

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Botanika



**Bc. Tereza Řídká**

Biogeografie a specifita fotobiontů rodu *Asterochloris*.  
Biogeography and specificity of *Asterochloris* photobionts.

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Pavel Škaloud, Ph.D.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

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

V Praze, 9. 5. 2012

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem členům algologické skupiny PřF UK za vytvoření příjemného pracovního prostředí, zejména Pavlu Škaloudovi za vedení diplomové práce, cenné rady, zkušenosti, připomínky a nápady k řešenému tématu. Děkuji Ondřejovi Peksovi za ochotu při determinaci lišejníkových položek, poskytnutí důležitých připomínek a celkovou spolupráci během mé práce na této studii. Můj velký dík patří Pavle Urbánkové, Heleně Bestové, Kataríně Nemjové, Jiřímu Neustupovi, Lucii Vančurové a Davidu Svobodovi za sběry lišejníků, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Nemohu opomenout poděkovat studentskému klubu Mrtvá Ryba, jelikož člověk se všechny podstatné zkušenosti dozví právě tam.

Ovšem největší dík patří mé rodině za jejich podporu během celého mého studia a Michalovi za jeho trpělivost, podporu a pochopení.

## Abstract

Tato práce se zabývá diverzitou a biogeografií fotobiontů rodu *Asterochloris*. Jelikož dosud nebyla publikována žádná studie, která by se biogeografií symbiotických organismů zabývala, je předkládaná práce první, která se pokouší zachytit biogeografickou distribuci a endemismus symbiontů.

Získáním 121 sekvencí z dalších míst, než jen z Evropy a Ameriky, se diverzita v rámci rodu výrazně zvýšila. Fylogenetická analýza založená na kombinaci ITS rDNA a aktin sekvencí fotobiontů vyizolovaných ze stélek lišejníků rodu *Cladonia* a *Stereocaulon* objevila 28 různě podpořených linií. Osm z nich bylo nově objeveno. Na základě statistického testování fylogenetického signálu možných ekologických faktorů, které mohou ovlivňovat rozšíření fotobiontů, jsem vybrala tři proměnné, které ovlivňují složení jednotlivých linií rodu *Asterochloris*, a to dva různé typy biogeografických ekoregionů a typ substrátu.

Celková biogeografie rodu *Asterochloris* vykazuje převážně kosmopolitní rozšíření s velmi nízkou mírou endemismu. Nově získaná data ukazují, že omezený výskyt jakékoliv linie fotobiontů není způsoben historickými nebo biologickými faktory, ale je způsoben spíše specifickými klimatickými podmínkami a jinými prvky na habitatu.

**Klíčová slova:** biogeografie, řasa, *Asterochloris*, fotobiont, symbióza, ekologie, fylogenetický signál

## **Abstract**

This diploma thesis has focused on the diversity and biogeography of *Asterochloris* photobionts. Since no study so far has been published on the biogeography of symbiotic microorganisms, the presented thesis is the first attempt to trace the biogeographic distribution and endemism of symbionts.

By gathering 121 *Asterochloris* sequences obtained from lichen thalli sampled outside Europe and America, the diversity within the genus increased dramatically. The phylogenetic analysis based on the concatenated alignment of ITS rDNA and actin sequences obtained from *Cladonia* and *Stereocaulon* photobionts revealed 28 differently supported clades. Of them, eight lineages were newly discovered. Three environmental factors explaining the best the distribution pattern of *Asterochloris* photobionts were selected according to the statistical tests of the phylogenetic signal: two different types of biogeographical ecoregions and the substrate type.

In general, the genus *Asterochloris* is distributed cosmopolitally, with a very low rate of endemism. Newly obtained data indicate that the restricted distribution of any photobiont clade is not caused by either historic or biological factors, but more likely by specific climatic or habitat preferences.

**Key words:** biogeography, algae, *Asterochloris*, photobiont, symbiosis, ecology, phylogenetic signal

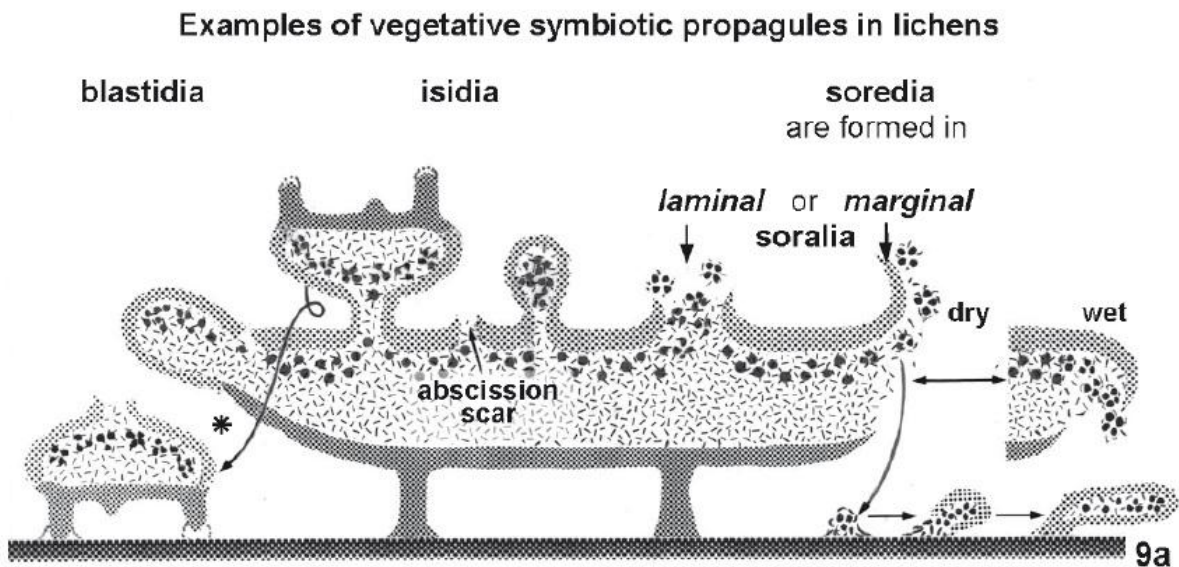
# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	7
1.1 Fotobionti lišejníků .....	8
1.1.1 Taxonomické posouzení rodu <i>Trebouxia</i> a <i>Asterochloris</i> (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) .....	10
1.1.2 Morfologie rodu <i>Asterochloris</i> .....	12
1.1.3 Rozmnožování.....	13
1.1.4 Diverzita rodu <i>Asterochloris</i> .....	13
1.2 Biogeografie protistních organismů .....	16
1.2.1 Biogeografie rozsivek (Bacillariophyta) .....	19
1.2.2 Biogeografie terestrických zelených řas (Chlorophyta).....	19
1.1.4 Biogeografie lišejníkotvorných hub .....	20
1.1.5 Biogeografie fotobiontů: .....	21
<b>2 Materiál a metody</b> .....	25
2. 1. Popis odběrových míst .....	25
2.2 Molekulární metody .....	29
2.2.1 Izolace DNA, PCR a sekvenace: .....	29
2.2.2 Fylogenetické analýzy .....	30
2.2.3 Analýzy ekologické preference .....	31
2.2.4 Haplotypové sítě.....	32
<b>3 Výsledky</b> .....	33
3.1 Molekulární variabilita rodu <i>Asterochloris</i> .....	33
3.2 Geografické rozšíření rodu <i>Asterochloris</i> .....	36
3.3 Vliv přírodních podmínek na rozšíření fotobiontů rodu <i>Asterochloris</i> .....	37
<b>4 Diskuze</b> .....	40
4.1 Diverzita rodu <i>Asterochloris</i> .....	40
4.2 Biogeografie rodu <i>Asterochloris</i> .....	42
4.3 Ekologické faktory ovlivňující druhové složení linií rodu <i>Asterochloris</i> .....	45
4.3.1 Substrátová specifita .....	46
4.3.2 Geografické rozdělení linií fotobiontů .....	46
<b>5 Literatura</b> .....	52

## 1 Úvod

Lišejníky jsou na Zemi široce rozšířeny. Osidlují především extrémní stanoviště, kde tvoří dominantní společenství o velikosti stovek kilometrů čtverečních a 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, od úrovně mořské hladiny až po vysokohorské oblasti (Honegger 2009). 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 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 (Honegger 1992). Mykobiont je heterotrofním zástupcem a obstarává přísun vody, anorganických látek a umožňuje fotobiontu růst a rozmnožování. Je to úspěšná nutriční strategie, kterou využívá 20 % druhů hub (Kirk et al. 2001). Mykobiont je ve velké většině převládající složkou v lišejníkové stélce a obvykle určuje i její morfologický tvar. Zástupci lišejníkotvorných hub patří do vřeckovýtrusných (Ascomycota) i vzácně do stopkovýtrusných hub (Basidiomycota) (Kalina & Váňa 2005). Jejich pojmenování určuje i celý název lišejníku. Velké procento lišejníků se rozmnožuje pomocí vegetativních propagulí: sorediemi, isidiemi, blastidiemi, které s sebou nesou i symbiotického partnera (fytobionta), anebo fragmentací stélky (Obr. č. 1). Soredie jsou na svém povrchu hydrofobní, což usnadňuje jejich rozšiřování na krátké/dlouhé vzdálenosti pomocí vzduchu, peří, srsti u obratlovců nebo kutikuly u bezobratlých (Muñoz et al. 2004; Bailey & James 1979; atd.). 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 pozorována např. u *Diploschistes muscorum* (Friedl 1987).



**Obr. č. 1:** Typy vegetativního rozmnožování lišejníku (Honegger 2009).

### 1.1 Fotobionti lišejníků

Záznam o výskytu zelených řas či sinic ve stélce lišejníku v útvarech zvaných gonidia zaznamenal jako první švýcarský botanik Simon Schwendener (1867). Před ním sice lichenologové zaregistrovali podobnost s řasou, ale byli toho názoru, že je to pouze jiný typ zbarvení hyf. V současné době se odhaduje, že 100 druhů ve 40 rodech řas a sinic tvoří symbiotické společníky v různých taxonech lišejníků (Friedl & Büdel 2008; Tschermak - Woess, 1988). Můžeme předpokládat, že diverzita lichenizovaných řas a sinic je mnohem vyšší než 100 druhů. Molekulární studie naznačují existenci mnoha nepopsaných druhů (např. Helms 2003; Beiggi & Piercey-Normore 2007; Cordeiro et al. 2005; Yahr et al. 2006 atd.).

Nejčastějšími fotobionty zelených řas (Chlorophyta, Eukaryota) jsou rody *Trebouxia*, *Asterochloris* a *Trentepohlia*. Rod *Nostoc* je nejčastějším zástupcem sinic (Cyanobacteria). Eukaryotičtí fotobionti jsou označováni jako fykobionti, zatímco jako cyanobionti jsou označováni zástupci sinic (Friedl & Büdel 1996). Přestože fotobiont představuje nenápadnou část v celém organismu, pro mykobiontního partnera je nezbytně důležitou součástí, protože mu dodává organické látky (Kalina & Váňa 2005).

Zaměříme-li se na zelené řasy, nejčastějšími fotobionty lišejníků v rámci třídy Ascomycetes jsou *Trebouxia* a *Asterochloris* (Peršoh et al. 2004). Na rodové a druhové úrovni jsou tradičně zelené řasy určovány podle morfologických znaků v jejich vegetativní



fázi životního cyklu (Ettl & Gärtner 1995). Hlavní morfologické a ultrastrukturální charakteristiky používané jako taxonomická kritéria pro zelené mikrořasy jsou: tvar a rozměry buněk, vlastnosti buněčné stěny, počet jadérek, tvar chloroplastů, přítomnost nebo absence pyrenoidů, počet a velikost autospor a schopnost tvořit zoospory (Ettl & Gärtner 1995; Komárek & Fott 1983). V minulosti se zjistilo, že morfologická identifikace in situ - tedy přímo ze stélky - je nemožná, protože se mění tvar buňky vlivem mykobionta (Tschermak - Woess 1988). Velikost buněk je redukována, počet buněk vláknitých řas je obvykle snížen na jednu buňku, pohlavní a nepohlavní cyklus řas je modifikován. Pouze „volně žijící“ řasy mohou být určeny podle tradičních morfologických metod. Ahmadjian (1967) jako první publikoval kompletní návod pro izolaci, kultivaci a identifikaci fotobiontů lišejníků. Avšak několik důležitých morfologických znaků vykazuje velkou plasticitu, kterou nelze odhalit pouze pomocí morfologie. Po roce 1990 vzrostlo množství výzkumů zabývajících se fylogenetickými analýzami, založenými na specifických molekulárních markerech. Typickými genetickými markery používanými v algologických studiích jsou: jaderný ribozomální operon (SSU, 5,8S, LSU a ITS), geny pro aktin, chloroplastové geny (*rbcL*, *atpB*) a mitochondriální geny (*coxI*). SSU rDNA obsahuje variabilní oblasti, proto je používán pro výzkum vyšších taxonomických úrovní zahrnujících výzkum evoluce. Další, v současné době nejpoužívanější marker, je internal transcribed spacer (ITS) (Hershkovitz et al. 1999). Byl použit například ve studiích zabývajících se specificitou a genetickou variabilitou rodu *Asterochloris* (Nelsen & Gargas 2008; Yahr et al. 2006).

Tradiční morfologické pojetí druhu je zastaralé a pro mnoho rodů zelených řas by se mělo přehodnotit (Pröschold et al. 2001), avšak díky mnoha předchozím studiím představuje pro další výzkum velmi cenný základ o morfologické variabilitě a rozšíření jednotlivých druhů řas. Příkladem morfologické nepřesnosti je rod *Chlorella*. Až pomocí molekulárních metod bylo prokázáno, že pouze 4 druhy morfologicky definovaného rodu spadají do skutečného taxonu *Chlorella*, ostatní druhy by měly být převedeny do samostatných rodů (Huss et al. 1999). Rod *Asterochloris* původně spadal do rodu *Trebouxia*, z něhož byl na základě molekulárních a ultrastrukturálních znaků vyčleněn (podrobnějším popisem se zabývám později; Helms 2001; Piercey-Normore & DePriest 2001; Škaloud & Peksa 2010). Jak je ukázáno na těchto příkladech, mnoho rodů zelených řas je polyfyletických. Jejich postavení stejně jako jejich počet je potřeba upravit. Kombinací morfologických, ultrastrukturálních, molekulárních, ekologických nebo biochemických znaků bychom mohli odhalit skutečnou biodiverzitu a vztahy mezi taxony u zelených řas. Polyfázickým přístupem

se mohou jasně určit rody či druhy, což ve většině případů vede k objevení více druhů (Neustupa et al. 2007), nebo i k opačnému jevu, a to snižování počtu druhů (např. Pröschold et al. 2001). Již nyní víme, že byla odhalena velká skrytá diverzita u rodů *Trebouxia* (Kroken & Taylor 2000), *Asterochloris* (Piercey-Normore & DePriest 2001; Škaloud & Pekska 2008; Škaloud & Pekska 2010), *Coccomyxa* (Friedl et al. 2007) a *Dictyochloropsis* (Škaloud et al. 2007).

### **1.1.1 Taxonomické posouzení rodu *Trebouxia* a *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)**

Již na začátku 20. století vědci zjistili nejednotnost – heterogenost v rodu *Trebouxia*. Tuto otázku se pokusilo vyřešit několik vědců přesunutím některých druhů rodu *Trebouxia* do nových rodů či podrodů. Z počátku Warén (1920) stanovil dva podrody na základě rozdílnosti nepohlavního rozmnožování. Do poddruhu *Eucystococcus* patřily řasy, které se rozmnožovaly vegetativně a vytvářely 4-16 dceřiných buněk. Do poddruhu *Eleuterococcus* tedy přidělil řasy, které produkovaly více než 32 malých kulovitých dceřiných buněk. Ahmadjian (1959b, 1960) dělí rod *Trebouxia* na dvě skupiny lišící se tvarem buňky a pozicí chloroplastu před sporogenezí. Skupinu I charakterizoval oválným tvarem buněk a parietální pozicí chloroplastu před buněčným dělením. Chloroplasty v této skupině byly popsány s hlubokými laloky dosahujícími až na konec buňky. Oproti tomu skupina II byla definována kulovitým tvarem buněk a centrální pozicí dělicích se chloroplastů. U druhé skupiny se vyskytuje masivní centrální chloroplast s hladším povrchem. Toto rozdělení později potvrdily studie srovnávající ultrastrukturu pyrenoidů (Jacobs & Ahmadjian 1968; Peveling 1968). V 70. letech se rod *Trebouxia* nově dělí na rod *Trebouxia* de Puymaly a *Pseudotrebouxia* Archibald na základě odlišné tvorby nepohyblivých reprodukčních buněk – autospor (Archibald 1975). Rod *Trebouxia* je definován tvorbou autospor pomocí tzv. „desmoschisis“ (typ buněčného dělení, kdy mateřská buněčná stěna je alespoň na krátkou dobu těsně spojená s dceřinou BS), rod *Pseudotrebouxia* pak pomocí tzv. „eleutheroschisis“ (druhý typ buněčného dělení, kdy nové buňky jsou obklopeny BS, která není těsně spojená s mateřskou BS) (Groover a Bold 1969). Gärtner (1985a,b) odmítal přijmout skupinu *Pseudotrebouxia*, jelikož jeho pozorování zjistilo dělení protoplastu u obou druhů. Sám odlišil v rámci rodu *Trebouxia* dvě skupiny na základě odlišné tvorby autospor, avšak jeho pojetí bylo odlišné. Později se jeho odmítnutí potvrdilo např. molekulární studií Kroken & Taylor (2000). Rod *Asterochloris* byl poprvé vyizolován a popsán z lišejníku *Anzina carneonivea* (Tschermak-Woess 1980) jako druh *Asterochloris phycobiontica*. Ačkoliv některé morfologické znaky byly podobné s druhy rodu *Trebouxia*,

vymezila ho výskytem radiálně laločnatého, pohárkovitě tvarovaného chloroplastu s jedním velkým pyrenoidem (v některých případech až 7 doplňkových pyrenoidů). Později při revizi rodu (opět rozdělen na dva podrody) převedla *Asterochloris phycobiontica* do podrodu *Eleutherococcus* (Warén) Tschermak-Woess. Podle jejího názoru tento podrod nevytvářel autospory, které se naopak objevují u podrodu *Trebouxia* Tschermak-Woess (Tschermak-Woess 1989). Nevykloučila však do budoucna rekvalifikaci podrodů do samostatných rodů a navrhla rodové jméno *Asterochloris* pro zástupce nevytvářející autospory (Tschermak-Woess 1989).

