

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Katedra parazitologie



Bakalářská práce

**Ovlivňuje heterogenita ribozomálních genů fylogenetické analýzy
sekundárních symbiontů hmyzu?**



Jana Smrčková

Vedoucí práce: prof. RNDr. Václav Hypša, CSsc.

České Budějovice 2008

Smrčková, J., 2008. Ovlivňuje heterogenita ribozomálních genů fylogenetické analýzy sekundárních symbiontů hmyzu? [Does the heterogeneity of ribosomal genes affect phylogenetic analyses of insect secondary symbionts?]. Bachelor thesis, in Czech. 30 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Secondary symbionts of insect are regarded as a heterogeneous group of bacteria possessing phylogenies which do not reflect phylogeny of their insect host. Phylogenetic analyses of bacteria are traditionally based on sequencing of ribosomal molecules, mainly SSU rRNA. Nonetheless, its application on recently speciated lineages is biased by heterogeneity of ribosomal operons. The process of gene conversions and intercistronic microheterogeneity produces mosaic-like operons including both ancestral and derived segments, thereby the retention of ancestral polymorphism along with an inadequate operon sampling may generate false signal of nonconcordant phylogenies. The impact of intercistronic heterogeneity on the congruence between the secondary and insect host phylogenies is discussed on *Arsenophonus* and *Sodalis glossinidius*, two examples of mid-term coevolution with the host. Because this artefact may possess source of potential distortion of coevolving associates in common, application of additional phylogenetic markers as well as consideration of possible intercistronic polymorphism is needed.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 12. května 2008

.....

Jana Smrčková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala všem členům laboratoře Molekulární fylogeneze a evoluce parazitů. Tento dík patří především Ryanu Regovi, Andree Škeříkové a Lence Štifterové za pomoc při pronikání do tajů sekvenace bakteriální DNA a za cenné rady, které mi pomohly čelit rozmarům molekulární biologie. Další dík patří mému školiteli Václavu Hypšovi za laskavé vedení a zajímavé téma práce.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za neochvějnou podporu a důvěru.

Obsah

Úvod	1
Ribozomální geny	3
Stavba a uspořádání ribozomálních operonů.....	3
Multiplicita rrn operonů.....	3
Concerted evolution.....	4
Fylogenetické charakteristiky rRNA	5
Artefakty.....	6
Mikroheterogenita	7
Vlastnosti mikroheterogenity.....	8
Jde o skutečnou heterogenitu?.....	8
Příčiny vzniku heterogenity.....	9
Oblasti výskytu.....	9
Množství variability.....	9
Ancestrální polymorfismus ve fylogenetických analýzách.....	11
Vliv fylogenetických artefaktů na koevoluční studie	14
<i>Arsenophonus</i>	14
<i>Sodalis</i>	15
<i>Sodalis glossinidius</i>	16
Vlastnosti bakterie <i>Sodalis glossinidius</i>	16
Primární symbionti hmyzu	17
Použití alternativních markerů pro rekonstrukce fylogeneze	19
Závěr	20

Úvod

Molekulární fylogenetika prokaryot je od roku 1977 bezmála výhradně fylogenetikou ribozomálních genů, zejména genu pro malou podjednotku rRNA. Všestrannost použití tohoto fylogenetického markeru je umožněna dostatečnou délkou sekvence, vysokou funkční stabilitou, univerzálním výskytem, přítomností domén s odlišnou rychlostí sekvenční evoluce a použitelnosti relativně rychlého přímého sekvenování (Woese 1987). Přehled současného stavu poznání prokaryotní fylogeneze v "The Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" je z velké části založen na studiích 16S rRNA (Garrity 2001). Sekvence 16S rRNA byla poprvé použita k rekonstrukci fylogeneze v práci Woese & Fox (1977). Použití ribozomálních sekvencí jako fylogenetických markerů navazuje na předpoklad, že tzv. sémantoforetické molekuly, například sekvence DNA, RNA či proteinů, nesou informaci využitelnou k rekonstrukci fylogeneze (Zuckerandl & Pauling 1965). Primární struktura molekuly 16S rRNA obsahuje pozice invariantní, tedy zcela konzervované, a variabilní, přičemž mutační rychlosti na rozdílných pozicích jsou značně rozdílné. Tento fakt umožňuje zkoumání širokého spektra fylogenetických vzdáleností od struktur na úrovni domén (tedy Bacteria, Archaea a Eucaryota) po úroveň jednotlivých druhů (Ludwig & Schleifer 1994). Kromě fylogenetických rekonstrukcí mají ribozomální sekvence v současnosti také velmi široké praktické využití, příkladem je identifikace patogenních agens (Harmsen et al., 2002), nebo stanovení mikrobiální diverzity v prostředí pomocí extrakce celkové DNA ze vzorku a použití univerzálních primerů (Pace 1997). Význam tohoto markeru reflektuje i fakt, že 16S rRNA je v současnosti nejčastější položkou v databázích pro genové produkty (Klappenbach et al., 2001). Na druhé straně je použití ribozomálních genů ve fylogenetických analýzách znesnadněno mnoha faktory, počínaje technickými problémy, kupříkladu mechanickým poškozením, nastávajícím při fixaci vzorku či extrakci DNA nebo PCR artefakty (Polz & Cavanaugh 1998). Z metodologického hlediska patří k významným zdrojům artefaktů intercistronická heterogenita, tj. sekvenční rozdílnost mezi více kopiemi ribozomálních cistronů (Clayton et al., 1995, Cilia et al., 1996, Conye et al., 2003). Tuto variabilitu v rámci několika kopií rRNA je možné rozdělit do dvou kategorií, které se liší množstvím polymorfních pozic a podstatou procesů, které ji formují. Těmito mechanismy jsou laterální přenos, postupná divergence některých operonů jako proces adaptace na úzce vymezenou niku a tzv. proces concerted evolution (Tourova 2002). V poslední době se ukazuje, že je třeba přihlížet k tomuto polymorfismu při rekonstrukcích fylogeneze bakterií (Gogarten et al., 2002). Evoluce sekvencí genových rodin, mezi které patří i rodina ribozomálních genů, podléhá procesu concerted evolution, která homogenizuje paralogní kopie v genomu prokaryotických i eukaryotických organismů. Genová konverze, která je molekulárním mechanismem concerted evolution prokaryot, způsobuje mozaikovitost ribozomálních sekvencí. Ribozomální geny jsou tedy složené z poměrně krátkých, cca 500 bp. paralogních a homologních sekvencí (Liao 2000). Variabilita těchto krátkých úseků odráží původ dané sekvence a není produktem konvergence. Intercistronickou variabilitu lze tedy chápat jako rozptyl krátkých homologních sekvencí v mnoha paralogních genech. Osekvenováním všech ribozomálních genů a porovnáním mutací v těchto genech dostaneme fylogenetický strom zachycující evoluci ribozomálních genů v daném organismu (Pettersson et al., 1998). Intercistronická heterogenita může při nedostatečném samplingu zkreslovat obraz evoluce daného organismu (Bogusz et al., 1988). Retence ancestrálního polymorfismu byla u volně žijících bakterií pozorována u blízce příbuzných bakteriálních druhů, například *Escherichia* a *Shigella* (Cilia et al., 1996; Garcia-Martinez et al., 1996, Anton et al., 1999).

Podobné fylogenetické artefakty se uplatňují při interpretaci různých evolučních scénářů, například při studiu koevoluce. U bakterií je to nejčastěji koevoluce mezi symbionty

a jejich hostiteli. Tyto vztahy jsou nejintenzivněji studovány v systémech hmyz - bakterie. Dosavadní studie biodiverzity naznačují, že hmyz je značně početnou skupinou (Novotný et al., 2002). Jedním z možných důvodů značné diverzifikovanosti této skupiny je tolerance vůči bakteriálním organismům (Moran & Telang 1998). Hmyz je charakteristický velkým množstvím různých vztahů s mikrobiálními organismy. Tyto vztahy zahrnují mutualistické, parazitické či komenzální interakce hmyzu s bakteriemi. Bakteriální symbionti se již tradičně rozdělují na primární a sekundární symbionty (tedy P a S symbionty) (Buchner 1965). Vztahy mezi těmito dvěma ekologicky vymezenými skupinami organismů a jejich hostiteli jsou v současné době studovány především pomocí molekulární biologie a fylogenetických přístupů (Moran 2006). Symbiotický vztah je definován jako stálé či dlouhotrvající soužití odlišných organismů. Tento název se však často chápe v podstatně užším smyslu a bývá spojován především s oboustranně prospěšnými, mutualistickými vztahy. K nim patří například bakterie obývající vnitrobuněčné prostředí eukaryot, z nichž nejznámější jsou primární symbionti hmyzu (Buchner 1965). Primární symbionti jsou alokovaní v buňkách bakteriocytech, které se často shlukují a vytvářejí orgán bakteriom (Buchner 1965, Wernegreen 2002). Předpokládá se, že počátek soužití primárních symbiontů a mnohých eukaryotních organismů, především hmyzu, byl klíčovým momentem pro diverzifikaci a specializaci těchto hostitelských organismů (Moran & Telang 1998). Vztah mezi bakteriálními symbionty a hmyzem je pozoruhodným příkladem důležitosti symbiogeneze, která navzdory Darwinovskému a Hennigovskému kladení důrazu na bifurkace jako způsob vzniku nových druhů umožnila diverzifikaci a využití nových nik vzhledem k dávné asociaci s bakteriálními symbionty (Buchner 1965, Margulis 1970).

Sekundární symbionti jsou nesourodou skupinou bakterií, jejichž fylogeneze neodpovídá fylogenezi jejich hostitele. Přestože se často předpokládá, že sekundární, či jinak fakultativní symbionti neovlivňují fitness svého hostitele, ukázalo se, že některé druhy fakultativních symbiontů se chovají mutualisticky. Příkladem je bakterie *Regiella insecticola*, která zvyšuje rezistenci hostitele *Acyrtosiphon pisum* (Arthropoda: Homoptera: Aphidoidea) vůči houbovým patogenům (Scarborough et al., 2005). Další studie prokázaly, že někteří sekundární symbionti zvyšují rezistenci svého hostitele vůči parazitoidům tím, že neumožňují dokončení vývoje jeho larev v hostiteli (Oliver et al., 2003). Tyto strategie vypovídají o možné počínající specializaci a kospeciaci bakterie.

Zatímco primární symbionti jsou přítomni ve všech jedincích daného druhu, slovo sekundární zde odkazuje k výskytu spolu s primárními symbionty a k nehomogenní distribuci těchto bakterií v hostitelských populacích (Buchner 1965). Lze zde rozlišit několik způsobů soužití s hostiteli, od častých laterálních přenosů po počínají specializaci a kospeciaci.

Mnohé bakterie dokáží snadno přecházet mezi parazitickým a obligátním způsobem života (Goebel & Gross 2001). Příkladem je změna strategie bakterie přenášené vertikálně z parazitické na mutualistickou během méně než 400 generací hostitele *Amoeba proteus* (Jeon 1972). Rychlá změna životní strategie bakteriálního organismu je nicméně nesnadno detekovatelná standardními metodami molekulární systematiky.

Topologie fylogenetických vztahů mezi některými bakteriemi, například primárními symbionty a jejich hostiteli, jsou často velmi podobné. Tato podobnost se vysvětluje jako kospeciace symbionta a jeho hostitele (Thao et al., 2001). Primární symbiont mšic, *Buchnera aphidicola*, vykazuje zcela shodnou fylogenezi se svým hostitelem i na velmi nízké úrovni (Funk et al., 2000). Příčiny nesouhlasné fylogeneze sekundárních symbiontů a jejich hostitelů jsou často vysvětlovány jako série horizontálních přenosů bakterie či nezávislých infekcí hostitelů (Aksoy et al., 1997).

Cílem této práce je zvážit intercistronickou variabilitu ribozomálních sekvencí jako další faktor fylogenetických analýz sekundárních symbiontů hmyzu. Zahrnutí paralogních sekvencí do fylogenetické analýzy způsobené nedostatečným samplíngem, stejně jako nezohlednění

potenciálního intercistronického polymorfismu může vést k rekonstrukci genových, a nikoli druhových kladogramů. Tento fakt je diskutován na příkladu evoluce sekundárních symbiontů *Arsenophonus triatominarum* a *Sodalis glossinidius* (Aksoy et al., 1997, Thao & Baumann 2004)

Ribozomální geny

Stavba a uspořádání ribozomálních operonů

Ribozomální geny jsou v prokaryotických organismech uspořádány ve formě operonu, tedy transkripční jednotky, která je transkribována ve směru 16S - 23S - 5S. Dané uspořádání zajišťuje výsledné ekvimolární množství genových produktů. Pro ribozomální operony se používá označení *rrn*. Sekvence 16S rRNA se také pojmenovává jako SSU, tedy "small subunit", nebo se používá označení *rrs*. Je-li v genomu daného organismu více ribozomálních genů, označují se tyto kopie *rrsA*, *rrsB*..., analogicky pro gen 23S rRNA *rrlA*, *rrlB*.

