

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Bakalářská práce

Genetická variabilita a specifita fotobiontů rodu *Cladonia*
(Ascomycetes)

Genetic variability and specificity of photobionts of genus *Cladonia*
(Ascomycetes)

Tereza Řídká

2009

Školitel: Mgr. Pavel Škaloud, PhD.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá problematikou fotobiontů v lišejnících. Je zaměřena na řasové fotobionty, tedy fykobionty.

První část, literární rešerše, shrnuje poznatky o lišejnících, řasách a vztazích mezi fotobiontem a mykobiontem. Tato část pojednává o výhodě genetické variability, která umožňuje adaptaci na měnící se podmínky prostředí. Dále se zabývá specifitou a selektivitou symbiontů, kde se s nižším stupněm selektivity objevuje více fotobiontů v jedné stélce lišejníku. Nakonec zmiňují otázku koevoluce, která rozděluje vědecké pracovníky na dva tábory. Jedni podporují společný vývoj symbiontů, druzí ho naopak vyvracejí.

Druhá část popisuje postupy mé vlastní práce v laboratoři, izolaci DNA lišejníku *Cladonia macilenta* a amplifikaci určitých sekvencí pomocí PCR. Dosažené výsledky odpovídají na otázku taxonomického zařazení fotobionta, nebo zda jedna stélka neobsahuje více druhů fotobiontů.

Klíčová slova: *Cladonia macilenta*, *Asterochloris*, *Trebouxia*, fotobiont, mykobiont, selekce, specifita, diverzita, koevoluce

Abstract

This bachelor thesis engages on the problematics of photobionts in lichens. It is focused on green algal photobionts, so called phycobionts.

The first part, literature research, summarizes the findings of lichens, algae and relations between photobionts and mycobionts. This section discusses the advantage of genetic variability, which allows the adaptation in changing natural conditions. Furthermore it concerns about specificity and selectivity of symbionts, where more photobionts in one lichen thallus appear with the lower level of selectivity. Finally I mentioned the question of coevolution, that divides researchers into two camps. Some promote the common development of symbionts, others to refute the contrary.

The second part describes the procedures of my own effort in the laboratory, the isolation of *Cladonia macilenta* lichen DNA and amplification of specific sequences using PCR. The results correspond to the question of taxonomic classification of photobiont, or whether one thallus contains more species of photobionts.

Keywords: *Cladonia macilenta*, *Asterochloris*, *Trebouxia*, photobiont, mycobiont, selektivty, specificity, diversity, coevolution

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala několika lidem, kteří mi byli oporou při vypracovávání bakalářské práce.

Mgr. Pavlu Škaloudovi, PhD., mému školiteli, který mě zasvětil do problematiky, naučil vše potřebné k práci v laboratoři a byl ochoten vždy pomoci při řešení jakéhokoli problému.

Mgr. Ondřejovi Peksovi za seznámení s druhem *Cladonia macilenta* a pomoci při sběru.

Michalovi, který mi pomáhal s jazykovou bariérou a technickými problémy mého počítače.

Nerada bych zapomněla na mé rodiče, kteří mi poskytovali rodinné zázemí.

Obsah

1. Úvod	6
2. Teoretická část.....	7
2.1 Lišejník.....	7
2.1.1 Obecná charakteristika	7
2.1.2 Morfologie.....	8
2.1.3 Anatomická stavba	8
2.1.4 Rozmnožování.....	9
2.2 Fotobiont	11
2.2.1 Taxonomické zařazení a obecná charakteristika	11
2.2.2 Životní cyklus zelených řas a rozmnožování	11
2.2.3 Historie taxonomického posouzení rodů <i>Trebouxia</i> a <i>Asterochloris</i> a jejich morfologické rozlišení.....	13
2.3 Vztahy mezi fotobiontem a mykobiontem	15
2.3.1 Genetická variabilita.....	15
2.3.2 Specifita a selektivita.....	18
2.3.3 Více fotobiontů v jedné stélce lišejníků	22
2.3.4 Koevoluce.....	23
3. Praktická část.....	24
3.1 Úvod	24
3.2 Vybrané lokality	25
3.3 Materiál a metody.....	25
3.3.1 Vybavení	25
3.3.1 Použité vzorky.....	26
3.3.2 Izolace DNA pomocí kitu JetQuick Tissue	26
3.3.3 PCR	27
3.3.3.1 Postup PCR přečištění produktu	27
3.3.3.2 Horizontální agarosová elektroforéza	29
3.3.3.3 Přečištění PCR produktu	30
3.3.4 Měření koncentrace DNA	30
3.4 Výsledky a diskuze.....	31
4. Literatura	33

1. Úvod

Heinrich Anton DeBary definoval termín „symbióza“ jako vztah organismů žijících pospolu (DEBARY, 1879). Termín symbióza zavedl již o 2 roky dříve lichenolog Albert B. Frank (FRANK, 1877). Ještě před ním, v roce 1867, Simon Schwender zjistil, že lišejník je organismus, ve kterém žije dohromady lišejníkotvorná houba s řasou (SCHWENDENER, 1867; DEPRIEST, 2004). V současné době výrazně stoupá zájem o fotobionty lišejníků, jejichž diverzita a evoluční vztahy se zkoumají pomocí mikroskopických, molekulárních a ultrastrukturálních technik (BÜDEL 1992; FRIEDL 1995; FRIEDL & BÜDEL 1996; TSCHERMAK – WOESS 1989). Velikým přínosem pak bylo zkoumání na molekulární úrovni, které zaznamenalo výrazný rozvoj v roce 1995 (DEPRIEST, 2004). Moje bakalářská práce se zabývá fotobionty lišejníků, přesněji řasovými fotobionty. Je rozdělena na část teoretickou a část praktickou, ve které jsem se zabývala lišejníkem *Cladonia macilenta*. Cílem této práce bylo zjistit a pokusit se shrnout podstatné informace o problematice vztahu mezi fotobiontem a mykobiontem a seznámit se s molekulárními metodami, které budu potřebovat v navazující diplomové práci.

2. Teoretická část

2.1 Lišejník

2.1.1 Obecná charakteristika

Lišejníky jsou na Zemi široce rozšířeny. Osidlují především extrémní stanoviště, kde je snížena konkurence ostatních organismů. Řada druhů je kosmopolitně rozšířena, jiné vykazují omezené areály. Nacházíme je nejčastěji na kamenech, skalách, borce stromů, vzácněji na listech a holé zemi. Hlavní význam lišejníků v přírodě je jejich pionýrský výskyt na extrémních stanovištích, kde působí jako půdotvorní činitelé. Některé druhy jsou velmi citlivými indikátory vzdušného znečištění nebo také indikátory znečištění půdy těžkými kovy, fluorem, bromem a radioaktivním spadem.

Lišejník, přesněji lichenizovaná houba, je symbiotické společenství houby (mykobionta) a sinice či řasy (fotobionta) - oba partneři nejsou navzájem omezováni, naopak soužití je pro ně prospěšné. Fotobiont představuje autotrofní složku organismu a dodává mykobiontu organické látky. Mykobiont je heterotrofním zástupcem a obstarává přísun vody, anorganických látek a umožňuje fotobiontu růst a rozmnožování. Mykobiont je ve velké většině převládající složkou v lišejníkové stélce, která obvykle určuje i morfologický tvar stélky. Zástupci lišejníkotvorných hub patří do vřeckovýtusných (Ascomycota) i vzácně do stopkovýtusných hub (Basidiomycota) (KALINA & VÁŇA, 2005).

2.1.2 Morfologie

Stélka (thallus) lišejníků vykazuje velkou variabilitu, ale u jednoho druhu je víceméně konstantní. Dříve morfologie stélky představovala důležitý určovací znak, dnes však ustupuje do pozadí. U lišejníků můžeme rozlišit tyto tři typy stélek:

1) keříčkovitá (frutikózní) – Přisedá k substrátu pouze malou částí a roste negativně geotropicky. (*Cetraria*, *Thamnolia* aj.)

2) lupenitá (foliózní) – Plošně rozložená stélka, která je na okraji laločnatá a přirůstá k podkladu jednou nebo více částmi. Od podkladu se dá uvolnit. Spodní strana, pokrytá kůrou, obvykle nese přichytná vlákna (rhiziny), což je nápadné např. u rodu *Peltigera*.

3) korovitá (krustózní) – Stélka je celou spodní stranou přirostlá k substrátu nebo přímo vzrostlá do podkladu. (např. *Placodium*)

Další typy stélek: rosolovitá, vláknitá a leprariovitá

Některé lišejníky (např. *Cladonia*, *Stereocaulon*) mají tzv. dvojtvarou (dimorfickou), která je rozlišena v lupenitou nebo korovitou přízemní část (thallus horizontalis) a keříčkovitou vystoupavou část (thallus verticalis). U rodu *Cladonia* a příbuzných rodů je thallus verticalis spojen vývojově s primordiím askokarpu a je nazýván *podecium*.

Růst stélky je ve srovnání s ostatními houbami velmi pomalý. Některé korovité lišejníky vykazují přírůstek během 20 let o pouhý 1mm. Lupenité a keříčkovité lišejníky rostou rychleji, až 15 mm za rok (KALINA & VÁŇA, 2005).

2.1.3 Anatomická stavba

Anatomicky rozlišujeme lišejníky na homeomerické, u nichž jsou ve stélce obě složky symbiontů rovnoměrně rozptýleny, a na lišejníky heteromerické, u kterých fotobiont bývá lokalizován v tzv. řasové vrstvě. Z morfologického hlediska tvoří lišejníky s homeomerickou stavbou stélky vláknitou nebo rosolovitou stélku, lišejníky s heteromerickou stavbou stélky vytvářejí korovitou, lupenitou nebo keříčkovitou stélku. Stélka heteromericky stavěných lišejníků je rozlišena do několika vrstev (KALINA & VÁŇA, 2005):

1) Korová vrstva - je tvořena buňkami mykobionta, které vytvářejí pseudoparenchymatickou tkáň. Je vytvořena vždy na svrchní, někdy i na spodní straně stélky. Někdy tato vrstva může zcela chybět.

2) Řasová vrstva - je tvořena oběma složkami, mykobiontem a fotobiontem. U většiny lišejníků tvoří mykobiont intracelulární haustoria, která mírně narušují stěny buňky fotobionta. U jiných lišejníků (např. *Peltigera*) se netvoří haustoria a probíhá zde výměna látek mezi buňkami mykobionta a fotobionta.

3) Dřeňová vrstva (medulla) - je tvořena vzájemně propletenými hyfami, mezi nimiž jsou dutiny. Nachází se mezi vrstvou řasovou a korovou.