S rozvojem molekulárních metod se zjistilo, že rod *Trebouxia* je paryfyletický s rodem *Myrmecia*, a zkoumáním nrSSU a nrLSU sekvencí byly *Trebouxia magna* a *Trebouxia erici* více příbuzné s *Myrmecia biatorellae* než s *Trebouxia s. str.* (Friedl & Zeltner 1994; Friedl 1995 a Friedl & Rokitta 1997). Po tomto objevu bylo navrženo rozdělení rodu *Trebouxia* na rod *Trebouxia* a *Asterochloris* na základě dřívějšího podnětu ze strany Tschermak-Woess (Rambold et al. 1998; Helms et al. 2001). Rozdělení bylo následně podpořeno molekulárními studii ITS rDNA u mnoha řasových fotobiontů (Piercey-Normore and DePriest 2001). Sekvence rodu *Asterochloris* jsou monofyletické a navíc odlišné od nejbližších příbuzných rodů *Myrmecia* a *Trebouxia* (Friedl & Büdel 2008). Příslušnost několika druhů rodu *Trebouxia* (*T. erici*, *T. excentrica*, *T. glomerata*, *T. irregularis*, *T. italiana*, *T. magna* a *T. pyriformis*) k rodu *Asterochloris* byla opakovaně v minulosti navržena několika autory (Friedl & Zeltner 1994; Friedl & Rokitta 1997; Helms et al. 2001; Nelsen & Gargas 2008; Normore & DePriest 2001; Rambold et al. 1998). Na základě morfologické a molekulární srovnávací studie byly výše uvedené druhy převedeny do rodu *Asterochloris* až v roce 2010 (Škaloud & Peksa 2010). *Trebouxia pyriformis* a *T. glomerata* byly shledány jako velmi podobné, a to jak morfologicky, tak porovnáváním molekulárních markerů (99,6 % podobnosti v obou lokusech). Toto zjištění vedlo ke spojení těchto dvou druhů a ustanovení *T. pyriformis* jako synonymum druhu *A. glomerata* (Škaloud & Peksa 2008, dříve navrženo Friedl 1989b; Piercey-Normore & DePriest 2001).

Morfologicky se rod *Asterochloris* odlišuje od příbuzných rodů parietální pozicí chloroplastu před dělením buňky (Ahmadjian 1960; Friedl & Gärtner 1988; Hildreth & Ahmadjian 1981; Škaloud & Peksa 2008), hluboce laločnatým chloroplastem (Ahmadjian 1959b; Ahmadjian, 1960), ultrastrukturou pyrenoidu - nelze přesně rozeznat matrix pyrenoidu od stromatu chloroplastu (Friedl 1989a), spíše vejčitém, eliptickým či hruškovitým tvarem buněk (Ahmadjian 1960; Hildreth & Ahmadjian 1981) a vysokým počtem (64 – 128)

nepohyblivých dceřiných buněk s buněčnou stěnou (Friedl 1993; Tschermak-Woess 1989; Warén 1920).

### 1.1.2 Morfologie rodu *Asterochloris*

Hlavní poznávací znaky pro zařazení do druhu stejně jako odlišení od nejbližších příbuzných rodů (tj. rod *Myrmecia* a *Trebouxia*) jsou: tvar a velikost buňky, struktura a počet pyrenoidů, morfologie chloroplastů a vlastnosti spojené s nepohlavním rozmnožováním. Tvar a velikost buněk mají dostatečnou variabilitu mezi druhy. Průměrná velikost vegetativních buněk se pohybuje mezi 13-24  $\mu\text{m}$ . Buňky jsou většinou kulovité, eliptické, vejčité nebo občas hruškovité. Tvar buňky se během ontogeneze mění, ale je stále zachován viditelný rozdíl mezi druhy. Například hruškovitý tvar se často objevuje u *Asterochloris glomerata* a *A. irregularis*, méně často u *A. sp.clade 10* (Škaloud & Peksa 2010) a *A. phycobiontica*, nikdy nebyl pozorován u *A. erici* a *A. excentrica*. Buněčná stěna je tenká, občasné ztlustliny mohou být pozorovány u vyžralých buněk. U starých kultur je občas zesílený celý povrch buněčné stěny. Jádro s výrazným jadérkem je parietálně uloženo v prohlubni chloroplastu (Škaloud & Peksa 2008).

Morfologie chloroplastu je velmi variabilní a je důležitá pro určení do jednotlivých druhů. Chloroplast mladých buněk není axiální, ale spíše parietální nebo páskovitý. Brzy se ve vývoji přesouvá do středu buňky a začne tvořit laloky. Dospělé buňky tedy obsahují centrální chloroplast s laloky dotýkajícími se buněčné stěny. V pozdním ontogenetickém stádiu, před fází zoo-/aplanosporogeneze, se chloroplast změní na parietální s hladkým povrchem - vždy bez laloků. Pro přípravu nepohlavního rozmnožování se brzy začne dělit na několik částí. Axiální chloroplast zralých buněk je charakteristický velkou morfologickou variabilitou, která napomáhá determinaci druhů (Škaloud & Peksa 2008).

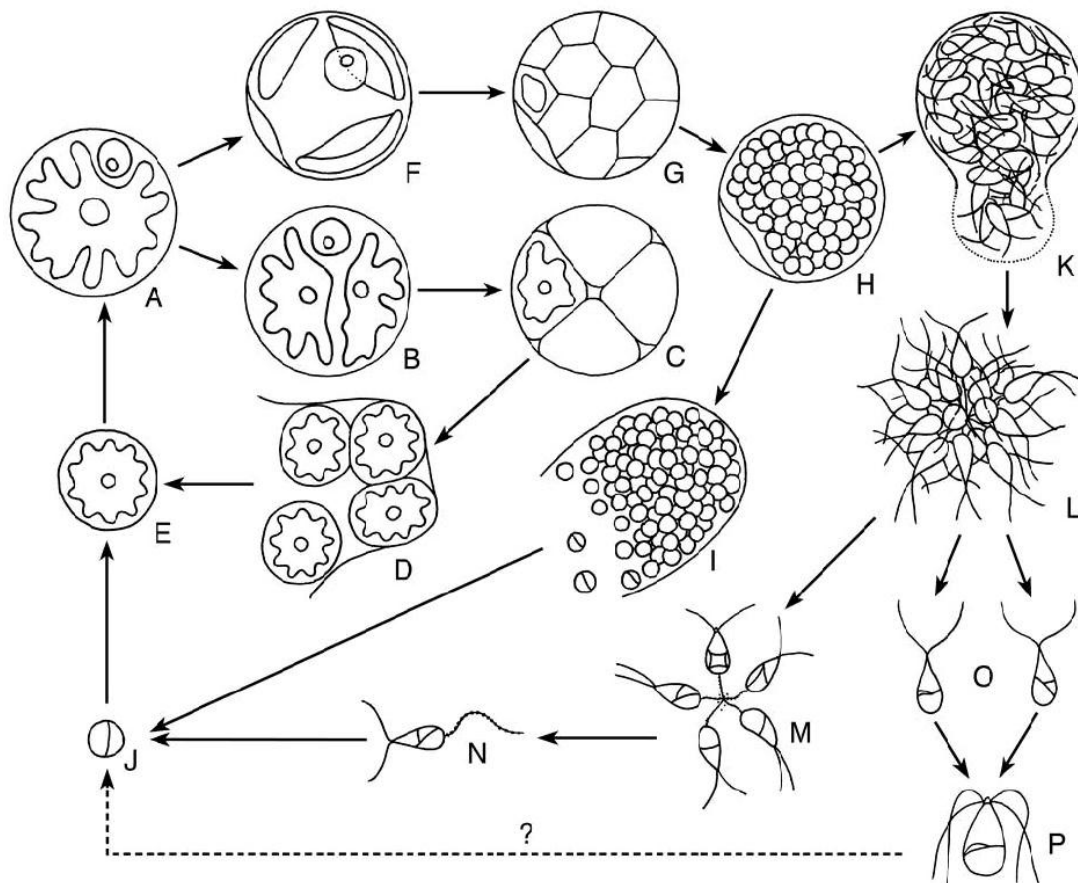
Pyrenoid je zastoupen ve všech druzích kromě druhu *Asterochloris magna*. Výskyt jednoho pyrenoidu je zjištěn např. u *A. erici*. Ostatní buňky obsahují většinou několik pyrenoidů ležících v centru chloroplastu. Matrix pyrenoidů je různorodý - granulovaný, tvořící strie nebo perforovaný. Často je obklopen vrstvou škrobu, která je viditelná pod mikroskopem jako tmavá oblast kolem pyrenoidu (Škaloud & Peksa 2008).

### 1.1.3 Rozmnožování

Nepohlavní rozmnožování zajišťují 3 typy buněk (Obr. č. 2) - autospory, zoospory a aplanospory (Tschermak-Woess 1989). Reprodukce pomocí autospor je poměrně vzácná, pozorovaná u několika druhů (Škaloud & Peksa 2008). **Autospory** jsou jednojaderné buňky, které nikdy nemají bičíky. V době opuštění mateřské buněčné stěny mají tvar, který odpovídá dospělé vegetativní buňce. Ve srovnání s aplono- a zoosporami se tvoří v malém počtu (většinou 4 nebo 8). Počáteční vývoj aplano- a zoospor je totožný. Stěna mladého sporangia se ztlušťuje, chloroplast se začíná dělit a konečný počet dceřiných buněk se ustálí na 64/128 (Tschermak-Woess 2000). **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 (Kalina & Váňa 2005). Pohlavní proces je velmi vzácný a byl pozorován např. u *Asterochloris* sp. (první záznam u rodu *Asterochloris*) izolovaného z *Lepraria borealis* (Škaloud & Peksa 2008) či *Trebouxia* sp. z lišejníků rodu *Letharia* (Kroken & Taylor 2000). Je otázkou, zda pohlavní rozmnožování lichenizovaných zelených řas ustoupilo (kromě rodu *Trentepohlia*) v důsledku vzniku velmi vyspělého symbiotického spojení řasy a lišejníkotvorné houby (Law & Lewis 1983), a kde by byl nový genotyp méně vhodný pro mykobiontního partnera (Ahmadjian 1993).

### 1.3.4 Diverzita rodu *Asterochloris*

Nejnovější molekulární výsledky poukázaly na velkou diverzitu uvnitř rodu *Asterochloris* (Škaloud & Peksa 2010). Nyní je známo 16 dobře podpořených linií, z nichž 7 je již popsanych (viz výše - *A. erici*, *A. excentrica*, *A. glomerata*, *A. irregularis*, *A. italiana*, *A. magna* a *A. phycobiontica*). Rod ale stále obsahuje mnoho nepopsaných druhů. Škaloud & Peksa (2010) použili kombinaci molekulárních markerů – ITS a aktin (aktinová data byla použita doposud pouze 2x; Nelsen & Gargas 2006, 2008) a poukázali na existenci 9 dobře podpořených linií, které mohou prezentovat nové druhy. I přes zkoumání fotobiontů lišejníků ze stejných rodů (dokonce i druhů - např. *Lepraria caesioalba*) a ekologických skupin (saxikolní, terikolní a epifytické) určili 3 nové, doposud neobjevené druhy (linie 7, 10 a 14). U rodu *Asterochloris* je proto přítomna vysoká kryptická diverzita, která nemůže být odhalena pouze morfologickými metodami.



**Obr. č. 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 aplano-/zoosporangium, I uvolnění aplanospor, 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 (Škaloud 2008).

**Specificita** je výraz pro vyjádření vztahu mezi oběma symbionty, který závisí na míře selektivity (Rambold et al. 1998; Beck et al. 2002, obr. č. 3). Specificitou se rozumí počet partnerů, s nimiž se symbiotický organismus sdružuje (Smith & Douglas 1987), selektivita nám ukazuje frekvenci spojení mezi kompatibilními partnery (Rambold et al. 1998). Tyto dvě vlastnosti spolu velmi úzce souvisí. Nízká specificita hostitele, který se sdružuje s několika nepříbuznými liniemi, může být shodná s vysokou selektivitou, pokud jde o upřednostnění spojení pouze s jednou z těchto linií (Yahr et al. 2004). Oba termíny jsou obvykle používány z pohledu mykobionta, nicméně neexistuje důvod, proč by se tyto pojmy nemohly používat i pro fotobionty, zvláště pak specificita.



## 1.2 Biogeografie protistních organismů

Pro pochopení termínu biogeografie musíme zkombinovat různé oblasti vědy, například evoluci, taxonomii, ekologii, geologii, klimatologii atd. Za posledních 200 let řada osobností přes Ehrenberga, Darwina, Beijerincka a mnoho dalších vytvořila myšlenku, která ukazuje zásadní rozdíl mezi mikro a makroorganismy. „Malé“ druhy jsou všudypřítomné oproti „velkým“ druhům, které bývají geograficky vymezeny.

Termín Protista se v současné době užívá pro eukaryotické organismy, které jsou buď jednobuněčné, nebo mnohobuněčné bez specializovaných tkání. Finlay (2002) odhaduje počet všech žijících protistních organismů od deseti do dvaceti tisíc, zatímco Foissner (1999, 2008) odhaduje počet pouze jedné skupiny nálevníků na třicet tisíc druhů a celkový počet všech protistních druhů na tři sta tisíc.

Biogeografie protistních organismů je úzce spjata se dvěma teoriemi jejich rozšíření. První – **teorie ubikvitního rozšíření** - předpokládá, že volně žijící mikroorganismy mají kosmopolitní rozšíření, a organismy menší než 1 mm jsou distribuovány po celém světě všude tam, kde jsou splněny jejich nároky na prostředí (Finlay 2002; Fenchel & Finlay 2003; Finlay & Fenchel 2004). Z historického hlediska se ubikvitní teorií zabýval již v roce 1887 anglický vědec William Miles Maskell, který ve své studii zjistil výskyt stejných druhů ciliátů na Novém Zélandu a v Evropě. Rozšířená myšlenka všudypřítomnosti mikroorganismů byla sepsána ve studii holandského mikrobiologa M. W. Beijerincka (1913), kterého můžeme považovat za autora originální teze „všechno je všude“. Jeho pokus s kultivací bakterií na různých typech přírodního materiálu, kde bakterie z biogeograficky vzdálených míst si byly velmi podobné, ne-li identické, aplikoval na mikrobiální eukaryota. Později dánský mikrobiolog Lourens Baas-Becking (1934) pokračoval s rozvíjením biogeografických teorií. Zabýval se slanými jezery z celého světa, ve kterých byly nalezeny v poměrně vysoké četnosti stejné organismy adaptované na toto prostředí (např. *Dunaliella viridis*). Na základě svých objevů a předešlých studií Beijerincka definoval dva zákony. První zákon byl formulován pouze pro mikroorganismy („všechno je všude“), pro které bariéry na lokálním a globálním měřítku nehrají zásadní roli při jejich rozšiřování. Druhý zákon, který říká, že limitující je pouze prostředí („*but the environment selects*“), se vztahuje na všechny organismy. V současné době se teorií ubikvitního rozšíření zabývají především Finlay a Fenchel, kteří dále prosazují a upřesňují tuto myšlenku.

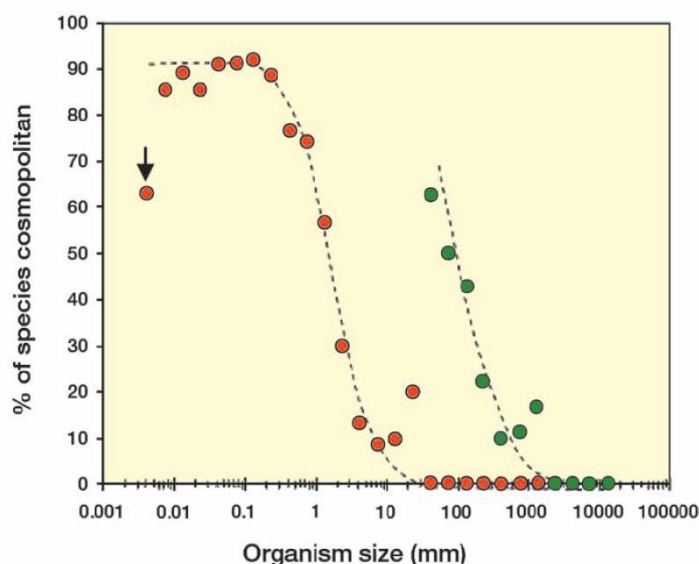


Výhodou protistních organismů je jejich malá velikost a velká početnost populací, které se rychle rozmnožují pomocí velkého množství propagulí (cysty, spory), a které se dokáží rozptýlit na velké vzdálenosti. Rozšiřování je řízeno náhodnými procesy (transport v srsti zvířat, nohy vodních ptáků, cirkulace oceánských proudů atd.) a je vzácně omezeno a ovlivněno geografickými bariérami, jejich výskyt tedy udávají vlastnosti prostředí. Nedochozí tu ani k alopatrickým speciacím, či k lokálním extinkcím, proto poměr jejich globální a lokální druhové diverzity je nižší než u makroorganismů (Finlay & Clarke 1999; Finlay 2002; Fenchel & Finlay 2004). Hranice velikosti, kde již jsou organismy geograficky rozlišeny, je mezi 1-10 mm (Lawton 1998), nyní je však tendence ke snižování této hranice. Ve studii srovnávající druhové složení sladkovodního rybníku Priest Pot (Velká Británie) a Nivå Bay (Dánsko) Fenchel & Finlay (2004) zjistili, že jeden mililitr vody obsahuje přibližně  $10^6$  bakterií a  $10^3$  protistů a že některé skupiny organismů jsou počtově podceněné („undersampling“), jako například nahé améby nebo jako mořská meiofauna na jižní polokouli. I přesto Finlay & Fenchel tvrdí, že tento nedostatek neohrožuje teorii ubikvitního rozšíření, protože většina protistů toleruje velké rozmezí přírodních faktorů (salinita, teplota) a dokáží se geneticky či fyziologicky adaptovat. Potvrzují se zde pravidla, že čím menší velikost organismu, tím větší hustota druhů v populaci a že se zvyšujícím se počtem kosmopolitních druhů se snižuje velikost organismů (Obr. č. 4).

Umírněnější variantu ubikvitního rozšíření zastává ve svých studiích Foissner (1999, 2006). Připouští, že velká část protistních organismů má kosmopolitní rozšíření, ale zároveň poukazuje na existenci mikroskopických organismů, které vykazují biogeografii. Předpokládá také, že za širší geografické rozšíření protistů může vedle jejich malé velikosti a velké abundance i to, že jsou fylogeneticky starší, tudíž měly více času na šíření než makroorganismy (Foissner 2006).

Důvody pro chybné předpokládání všudypřítomnosti protistních organismů jsou: nesprávné určení, stále používání teorie druhového složení založené na morfologii, „morphological species concept“ (Foissner 2006, 2008) a vliv člověka. Podhodnocování globální druhové diverzity podpořily molekulární studie několika skupin mikroskopických eukaryot (Šlapeta et al. 2005, 2006; Luo et al. 2006; Evans et al. 2008). Podhodnocování je úzce spjato s velikostí organismu. Tento problém, který neumožňuje získat odpovídající data o diverzitě a biogeografii protistů, se vztahuje k organismům s malou velikostí, organismům tvořícím dormantní stadia (cysty, spory) a k chybám způsobeným člověkem - chybnému určení a kultivaci. Pokud se bude v rybníku o rozloze 1 ha (např. výše uvedený Priest Pot)

vyskytovat milion jedinců jednoho protistního druhu, nemusíme na něj při výzkumu nikdy narazit. Například v období odběru jsou určité druhy aktivní a další ve stavu dormance. Dále se odebírá vždy jen malé množství vody/sedimentu a často se používá pouze světelný mikroskop. To vysvětluje, proč se nové druhy nalézají na habitatech, na kterých nebyly dříve nalezeny, což současně přispívá k jejich označení za endemický organismus (Finlay et al. 2002).