Escherichia coli je členem γ -3 Proteobacteria, skupiny Enterobacteriaceae. Do této skupiny náleží mnoho významných patogenních a symbiotických bakterií. Mezi tyto bakterie patří kupř. primární symbionti mravenců rodu *Camponotus* - *Blochmania floridanus*; děle *Baumannia cicadellinicola*, primární symbiont organismu *Homalodisca vitripennis* (Auchenorrhyncha: Cicadellidae); *Wigglesworthia glossinidia*, primární symbiont krev sajících much tse-tse rodu *Glossina* nebo primární symbiont brouků nosatců (Coleoptera: Curculionidae: Sitophilus) rodu *Sodalis* (Moran & Telang 1998). Genomové charakteristiky *E. coli* jsou velmi dobře známy díky dlouhodobým snahám porozumět biologii tohoto modelového organismu. Znalosti *rrn* operonů, intercistronické variability a dalších jevů souvisejících s multiplicitou ribozomálních genů jsou proto často odvozené od studií provedených na tomto organismu.

Escherichia coli obsahuje sedm *rrn* operonů. Mezi jednotlivými geny se nacházejí krátké mezigenové spacery (mezerníky), tedy "Intergenic Spacer Regions" (ISR) Tyto sekvence obsahují cílová místa pro RNázu 3, tedy enzym, který vyštěpuje ISR z primárního transkriptu, a dále sekvence kódující tRNA. Sekvence ISR jsou značně variabilní a používají se často pro identifikaci blízkce příbuzných bakteriálních druhů (García-Martínez et al., 1996, Luz et al., 1998). Jednotlivé ribozomální operony jsou rozptýleny v polovině chromozomu, blízko *oriC*, tedy počátku replikace (Boros et al., 1979, Ellwood et al., 1982). Délka sekvence 16S rRNA *E. coli* byla stanovena na 1541bp. Celý primární transkript je dlouhý asi 5000bp, v závislosti na proměnlivých délkách sekvencí ISR (Brosius et al., 1978; Condon et al., 1995). V buňce *Escherichia coli* se mění množství ribozomů v závislosti na potřebě buňky syntetizovat proteiny. Toto množství kolísá v závislosti na času zdvojení buňky (Bremer & Dennis 1999). Tato schopnost dosáhnout vysokých růstových rychlostí bakterie souvisí především s množstvím ribozomálních operonů v buňce, tj. s jejich multiplicitou.

Multiplicita *rrn* operonů

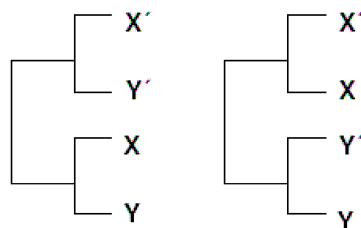
Bakteriální genomy obsahují jeden až patnáct ribozomálních operonů (Acinas et al., 2004). Toto množství je pro blízkce příbuzné bakterie, až na výjimky, stabilní (Fogel et al., 1999) a umožňuje tedy odhadnout množství ribozomálních kopií u blízkce příbuzných organismů. Výjimkou je několik bakteriálních organismů. Kupříkladu termofilní bakterie *Aquifex pyrophilus* obsahuje ve svém genomu šest ribozomálních kopií, zatímco blízkce příbuzné bakterie tohoto organismu obsahují pouze dvě kopie (Sanz et al., 1988, Shao et al., 1994).

Příkladem bakterie s jedním ribozomálním operonem je *Rickettsia prowazekii*, obligátní intracelulární bakterie s generační dobou 8-12 hodin (Pang & Winkler 1993).

Gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* obsahuje ve svém genomu čtyři ribozomální operony. Tento mikroorganismus se vyskytuje v zasolené půdě i v rostlinných a živočišných tkáních (Stover et al., 2000). Nedávná komparativní studie zabývající se množstvím ribozomálních operonů v bakteriálních liniích ukázala, že nejvyšší množství bakterií obsahuje dva ribozomální operony (25%). Dalším častým množstvím ribozomálních operonů ve zkoumaných bakteriálních liniích byly 4 operony. Lze tedy říci, že většina bakterií obsahuje více než jeden ribozomální operon (Acinas et al., 2004).

Z uvedených příkladů je zřejmé, že mezi bakteriemi existují rozdíly v množství ribozomálních operonů v genomu. Klappenbach et al. (2000) ukázali, že toto množství ribozomálních operonů v buňce je těsně svázáno s ekologickou strategií bakteriálního organismu. Fakt, že množství rRNA operonů v genomu nekoreluje s fylogenezí prokaryot, byl potvrzen i v některých dalších studiích (Coenye & Vandamme 2003, Acinas et al. 2004). Počet kopií rrr v genomu pozitivně koreluje s rychlostí, jakou dokáží bakterie využívat potravní zdroje a tedy s maximální růstovou rychlostí bakteriálního organismu. Ukázalo se, že vyšší množství ribozomálních operonů poskytuje selekční výhodu v prostředí s fluktuujícími podmínkami, např. dostupností zdrojů potravy, protože umožňuje rychle navýšit růstovou rychlost bakterie. Pro mikroorganismy žijící v relativně stabilním prostředí je ale selekčně výhodnější udržovat méně kopií rRNA v genomu, protože stálá produkce rRNA umožňuje v daných podmínkách efektivnější regulaci transkripce rRNA. Pomocí této hypotézy můžeme dobře vysvětlit variabilitu mezi výše uvedenými bakteriálními organismy. Zatímco *Clostridium paradoxum* a *Pseudomonas aeruginosa* jsou volně žijící mikroorganismy, pro něž se dostupnost potravy rychle mění v čase, *Rickettsia* je obligátní patogen vázaný na relativně stálé vnitřní prostředí eukaryotických buněk. Protože jsou patogenní i primárně symbiotické bakterie omezené na intracelulární prostředí eukaryot, lze předpokládat, že množství kopií rrr v genomech těchto dvou typů bakterií bude stejné. Skutečně, pro obligátně mutualistické bakterie je charakteristické, že jejich genom obsahuje jen jeden ribozomální operon (Tourova 2002). Malé množství ribozomálních operonů je v tomto případě způsobeno také degradačními procesy způsobenými populační dynamikou těchto bakterií a je jedním z aspektů celkové úspornosti genomu těchto organismů. Porovnáme-li charakteristiky ribozomálních operonů pro primární a sekundární symbionty, zjistíme, že se navzájem liší v množství kopií v genomu. Zatímco genom sekundárních symbiontů je velmi podobný genomu volně žijících bakterií a obsahuje tedy více kopií rrr, genomy primárních symbiontů nesou bez výjimky jen jeden ribozomální operon. Na více kopií ribozomálních operonů působí mechanismus concerted evolution.

Concerted evolution



Obr 1. Kladogram vlevo ukazuje na divergentní evoluci paralogních kopií, kladogram vpravo znázorňuje podobnost paralogních kopií multigenových rodin podléhajících procesu concerted evolution. Převzato Santoyo & Romero (2004).

Concerted evolution je proces, při němž se všichni členové dané genové rodiny mění společně. Mutace, které vzniknou v jednom genu, jsou buď překryty genovou konverzí, nebo

jsou rozptýleny po všech paralogních sekvencích genové rodiny. Genová rodina je skupina genů, které vznikly ze společné ancestrální sekvence a mají tedy společnou funkci a podobné sekvence DNA. Arbitrárně určenou hodnotou pro příslušnost ke genové rodině je nejméně 50% sekvenční identity (Cvrčková 2006). Zmnožení genů genové rodiny většinou souvisí s jejich nezbytností pro život a množení buňky. Jednou z nejnezbytnějších genových rodin prokaryot je rodina ribozomálních genů. Je známo několik dalších způsobů evoluce multigenových rodin, mezi které patří i tzv. divergentní evoluce. Divergentní evoluce je charakterizovaná postupným hromaděním změn v paralogních sekvencích, které postupně odlišují jednotlivé paralogní kopie. Je-li rychlost těchto změn stejná pro všechny paralogní sekvence genové rodiny, pak je získaný kladogram daného genu, který podléhá divergentní evoluci, ultrametrický. Tento způsob změny genových rodin je charakteristický například pro hemoglobinové geny (Nei & Rooney 2005). Concerted evolution je oproti tomu proces, který homogenizuje mnohočetné kopie sekvencí genových rodin (Dover 1982) (Obr.1). Pravděpodobnou příčinou tohoto procesu, jak uvádí Woese & Fox (1987), je silný selekční tlak na primární strukturu ribozomálních operonů. Tato stabilizující selekce umožňuje zachovat komplexní interakce s mnoha proteinovými molekulami podílejících se na stavbě ribozomu. Počáteční studie tohoto procesu byly provedeny na rRNA žab rodu *Xenopus* (Anura: Pipidae) (Brown et al., 1972). Protože tandemově uspořádané kopie ribozomálních genů eukaryot obsahují několik stovek kopií rRNA, umožňují vysoké koncentrace primárních transkriptů rRNA v buňce provést hybridizační studie. Ty poukázaly na uniformitu dané sekvence v paralogních kopiích rRNA. Předpokládaným molekulárním mechanismem concerted evolution u eukaryot je genová konverze a nerekiproký crossing-over, avšak evoluce ribozomálních sekvencí prokaryot je odlišná (Eickbush et al., 2007). Molekulární mechanismus introduhové homogenizace rRNA prokaryot spočívá v genové konverzi (tedy nerekiprokém přenosu sekvence mezi jednotlivými genovými kopiemi) krátkých, cca 500 bp úseků mezi paralogními sekvencemi ribozomálních genů¹. Předpokládá se tedy, že podobnost sekvencí mezi jednotlivými částmi paralogních genů neodráží konvergentní vznik mutací, daný například funkčními omezeními, ale ukazuje na pravděpodobný vznik dané sekvence (Liao 2000). To způsobuje, že členové genové rodiny se jeví jako mozaika ancestrálních a odvozených sekvencí. Tento fakt je příčinou ztráty ultrametrickosti pro některé ribozomální genové stromy (Cilia et al., 1996).

Ribozomální geny mezi sebou vykazují nápadnou sekvenční identitu, kdy paralogní sekvence v rámci jednoho druhu jsou si navzájem podobnější než homologní sekvence mezi dvěma příbuznými druhy. Ohta (1991) předpokládá, že míra uniformity sekvencí podléhajících procesu concerted evolution je daná intenzitou molekulárních interakcí a rychlostí vzniku nových mutací. Je-li intenzita homogenizace paralogních kopií v genomu vyšší než rychlost vzniku nových mutací, jsou všechny kopie sekvenčně identické. Tento fakt má značný vliv na rekonstrukce fylogeneze pomocí ribozomálních genů.

Fylogenetické charakteristiky 16S rRNA

Komparativní sekvenční analýza genu 16S rRNA hraje ústřední roli v mikrobiální taxonomii, identifikaci a studiu evoluce bakterií (Sapp 2005). Toto výsadní postavení genu 16S rRNA při studiu prokaryot je dáno kombinací několika faktorů. Jedním z těchto faktorů je historický aspekt studia mikroorganismů. Studium prokaryotní evoluce a fylogeneze bylo po dlouhou dobu zcela opomíjeno a těmto organismům byla věnována jen minimální pozornost. První

¹ K objasnění molekulární podstaty tohoto jevu bylo navrženo několik modelů zahrnujících tvorbu Hollidayových křížů, Meselson a Raddingův model, DSBR (double strand repair model) a SDSA (synthesis dependent strand annealing model). (Santoyo & Romero 2004)

studií klasifikace bakterií, která předpokládala evoluci těchto organismů a nebyla tedy založena např. na morfologických či fyziologických znacích, byla studie Woese (1977). Široké využití genu 16S rRNA jako markeru pro molekulární fylogenetiku prokaryot je dáno také výhodnou kombinací mnoha jeho vlastností. Těmito vlastnostmi jsou především (Fox & Woese 1987):

- Funkční stabilita
- Předpokládá se, že interakce ribozomálních genů s velkým počtem proteinů omezuje laterální transfer dané sekvence (Odlišný názor má ale kupř. Gogarten et al., 2002) Někteří autoři (Wertz et al., 2003) předpokládají, že laterální přenos tzv. "core genů", tj. genů kódujících komponenty fungující v klíčových dějích pro život prokaryotické buňky (například ribozomálních genů, genu *gapA*, *groEL*) není pravděpodobný. Občasná pozorování značné odlišnosti některých ribozomálních kopií, která je možno vysvětlit jako laterální přenos dané sekvence, jsou ale známa (např. Yap et al., 1999) K laterálnímu přenosu ribozomálních sekvencí dochází, ale určit frekvenci těchto událostí je velmi obtížné vzhledem k neustálé homogenizaci ribozomálních sekvencí procesem concerted evolution. Horizontální přenos tedy pravděpodobně ovlivňuje fylogenetické rekonstrukce organismů rekonstruované na základě 16S rRNA jen v krátkém časovém měřítku.
- Dostatečná velikost genu, které nezkrusuje fylogenetické analýzy malým počtem pozorování.
- Gen je složen z mnoha evolučně izolovaných domén v tom smyslu, že změna rychlosti sekvenční evoluce daná změnou selekčních tlaků na danou oblast neovlivňuje sekvenční rychlost dalších domén.
- Výskyt ve všech prokaryotních organismech
- Možné využití rychlého přímého sekvenování. Studie mikrobiální diverzity, které jsou založené především na přímém sekvenování rRNA pomocí tzv. "Shotgun libraries", tedy postupů získávání rRNA pomocí univerzálních primerů z přírodních vzorků, umožňují zkoumat nekultivovatelné mikroorganismy (Amann et al., 1994, Pace 1997).
- 16S rRNA obsahuje vysoce konzervované i variabilní oblasti.
- Tyto vysoce konzervované a variabilní oblasti genu jsou využitelné pro tvorbu primerů použitelných pro rekonstrukci vztahů na různých fylogenetických úrovních. Zatímco rekonstrukce dávných evolučních událostí je umožněna přítomností konzervativních domén, rekonstrukce fylogeneze na nízké úrovni, tedy mezi druhy a v rámci jednoho druhu, je umožněna přítomností variabilních oblastí genu.

