopolitan snow species of the genus *Chloromonas* (Volvocales, Chlorophyceae). *Phycologia*, 54, pp. 491–502.
- Morgan-Kiss, R. M., Priscu, J. C., Pocock, T., Gudynaite-Savitch, L., and Huner, N. P. A.** (2006): Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, pp. 222–252.
- Morita, R. Y.** (1975): Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39, pp. 144–167.
- Müller, T., Bleiss, W., Martin, C.-D., Rogaschewski, S. and Fuhr, G.** (1998): Snow algae from northwest Svalbard: their identification, distribution, pigment and nutrient content. *Polar Biology*, 20, pp. 14–32.
- Müller, T., Leya, T. and Fuhr, G.** (2001): Persistent snow algal fields in Spitsbergen: field observations and a hypothesis about the annual cell circulation. *Arctic, Antarctic and Alpine Research*, 3, pp. 42–51.
- Nakada, T., Shinkawa, H., Ito, T. and Tomita, M.** (2010): Recharacterization of *Chlamydomonas reinhardtii* and its relatives with new isolates from Japan. *Journal of Plant Research*, 123, pp. 67–78.

- Nedbalová, L. and Sklenář, P.** (2008): New records of snow algae from the Andes of Ecuador. *Arnaldoa*, 15, pp. 17–20.
- Nedbalová, L., Kociánová, M. and Lukavský, J.** (2008): Ecology of snow algae in the Giant Mts. *Opera Corcontica*, 45, pp. 59–68.
- Newton, A. P. W.** (1982): Red-coloured snow algae in Svalbard – some environmental factors determining the distribution of *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyta Volvocales). *Polar Biology*, 1, pp. 167–172.
- Novis, O., Beer, T. and Vallance, J.** (2002): New records of microalgae from the New Zealand alpine zone, and their distribution and dispersal. *New Zealand Journal of Botany*, 46, pp. 347–366.
- Novis, O. M., Hoham, R. W., Beer, T. and Dawson, M.** (2008): Two snow species of the quadriflagellate green alga *Chlainomonas* (Chlorophyta, Volvocales): ultrastructure and phylogenetic position within the Chloromonas clade. *Journal of Phycology*, 44, pp. 1001–1012.
- Oren, A., and Gunde-Cimerman, N.** (2007): Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites. *FEMS, Microbiology Letters*, 269, pp. 10.
- Peksa, O. and 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, pp. 3936–3948.
- Piercey-Normore, M. D. and DePriest, P. T.** (2001): Algal switching among lichen symbioses. *American Journal of Botany*, 88, pp. 1490–1498.
- Pigenau, G., Eyre-Walker, A., Grimsley, N. and Moreau, H.** (2011): How and why DNA Barcodes underestimate in diversity of microbial eukaryotes. *PLoS ONE*, 6, pp. 6.
- Pomeroy, J. W. and Brun, E.** (2001): Physical properties of snow. – In: Jones, H. G., Pomeroy, J. W., Walker, D. A. and Hoham, R. W. (eds): Snow ecology: an interdisciplinary examination of snow-covered ecosystems. *Cambridge University Press, Cambridge*, pp. 45–118.
- Posada, D.** (2008): jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, pp. 1254–1256.
- Pröschold, T., Marin, B., Schlösser, U. G. and Melkonian, M.** (2001): Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist*, 152, pp. 265–300.
- Pröschold, T., Harris, E. H. and Coleman, A. W.** (2005): Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 170, pp. 1601–1610.
- Rambaut, A.** (2014): FigTree Version 1.4.2. *Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh*: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Remias, D., Lütz-Meindl, U. and Lütz, C.** (2005): Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *European Journal of Phycology*, 40, pp. 259–268.
- Remias, D., Albert, A. and Lütz, C.** (2010a): Effects of realistically simulated, elevated UV irradiation on photosynthesis and pigment composition of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis* and the arctic soil alga *Tetracystis* sp. (Chlorophyceae). *Photosynthetica*, 48, pp. 269–277.
- Remias, D., Karsten, U., Lütz, C. and Leya, T.** (2010b): Physiological and morphological processes in the Alpine snow alga *Chloromonas nivalis* (Chlorophyceae) during cyst formation. *Protoplasma*, 243, pp. 73–86.
- Remias, D., Holzinger, A., Aigner, S., and Lütz, C.** (2012): Ecophysiology and ultrastructure of *Ancylonema nordenskiöldii* (Zygnematales, Streptophyta), causing brown ice on glaciers in Svalbard (high arctic). *Polar Biology*, 35: 899–908.
- Remias, D., Wastian, H., Lütz, C. and Leya, T.** (2013): Insights into the biology and phylogeny of *Chloromonas polyptera* (Chlorophyta), an alga causing orange snow in Maritime Antarctica. *Antarctic Science* 25, pp. 648–656.

- Remias, D., Pichrtová, M., Pangratz, M., Lütz, C. and Holzinger, A.** (2016): Ecophysiology, secondary pigments and ultrastructure of *Chlainomonas* sp. (Chlorophyta) from the European Alps compared with *Chlamydomonas nivalis* forming red snow. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, pp. 11.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, I., Suchard, M. A. and Huelsenbeck, J. P.** (2012): MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, pp. 539–542.
- Roser, D. J., Melick, D. R., Ling, H. U., and Seppelt, R. D.** (1992): Polyol and sugar content of terrestrial plants from continental Antarctica. *Antarctic Science*, 4, pp. 413–420.
- Řezanka, T., Nedbalová, L., Sigler, K. and Cepák, V.** (2008): Identification of astaxanthin diglucoside diesters from snow alga *Chlamydomonas nivalis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Phytochemistry*, 69, pp. 479–490.
- Řezanka, T., Nedbalová, L., Kolouchová, I. and Sigler, K.** (2013): LC-MS/APCI identification of glucoside esters and diesters of astaxanthin from the snow alga *Chlamydomonas nivalis* including their optical stereoisomers. *Phytochemistry*, 88, pp. 34–42.
- Schmidt, S. K. and Darcy, J. L.** (2015): Phylogeny of ulotrichalean algae from extreme high-altitude and high-latitude ecosystems. *Polar Biology*, 38, pp. 689–697.
- Sommaruga, R., and Garcia-Pichel, F.** (1999): UV-absorbing mycosporine-like compounds in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 144, pp. 255–269.
- Spijkerman, E., Wacker, A., Weithoff, G. and Leya, T.** (2012): Elemental and fatty acid composition of snow algae in Arctic habitats. *Frontiers in Microbiology*, 3, pp. 15.
- Stibal, M. and Elster, J.** (2005): Growth and morphology variation as a response to changing environmental factors in two Arctic species of *Raphidonema*. *Polar Biology*, 28, pp. 558–567.
- Stibal, M., Elster, J., Šabacká, M. and Kaštovská, K.** (2007): Seasonal and diel changes in photosynthetic activity of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae) from Svalbard determined by pulse amplitude modulation fluorometry. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, pp. 265–273.
- Storey, K. B.** (1997): Organic solutes in freezing tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117A, pp. 319–326.
- Swofford, D. L.** (2003): PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10.
- Takeuchi, N., Kohshima, S., and Seko, K.** (2001): Structure, formation, and darkening process of albedo-reducing material (cryoconite) on a Himalayan glacier: a granular algal mat growing on the glacier. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 33, pp. 115–122.
- Takeuchi, N., Uetake, J., Fujita, K., Aizen, V. B. and Nikitin, S.D.** (2006): A snow algal community on Akkem glacier in the Russian Altai mountains. *Annals of Glaciology*, 43, pp. 378–384.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. and Kumar, S.** (2013): MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, pp. 2725–2729.
- Tazaki, K., Fyfe, W. S., Iizumi, S., Sampei, Y., Watanabe, H., Goto, M., Miyake, Y., and Noda, S.** (1994): Clay aerosols and Arctic ice algae. *Clays and Clay Minerals*, 42, pp. 402–408.
- Ter Braak, C. J. F. and Šmilauer, P.** (2012): Canoco Reference Manual and User's Guide: Software for Ordination (version 5.0), Microcomputer power, Itaca, NY.
- Thomas, W. H.** (1972): Observations on snow algae in California. *Journal of Phycology*, 8, pp. 9.
- Thomas, W. H.** (1994): Tioga pass revisited: Interrelationships between snow algae and bacteria. *Proceedings 62nd Annual Western Snow Conference*, pp. 56–62.
- Thomas, W. H. and Duval, B.** (1995): Sierra Nevada, California, USA, Snow algae: Snow albedo changes, algal-bacterial interrelationships and ultraviolet radiation effects. *Arctic and Alpine Research*, 27, pp. 389–399.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, pp. 4673-4680.
- Verma, V., Bhatti, S., Huss, V. A. R. and Colman, B.** (2009): Photosynthetic inorganic carbon acquisition in an acid-tolerant free-living species of *Coccomyxa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 45, 847-854.
- Vilgalys, R. and M. Hester** (1990): Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172, pp. 4238-4246.
- Weiss, R. L.** (1983): Fine structure of the snow alga (*Chlamydomonas nivalis*) and associated bacteria. *Journal of Phycology*, 19, pp. 200-204.
- Wille, N.** (1903): Algologische Notizen IX-XIV. *Nytt Magazin for Naturvidenskaberne*, 41, pp. 89-185.
- Williams, W. E., Gorton, H. L. and Vogelmann, T. C.** (2003): Surface gas-exchange processes of snow algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, pp. 562-566.
- Wharton, R. A., McKay, C. P., Simmons, G. M., and Parker, B. C.,** (1985): Cryoconite holes on glaciers. *BioScience*, 35, pp. 499-503
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.** (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, New York*, pp. 315-322.
- Wolf, M., Chen, S., Song, J., Ankenbrand, M. and Müller, T.** (2013): Compensatory base changes in ITS2 secondary structures correlate with the biological species concept despite intragenomic variability in ITS2 sequences – a proof of concept. *PLoS ONE*, 8, pp. 5.
- Wujek, D. E.** (1968): Some observations on the fine structure of three green genera in the Tetrasporaceae. *Ohio Journal of Science*, 68, pp. 187-191.
- Wynne, M. J. and Hallan, J. K.** (2015): Reinstatement of *Tetradismus* G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repertorium*, 126, pp. 83-86.
- Xiong, F., Kopecký, J. and Nedbal, L.** (1999): The occurrence of UV-B absorbing mycosporine-like amino acids in freshwater and terrestrial microalgae (Chlorophyta). *Aquatic Botany*, 63, pp. 37-49.
- Yoshimura, Y., Kohshima, S., and Ohtani, S.** (1997): A community of snow algae on a Himalayan glacier: Change of algal biomass and community structure with altitude. *Arctic Alpine Research*, 29, pp. 126-137.
- Zachariah, P. and Liston, J.** (1973): Temperature adaptability of psychrotrophic *Pseudomonas*. *Applied Microbiology*, 26, pp. 437-438.
- Zoller, S. and Lutzoni, F.** (2003): Slow algae, fast fungi: exceptionally high nucleotide substitution rate differences between lichenized fungi *Omphalina* and their symbiotic green algae *Coccomyxa*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 629-640.
- Zwickl, D. J.** (2006): GARLI: genetic algorithm for rapid likelihood inference. <http://www.bio.utexas.edu/faculty/antisense/garli/Garli.html>.