**Obr. č. 4:** Podíl eukaryotních organismů v rybníku Priest Pot ve Velké Británii. Příklad závislosti velikosti organismu na kosmopolitním rozšíření (Finlay & Fenchel 2004). Červené tečky nahoře – Gastrotricha (prům. velikost 0,16 mm), Rotifera (0,28 mm), Ostracoda (0,88 mm) a Nematoda (0,98 mm), v dolní části převažuje vodní hmyz (13 mm) a Mollusca (23 mm). Zelené tečky zastupují cévnaté rostliny a mechy.

Vliv člověka způsobuje změny v biogeografickém rozšíření organismů (i vyšších). U protistních organismů se ukázalo používání zátěžové vody v lodích jako jedna z možných příčin kosmopolitního rozšíření mořských protist (Hulsman & Galil 2002). Příkladem rozšířeného výskytu mikroorganismů, který byl způsoben transportem, je zavlečení řasy *Hydrodictyon* na Nový Zéland, kde před tím nebyla nikdy zaznamenána (Kristiansen 1996). Dále výstavba Suezského průplavu způsobila rozšíření několika tropických druhů foraminifer a toxických obrněnek přes kanál do Středozemního moře (Hallegraeff & Bolch 1992).

Příklady studií, které ukazují spíše umírněný model ubikvitního rozšíření, jsem zaměřila na řasy (zelené terestrické, rozsivky), na lišejníkotvorné houby a hlavně na jejich fotobionty.

### 1.2.1 Biogeografie rozsivek (Bacillariophyta)

Jak již bylo zmíněno výše, důležitou roli při výzkumu biogeografie rozsivek hrálo v minulosti podhodnocení globální druhové diverzity díky nerozpoznání kryptických a pseudokryptických druhů (Foissner 2006), či podcenění druhového složení v neprozkoumaných oblastech. Tímto způsobem byla většina rozsivek považována za kosmopolitní. Nové studie založené na molekulárních analýzách nevyklučují kosmopolitní rozšíření druhů a zároveň poukazují i na druhy s omezeným rozšířením. Kosmopolitní druh *Skeletonema costatum* sensu lato je složen z mnoha morfologicky a geneticky odlišných kryptických druhů. Kooistra et al. (2008) analýzou LSU rDNA objevili druhy s kosmopolitním i geograficky omezeným výskytem na tropický a subtropický areál. Potenciální vnitrodruhové změny a biogeografická distribuce byla pozorována i u globálně rozšířené rozsivky *Pseudonitzschia pungens* pomocí ITS rDNA regionu (Casteleyn et al. 2008). Autoři došli k podobným závěrům - mnoho druhů rodu *Pseudonitzschia* je kosmopolitních, ale některé druhy mají jasně vyhraněný areál zeměpisnou šířkou.

### 1.2.2 Biogeografie terestrických zelených řas (Chlorophyta)

K potvrzení nebo vyvrácení dvou scénářů ubikvitní teorie díky nedostatku potřebných znalostí u zelených terestrických řas zatím nemůže dojít, protože doposud všechny studie biogeografie byly založeny na morfologickém konceptu druhů, což je dost zavádějící (Rindi et al. 2009). Jednou z nejvíce široce distribuovaných suchozemských řas je rod *Klebsormidium*, přesněji jeho zástupce *Klebsormidium flaccidum* (Ettl & Gärtner, 1995; John 2002). Jeho rozšíření se vztahuje hlavně na typ substrátu - půda, skály, betonové bloky (Ettl & Gärtner, 1995). Obecně se tento rod vyskytuje ve všech klimatických oblastech, od polárních k tropickým (Broady 1996; John 2002).

Ve vlhkých tropických oblastech jsou nejčastější terestrickou řasou zástupci řádu Trentepohliales (Rindi et al. 2008a). Stejně jako rod *Klebsormidium* osidluje širokou škálu substrátů od skal, přes kůru, listy až po betonové zdi (Chapman 1984). Předpokládá se, že větší prozkoumání tropických oblastí odhalí širší geografické rozdělení, jelikož dříve známé druhy ze „Starého světa“ se začínají objevovat i ve Francouzské Guyaně a Panamě (Rindi & López-Bautista 2008; Rindi et al. 2008a). O této řase se dále zmíním v kapitole 1.1.5, jelikož rod *Trentepohlia* je jedním z rodů zelených řas, který vytváří symbiotické (mutualistické) spojení s lišejníkotvornou houbou (mykobiontem).

Řád Prasiolales zahrnuje univerzální druhy řas, které se vyskytují v mořských, sladkovodních i terestrických habitatech. Rozšíření této řasy se orientuje na polární a studené mírné oblasti s vlhkým klimatem, hlavně na území Antarktidy, kde je povrch pokryt velkým množstvím guana (Broady 1996). Jediní zástupci vyskytující se v teplejších oblastech, avšak v horských pramenech, jsou sladkovodní zástupci rodu *Prasiola* (Naw & Hara 2002).

Prostředí deštných pralesů skrývá obrovské množství neobjevených druhů zelených terestrických řas. Nové studie i nadále objevují další druhy (Neustupa 2003; Neustupa 2005; Neustupa et al. 2007; Rindi & López-Bautista 2008, Eliáš et al. 2008; Neustupa et al. 2009). Vysoká vlhkost vzduchu a velká rozmanitost biotopu nabízí ideální podmínky pro velkou diverzitu terestrických řas. Je důležité, aby toto prostředí bylo detailně prozkoumáno dřív, než jej ovlivní lidská činnost. Dále je třeba se zabývat i jinými aspekty biologie, například rozsahem a mechanismy rozptylu, které nám pomohou pochopit zeměpisné rozšíření druhů, například rozšíření zelené vzdušné řasy rodu *Stichococcus*, která má buňky o velikosti 10-12  $\mu\text{m}$ , a je schopna se rozšiřovat na tisíce kilometrů (Roy-Ocotla & Carrera 1993).

#### **1.1.4 Biogeografie lišejníkotvorných hub**

Mnoho druhů lišejníkotvorných hub je široce rozšířeno díky jejich schopnosti šířit se na velké vzdálenosti pomocí propagulí a díky jejich dlouhé evoluční historii. Lucking et al. (2008) zkoumal historickou biogeografii široce rozšířeného foliosního lišejníku *Chroodiscus*. Jeho dnešní rozšíření je dáno spíše historickým rozptylem v období křídý než nynějším překonáváním oceánů. Některé druhy se rozšířily i přes několik klimatických pásů/kontinentů. Patří mezi ně *Lobaria pulmonaria*, nebo také *Hypogymnia physodes* (nejvíce se vyskytuje na severní polokouli), které obsadily subtropické, tropické i boreální areály, a je zaznamenán jejich výskyt i na jižní polokouli (Yoshimura 1971 z Silke Werth 2011). Jejich schopnost tolerovat fyziologické stresy je uvádí do role úspěšných kolonizátorů nových (i extrémních) habitatů. Ostrov Surtsey, vzdálený 30 km od Islandu, je příkladem kolonizace v průběhu čtyřiceti let. Vznikl sopečnou činností mezi lety 1963-1967, a již v roce 1970 zde vědci zaznamenali první druhy lišejníků (Kristiansen & Heiðmarsson 2009). V časovém rozmezí třiceti devíti let se na ostrově objevilo 87 druhů lišejníků a jejich počty stále stoupají.

Lišejníky jsou sice široce rozšířeny, ale opravdu kosmopolitních je jich pouze několik (Otte et al. 2005). Dokonce i druhy s širokým rozšířením vykazují ekologické tendence (Werth et al. 2005, Peksa & Škaloud 2011). Například lišejníky rozšířené v chladných arktických oblastech se vyskytují i v teplejších oblastech, ale pouze ve vysokých

nadmořských výškách. Jejich distribuce je řízena druhově specifickou ekologií (Codogno & Sancho 1991).

### 1.1.5 Biogeografie fotobiontů:

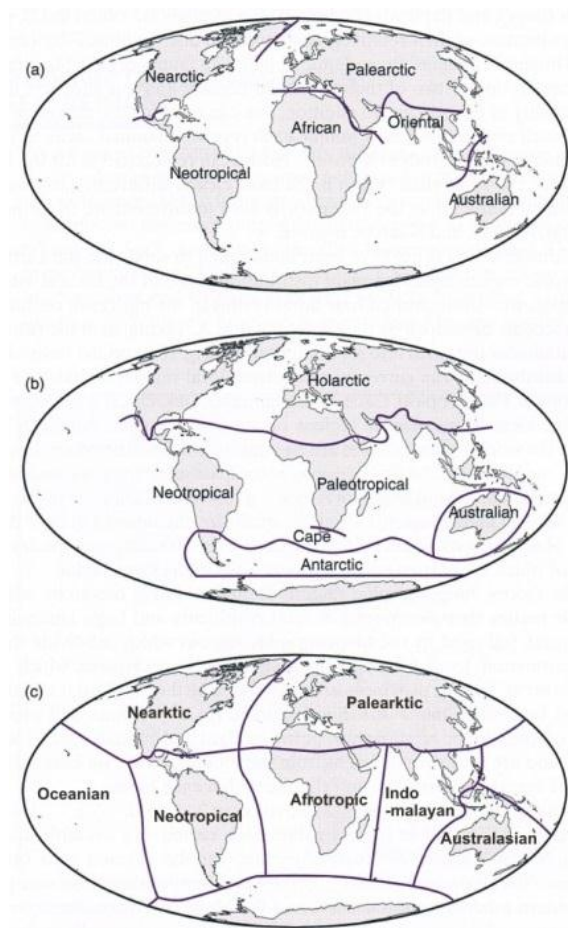
Lichenizované sinice a řasy jsou mikroskopické organismy, které se společně s houbou složkou rozmnožují pomocí malých propagulí (soredia, isidia). Ty nejsou o moc větší než buňka samotná (20-50 $\mu$ m; Budel & Scheidegger 2008) a mohou tak být rozptýleny do velkých vzdáleností (Bailey 1976). Do dnešní doby nebyly sepsány žádné biogeografické studie fotobiontů. Je známo, že některé druhy fotobiontů jsou široce rozšířené (např. *Trebouxia jamesii* sensu lato; Romeike et al. 2002), zatímco jiné byly nalezeny jen v konkrétních areálech, čímž podporují teorii biogeografické distribuce. Podstatnou roli hrají endemické druhy, kde endemismus může být vysvětlen lokální adaptací obou symbiontů (mykobiont, fotobiont), jako je tomu například u lišejníků z Nového Zélandu (Galloway 2007) nebo Antarktidy (Romeike et al. 2002; Øvstedal & Lewis Smith 2001). Při výzkumu biogeografie fotobiontů se vyskytují problémy, které znemožňují jasnou odpověď, zda jsou či nejsou kosmopolitní, či zda vykazují biogeografické znaky. Jedním z těchto problémů je spojování fotobiontů s několika druhy mykobiontů, které je navíc mohou během svého životního cyklu vyměnit za jiné (Kroken & Taylor 2000, Depriest 2004). Dalším problémem je potvrzení výskytu volně žijících populací zelených řas, které také mohou žít v symbiotickém vztahu s lišejníkotvornou houbou – např. rod *Trebouxia* (Tschermak-Woess 1978, Bubrick et al. 1984).

Příkladem fotobionta, který vykazuje geografické rozšíření, je rod *Trentepohlia*. Tento fotobiont se vyskytuje často v subtropických a tropických oblastech (Rundel 1978) a v nízkých nadmořských výškách (Rindi & Lopez 2008). Nash et al. (1987) zjistili, že lišejníky obsahující *Trentepohlii* mají nižší teplotní rezistenci než lišejníky obsahující fotobiont *Trebouxia*. Tímto jevem je odůvodněn výskyt rodu *Trentepohlia* v oblastech s vyššími teplotami.

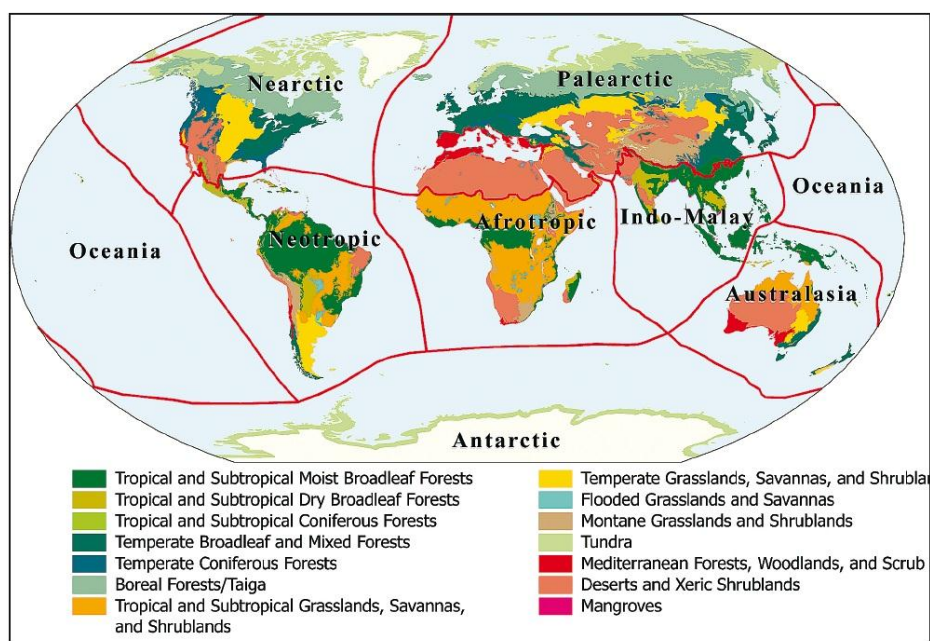
Většina studií zabývajících se biogeografií studovala tuto problematiku na volně žijících organismech. Lišejník je symbiotické (mutualistické) spojení dvou organismů - fotobionta a mykobionta. Mykobiont a fotobiont mají každý své požadavky na životní prostředí, kde se navíc ukazuje, že sinice či řasy projevují své požadavky do značné míry nezávisle na konkrétním mykobiontu. Preference životního prostředí je logický postup pro jejich distribuci, avšak geografický pattern fotobiontů se může výrazně lišit od mykobiotního

partnera (Peksa & Škaloud 2001). Například v případě rodu *Asterochloris* byl druh *A. phycobiontica* izolován pouze v nadmořských výškách nad 950 m n. m. (Škaloud & Peksa 2010). Výskyt odlišných fotobiontů v gradientu nadmořské výšky byl zaznamenán u krustózních epilitických lišejníků (Blaha et al. 2006, Muggia et al. 2008), stejně jako u epifytických keříčkovitých druhů (Krokren & Taylor 2000). Podobné případy jiného výskytu fotobiontů byly zjištěny při výzkumu substrátu (zásaditý x kyselý nebo epifytický x terikolní). Rikkinen et al. (2002) objevil odlišné linie rodu *Nostoc* u lišejníků rostoucích na kůře a na zemi. Zaměříme-li se na větší areály, zjistíme ze studie Škaloud a Peksa (2010), že určité linie rodu *Asterochloris* vykazují převážně kosmopolitní rozšíření - např. linie A7 (Amerika, Evropa, Asie), či *A. glomerata*. Naopak linie A9, která je známa svou nízkou specificitou k mykobiontům, je dodnes známa pouze z celého amerického kontinentu (Cordeiro et al. 2005, Nelsen and Gargas 2006, Piercey-Normore and DePriest 2001, Reis 2005, Yahr et al., 2004). Díky její nízké míře specificity by se očekávalo širší rozšíření i na jiný kontinent. Je ale předčasné tyto fotobionty kvalifikovat jako druhy s úzkou distribucí. Nejvíce studií zabývajícími se fotobionty (*Asterochloris*, *Trebouxia*, *Nostoc*) pochází z Evropy a Severní Ameriky (Bačkor et al. 2010; Blaha et al. 2006; Nelsen & Gargas 2008; Piercey-Normore 2006, 2009; Yahr et al. 2004; Peksa & Škaloud 2011), v menší míře ze Střední a Jižní Ameriky (Helms 2003; Cordeiro et al. 2005), Antarktidy (Romeike et al. 2002; Nyati 2007; Engelen & Ott 2010) a Austrálie (Piercey-Normore & DePriest 2001). Jen velmi málo dat existuje o fotobiontech z Afriky, Asie a Austrálie, proto jsem ve své práci využila sběry z míst, která jsou pro získání cenných informací o biogeografii symbiotických organismů přínosná (např. Tanzanie, Grónsko).

Biogeografické areály pro protistní organismy nikdo doposud nenavrhl, s výjimkou krásivek (Desmidiáles), které ale již spadají do skupiny Streptophyta, zahrnující i vyšší rostliny. Krieger (1939) navrhl 10 krásivkových světových regionů, které doposud nikdo nerevidoval - 1) Temperátní Eurasie, 2) cirkumpolární areál, 3) východní Asie, 4) Indo-Malajsie / severní Austrálie, 5) Nový Zéland / jižní Austrálie, 6) jižní Afrika, 7) rovníková Afrika, 8) severní Afrika, 9) tropické části Ameriky, 10) Amerika vyjma tropických částí. Biogeografické oblasti pro vyšší rostliny (fyto geografické oblasti) byly v minulosti rozděleny do 6 regionů (Obr. č. 5b, Pielou 1979), nyní podle studie Olson et al. (2001) jsou rozděleny přesněji na 8 biogeografických oblastí se 14 biomy (Obr. č. 6).



**Obr. č. 5:** Srovnání biogeografických oblastí podle E. C. Pielou (1979): a) zoogeografické oblasti světa, b) fytozoogeografické oblasti světa, c) biogeografické (fyto- a zoogeografické) oblasti světa.



**Obr. č. 6:** Nové přesnější vymezení fytozoogeografických světových oblastí (podle Olson et al. 2001).

Cílem této práce je rozšířit poznatky o biogeografii fotobiontů rodu *Asterochloris* vyizolovaných ze stélek lišejníků rodu *Cladonia* a *Stereocaulon*, jelikož do současné doby neexistují studie, které by se zabývaly biogeografií symbiotických organismů. V této práci se snažím rozšířit místa sběru a je jen otázkou, zda se potvrdí předešlé výsledky, nebo se v liniích s biogeografickým patternem objeví nová rozšíření (potvrdí se americký či evropský endemismus některých linií?) a zda se zvýší diverzita uvnitř rodu *Asterochloris*.



## 2 Materiál a metody

Pro výzkum biogeografie fotobiontů rodu *Asterochloris* lišejníku rodu *Cladonia* a *Stereocaulon* bylo v průběhu 4 let (od srpna 2007 do prosince 2011) odebráno 121 vzorků ze 14 oblastí (oblast = země) na 5 kontinentech (Obr. č.7). Konkrétně: Grónsko (G) – 23 vzorků/2 lokality; Azorské ostrovy (A) - 1/1; Indie (I, IH) – 23/5; Irsko (IR) – 1/1; Japonsko (JA) - 13/3; Kanárské ostrovy (KO) – 12/9; Korfu (KOR) – 2/1; Mongolsko (M) – 2/1; Patagonie (PA) – 6/6; Švédsko (SV) – 3/2; Tanzanie (T) – 5/3; Rakousko (RA) – 3/2; Rusko – Sibiř (SI) – 1/1; Aljaška (AL) – 22/6 (příloha Tab. 1). U některých byl zjištěn výskyt dvou fotobiontů ve stélce (Tanzanie a Indie). Jsou zde zastoupeny organismy ze severní i jižní polokoule. Lišejníky byly nasbírány v rámci zahraničních cest členů algologické a lichenologické laboratoře. Vzorky z Indie byly získány od Dr. Himanshu Rai (Garhwal Central University, Rishikesh, Indie) v průběhu spolupráce a následném výzkumu fotobiontů indických lišejníků (Photobiont diversity in Indian *Cladonia* lichens, with special emphasis on the geographical patterns, in press, příloha). Vzorky z Tanzanie poskytla Dr. Lucia Muggia (Institut für Pflanzenwissenschaften, Karl-Franzens-Universität Graz, Austria) a spoluprací s Lucií Vančurovou jsem získala sekvence z Aljašky (sběr L. Muggia), Itálie, Rakouska a Sibiře. Sesbíraný materiál byl určen primárně na základě morfologických znaků.