Artefakty

Analýzy ribozomálních genů jsou spojené s mnohými artefakty, jimž je nutné věnovat pozornost při rekonstrukcích fylogeneze založených na sekvenování ribozomálních genů. Tyto artefakty jsou jednak mechanické, často spojené s izolací genetického materiálu, kterým se lze vyhnout úpravou příslušných postupů, dále i problémy nastávající při proceduře PCR, ale i artefakty dané samotným uspořádáním a evolucí ribozomálních operonů.

Jak upozornili Liphay et al. (2004), výběr extrakční metody pro izolaci DNA z přírodních vzorků může ovlivnit představu o mikrobiální diverzitě v tomto prostředí.

Jedním z možných problémů při sekvenování DNA jsou artefakty způsobované chybovostí DNA polymerázy. Je známo, že enzym DNA polymeráza zařazuje během cyklů replikace nesprávné nukleotidy, frekvence těchto záměn byla stanovena na 10^{-3} (Kwiatowski et al., 1991). Hodnota této sekvenační chyby (odpovídající množství nesprávných nukleotidů

mezi skutečným genem v buňce a sekvencí v databázi) odpovídá přibližně 1 nesprávně začleněnému nukleotidu na 500 - 1000 bp, pro sekvenci 16S rRNA tedy 0 - 2 nesprávné nukleotidy. Někteří autoři upozornili na možné ovlivnění fylogenetických analýz u druhů, jejichž sekvenční diverzita je nízká a tedy poměr signál / šum je nižší než pro druhy vykazující vysokou sekvenční diverzitu. Náhodné chyby by v takovém případě mohly ovlivnit topologie koncových a krátkých větví (Clark & Whittam 1992).

Dalším zdrojem artefaktů jsou procesy nastávající při PCR. Při multitemplátové PCR, tedy při použití vzorku s několika variantami daného genu, může dojít k zkreslení počátečního poměru těchto molekul ve vzorku. Tento artefakt nastává při vyšším než 35x opakování cyklů PCR a lze jej tedy odstranit snížením počtu cyklů (Kanagawa 2003).

Posledním uvažovaným zdrojem artefaktů v molekulárně fylogenetických studiích je variabilita kopií rrn. Pokud tato variabilita překračuje 2% sekvenční odlišnosti, pak je často přičítána laterálnímu přenosu sekvence či divergentní evoluci jednotlivých ribozomálních kopií. Tento jev bývá také nazýván makroheterogenita rrn (Tourova 2002). Případy makroheterogenity ribozomálních sekvencí byly popsány jen zřídka. Tento jev se vyskytuje nejen u prokaryot, ale byl nalezen i v eukaryotních a archebakteriálních organismech. Divergence ribozomálních kopií byla pozorována u některých archebakterií skupiny *Haloarchea*, např. *Halosimplex carlsbadense* (Russel et al., 2002). Předpokládá se, že vysoce variabilní operony v genomech těchto organismů slouží k adaptaci na měnící se podmínky prostředí. Vliv selekčního tlaku na udržování funkčně odlišných kopií genu byl potvrzen studií zabývající se citlivostí divergentních operonů v genomu *Halobacterium cutirubrum* na koncentrace soli v médiu (Dennis 1999). Příkladem makroheterogenity ribozomálních sekvencí prokaryot, která je pravděpodobně zapříčiněna laterálním transferem, jsou termofilní aktinomycety *Thermobispora bispora* (Actinobacteria: Pseudonocardiaceae) a *Thermomonospora chromogena* (Actinobacteria: Thermomonosporaceae) (Yap et al., 1999). Mezi genomy obou organismů pravděpodobně došlo k laterálnímu přenosu a následným genovým konverzím xenologní sekvence. Vliv makroheterogenity rRNA na fylogenetické studie byl několikrát prokázán (např. Yap et al., 1999), přesto tento jev pravděpodobně neovlivňuje fylogenetické analýzy sekundárních symbiontů hmyzu. Makroheterogenita se vyskytuje především u organismů, které žijí v nějakým způsobem extrémním prostředí. Příkladem je již zmíněný archebakteriální halofilní organismus *Halosimplex*, ale i parazit *Plasmodium berghei* (Apicomplexa: Haemosporida) (Gunderson et al., 1987). Heterogenita ribozomálních sekvencí tohoto parazita je spojena s adaptací na rozdílné prostředí v hostitelích během fází životního cyklu. Fylogenetické analýzy sekundárních symbiontů hmyzu mohou být ovlivněny především tzv. mikroheterogenitou ribozomálních sekvencí.

Mikroheterogenita ribozomálních sekvencí

Rozsah a možné důsledky sekvenční heterogenity nebyly po dlouhou dobu systematicky studovány, neboť většina výzkumníků předem předpokládala vysokou sekvenční podobnost jednotlivých kopií rRNA. Pokud byla analyzována více než jedna ribozomální kopie, pak byla možná intercistronická heterogenita určena na méně než 1%. Příkladem je analýza ribozomálních sekvencí bakterie *Rhodobacter sphaeroides* (Dryden & Kaplan 1990). Jednou z možných příčinou opominutí tohoto jevu je nejspíše široké využívání přímého sekvenování. Přímé sekvenování je metoda, která neumožňuje rozpoznat heterogenní pozice, tedy pozice, které nejsou přítomny ve všech sekvenovaných molekulách DNA (Edwards et al., 1989). V případě výskytu takovýchto heterogenních pozic v genech je daná pozice ponechána nerozlišená. Vliv této variability na fylogenetické studie byl často pouze předmětem spekulací. Kupř. Nübel et al. (1996) detekovali intercistronickou variabilitu v ribozomálních

kopíích organismu *Paenibacillus polymyxa* (Firmicutes: Paenibacillaceae)*. Autoři studie však pouze poznamenali, že množství zde zjištěných variabilních pozic pravděpodobně neovlivní fylogenetické analýzy.

S přibývajícím množstvím ribozomálních sekvencí v databázích se ukázalo, že intercistronická variabilita je poměrně běžným jevem (Clayton et al., 1995). Přestože má variabilita ribozomálních genů zásadní vliv na fylogenetické analýzy, tímto problémem se zabývá jen poměrně malé množství studií a jako další faktor vstupující do fylogenetických analýz prokaryot je zahrnována teprve krátkou dobu. Ukazuje se nicméně, že intercistronická variabilita je zásadním problémem pro fylogenetické analýzy druhů, k jejichž oddělení došlo teprve nedávno. Pro zvážení vlivu této heterogenity na fylogenetické analýzy je třeba zjistit vlastnosti tohoto jevu.

Vlastnosti mikroheterogenity

Příčinami mikroheterogenity rRNA (Coenye & Vandamme 2003) jsou:

- 1) rRNA geny jsou organizovány v multigenových rodinách. Vzhledem k sekvenční podobnosti jednotlivých genů (repetic) na ně působí různé homogenizační mechanismy (např. genová konverze).
- 2) tyto mechanismy postupně homogenizují sekvence jednotlivých členů genové rodiny. Jestliže jsou genové konverze poměrně vzácnými událostmi, pak některé uzly fylogenetického stromu budou reflektovat rekombinační události spíše než historii daného organismu (Cilia et al., 1996).

Pro zevrubné pochopení tohoto jevu je třeba znát výskyt, množství a příčiny vzniků této variability.

Jde o skutečnou heterogenitu?

Variabilita ribozomálních genů byla poměrně dlouhou dobu považována pouze za následek chybovosti DNA polymerázy. Výsledky studie Clayton *et al.* (1995) porovnávající variabilitu sekvencí uložených v databázi GenBank ukázaly, že množství mutací značně převyšuje odhad učiněný pro sekvenační chybu. Dalším důkazem jiného vzniku těchto mutací byla lokalizace těchto změn pouze v určitých, variabilních, oblastech. Jestliže by byla variabilita ribozomálních sekvencí způsobena náhodným začleňováním nesprávných nukleotidů, pak by nebyla soustředěna do určitých oblastí sekvence (Coenye & Vandamme 2003).

Příčiny vzniku heterogenity

Jako možná příčina vzniku heterogenity ribozomálních genů (heterogenity, která zahrnovala 5 a více mutací) byl často navrhován laterální přenos zprostředkovaný konjugativními plasmidy (Ueda et al., 1999). Další studie ale ukázaly, že pro vznik této variability lze použít i jiné

* Odlišné kopie 16S rRNA byly v této práci zjištěny pomocí tzv. DGGE. Tato denaturační gradientová gelová elektroforéza je častou metodou mikrobiální ekologie a slouží k odhalování genetické diverzity mikrobiálních přírodních populací. Tato technika spočívá v separaci sekvencí amplifikovaných při PCR v polyakrylamidovém gelu. Tento gel obsahuje gradient denaturačního činidla, které zabraňuje přejít sekvencím variabilních domén do helikálního uspořádání. Doputuje-li sekvence DNA do místa, které umožňuje zaujmout stabilnější sekundární strukturu, zastaví se pohyb molekuly v gelu. Sekvenční variabilita mění bod, ve kterém se pohyb molekuly zastaví. Výsledky této metody často reflektují intercistronickou variabilitu, a tedy způsobují nadhodnocení nikoli diverzity prokaryot v daném vzorku (Muyzer et al., 1993)

vysvětlení. Tuto variabilitu lze lépe vysvětlit jako kompenzační mutace zachovávající sekundární strukturu genového produktu vznikem ne-Watson-Crickovského párování G-U. (García-Martínez et al., 1999). Pravděpodobnou příčinou variability, která je nižší než zmíněných 5 mutací, bude nejspíše homogenizace ribozomálních genů (García-Martínez et al., 1999).

Oblasti výskytu

První srovnávací studie intercistronické heterogenity mezi jednotlivými kopiemi rRNA ukázaly, že tento jev je vymezen pouze do variabilních oblastí ribozomálních genů (Woese et al., 1980). Case et al. (2007) porovnávali výskyt těchto heterogenních oblastí se sekundární strukturou molekuly 16S rRNA. Jejich studie ukazuje na přítomnost těchto variabilních míst lokalizovaných v helixech (stoncích) 16S rRNA (Obr. 9), které se vyznačují vysokým podílem G:U bází. 16S rRNA obsahuje celkem 50 helixů (Obr. 9). Lokalizace těchto variabilních oblastí v sekundární struktuře rRNA se může pro různé prokaryota drobně lišit. Např. *Escherichia coli* vykazuje nejvyšší variabilitu v oblastech V1, V6, dále také V3 a V4 (Obr. 9). (Ueda et al., 1998, Coenye & Vandamme 2003, Marchandin et al., 2003).

Rychlost sekvenční evoluce v této struktuře je vyšší, než ve struktuře smyčky. Studium sekundární struktury ukázalo, že tyto mutace nemají vliv na prostorové uspořádání SSU ani na stabilitu daných oblastí (Ueda et al., 1998, Coenye & Vandamme 2003). Oblasti sekundární struktury, které obsahují smyčky ("loop") jsou vysoce stabilní a obsahují jen malé množství sekvenčních motivů. Tyto části molekuly také hrají důležitou roli ve funkci ribozomů a působí na ně tedy silná stabilizující selekce (Woese et al., 1990b).

Množství variability

Práce, které se zabývaly množstvím variabilních pozic mezi jednotlivými rrn, dospěly často k podobným výsledkům. Maximální množství detekované introdruhovité variability ve studii Coenye & Vandamme (2003) bylo 19 mutací. Další studie uvádí 11 variabilních pozic, přičemž nejvariabilnějším zkoumaným druhem byla *E. coli* (1,23% mezi 7 rrs) (Klappenbach et al., 2001). Rozložení těchto mutací ve zkoumaných liniích (Tab. 2) ukazuje, že většina linií neobsahuje variabilní rrn (93,1%) a jen malé množství linií obsahuje jednu variabilní pozici (4,4%). (Ueda et al., 1998). Ukazuje se tedy, že ne všechny bakteriální druhy obsahují variabilní rrn operony. Množství mutací je navíc - pokud uvažíme celkovou délku rrs sekvence - poměrně omezené.