Ostatní zdroje

Algaebase. [webová stránka]. [Datum citace 23. 1. 2016].

<http://www.algaebase.org/>

BizLifes. [webová stránka]. [Datum citace 19. 6. 2016].

<http://bizlifes.net/discovery/770-startle-with-bloody-red-snow.html>

EspaceNet. [webová stránka]. [Datum citace 25. 6. 2016].

<https://www.epo.org/index.html>

TNP (Triglavski narodni park). [webová stránka]. [Datum citace 11. 3. 2017].

http://www.tnp.si/national_park/

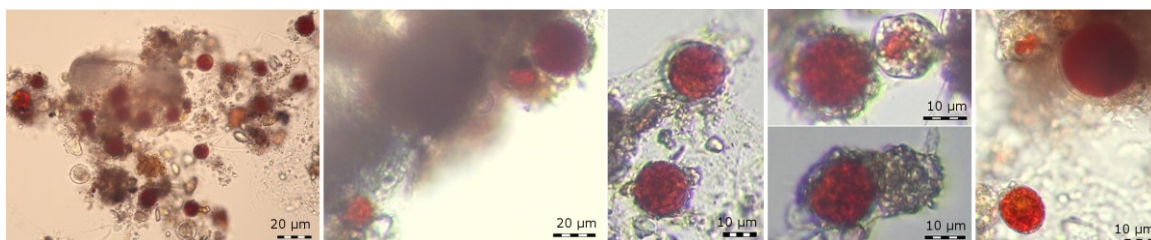
8 Přílohy

Příloha 1: Přehled rozměrů, barvy buněk a morfologie povrchu buněk sněžných řas z jednotlivých lokalit. Barva buněk: 0 – tato barva nebyla ve vzorku přítomná nebo byla ojedinělá, 1 – tato barva buněk byla ve vzorku dominantní. Morfologie povrchu buněk: 0 – buňky s tímto povrchem nebyly ve vzorku zastoupeny, 1 – buňky s tímto povrchem byly ve vzorku zastoupeny minimálně, 2 – buňky s tímto povrchem byly ve vzorku přítomny často, nikoliv však dominantně, 3 – buňky s tímto povrchem ve vzorku dominovaly.

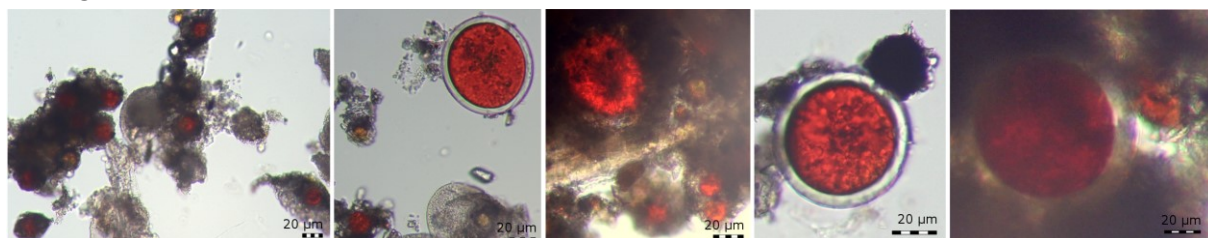
Číslo lokality	Lokalita	Průměr buněk [μm]				Barva buněk			Morfologie povrchu buněk		
		Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota	Oranžová	Červená	Vínová	Hladký	S výrůstky	S výraznými výrůstky
1	Veliki Otari	16.9	2.6	14	26	0	0	1	3	1	0
2	Triglav	22.9	12.8	12	60	0	1	0	3	0	1
3	Iezerul Muntinului	19.2	3.3	12	25	1	0	0	2	2	0
4	Lacul Mândra	15.9	4.1	10	24	0	1	0	3	0	0
5	Lacul Iezerul Mic	19.2	3.3	12	25	0	1	0	3	0	0
6	Val Rosalia	17.8	4.3	11	31	0	0	1	0	3	0
7	Pas de San Nicolo	17.0	2.2	12	21	0	1	0	0	3	0
8	Forcella dal Pief	17.1	2.3	13	23	0	1	0	2	1	2
9	Pas de le Selle	18.3	2.8	13	25	0	0	1	3	0	0
10	Cima de Costabela	17.0	2.5	12	22	0	0	1	3	0	0
11	Wannser Joch	22.0	3.3	15	27	1	0	0	2	2	0
12	Sailer Gruben	23.4	5.2	12	39	1	0	0	3	1	0
13	Steinwandseen	16.7	2.1	12	22	0	1	0	2	2	0
14	Longyearbyen	26.8	9.8	14	48	0	1	0	0	2	2
15	Rondslottet výstup	19.6	3.2	14	30	0	1	0	3	1	0
16	Rondslottet sestup	26.2	6.1	11	35	0	0	1	0	3	0
17	Besegen	19.9	2.5	14	24	0	1	0	1	1	3
18	Memurubu	24.9	6.5	17	48	0	0	1	1	3	0
19	Alterpragerhütte	24.9	3.6	17	33	0	1	0	3	0	0
20	Venedigerkees	18.8	2.1	15	25	0	1	0	1	3	0
21	Kürsingerhütte	19.5	3.0	13	27	0	1	0	3	0	0
22	Obersulzbachkees	28.4	4.7	20	42	0	1	0	3	0	0
23	Simonyispitze	24.4	4.8	16	33	0	1	0	3	0	0
24	Weissmeisschütte	34.1	8.7	17	62	0	1	0	3	1	0
25	Triflbach	33.2	6.7	20	50	0	1	0	3	1	0
26	Nuefenen Pass	32.3	5.3	17	42	0	1	0	3	1	0
27	Rif. Similaun	24.2	4.5	17	40	0	1	0	2	2	0
28	Similaun	14.4	3.2	9	20	0	1	0	2	2	0
29	Kačkar Dağı	25.8	3.5	19	33	0	1	0	2	2	0
30	Vedretta del Gran Zebru	19.1	1.9	15	23	1	0	0	1	3	0

Príloha 2: Mikrofotografie buněk ze vzorků z terénu.