Zaznamenávaly se informace o nadmořské výšce, substrátu a GPS souřadnicích (pokud byly dostupné informace). Dodatečně jsem zjišťovala pomocí GPS souřadnic lokalit na meteorologickém serveru <http://www.wunderground.com> a <http://www.weatherbase.com> nejbližší meteorologické stanice zaznamenávající celoroční (leden 2011 – leden 2012) teploty ( $T_{max}$ ,  $T_{min}$ ,  $T_{prům}$ ) a množství (úhrny) srážek ( $P_{prům}$ ). Teploty byly upraveny podle rozdílu nadmořských výšek stanic a lokalit (= 0,65°C /100 m). Veškeré informace jsou uvedeny v příloze (příloha, Tab. 1).

### 2. 1. Popis odběrových míst

#### **Azorské ostrovy (38° sš, 28° zd)**

Lišejníky byly sebrány na ostrově Pico a Sao Miguel (0 – 1500 m n. m.) v roce 2009. Ostrovy vznikly v důsledku vulkanické a seismické činnosti v pozdním geologickém období třetihor. Podle fytogeografického rozdělení E. C. Pielou (1979) spadají do

Holarktického superregionu, přesněji do Palearktické oblasti. Podle přesnějšího rozdělení Olson et al. (2001) spadají azorské ostrovy do čtvrtého typu biomu – temperátní opadavý a smíšený les.

#### **Grónsko (69° - 70° sš, 51° - 54° zd)**

Vzorky byly sebrány na dvou místech v srpnu 2011 - Ilulissat a ostrov Disco. Všechny lišejníky byly odebrány přímo z půdy, některé obklopovaly mechové porosty. Geologické podloží je kyselé a převládá rula a granit. Nadmořská výška odběrových míst se pohybovala od 100 m n. m. (Ilulissat) do 140 m n. m. (Disko Island). Grónsko spadá do Holarktického superregionu, přesněji Nearktické fyto geografické oblasti (Pielou 1979). Odběrová místa spadají do jedenáctého typu biomu – tundry (Olson et al. 2001).

#### **Indie (11° - 32° sš, 78° - 92° vd)**

Lišejníky, sesbírané v období 2007 – 2010, pocházejí z 5 různých míst na území Indie a Nepálu. Většina stélek pochází z Himaláji ze států Uttarakhand a Himachal Pradesh. Z jižní Indie, přesněji ze státu Tamilnadu, jsou sebrány 3 vzorky. Z východního Nepálu pochází 2 vzorky. Po jednom vzorku jsou sebrány stélky z míst Maharashtra, Madhyapradesh a Assam, které se nacházejí v západní, střední a severovýchodní Indii. Nadmořská výška se pohybuje v rozmezí 1014 – 3700 m n. m. Lišejníky byly sebrány převážně z jílovitého, štěrkovitého substrátu, či z půdy v jehličnatém lese ve třech biogeografických biomech – tropickém a subtropickém mlžném opadavém lese, tropickém a subtropickém opadavém lese a na horských stepích. Indie náleží do Paleotropické oblasti, která je nadskupinou Indo-malajské oblasti (Pielou 1979).

#### **Irsko – Kerry (52° sš, 9° zd)**

Sběr proběhl v roce 2009 v hrabství Kerry, poblíž jezera Lough Leane, kde nižší oblasti tvoří karbonový vápenec. Nadmořská výška – 62 m n. m. Lokalita spadá do Holarktického superregionu, Palearktické oblasti, kde se nachází temperátní opadavý a smíšený les.

#### **Japonsko (35° - 37° sš, 139° vd)**

Lišejníky byly sbírány na třech místech – Mt. Fuji v nadmořské výšce 2300 m n. m., v blízkosti Mt. Fuji v 1010 m n. m., a v Nikko s nadmořskou výškou 666 m n. m. Převládá sběr z kůry a půdy s mechem na vulkanickém podloží. Japonsko leží v Holarktické – Palearktické oblasti. Všechna místa sběrů ležela v temperátní oblasti se smíšeným opadavým lesem.

### **Kanárské ostrovy (28° sš, 17° zd)**

Vzorky lišejníků pocházejí z konce roku 2011 z ostrova La Palma, který je tvořen vulkanickým podložím. Nadmořská výška sběrů se pohybovala mezi 700 – 2400 m n. m. Místa sběru patří do skupiny biomů Mediteránských lesů. Ostrovy spadají do Holartické, Palearktické fytogeografické oblasti.

### **Korfu (39° sš, 20° vd)**

Ostrov se zásaditým vápenatým podložím náleží do biomu Středozemních lesů a Holartické – Palearktické oblasti. Vzorky byly sebrány na jaře 2010 v nadmořské výšce 300 m n. m.

### **Mongolsko (46° sš, 101° vd)**

Lišejníky byly sebrány v červenci 2011 v nadmořské výšce 2620 m n. m. na podkladu lávového pole. Místo sběru spadá do biomu horských stepí. Samotné Mongolsko patří do Holartické-Palearktické oblasti.

### **Patagonie (47° - 54° jš, 73° - 77° zd)**

Vzorky pocházejí z nadmořské výšky 90 m n. m. – 786 m n. m. z přelomu roku 2011/2012. Převažují vzorky sbírané ze dřeva a půdy v oblasti temperátních opadavých a smíšených lesů. Patagonie patří podle Pielou do Antarktické (fytogeografie) a Neotropické (zoo- i fytogeografie) oblasti.

### **Švédsko (58° sš, 12° - 14° vd)**

Lišejníky byly sebrány v národním parku Store Mosse na rašelinovém substrátu v nadmořské výšce 120 – 160 m n. m. Store Mosse leží v biomu boreálních lesů. Švédsko leží v Holartickém superregionu v Palearktické oblasti.

### **Tanzanie (3° jš, 36° zd)**

Odběrová místa byla vytvořena v pleistocénu vulkanickou činností a pocházejí převážně z nejvyšší hory Tanzanie – Mt. Kilimanjaro a z poblíž vzdálené Mt. Little Meru. Místa sběrů se nacházela v nadmořské výšce 3400 – 4400 m n. m. Mt. Kilimanjaro a Mt. Little Meru spadají do biomu tropických a subtropických savan. Tanzanie patří do Paleotropické, nebo také Afrotropické oblasti.

### **Rakousko (46° - 47° sš, 15° - 16° zd)**

Položky lišejníků pochází z Kals an Grossglockner a okolí Štýrských Alp z let 2009 a 2010. Všechny rostly na kyselém substrátu v nadmořské výšce 2450 m n. m. (Kals

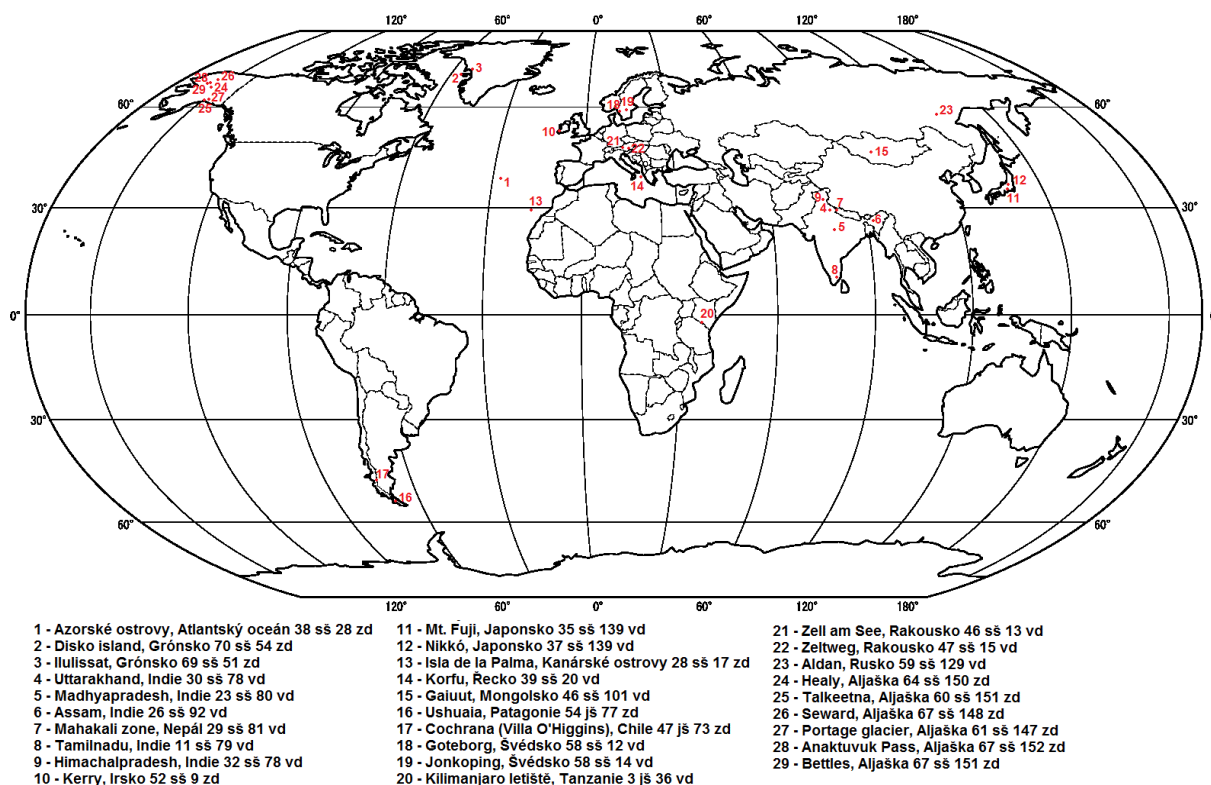
an Grossglockner) a 2100 m n. m. (Štýrské Alpy) v biomu temperátních jehličnatých lesů. Rakousko, stejně jako celá Evropa, spadá do Holarktického seperregionu a Palearktické oblasti.

### Rusko – Sibiř (59° sš, 129° vd)

Vzorek ze Sibiře byl sebrán na dřevě u břehu řeky Timp-ton v srpnu 2010 v nadmořské výšce 300 m n. m. Tato oblast patří do biomu boreálních lesů a tajg. Sibiř také spadá do Holarktického superregionu a Palearktické oblasti.

### USA – Aljaška (60° – 67° sš, 148° - 152° zd)

Lišejníky byly sbírány v srpnu 2010 na 6 místech – Panorama Mountains (650 m n. m.), Talkeetna (400 m n. m.), Kenai Penninsula Lost Lake (650 m n. m.), Kenai Penninsula Moose Pass (650 m n. m.), Finger Mountains (750 m n. m.) a Atigun Pass (1450 m n. m.). Převládá křemičitý substrát. Oblasti se nacházely v biomu tundry a spadají do skupiny Holarktických a Nearktických oblastí.



Obr. č. 7: Vyznačení míst sběrů ve studovaných oblastech.

## 2.2 Molekulární metody

### 2.2.1 Izolace DNA, PCR a sekvenace:

Celková DNA byla získána izolací pomocí kitu Invisorb Spin Plant Minikit (Invitex), kdy jsem postupovala podle modifikovaného protokolu firmy Invitex. Při nízkých výtěžcích jsem použila s menšími úpravami metodu CTAB podle protokolu Doyle & Doyle (1987). Nejprve byly kousky stélky (hlavně podecia) vloženy do sterilních 2ml ependorfech s kulatým dnem se 3wolframkarbidovými kuličkami. Manipulovalo se s pinzetou, která byla při každém kroku opálena nad kahanem. Materiál byl drcen po dobu 5 min v přístroji Retsch MM200 při 13000 rpm. Vyizolovanou DNA jsem uchovávala při 4 °C. Po ukončení veškerých prací je dobré DNA uchovávat v mrazicím boxu.

Koncentrace vyizolované DNA jsem měřila na spektrofotometru NanoDrop 1000. Před polymerase chain reaction (PCR) jsem naředila DNA na pracovních 5ng/μl. Pro amplifikaci ITS jaderné oblasti rDNA jsem použila specifický řasový primer nr SSU -1780-5' (5'-CTG CGG AAG GAT CAT TGA TTC-3'; Piercey-Normore & DePriest, 2001) a univerzální primer ITS4-3' (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'; White et al., 1990). Primery byly vyzkoušeny již při vypracovávání bakalářské práce. PCR byla namíchána v reakčním objemu 20 μl/vzorek: Sterilní MiliQ voda 12,4 μl, MgCl<sub>2</sub> 1,5 μl (25 mM), dNTP 0,4 μl (10 mM), forward primer 0,25 μl (25 nM), reverse primer 0,25 μl (25 nM), Gold<sup>®</sup> 360 Buffer 2 μl, 360 GC Enhancer 2 μl, AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 DNA Polymerase 0,2 μl a 1 μl DNA (5ng/μl). K amplifikaci DNA byla použita polymeráza AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied biosystems) a osvědčený cyklus (viz tab. č. 1). Reakce proběhla v přístroji Touchgene gradient cycler (Techne). Získané PCR produkty jsem zkontrolovala s použitím ethidiumbromidu na 1% agarosovém TBE gelu. Elektroforéza probíhala pod napětím 98V po dobu 15–20 minut. Nakonec jsem získané PCR produkty přečistila pomocí kitu Jet Quick PCR Purification Spin Kit (Genomed). Sekvenaci přečištěných PCR produktů provedla firma Macrogen Inc. (Soul, Korea; Amsterdam, Holandsko) pomocí Applied Biosystems (ABI 3730xl).

Tab. č. 1: PCR cyklus pro amplifikaci ITS rDNA

reakce	teplota	čas
<b>Iniciální denaturace</b>	95 °C	10 min
<b>Denaturace</b>	95 °C	1 min
<b>Annealing</b>	50 °C	1 min
<b>Elongace</b>	72 °C	2 min
<b>Finální elongace</b>	72 °C	10 min
<b>Hold</b>	10 °C	

} 35x

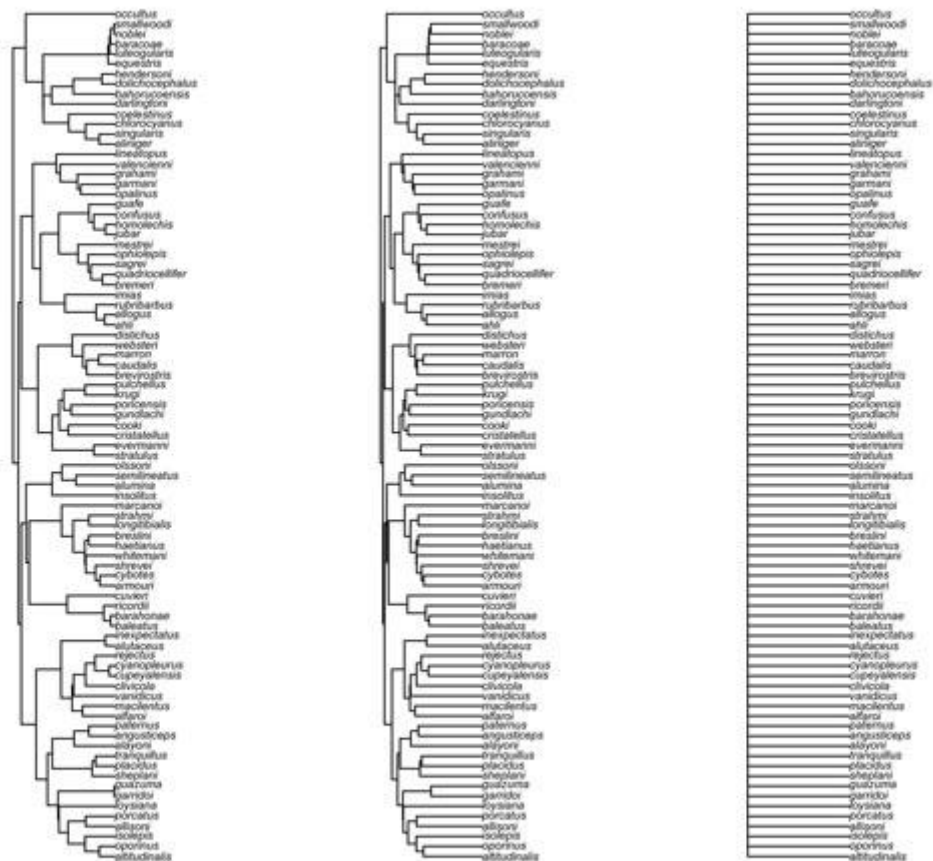
### 2.2.2 Fylogenetické analýzy

Získané sekvence byly manuálně zkontrolovány v programu SeqAssem (Hepperle 2004). Na přípravu aligmentu byly použity jak vlastní sekvence, tak zveřejněné sekvence rodu *Asterochloris* dostupné v internetové databázi GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pro pokrytí veškeré diverzity rodu. Podmínkou pro použití těchto sekvencí byla přítomnost celého ITS úseku (ITS1, 5,8S, ITS2). Podobnost sekvencí byla zkontrolována případně na základě algoritmu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). V programu MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007) byl vytvořen aligment pomocí algoritmu ClustalW (Thompson et al. 1994) a následně manuálně doupřaven. Konečný aligment zahrnoval 229 sekvencí (123 unikátních) s délkou 1093bp, a obsahoval jak ITS (100 %), tak aktinové (24 %) sekvence. Na základě porovnávání modelů v programu PAUP/MrModeltest 2.3 (Nylander 2004) pomocí Akaike information criterion (AIC) byly vybrány vhodné substituční modely. Pro konstrukci stromu byl použit GTR+I+G pro ITS aligment a HKY+I+G pro aktin aligment. V programu MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) byl spočítán nezakořeněný fylogenetický strom z unikátních sekvencí metodou Bayesovy inference (BI). BI strom byl nalezen pomocí Markov Chain Monte Carlo metody (MCMC), kde paralelně běžely 2 MCMC běhy, každý s třemi horkými a jedním studeným řetězcem. Analýza běžela po 3 000 000 generací a každou stou generací byly zaznamenávány stromy. Další parametry byly ponechány na výchozím nastavení. Statistická podpora jednotlivých větví byla spočítána nezávisle metodou maximum likelihood (ML) v programu Garli v0.951 (Zwickel et al. 2006) a dále metodou maximální parsimonie (MP) v programu PAUP (Swofford 2002). ML analýza počítala podle modelu GTR+I+G na základě 100 opakování heuristické analýzy s ukončením po 100 000 generacích.