Intercistronická variabilita několika bakteriálních druhů (Klappenbach et al., 2001) je uvedena v Tab.1. Zatímco některé druhy (například *Methanococcus jannaschii* či *Ureaplasma urealyticum*) obsahují dva ribozomální operony a intercistronická variabilita mezi jednotlivými kopiemi je poměrně malá, druhy s vyšším množstvím ribozomálních operonů vykazují vyšší variabilitu (např. variabilita pro druhy *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* byla stanovena na 1,23 a 0,97 %). Tyto výsledky jsou v dobrém souhlasu se studií porovávající množství rrn a frekvenci intercistronické variability (Acinas et al., 2004). Bylo ukázáno, že intercistronická variabilita a množství operonů v genomu bakterií spolu pozitivně korelují.

	a	b	c
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5	2	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23857	10	1 - 15	0,97
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 700819	3	-	-
<i>Deinococcus radiodurans</i> ATCC 13939	3	0-2	0,13

	a	b	c
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10798	7	0 - 19	1,23
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 51907	6	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	2	-	-
<i>Methanococcus jannaschii</i> DSMZ 2661	2	3	0,2
<i>Methanococcus thermoautotrophicum</i> ATCC 29096	2	2	0,14
<i>Neisseria meningitidis</i> MC 58	4	-	-
<i>Treponema pallidum</i> ATCC 25870	2	-	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i> serovar 3	2	1	0,07
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 39315	8	0 - 14	0,91
<i>Xyella fastidiosa</i> 9a5c	2	-	-

Tab. 1: Intragenomová variabilita 16S rRNA pro Bacteria a Archea založená na celogenomových studiích. Nejvyšší variabilitu mezi zkoumanými bakteriálními druhy vykazuje *Escherichia coli*. **a** - množství rRNA operonů v genomu; **b** - rozmezí rozdílů mezi jednotlivými 16S rRNA operony v jednom genomu vyjádřený jako počet mutací; **c** - rozdíl mezi jednotlivými operony v genomu vyjádřený v %. Převzato z Klappenbach et al. (2001).

Množství heterogenních bází	a	b
14	1	0,2
13	0	0
12	2	0,4
11	3	0,6
10	2	0,4
9	1	0,2
8	1	0,2
7	0	0
6	0	0
5	1	0,2
4	0	0
3	0	0
2	1	0,2
1	21	4,4
0	442	93,1
Celkem	475	100

Tab.2: Frekvence sekvenční heterogenity, která byla detekovaná ve variabilní oblasti 16S rRNA linií rodu *Streptomyces*. Celkové množství zkoumaných linií bylo 475. **a** - počet linií, které vykazovaly dané množství heterogenity; **b** - procento linií, které vykazovaly dané množství heterogenity. Převzato z (Ueda et al., 1998).

Skupina *Enterobacteriaceae* (Proteobacteria: Gammaproteobacteria: Enterobacteriales) obsahuje sekundární symbionty *Sodalis*, *Arsenophonus*, patogeny *Escherichia*, *Shigella* i primární symbionty hmyzu (např. *Buchnera aphidicola*). Průměrná hodnota počtů

ribozomálních operonů pro tuto skupinu byla získána z databáze rrnDB a činila 6,13 (Klappenbach et al., 2001). Lze tedy předpokládat, že ribozomální operony této skupiny budou vykazovat vysokou úroveň intercistronické heterogenity.

Ancestrální polymorfismus ve fylogenetických analýzách

Studium intercistronické variability v rámci skupiny Enterobacteriaceae poskytlo značně přesné informace o vlivu této heterogenity na fylogenetické analýzy.

Tento jev byl studován především v organismech *Shigella* a *Escherichia*. Příčinou je blízká příbuznost těchto bakterií, předpokládá se, že *Shigella* je klon, který vznikl několikrát v evoluci této skupiny jako adaptace bakterie *Escherichia* na prostředí epitelálních buněk lidského střeva. Mnohé konvergentní změny, spojené s přechodem k této strategii, byly po dlouhou dobu důvodem pro zařazení těchto organismů do dvou rovnocenných rodů (Pupo et al., 2002).

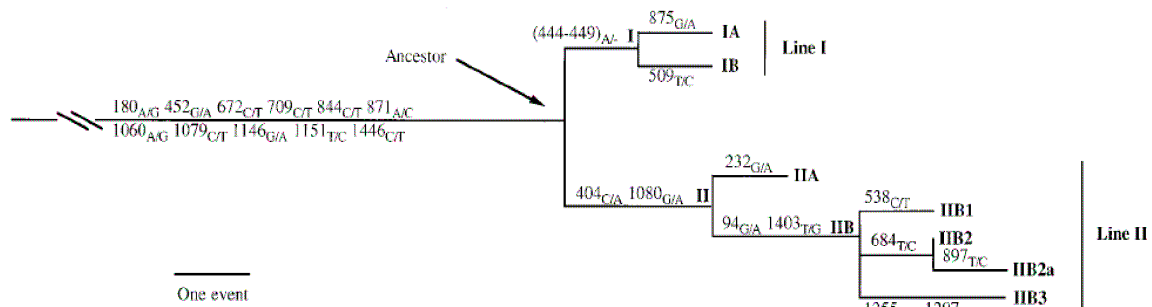
Intercistronická heterogenita je jev významný především při rekonstrukcích fylogeneze blízké příbuzných organismů. Příčinou je poměrně pomalá sekvenční evoluce ribozomálních genů. Tato rychlost neumožňuje nashromáždění velkého množství změn v molekule rrn, pokud čas, který uplynul od okamžiku speciace, byl příliš krátký. Tento fakt vede k uchování polymorfismu ribozomálních sekvencí v ancestrální podobě. Proces genové konverze náhodně vybírá jednotlivé mutace (nebo přesněji řečeno krátké sekvenční motivy), které pak disperguje v členech genové rodiny. Protože je tento proces náhodný, dochází v každém organismu k fixaci jiného sekvenčního motivu (Obr. 4). Je-li tento proces dostatečně intenzivní po dlouhou dobu, můžeme poté detekovat zcela identické sekvence ribozomálních genů. Příkladem je organismus *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al., 1995). Nejsou-li ale molekulární interakce mezi jednotlivými ribozomálními operony příliš silné, přechází tento ancestrální polymorfismus do dalšího druhu, kde se opět náhodně fixují nové mutace a dochází k ustanovení nové rovnováhy. Předpoklad ovlivnění fylogenetických analýz ancestrálním polymorfismem jednotlivých ribozomálních kopií by byl oprávněný, pokud by se čas divergence těchto kopií překračoval čas divergence daného organismu. Porovnání těchto časů bylo provedeno pro sekundárního symbionta *Arsenophonus triatominarum* a hostitelské organismy *Triatoma rubrofasciata* a *T. melanosoma*. Časy divergence jednotlivých alel symbionta překračovaly čas divergence těchto dvou hostitelských linií (Šorfová et al., 2008).

Jednotlivé operony v rámci jednoho organismu tedy často nejsou identické. Příkladem prokázání této nehomologie mezi jednotlivými operony jsou Obr. 2, 3. Použití ribozomálních genů bez ohledu na homologii dané sekvence poskytuje odlišné fylogenetické rekonstrukce. Tento fakt byl demonstrován především při analýzách fylogeneze bakterií *Escherichia* a *Shigella*. Byl-li při analýze použit 3' konec 16S rRNA, který obsahoval variabilní oblast genu, pak analýza fylogeneze poskytla často odlišné topologie (Cilia et al., 1996). Tento jev byl ukázán i pro jiné organismy (Obr. 5).

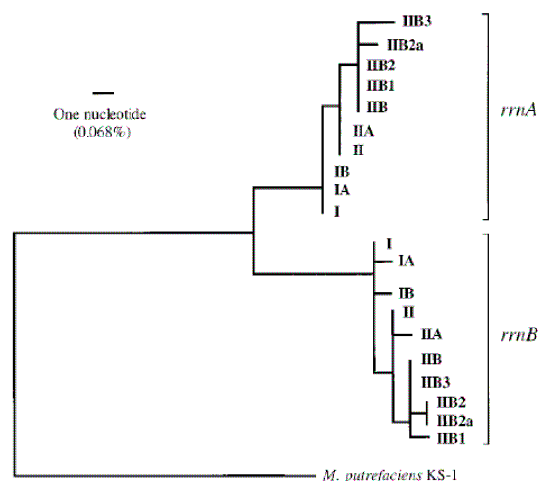
Mozaikovitost ribozomálních genů ovlivňuje ultrametričnost získaného kladogramu. Tento fakt je způsoben přítomností ancestrálních i odvozených variabilních domén, na základě kterých je fylogeneze rekonstruována (Cilia et al., 1996). Získáme-li takto neultrametrický kladogram, pak je možné, že provedená fylogenetická analýza neuvažovala intercistronickou heterogenitu daných sekvencí a nedošlo k osekvenování a následnému porovnání všech alel daného organismu. Neultrametrický kladogram byl získán i pro všechny operony organismu,

odlišná délka větví byla ale pravděpodobně způsobena zvýšenou rychlostí sekvenční evoluce (Obr. 2).

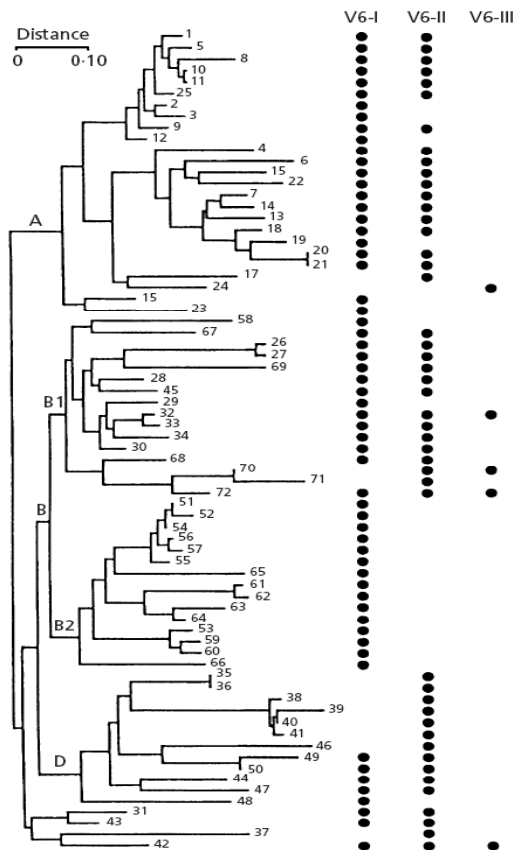
Pro blízké příbuzné organismy je typická nesnadná determinace prostřednictvím klasických mikrobiologických, biochemických či fyziologických metod, stejně jako použití techniky DNA-DNA hybridizace. Protože se pro identifikaci těchto organismů často využívá variabilních oblastí genu 16S rRNA, je pro ně tento efekt dobře prozkoumán. Příkladem takovýchto organismů je *Mycoplasma capricolum*, *Veilonella*, či rod *Aeromonas* (Johansson et al., 1998, Marchardin et al., 2003, Morandi et al., 2005).



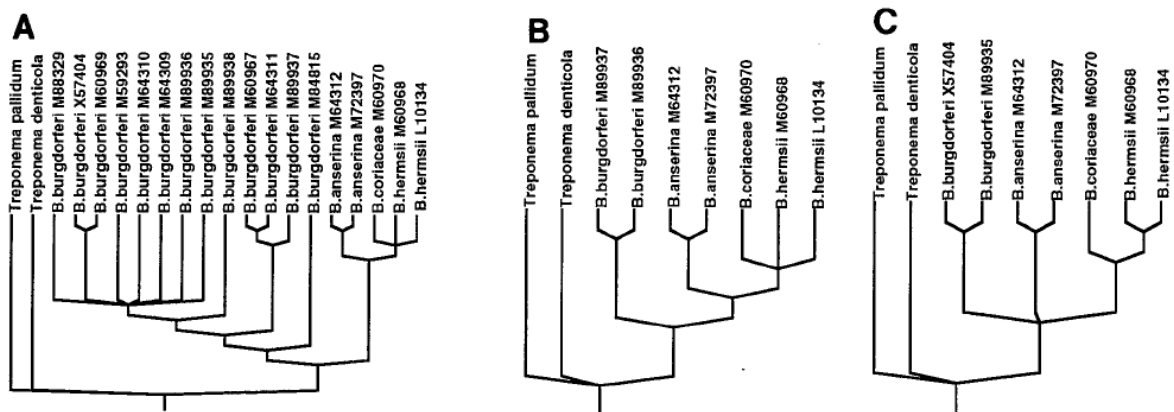
Obr. 2: Polymorfismus sekvence 16S rRNA *Mycoplasma capricolum*. Kladogram je zakořeněn 11 plesiomorfními polymorfismy. Zatímco bakteriální linie skupiny I (Line I) vykazují nízkou sekvenční proměnlivost, skupina II (Line II) je heterogennější. Skupinu I a skupinu II lze považovat za monofyletické jednotky, neboť každá z nich obsahuje apomorfie. Tento kladogram ukazuje na přítomnost hierarchické struktury ve variabilních oblastech zkoumaných bakteriálních linií. Při použití nehomologických sekvencí *rrn* by daná fylogenetická analýza odrážena spíše tuto hierarchii. Délky větví skupiny B ukazují na zvýšení rychlosti sekvenční evoluce v daných liniích (Pettersson et al., 1998).



Obr.3: Kladogram zrekonstruovaný na základě 16S rRNA bakterie *Mycoplasma capricolum*. Dvě skupiny sekvencí *rrnA* a *rrnB* ukazují, že jednotlivé ribozomální operony jsou monofyletické (Pettersson et al., 1998).



Obr. 4: Distribuce variabilních motivů V6-I, V6-II a V6-III mezi liniemi ECOR. V6 a V1 odkazují na dvě nejvariabilnější domény v 16S rRNA *E.coli*, označení I a II pak na jednotlivé motivy přítomné v jednotlivých operonech. Fylogenetické vztahy těchto linií byly stanoveny pomocí MLEE*. Strom je výrazně neultrametrický. Zatímco v některých liniích došlo již k fixaci jednoho sekvenčního motivu (např. linie B2, o které se předpokládá, že je výrazně klonální), v jiných liniích proces homogenizace genové rodiny stále neskončil. Převzato z (Martinez-Murcia et al., 1999).