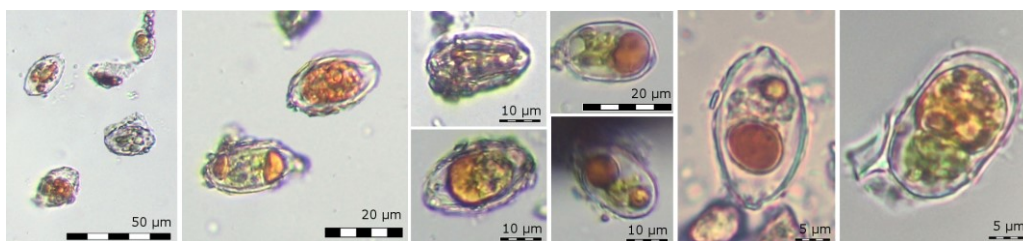
1 - Veliki Oltar, Slovinsko



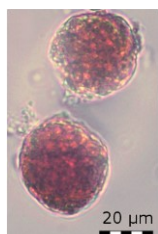
2 - Triglav, Slovinsko



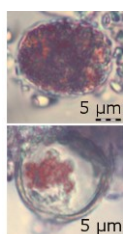
3 - Iezerul Muntinului, Rumunsko



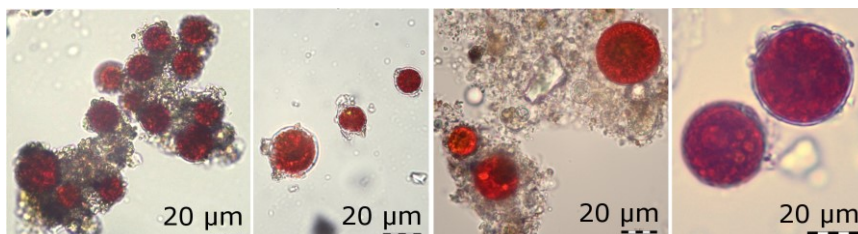
4 - Lacul Mândra, Rumunsko



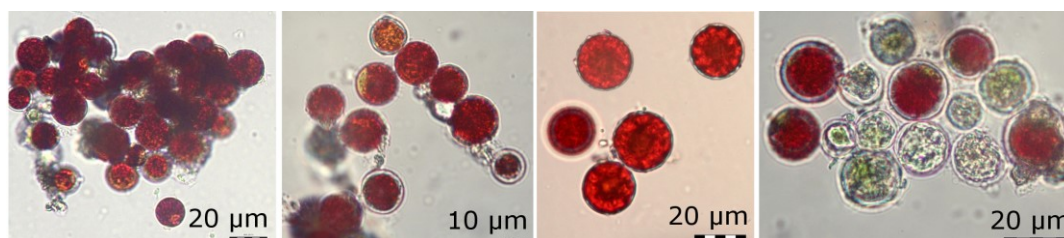
5 - Lacul Iezerul Mic, Rumunsko



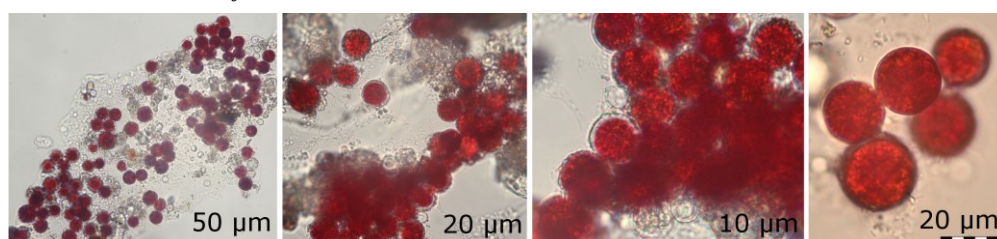
6 - Val Rosalia, Itálie



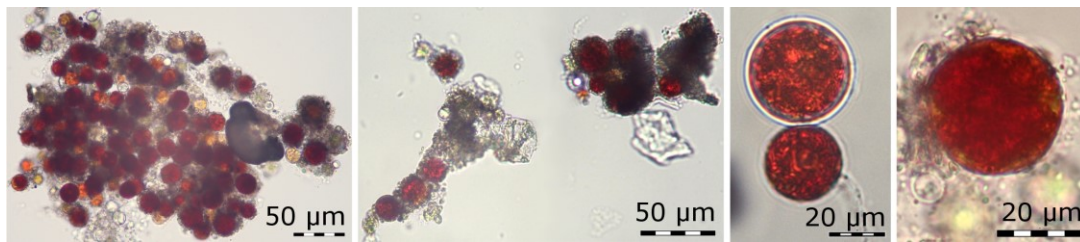
7 - Pas de San Nicolo, Itálie



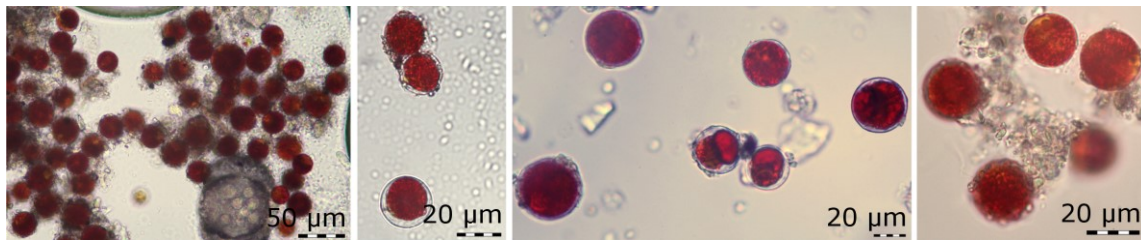
8 - Forcella dal Pief, Itálie



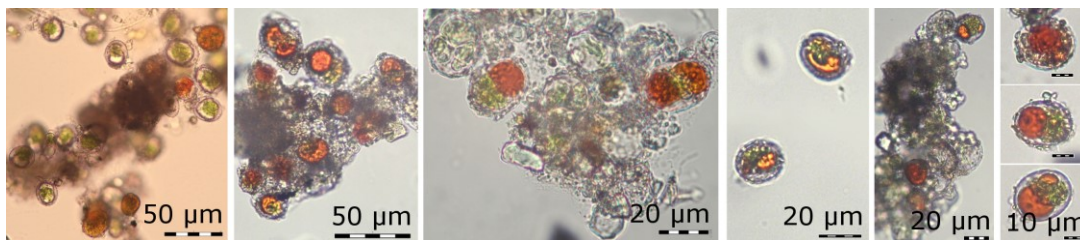
9 - Pas de le Selle, Italie



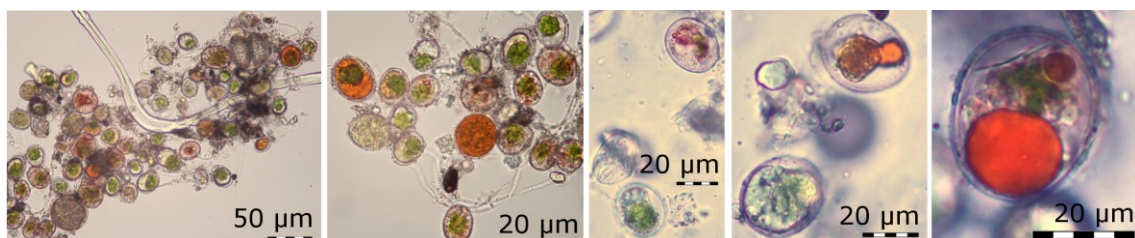
10 - Cima de Costabella, Italie



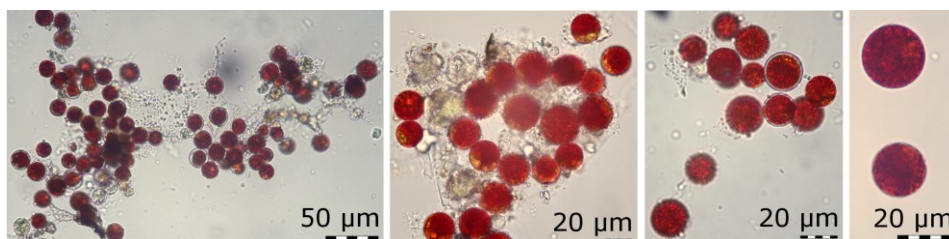
11 - Wannser Joch, Italie



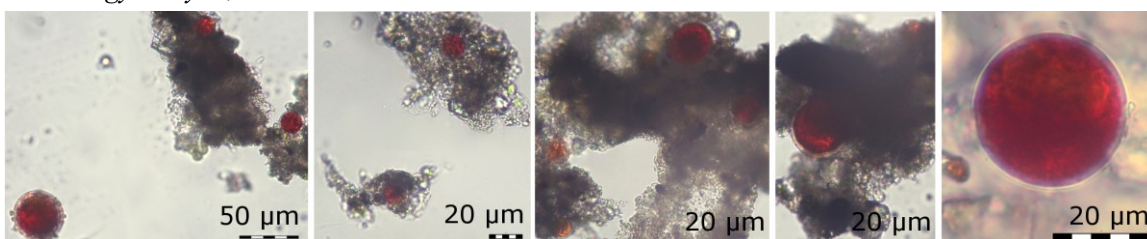
12 - Sailer Gruben, Italie



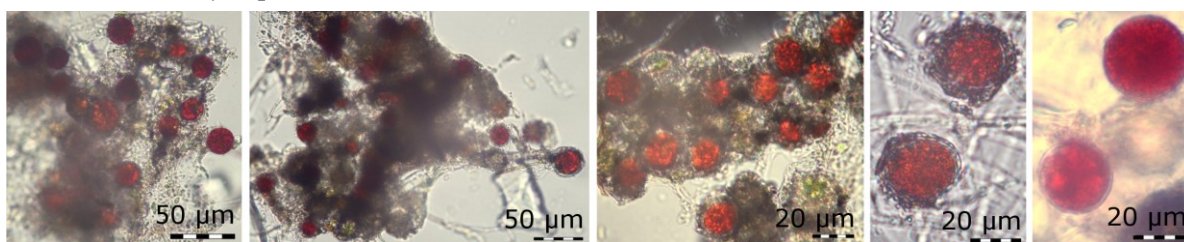
13 - Steinwandseen, Italie



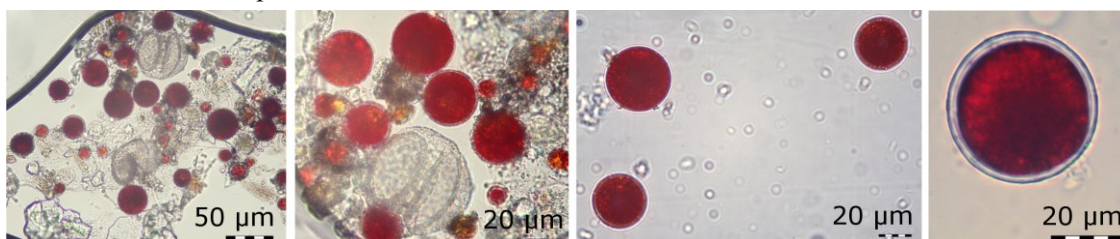
14 - Longyearbyen, Svalbard



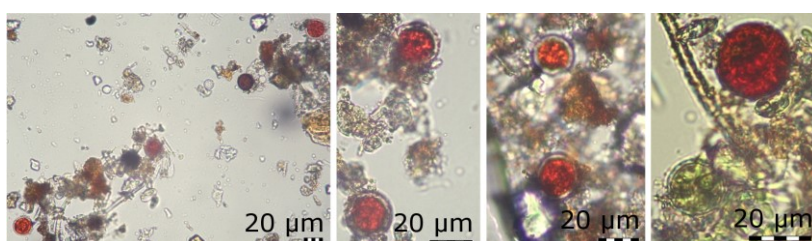
15 - Rondslottet vystup, Norsko



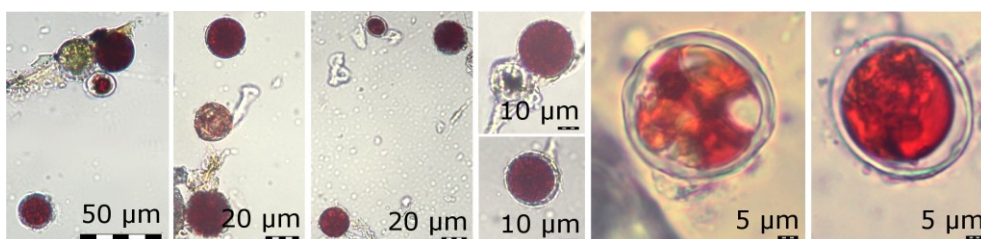
16 - Rondslottet sestup, Norsko



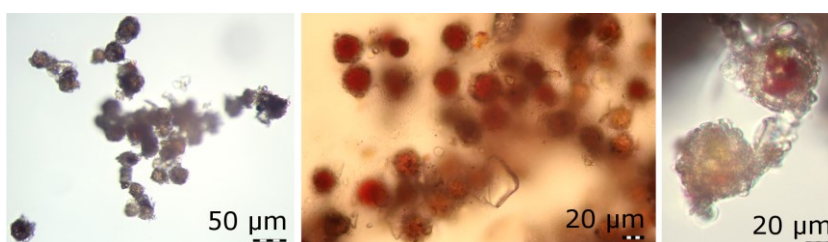
17 - Bessegen, Norsko



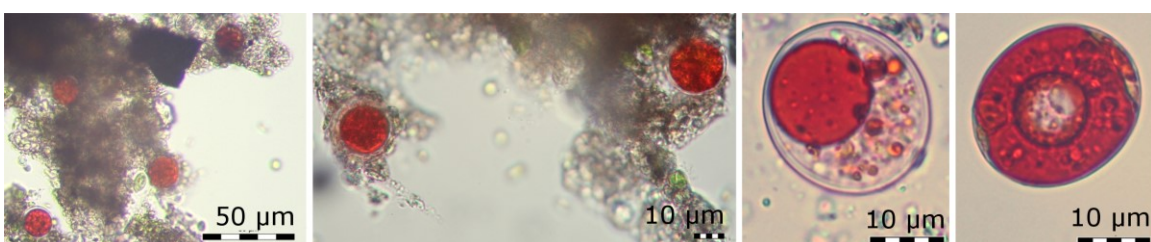
18 - Memurubu, Norsko



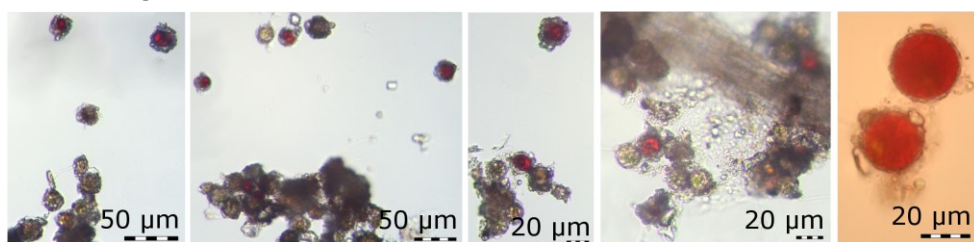
19 - Alterpragerhutte, Rakousko