Podobně byl proveden výpočet MP pro 100 opakování s ukončením po 10 000 generacích. Bootstrapové podpory a posteriorní pravděpodobnosti byly určeny jako žádné (< 50% ML a MP, < 0,5 pro BI), střední (50-90% pro ML a MP, 0,5-0,97 pro BI) a vysoké (>90% pro ML a MP, >0,98 pro BI). Výsledný strom byl upraven v programu MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007) a Fig Tree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### 2.2.3 Analýzy ekologické preference

Data o přírodních podmínkách byla sestavena pomocí dostupných informací (viz výše uvedené internetové meteorologické servery) a zahrnovala informace o teplotě ( $T_{\max}$ ,  $T_{\min}$ ,  $T_{\text{prům}}$ ), srážkách ( $P_{\text{prům}}$ ), nadmořské výšce, substrátu a přiřazení do 3 skupin biogeografických oblastí (viz. kapitola 2). Pro analýzu možné ekologické preference jednotlivých fotobiontů k předem určeným parametrům prostředí jsem použila dva testy, které zjišťují přítomnost fylogenetického signálu v datech (podle Blomberg et al. 2003). Fylogenetický signál je uznáván, pokud blízké příbuzné druhy mají tendenci si být signifikantně ekologicky podobnější. Pokud je fylogenetický signál nízký, nebo dokonce nulový, nejsme schopni odvodit ekologické změny během evoluce. Všechny testy byly provedeny v programu R 2.1.5.0 (<http://www.r-project.org/>, celý skript v příloze). Testování fylogenetického signálu bylo provedeno pomocí Pagel's  $\lambda$  (Pagel 1999), kde proměnný parametr  $\lambda$  postupně eliminuje fylogenetickou strukturu stromu ( $\lambda=0$  - strom bez fylogenetické struktury,  $\lambda=1$  - koresponduje s vytvořeným stromem, Obr. č. 8). Optimalizace hodnot  $\lambda$  bylo dosaženo funkcí „fitDiscrete“ / „fitContinuous“ v Geiger package (Harmon et al. 2008). Pomocí likelihood ratio testu, který testuje existenci fylogenetického signálu, jsem porovnávala negativní logaritmy pravděpodobnosti získané ze stromu s nulovou topologií a ze stromu s původní topologií. Druhá metoda testování fylogenetického signálu navíc testovala signifikaci rozdílu získané  $\lambda$  od  $\lambda = 0$  (lower bound) a od získané  $\lambda$  a  $\lambda = 1$  (upper bound). Na testování byl použit caper package (Harmon et al. 2008).



**Obr. č. 8** : Příklad odbourávání fylogenetického signálu. Vlevo  $\lambda=1$  – originální strom, uprostřed  $\lambda=0,5$  a v pravo  $\lambda=0$  – strom bez fylogenetické struktury. Zdroj: <http://bodegaphylo.wikispot.org/>

## 2.2.4 Haplotypové sítě

Pomocí programu TCS 1.21 jsem vytvořila haplotypové sítě pro jednotlivé linie rodu *Asterochloris*, které zobrazují geografické rozložení v rámci kontinentů. Síť umožňuje zjednodušené zobrazení fylogenetické struktury při velkém počtu sekvencí v podobě koláčových grafů. Velikost koláčového grafu se liší počtem stejných sekvencí. Jednotlivé linie byly doplněny sekvencemi, které jsou dostupné z GenBanku. Podmínka pro vytvoření sítí byla dobrá podpora linií a minimálně šest sekvencí v rámci linie. Výjimku v počtu sekvencí tvořila linie již popsaného druhu rodu *Asterochloris magna*. Program TCS 1.21 zkolabuje sekvence na jednotlivé haplotypy a pomocí tzv. statistické parsimonie vytvoří síť mezi haplotypy (<http://darwin.uvigo.es/software/tcs.html>), které lze dále editovat.



## 3 Výsledky

### 3.1 Molekulární variabilita rodu *Asterochloris*

V rámci diplomové práce jsem pracovala se 149 vyizolovanými vzorky DNA, ze kterých jsem získala 121 sekvencí ze 14 oblastí na 5 kontinentech. Další sekvence byly doplněny z GenBanku pro pokrytí celkové diverzity rodu *Asterochloris* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)). Celkový aligment měl délku 1093 bp a obsahoval 529 polymorfních míst. Ve většině případů se ve stélce lišejníku vyskytoval pouze jeden druh fotobionta. Výjimky tvořily položky IH8 (*Cladonia verticillata*), IH21 (*Cladonia delavayi*) a T16 (*Cladonia* sp.). Všichni fotobionti vyizolovaní ze stélek lišejníku *Cladonia* a *Stereocaulon* náleželi do rodu *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Bayesovskou analýzou, vytvořenou na základě analýzy konkatenovaného datasetu 132 unikátních ITS a aktinových sekvencí, bylo odlišeno 28 různě podpořených linií (Obr. č. 9). To je o osm více, než bylo uveřejněno v poslední studii o indických lišejnících (Řídká et al. in press, viz. příloha). Nově vzniklé linie jsem označila písmenem „b“ a číslem linie, od které jsou odděleny (například 1b = nová linie u *Asterochloris glomerata*). Výjimku tvoří nové linie označené L60, TJ a Talbot 400. Podle studie Peksa & Škaloud (2011) jsou označeny linie A4 a A9. Označení I1, I2 je odvozeno ze studie Řídká et al. (in press). Linie 4 (*A. erici*), 6, 11, 13 (*A. italiana*), 14, I2, A4 a A9 byly signifikantně podpořeny (>0,98 pro BI, >90 % pro ML a MP). Střední bootstrapová podpora byla zaznamenána pro linie 1 (*A. glomerata*), 3 (*A. magna*), I1, 6b, 8, 9, 10, L60 a linie 12. Linie 7, 11b a Talbot 400 mají bootstrapovou podporu větví nízkou. Nově vzniklé linie 1b, 2b, 7b, TJ nebyly podpořeny.

Nově získané sekvence připadly do dvanácti linií. Sekvence T8 a T15 nebyly zařazeny do žádné linie. K linii 1 (*A. glomerata*) připadlo 11 nových sekvencí ze 4 oblastí světa (Japonsko, Švédsko, Patagonie a Indie). K dříve nezařazené sekvenci fotobiontu Talbot 281 (podle Škaloud & Peksa 2010) patří 12 nových sekvencí ze 3 oblastí (Grónsko, Aljaška a Švédsko), z nichž 3 jsou identické s Talbot 281. Tato linie nemá žádnou podporu, tudíž by bylo dobré pro přesnější informaci získat další gen těchto fotobiontů, například aktin. Nejvíce nových sekvencí (35) utvořilo novou linii blízkou příbuznou druhům *A. glomerata* a *A. irregularis*. Jelikož tato linie má bootstrapové hodnoty < 50 %, nelze říci, zda jde o novou linii, nebo zda nově získané sekvence



**Obř. ř. 9:** Fylogenetický strom unikátních sekvencí zkonstruovaný metodou BI. Identické sekvence jsou znázorněné v rámečkích. Bootstrapové hodnoty v pořadí BI/ML/MP. Originální velikost viz. příloha.

fotobiontů pouze rozšiřují variabilitu uvnitř druhu *A. glomerata*. Délka větví u sekvencí M4 a G2 naznačuje rychlejší evoluci v této skupině. Sekvence pocházejí ze 7 oblastí (Aljaška, Grónsko, Sibiř, Galapágy, Mongolsko a Rakousko). Linie 3 (*A. magna*) byla známá pouze ze Severní Ameriky a z Evropy. Nyní do této linie připadla sekvence PA3 z Patagonie (J. Amerika). Linie I1 je složena pouze ze šesti sekvencí fotobiontů vyizolovaných ze stélek indických lišejníků rodu *Cladonia*. Nově vzniklá linie 6b je složena z fotobiontů z Patagonie (PA6) a Austrálie (Hammer 7000). Linie 9 je tvořena největším počtem sekvencí (přesně 36 sekvencí), do které patří 13 nových sekvencí pocházejících pouze z Indie. Linie je známa svou nízkou specificitou k mykobiontům a také tím, že do dnešní doby byly známy záznamy pouze ze Severní a Střední Ameriky (Cordeiro et al. 2005, Nelsen and Gargas 2006, Piercey-Normore and DePriest 2001, Reis 2005, Yahr et al., 2004). Do linie 10, která již obsahuje sekvence z Evropy, Severní a Střední Ameriky, je nyní přidána s dobrou podporou pouze jedna sekvence T21 z Tanzanie. Nově vzniklá linie 11b se skládá pouze z afrických sekvencí fotobiontů T16B a T20, vyizolovaných ze stélek lišejníků rodu *Cladonia* sp. a *Stereocaulon vesuvianum*. Ovšem podpora větví je < 50 %, tudíž nemáme jistotu, zda se poloha těchto sekvencí s přidáním dalších dat v budoucnu nezmění. Dobře podpořená linie L60 vznikla nově a je nejpříbuznější k dříve nezařazené sekvenci Nelsen L60 (Škaloud & Peksa 2010). Obsahuje 13 sekvencí ze dvou oblastí – Kanárských ostrovů a ostrova Korfu. Japonské (JA4) a indické (IH 16) sekvence připadly do původně evropsko – americké linie. Její dobře podpořená sesterská linie 13 (*A. italiana*) nyní obsahuje tři nové sekvence z Patagonie (PA2 a PA4) a Azorských ostrovů (A4). Nově vzniklá větev TJ je stejně jako linie 11b nepodpořena a složena ze dvou sekvencí z Tanzanie (T16A) a Japonska (JA9). Do linie I2 podobně jako do linie I1 spadají pouze sekvence fotobiontů pocházejících z indických lišejníků (I4, IH23 a IH26). Tato linie je podpořena dobrou bootstrapovou hodnotou a je vyizolovaná z jednoho druhu lišejníku – *Cladonia furcata*. Nová linie Talbot 400 vznikla připadnutím 4 nových sekvencí k dříve nezařazené sekvenci Talbot 400 z Aljašky. Nové sekvence pocházejí ze 3 oblastí – Aljašky, Grónska a rakouských Alp (Kals an Grossglockner). Linie 16 je poslední linií, do které spadá šest nově získaných sekvencí fotobiontů pocházejících ze tří oblastí: Indie (IH17, IH18), Japonska (JA10a, JA11, JA14) a Patagonie (PA1). Samotná linie dále obsahuje sekvence z Ameriky a Evropy, tudíž ji můžeme nazývat kosmopolitní.

Rozsah diverzity rodu *Asterochloris* se přidáním nově získaných sekvencí výrazně zvýšil. Není ale zatím jisté, zda se fylogenetická pozice nepodpořených linií nezmění s přidáním dalších dat.

### 3.2 Geografické rozšíření rodu *Asterochloris*

V programu TCS jsem vytvořila haplotypové sítě pro jednotlivé linie rodu *Asterochloris*, které jsem následně spojila s již vytvořeným fylogenetickým stromem (Obr. č. 10). Pro snadnější zobrazení geografického rozložení v rámci kontinentů bylo vytvořeno 13 separátních haplotypových sítí. Haplotypy pocházející z odlišných kontinentů jsou znázorněny výsečovými grafy, kde velikost grafu souvisí s počtem shodných haplotypů. Nevytvářela jsem haplotypové sítě pro nepodpořené linie, nebo linie, které obsahovaly méně než šest sekvencí. Malý počet sekvencí může způsobit zkreslování biogeografického patternu způsobený náhodnými procesy. *Asterochloris magna* tvoří výjimku - počtem sekvencí sice nevyhovuje mnou určený limit, avšak jeho geografické rozšíření mi přišlo zajímavé a navíc obsahuje nově získanou sekvenci PA3 z Patagonie. Stejně také *Asterochloris erici*, který nesplňuje limit počtu sekvencí, jeho rozšíření v rámci severoamerického kontinentu je zajímavé v jeho rozdělení haplotypů na haplotypy pocházející z USA a haplotyp z Kanady.

Haplotypová síť pro linii *A. glomerata* byla vytvořena ze 78 sekvencí a tvořila tak největší síť. Byli zde zastoupeni z 58 % fotobionti z amerických lišejníků, 28 % pocházelo z Evropy, 10 % z Asie a 4 % z Jižní Ameriky. Oblasti, ze kterých lišejníky pocházejí, se pohybují z velké části na úrovni boreálních a temperátních opadavých a smíšených lesů. Výjimkou je indický fotobiont pocházející z oblasti tropických a subtropických opadavých lesů. Zástupci *A. glomerata* mohou být považováni za fotobionty s širokým světovým rozšířením. *Asterochloris irregularis* je linie evropsko – severoamerická (boreální a temperátní oblasti) se zastoupením 52 % a 48 %. *Asterochloris magna* tvoří v rámci zkonstruovaných haplotypových sítí výjimku, jelikož alignment byl tvořen pouze čtyřmi sekvencemi. Dříve byla tato linie považována za geograficky omezenou na Severní Ameriku (temperátní jehličnatý les), avšak její další rozšíření na evropský kontinent objevili Peksa & Škaloud (2011) v Nízkých Tatrách na Slovensku (temperátní jehličnatý les). V této práci jsem objevila její další rozšíření na jihoamerický kontinent, přesněji na území Patagonie (temperátní jehličnatý les). *Asterochloris magna* patří svou četností výskytu mezi vzácné druhy, můžeme ale říci, že jeho rozšíření je kosmopolitní. Linie fotobiontů *A. erici* je další síť vytvořená z méně než šesti sekvencí, obsahuje 4 sekvence, které jsou ale zajímavé tím, že sekvence z USA (Whitinsville) jsou odlišené od sekvence pocházející z Kanady. Celkově je linie stoprocentně geograficky omezená na severoamerický kontinent, kde se nachází v temperátním a boreálním pásu lesů. Linie II obsahuje stoprocentní zastoupení fotobiontů

z indických lišejníků (z většiny výskyt v tropických a subtropických mlžných opadavých lesích, jeden výskyt na horských stepích). Linie 6, stejně jako její sesterská linie 7 z temperátních oblastí smíšených a opadavých lesů, má geografické rozšíření omezené na Evropu a Severní Ameriku. Linie 9 tvoří druhou nejpočetnější linii rodu *Asterochloris* (40 sekvencí). Jak již bylo řečeno v minulé kapitole, je známo, že tuto linii tvoří fotobionti s nízkou specificitou k mykobiontům – generalisti. Bylo ale zarážející, že nebyli nalezeni jinde než v Severní a Střední Americe. Do této linie připadlo 13 nových sekvencí z Indie, tudíž můžeme vyvrátit její označení za linii pouze americkou. Linie 10 obsahuje fotobionty s euryekním rozšířením, tedy s velmi širokou ekologií od tropických deštných pralesů ve Střední Americe, přes biotopy tropických a subtropických stepí a savan k temperátním oblastem v Evropě. Vysoce podpořená linie 11 patří mezi početné linie (30 sekvencí) kosmopolitně rozšířených na severní polokouli s poměrem rozšíření 10 % Evropa, 76 % Severní Amerika a 14 % Asie (Čína). Nově vzniklá dobře podpořená linie L60 je geograficky omezena pouze na středozevní biotop obsahující pouze sekvence z Kanárských ostrovů (85 %) a Korfu (15 %). Linie 12 je kosmopolitní linie rozšířená přes několik klimatických pásů na severní polokouli se zastoupením 62,5 % Evropa, 25 % Severní Amerika a 12,5 % Asie (Japonsko). Linie *Asterochloris italiana* představuje široce rozšířenou linii na severní a jižní polokouli, přes Mediterán k temperátní oblasti smíšených opadavých lesů. *Asterochloris phycobiontica* je linie rozšířená na severní polokouli na území temperátního a boreálního pásu lesů. Všechny oblasti mají kyselé podloží (granit a rula). Poslední síť vytvořená pro linii 16 obsahuje 35 sekvencí z jižní i severní polokoule. Linii můžeme řadit mezi kosmopolitní s širokým biogeografickým areálem (45 % Evropa, 37 % Severní Amerika, 15 % Asie a 4 % Jižní Amerika).

### 3.3 Vliv přírodních podmínek na rozšíření fotobiontů rodu *Asterochloris*

Statistické testování vlivu abiotických faktorů na rozšíření linií rodu *Asterochloris* jsem prováděla pro každou vlastnost, tedy pro: teplotu ( $T_{\max}$ ,  $T_{\min}$ ,  $T_{\text{prům}}$ ), průměrné roční srážky, nadmořskou výšku, substrát a tři typy rozdělení do biogeografických oblastí. Porovnáváním fylogenetického signálu u více znaků lze dobře vyvodit, který z nich je evolučně stabilnější. Hodnoty  $\lambda$  se mohou pohybovat od 0 (bez vlivu fylogeneze) až k 1 (silný vliv fylogeneze).



Fylogenetický signál pro všechny faktory prostředí byl signifikantní (Tab. č. 2). Hodnota  $\lambda = 1$  však nikdy nevyšla nesignifikantně, což znamená, že žádná z testovaných mohou ovlivňovat kombinace faktorů v různých mírách působení. Avšak síla signálu je viditelná v hodnotě  $\lambda$ . Důležitými faktory ovlivňující rozšíření linií jsou typ substrátu, fyto-/zoogeografické rozdělení oblastí podle Pielou (1979) a geografické rozdělení do čtrnácti biomů podle Olson et al. (2001). Tyto faktory mají hodnoty obou Pagel's  $\lambda$  nejbližší k 1. Maximální a průměrná teplota stejně jako průměrné roční srážky a rozdělení fytoogeografických oblastí (Pielou 1979) mají velikost lambdy blízké k hodnotě 1 v jednom ze dvou testů. Tyto hodnoty beru na vědomí, jelikož souvisejí například s charakteristikou jednotlivých biomů.

Tab. č. 2: Testování fylogenetického signálu metodami Pagel's  $\lambda$ .

faktor	Pagel's $\lambda$ (geiger)	Likelihood ratio	p hodnota	Pagel's $\lambda$ (carper)	p $\lambda = 0$	p $\lambda = 1$
<b>T<sub>max</sub></b>	0,82	1,11	<0,0001	<b>0,93</b>	<0,0001	<0,0001
<b>T<sub>min</sub></b>	0,83	1,15	<0,0001	0,80	0,003	<0,0001
<b>T<sub>prum</sub></b>	0,79	1,18	<0,0001	<b>0,90</b>	<0,0001	<0,0001
<b>P<sub>prům</sub></b>	<b>0,94</b>	1,02	<0,0001	0,62	0,0002	<0,0001
<b>Nadm. výška</b>	0,79	1,03	<0,0001	0,67	<0,0001	<0,0001
<b>Substrát</b>	<b>0,96</b>	1,41	<0,0001	<b>0,93</b>	<0,0001	<0,0001
<b>Areál 1</b>	<b>0,94</b>	1,89	<0,0001	0,78	<0,0001	<0,0001
<b>Areál 2</b>	<b>0,95</b>	1,78	<0,0001	<b>0,86</b>	<0,0001	<0,0001
<b>Areál 3</b>	<b>0,89</b>	1,52	<0,0001	<b>0,85</b>	<0,0001	<0,0001

## 4 Diskuze

### 4.1 Diverzita rodu *Asterochloris*

Rod *Asterochloris* je jedna z nejčastějších zelených řas lišejníků v rámci třídy Ascomycetes (Peršoh et al. 2004). Jeho taxonomické zařazení prošlo řadou změn již od 20. let 20. století. V 90. letech 20. století vzrostlo množství výzkumů zabývajících se fylogenetickými analýzami založenými na specifických molekulárních markerech, což vedlo ke zjištění, že tradiční morfologické pojetí je zastaralé a že nejlepší možností je kombinace morfologických, molekulárních, ultrastrukturních, ekologických a biochemických znaků pro přesné určení vztahů mezi taxony zelených řas, či pro odhalení skutečné diverzity jednotlivých rodů (Pröshold et al 2001; Huss et al. 1999). Ke stejným objevům došlo i u skupiny rozsivek (Bacillariophyta), kde byla odhalena jejich velká skrytá diverzita (např. Benkhe et al. 2004).