Obr. 5: Fylogenetická analýza rodu *Borellia*. Byly-li použity pouze dvě náhodně vybrané sekvence *B. burgdorferi*, změnila se v jednom případě topologie výsledného kladogramu C. Kladogram B ukazuje

* MLEE, tedy MultiLocus Enzyme Electrophoresis je používaná standardně k odhadu diverzity a struktury mikrobiálních populací. Metoda je založena na rozdílné elektroforetické pohyblivosti aminokyselinových sekvencí enzymů rozpustných ve vodě (Selander et al, 1986). Použitím této metody se lze vyhnout artefaktům vyplývajících z mozaikovitosti rrrN sekvencí.

vztahy *B. burgdorferi*, *B. coriaceae*, *B. anserina* a *B. hermsii*. Použití dvou náhodně vybraných sekvencí zde neovlivnilo vztahy uvnitř skupiny. Převzato z (Clayton et al., 1996).

Kromě volně žijících bakteriálních organismů ovlivňuje pravděpodobně ancestrální polymorfismus ribozomálních genů i analýzy fylogeneze sekundárních symbiontů hmyzu. Fylogenetické analýzy některých sekundárních symbiontů ukazují, že dané symbiotické bakterie jsou v rámci své hostitelské skupiny monofyletické. Tento fakt je často podložen i vysokou hodnotou bootstrapové analýzy. Fylogenetická analýza nicméně neukazuje na koevoluci hostitele a dané bakterie a rekonstruované kladogramy jsou výrazně neultrametrické. Příkladem rekonstrukcí vztahů mezi hostitelem a symbiontem, které byly pravděpodobně ovlivněny intercistronickou heterogenitou jsou bakterie *Sodalis* a *Arsenophonus*.

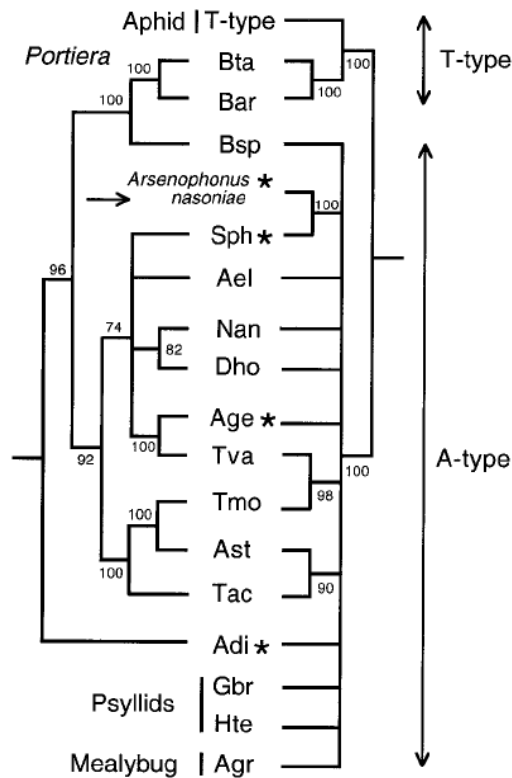
Vliv fylogenetických artefaktů na koevoluční studie

Arsenophonus

Skupina *Arsenophonus* představuje bakterie s širokým hostitelským spektrem. Bakterie rodu *Arsenophonus* byly nalezeny v merách (Insecta: Homoptera: Aleyrodidae), rostlinných tkáních, zákeřnicích skupiny *Triatominae* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae), parazitické vose *Nasonia vitripennis* (Insecta: Hymenoptera), a jiných dalších hostitelských skupinách (Hypša & Dale 1997, Zreik et al., 1998, Thao et al., 2004, Dale et al., 2006). Tento fakt tedy ukazuje na schopnost častého laterálního transferu této bakterie. Studium fylogenetických vztahů mezi některými hostiteli a těmito symbiotickými bakteriemi však ukazuje i na kospeciaci v rámci hostitelské linie. Příkladem je skupina *Arsenophonus*, rozšířená v hostitelských skupinách *Hippoboscidae* a *Streblidae* (Insecta: Diptera: Hippoboscidoidea). Tyto bakterie tvoří monofyletickou skupinu, rozšíření v populacích hostitele je tedy dáno infekcí ancestrální linie a následnou kospeciací. Podobné vztahy s hostitelem vykazuje i blízce příbuzná skupina *Photorhabdus* (Trowbridge et al., 2005).

Rekonstrukce koevoluce tohoto symbionta a hostitelské skupiny mer ukázala, že tato bakterie nevykazuje těsný vztah s hostitelem (Thao & Baumann 2004). Tato analýza byla učiněna na základě porovnání fylogenezí primárního symbionta *Portiera aleyrodidarum* a fakultativních symbiontů, které byly rekonstruovány na základě ribozomálních sekvencí. Tato skutečnost byla vysvětlena jako následek nedávným laterálních přenosů či nezávislých infekcí hostitele. Tomuto vysvětlení ale odporují vysoké hodnoty bootstrapové analýzy, které ukazují, že skupina je monofyletická. Několik typů tRNA ukázalo, že bakterie obsahuje více ribozomálních operonů. Fylogenetická analýza navíc neporovnávala všechny ribozomální kopie v rámci daného symbiotického organismu, ale získávání sekvencí bylo provedeno zaklonováním sekvence SSU do vektoru. Na nedávný vznik těsného vztahu s hostitelem lze usuzovat i podle nezměněného obsahu GC oproti volně žijícím bakteriím.

16S - 23S spacer bakterie *Arsenophonus* obsahoval několik různých genů pro tRNA. Tyto tRNA byly mezi jednotlivými kopiemi rrn v kladogramu roztroušeny náhodně. Příčinou této distribuce je pravděpodobně intercistronická variabilita některých polymorfních částí sekvence (tedy např. i tRNA) (García-Martínez et al., 1996). Tato náhodná distribuce některých tRNA (např. pro sekvence označené Tva a Tmo, Obr. 6) tedy pravděpodobně reflektuje pouze variabilitu ISR.



Lze tedy říci, že inkongruence topologií kladogramů sekundárního symbionta *Arsenophonus* byla způsobena intercistronickou variabilitou 16S-23S spacerů a dále ancestrálním polymorfismem jednotlivých kopií ribozomálních genů. Dalším symbiotickým organismem, jehož rekonstrukce fylogeneze byla pravděpodobně ovlivněna intercistronickým polymorfismem ribozomálních genů je *Sodalis glossinidius*.

Obr. 6: Porovnání kladogramů primárního symbionta *Candidatus Portiera aleyrodidarum* a dvou skupin sekundárních symbiontů A a T. Skupina A je podložena 100% bootstrapovou hodnotou, její fylogeneze ale není kongruentní s fylogenezí primárního symbionta. Tři monofyletické skupiny podpořené vysokými bootstrapovými hodnotami spojují sekvence 16S - 23S rRNA symbiontů molic. Skupina T vykazuje značnou podporu pro získaná data a hierarchickou strukturu (Thao & Baumann 2004).

Sodalis

Nedávné fylogenetické studie bakteriálních symbiontů hmyzu (založené především na použití degenerovaných a specifických primerů) odhalily širokou distribuci a rozmanitost symbiotických strategií rodu *Sodalis* (Lefevre et al., 2004; Fukatsu et al., 2007; Nováková & Hypša 2007). Porovnáním vztahů jednotlivých symbiontů rodu *Sodalis* a jejich hostitelů zjistíme, že tyto bakterie jsou schopny jednak častých laterálních přenosů, ale i mutualistických vztahů s hostitelem. Dokladem častých laterálních přenosů je blízká příbuznost symbiontů *Sodalis* žijících v poměrně vzdálených hostitelských skupinách (Nováková & Hypša 2007).

Příkladem obligátních vztahů *Sodalis* je symbiosa s brouky nosatci skupiny Dryophthoridae (Insecta: Coleoptera: Curculionidae) či skupinou Philopteridae (Arthropoda: Hexapoda: Phtiraptera) (Fukatsu et al., 2007). Na převládající vertikální přenos bakterie ukazuje zrychlená sekvenční evoluce, relativně delší délky větví ve srovnání s příbuznými skupinami a mutualistické vztahy s hostitelem. Např. infekce touto symbiotickou bakterií poskytla hostitelům skupiny Dryophthoridae selekční výhodu a umožnila využití nových zdrojů potravy. Ustanovení mutualistického vztahu s bakterií *Sodalis* je v tomto případě spojené s přechodem ke granivorii. Příkladem bakterie *Sodalis*, která vykazuje vlastnosti typické pro počínající těsný vztah s hostitelem, je *S. glossinidius*.

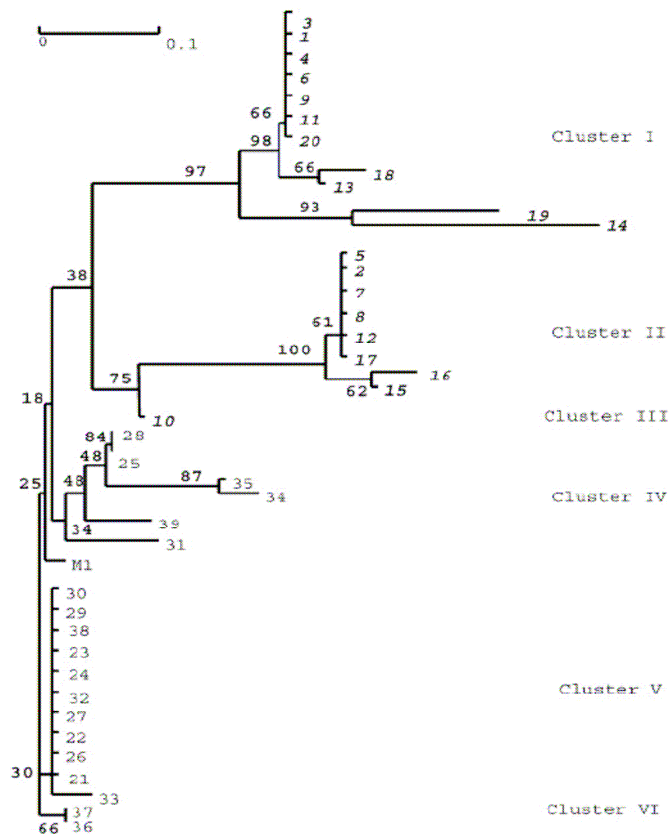
Sodalis glossinidius

Symbiont *Sodalis glossinidius* (γ -3 Proteobacteria: Enterobacteriaceae) byl poprvé identifikován jako fakultativní symbiont druhu *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae) (Dale & Maudlin 1999). Tato bakterie je považována za organismus, který vykazuje známky počínajícího mutualistického vztahu s hostitelem, dosud je ale schopna laterálního přenosu a kultivace (Akman et al., 2001).

Vlastnosti bakterie *Sodalis glossinidius*:

1. Znaky, které ukazují na počátek těsného vztahu s hostitelem, jsou zvýšená míra sekvenční evoluce a počínající degradace genetické informace, dále i snížená velikost genomu a ztráta některých biosyntetických drah zajišťujících produkci některých esenciálních látek. Tyto charakteristiky (typické spíše pro primární symbionty) byly nedávno potvrzeny osekvenováním genomu této bakterie (Toh et al., 2006).
2. Naopak přítomnost mnoha biosyntetických drah spolu s geny Sekrečního systému III je charakteristická spíše pro volně žijící bakterie. Sekreční systém typu III slouží k pronikání do hostitelské buňky. Geny tohoto komplexu jsou často situovány v ostrovech patogenity, tedy laterálně přenosných souborech genů, které umožňují osvojení nových vlastností bakterií. *Sodalis* obsahuje téměř všechny geny umožňující reparaci poškozené DNA, což vysvětluje frekvenci AT charakteristickou spíše pro volně žijící bakterie.

Studie Aksoy et al. (1997), založená na sekvenování genu 16S rRNA, našla nekongruentní fylogeneze této bakterie a jejího hostitele. Nízká sekvenční variabilita 16S rRNA spolu s nehomogenní přítomností bakterie v rámci hostitelské skupiny *Glossina* vedla autory k závěru, že tato inkongruence byla způsobena nedávnou sérií horizontálních přenosů nebo nezávislých infekcí. K vysvětlení této fylogeneze bylo navrženo ad hoc vysvětlení. Tato hypotéza se opírala o výskyt bakterie ve tkáních mléčných žláz, které u pupiparních dipter slouží k intrauterinní výživě larev. Schopnost infikovat tyto mléčné žlázy by tedy limitovala výskyt sekundárního symbionta pouze na hostitelské linii sdílející tuto rozmnožovací strategii. Oproti tomu studie genetické struktury *Sodalis* ukázala, že tato bakterie tvoří v rámci hostitelských druhů monofyletické skupiny (Geiger et al., 2005), jejichž hodnota bootstrapové analýzy byla poměrně nízká (Obr. 7). Tato snížená hodnota bootstrapové analýzy je pravděpodobně způsobena přítomností rozdílných variabilních oblastí v analýze a vypovídá pouze o použití nehomologických sekvencí ribozomálních genů. Kladogram byl výrazně neultrametrický, s nejasnou vnitřní strukturou. Tyto vlastnosti daného kladogramu můžeme vysvětlit jako následek artefaktů způsobených použitím ribozomálních genů jako fylogenetických markerů. Vzhledem k počínající degradaci genomu této bakterie lze říci, že ancestrální polymorfismus rrr zde ovlivňuje fylogenetické analýzy delší dobu, než jak je tomu u bakterie *Arsenophonus*. Ukazuje se ale, že retence některých sekvenčních motivů ve variabilních oblastech ribozomálních genů může přetrvávat i poměrně dlouhou dobu. Příkladem je homologie sekvenčního motivu V6-I *Escherichia coli* a dané sekvence v druzích *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Serratia* a dalších (Martínez-Murcía et al., 1999).