2.1.4 Rozmnožování

Rozmnožování symbiotického organismu, kterým je lišejník, musí být komplexní. Při odděleném rozmnožování obou složek, pokud má vzniknout opět lišejníková stélka, musí vždy dojít k opětovnému setkání obou symbiontů. Z tohoto hlediska pouze nepohlavní rozmnožování zajišťuje tvorbu diaspor obsahující obě složky. (Obr. 1)

Nejjednodušším typem rozmnožování je **fragmentace stélky**. Lišejník ovšem musí být schopný regenerace, aby úlomky stélky mohly za příznivých podmínek dorůst v novou stélku (*Cladonia*, *Parmelia* aj.).

Izidie jsou struktury zajišťující nepohlavní rozmnožování. Vznikají protržením korové vrstvy, tím proniknou ven vnitřní vrstvy stélky za vzniku výrůstků, které obsahují buňky fotobionta a svou stavbou odpovídají stavbě stélky. U některých druhů lišejníků se tvoří izidie v takovém množství, že pokrývají povrch stélky (některé druhy rodu *Parmelia*). Po ulomení slouží jako částice schopné regenerace v novou stélku (u rodu *Pertusaria*).

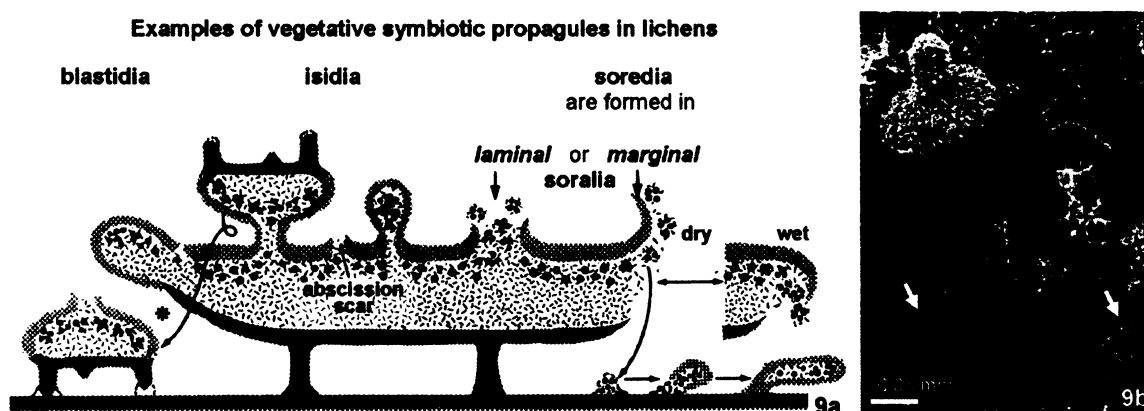
U některých lišejníků (např. *Baeomyces*) se oddělují malé částičky povrchové stélky. Tyto šupinkovité útvary jsou označovány jako **schizidie** a slouží rovněž jako diaspory.

Rozmnožování pomocí soredií je nejběžnějším typem. **Soredie** jsou malé útvary (o velikosti 25-100 μm) tvořené buňkami fotobionta, které ho oplétají hyfy mykobionta. Vznikají v řasové vrstvě a rozrušením korové vrstvy se uvolňují na povrch. Někdy k jejich uvolňování slouží speciální místa – *soralý*. U některých druhů mohou soredia vznikat na celém povrchu stélky, která je poté moučnatě sorediózní (např. u *Cladonia fimbriata*).

Blastidie jsou fragmenty stélky vznikající pučením (např. u rodu *Xanthoria*). Jsou to kulovité útvary obsahující stejně jako soredie buňky fotobionta a hyfy mykobionta. Díky tomu jsou často se sorediemi zaměňovány. Nové blastidia vznikají ze špičky předchozí blastidie.

Pohlavní rozmnožování se omezuje pouze na mykobionta. Pro většinu lišejníků je nezbytné, aby spory mykobionta našly v přírodě odpovídajícího volně žijícího fotobionta, jinak nemůže stélka lišejníku vzniknout. Po kontaktu s potencionálním fotobiontem vzniká nenápadný „pre-thallus“ (BECK ET AL., 1998). „Pre-thallus“ může vzniknout i po kontaktu s nekompatibilním fotobiontem (OTT, 1987A, B) a v životním cyklu lišejníku se zdá být velmi důležitý, protože umožňuje přežití mykobionta do té chvíle, než objeví vhodného fotobionta. Kompatibilní řasa může být začleněna do stélky později (FRIEDL, 1987; SANDERS & RICO, 1992). Tato výměna fotobiontů byla např. pozorována u *Diploschistes muscorum* (FRIEDL, 1987). Tento lišejník se zachytí na povrchu stélky lišejníku rodu *Cladonia*, roste dovnitř a přebírá fotobionta, který je pro něj výhodnější.

Problém nastává u těch druhů, jejichž fotobiont se volně v přírodě nevyskytuje. Jedná se hlavně o ty lišejníky, jejichž fotobiontem je řasa z rodu *Trebouxia*. Otázka, jak si mykobiont těchto druhů lišejníků zajistí svého fotobionta, není doposud do detailu objasněna (KALINA & VÁŇA, 2005). Některé studie řešící tuto otázku došly k závěru, že lišejník získá fotobionta buď krádeží ze stélky jiného lišejníku, nebo přímo parazitismem (FRIEDL, 1987; OTT, 1987A,B; RAMBOLD & TRIEBEL, 1992; LÜCKING & GRUBE, 2002). Obě tyto strategie byly použity k vysvětlení relichenizace těch druhů lišejníků, kterým chybí sdílený způsob šíření mykobionta a fotobionta (BECK ET AL., 1998, 2002). Je ale také třeba uvést, že otázka absence volného výkytu rodu *Trebouxia* v přírodě je stále diskutována. Zatímco někteří autoři zastávají názor, že *Trebouxia* může přežívat pouze ve stélkách lišejníků (AHMADJIAN 1988, 1993), jiní autoři přinesli důkazy o existenci volně žijící populace v přírodě (např. TSCHERMAK-WOESS, 1978; SANDERS, 2005).



Obr. 1: Příklad vegetativního rozmnožování lišejníku (ROSMARIE HONEGGER, 2009).

2.2 Fotobiont

2.2.1 Taxonomické zařazení a obecná charakteristika

Přibližně 100 druhů ve 40 rodech řas a sinic je udáváno jako fotobionti lišejníků (TSCHERMAK-WOESS, 1989; BÜDEL, 1992; RIKKINEN, 2002). Mezi nejčastější fotobionty patří rody *Trebouxia*, *Trentepohlia* a *Nostoc*. Rody *Trebouxia* a *Trentepohlia* náleží k zeleným řasám (Chlorophyta, Eukaryota), rod *Nostoc* patří do sinic (Cyanobacteria). Eukaryotičtí fotobionti jsou často označováni jako fykobionti (phycobionts), zatímco sinicoví fotobionti jsou označováni jako cyanobionti (cyanobionts) (FRIEDL & BÜDEL, 1996).

Zaměříme se na zelené řasy. Mezi nejčastější fotobionty lišejníků v rámci třídy Ascomycetes patří druhy rodů *Trebouxia* a *Asterochloris* (PERŠOH ET AL., 2004). Ačkoli se diverzita v rámci těchto rodů omezuje jen na pár popsaných druhů, současné molekulární studie odhalily velkou skrytou diverzitu jak u rodu *Trebouxia* (KROKEN & TAYLOR, 2000), tak především u rodu *Asterochloris* (PIERCE-NORMORE & DEPRIEST, 2001). Například u rodu *Trebouxia* se pomocí sekvenování intronu v genu pro aktin (ACT1) a ITS rDNA oblasti zjistilo, že druh *Trebouxia jamesii* se skládá z mnoha fylogeneticky příbuzných druhů (KROKEN & TAYLOR, 2000). Současné molekulární studie založené na stejných molekulárních markerech ukazují obdobnou skrytou diverzitu i u rodu *Asterochloris* (ŠKALOUD, 2008). Uvedme ještě další rody zelených řas vyskytujících se v lišejníkových symbiotických asociacích. Rod *Dictyoichloropsis*, je častým fotobiontem čeledi Lobariaceae (Peltigerales), *Myrmecia* se často vyskytuje v čeledi Pannariaceae (Peltigerales) (MIADLIKOWSKA & LUTZONI, 2004).

2.2.2 Životní cyklus zelených řas a rozmnožování

Zelené řasy mají zpravidla haplontní životní cyklus, kdy jedinou diploidní buňkou je zygota (zygospora). Haplo-diplontní životní cykly nacházíme pouze ve třídách Ulvophyceae, Cladophorophyceae, Bryopsidophyceae a Dasycladophyceae. (KALINA & VÁŇA, 2005)

Nepohlavní rozmnožování zajišťují jednobuněčné, zpravidla jednojaderné rozmnožovací buňky (tzv. *mitospory*). Haploidní mitospory produkují haploidní gametofyty,

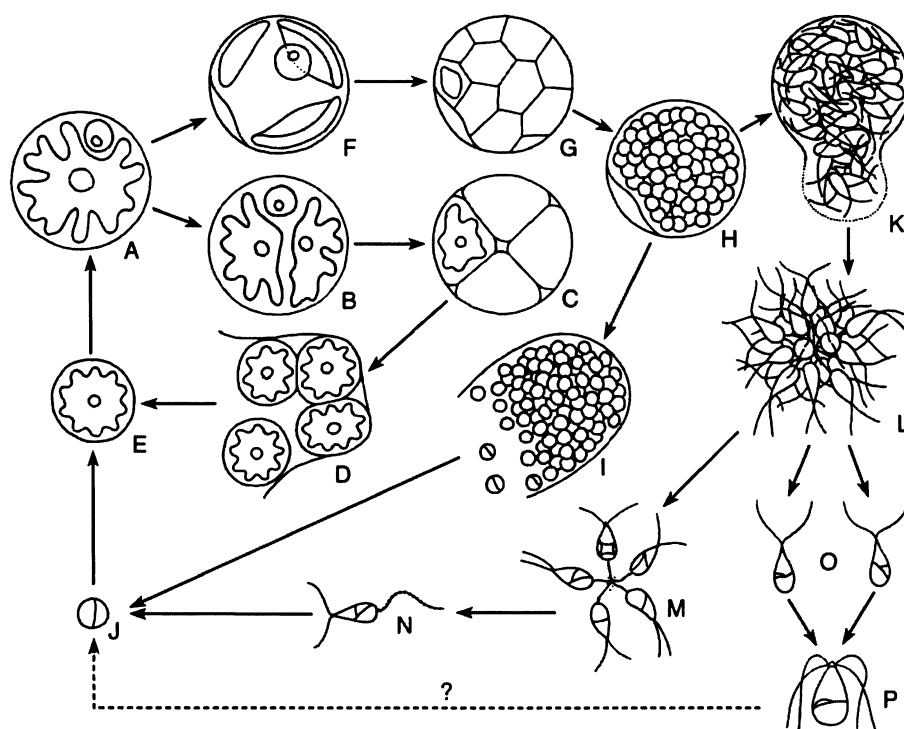
diploidní mitospory produkují sporofyty. U zelených řas rozlišujeme několik typů buněk sloužících k nepohlavnímu rozmnožování (Obr. 2):

Zoospory jsou volně pohyblivé a vznikají v zoosporangiu ve velkém počtu. Pohyb zoospor zajišťují bičíky, které se po krátké pohyblivé fázi zatáhnou. Buňka se zaoblí a v případě nahých zoospor vyloučí na povrch buňky buněčnou stěnu.