Rod *Asterochloris* byl na základě ultrastrukturálních a molekulárních znaků vyčleněn z rodu *Trebouxia* (Helms 2001; Piercey-Normore & DePriest 2001; Škaloud & Pekska 2010). Nejnovější výsledky ukazují na jeho velkou diverzitu uvnitř rodu (Škaloud & Pekska 2010). Do dnešní doby je známo 16 dobře podpořených linií, z nichž 7 je již určených do druhů. Rod ale stále obsahuje mnoho dalších nepopsaných linií. Tuto skutečnost podporují i mnou získané výsledky (nárůst o 8 nových nepopsaných linií). Pro získání představy o diverzitě uvnitř rodu jsem použila alignment kombinující ITS a aktin markery. Tato kombinace byla použita pouze ve studiích Nelsen & Gargas (2006, 2008) a Škaloud & Pekska (2010). Kombinace markeru ITS a aktinu je pro vyjasnění fylogenetické pozice nově vzniklých linií přesnější, jelikož počet variabilních a parsimoně informativních míst v úseku genu pro aktin je ve srovnání s ITS mnohonásobně vyšší. Alignment pro tvorbu výsledného stromu v této práci obsahoval 229 sekvencí, z nichž 123 bylo unikátních s délkou 1093bp, kde ITS úsek byl ve 100 % zastoupen u všech sekvencí a sekvence s úsekem aktinu byly zastoupeny ve 24 %. Výsledný strom obsahuje 28 různě podpořených linií, což je o osm linií víc než bylo získáno v poslední studii o indických lišejnících (Řídká et al. in press), a o 12 linií víc než ve studii Škaloud & Pekska (2010). Nově získané sekvence připadly do dvanácti linií.



Celková diverzita byla obohacena o sekvence z míst, které se v GenBanku doposud neobjevily: z Azorských ostrovů, Kanárských ostrovů, Korfu, Indie, Tanzanie, Mongolska, Irska, Ruska – Sibíře, Grónska a Patagonie.

Jedním s cílů této práce bylo pozorovat, zda se s přibývajícím daty změni velikost diverzity uvnitř rodu (Piercey-Normore & DePriest 2001; Škaloud & Pekska 2008, 2010). Ze 121 nově získaných sekvencí připadlo do dříve popsáných druhů rodu *Asterochloris* pouhých 15 (*A. glomerata*, *A. magna* a *A. italiana*). Je zajímavé, že od poslední studie zabývající se fotobionty indických lišejníků (Řídká et al. in press) se nezměnily linie I1, I2 a linie 9. Celkem vznikly čtyři nové linie (bez připojení k již stávajícím dříve nezařazeným sekvencím), z nichž pouze jedna (L60) měla střední bootstrapovou podporu – 1/87/84. Největší nově vzniklou linií je linie s pracovním názvem 2b obsahující 35 sekvencí. Pozice linie není objasněná, takže se naskýtá otázka, zda se v budoucnu neukáže, že pouze rozšiřuje variabilitu uvnitř rodu *A. glomerata*. Součástí této linie je viditelně prodloužená dobře podpořená větev sekvencí M4 a G2, což naznačuje zrychlenou evoluci v rámci skupiny.

V práci se potvrdila specifita rodu *Asterochloris* k mykobiontům ze třídy Cladoniaceae a Stereocaulaceae (Rambold et al. 1998). To samé tvrzení ovšem nejde aplikovat na úroveň druhů (Piercey-Normore 2009), jelikož většina linií vykazovala nízkou specifitu k mykobiontům. Nejvíce fotobiontů bylo součástí stélek lišejníků rodů *Cladonia*, *Stereocaulon* a *Lepraria*. Jednotlivé linie byly v některých případech specifické pro určitý rod mykobionta. Například linie I1, 6b, 8, 12, TJ a I2 se vyskytují v lišejníku rodu *Cladonia*. Rod *Lepraria* je specifický pro linie 6, 7, 11, 14, A4 a A9 (Obr. č. 9). Je zajímavé, že tento rod se nevyskytoval v horní části fylogenetického stromu, tedy například u *A. glomerata*, který je velmi málo specifický (objevuje se u více než 20 druhů mykobiontů). Ve studii Škaloud & Pekska (2010) se rod *Lepraria* nevyskytoval v cladu I, což odpovídá umístění linie *A. glomerata*. Linie I2 je jediným příkladem vysoké specifity k druhu *Cladonia furcata*.

Rozsah diverzity rodu *Asterochloris* se tedy přidáním nově získaných sekvencí z lokalit, které dosud v oblasti fotobiontů nebyly prozkoumány, výrazně zvýšil. Tento objev potvrzuje fakt, že morfologické určení již nestačí na odhalení diverzity a že například tropické a subtropické oblasti nám stále ještě neodhalily skutečnou diverzitu (Neustupa et al. 2007; Neustupa & Škaloud 2008; Eliáš et al. 2008). Lze tedy očekávat, že míra diverzity uvnitř rodu *Asterochloris* bude nadále růst. Nově vzniklé nepodpořené linie nemají do budoucna jasné fylogenetické postavení a je možné, že se jejich pozice ještě změní.

V minulosti byla odhalena skrytá diverzita i u dalších fotobiontů lišejníků rodu *Trebouxia* (Kroken & Taylor 2000), *Coccomyxa* (Friedl et al. 2007) a *Dyctiochloropsis* (Škaloud et al. 2007). Cílem této práce nebylo druhově vymezit rod *Asterochloris*, takže nové linie jsou pojmenovány pouze pracovními názvy pro lepší orientaci jak z hlediska fylogenetického stromu a diverzity, tak následného biogeografického rozdělení linií. Do budoucna se počítá se získáním dalšího markeru – přesněji, ráda bych získala u svých sekvencí i gen pro aktin pro upřesnění pozic větví a jejich lepší bootstrapovou podporu, jelikož nižší podpory linií, které byly silně podpořeny ve fylogenetickém stromě Škaloud & Peksa (2010), jsou pravděpodobně způsobeny například připadnutím nových sekvencí obsahující pouze úsek ITS.

#### **4.2 Biogeografie rodu *Asterochloris***

Hlavním cílem této práce bylo pokusit se rozšířit poznatky o biogeografii fotobiontů rodu *Asterochloris* vyizolovaných ze stélek lišejníku rodu *Cladonia* a *Stereocaulon*. Během posledních dvaceti let se rozrostl počet studií zabývajících se řešením otázky rozšíření volně žijících protistních organismů, kde jejich výhodou oproti makroorganismům je jejich malá velikost a velká početnost populací (Finlay 2002; Fenchel & Finlay 2003; Finlay & Fenchel 2004; Foissner 1999 atd.). Tato práce se ovšem zabývá symbiotickým organismem, který projevuje do určité míry své požadavky na životní prostředí nezávisle na konkrétním mykobiontu (podrobněji v kapitole 1.1.5). Pravidlo o velikosti protistního organismu (Finlay & Fenchel 2004) pro kosmopolitní rozšíření lichenizovaná sinice či řasa splňuje. Soredia/isidia nejsou o moc větší než buňka samotná (20-50  $\mu\text{m}$ , Büdel & Scheidegger 2008) a mohou být rozptýleny do velkých vzdáleností (Bailey 1976), čímž by se dalo předpokládat, že i rod *Asterochloris* bude vykazovat kosmopolitní rozšíření.

Devět linií obsahuje fotobionty s širokou distribucí (Obr. č. 10). Jednou z nejvíce rozšířených linií je *Asterochloris glomerata* (linie 1) jejíž fotobionti se vyskytují na čtyřech kontinentech a jsou známi svou nízkou specifitou k mykobiontům lišejníků (z rodů *Cladia*, *Cladonia*, *Stereocaulon*, *Pycnothelia*, *Diploschistes*, *Herteledea*) rostoucích na různých typech substrátů (Škaloud & Peksa 2010). Podobný charakter rozšíření má i linie 16. *Asterochloris italiana* je taktéž linie s bipolárním rozšířením, avšak od předchozích linií se liší absencí fotobiontů na severoamerickém kontinentu. Je taktéž jedinou linií, ve které se nachází fotobionti z Austrálie, to však může být způsobeno malou měrou výzkumu na tomto kontinentu (Piercey-Normore & DePriest 2001). Nyní kosmopolitně rozšířená Linie 10 byla

považována za evropsko-americkou linii (Nelsen & Gargas 2008; Peksa & Škaloud 2011) s výskytem v nižších nadmořských výškách. Toto tvrzení nemůžu potvrdit, jelikož fotobiont T21 pocházející z Tánzanie (Kilimanjaro) byl odebrán v nadmořské výšce 4400 m n. m (podrobnější popis v kapitole 4.3). Linie 11 a 12 obsahují fotobionty s širokým rozšířením, které je prozatím omezeno pouze na severní polokouli. *Asterochloris magna* je taktéž široce rozšířen, avšak v minulosti bylo jeho rozšíření omezené pouze na Severní Ameriku (Nelsen & Gargas 2008; Škaloud & Peksa 2010), kde byl nalezen v lišejníku *Pilophorus aciculare*. Později byl objeven na evropském kontinentu ve slovenských Nízkých Tatrách v lišejníku *Lepraria borealis* (Peksa & Škaloud 2011). V této práci jsem objevila třetí místo výskytu v Tanzánii v lišejníku *Cladonia* sp. Z těchto objevů vyplývá, že *A. magna* patří svou četností výskytu mezi vzácné druhy fotobiontů. Linie 9 nám svým výjimečným kosmopolitním rozšířením skýtá řadu otázek. Tato linie byla známa svým rozšířením pouze v Severní, Střední a Jižní Americe (Cordeiro et al. 2005, Nelsen & Gargas 2006; Yahr et al. 2004; Piercey-Normore & DePriest 2001 a další) a taktéž velmi nízkou specifitou k lišejníkům rostoucím na více typech substrátů. Ve studii Řídká et al. (in press) bylo zjištěno, že mnoho indických fotobiontů spadá právě do této linie. Absence linie 9 v Evropě je pravděpodobně daná její preferencí k tropickým a teplým temperátním oblastem (podrobněji v kapitole 4.3.2, Obr. č. 13), které se v Evropě nalézají pouze v oblasti Středomoří. Bohužel tato oblast je ve vztahu k fotobiontům velmi málo prozkoumaná (Řídká et al. in press). U nově vzniklých linií (nebyly vytvořeny sítě, viz kapitola 3.2) bych zdůraznila kosmopolitní bipolární rozšíření linie 2b, která je blízká k *A. glomerata* a jejíž substrátová specifita i nízká specifita k mykobiontům lišejníků odpovídá charakteristice linie *A. glomerata*.

Fotobionti s širokým (eurychorním) rozšířením se často vyskytují ve stélkách pionýrských lišejníků, což není překvapivé díky jejich širokému ekologickému rozsahu (Peksa 2011).

Podle výsledků této práce je pouze pět linií striktně geograficky vymezených, z čehož linie *A. erici* je tvořena pouze čtyřmi sekvencemi (což může zkreslovat výsledek geografického rozšíření), a nově vzniklá linie 11b má malou podporu větví. Linie I1 a I2 tvoří fotobionti pocházející pouze z Indie. Nově vzniklá linie L60 byla nalezena pouze na Kanárských ostrovech a ostrově Korfu (oblast Středozemního moře). Podle Foissnera (2006) může být omezená distribuce protistních druhů způsobena historickým, biologickým, klimatickým, nebo stanovištním faktorem. Biogeografie fotobiontů těchto linií nemůže být ovlivněna omezeným výskytem jejich mykobiontních partnerů, jelikož tyto druhy jsou

lišejníky s velmi širokou kosmopolitní distribucí (Smith et al. 2009). Navíc tyto druhy se rozmnožují převážně pomocí propagulí, které obsahují oba symbionty. Tudíž tvrzení o historickém či biologickém omezení můžeme zamítnout. Více pravděpodobné je jejich rozšíření podle specifických požadavků na klimatické a jiné abiotické prvky dané lokality, což potvrzují studie zkoumající vlastnosti mykobionta ve smyslu jeho schopnosti chránit fotobionta před zvýšeným množstvím UV záření a regulovat vodní režim v rámci stélky (Honegger 2006, 2009), a dále před přímým vlivem pH substrátu (Mollenhauer 1997). Nicméně potenciál mykobiontů chránit fotobionty je limitován, jelikož lišejník je poikilohydrický organismus závislý na místních klimatických podmínkách (Peksa & Škaloud 2011). Navíc ekologie řas má svojí vlastní historii, která předchází historii lichenizace. Zjišťování biogeografického rozšíření fotobiontů ztěžuje fakt, že každý druh fotobionta se liší ve svém optimu fotosyntetické aktivity (Paoli et al. 2010), takže v některých případech není schopen žít celý organismus efektivně. Proto si mykobiot hledá lépe adaptovaného fotobionta, což následně vede k výměně za fotobionta s vyšším fitness. Tento jev je potvrzený jak u pohlavně, tak u nepohlavně se rozmnožujících lišejníků (Bláha et al. 2006; Muggia et al. 2008; Nelsen a Gargas 2008; Romeike et al. 2002; Yahr et al. 2006). Spojování fotobiontů s několika druhy mykobiontů, kteří je navíc mohou během svého životního cyklu vyměnit za jiné (Kroken a Taylor 2000; DePriest 2004), způsobuje problémy, které znemožňují jasnou odpověď na otázku biogeografie fotobiontů.

Ve srovnání s ostatními rody fotobiontů je rod *Asterochloris* kosmopolitní, stejně jako druh *Trebouxia jamesii* a některé druhy rodu *Nostoc*. Nicméně jiné druhy jsou známé pouze z konkrétních regionů (Nový Zéland, Antarktida), kde existence endemických lišejníků je vysvětlena lokální adaptací jak mykobiontů, tak fotobiontů (Galloway 2007; Romeike et al. 2002; Øvstedal & Lewis Smith 2001). Symbionti z jiných než lišejníkových společenství, například rod *Symbiodinium* žijící v korálech nebo rod *Chlorella* sp. z ciliárního organismu *Paramecium*, jsou oproti rodu *Asterochloris* či *Trebouxia* více geograficky vymezeny. Rod *Chlorella* sp. má do dnešní doby rozdělené linie na americkou (kosmopolitní) a evropskou linii s geografickým vymezením (Hoshina & Nobutaka 2009; Obr. č. 11). U rodu *Symbiodinium* se ukázal silný vliv zonace podle teploty a dostupnosti světla v mořích (Baker 2003).

Pokud porovnáám biogeografii volně žijících organismů s organismy symbiotickými, došla jsem k závěru, že u těchto dvou skupin je pattern rozšíření totožný. Příkladem volně žijících kosmopolitně rozšířených protistních organismů je rozsivka rodu *Pseudonitzschia*,

která stejně jako rod *Asterochloris* vykazuje u některých druhů geografické vymezení (Casteleyn et al 2008). Dalším kosmopolitním organismem je zelená řasa rodu *Klebsormidium* obsahující převážně kosmopolitně rozšířené linie (Broady 1996).



**Obr. č. 11:** Geografické vymezení evropské a americké linie symbiotického organismu *Chlorella* sp. v ciliátním organismu *Paramecium* (z Hoshina & Nobutaka 2009).

Naopak zelená terestrická řasa rodu *Trentepohlia* je geograficky vymezena na areál tropických a subtropických oblastí (Rindi et al 2008a).

#### 4.3 Ekologické faktory ovlivňující druhové složení linií rodu *Asterochloris*

Ekologické preference fotobiontů nebyly doposud velkou měrou zkoumány (např. Peksa & Škaloud 2011). Fyziologické odpovědi na abiotické faktory (teplota, dostupnost vody, světla, pH substrátu) se mohou mezi jednotlivými fotobionty lišit (Casano et al. 2011). Nevhodné světelné nebo klimatické podmínky způsobují nízkou fitness fotobionta, což může vést až k úplnému vymizení z tohoto habitatu. Přesně tento případ řešila studie Yahr et al. (2006), kde absence lišejníku *Cladonia subsetacea* byla vysvětlena chybějícími fotobionty cladu I (*A. glomerata* a *A. irregularis*). Ovlivnění přírodními podmínkami bylo prokázáno i u rodu *Symbiodinium*, který je v symbiotickém vztahu s druhy mořských korálů. Sampayo et al. (2007) našel dva druhy korálů, které hostí více druhů *Symbiodinium*, jelikož rod *Symbiodinium* je citlivý na velikost ozáření a teplotu vody. Z mých výsledků je patrné, že

rozšíření linií rodu *Asterochloris* je nejvíce ovlivněno typem substrátu (Obr. č. 12), geografickým rozdělením světa do čtrnácti biomů (Obr. č. 13) a fyto-/zoogeografickým rozdělením oblastí (Obr. č. 14).