Obr. 7: Kladogram *Sodalis glossinidius* ukazuje 6 skupin bakterie. Bakterie Skupiny I-III (Cluster I-III) jsou symbionty hostitele *Glossina morsitans morsitans*, bakterie Skupiny IV-VI (Cluster IV-VI) pocházejí z hostitele *Glossina palpalis gambiensis*. Převzato z (Geiger et al., 2005).

Příkladem organismů, jejichž rekonstrukce fylogeneze intercistronický polymorfismus neovlivňuje, jsou primární symbionti hmyzu.

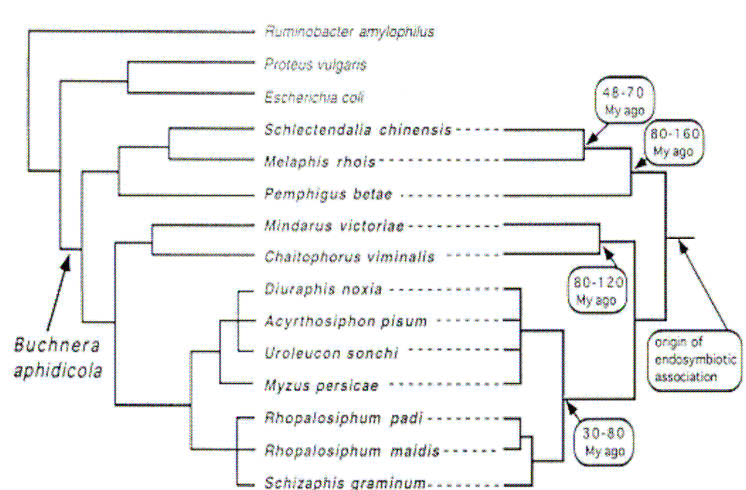
Primární symbionti hmyzu

Primární symbionti jsou dobře známou skupinou, jejíž fylogeneze reflektují striktní vertikální přenos v rámci hostitelských populací a obsahují tedy silný koevoluční signál (Obr.8). Příkladem je rekonstrukce fylogeneze bakterie *Buchnera aphidicola* a jejího hostitele *Uroleucon ambrosiae* (Aphidoidea: Macrosiphini). Tato analýza byla provedena na základě genu 16S rRNA a dalších fylogenetických markerů. Studie 16S rRNA potvrdily monofyletický původ primárního symbionta *B. aphidicola* a paralelní kladogenesi s hmyzími hostiteli. Fylogeneze rekonstruovaná na základě ribozomálních genů zde potvrdila výsledky analýz provedených na základě dalších fylogenetických markerů (Funk et al., 2000).

Pro vhodnost použití ribozomálních genů k rekonstrukcím fylogeneze primárních symbiontů existuje několik důvodů. Protože je v genomu těchto bakterií přítomna jen jedna kopie ribozomálního operonu (Moran & Baumann 1994, Wernegreen & Moran 1999), je vyloučeno uplatnění jevu intercistronické heterogenity, která se může projevit pouze mezi více kopiemi rrn. Navíc dlouhá doba těsného soužití primárních symbiontů s jejich hostiteli spolu se zvýšenou mírou sekvenční evoluce umožňuje nashromáždění dostatečného množství informace pro rekonstrukce fylogeneze.

Přítomnost jen jednoho ribozomálního operonu v genomu primárních symbiontů je způsobena jednak celkovou úsporností genomu, ale i degradačními procesy, které se v genomu těchto organismů projevují.

Wernegreen (2002) o změnách DNA primárních symbiontů mluví jako o vzájemně propojených faktorech, které se často navzájem posilují. Mezi tyto faktory patří dlouhodobá asexualita, zvýšená substituční rychlost DNA a převládající genetický drift.



Obr. 8: Kladogramy primárního symbionta *Buchnera aphidicola* a jejího hostitele rekonstruované na základě sekvence ribozomálních genů ukazují na přítomnost silného koevolučního signálu (Moran & Baumann 1994).

Proces genové degradace je jednoznačně podmíněn dlouhodobou vazbou na intracelulární prostředí hostitelských buněk. Schopnost využívat metabolity hostitelské buňky vede k zeslabení stabilizující selekce na biosyntetické dráhy produkující dané esenciální molekuly (Wernegreen 2002). Další příčinou degradace genomu je vysoká frekvence delečních mutací (Douglas 1998). Dlouhodobé udržení takového poměru sekvenčních změn vede k postupnému zmenšování velikosti genomu (Andersson et al., 2000). Pro objasnění akumulace delečních mutací je třeba vzít v potaz i populační dynamiku intracelulárních bakterií. Tyto organismy vykazují malou velikost populací v porovnání s jejich volně žijícími příbuznými. Vzhledem k dlouhodobé izolaci těchto asexuálních linií a častým bottleneckům, tedy drastickým krátkodobým snížením populační velikosti, dochází k fixaci mutací, které nejsou eliminovány selekcí (Mira et al., 2001). Tyto mírně škodlivé mutace snížily i stabilitu sekundární struktury 16S rRNA (Lambert & Moran 1998). V malých a asexuálních populacích organismů se projevuje proces známý jako Müllerova rohatka. Tento princip předpokládá, že u organismů množících se striktně asexuálně dochází k nevratnému hromadění mutací, které nelze odstranit homologní rekombinací (Moran 1996, Spaulding & von Dohlen 2001). Dalším aspektem evoluce genomů primárních symbiontů je vysoká sekvenční rychlost ribozomálních i protein-kódujících genů (Brynnel et al., 1998).

Další změnou genomů intracelulárních bakterií a patogenů je posun celkového obsahu nukleotidů ve prospěch AT. Tyto hodnoty v genomech mutualistických bakterií byly stanoveny na přibližně 26% AT (*Buchnera aphidicola*) (Shigenobu et al., 2000). Frekvence AT v genomech volně žijících bakterií a sekundárních symbiontů se pohybují kolem přibližně 50%.

Předpokládá se, že za změnu ve frekvencích nukleotidů je zodpovědný jednak tlak na ekonomičnost syntézy DNA, ale i poškození či ztráta mnohých reparačních genů, například genu pro *recA*. Tento enzym je esenciální komponentou při homologní rekombinaci (Moran,

1996, Shigenobu et al., 2000). Univerzální výskyt těchto změn v genomech primárních symbiontů byl v nedávné době potvrzen i osekvenováním celých genomů těchto organismů (Shigenobu et al., 2000, Akman et al., 2002, Degnan et al., 2005, Nakabachi et al., 2006). Můžeme tedy říci, že změny genomu těchto bakterií jsou dány především striktním vertikálním přenosem. Mezi tyto změny patří jednak snížená frekvence AT obsahu v genomu, dále snížení velikosti a celková degradace genomu. Tyto změny se v genomech symbiontů *Arsenophonus* a *Sodalis* převážně neuplatňují, výjimkou jsou známky počínající degradace genomu bakterie *Sodalis*. Můžeme tedy říci, že vznik těsného vztahu s hostitelem je u těchto bakterií nedávný. Protože k těmto typickým změnám v genomech zmíněných bakterií zatím nedošlo, nebyla brána možnost koevoluce těchto bakterií v potaz.

Použití alternativních markerů pro rekonstrukce fylogeneze

Je nepochybné, že molekula 16S rRNA změnila náš pohled na evoluci prokaryot. Ukazuje se ale, že její využití pro rekonstrukce evolučních událostí není neomezené. Četné rekonstrukce fylogenezí pro patogenní bakterie *Shigella* a *Escherichia coli* ukazují, že při analýzách fylogeneze blíže příbuzných prokaryotických organismů založených na sekvenování genu SSU je třeba postupovat obezřetně (například Martínez-Murcia et al., 1999). Důležitým faktorem úspěšnosti takovýchto fylogenetických analýz je určení homologických sekvencí ribozomálních genů a použití klonování jako způsobu získání sekvence rRNA (Pettersson et al., 1998).

Odhlédneme-li ale od problémů pramenících z uspořádání ribozomálních genů a působení mechanismu homogenizujícího tyto sekvence, je třeba vzít v úvahu i malé množství fylogeneticky využitelné informace, které se za krátkou dobu stačí v sekvenci 16S rRNA nashromáždit. Nedostatek informace je příčinou nerozlišených fylogenetických vztahů v získaných kladogramech (Cilia et al., 1996). Logickým postupem při analýze mezidruhových a vnitrodruhových příbuzenských vztahů prokaryot je použití jiného molekulárního markeru. Vhodný výběr takovéto sekvence v sobě nicméně skrývá mnoho potenciálních problémů:

- 1) Jedním z nich je laterální přenos genů prokaryot. Použití laterálně přenášených genů není pro účely fylogenetiky vhodné, protože analýza jejich sekvence neposkytuje informace o fylogenezi zkoumaného prokaryotního organismu. Těmito horizontálně přenosnými geny jsou sekvence, které umožňují přizpůsobení se bakterie na měnící se selekční tlaky, například geny pro metabolické funkce, toxiny, ostrovy patogenity a pod. (Planet 2002).
- 2) tento gen by měl být přítomen v buňce pouze v jedné kopii, aby tak došlo k zamezení vlivu intercistronické heterogenity
- 3) daná sekvence by měla být univerzálně přítomná
- 4) gen by měl obsahovat konzervativní i variabilní úseky, tedy domény s rozdílnou sekvenční rychlostí.

Vhodnými geny pro rekonstrukci bakteriální fylogeneze jsou tzv. housekeeping sekvence, jejichž použití umožňuje získat robustní fylogeneze prokaryot. Těmito geny jsou například *gapA*, *groEL*, *gyrA*, *rpoB* a další. Předpokládá se, že tyto sekvence jsou natolik nezbytné pro život bakteriální buňky, že k jejich laterálnímu přenosu nedochází (Wertz et al., 2003).

Alternativním markerem pro rekonstrukce fylogeneze blíže příbuzných organismů jsou například proteinové geny. Důvodem pro toto použití je zvýšená míra sekvenční evoluce oproti ribozomálním sekvencím. Tento fakt se projevuje prodloužením délky větví blíže

příbuzných druhů v porovnání s kladogramy, vytvořenými na základě sekvence 16S rRNA (Fukushima et al., 2002). Jedním z často používaných proteinových genů je *gyrA*. Tento gen kóduje B podjednotku topoisomerázy typu II a byl využit například pro vytvoření podrobnější taxonomické klasifikace linií rodu *Acetivobacter* (Yamamoto & Harayama 1996). Další výhodou použití tohoto genu je odolnost vůči horizontálnímu přenosu a téměř univerzální přítomnost v genomech prokaryot (Yamamoto & Harayama 1998).

Dalším alternativním markerem pro rekonstrukce fylogeneze prokaryot je 23S rRNA. Protože je sekvence tohoto genu delší oproti sekvenci *rrs* (délka sekvence *rrl* je přibližně 2,9 kb), obsahuje tento gen více potenciálně využitelné informace k rekonstrukci fylogeneze. Možným problémem je nicméně přítomnost menšího množství variabilních domén v sekvenci LSU. Tento fylogenetický marker přesto dokázal rozlišit fylogenetické vztahy některých blízkých příbuzných bakterií (Sallen et al., 1996). Další použití 16S rRNA a 23S rRNA sekvencí ukázalo, že oba fylogenetické markery umožňují často rozlišit vztahy mezi odlišnými mikroorganismy (Christensen et al., 1998).

Z recentních analýz mikrobiálních společenství vyplývá, že je možné rekonstruovat fylogenetické vztahy blízkých příbuzných mikroorganismů na základě jiných fylogenetických markerů, než 16S rRNA. Tyto sekvence poskytují v mnoha případech přesnější obraz fylogeneze daných organismů.

Jedním z těchto alternativních markerů je *rpoB*, gen pro β podjednotku RNA polymerázy. Kim et al. (1999) ukázali, že lze tento gen využít k rekonstrukci fylogeneze blízkých příbuzných bakterií rodu *Mycobacterium*. Tato analýza umožnila (narozdíl od fylogenetických markerů 16S a 23S rRNA) rozlišit fylogenetické vztahy mezi některými druhy (Stone et al., 1995). Jednou z výhod tohoto genu je jeho malá sekvenční velikost (306 bp), která umožňuje použití rychlého přímého sekvenování, oproti zdlohavější izolaci a sekvenaci několika variabilních úseků 16S rRNA. Gen *rpoB* byl použit také pro analýzu příbuzenských vztahů skupiny Enterobacteriaceae (Mollet et al., 1997). Kladogram *rpoB* vykazoval v porovnání s fylogenetickou analýzou na základě 16S rRNA delší větev. Tento gen také umožnil rozlišení bakterií *E. coli* a *Shigella*. Použití 16S neposkytlo rozlišení v rámci skupiny *Salmonella*, oproti tomu *rpoB* analýza ukázala skupinu *Salmonella* jako přirozenou, tedy monofyletickou skupinu. Analýza ukázala, že *rpoB* dokáže rozlišit i vztahy mezi *Shigella dysenteriae* a *Escherichia coli*, které se považují za zástupce jednoho druhu (Pupo et al., 2000). Ukazuje se tedy, že k analýzám fylogeneze prokaryot je často vhodné využít srovnání mezi několika fylogenetickými markery.