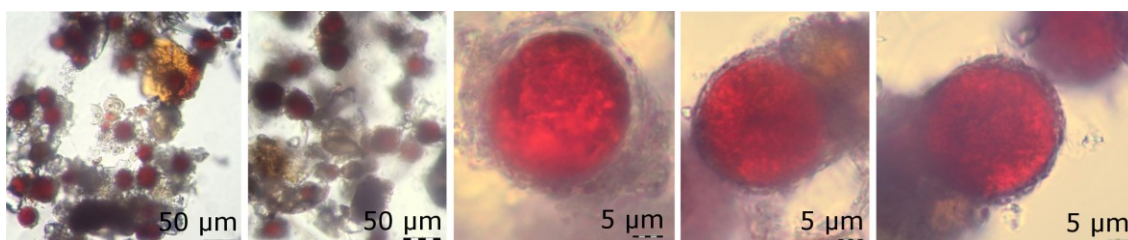
20 - Venedigerkees, Rakousko



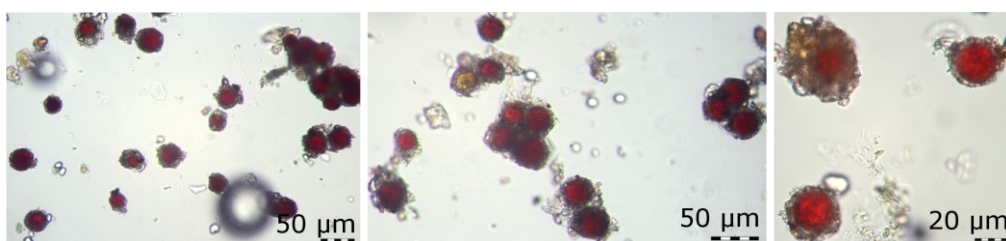
21 - Kürsingerhütte, Rakousko



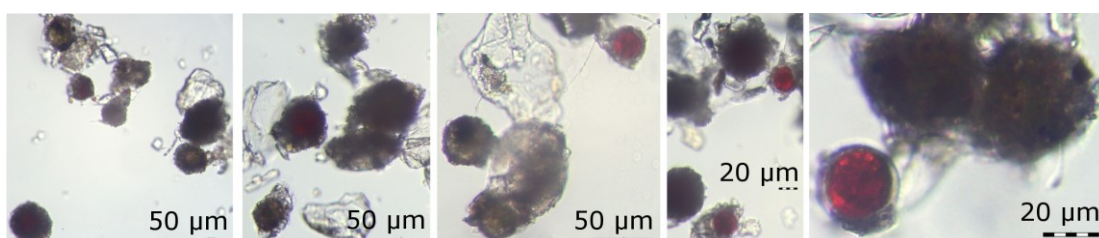
22 - Obersulzbachkees, Rakousko



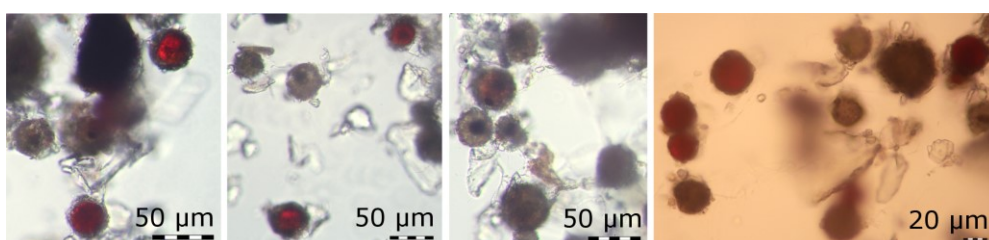
23 - Simonyspitze, Rakousko



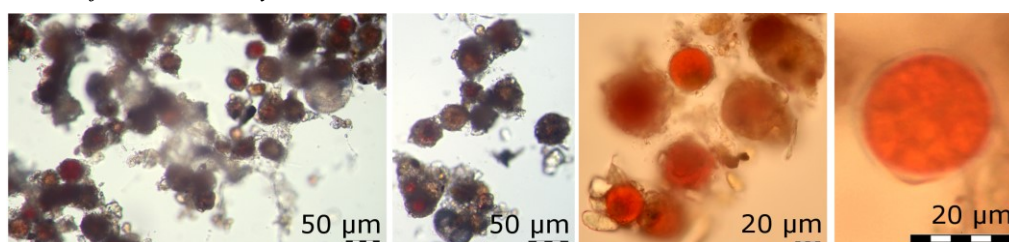
24 - Weissmeishütte, Švýcarsko



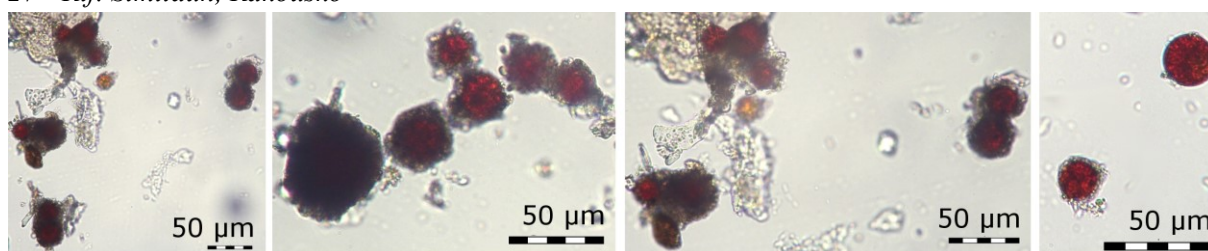
25 - Triftbach, Švýcarsko



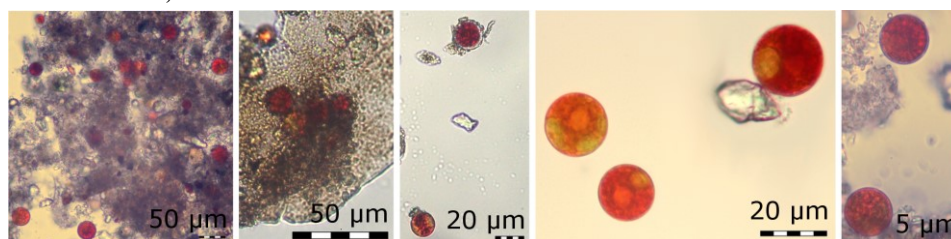
26 - Nufenen Pass, Švýcarsko



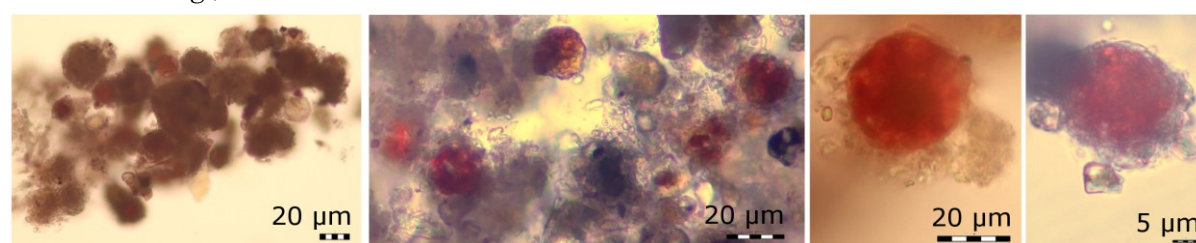
27 - Rif. Similaun, Rakousko



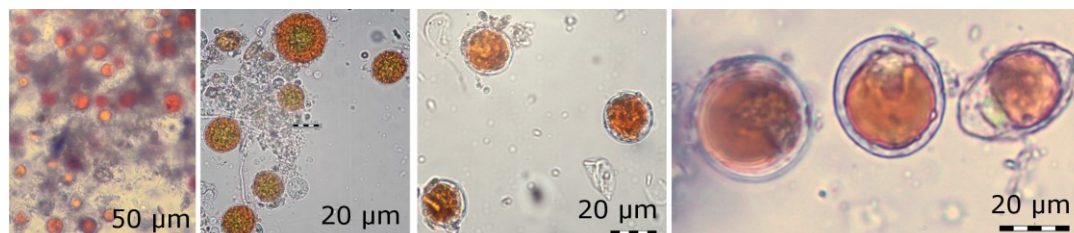
28 - Similaun, Rakousko



29 - Kackar Dagı, Turecko



30 - Vedretta del Gran Zebru, Itálie



Príloha 3: Částečné sekvence 18S rDNA pro izolované kmeny. V názvu je uvedena lokalita sběru vzorku, číslo lokality a v závorce použité primery pro PCR.

1 - Veliki Oltar (F2, R2)

ATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGA
GCTAATACGTGCGTAAACCCGACTTCTGGAAGGGTCGTATTATTAGATAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACTCGCGGTGA
ATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATA
GAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACCACATCCA
AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCGCTTCGCGTC
TGTAATTTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCC
AGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGATGGTGCGGTCCGCCTCTGGGT
GTGCACTGCTCCGTTCCACCTTCTGCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGATGTTACTTTG
AGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCTTATCTGTTGGT
CTGTGAGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCAATTCGATTCCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTATGGA
AGACGAACATCTGCGAAAGCATTGTCGAAGGATGTTTCATTGATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAC
CGTCGTAGTCTCAACCAATAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGATGTTCCATTGATGACTCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCA
AAGGTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACAGGCGTGGAGC
CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTTACCAGGTCCAGACACGGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGA
TTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGGCTTGTACAGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCT
GCTAAATAGTCAGCATCGCACCTGCGGTGCGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTTAGCCAATGGAAGTATGAGGCGATA
ACAGGTCTGTGATGCTTCTAGATGTTCTGGGCCGACGCGGCTTACATGATGCGACCAACGAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGC
CCGGGTAATCTTGAACCGCATCGTATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAGTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCGAG
TCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCG
GACTGGCTTTGCTTG

2 - Triglav (F2, R2)

AAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATAC
GTGCGTAAACCCGACTTCTGGAAGGGTCGTATTATTAGATAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGAT
AATTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCT
ACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACCACATCCAAGGAAG
GCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCGCTTCGCGTCTGGTAA
TTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGTCC
AATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGATGGTGCGGTCCGCCTCTGGGTGTGAC
TGCTCCGTTCCACCTTCTGCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGATGTTACTTTGAGTAAA
TTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCTTATCTGTTGGTCTGTGA
GACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCAATTCGATTCCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTATGGAAGACGA
ACATCTCAGCAATGCAAGCATTGCCAAGGATGTTTTATTGATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTAGTA
GTCTCAACCAATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGATGTTCCATTGATGACTCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTT
TGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGC
TTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCAGACACGGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGG
GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGCTTGTACAGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATA
GTACGATCGCACCTGCGGTGCGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTTAGCCAATGGAAGTATGAGGCGATAACAGGTCT
GTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGATGCGACCAACGAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAA
TCTTGAAAACCGCATCGTATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAGTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGC
TCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCGGACTGGC
TTTG

7 - Pas de San Nicolo (F1, R1)

ACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTYGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTC
GATGGTAGGATAGAGGCCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG
CTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGG
GCTTTTCAAGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGATGGGTTCCGTCGGT
CCGCGTTTCCGGTGTGCACTGACGGCGCTATCTGCTGTCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCG
ACGAGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCT
GGCCTATCTTGTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCAATTCGATTTCATTGTCAGAGGTGAAA
TTCTTGGATTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGTCGAAGGATGTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCG
AAGCATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCAATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGTGGATGTTTATTGATGACTTACCAGCAC
CTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCA
CCAGGCGTGGAACCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAG
AGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGCTTGTACAGTTGATTCCGGTAACGAACG
AGACCTCAACCTGCTAAATAGTCACGATCGATTTTTTCGGTTGGCCGACTTCTTAGAGGGACTGTTGGCGACTAGCCAATGGAA
GTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGTTACACTGATGCAATTCAACGAGCCTATCCT
TGACCgagaggtccgggNNatCTGCGAAACTGCATCGTATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAA
GCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGA
AGA

10 - Cima de Costabella (F1, R1)

gGaCgtaTttattagAtaaAagGccgaccggGcTetgcccGAATCGCGGTGAATCATGATAACTCCACGAATCGCATGGCCCCAGTGCCGGCGAT
GTTTCATTCAAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGACGGTAAGGTATTGGCTTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGT
TCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTTGACACA
AGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGGTTTTTCAACTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTTAACGAGG
ATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGGACGTTTCAACGACTCGCTGTTGACGCCAGAGATAGTGGGGCGGGCGCTTGGCCGTTACGCC
CGCTAGTCGAGCAGTCCGCGTGCAGGATCGGGTGAATGCGCGCAAGACGACCTGGAACGGGGAAGGCCCTTCAATCGAATTGAGGTTG
ATCCCGTGGCGAGCTCGCACAGGGGCGACCTGTGCGGAGCCGTCGTAACGCACGGAAGGGCGTCGGCCGACTCTCCGAGTCGGTTTA
AGGGACGTGCTAAACCCATCCGATGACAAAGGGTGCCCCGACGAGAGATCCCGATCATCGAAGGTCCGGGGGGGATGAGAGCGCA
gGGAGGAAATGCCCTGCGCTATCCGGTACTCGcGGCGGCCACGAGAGtgGTCcgCCGtGAATTgGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGC
TCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGCGGGGCCGGCCGCTCCGCCTTTTGGTGTC
CACTGACCGGGCCCGTCTTGTGGCGGGACGGGCTCCTGGGCTTAACGTGCCGGACTCGGAGTCGGCGAGGTTACTTTGAG
TAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCTATCTTGTGGTC
TGTGGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCAATTCGATTTCATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTATGAAA
GACGAACACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACC
GTCCATAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCGGGCGTCTTTTGATGACCCCGCCAGCACCTTATGAGAAATCA
AAGTTTTTGGGTTCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACACCAGGCGTGGAGC
CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGAT
TCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTCTTAGTTGGTGGGTGCTTGTGACGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCGT
CTAAGTAGTCACGATTGGTTCTTCCAGTCGCGCGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGTGTGAGGCAATA
ACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCAATCAACGAGCCTAGCCTTGGCCGACAGgtc
cgggTATtCTGtGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATGATTGCAATTATTCATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCGAGTCA
TCAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAG

17 - Bessegen (F2, R2)

ATTAAATCAGTTATAGTTTATTGATGGTACCTTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGGAAATCCCGA
CTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTCCACGAATCGC
ATGGCCTCAGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGACGGTAAGGTATTGGCTTACCGTGGTGGTAAC
GGGTGACGGAGGATTAGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCA
AATTACCCAATCTTGACACAAGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGGTTTTTCAACTCTGGTAATTGGAATGAGTACA
ATCTAAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTA
AGTTGTTGCAAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGCGGGCCGGCCGGTCCGCCTTTTGGTGTGCTGACTGACCCGGcCCGTC
TTGTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGAGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAA
AGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAAT
GATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTGCTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTATGAAAGACGAACACTACTGCGAAA
GCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCAT
AACGATGCCGACTAGGGATTGCGGGCGTCTTTTGTGATGCCCGCCGAGCACCTTATGAGAAATCAAAAGTTTTTGGGTTCGGGG
GGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTC
AACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCAT
GGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGCTTGTGAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAACTAGTCACGCTTGGT
TCTTCCAGGCGGCCGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGTGTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTT
AGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCAATCAACGAGCCTAGCCTTGGCCGACAGGTCCGGGTAATCTTTGAAACT
GCATCGTGATGGGGATAGATGATTGCAATTATTCATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCGAGTATCAGCTCGCGTTGATT
ACGTCCCTGCCCTTTGTaCACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGCGTTCCGATTGGCG

21 - Kürsingerhütte (F1, R1)

taTtaTCaTAtaaAagGccgaccggGcTtgcccGAATCGCGGTGAATCATGATAACTCCACGAATCGCATGGCCTCAGCGCCGGCAATGTTTC
ATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGACGGTAAGGTATTGGCTTACCGTGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCgAT
TCCGGAgAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTTGACACAAGGAG
GTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGGTTTTTCAACTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTTAACGAGGATCAAT
TGGAGGGCAAGTCTGGTGAATCTCTCGACAGAGATTGCTGTTGACGCCAGAGATAGTGGGGCGGCTGCCTGTCATAAGG
GCAGCCGTAAAGCCCGCTAGTCGAGCAGTCGATTGGAACGGATCGGGTGAATGCGCGCAAGACGACCTGGTACGGGGAAGGC
CTTCAATTGATTGAGTTAATCCCGTGGCGAGCTTGAGCGGGcGACCCGCTCGAAGCCGCTGAAGCCGCTAACGCACGGTAAGGCGTCG
GCCGACTCTCGCAGTCGGTTTAAGGGACGTGCTAAACCCATCCGATGAAAAAGGATGCCCGGACAGTAGACCCCGATCGTCG
AGGGTCCGGGGGGGTGACAGTGCCgGGAGGAAATGCCCGTGCATATATCCGGTATCCACGGGCGGTCTCTCGATCAATCGAG
GGACCGTCGGTGTTTGCCAGCAGCCgCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTACTAGGGGATTGGCGGGCGTCTTTTGA
TGACCCCGCAGCaCCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGGAGTATGGTTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATT
GACGGAAGGGCACACCAGGCGTAAAATACATTAGGCTTTGCGCTTCAAAGGCGCTCCTTCAAAGGGAGCGCCTAGTGCCTGA
CCCCGGTCAGGCGCAACACCGTCCAATTGCGGGGACTCCCTAAAGCTCGTGACACCAAACGGTGCGGGGAAACCCACCGT
GGCCAGGCCAATCACCTGGGTATGGTAAAAAGCGGCATGAGATGAAAGGCGCCAGCGCCTGAAATGGGTGATCCGACGCCAAGT
CTACCGAGCCCGGACCGAGCCGGGTTCACGGATGCAGTTCACAGACTAAATGGCGGTGGGTTCGGATGGAGCTTAAGAT
ATAGTCGAGACCCTCGAGAGGAGTTCCGTCGAGAGGATCCGGTTCGTTGAGGAAAGTGTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCT
TGCCGGAGAGATTCCGTCAACGGCTGAAACACGCCCTCGCCATCCGGAGCAATCGGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACAC
GGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCG
TTCTTAGTTGGTGGGTGCTTGTGAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAACTAGTCACGATTGGTTCTTCC
AGTCCGGCAGACTTCTGAGAGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGTGTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGT
TCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCAATCAACGAGCCTAGCCTTGGCCGACAGgtccgggTANtTtCGAAACTGCATCGTGA
TGGGGATAGATGATTGCAATTATTCATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCGAGTATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTG
CCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAG