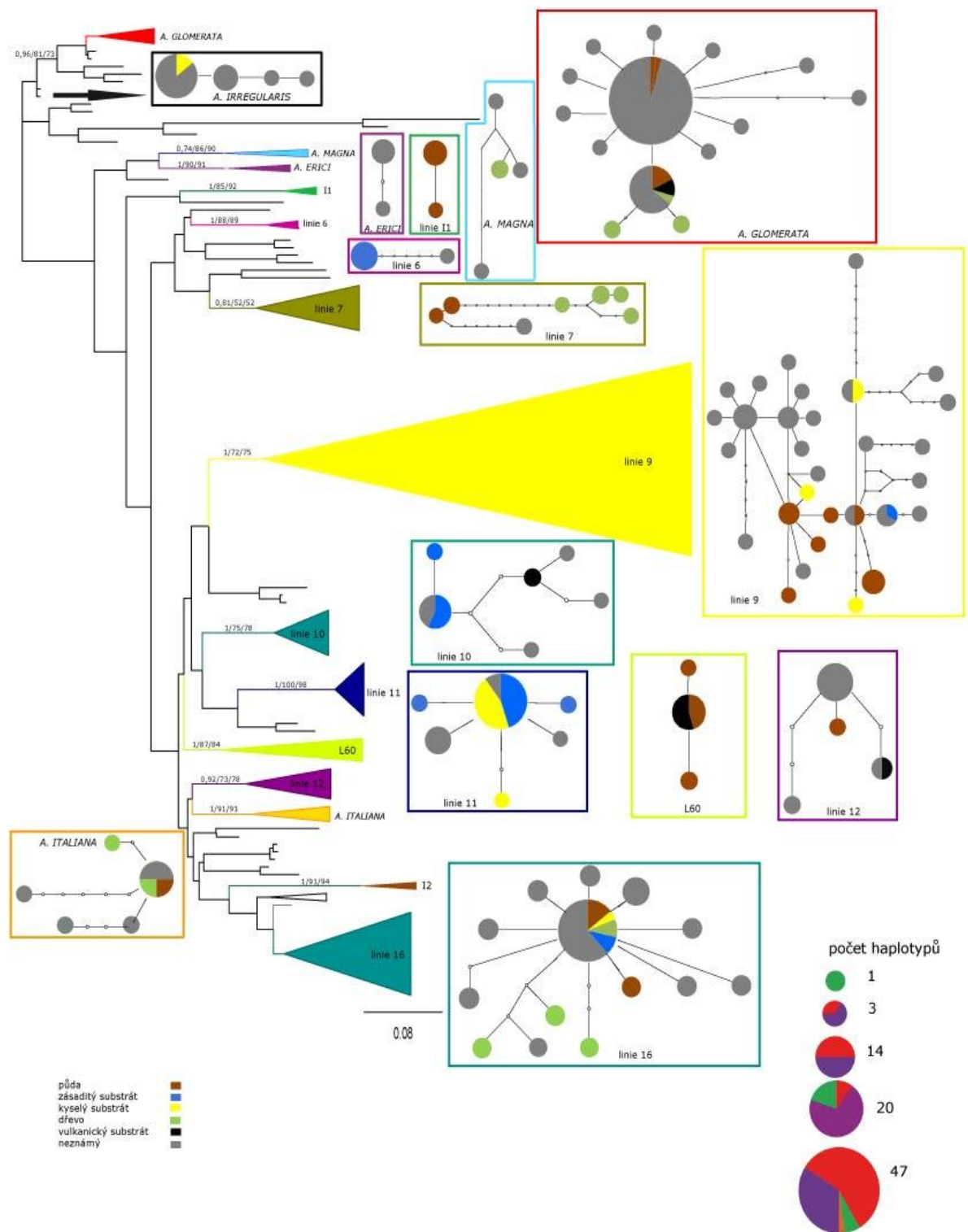
#### 4.3.1 Substrátová specifita

Testováním fylogenetického signálu jsem zjistila signifikantní vliv substrátu na rozšíření jednotlivých linií rodu *Asterochloris*. Tento závěr koresponduje se zjištěním Helms (2003), kde fylogeneze rodu *Trebouxia* byla více ovlivněna typem substrátu než fylogeneze mykobiontu. V jeho studii se linie rodu *Trebouxia* rozdělily na zásadomilné a kyselomilné. Navíc další linie byly rozděleny podle místa růstu na epilitické a epifytické.

Substrátově specifické mohou nazvat v této studii fotobionty linie I1 a I2, kteří se nalézali zásadně v lišejnících rostoucích na zemi. Linie 6 preferuje zásadité substráty (Obr. č. 12). Linie *A. italiana*, stejně jako linie 7, upřednostňuje dva typy substrátů – dřevo a půdu. Preference půdy a vulkanického substrátu se ukázala v linii L60 a v linii 12. Fotobionti linie 10 byli nalezeni na zásaditém a vulkanickém substrátu. *A. glomerata* potvrdila svoje euryekní postavení, stejně jako linie 16 a 9. Fotobionti linie 11 žijí ve velkém rozsahu pH od kyselého až po zásadité, což pro ně představuje adaptivní výhody, například na substrátech s vysokou koncentrací mědi. V minulosti byl rod *Asterochloris* testován právě na substrátech se zvýšenou koncentrací mědi. Výsledek neodhalil rozdíl ve druhovém složení fotobiontů ve stélkách s vysokou a nízkou koncentrací tohoto toxického kovu (Bačkor et al. 2010). Naopak laboratorním testováním fotobiontu *A. erici* při vysoké koncentraci mědi se prokázala degradace chlorofylu (Bačkor & Váczi 2002). Stélka lišejníku tedy do určité míry chrání sekundárními metabolity symbiotické organismy (Mollenhauer 1997). Pro prokázání vlivu ekologických parametrů by bylo vhodné tyto podmínky (např. pH substrátu) laboratorně testovat na vybraných liniích.

#### 4.3.2 Geografické rozdělení linií fotobiontů

Biogeografické areály nebyly doposud pro protistní organismy navrženy (s výjimkou Desmidiáles). Většina studií se zabývala rozšířením fotobiontů na gradientu nadmořské výšky u krustózních lišejníků (Blaha et al. 2006; Muggia et al. 2008) či lišejníků s keříčkovitou stélkou (Kroken & Talyor 2000). Výsledky nepotvrdily, že by nadmořská výška měla

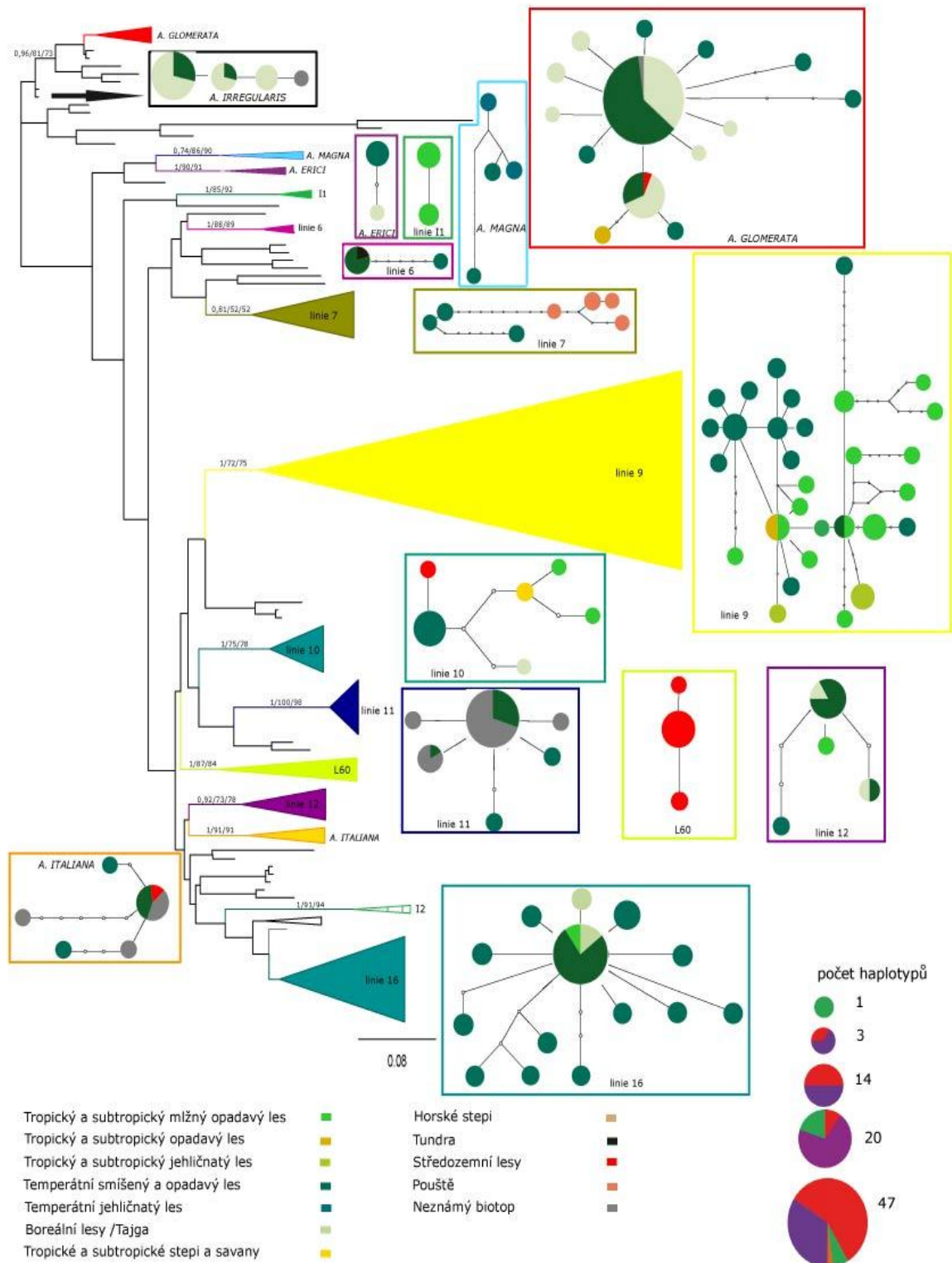


Obr. č. 12: Substrátová specifita jednotlivých linií rodu *Asterochloris*.

signifikantní vliv na rozšíření linií rodu *Asterochloris*. Na testování geografického rozdělení jsem tedy použila rozdělení pro vyšší cévnaté rostliny na 8 oblastí a 14 biotopů (Obr. č. 12 a 13). Nejvíce fotobiontů pochází z temperátních a boreálních oblastí. To je pravděpodobně způsobeno velkou měrou absencí studií zabývajících se tropickými a subtropickými oblastmi – Afrika, Asie, Austrálie. Nalezla jsem pouze dvě linie, které se vyskytují v jediném biotopu – I1 a L60. Linie I1 je sama o sobě skupina fotobiontů specifická na substrát, typ biomu (tropický a subtropický mlžný les) a navíc zástupci této linie se vyskytovali v lišejnících z vysokých nadmořských výšek (2300–3700 m n. m.) (Řídká et al. in press). Oproti tomu druhá indická linie je složena z fotobiontů, které obývají tři různé biotopy – tropický a subtropický mlžný/suchý les a oblast horských stepí, kde se nadmořská výška pohybuje v rozmezí 2607 – 3250 m n. m. Linie L60 obsahuje fotobionty specifické pouze na biotop středozezemních lesů. Skupinami fotobiontů, kteří se vyskytují pouze na severní polokouli v temperátních a boreálních oblastech jsou linie 2 (*A. irregularis*) a linie 3 (*A. erici*). Linie 6 je jako jediná rozšířená na severní polokouli v temperátních oblastech a v oblasti tundry. Její sesterská linie 7 má areál rozšíření kromě společné temperátní oblasti i na oblast s vyššími teplotami – přesněji biom kalifornských pouští a polopouští. Poslední linií rozšířenou pouze na severní polokouli je linie 11, což je překvapivé při její nízké specifitě k mykobiontům (Peksa & Škaloud 2011) a jejímu širokému rozpětí pH substrátu.

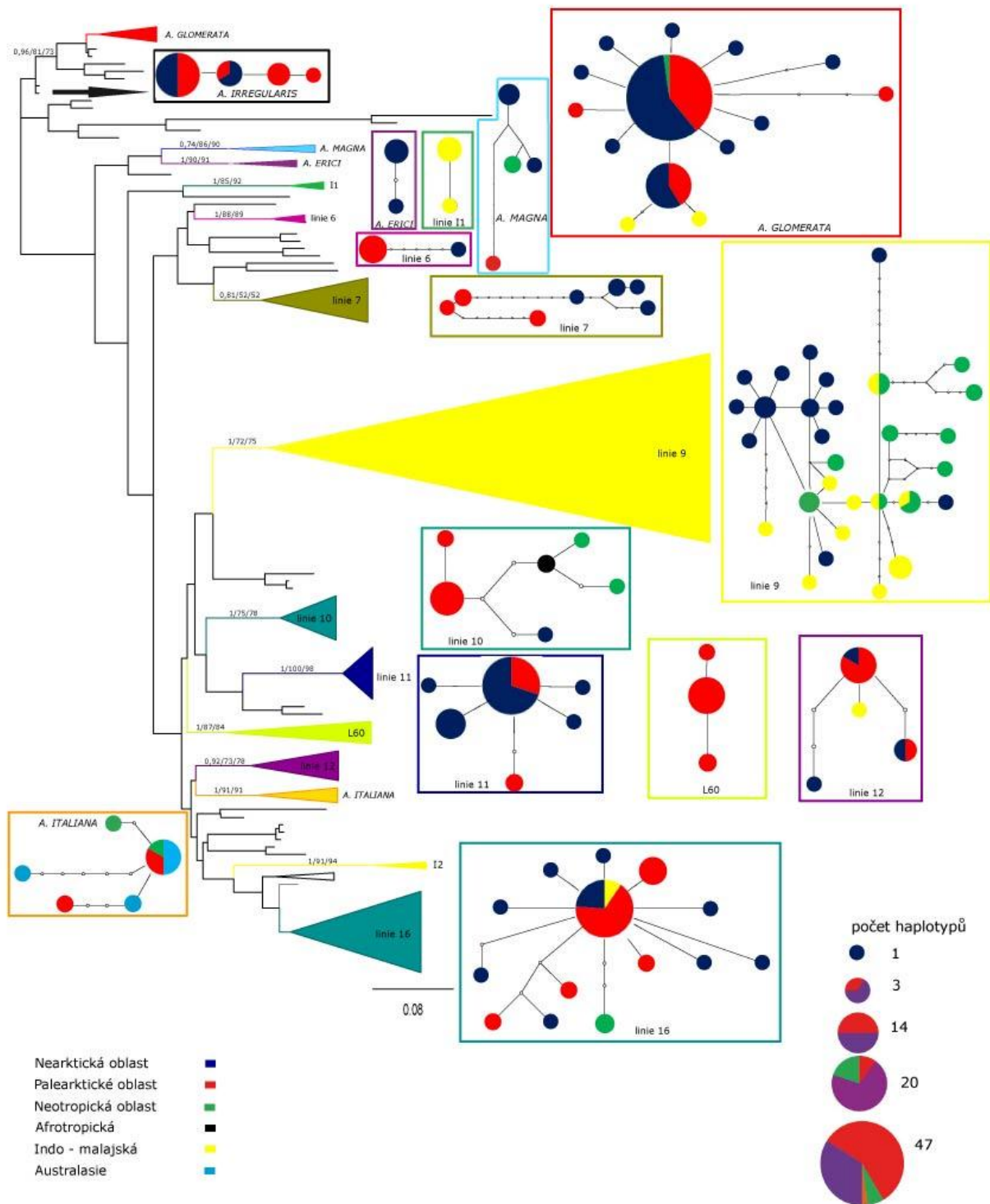
Bipolární linie, tedy linie fotobiontů nacházejících se na obou polokoulích v širokém rozsahu biotopů, tvoří linie 1 (*A. glomerata*), 9, 10, 12, 13 (*A. italiana*) a 16. Přes nejvíce typů biomů je rozšířena linie *A. glomerata*, a to od tropických a subtropických suchých lesů, přes lesy Středozezemní oblasti, až k boreálnímu pásu. Jak již bylo několikrát zmíněno, linie 9 potvrdila domněnku ze studie Řídká et al. (in press), kde se předpokládalo její rozšíření od teplých temperátních oblastí k tropickým a subtropickým oblastem mlžných lesů v Indii. Linie 10, 12 a 16 představují skupiny fotobiontů s euryekním rozšířením, kde navíc linie 10 je rozšířená přes šest biomů. *Asterochloris italiana* má zajímavé rozšíření už díky přítomnosti fotobiontů z Austrálie. Bohužel absence informací o místě sběru australských lišejníků nás odkazuje prozatím na rozšíření této linie na temperátní smíšené opadavé oblasti a oblasti středozezemních lesů. Jediná linie, která se nachází na severní i jižní polokouli pouze v oblastech temperátních smíšených a jehličnatých lesů, je linie *A. magna*, donedávna známá pouze jako linie evropsko-americká (Škaloud & Peksa 2010).





Obr. č. 13: Geografické rozdělení linií do fytogeografických biotopů (podle Olson et al. 2001).

Výsledky překvapivě ukázaly, že fylogeneze fotobiontů je více ovlivněna rozšířením do osmi fyto-/zoogeografických areálů, než do podrobnějšího rozdělení zahrnujícího 14 biomů. Oba typy rozdělení areálů měly silný fylogenetický signál, avšak rozdělení do osmi areálů bylo více signifikantní. Toto rozdělení je velmi podobné vymezení areálu pro třídu Desmidiáles (Krieger 1939; Coesel & Krienitz 2008), což je jediné rozdělení pro mikrobiální organismy. Jedinou výjimku u krásivkových areálů je více rozdělená Afrika – areál severní, rovníkový a jižní. Klademe-li si otázku, proč zrovna u kosmopolitně rozšířených organismů vyšlo signifikantně rozdělení do osmi oblastí, můžeme konstatovat, že příslušné areály zahrnují další ekologické charakteristiky (teplota, srážky atd.). Ve srovnání se skupinou Trebouxiophyceae nebo Chlorophyceae jsou organismy ve skupině Desmidiáles snadno od sebe rozeznatelné, proto zkoumání jejich biogeografických areálů není tak komplikované.



Obr. č. 14: Fyto-/zoogeografické rozdělení linií podle Pielou (1979).