Závěr

Je dobře známo, že schéma fylogeneze získané sekvenováním určitého lokusu nemusí nutně zrcadlit evoluci daného organismu. Jednou z možných příčin této inkongruence je genetický polymorfismus ancestrálního druhu. Jestliže je k rekonstrukci fylogeneze využita pouze jedna alela (např. sekvence SSU), pak pravděpodobnost získání tzv. „správné fylogeneze“ prudce klesá, čím mělčeji se ve vztazích daných druhů pohybujeme (Pamilo & Nei 1988)*. Rekonstrukce fylogeneze symbiontů hmyzu jsou v současnosti postaveny především na amplifikaci určitého úseku sekvence DNA, tedy 16S rRNA. Ukazuje se, že při rekonstrukcích fylogeneze sekundárních symbiontů si musíme být tohoto faktu (a jeho možnými omezeními) velmi dobře vědomi. Jedním z artefaktů, které jsou spojeny s použitím 16S rRNA jako fylogenetického markeru, je retence ancestrálního polymorfismu. Tento artefakt může ovlivnit

* tato pravděpodobnost je dána vztahem $T_i = t_i / 2N$, kdy t_i je evoluční čas měřený v počtu generací pro daný i -tý uzel a N je efektivní velikost populace (Pamilo & Nei 1988). Jestliže je $T_i < 1$, pak je nutné zvýšit množství informace, např. přidáním dalších dat pro lokusy, které se vyvíjely nezávisle.

fylogenetické analýzy blízké příbuzných druhů, například skupin *Shigella* a *Escherichia*, a je známým problémem bakteriální fylogenetiky na nízké úrovni. Tento fakt však dosud nebyl zohledněn při fylogenetických rekonstrukcích sekundárních symbiontů. Jednou z možných příčin je soustředění zájmu symbiotických studií na primární symbionty, kteří umožňují nahlédnout do fylogenetických i molekulárních mechanismů spojených s přechodem k trvale obligatorní, intercelulární životní strategii (např. Wernegreen 2002).

Na příkladu symbiotických bakterií rodu *Arsenophonus* a *Sodalis* bylo ukázáno, že nezohlednění některých specifíků sekvencí ribozomálních genů, především mozaikovitosti molekuly, tedy přítomnosti ancestrálních a odvozených segmentů, dále pomalé sekvenční evoluce a nedostatečného samplingu může vést k zamítnutí koevolučního scénáře jako způsobu soužití symbionta a hostitele.

Tento fakt by měl být zohledněn v koevolučních studiích sekundárních symbiontů.

Zohlednění tohoto faktu by mělo vést k využití alternativních fylogenetických markerů, které se vyskytují pouze v jedné kopii na chromozomu bakteriální buňky, například genů kódujících proteinové sekvence (Mollet et al., 1997). Přestože Gogarten et al. (2002) namítají, že obecná shoda fylogenezí rekonstruovaných na základě proteinových a ribozomálních genů pouze reflektuje mozaikový charakter prokaryotního genomu, využití proteinových genů (např. *rpoB*) se často ukazuje jako vhodná alternativa pro rekonstrukce fylogenezí na nízké úrovni. Dalším možným postupem je například navýšení množství informace vstupující do analýzy, které by mohlo zvýšit věrohodnost získaných topologií (Nixon & Carpenter 1996) a využití metody zaklonování sekvence rRNA do vektoru (Edwards et al., 1989). Tato metoda umožňuje rozlišit intercistronickou heterogenitu mezi jednotlivými rrn. Tento postup spolu se sekvenováním všech ribozomálních operonů a přihlédnutím k jejich homologii by mohl vést k zpřesnění fylogenetických analýz introdruhových a mezidruhových vztahů prokaryot.

Literatura

- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M. (2004). Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *Journal of bacteriology*. 186(9), 2629–2635
- Akman, L., Rio, R. V. M., Beard, C. B., Aksoy, S. (2001). Genome Size Determination and Coding Capacity of *Sodalis glossinidius*, an Enteric Symbiont of Tsetse Flies, as Revealed by Hybridization to *Escherichia coli* Gene Arrays. *Journal of Bacteriology*. 143(15), 4517-4525
- Aksoy, S., Chen, X., Hypša, V. (1997). Phylogeny and potential transmission routes of midgut-associated endosymbionts of tsetse (Diptera: Glossinidae). *Insect Molecular Biology*. 6(2), 183-190
- Andersson, J. O., Andersson, S. G. E. (2000). Insights into the evolutionary process of genome degradation. *Current Opinion in Genetics & Development*. 9(6), 664-671.
- Anton, A. I., Martinez-Murcis, A. J., Rodriguez-Valera, F. (1999). Intraspecific diversity of the 23S rRNA gene and the spacer region downstream in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 181(9), 2703-2709
- Bremer, H., Dennis, P. P. (1987). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate, p. 1527–1542. *In* F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B.
- Bogusz, D., Appleby, C. A., Ladsmann, J., Dennis, E. S., Trinick, M., Peacock, J. (1988). Functioning haemoglobin genes in non-nodulating plants. *Letters to Nature*. 331(14), 176-181
- Boros, I., Kiss, A., Venetianer, P. (1979). Physical map of the seven ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Nucleic acid research*. 6(5), 1817-1830.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J., Noller, H. F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75(10), 4801–4805.
- Brown, D. D., Wensink, P. C., Jordan, E. (1972). A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *Journal of molecular biology*. 63(1):57-73.
- Buchner, P. (1965). *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Interscience, New York.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllorf, I., Holmstrom, C., Doolittle, W. F., Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and environmental microbiology*. 73(1), 278–288
- Christensen, H., Nordentoft, S., Olsen, J. E. (1998). Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*., 48, 605–610
- Cilia, V., B. Lafay, et al. (1996). "Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level." *Molecular Biology and Evolution* 13(3): 451-461.
- Clark, A. G., Whittam T. S. (1991). Sequencing Errors and Molecular Evolutionary Analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 744-752
- Clayton R., Sutton G., Hinkle P., Bult C., Fields Ch. (1995): Intraspecific Variation in Small-Subunit rRNA Sequences in GenBank: Why Single Sequences May Not Adequately Represent Prokaryotic Taxa, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 595–599

- Coenye, T. a P. Vandamme (2003). "Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes." *Fems Microbiology Letters* 228(1): 45-49.
- Condon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., Squires, C. L. (1995). rRNA Operon Multiplicity in *Escherichia coli* and the Physiological Implications of *rrn* Inactivation. *Journal of Bacteriology*. 177(14), 4152–4156
- Cvrčková, F. (2006). Úvod do praktické bioinformatiky. Akademia, Praha, 148 str.
- Dale, C., Maudlin, I. (1999). *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 267–275.
- Dale, C., Beeton, Harbison, C., Jones, T., Pontes, M. (2006). Isolation, Pure Culture, and Characterization of “*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*,” an Intracellular Secondary Endosymbiont from the Hippoboscid Louse Fly *Pseudolynchia canariensis*. *Applied and environmental microbiology*. 72(4), 2997–3004
- Degnan, P. H., Lazarus, A. B., Wernegreen, J. J. (2005). Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome research*. 15, 1023-1033
- Dennis, P. P. (1999). Expression of ribosomal RNA operons in halophilic archaea, *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. CRC Press, New York, N.Y. 319–329
- Dryden, S. C., Kaplan, S. (1990). Localization and structural analysis of the ribosomal RNA operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *Nucleic Acids Research*. 18(24), 7267-7277.
- Douglas, A. E. (1998) Nutritional interactions in insect -microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. *Annu. Rev. Entomol.* 48(1), 17-37
- Dover, G. (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*. 299, 111 - 117
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17(19), 7843–7853.
- Eickbush, T. H., Eickbush, D. G. (2007). Finally orchestrated movements: Evolution of the Ribosomal RNA. *Genetics*. 175, 477-485.
- Ellwood., M., Nomura, M. 1982. Chromosomal location of the genes for rRNA in *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* 149, 458–468.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A. et al (1995). Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *SCIENCE*. 269. 269 (5223), 496 – 512
- Fogel, C.R. Collins, J. L., Brunk, C. F. (1999). Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microbial ecology*. 38, 93–113
- Fukatsu, T., Koga, R., Smith, W. A., Tanaka, K., Nikoh, N., Sasaki-Fukatsu, K., Yoshizawa, K., Dale, C., Clayton, D. H. (2007). Bacterial Endosymbiont of the Slender Pigeon Louse, *Columbicola columbae*, Allied to Endosymbionts of Grain Weevils and Tsetse Flies. *Applied and environmental microbiology*. 73(20), 6660-6668

- Fukushima, M., Kakinuma, K., Kawaguchi, R. (2002). Phylogenetic Analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* Strains on the Basis of the *gyrB* Gene Sequence. *J Clin Microbiol.* 40(8), 2779–2785.
- Funk, D. J., Helbling, L., Wernegreen and Nancy A. Moran (2000). Intraspecific phylogenetic congruence among multiple symbiont genomes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267, 2517-2521
- García-Martínez, J., Martínez-Murcia, A., Antón, A. I., Rodríguez-Valera, F. (1996). Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. *Journal of bacteriology.* 178(21), 6374–6377
- Garrity G. M. (2001): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition, Volume 2: The Proteobacteria, part A, An Introductory Essays; New York, Springer
- Geiger, A., Cuny, G., Frutos, R. (2005). Two Tsetse Fly Species, *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina morsitans morsitans*, Carry Genetically Distinct Populations of the Secondary Symbiont *Sodalis glossinidius*. *Applied and environmental microbiology.* 71(12), 8941–8943
- Goebel, W., Gross, R. (2001) Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. *TRENDS in Microbiology*, 9(6)267-273
- Gogarten, J. P., Doolittle, W. F., Lawrence, J. G. (2002). Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer. *Molecular Biology and Evolution* 19(12), 2226-2238
- Gunderson, J. H., Sogin, M. L., Wollett, G., Hollingdale, M., de la Cruz, V. F., Waters, A. P., McCutchan, T. F. (1987). Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science.* 238(4829), 933-7.
- Harmsen, D., Rothgänger, J., Frosch, M., Albert, J. (2002). RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms Database. *Nucleic Acids Research.* 30(1), 416-417
- Hypša, V., Dale, C. (1997). In vitro culture and phylogenetic analysis of "*Candidatus Arsenophonus triatominarum*," an intracellular bacterium from the Triatomine bug, *Triatoma infestans*. *International journal of systematic bacteriology.* 47(4), 1140-1144.
- Jeon, K.W. (1972). Development of cellular dependence on infective organisms: micrurgical studies in amoebas. *Science* 179, 1123–1129.
- Kanagawa, T. (2003). Bias and Artifacts in Multitemplate Polymerase Chain Reactions (PCR). *Journal of Bioscience and engineering.* 96(4), 317-323.
- Kim, B.-J., Lee, S.-H., Lyu, M.-A., Kim, S.-J., BAI, G.-H., Kim, S.-J., CHae, G.-T., Kim, E.-C., Cha, C.-Y., Kook, Y. H. (1999). Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). *Journal of Clinical biology.* 37(6), 1714–1720.
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., Schmidt, T. M. (2000). rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Applied and environmental microbiology.* 66(4), 1328–1333.
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., Schmidt T. M. (2001). rrndb: The ribosomal RNA ribosomal operon copy number database. *Nucleic Acid Research*, 29(1), 181-184
- Klappenbach, J. A. rrnDB[online]. c2001 [cit. 8. 5. 2008]. Dostupný na World Wide Web: < <http://ribosome.mmg.msu.edu/rrndb/about.php> >

- Kwiatowski, J., D. Skarecky, S. Hernandez, D. Pham, F. Quitas, and F. J. Ayala (1991). High fidelity of the polymerase chain reaction. *Mol. Biol. Evol.* 8:884-887.
- Lambert, J. D., Moran, N. A. (1998). Deleterious mutations destabilize ribosomal RNA in endosymbiotic bacteria. *Evolution.* 95(8), 4458-446
- Lefevre, C., H. Charles, et al. (2004). "Endosymbiont phylogenesis in the Dryophthoridae weevils: Evidence for bacterial replacement." *Molecular Biology and Evolution* 21(6): 965-973.
- Liao, D. (2000). Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archaea. *Journal of molecular evolution.* 51(4), 305-17
- Lipthay, J- R., Enzinger, Ch., Johnsen, K., Aamand, J., Sørensen, S. J. (2004). Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil biology and biochemistry.* 36(10), 1607-1614.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 155-173
- Luz, S. P., Rodríguez-Valera, F., Lan R., ² and Reeves, P. R. (1998). Variation of the Ribosomal Operon 16S-23S Gene Spacer Region in Representatives of *Salmonella enterica* Subspecies. *Journal of bacteriology.* 180(8), 2144-2151.
- Marchandin, H., Teyssier, C., de Buochberg, M. S., Jean-Pierre H., Carriere, C., Jumas-Bilak, E. (2003). Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Society for General Microbiology.* 149, 1493-1501
- Margulis, L. (1970). *Origin of eucaryotic cell.* Yale University Press, New Haven, CT
- Martínez-Murcia, A. J., Antón, A. I., Rodriguez-Valera, F. (1999). Patterns of sequence variation in two regions of the 16S rRNA multigene family of *Escherichia coli*. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 49, 601-610
- Mira, A., Ochman, H., Moran, N. A. (2001). Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends in genetics.* 17(10), 589-596
- Mollet, C., Drancourt, M., Didier, R. (1997). Novel basis for bacterial identification. *Molecular Biology.* 26(5), 1005-1011.
- Morandi, A., O. Zhaxybayeva, et al. (2005). "Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains." *Journal of Bacteriology* 187(18): 6561-6564.
- Moran, N. and Baumann, P. (1994). Phylogeny of cytoplasmically inherited microorganisms in arthropods. *Trends Ecol. Evol.* 9, 15–20.
- Moran, N. A. (1996). Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 2873-2878
- Moran, N. A., Telang, A. (1998). Bacteriocyte-Associated Symbionts of Insects. *Bioscience.* 48 (4), 295-304