Aplanospory jsou jednojaderné rozmnožovací buňky, které jsou alternativou zoospor. Jediné v čem se liší je absence bičíků a zkrácený vývoj. Buňka vyloučí buněčnou stěnu ihned po rozdělení mateřského protoplastu.

Autospory jsou také jednojaderné rozmnožovací buňky, které nikdy nemají bičíky. V době opuštění mateřské buněčné stěny mají tvar, který odpovídá dospělé vegetativní buňce.

Zoospory, aplanospory a autospory vznikají endogenně, tj. uvnitř mateřské buňky. Uvolňují se odbouráváním mateřské buněčné stěny pomocí enzymů autolyzinů (KALINA & VÁŇA, 2005).



Obr. 2: Schéma životního cyklu a rozmnožování u rodu *Asterochloris*: A vegetativní buňka, B–E Tvorba autospor, B dělení chloroplastu, C mladé autosporangium, D uvolnění autospor, E zralá autospora, F–N Aplano-, zoosporogeneze, F přeměna chloroplastu z axiálního na parietální typ, G mladé aplano-, zoosporangium, H zralé aplanosporangium, I uvolnění aplnospor, J mladé aplanospory, K uvolnění zoospor ze slizovitého váčku, L shluk zoospor, M uvolnění zoospor, N dorziventrálně zploštělá zoospora s dvěma bičíky, O–P pohlavní rozmnožování, O gamety, P planozygota se čtyřmi bičíky (převzato z ŠKALOUD, 2008).

Pohlavní proces zelených řas je založen na gametogamii, tj. kopulace se účastní jednobuněčné gamety, které vznikají v gametangiích. Podstatou tohoto procesu je splývání plazmy (plazmogamie) a jader (karyogamie) kopulujících gamet. Vzniká zygota s diploidním jádrem, která se záhy mění v tlustostěnou zygosporu s různě dlouhou dobou dormance. Podle morfologie gamet rozlišujeme *izogamii* – gamety mají stejný tvar a velikost a jsou opatřeny bičíkem, *anizogamii* – mají rovněž bičík, ale liší se vzájemnou velikostí (menší gamety jsou považovány za samčí, jsou více pohyblivé) a *oogamii* – samčí gamety (spermatozoidy) jsou opatřené bičíky a pohybují se, samičí gamety (oogonia, vaječné buňky) bičíky nemají (KALINA & VÁŇA, 2005).

2.2.3 Historie taxonomického posouzení rodů *Trebouxia* a *Asterochloris* a jejich morfologické rozlišení

Rody *Trebouxia* a *Asterochloris* jsou nejčastějšími fotobionty lišejníků (PERŠOH ET AL. 2004). Morfologická a především genetická data naznačují, že rod *Trebouxia* je parafyletický (ARCHIBALD, 1975; TSCHERMAK-WOESS, 1989; FRIEDL & ZELTNER, 1994; FRIEDL & ROKITTA, 1997). Nekonzistenci rodu *Trebouxia* se pokusilo vyřešit několik autorů přesunutím některých druhů rodu *Trebouxia* do nových rodů či podrodů.

V roce 1975 byl popsán rod *Pseudotrebouxia* (ARCHIBALD, 1975), definovaný na základě odlišné tvorby nepohyblivých reprodukčních buněk (autospor). Rod *Trebouxia* definoval tvorbou autospor pomocí tzv. „desmoschisis“, rod *Pseudotrebouxia* pak pomocí tzv. „eleutheroschisisů“. Gärtner (1985b) a Tschermak-Woess (1989) rovněž odlišili v rámci rodu *Trebouxia* dvě skupiny na základě odlišné tvorby autospor, jejich pojetí však bylo odlišné. Gärtner (1985a, b) následně napadl existenci rozdílů navržených Archibald (1975) a zamítl vytvoření rodu *Pseudotrebouxia*. Tschermak-Woess (1989) rozdělila rod *Trebouxia* do dvou podrodů - *Trebouxia* a *Eleutherococcus* na základě přítomnosti autospor. Do podrodu *Eleutherococcus* Tschermak-Woess zahrnula všechny druhy, které nevytvářejí autospory. Toto rozdělení pak bylo následně podpořeno i molekulárními studii ITS rDNA (PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST, 2001).

Rod *Asterochloris* byl poprvé vyizolován a popsán z lišejníku *Anzina carneonivea* (TSCHERMAK-WOESS, 1980) jako druh *A. phycobiontica*. Stejná autorka ale později navrhla zrušení rodu a převedení druhu *Asterochloris phycobiontica* do podrodu *Eleutherococcus* pod

jménem *Trebouxia phycobiontica* (TSCHERMAK-WOESS, 1989). Na základě morfologických poznatků ale nevyloučila možné zachování rodu *Asterochloris*, pokud by další studie prokázaly jeho platnost. O několik let později pak skutečně molekulární studie potvrdily výraznou genetickou odlišnost fotobionta ze stélky lišejníku Anzina *carneonivea* od většiny druhů rodu *Trebouxia* (PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST, 2001) a tudíž platnost popsaného rodu *Asterochloris*. Rod *Asterochloris* lze od rodu *Trebouxia* odlišit pomocí těchto znaků (HELMS, 2001; PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST, 2001):

- kratší ITS úsek, který nelze zaligovat s druhy rodu *Trebouxia*.
- u rodu *Asterochloris* lze velmi těžce odlišit matrix pyrenoidu od stromatu chloroplastu (FRIEDL 1989A, B)
- pyrenoid má u rodu *Asterochloris* nepravidelný tvar (FRIEDL 1989A, B)
- chloroplasty rodu *Asterochloris* se před dělením buněk přetvoří z axiálního

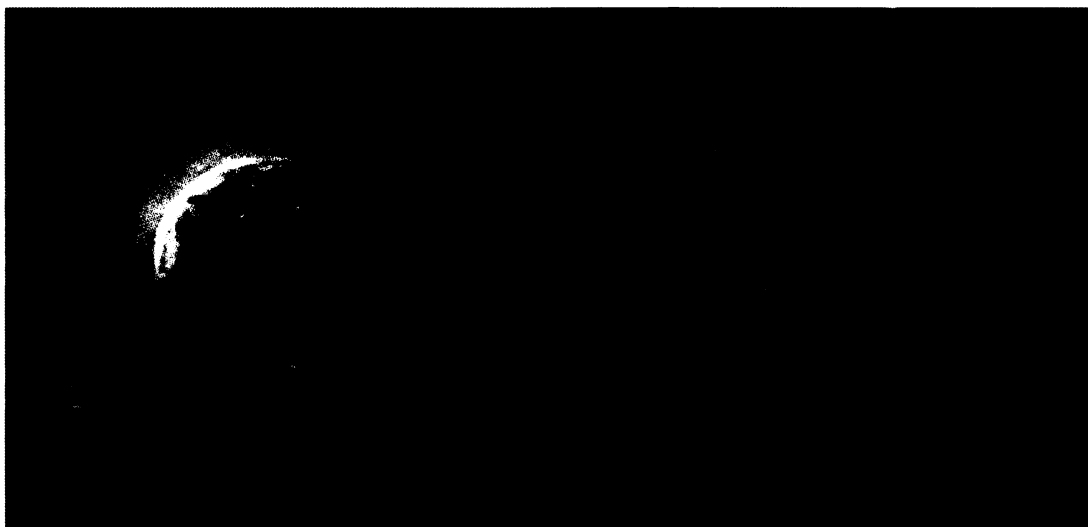
na parietální typ. Naopak chloroplasty rodu *Trebouxia* zůstávají před a při dělení buněk lalokovité (GÄRTNER 1985B)

- kopmatibilita rodu *Asterochloris* s lišejníky z čeledi *Cladoniaceae* (RAMBOLD ET AL., 1998; PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST, 2001).

Vymezení rodů *Trebouxia s.str.* a *Asterochloris* je podporováno těmito pěti nezávislými znaky, které jsou považovány za dostatečně silné důkazy pro to, aby *Trebouxia* a *Asterochloris* byly považovány za dva samostatné rody.

Avšak existují další morfologické znaky, pomocí kterých můžeme tyto dva rody odlišit. Jsou jimi například:

- vegetativní buňky rodu *Trebouxia* mají kulovitý tvar, *Asterochloris* může mít buňky buď rovněž kulovité, či nepravidelně tvarované
- buňky obou rodů obsahují výrazný centrální hvězdicovitě tvarovaný chloroplast, který ovšem může mít mnoho podob
- jádro je invaginované v chloroplastu; *Asterochloris* se od rodu *Trebouxia* liší více vykrojenými laloky chloroplastu a transformací chloroplastu do parietální formy před dělením buňky; v obou rodech chloroplasty obsahují pyrenoidy s rozdílnou ultrastrukturou
- u rodu *Trebouxia* autospory tvoří nepravidelné shluky (balíčky), spojené dohromady pomocí starých stěn sporangií (FRIEDL & BÜDEL 1996), u rodu *Asterochloris* tento znak pozorován nebyl; naopak tento rod je charakteristický častou tvorbou aplanosporangií (ŠKALOUD, 2008)



Obr. 3: A *Asterochloris* („*Trebouxia*“ *glomerata*), B *Trebouxia arbuscula* (foto: Škaloud)

2.3 Vztahy mezi fotobiontem a mykobiontem

2.3.1 Genetická variabilita

Genetická variabilita, neboli proměnlivost, vysvětluje existenci rozdílů určitých znaků mezi jedinci stejného druhu. Je to důležitý faktor pro zkoumání, zda je lišejník schopen se adaptovat na nové prostředí (MITTON & GRANT, 1984). Podle zavedených představ schopnost fotobionta adaptovat se na nový habitat ovlivňuje schopnost lišejníku přizpůsobit se novému stanovišti. U lišejníků s vegetativním rozmnožováním, kdy obě propagule jsou již pospolu (soredie) a vytvářejí geneticky identickou stélku, se ale tato míra přizpůsobení snižuje. (PIERCE-NORMORE, 2006). Genetická variabilita, a tudíž míra přizpůsobení přírodním podmínkám, může být zvýšena sexuálním rozmnožováním mykobionta nebo změnou fotobionta (podrobněji popsáno dále).