## 5 Literatura

- Ahmadjian V** (1959b) Experimental observations on the algal genus *Trebouxia* de Puymaly. Svensk Bot Tidskr **53**: 71-84
- Ahmadjian V** (1960) Some new and interesting species of *Trebouxia*, a genus of lichenized algae. Am J Bot **47**: 677-683
- Ahmadjian V** (1967) A Guide to the Algae Occurring as Lichen Symbionts: Isolation, Culture, Cultural Physiology, and Identification. Phycologia **6**: 128-160
- Archibald R** (1975) *Trebouxia* de Puymaly (Chlorophyceae, Chlorococcales) and *Pseudotrebouxia* gen. nov. (Chlorophyceae, Chlorosarcinales). Phycologia **14**: 125-137
- Ahmadjian V** (1993) The lichen symbiosis. John Wiley & Sons, New York, NY, USA
- Baas Becking LGM** (1934) Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. WP Van Stockum en Zoon, The Hague, The Netherlands
- Báčkor M, Peksa O, Škaloud P, Bačkorová M** (2010) Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on ITS rDNA sequences. Ecotox Environ Safe **73**: 603-612
- Bailey RH** (1976) Ecological aspects of dispersal and establishment in lichens. In: Brown DH, Hawksworth DL, Bailey RH (eds) Lichenology: Progress and Problems, Academic Press, New York, pp. 215-247
- Baker AC** (2003) Flexibility and Specificity in Coral-Algal Symbiosis: Diversity, Ecology, and Biogeography of *Symbiodinium* Evol Syst **34**: 661-689
- 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**: 709-720
- Beck A, Kasalicky T, Rambold G** (2002) Myco-photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. New Phytol **153**: 317-326
- Behnke A, Friedl T, Chepurinov VA, Mann DG** (2004) Reproductive compatibility and rDNA analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). J Phycol **40**: 193-208
- Beiggi, S, Piercey-Normore MD** (2007) Evolution of ITS ribosomal RNA secondary structures in fungal and algal symbionts of selected species of *Cladonia* sect. *Cladonia* (Cladoniaceae, Ascomycotina). J Mol Evol **64**: 528-542
- Beijerinck MW** (1913) De infusies en de ontdekking der bacteriën, Jaarboek van de Koninklijke Akademie v. Wetenschappen, Müller, Amsterdam

- Blaha J, Baloch E, Grube M** (2006) High photobiont diversity in symbioses of the euryoecious lichen *Lecanora rupicola* (Lecanoraceae, Ascomycota). *Biol J Linn Soc* **88**: 283-293
- Blomberg SP, Garland TJr, Ives AR** (2003) Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* **57**: 717-745
- Broady PA** (1996) Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodivers Conserv* **5**: 1307-1335
- Bubrick P, Galun M, Frensdorff A** (1984) Observations on free-living *Trebouxia* Depuymaly and *Pseudotrebouxia* Archibald, and evidence that both symbionts from *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. can be found free-living in nature. *New Phytol* **97**: 455-462
- Büdel B, Scheidegger C** (2008) Thallus morphology and anatomy. In: Nash III T.H. (ed.) *Lichen Biology*, Cambridge University Press, New York, **pp.** 336-352
- Casano et al.** (2011) Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus competition? *Environ Microbiol* **13**: 806-818
- Casteleyn et al.** (2008) *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): A cosmopolitan diatom species? *Harmful Algae* **7**: 241-257
- Chapman RL** (1984) An assessment of the current state of our knowledge of the Trentepohliaceae. In: Irvine DEG, John DM (Eds) *Systematics of the green algae*, Academic press, London, UK, **pp.** 233-250
- Codogno M, Sancho LG** (1991) Distribution pattern of the lichen family Umbilicariaceae in the W Mediterranean Basin (Iberian Peninsula, S France and Italy). *Botanica Chronica* **10**: 901-910
- Cordeiro et al.** (2005) Molecular studies of photobionts of selected lichens from the coastal vegetation of Brazil. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 381-390
- Depriest PT** (2004) Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986-2001. *Microbiol* **58**: 273-301
- Doyle JJ, Doyle JL** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**: 11-15
- Eliš M, Neustupa J, Škaloud P** (2008) *Elliptochloris bilobata* var. *corticola* var. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccal green alga. *Biologia* **63**: 791-798
- Engelen A, Convey P, Ott S** (2010) Life history strategy of *Lepraria borealis* at an Antarctic inland site, Coal Nunatak. *Lichenologist* **42**: 339-346
- Ettl H, Gärtner G** (1995) *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. G. Fischer Verlag. Stuttgart. (v němčině)

- Evans et al.** (2008) A molecular approach to explore diversity within the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta) *J Phycol* **44**: 215-231
- Finlay BJ** (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**: 1061
- Finlay BJ, Clarke KJ** (1999) Ubiquitous dispersal of microbial species. *Nature* **400**: 828
- Finlay BJ, Fenchel T** (2004) The Ubiquity of Small Species: Patterns of Local and Global Diversity. *Bioscience* **54**:777-784
- Fenchel T, Finlay BJ** (2003) Is microbial diversity fundamentally different from biodiversity of larger animals and plants? *Eur JProtistol* **39**: 486-490
- Foissner W** (1999) Protist diversity: estimates of the near-imponderable. *Protist* **150**: 363-368
- Foissner W** (2006) Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protests. *Acta Protozoologica* **45**:111-136
- Foissner W** (2008) Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodivers Conserv* **17**: 235-142
- 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). Ph.D. Dissertation, Universität Bayreuth, Germany
- Friedl T** (1993) New aspects of the reproduction by autospores in the lichen alga *Trebouxia* (Microthamniales, Chlorophyta). *Arch Protistenkd* **143**: 153-161
- Friedl T** (1995) Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: A phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae *cl. nov.*). *J Phycol* **31**: 632-639
- Friedl T, Büdel B** (1996) Photobionts. In: Nash TH (ed) *Lichen Biology*, Cambridge University Press, Cambridge, **pp.** 8-23
- Friedl T, Büdel B** (2008) Photobionts. In: Nash III TH (ed.) *Lichen Biology*, Cambridge University Press, New York, **pp.** 9-26
- Friedl T, Gärtner G** (1988) *Trebouxia* (Pleurastrales, Chlorophyta) as a phycobiont in the lichen genus *Diploschistes*. *Arch Protistenkd* **135**: 147-158

- 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 CT** (1994) Assessing the relationships of some coccoid green lichen algae and the Microthamniales (Chlorophyta) with 18S ribosomal RNA gene sequence comparisons. *J Phycol* **30**: 500-506
- Friedl et al.** (2007) A reinvestigation of *Pseudococcomyxa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): morphology rDNA sequencing and AFLP fingerprinting to define species. In: Proc Abstr Int Conf Taxonomy and Biology of Green Algae V., Smolenice, pp. 23
- Galloway DJ** (2007) Flora of New Zealand, Including Lichen-forming and Lichenicolous Fungi. 2nd edit. Lincoln, Manaki Whenua.
- Gärtner G** (1985a) Taxonomische Probleme bei den Flechtenalgengattungen *Trebouxia* und *Pseudotrebouxia* (Chlorophyceae, Chlorellales). *Phyton* **25**: 101-111
- Gärtner G** (1985b) Die Gattung *Trebouxia* Puymaly (Chlorellales, Chlorophyceae). *Arch Hydrobiol Suppl, Algal Stud* **41**: 495-548
- Groover RD, Bold HC** (1969) The taxonomy and comparative physiology of the Chlorosarcinales and certain edaphic algae. *Phycological Studies VIII*, The University of Texas, pp. 165
- Hallegraeff GM, Bolch CJ** (1992) Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *J Plankton Res* **14**: 1067-1084
- Harmon et al.** (2008) GEIGER: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics* **24**: 129-131
- Helms G** (2003) Taxonomy and symbiosis in associations of Physciaceae and *Trebouxia*. Ph.D. Dissertation, Georg-August Universität Göttingen, Germany
- Helms G, Friedl T, Rambold G, Mayrhofer H** (2001) Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific nrITS sequencing. *Lichenologist* **33**: 73-86
- Hershkovitz MA, Zimmer EA, Hahn WJ** (1999) Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematics. In: Holinngsworth PM, Bateman RM; Gornall RJ (eds) *Molecular systematics and plant evolution*. Taylor & Francis, London, pp. 268-326.
- Hildreth KC, 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: Reiser W (ed) *Algae and symbioses: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored*. BioPress Ltd, Bristol, UK, pp. 255-275
- Honegger R** (2006) Water relations in lichens. In: Gadd GM, Watkinson SC, Dyer P (eds) *Fungi in the Environment*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 185-200
- Honegger R** (2009) Lichen-forming fungi and their photobionts. In: Deising HB (ed) *The Mycota V.: Plant Relationships*, 2nd edn Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 307-333
- Hoshina R, Nobutaka I** (2009) Origins of Algal Symbionts of *Paramecium bursaria*. In: Fujishima M (Ed) *Endosymbionts in Paramecium*. Ecol Monogr **12**: 1-29
- Huelsenbeck JP, Ronquist F** (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**: 754-755
- Hülsmann N, Galil BS** (2002) Protists - a dominant component of the ballast-transported biota. In: Leppäkoski et al. (Eds) *Invasive Aquatic Species of Europe*. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, Boston, London, pp. 20-26
- Huss et al.** (1999) Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *J Phycol* **35**: 587-598.
- Jacobs JB, Ahmadjian V** (1968) Ultrastructure of the lichen alga *Trebouxia*. *Am J Bot* **55**: 720
- John DM** (2002) Orders Chaetophorales, Klebsormidiales, Microsporales, Ulotrichales. In: John DM, Whitton BA, Brook AJ (Eds) *The Freshwater Algal Flora of the British Isles*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 433-468
- Kalina T, Váňa J** (2005) *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Nakladatelství Karolinum, Praha
- Kembel et al.** (2010) Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* **26**: 1463-1464
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA** (2001) *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi*, 9th ed CAB International, Oxford, UK
- Komárek J, Fott B** (1983) Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi G (Ed) *Das Phytoplankton des Süßwassers, Die Binnengewässer* 16, Schweizerbart, Stuttgart, pp. 1043
- Kooistra et al.** (2008) Global Diversity and Biogeography of *Skeletonema* Species (Bacillariophyta). *Protist* **159**: 177-193
- Kristiansen J** (1996) Dispersal of freshwater algae - a review. *Hydrobiologia* **336**: 151-157



- Krieger W** (1939) Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz. 2. vydání
- Kristiansen H, Heiðmarsson S** (2009) Colonization of lichens on Surtsey 1970-2006. Surtsey research Programme Report **12**: 81-104
- Kroken S, Taylor JW** (2000) Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist* **103**: 645 - 660
- Law R, Lewis DH** (1983) Biotic environments and the maintenance of sex - some evidence from mutualistic symbioses. *Biol J Linn Soc* **20**: 249-276
- Lawton JH** (1998) Small is beautiful, and very strange. *Oikos* **81**: 3-5
- Lucking R, Papong K, Thammathaworn A, Boonpragob K** (2008) Historical biogeography and phenotype-phylogeny of *Chroodiscus* (lichenized Ascomycota: Ostropales: Graphidaceae). *J Biogeogr* **35**: 2311-2327
- Luo et al.** (2006) Genotyp versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist* **157**: 315-323
- Mollenhauer D** (1997) Photobionten (Grünalgen und Cyanobakterien). In: Schöller H (ed) Flechten: Geschichte, Biologie, Systematik, Ökologie, Naturschutz and kulturelle Bedeutung; Begleitheft zur Ausstellung "Flechten - Kunstwerke der Natur" Kramer, Frankfurt am Main, pp. 18-19
- Maskell WM** (1887) *Trans NZ Inst* **20**: 3
- Muggia L, Grube M, Tretiach M** (2008) Genetic diversity and photobiont associations in selected taxa of the *Tephromela atra* group (Lecanorales, lichenised Ascomycota). *Mycol Prog* **7**: 147-160
- Muñoz et al.** (2004) Wind as a long-distance dispersal vehicle in the southern hemisphere. *Science* **304**: 1144-1147
- Nash et al.** (1987) Cold resistance of lichen with *Trentepohlia* or *Trebouxia* photobionts from the North American west coast. *Flora* **179**: 241-251
- Naw MWD, Hara Y** (2002) Morphology and molecular phylogeny of *Prasiola* sp. (Prasiolales, Chlorophyta) from Myanmar. *Phycol Res* **50**: 175-82
- Nelsen MP, Gargas A** (2006) Actin type I introns offer potential for increasing phylogenetic resolution in *Asterochloris* (Chlorophyta: Trebouxiophyceae). *Lichenologist* **38**: 436-440
- Nelsen MP, Gargas A** (2008) Dissociation and horizontal transmission of co-dispersed lichen symbionts in the genus *Lepraria* (Lecanorales: Stereocaulaceae). *New Phytol* **177**: 264-275

- Neustupa J** (2003) The genus *Phycopeltis* (Trentepohliales, Chlorophyta) from tropical Southeast Asia. *Nova Hedwigia* **76**: 487-505
- Neustupa J** (2005) Investigations on the genus *Phycopeltis* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from South-East Asia, including the description of two new species. *Cryptogamie Algol* **26**: 229-242
- Neustupa J, Škaloud P** (2008) Diversity of subaerial algae and cyanobacteria on tree bark in tropic mountain habitats. *Biologia* **63**: 806-802
- Neustupa J, Eliáš M, Šejnohová L** (2007) A taxonomic study of two *Stichococcus* species (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with a starch-enveloped pyrenoid. *Nova Hedwigia* **84**: 1-2
- Neustupa et al.** (2009) *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella*-like subaerial alga from Southeast Asia. *Phycol Res* **57**: 159-169
- Nyati S** (2007) Photobiont diversity in *Teloschistaceae* (Lecanoromycetes). Ph.D. Dissertation, Universität Zürich, Switzerland.
- Nylander JAA** (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre: Uppsala University. Available at: <http://www.abc.se/~nylander/>, accessed 26 March 2009
- Olson et al.** (2001) Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience* **51**: 933-938
- Orme et al.** (in press). caper: Comparative Analyses of Phylogenetics and Evolution in R. *Methods Ecol Evol*
- Ott S** (1987a) Sexual reproduction and developmental adaptation in *Xanthoria parietina*. *Nord J Bot* **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
- Otte V, Esslinger TL, Litterski B** (2005) Global distribution of the european species of the lichen genus *Melanelia* Essl. *J Biogeogr* **32**: 1221-1241
- Øvstedal DO, Lewis Smith RI** (2001) The Lichens of antarctica and South Georgia: A Guide to their Identification and Ecology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Paoli et al.** (2010) Influence of sun irradiance and water availability on lichen photosynthetic pigments during a Mediterranean summer. *Biologia* **65**: 776-783
- Pagel M** (1999) Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* **401**: 877-884
- Peksa O** (2011) The study of photobionts in the lichenized genus *Lepraria*. Ph.D. Dissertation, Charles University

- Peksa O, Škaloud P** (2011) Do photobionts influence the ecology of lichens? A case study of environmental preferences in symbiotic green alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae). *Mol Ecol* **20**: 3936-3948
- Peršoh D, Beck A, Rambold G** (2004) The distribution of ascus types and photobiontal selection in *Lecanoromyces* (Ascomycota) against the background of a revised SSU nrDNA phylogeny. *Mycol Progr* **3**: 103-121
- Peveling E** (1968) Pyrenoidstrukturen in symbiontisch lebenden *Trebouxia*-arten. *Z Pflanzenphysiol* **59**: 393-396
- Pielou EC** (1979) *Biogeography*. Wiley, New York
- Piercey-Normore, M D** (2006) Lichens from the Hudson Bay Lowlands: Diversity in the southeastern peatlands of Wapusk National Park, Manitoba. *Can J Bot* **84**:1781-1793
- Piercey-Normore MD** (2009) Vegetatively reproducing fungi in three genera of the Parmeliaceae share divergent algal partners. *The Bryologist* **112**:773-785
- Piercey-Normore MD, DePriest PT** (2001) Algal switching among lichen symbioses. *Am J Bot* **88**: 1490-1498
- Pröschold T, Marin B, Chlöser UG, 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**: 265-300
- Rambold G, Friedl T, Beck A** (1998) Photobionts in lichens: Possible indicators of phylogenetic relationships? *Bryologist* **101**: 392-397
- Reis RA** (2005) Estudo filogenético de fotobiontes de líquens; isolamento e cultivo de simbiontes líquênicos; estudo comparativo de polissacarídeos e ácidos graxos do líquens *Teloschistes flavicans* e seus simbiontes. Ph.D. Dissertation, Universidade Federal do Paraná.
- Rikkinen J, Oksanen I, Lohtander K** (2002) Lichen Guilds Share Related Cyanobacterial Symbionts. *Science* **297**: 357
- Rindi F, López-Bautista JM** (2008) Diversity and ecology of Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta) in French Guiana. *Cryptogamie Algol* **29**: 13-43
- Rindi F et al.** (2008a) Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta) from Panama. *Nova Hedwigia* **87**: 421-444
- Rindi et al.** (2009) An Overview of the biodeiversity and biogeography of terrestrial green algae. In: Rescigno V (ed) *Biodiversity Hotspots*. Nova Science Publisher, Chapter 3
- Rindi F et al.** (2011) Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Mol Phyl Evol* **58**: 218-231

- Roimeke J, Friedl T, Helms G, Ott S** (2002) Genetic diversity of algal nad fungal partners in four species of *Umbilicaria* (lichenized Ascomycetes) along a transect of the Antarctic peninsula. *Mol Biol Evol* **19**: 1209-1217
- Roy-Ocotla G, Carrera J** (1993) Aeroalgae: response to some aerobiological questions. *Grana* **32**: 48-56
- Rundel PW** (1978) Ecological relationships of desert fog zone lichens. *The Bryologist* **81**: 277-293
- Řídká T, Peksa O, Himanshu R, Upreti DK, Škaloud P** (in press) Photobiont diversity in Indian *Cladonia* lichens, with special emphasis on the geographical patterns.
- Sanders WB, Rico VJ** (1992) Lichenizing rhizomorphs and thallus development in the squamulose lichen *Aspicilia crespiana* Rico ined. (Lecanorales, Ascomycetes). *Bot Acta* **105**: 449-456
- Schwendener S** (1867) Über die wahre Natur der Flechtengonidien. *Verh Schweiz Naturforsch Ges* **9-11**
- Silke Werth** (2011) Biogeography and phylogeography of lichen fungi and their photobionts. In: Diego Fontaneto (ed) *Biogeography of Microscopic Organisms: Is Everything Small Everywhere?* University Press, Cambridge, pp. 191-208
- Smith DC, Douglas AE** (1987) *The biology of symbiosis*. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, UK.
- Smith et al.** (2009) *The Lichens of Great Britain and Ireland*. British Lichen Society, London.
- Swofford DL** (2002) PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Škaloud P** (2008) Polyphasic approaches in the taxonomy of green aerophytic algae. Ph.D. Dissertation, Charles University
- Škaloud P, Peksa O** (2008) Comparative study of chloroplast morphology and ontogeny in *Asterochloris*. *Biologia* **63**: 869-876
- Škaloud P, Peksa O** (2010) Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Mol Phyl and Evol* **54**:36-46
- Škaloud P, Friedl T, Neustupa J** (2007) Morphology, molecular phylogeny and taxonomy of green algal genera *Aerosphaera* and *Dictyochloropsis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Eur J Phycol* **42**: 107-108
- Šlapeta J, Moreira D, Lopez-Garcia P** (2005) The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society - Biol Sciences* **272**: 2073-2081

- Šlapeta J, López-García P, Moreira D** (2006) Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. *Mol Biol Evol*: 23-29
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumara S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position 86 specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* **22**: 4673-4680
- Tschermak-Woess E** (1978) *Myrmecia reticulata* as a phycobiont and free-living – 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** (1988) The algal partner. In: Galun M (ed) *CRC Handbook of Lichenology*. vol. 1. CRC Press Boca Raton, Florida, USA, pp. 39-92
- Tschermak-Woess E** (1989) Developmental studies in trebouxioid algae and taxonomical consequences. *Plant Syst Evol* **164**: 161-195
- Tschermak-Woess E** (2000) *Dictyochloropsis irregularis* (Chlorococcales, Chlorophyta) new to Europe and the peculiar opening of its sporangia. *Plant Syst Evol* **225**: 241-244
- Yahr R, Vilgalys R, DePriest PT** (2004) Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. *Mol Ecol* **13**: 3367–3378
- Yahr R, Vilgalys R, DePriest PT** (2006) Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytol* **171**: 847–860
- Yoshimura I** (1971) The genus *Lobaria* of Eastern Asia. *J Hattori Bot Bot Lab* **34**: 231-364
- Warén H** (1920) Reinkulturen von Flechtengonidien. *Finska Vet Soc Förh* **61**: 1-79
- Werth S, Tømmervik H, Elvebakk A** (2005) Epiphytic macrolichen communities along regional gradients in northern Norway. *J Veg Sci* **16**: 199-208
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) *A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego
- Zwickl DJ** (2006) Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas, Austin.

- Internetové zdroje:**
- 1) <http://www.wunderground.com>
  - 2) <http://www.weatherbase.com>
  - 3) <http://www.r-project.org/>
  - 4) <http://darwin.uvigo.es/software/tcs.html>
  - 5) [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)

**Pozn.** Pokud byli více než 4 autoři, psáno „et al.“

## Přílohy

**Seznam:**      **Tab. 1:** Seznam položek, ze kterých byla získána ITS rDNA

**Tab. 2:** Použitý script pro výpočet fylogenetického signálu v programu R.

**Obrázek č. 1:** Fylogenetický strom unikátních sekvencí zkonstruovaný metodou BI, založený na ITS rDNA a aktin alignmentu. Identické sekvence jsou znázorněné v rámečcích. Bootstrapové hodnoty v pořadí BI/ML/MP.

**článek:** Photobiont diversity in Indian *Cladonia* lichens, with special emphasis on the geographical patterns (in press).