27 - Rif. Similaun (F1, R1)

TGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTC
AACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCGGGTGTTTMTGTTGATGACCCCGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTHTTTGG
GTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGGCTTA
ATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACACGGGAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTCTGTGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGCTTGTACAGTTGATCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGT
CACAGTTGCCCTGCGCAGYTGGCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGTCGTTTAGGCAATGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTG
TGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGccccgggtaNtctNtG
AAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTmrTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCG

30 - Kackar Dagi (P2, P4)

TGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTATACTGTGAAmCTGCGAATGGCTCAwTAAATCAGTTATAGTTTATTTGGTGGTACCTTACTA
CTCGGATAACCGTAGTAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATATATTAGATAAAAGGCCGA
CCGAGCTTTGCTCGACCCGCGGTGAATCATGATATCTTACGAAGCGCATGGCCTTGTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTG
CCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGA
GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGACAATAA
ATAACAATACCGGGCATTATGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCT
GGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTG
GGTTCTAGCGGTCCGCCATGGTGAGTACTGCTATGGCCTTCCTTTCTGTGCGGGACGGGCTTCTGGGCTTCACTGTCCGGGACT
CGGAGTCGACGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCAGAATACTTTAGCATGGAATAACACGATA
GGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTCAATTGTCAGA
GGTGAAATTTCTGGATTTATGAAAGACGAACCTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGG
GGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCGAATGTTTTTTTAAATGACTTC
GCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCGCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAA
GGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGAC
AGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGCTTGTGAGGTTGATTCCGGT
AACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCTCAGTTGCTTTTTGCGCTGGCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTTGT
CAATGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACAA
GCCTATCCTTGACCGAAGGGTCTGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAGTCTTCAACGA
GGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCyTGCCTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTG
GGTGTGCTGGTGAAGTGTTCCGATTGGCAGCTTAGGGTGGC

Příloha 4: Sekvence použité pro tvorbu fylogenetických stromů.

- Sekvence z fylogenetického stromu třídy Chlorophyceae:

Název kmenu	Označení v GenBank	Poznámka
Kmeny příbuzné nově získaným sekvencím dle BLAST		
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	GU117577	
<i>Chlamydomonas</i> sp. Tow 2/24 P-8d	AY220083	
<i>Tetrademus obliquus</i> CCAP 276/3A	KU900221	
Demchenko et al., 2012		
<i>Chlamydomonas zebra</i> SAG 10.83	U70792	
Fawley et al., 2004		
<i>Coelastropsis costata</i>	AB037083	
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	AB037088	
Matsuzaki, 2014		
<i>Chloromonas tenuis</i> SNO132	AB906347	
Matsuzaki, 2015		
<i>Chloromonas fukushimae</i> GsCI-11	AB906342	
<i>Chloromonas chenangoensis</i> UTEX SNO150	AB906341	
<i>Chloromonas nivalis</i> Gassan-C	LC012715	
<i>Chloromonas nivalis</i> Hakkoda-3	LC012716	
<i>Chloromonas tughillensis</i> UTEX SNO 88	AB734116	
Nakada et al., 2010		
<i>Eudorina unicocca</i> NIES-1858	AB511841	
<i>Gonium multicoccum</i> NIES-1708	AB511840	
Pröschold et al., 2001		
<i>Chlamydomonas debaryana</i> SAG 26.71	AF008240	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 1061	J02949	
<i>Nephroselmis olivacea</i> SAG 40.89	X74754	outgroup
<i>Paulschulzia pseudovolvox</i> UTEX 167	U83120	
<i>Pseudoscourfieldia marina</i> CCMP 717	X75565	outgroup
<i>Scenedesmus obliquus</i> SAG 276-3A	X56103	
<i>Scenedesmus ovalternus</i> SAG 52.80	X81966	
<i>Scenedesmus vacuolatus</i> SAG 211-8b	X56104	
Pröschold et al., 2005		
<i>Vitreochlamys ordinata</i> NIES-882	LC086344	
Remias et al., 2013		
<i>Chlamydomonas nivalis</i> red snow cysts „little orange“ CCCryo 8-2/04	JQ790557	
<i>Chlamydomonas nivalis</i> red snow cysts „warty red“ CCCryo 04/10	JQ790560	
<i>Chlamydomonas nivalis</i> red snow cysts „little orange“ CCCryo 6-1/04	JQ790558	
<i>Chlamydomonas nivalis</i> red snow cysts „little orange“ CCCryo 102/98	AF514411	
<i>Chlamydomonas nivalis</i> red snow cysts „warty red“ CCCryo 84/98	AF514412	
<i>Chlamydomonas nivalis</i> red snow cysts „warty red“ CCCryo 13-1/04	JQ790559	
Indet. <i>chlamydomonad</i> CCCryo 086a-99	GU117586	
<i>Chloromonas brevispina</i> UTEX SNO132	AF517092	
<i>Chloromonas nivalis</i> DRAIp024	GU117576	
<i>Chloromonas pichinchae</i> UTEX SNO33	AF517087	
<i>Chloromonas polyptera</i> DRAnt023	JQ790556	
<i>Chloromonas reticulata</i> SAG 29.83 (Akanym: <i>Cd. Yellowstonensis</i> , <i>Cd. Augustae</i> , <i>Cr. clathrata</i>)	AJ410448	
<i>Chloromonas reticulata</i> UTEX LB 1969 (Akanym: <i>Cd. Nivalis</i> , <i>Cd. Augustae</i>)	CNU57696	
Remias et al., 2016		
<i>Chlainomonas</i> sp. HW01/clone1	GU117574	
<i>Chlainomonas</i> sp. HW01/clone17	GU117575	

- Sekvence z fylogenetického stromu třídy Trebouxiophyceae:

Název kmenu	Označení v GenBank	Poznámka
Sbírkové kmeny příbuzné nově získaným sekvencím dle BLAST		
<i>Coccomyxa silvae-gabretae</i> CCALA1095	KX809909	
<i>Coccomyxa</i> sp. IB-T-91	KM020151	
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> SAG 216-13	HG972978	
<i>Pseudochlorella signiensis</i> CCAP 211/57	LT560364	
Environmentální vzorky příbuzné nově získaným sekvencím dle BLAST		
<i>Coccomyxa</i> sp. GA5a	AB917140	
<i>Choricystis</i> sp. GSE4G	HE586518	
<i>Coccomyxa</i> sp. RCC903	KT860910	
<i>Pseudococcomyxa</i> cf. <i>simplex</i> WB40	KF144226	
<i>Chlorella</i> sp. ANT3	AB903014	
Uncultured eukaryote TE207G	KM870737	
<i>Paradoxia</i> sp. 294-GA206	EU282454	
Barcyte and Nedbalová, 2016		
<i>Coccomyxa elongata</i> DB-2016-Hromnice	KX809905	
<i>Coccomyxa fotii</i> CCALA 428	KX809910	
<i>Coccomyxa simplex</i> CCALA 425	KX809906	
<i>Trebouxiophyceae</i> sp. VPL5-6	FJ946891	
Darienko et al., 2015		
<i>Choriocystis</i> sp. CAUP H5107	HG972981	
<i>Coccomyxa arvernensis</i> SAG 216-1	HG972999	
<i>Coccomyxa chodatii</i> SAG 216-2	FJ648512	
<i>Coccomyxa elongata</i> SAG 216-3b	KF673385	
<i>Coccomyxa mucigena</i> SAG 216-4	FJ648513	
<i>Coccomyxa peltigerae</i> SAG 216-5	HG972982	
<i>Coccomyxa peltigera-variolosae</i> SAG 216-6	KF673361	
<i>Coccomyxa pringsheimii</i> SAG 69.80	AY762603	
<i>Coccomyxa rayssiae</i> SAG 216-8	KF673389	
<i>Coccomyxa simplex</i> SAG 216-9a	FN298926	
<i>Coccomyxa solorina-bisporae</i> SAG 216-10	KF673383	
<i>Coccomyxa solorina-croceae</i> SAG 216-11a	KF673360	
<i>Coccomyxa solorina-saccatae</i> SAG 216-12	KF673386	
<i>Coccomyxa</i> sp. CCAP 216/24	FN298927	
<i>Coccomyxa</i> sp. NIES 2252	HG972973	
<i>Coccomyxa</i> sp. SAG 2040	KM116459	
<i>Coccomyxa</i> sp. SAG 2325	AJ302939	
<i>Coccomyxa</i> sp. SAG 49.84	HG972998	
<i>Coccomyxa viridis</i> SAG 216-14	KF673392	
<i>Pseudococcomyxa closterioides</i> SAG 2253	KM020051	
<i>Pseudococcomyxa simplex</i> CCAP 812/2A	HG972992	
<i>Pseudococcomyxa simplex</i> CCAP 812/3	HG972972	
Darienko et al., 2016		
<i>Coccomyxa galuniae</i> CCAP 211/97	FN298928	
<i>Coccomyxa polymorpha</i> CAUP H5101	HG972979	
<i>Coccomyxa vinatzeri</i> ASIB V16	HG972994	
<i>Koliella antarctica</i> SAG 2030	AJ311569	
<i>Koliella longiseta</i> SAG 470-1	HE610126	
<i>Pseudochlorella pringsheimii</i> SAG 211-1a	LT560356	
<i>Pseudochlorella pyrenoidosa</i> CCAP 264/3	LT560357	
<i>Pseudochlorella signiensis</i> SAG 2300	LT560365	
<i>Pseudochlorella signiensis</i> SAG 2374	LT560363	
<i>Pseudochlorella signiensis</i> SAG 3.80	LT560359	
<i>Pseudochlorella signiensis</i> SAG 7.90	LT560360	
<i>Oocystis heteromucosa</i> SAG 1.99	AF228689	outgroup
<i>Oocystis marssonii</i> KR-1996/10	AF228688	outgroup