Pouze pár studií zkoumalo genetickou variabilitu fotobiontů u vegetativně se rozmnožujících lišejníků (BECK ET AL., 1998). Objektem zkoumání byl například rod *Letharia*, u kterého se pomocí ITS zjistilo, že jejím fotobiontem je *Trebouxia jamesii* (KROKEN & TAYLOR, 2000). Dalším sekvenováním intronu v genu pro aktin se objevila velká skrytá diverzita tohoto druhu. Druh *Trebouxia jamesii* byl rozdělen na mnoho fylogeneticky

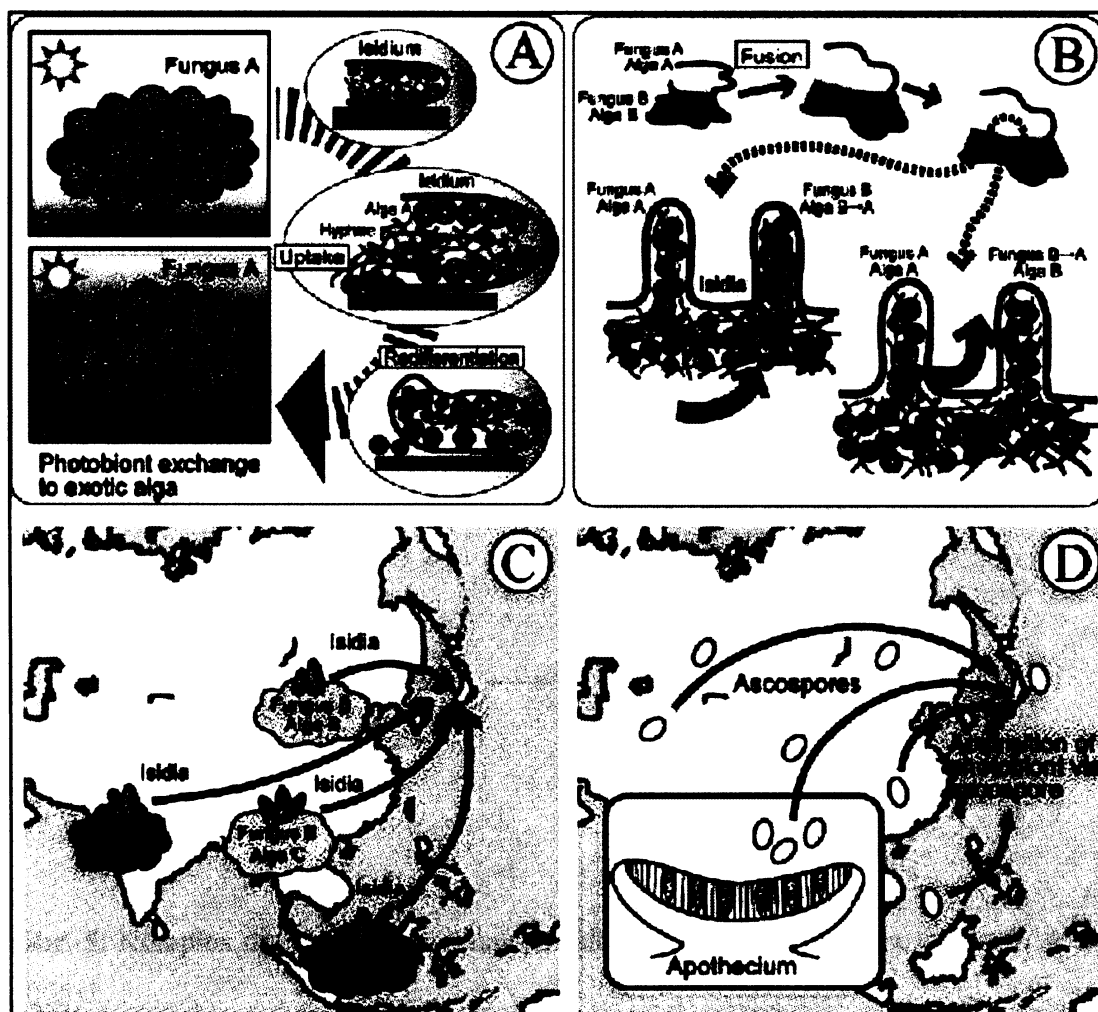
příbuzných druhů (Obr.4). Porovnáním aktinových a ITS sekvencí fotobiontů byly navíc objeveny rekombinované úseky, které naznačují pohlavní rozmnožování rodu *Trebouxia*.

Trebouxia jamesii byla dále zkoumána ve studii Piercey-Normore (2005) v lišejníku *Evernia mesomorpha*, rostoucí na kůře borovice *Pinus banksiana*. *Evernia mesomorpha* asociuje s 5 genotypy druhu *Trebouxia jamesii*. To může znamenat adaptivní výhodu (ROMEIKE ET AL., 2002) v drsných a měnících se podmínkách a schopnost lišejníku *E. mesomorpha* reagovat na změny životních podmínek (GUNN ET AL., 1995).

Ohmura et al. (2006) sledovali genetickou variabilitu mykobionta a fotobionta ve vegetativně se rozmnožujícím lišejníku *Parmotrema tinctorum*, který se rozmnožuje pomocí isidií a který málokdy vytváří apothecia. Výzkum byl založen na ITS rDNA sekvencích na základě vzorků odebraných v Japonsku z plochy 60 km². Zjistilo se, že genetická variabilita mykobiontů zahrnuje čtyři ITS typy, zatímco fotobiontů bylo nalezeno dvacet jedna ITS typů (všechny patřili do druhu *Trebouxia corticola*). Dohromady bylo zjištěno 28 různých kombinací mezi fotobionty a mykobionty. *Parmotrema tinctorum* je považována za vysoce selektivní vůči fotobiontům. Dvacet osm kombinací na relativně malém území tak reprezentovalo neočekávaně vysokou diverzitu. Genetická diverzita fotobiontů byla malá na místech ve městě, ale velká na předměstích a horských úbočích. To může být způsobeno „efektem hrdla lahve“ („bottleneck“ nebo „founder effect“), tj. poklesem druhové diverzity při velkém úbytku jedinců v populaci, způsobené například znečištěním životního prostředí (ovzduší).

Ohmura et al. (2006) určili 4 různé mechanismy, které zvyšují genetickou variabilitu lišejníkových symbiontů. První z nich je výměna fotobiontů pomocí isidií (Obr. 5A), které získají novou řasu z půdy. Druhým mechanismem je fúze stélek dvou geneticky odlišných druhů (Obr. 5B). Třetí možnost se týká velkého rozptylu isidií (přiletí z daleka s jinou genetickou výbavou)

(Obr. 5C). Tuto možnost potvrdili ve své studii i Romeike et al. (2002), kteří navrhli stejný způsob získání genetické diverzity fotobiontu u druhů rodu *Umbilicaria* na Antarktidě. Diverzita byla na tomto území způsobena velkým rozptylem suchých diaspor (např. sordií) obsahujících fotobionty rodu *Trebouxia*. Za vektory diaspor můžeme považovat vítr (MUÑOZ ET AL., 2004) nebo ptáky (BAILEY & JAMES, 1979). U pohlavně se rozmnožujících lišejníků může uvažovat i čtvrtou možnost zvýšení genetické variability symbiontů – rozptyl askospor (Obr. 5D). Sexuální rozmnožování zahrnuje získání výhodné řasy v půdě při klíčení askospor (Ott, 1987). Fotobiont z původní stélky je vyměněn v sexuální fázi reprodukce a následně může nastat genetická variabilita v podobě různých kombinací mykobionta a fotobionta.



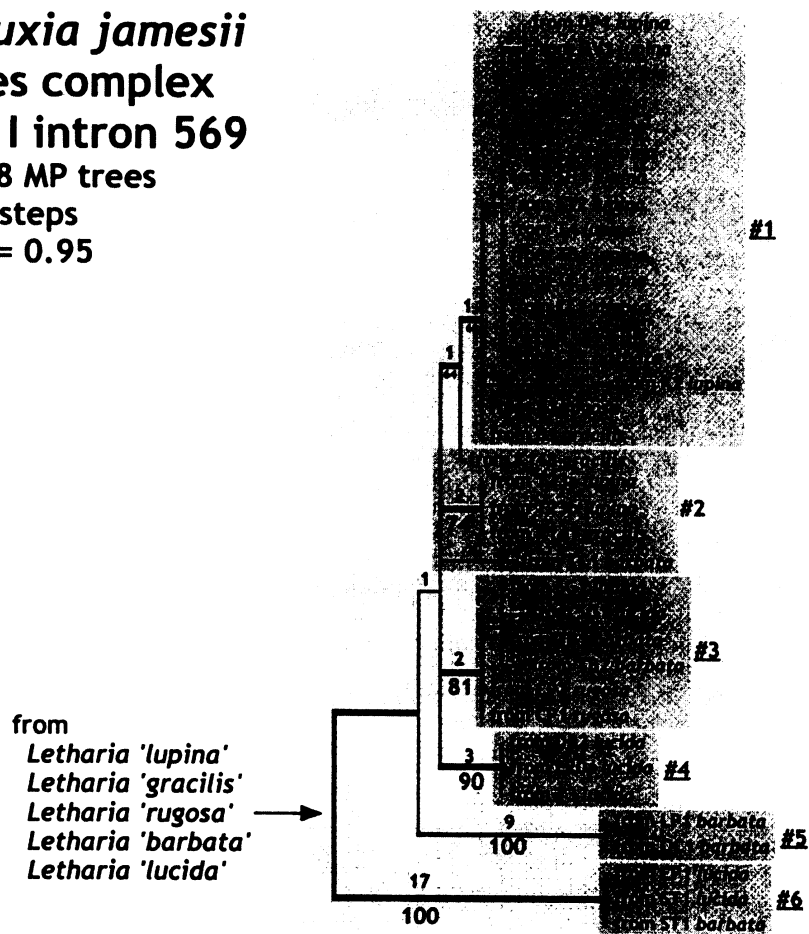
Obr. 4: Možnosti změny genetické kombinace mezi mykobiontem a fotobiontem. **A** Výměna původního s novým fotobiontem. **B** Výměna fotobionta nebo mykobionta způsobená fúzí dvou geneticky odlišných stélek. **C** Široký rozptyl geneticky odlišných isidií. **D** Rozptyl askospor na velké vzdálenosti u druhů, které vytvářejí apothecia (OHMURA ET AL., 2006).