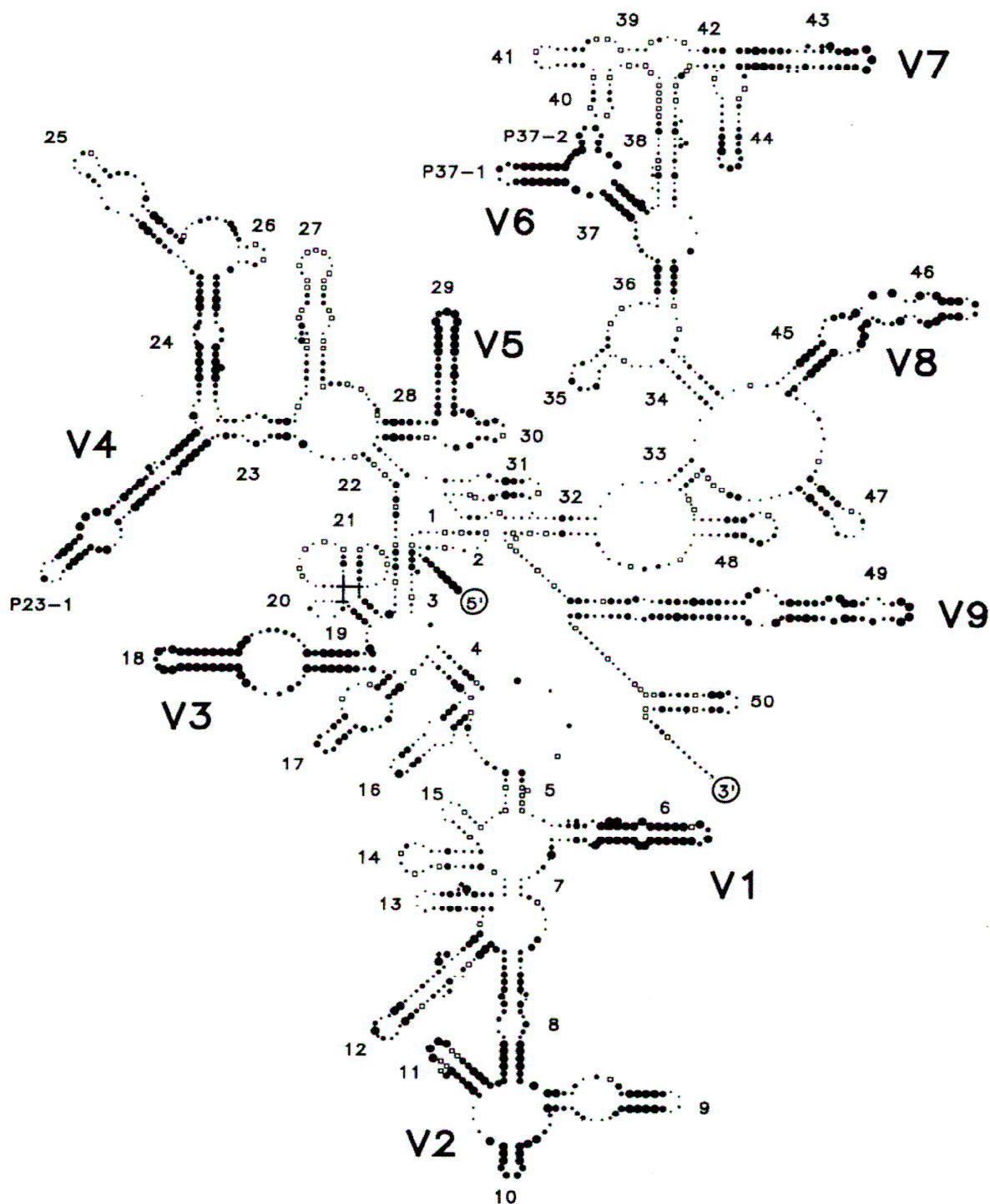
- Moran, N. A., Baumann, P. (2000). Bacterial endosymbionts in animals. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 270–275.
- Moran, N. A. (2006). Symbiosis. *Current biology.* 16(20), 866-871.
- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H. E., Moran, N. A., Hattori, M. (2006). The 160-Kilobase Genome of the Bacterial Endosymbiont *Carsonella*. *Science*, 314(13), 267
- Nixon, K. C., Carpenter, J. M. (1996). On simultaneous analysis. *Cladistics.* 12, 221–241
- Nei, M., Rooney, A. P. (2005). Concerted and Birth-and-Death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet.* 39, 121-152
- Neefs, J.-M., de Peer, Y.-V., de Rijk, P., Chapelle, S., De Wachter, R. (1993). Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Research.* 21(13), 3025-3049
- Novakova, E. and V. Hypsa (2007). "A new *Sodalis* lineage from bloodsucking fly *Craterina melbae* (Diptera, Hippoboscoidea) originated independently of the tsetse flies symbiont *Sodalis glossinidius*." *Fems Microbiology Letters* 269(1): 131-135.
- Novotný, V., Basset, Y., Miller, S. E., Welblen, G. D., Birgitta, B., Cizek, L., Drozd, P., Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. *Nature.* 416:841-844
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W., Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 178(19), 5636–5643.
- Ohta, T. (1991). Multigene families and the evolution of complexity. *J Mol Evol.* 33, 34-41
- Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *PNAS.* 100(4), 1803–1807
- Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* 276, 734-741
- Pamilo, P., Nei, M. (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Mol. Biol. Evol.* 5(5), 568-83
- Pang, H., Winkler, H. H. (1993). Copy Number of the 16S rRNA Gene in *Rickettsia prowazekii*. *Journal of bacteriology*, 175 (12), 3893-3896
- Pettersson, P., Bölske, G., Thiaucourt, F., Uhlén, M., Johansson, K.-E. (1998). Molecular Evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* Strains, Based on Polymorphisms in the 16S rRNA Genes. *J Bacteriol.* 180(9), 2350–2358.
- Planet, P. J. (2002). Reexamining microbial evolution through the lens of horizontal transfer. *Molecular systematics and Evolution: Theory and Practice.* Birkhauser Verlag (92), 247-303.
- Polz, M. F. and C. M. Cavanaugh (1998). "Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR." *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 3724-3730.
- Pupo, G. M., Lan., R., Reeves, P. R. (2000). Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *PNAS.* 97(19), 10 567-10572

- Russell H. Vreeland R. H., Straight, S., Krammes J., Dougherty, K., Rosenzweig W. D., Kamekura, M., (2002). *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. *Extremophiles* 6:445–452
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., Mabilat, C. (1996). Comparative Analysis of 16S and 23S rRNA Sequences of *Listeria* Species. *International journal of systematic bacteriology*. 46(3), 669–674
- Sapp, J. (2005). *The bacterium place in nature. Microbial phylogeny and evolution. Concepts and controversies.* Oxford university press. 317 str.
- Santoyo, G., Romero, D. (2004). Gene conversion and concerted evolution in bacterial genomes. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 169–183
- Sanz, J. L., Marin, I., Ramirez, L., Abadl, A. P., Smith, C. L., Amils, R. (1988). Variable rRNA gene copies in extreme halobacteria. *Nucleic Acids Research*. 16(16), 7827-7832
- Scarborough, C. L., Ferrari, J., Godfray, H. C. J. (2005). Aphid Protected from Pathogen by Endosymbiont. *Science*, 310(5755), 1781
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., Whittam, T. S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*. 51(5), 873–884.
- Shao, Z., Mages, W., Schmitt, R. (1994). A Physical Map of the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex pyrophilus* Chromosome. *Journal of bacteriology*. 176(21), 6776-6780.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., Ishikawa, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* 407, 81–86
- Spaulding, A. W., von Dohlen, C. D. (2001). Psyllid endosymbionts exhibit patterns of co-speciation with hosts and destabilizing substitutions in ribosomal RNA. *Insect Molecular Biology*. 10(1), 57–67
- Stone, B. B., R. M. Nietupski, G. L. Breton, and W. G. Weisburg (1995). Comparison of *Mycobacterium* 23S rRNA sequences by high-temperature reverse transcription and PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 45, 811–819.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406, 959-964.
- Šorfová, P., Škeříková, A., Hypša, V. (2008). An effect of 16S rRNA intercistronic variability on coevolutionary analysis in symbiotic bacteria: molecular phylogeny of *Arsenophonus triatominarum*. *Systematic and Applied microbiology*, in press.
- Thao, M. L., Clark, M. A., Burckhardt, D. H., Moran, N. A., Baumann, P. (2001). Phylogenetic Analysis of Vertically Transmitted Psyllid Endosymbionts (*Candidatus Carsonella ruddii*) Based on *atpAGD* and *rpoC*: Comparisons with 16S–23S rDNA-Derived Phylogeny. *Current microbiology*. 42, 419–421
- Thao, M. L., and P. Baumann. 2004. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Curr. Microbiol*. 48:140-144.

- Toh, H., Weiss, B. L., Perkin, S. A. H., Yamashita, A., Oshima, K., Hattori, M., Aksoy, S. (2006). Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. *Genome Res.* 16, 149-156
- Tourova, T. H. (2002). Copy Number of Ribosomal Operons in Prokaryotes and Its Effect on Phylogenetic Analyses. *Microbiology.* 72(4), 389–402
- Trowbridge, R. E., Dittmar, K., Whiting, M. F. (2005). Identification and phylogenetic analysis of Arsenophonus- and Photorhabdus-type bacteria from adult Hippoboscidae and Streblidae (Hippoboscoidea). *Journal of intervertebrate pathology.* 91(1), 64-68
- Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T., Kataoka, M. (1999). Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *Journal of bacteriology.* 181(1), 78-82.
- Wernegreen, J. J., Moran, N. A. (1999). Evidence for genetic drift in endosymbionts (Buchnera): Analyses of protein coding genes. *Mol. Biol. Evol.* 16(1), 83-97.
- Wernegreen, J. J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics,* 3, 850-861
- Wertz, J. E., Goldstone, C., D. M, Riley, M. A. (2003). A molecular phylogeny of enteric bacteria and implication for a bacterial species concept. *Journal of evolutionary biology* 16, 1236-1248
- Woese, C., Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(11), 5088-5090.
- Woese, C. R., Magrún, L. J., Gupta, R., Siegel, R. B., Stahl, D. A. (1980). Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucleic Acids Research* 8(10), 2275-2293
- Woese, C. R. (1987). "Bacterial evolution." *Microbiological Reviews* 51(2): 221-271.
- Woese, C., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990a). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 4576-4579
- Woese, C. R., Winkers, T. S., Gutell, R. R. (1990b). Architecture of ribosomal RNA: Constraints on the sequence of "tetra-loops" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 8467-8471
- Yap, W. H., Zhang, Z., Wang Y. (1999). Distinct Types of rRNA Operons Exist in the Genome of the Actinomycete *Thermomonospora chromogena* and Evidence for Horizontal Transfer of an Entire rRNA Operon. *Journal of Bacteriology,* 181 (17), 5201–5209
- Yamamoto, S., Harayama, S. (1996). Phylogenetic Analysis of *Acinetobacter* Strains Based on the Nucleotide Sequences of *gyrB* Genes and on the Amino Acid Sequences of Their Products. *International journal of systematic bacteriology.* 46(2), 506–511
- Yamamoto, S., Harayama, S. (1998). Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 48, 813–819
- Zuckerandl, E., Pauling. L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of theoretical biology.* 8(2), 357-366
- Zreik, L., Bove, J. M., Garnier, M. (1998). Phylogenetic characterization of the bacterium-like organism associated with marginal chlorosis of strawberry and proposition of a *Candidatus* taxon for

the organism, '*Candidatus Phlomobacter fragariae*' International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 257–261

Dodatek



Obr. 9: Model sekundární struktury SSU prokaryot. Jednotlivé pozice jsou rozděleny do pěti skupin podle vzrůstající substituční rychlosti. Substituční rychlost na jednotlivých pozicích je vyznačena vzrůstajícím průměrem jednotlivých kroužků (příčměm větší průměr znamená vyšší substituční rychlost), invariantní pozice jsou znázorněny jako čtverce. Nejvariabilnější domény jsou označeny jako V1 - V9. Helikální struktury jsou očíslovány 1-50. Helikální struktury charakteristické pro prokaryota jsou označeny **P a-b**, přičemž **a** odkazuje k číslu předcházející helikální struktury, **b** označuje helikální struktury v rámci těchto struktur charakteristických pro Prokaryota (např. P37-1 a P37-2 jsou včleněny mezi helikální struktury 37 a 40). Příkladem helixu, který je značně konzervovaný, je helix č. 15. Převzato (Neefs et al., 1993).