Leya, 2003		
<i>Chlorella ellipsoidea</i> IAM C-87	D13324	
<i>Chlorella mirabilis</i> Andreyeva 748-I	X74000	
<i>Chlorella sphaerica</i> SAG 11.88	AJ416105	
indet. Trebouxiophyceae CCCryo 46/99	AF514413	
<i>Koliella sempervirens</i> CCALA 363	AF278743	
<i>Pabia signensis</i> SAG 7.90	AJ416108	
<i>Raphidonema longiseta</i> UTEX 339	U18520	
<i>Raphidonema nivale</i> CCAP 470/4	AF448477	
<i>Raphidonema sempervirens</i> CCCryo 011a-99	AF514410	
<i>Stichococcus bacillaris</i> SAG 379-1b	AJ416107	
<i>Stichococcus bacillaris</i> UTEX 314	U18524	
<i>Stichococcus chodatii</i> UTEX 1177	AB055867	
Malavasi et al., 2016		
<i>Coccomyxa melkonianii</i> SCCA048	KU696488	
<i>Coccomyxa onubensis</i> ACCV1	HE617183	
<i>Coccomyxa</i> sp. IB-GF-12	KM020052	
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> SAG 216-7	KF673358	

Príloha 5: Sekvence ITS2 s koncom sekvence 5.8S rDNA a začátkem sekvence 26S rDNA z terénnych vzorků. V názvu je uvedena lokalita sběru vzorku, číslo lokality a v závorce použité primery pro PCR.

1 - Veliki Oltar (AB, TW)

CTCAGCGTCGGGTTAATTCTCGCCCATCATCTTCCCTGTGTTGATGATCTGGGCGGATCTGGCTTTCTCAGCTCTCACGAGCTGG
GTTAGYTGAAGTACAGAGGTTAATGCATGGACCCGTTAAGGGCTGCAGCTGGTTAGGCAGTGATGCTATCGATTAGCTGTTGGT
CTGGGAACTGCGTTTGACCCTCCACAAGGAACTTAATTATTTCTCGACCTGAG

7 - Pas de San Nicolo (AB, TW)

CTCAGCGTCGGGTTAATTCTCGCCCATCATCTTCCCTGTGTTGATGATCTGGGCGGATCTGGCTTTCTCAGCTCTCACGAGCTGG
GTTTGCTGAAGTACAGAGGTTAATGCATGAACCCGTTAAGGGCTGCAGCTGGTTAGGCAGTGATGCTATCGATTAGCTGTTGGT
CTGGGAACTGCGTTTGACCCTCCACAAGGAACTTAATTATTTCTCGACCTGAG

8 - Forcella dal Pief (LSU, SSU)

CTCAGCGTCGGGTTAATTCTCGCCCATCATCTTCCCTGTGTTGATGATCTGGGCGGATCTGGCTTTCTCAGCTCTCACGAGCTGG
GTTAGCTGAAGTACAGAGGTTAATGCATGGACCCGTTAAGGGCTGCAGCTGGTTAGGCAGTGATGCTATCGATTAGCTGTTGGT
CTGGGAACTGCGTTTGACCCTCCACAASGAACTTAATTATTTCTCGACCTGAG

10 - Cima de Costabella (AB, TW)

CTCAGCGTCGGGTTAATTCTCGCCCATCATCTTCCCTGTGTTGATGATCTGGGCGGATCTGGCTTTCTCAGCTCTCACGAGCTGG
GTTAGCTGAAGTACAGAGGTTAATGCATGGACCCGTTAAGGGCTGCAGCTGGTTAGGCAGTGATGCTATCGATTAGCTGTTGGT
CTGGGAACTGCGTTTGACCCTCCACAAGGACACTWAATTATTTCTCSAYCTGAR

13 - Steinwandseen (AL1500, LR3)

CTCAGCGTCGGGTTAATTCTCGCCCATCATCTTCCCTGTGTTGATGATCTGGGCGGATCTGGCTTTCTCAGCTCTCACGAGCTGG
GTTTGCTGAAGTACAGAGGTTAATGCATGAACCCGTTAAGGGCTGCAGCTGGTTAGGCAGTGATGCTATCGATTAGCTGTTGGT
CTGGGAACTGCGTTTGACCCTCCACAAGGAACTTAATTATTTCTCGACCTGAG

16 - Rondsloppet sestup (LSU, SSU)

CTCASCCTCGGGTTAATTCTCGCCCATCATCTTCCCTGTGTTGATGATCTGGGCGGATCTGGCTTTCTCAGCTCTCACGAGCTGG
GTTTGCTGAAGTACAGAGGTTAATGCATGGACCCGTTAAGGGCTGCAGCTGGTTAGGCAGTGATGCTATCGATTAGCTGTTGGT
CTGGGAACTGCGTTTGACCCTCCACAAGGAACTTAATTATTTCTCGACCTGAG

22 - Obersulzbachkees (LSU, SSU)

CTCAGCGTCGGGTTAATTCTCGCCCATCATCTTCCCTGTGTTGATGATCTGGGCGGATCTGGCTTTCTCAGCTCTCACGAGCTGG
GTTTGCTGAAGTACAGAGGTTAATGCATGAACCCGTTAAGGGCTGCAGCTGGTTASGCAGTGATGCTATCGATTASCTGTTGGT
TGGAAGCTGCGTTTGACCCTCCACAAGGAACTTAATTATTTCTCGACCTGAS

25 - Triftbach (LSU, SSU)

CTYAGCGTCGGGTTAATTCTCGCCCATCATCTTCCCTGTGTTGATGATCTGGGCGGATCTGGCTTTCTCAGCTCTCACGAGCTGG
GTYTGCTGAAGTACAGAGGTTAATGCATGGACCCGTTAAGGGCKGCAGCIGGTTAGGCAGKGAKEVATCGRTT

27 - Rifugio Similaun (AB, TW)

CTCAGCGTCGGGTTAATTCTCGCCCATCATCTTCCCTGTGTTGATGATCTGGGCGGATCTGGCTTTCTCAGCTCTCACGAGCTGG
GTTTGCTGAAGTACAGAGGTTAATGCATGAACCCGTTAAGGGCTGCAGCTGGTTAGGCAGTGATGCTATCGATTAGCTGTTGGT
CTGGGAACTGCGTTTGACCCTCCACRAKGAACTTAATTAKTTCTCRACCTGAG

28 - Similaun (AB, TW)

CTCAGCGTCGGGTTAATTCTCGCCCATCATCTTCCCTGTGTTGATGATCTGGGCGGATCTGGCTTTCTCAGCTCTCACGAGCTGG
GTTTGCTGAAGTACAGAGGTTAATGCATGAACCCGTTAAGGGCTGCAGCTGGTTAGGCAGTGATGCTATCGATTAGCTGTTGGT
CTGGGAACTGCGTTTGACCCTCCACAAGGAACTTAATTATTTCTCGACCTGAG