***Trebouxia jamesii*
species complex
actin I intron 569**

1 of 8 MP trees

51 steps

RC = 0.95



Obr. 5: Komplex druhů *Trebouxia jamesii* založený na actin 1 intronu. (KROKEN & TAYLOR, 2000)

2.3.2 Specifita a selektivita

Termín selektivita byl doposud popisován jako vlastnost mykobiontů, nikdy nebyl použit pro fotobiontního partnera. Beck et al. (2002) charakterizovali tento termín jako vlastnost určující interakci mezi symbionty, ale pouze z pohledu jednoho z biontů. Selektce vhodného fotobionta není neplánovaná, ale je to důležitá vlastnost mykobiontů lišejníků (RAMBOLD ET AL., 1998). Bylo zjištěno, že většina zkoumaných fotobiontů má relativně nízký stupeň selektivity, ale vzhledem k nedostatku údajů by bylo unáhlené stanovit přesnou míru selektivity fotobiontů. Jako příklad uvádím druh *Trebouxia jamesii*, který asociuje s mnoha

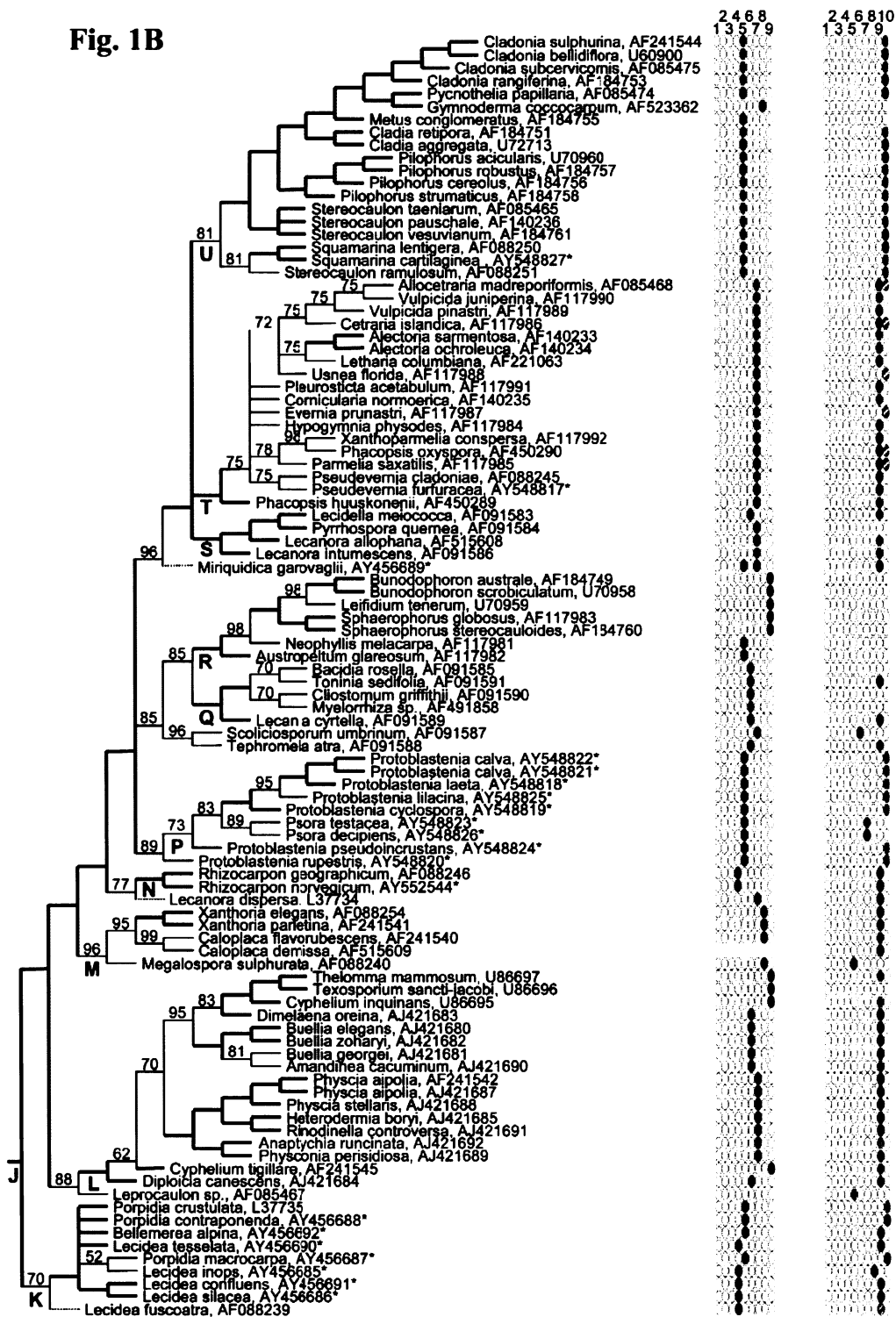
druhy hub (BECK, 1998). Stupeň selektivity je odvozen od počtu partnerů, se kterými může být daný organismus v symbióze.

Pod termínem vysoká selektivita mykobiontů si můžeme představit vztah mykobionta, který asociuje pouze s jedním druhem či genotypem fotobionta. Není vztažena pouze na blízké vzdálenosti, jsou příklady lišejníků rostoucích v geograficky velmi vzdálených lokalitách a majících stále stejného fotobionta (HELMS ET AL., 2001). Vysoká selektivita se nevztahuje pouze na jednotlivé druhy mykobiontů, ale i na vyšší taxony. Například většina druhů čeledi Physciaceae tvoří symbiotickou asociaci s fotobionty pouze jediného subcladu rodu *Trebouxia*, potvrzuje to vysoký stupeň selektivity mykobiontů (HELMS ET AL., 2001). Jako další příklad mohu uvést skupinu červenoplodých dutohlávek *Cladonia coccifera* (*Cl. coccifera* a *Cl. pleurota*), která je asociována pouze se dvěma příbuznými druhy rodu *Asterochloris* – *A. glomerata* a *A. irregularis* (BAČKOR ET AL., 2009).

Vytváří-li lišejník na stanovišti symbiotický vztah s více druhy řas (3-4), jedná se o nízkou selektivitu. Lišejníky s nízkou selektivitou většinou patří k běžným pionýrským druhům rostoucím na různých typech habitatů včetně městských oblastí. Současně některé studie prokázaly, že určité druhy fotobiontů mají ekologické preference (BECK, 2002; HELMS, 2003). Proto mykobionti s nízkou selektivitou mohou kolonizovat široké spektrum habitatů, kde se vyskytují různé druhy fotobiontů. Schopnost houby změnit fotobionta je hlavním důvodem, proč tyto lišejníky rostou a jsou úspěšní v kolonizaci rozdílných stanovišť. Nízkou selektivitu má například rod *Umbilicaria* nebo druh *Evernia mesomorpha* (ROMEIKE ET AL., 2002; PIERCE-NORMORE, 2006), které mají schopnost se přizpůsobit drsným nebo měnícím se podmínkám životního prostředí. Se změnou prostředí může být výběr fotobiontů přeměřován na jiné druhy či genotypy. Je potvrzeno, že druhy s krustózní stélkou mají často malou selektivitu (např. druh *Ridnodina*) oproti lišejníkům s lupenitou stélkou (např. druh *Physcia* nebo *Parmotrema tinctorum*), kteří obvykle bývají vysoce selektivní (HELMS ET AL., 2001).

Specifitou lze popsat symbiotické sdružení jako celek, který závisí na míře selektivity obou symbiontů (Obr. 6). Specifita mykobiontů na úrovni rodu hraje významnou roli. Nedávno navržené rozdělení rodu *Trebouxia* do dvou rodů (FRIEDL - nepublikováno; RAMBOLD ET AL., 1998; HELMS ET AL., 2001 na základě TSCHERMAK-WOESE, 1989), *Asterochloris* a *Trebouxia*, se odráží ve volbě mykobiontů. Zatímco rod *Asterochloris* je specifický pro podřád Cladoniineae, rod *Trebouxia* najdeme hlavně v Lecanoriineae (RAMBOLD ET AL., 1998) (Obr. 7).

Fig. 1B

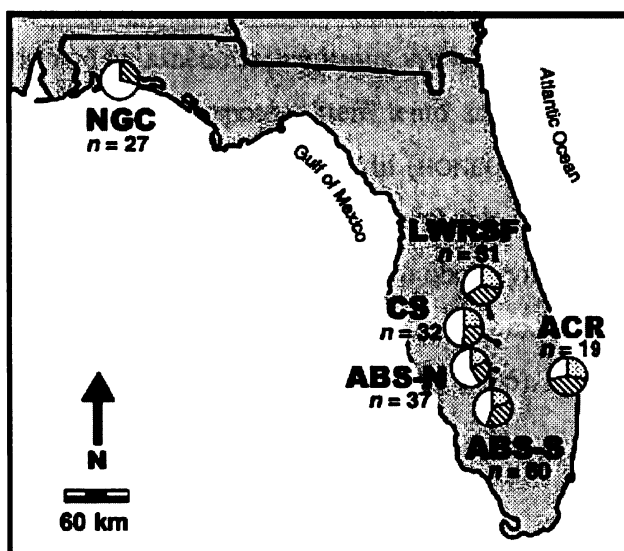


Obr. 7: Příklad specifity na úrovni rodu. Clade S a T (Lecanorineae) obsahuje fotobionta rodu *Trebouxia* (druhý sloupec, č. 9). Clade U (Cladoniineae) obsahuje fotobionta rodu *Asterochloris* (druhý sloupec č. 10) (PERŠOH ET AL., 2004).

		selectivity of biont 1				
selectivity of biont 2		Very high	High	Moderate	Low	Very low
Very high		specific				
High				moderate specific		
Moderate						
Low						
Very low		unspecific				

Obr. 6: Definice různých stupňů specifity (BECK ET AL., 2002).

Studie Yahr et al. (2004) rozdělila mykobionty lišejníků do 3 skupin: fotobiontní specialisté, fakultativní mykobionti a generalisté. Zabývali se diverzitou fotobiontů na území Floridy a dále selektivitou mykobiontů z lišejníků rodu *Cladonia*. Je zajímavé, že ačkoli autoři uvádějí svůj článek jako výzkum specifiky mykobiontů, jedná se ve skutečnosti o studii jejich selektivity (viz HELMS ET AL., 2002). Z osmi zkoumaných druhů hub bylo šest fotobiontních specialistů, kteří prokazovali specifitu pro jeden řasový clade. Na území severní Floridy označeném jako NGC (Obr. 8) nebyl nalezen žádný fotobiont z linie I, tzn. druhy *Asterochloris irregularis* a *A. glomerata*. Zjistilo se, že právě proto se na tomto místě nevyskytují lišejníky *Cladonia dimorphoclada* a *Cladonia subsetacea*, kteří tudíž patří mezi fotobiontní specialisty a mají tedy vysokou specifitu pro výše zmíněné druhy fotobiontů.



Obr. 8: Druhová selektivita lišejníků *Cladonia subsetacea* a *Cl. dimorphoclada* (clade I). Mapa míst, na kterých se odebíraly vzorky. Clade I (tmavé tečky), Clade IIa (šrafovaní), Clade IIb (bílá plocha) (YAHN ET AL., 2004).

2.3.3 Více fotobiontů v jedné stélce lišejníků

U lišejníků s nízkou selektivitou bylo nalezeno více druhů fotobiontů (HELMS ET AL., 2001). Například v čeledi Parmeliaceae (např. u druhu *Pleurosticta acetabulum*) byly dva geneticky odlišné druhy fotobiontů vyizolovány ze stejné stélky lišejníku (BHATTACHARYA ET AL., 1996). Adaptivní výhody této několikanásobné symbiosy byly popsány výše. Doplňková hypotéza je ta, že houba chce využít pro dosažení maximální fotosyntézy s různou úrovní světla několik řasových genotypů (RIKKINEN, 1997). Podobné mechanismy můžeme nacházet u korálů, kteří asociují s rodem *Symbiodinium* (MIEOG ET AL., 2009). Při stresu (zvýšení / snížení teploty vody, zvýšení slunečního ozáření, acidifikace oceánů, pokles hladiny zooplanktonu, zvýšená sedimentace, infekce patogenem) může dojít k odumření symbiotických řas (tzv. zooxantel) ve stélkách korálů, což vede k světlejší nebo úplně bílé barvě („coral bleaching“) a následnému úhynu korálu. Korálová kolonie se tomuto nebezpečí brání mimo jiné i tím, že poskytuje útočiště více druhům zooxantel z rodu *Symbiodinium*.

Fahselt et al. (1995) zastávají názor, že výskyt více řasových genotypů ve stejné stélce lišejníků může souviset s věkem stélky. Starší stélka by tedy měla za dobu svého vývoje nashromáždit více než jeden genotyp z rozptýlených soredií. Pokud přilétne soredie obsahující již několik genotypů, může se ve stélce rychle zvětšit počet genotypů. Jsou-li vzácné genotypy uchovány ve stélce, mohou pak být využity při změně životních podmínek a tím přinést výhodu celé lišejníkové asociaci.

Stále ještě není plně objasněn mechanismus výskytu a udržení více fotobiontů v jedné stélce lišejníku a existuje několik hypotéz, které tento stav vysvětlují. Je zde možnost, že jednotlivá podécia vznikají z velkého počtu soredií (HONEGGER, 1992; JAHNS, 1988). Každé soredium může obsahovat jiný druh fotobionta, stejně tak jiný genotyp mykobionta, tudíž výsledná stélka je vlastně rekombinací více genotypů obou symbiontů. Fotobiont (stejně jako mykobiont) dále může přistát v podobě soredia na povrch již existující stélky lišejníku a začlenit se do ní během jejího růstu (PIERCE-NORMORE, 2006). Poslední možností je pak fúze dvou různých stélek do jedné (OHMURA ET AL., 2006).

2.3.4 Koevoluce

Pojem koevoluce popisuje proces vzájemné evoluční změny druhů, které mají jistou ekologickou vazbu (Thomson, 1982). Lišejníkové symbiosy představují vztah dvou silně vázaných symbiontů, byly proto dlouho považovány za koevoluční. Tvar stélky nebo syntéza sekundárních sloučenin jsou výsledky spolupráce symbiontů, což bylo udáváno jako důkaz nutné koevoluce symbiontů (AHMADJIAN, 1987). Nedávné studie nicméně prokázaly jen malou, ne-li žádnou koevoluci houbových a řasových symbiontů. Srovnávací fylogenetické metody neprokázaly žádnou paralelní kladogenezi a kospeciaci symbiontů (PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST, 2001; KROKEN & TAYLOR, 2000).

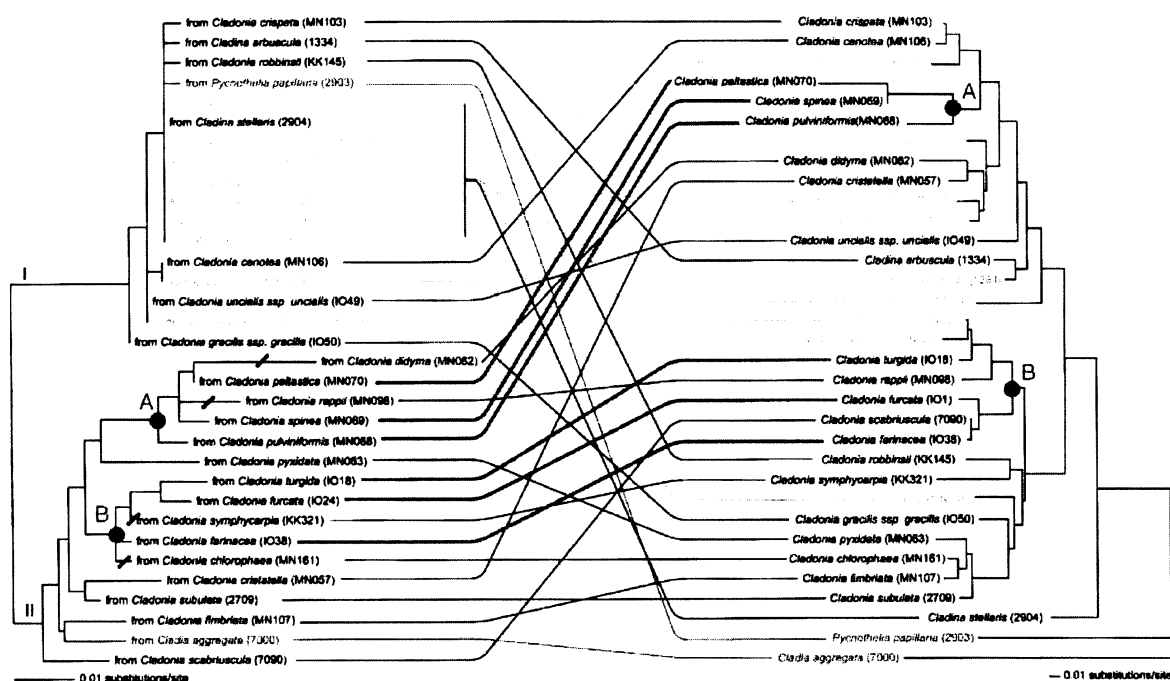
Piercey-Normore & DePriest (2001) porovnávaly ITS fylogenezi řas rodu *Asterochloris* a houbových partnerů z čeledi Cladoniaceae (Obr. 9). Pomocí statistických metod zamítly kospeciaci a striktní paralelní kladogenezi. Došli k závěru, že k získávání fotobiontů mykobiontem dochází opakovaně.

Ke stejným výsledkům došli i Kroken & Taylor (2000) u houby rodu *Letharia*, která asociuje s *Trebouxia jamesii*.

Další studie (NELSEN & GARGAS, 2007) zkoumala evoluční vztahy symbiontů u rodu *Lepraria*. Stejně jako u obou výše zmíněných studií, ani v tomto případě nebyl vztah symbiontů zachován během evoluce lišejníku. Schopnost změnit partnera (horizontálním přenosem) může poskytnout výhody pro udržení životaschopnosti genotypu mykobionta (zmíněny v předešlých kapitolách).

Algal Partners

Fungal Partners



Obr: 9: Neshoda fylogenetických stromů řasových a houbových složek lišejníku dokládající neexistenci koevoluce těchto symbiontů. Symbionti ze stejného lišejníku jsou propojeny linkami (PIERCEY-NORMORE & DEPRIEST, 2001).

3. Praktická část

3.1 Úvod

Cílem praktické části bakalářské práce byla studie fotobiontů ve stélce rodu *Cladonia macilenta*. Zaměřila jsem se nejen na taxonomické zařazení fotobiontů z různých stélek lišejníků, ale také na detekci více genotypů fotobionta v jedné lišejníkové stélce. Praktická část je navíc začátkem zpracovávání dat pro diplomovou práci. Práce zahrnovala sběr vzorků, izolaci DNA, amplifikaci určitého úseku DNA pomocí PCR, přečištění produktu a měření jeho koncentrace. Sekvence byly získány ve spolupráci s firmou Macrogene, Inc. (Jižní Korea). Druh *Cladonia macilenta* byl vybrán na základě předběžných literárních údajů

(PEKSA, unpubl.), poukazující na 3 druhy fotobiontů ve stélce tohoto lišejníku, což ukazuje na velmi nízkou selektivitu mykobionta. Pokud by data byla uspokojující, využila by se v následujících letech, ve kterých bych dále ráda zkoumala přesnější umístění fotobionta ve stélce, a zda fotobiont migruje, nebo se vyskytuje na určitém místě stélky.

3.2 Vybrané lokality

Cladonia macilenta je acidofilní druh. Výběr lokalit se tedy zaměřil na pískovcové skály, smrkové a borové lesy, které jsou indikátorem kyselých půd. Vzorky byly odebírány na Kokořínsku, poblíž obce Želízy, na skalách u Čertových hlav. Další vzorky, nasbírané na Plzeňské pahorkatině poblíž Hradce u Stoda, pocházejí z herbářové sbírky Mgr. Ondřeje Peksy.

3.3 Materiál a metody

3.3.1 Vybavení

- Pipety Eppendorf Research
- Centrifuga Centrifuge5415 D, Eppendorf
- Centrifuga MiniSPin plus, Eppendorf
- Wolframové kuličky
- Žebříček O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus
- Retsch MM400
- Termoblok Thermomixer comfort, Eppendorf
- Vortex Genie 2, Scientific Industries
- Termocykler Techne Touchgene Gradient
- Vybavení pro elektroforézu
- UV lampa Herolab UV T -20 M, dokumentační systém Kodak Gel Logic 100
- Kit JetQuick Tissue, Genomed
- Kit Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit / 250, Genomed
- Spektrofotometer NanoDrop 1000

3.3.1 Použité vzorky

Vzorky lišejníků, použité v praktické části bakalářské práce, jsou uvedeny v Tab. 1. Lišejníky z Plzeňské pahorkatiny byly většího vzrůstu, proto jsem jednu položku mohla rozdělit na více vzorků (např. 957a, 957b). Z každého trsu jsem odebírala 2 - 3 podélná jednotlivých lišejníků a k nim příslušející přízemní šupiny.

vzorek	lokalita	sběr
957a	Plzeňská pahork.	od Mgr. Ondřej Peksa
957b	Plzeňská pahork.	od Mgr. Ondřej Peksa
958a	Plzeňská pahork.	od Mgr. Ondřej Peksa
958b	Plzeňská pahork.	od Mgr. Ondřej Peksa
959a	Plzeňská pahork.	od Mgr. Ondřej Peksa
959b	Plzeňská pahork.	od Mgr. Ondřej Peksa
959c	Plzeňská pahork.	od Mgr. Ondřej Peksa
959d	Plzeňská pahork.	od Mgr. Ondřej Peksa
960	Plzeňská pahork.	od Mgr. Ondřej Peksa
CH1B	Čertovy hlavy	vlastní sběr
CH2A	Čertovy hlavy	vlastní sběr
CH2B	Čertovy hlavy	vlastní sběr
CH2C	Čertovy hlavy	vlastní sběr
CH4	Čertovy hlavy	vlastní sběr
OP1020		od Mgr. Ondřej Peksa

Tab. 1: Použité vzorky.

3.3.2 Izolace DNA pomocí kitu JetQuick Tissue

- Byly použity vzorky uvedené v tabulce.
- Vzorky se odebíraly pinzetou do eppendorfků s kulatým dnem.
- Byly přidány 2 wolframové kuličky.
- Do eppendorfků bylo přidáno 100 µl Lysis buffer P.

- Vzorek byl protřepán v Retsch MM400 po dobu 5 min a frekvenci 30 kmitů / s, aby se materiál rozdrtil.
- Opět byl přidán Lysis buffer P - 300 μ l.
- Do vzorku se připipetovalo 5 μ l proteinkinázy K (je stále uložena v mrazáku).
- Vzorek byl zvortexován a nechán po dobu 1 h v inkubátoru při teplotě 65° C za stálého míchání.
- Byly připraveny nové 2 ml eppendorfky se spin filtry, do kterých byl vzorek nalit.
- Následně byl vzorek centrifugován 1 min při 12000 rpm.
- Filtr se vyhodil a přidalo se 10 μ l RNAzy.
- Vzorek se zvortexoval a nechal se 5 minut stát.
- Přidalo se 200 μ l Binding bufferu a opět zvortexovalo.
- Vzorek se přelil na nové filtry a opět byl vrácen do původní eppendorfky.
- Zcentrifugován 1 min při 12000 rpm.
- 75 μ l Elution buffer D se dalo předehřát na 65° C.
- Filtrát z epp. se vylil a filtr byl do ní opět vrácen.
- Přidalo se 550 μ l Wash bufferu I a centrifugovalo se 1 min při 12000 rpm.
- Obsah epp. se vylil a filtr byl opět vrácen.
- Přidalo se 550 μ l Wash bufferu II a centrifugovalo se 1 min při 12000 rpm.
- To se opakovalo ještě jednou.
- Obsah epp. se vylil a centrifugovalo se na sucho 2 min při 12000 rpm, aby se odstranil zbytkový ethanol.
- Filtry se přendaly do 1,5 ml epp. a bylo přidáno 50 μ l předehřátého Elution bufferu D.
- Vzorek se nechal odstát 15 min.
- Naposledy se centrifugoval 1 min při 12000 rpm.
- Filtry se vyhodily a získaná DNA se uchovávala v mrazáku.

3.3.3 PCR

3.3.3.1 Postup PCR přečištění produktu

- Se všemi látkami se pracovalo na ledu.

- Nejprve byl připraven mastermix (Tab. 2) do 1,5 ml eppendorfky pro příslušný počet vzorků, polymeráza se přidávala jako poslední (uložena v mrazáku).
- Master mix byl rozpipetován do PCR mikroskopů a byl přidán 1 μ l DNA.
- Vzorky se zvortexovaly, popřípadě zcentrifugovaly.
- Byl použit cyklér Touchgene Gradient s délkou cyklu 2h a 35 min (Tab.4)
- Po proběhnutí reakce byl otestován amplifikovaný produkt nanesením na 1% agarosový gel. (horizontální agarosová elektroforéza)
- Výsledky byly zobrazeny pomocí softwaru Kodak 1D Image Analyses Software.
- Poté se produkt přečistil pomocí kitu Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit / 250, Genomed

složka	μ l / vzorek
voda	13,9
Gold pufr	2
dNTP	0,4
primer 1	0,25
primer 2	0,25
MgCl ₂	2
Gold polymeráza	0,2
DNA	1

Tab. 2: Mastermix pro PCR.

primer	sekvence
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
nr-SSU-1780-5'Algal	CTGCGGAAGGATCATTGATTC

Tab. 3: Použité primery.

Iniciální denaturace	94° C	5 min
Denaturace	94° C	1 min
Annealing	50° C	1 min
Elongace	72° C	2 min
Finální elongace	72° C	10 min
End	10° C	



Tab. 4: PCR cyklus (šipka označuje opakování 35x).

3.3.3.2 Horizontální agarosová elektroforéza

TBE gel 1% (malý): - 30 ml buffru (TBE)
- 0,30 g agarosy

- Pracuje se v rukavicích!!! (možná kontaminace ethidiumbromid – karcinogen)
- Do Erlenmayerovy baňky se navážilo 0,30 g agarosy.
- Přidalo se 30 ml TBE, a krouživým pohybem se látky promíchaly.
- Gel se dal vařit do mikrovlnky na 1-2 min.
- Mezitím se připravila komůrka s hřebínkem, do které se gel nalil.
- Uvařený gel z mikrovlnky se zchladil kroužením erlenkou pod tekoucí vodou.
- Přidala se 1 kapka ethidiumbromidu.
- Gel byl nalit do komůrky, kde tuhnul cca 20 min.
- Po ztuhnutí byl vyndán hřebínek a komůrka byla vložena do elektroforetické vany, která byla zalita TBE buffrem.
- Do první jamky byly odpipetovány 2 μ l žebříčku (O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus), do dalších jamek 4 μ l DNA.
- Vana byla přiklopena a napojena na zdroj, napětí bylo nastaveno na 100 V.
- Výsledky se zobrazily pod UV zářením (Herolab UV T -20 M, dokumentační systém Kodak Gel Logic 100).

3.3.3.3 Přečištění PCR produktu

- Pomocí Kit Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit / 250, Genomed.
- Ke zbylému PCR produktu se přidalo 80 μ l H1 solution.
- Do nové 2ml eppendorfky (bez víčka z kitu) se přidaly filtry, na které se produkt přepipetoval.
- Centrifugace 1 min při maximálních otáčkách.
- Filtrát se vylil (DNA zůstala navázána na membráně) a filtr se vrátil opět do eppendorfky.
- Přidalo se 500 μ l H2 solution.
- Centrifugace 1 min při maximálních otáčkách.
- Filtrát se vylil (DNA zůstala promytá na membráně) a filtr se vrátil opět do eppendorfky.
- Centrifugace 1 min při maximálních otáčkách.
- Filtr se přendal do nové 1,5 ml epp., do které se přidalo 30 μ l přehřátého TE bufferu (na 70° C).
- Vzorky se nachaly 10 min odstát, centrifugovaly se 2 min při maximálních otáčkách.
- DNA byla skladována v mrazáku.

Srážecí reakce a sekvence PCR produktů probíhala servisní formou ve firmě Macrogen, Inc., Jižní Korea.

3.3.4 Měření koncentrace DNA

Pro měření koncentrace DNA byl použit přístroj Spectrofotometer NanoDrop 1000

- Nejdříve byl změřen blank, použil se 1 μ l destilované vody.
- Dále se nanášely jednotlivé vzorky po 1 μ l.

3.4 Výsledky a diskuze

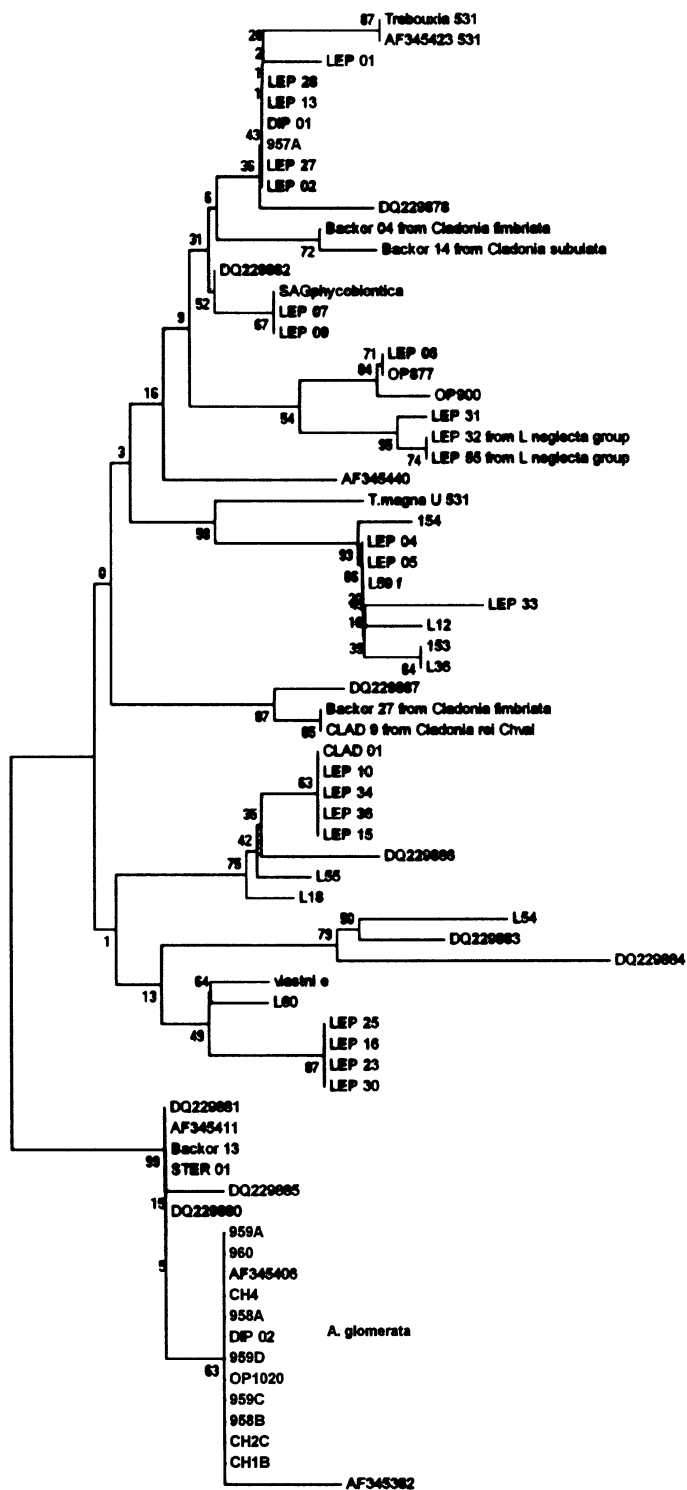
Výsledky sekvenace ukázaly, že lišejník *Cladonia macilenta* ve své stélce často obsahuje více než jednoho fotobionta. Analýza sekvencí navíc ukázala rozdílný poměr mezi fotobionty. Zatímco u některých vzorků byly oba fotobionti ve stélce zastoupeny rovným dílem, v jiných vzorcích výrazně dominoval pouze jeden z nich (Tab. 5).

vzorek	počet fotobiontů
957A	1
957B	2
958A	1
958B	dominuje 1
959A	dominuje 1
959B	2
959C	dominuje 1
959D	1
960	1
CH1B	1
CH2A	2
CH2B	2 - 1 mírně dominuje
CH2C	1
CH4	1
OP 1020	1

Tab. 5: Počet fotobiontů ve stélce lišejníku druhu *Cladonia macilenta*.

Fylogenetická analýza získaných sekvencí odhalila příslušnost fotobiontů ke dvěma liniím v rámci rodu *Asterochloris*. Většina fotobiontů příslušela k druhu *A. glomerata*. Fotobiont ze vzorku 957A ale patřil do odlišné, dosud nepopsané linie v rámci rodu (Obr. 10). Přesná fylogenetická pozice tohoto fotobionta je ale stále neznámá, protože výše zmíněný clade získal pouze malou bootstrapovou podporu (36 %).

Deset z jedenácti vzorků tedy obsahovaly fotobionta *Asterochloris glomerata*. Otázkou je, proč druh *Cladonia macilenta*, který v několika případech obsahoval v jedné stélce více druhů fotobiontů, tak výrazně preferuje druh *A. glomerata*. Nabízí se také otázka, jakým způsobem získává *Cladonia macilenta* své fotobionty. Na tyto a podobné otázky se pokusím odpovědět ve své diplomové práci.



0.002

Obr.10 : Neighbour-joining fylogenetická analýza vybraných sekvencí rodu *Asterochloris*. Modře jsou vyznačeny použité vzorky.

4. Literatura

- AHMADJAN, V. (1988): The lichen alga *Trebouxia*: does it occur free-living? - *Plant Syst. Evol.* 158: 243-247.
- AHMADJAN, V. (1993): The lichen symbiosis. - John Wiley & Sons, New York. *Evolution* 165 : 19-38.
- ARCHIBALD, P. (1975): *Trebouxia* de Puymaly (Chlorophyceae, Chlorococcales) and *Pseudotrebourgia* gen. nov. (Chlorophyceae, Chlorosarcinales). *Phycologia* 14: 125 - 137.
- BAČKOR, M., PEKSA, O., ŠKALOUD, P. & BAČKOROVÁ, M. (2009): Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata. *Submitted manuscript*.
- BAILEY, R. H. & JAMES P. W. (1979): Birds and the dispersal of lichen propagules. *Lichenologist* 11: 105–106.
- BECK, A., FRIEDL, T. & RAMBOLD, G. (1998): Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytol.* 139: 709–20
- BECK, A. ET AL. (2002): Myco-photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. *New Phytologist* 153: 317-326.
- BHATTACHARYA, D., FRIEDL, T. & DAMBERGER, S. (1996): Nuclear-encoded rDNA group I introns: origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae. *Molecular Biology and Evolution* 13: 978–989.
- BÜDEL, B. (1992): Taxonomy of lichenized procaryotic blue-green algae. In W. Reisser (ed.), *Algae and Symbioses*: 301-324
- DEBARY, H. A. (1879): *The Phenomenon of Symbiosis*.
- DEPRIEST, P. T. (2004): Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986-2001. *Microbiol.* 58:273-301
- FAHSEL, D., ALSTRUP, V. & TAVARES, S. (1995): Enzyme polymorphism in *Umbilicaria cylindrica*. Northwest Greenland. *Bryologist* 98: 118–122.
- FRANK, A. B. (1877): Über die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 2: 123-200.
- FRIEDL, T. (1987): Thallus development and phycobionts of the parasitic lichen *Diploschistes muscorum*. *Lichenologist* 19: 183±191.

- FRIEDL, T.(1989a): Comparative ultrastructure of pyrenoids in *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta). *Plant Syst. Evol.* 164: 145-159.
- FRIEDL, T.(1989b): Systematik und Biologie von *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta) als Phycobiont der Parmeliaceae (lichenisierte Ascomyceten). Inaugural-Dissertation, Universität Bayreuth, Germany.
- FRIEDL, T. (1995): Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: A phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dyctiochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.). *J. Phycol.* 31: 632-639
- FRIEDL & BÜDEL (1996): Photobionts. *Lichen biology*. Cambridge University Press, pp. 8-23.
- FRIEDL, T.& ROKITTA, C. (1997): Species relationships in the lichen alga *Trebouxia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): molecular phylogenetic analyses of nuclear - encoded large subunit rRNA gene sequences. *Symbiosis* 23: 125 - 148.
- FRIEDL, T.& ZELTNER, C. (1994): Assessing the relationships of some coccoid green lichen algae and the Microthamniales (Chlorophyta) with 18S ribosomal RNA gene sequence comparisons. *Journal of Phycology* 30: 500 – 506.
- GALUN, M. & BUBRICK, P.(1984): Physiological interactions between the partners of the lichen symbiosis, pp. 362-401. In H. F Linskens & J. Heslop-Harrison (eds.), *Cellular Interactions*. Encyclopedia of Plant Physiology. Berlin.
- GÄRTNER, G. (1985a): Die Gattung *Trebouxia* Puymaly (Chlorellales, Chlorophyceae). *Archiv für Hydrobiologie, Supplement. Algological Studies* 41: 495 - 548.
- GÄRTNER, G. (1985b): Taxonomische Probleme bei den Flechtenalgen Gattungen *Trebouxia* und *Pseudotrebouxia* (Chlorophyceae, Chlorellales). *Phyton (Austria)* 25: 101 -111.
- GUNN, J. ET AL. (1995): Ecosystem recovery after emission reductions: Sudbury, Canada. *Water, Air, and Soil Pollution* 85: 1783–1788.
- HELMS, G. (2001): Taxonomy and symbiosis in associations of *Physciaceae* and *Trebouxia*. Ph.D. Dissertation, Göttingen, Germany
- HELMS ET AL. (2001): Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. *Lichenologist* 33:73–86.
- HELMS, G.,FRIEDL, T. & RAMBOLD, G. (2003): Phylogenetic Relationships of the Physciaceae inferred from rDNA sequence data and selected phenotypic Characters. *Mycologia* 6:1078-1099.
- HILDRETH, K. & AHMADJIAN, V. (1981): A study of *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia* isolates from different lichens. *Lichenologist* 13: 65 - 86.

- HONEGGER, R. (1992): Lichens: mycobiont – photobiont relationships. In *Algae and Symbioses*. Bristol: Biopress: 255-275.
- KALINA, T. & VÁŇA, J. (2005): *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha.
- JAHNS, H. M. (1988): The lichen thallus. In *Handbook of Lichenology*, Vol. 1, ed. M. Galun, Boca Raton: CRC Press: 95-143.
- KROKEN, S. & TAYLOR, J.W. (2000): Phylogenetic Species, Reproductive Mode, and Specificity of the Green Alga *Trebouxia* Forming Lichens. *The Bryologist* 4: 645-660.
- LÜCKING, R., GRUBE, M. (2002): Facultative parasitism and reproductive strategies in *Chroodiscus* (Ascomycota, Ostropales). *Stapfia* 80: 267–292.
- MIADLIKOWSKA, J. & LUTZONI, F. (2004): Phylogenetic classification of peltigeralean fungi (Peltigerales, Ascomycota) based on ribosomal RNA small and large subunits. *American Journal of Botany* 91: 449–464.
- MIEOG, J. C. ET AL. (2009): Quantification of algal endosymbionts (*Symbiodinium*) in coral tissue using real-time PCR. *Molecular Ecology Resources* 9: 74 – 82.
- MITTON, J.B. & GRANT, M.C. (1984): Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 479–499.
- MUÑOZ, J. ET AL. (2004): Wind as a long-distance dispersal vehicle in the Southern Hemisphere. *Science* 304: 1144–1147.
- NELSEN & GARGAS (2006): Dissociation and horizontal transmission of codispersing lichen symbionts in the genus *Lepraria* (Lecanorales: Stereocaulaceae). *The Lichenologist* 5: 435-440.
- OHMURA ET AL. (2006): Genetic combinations of symbionts in a vegetatively reproducing lichen, *Parmotrema tintctorum*, based on ITS rDNA sequences. *Bryologist* 109: 43-59.
- OTT, S. (1987a): Sexual reproduction and developmental adaptations in *Xanthoria parietina*. *Nordic Journal of Botany* 7: 219±228.
- OTT, S. (1987b): Reproductive strategies in lichens. In: Peveling E. ed. *Progress and Problems in Lichenology in the Eighties*. Bibliotheca Lichenologica 25: 81±93.
- PERŠOH ET AL. (2004): The distribution of ascus types and photobiontal selection in Lecanoromycetes (Ascomycota) against the background of a revised SSU nrDNA phylogeny. *Mycological Progress* 3: 103–121.
- PIERCEY-NORMORE, M. & DEPRIEST, P.T. (2001): Algal switching among lichen symbioses. *Am. J. Bot.* 88:1490–98.

- PIERCEY-NORMORE, M. (2006): The lichen-forming ascomycete *Evernia mesomorpha* associates with multiple genotypes of *Trebouxia jamesii*. *New Phytologist* 2: 331-344.
- RAMBOLD, G. & TRIEBEL, D. (1992): The inter-Lecanoralean associations. *Bibliotheca Lichenologica* 48: 1-201.
- RAMBOLD, G., FRIDEL, T. & BECK, A. (1998): Photobionts in lichens: possible indicators of phylogenetic relationships. *Bryologist* 101:392-97
- RIKKINEN, J. (1997): Habitat shifts and morphological variation of *Pseudevernia furfuracea* along a topographical gradient. *Symbolae Botanicae Upsalienses* 32: 223-245.
- ROMEIKE ET AL. (2002): Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (lichenized ascomycetes) along a transect of the Antarctic Peninsula. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1209-1217.
- SANDERS, W. B. (2005): Observing microscopic phases of lichen life cycles on transparent substrata placed *in situ*. - *Lichenologist* 37: 373-382.
- SANDERS, W. B. & RICO, VJ. (1992): Lichinizing rhizomorphs and thallus development in the squamulose lichen *Aspicilia crespiana* Rico ined. (Lecanorales, Ascomycetes). *Botanica Acta* 105: 449±456.
- SCHWENDENER, S. (1867): Ueber den Bau des Flechten thallus. *Verb. Schweiz. Naturf. Ges. Aarau*. p. 88.
- SMITH, D. C. & DOUGLAS, A. (1987): *The Biology of Symbiosis*. Edward Arnold, London.
- ŠKALOUD, P. (2008): Polyphasic approaches in the taxonomy of green aerophytic algae. Ph.D. Dissertation, Praha.
- THOMPSON, JN. (1982): *Interaction and Coevolution*. John Wiley & Sons: pp. 179
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1978): *Myrmecia reticulata* as a phycobiont and free-living *Trebouxia*- The Problem of *Stenocybe septata*. *Lichenologist* 10: 69-79.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1980): *Asterochloris phycobiontica*, gen. et spec. nov., der Phycobiont der Flechte *Varicellaria carneonivea*. *Plant Syst. Evol.* 135: 279-294.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1989): Developmental studies in trebouxoid algae and taxonomical consequences. *Pl. Syst. Evol.* 164: 161 - 195.
- YAHR ET AL. (2004): Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. *Molecular Ecology* 13: 3367-3378.