

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

FYLOGENEZE V RÁMCI ČELEDI OOCYSTACEAE
(CHLOROPHYTA)

Bakalářská práce



Vypracovala: Lenka Štenclová

Školitelka: Mgr. Marie Pažoutová, Ústav půdní biologie AV ČR

České Budějovice 2011

Štenclová L. (2011): Fylogeneze v rámci čeledi Oocystaceae (Chlorophyta). [Phylogeny inside family Oocystaceae (Chlorophyta). Bc. Thesis, in Czech] Faculty of Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Abstract

The family Oocystaceae (phylum Chlorophyta, class Trebouxiophyceae) is a group of green coccal algae. Its members are mainly freshwater and planctonic. The group is characteristic by its specific cell shape and arrangement of cellulosal fibril in the cell wall. Monophyly of the group is well supported by morphologic and ultrastructural observation and also by molecular phylogeny, but the generic and species concept of the family has been changed due to the molecular analyses in last decades.

In this thesis, seven strains of Oocystaceae and one strain assigned to Scenedesmaceae were observed by light microscopy and studied by molecular methods. 18S rRNA gene sequences were gained for four strains and then analyzed by three phylogenetic methods. Phylogenetic positions were found and compared with morphology. *Willea* sp. was removed from Scenedesmaceae to Oocystaceae, the position of *Lagerheimia*, *Oocystis* cf. *bispora* and *Oocystis* cf. *pusilla* inside Oocystaceae was confirmed

Prohlášení

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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 1. 2011

Lenka Štenclová

Poděkování

Děkuji především své školitelce Marušce Pažoutové, za vedení této práce. Dále taky celému kolektivu algologů z botanické vily za pomoc a cenné rady. Děkuji svým rodičům Olze Štenclové a Břetislavu Štenclovi, svému příteli Janu Randlískovi a všem svým přátelům za podporu a vytváření příjemného zázemí.

Obsah

| | |
|--|-----|
| Abstract | II |
| Prohlášení | II |
| Poděkování | III |
| Obsah..... | IV |
| 1. Úvod..... | 1 |
| 1.1. Téma této práce | 1 |
| 1.2. Cíle práce | 1 |
| 1.3. Vymezení čeledi Oocystaceae | 1 |
| 1.4. Zařazení čeledi v rámci Chlorophyta..... | 2 |
| 1.5. Historie čeledi..... | 4 |
| 1.5.1. Vznik čeledi, typový rod a typový druh čeledi | 4 |
| 1.5.2. Předmolekulární stav – vymezení čeledi podle morfologie a ultrastruktury..... | 4 |
| 1.5.3. Molekulární revize | 5 |
| 1.6. Otázky vyplývající ze současného stavu čeledi Oocystaceae..... | 8 |
| 1.7. Variabilita morfologicky významných znaků | 9 |
| 1.7.1. Znak zkoumané u kokálních řas..... | 9 |
| 1.7.2. Variabilita znaků u čeledi Oocystaceae..... | 9 |
| 2. Metodika | 13 |
| 2.1. Materiál..... | 13 |
| 2.2. Kultivace..... | 13 |
| 2.3. Morfologie | 14 |
| 2.4. Molekulární biologie | 14 |
| 2.5. Fylogenetická analýza molekulárních dat | 15 |
| 3. Výsledky | 17 |
| 3.1. Morfologie | 17 |
| 3.2. Sekvence | 19 |

| | |
|--|----|
| 3.3. Molekulární fylogenetika | 20 |
| 4. Diskuze | 21 |
| 4.1. Morfologie | 21 |
| 4.2. Sekvenace | 23 |
| 4.3. Molekulární fylogenetika | 23 |
| 4.4. Konfrontace molekulární analýzy a morfologických pozorování | 24 |
| 4.5. Přehodnocení některých morfologických znaků na základě molekulárních analýz.. | 26 |
| 5. Závěr | 28 |
| 6. Literatura..... | 29 |
| 7. Přílohy..... | 35 |
| 7.1. Příloha 1: Seznam kmenů | 35 |
| 7.2. Příloha 2: Přehled a určovací kritéria pro rody čeledi Oocystaceae podle Komárka a Fotta (1983) | 36 |
| 7.3. Příloha 3: Tabulka současného stavu čeledi Oocystaceae..... | 45 |
| 7.4. Příloha 4: Obrazové tabule | 47 |

1. Úvod

1.1. Téma této práce

Tato práce se zabývá systematikou kokálních zelených řas z čeledi Oocystaceae. Zelené řasy (oddělení Chlorophyta) jsou jednou z hlavních skupin řas a přes své mikroskopické rozměry se významně podílí na primární produkci např. ve sladkovodním prostředí. V průběhu minulého století docházelo v systematice zelených řas, původně založené na morfologických znacích, k poměrně zásadním změnám například studiím buněčné ultrastruktury, v posledních desetiletích pak zejména rozšířením molekulárních metod. Molekulární data a kladistické analýzy vedly u mnoha skupin zelených řas k přehodnocení tradičního systému (Pröschold and Leliart 2007). Čeď Oocystaceae představuje z hlediska molekulární fylogenetiky poměrně málo studovanou skupinu. Cíleně se jí zabývaly pouze tři práce (Hepperle et al. 2000, Pažoutová a kol. 2010, Krienitz and Bock, in press). Dílčí poznatky k fylogenezi čeledi Oocystaceae přináší také Krienitz et al. (2003), Krienitz et al. (2004), Wolf et al. (2003), Fawley et al. (2004). Současný stav poznání této velmi početné čeledi řas tak poskytuje mnoho otázek pro další výzkum.

1.2. Cíle práce

Bakalářská práce *Fylogeneze v rámci čeledi Oocystaceae* má jednak rešeršní část, která by měla být souhrnným přehledem dosavadních morfologických, ultrastrukturních a molekulárně fylogenetických poznatků ohledně taxonomie zelených řas čeledi Oocystaceae a jednak část praktickou – experimentální. V rámci experimentální části práce je cílem morfologický popis vybraných kmenů čeledi Oocystaceae podle mikroskopických pozorování a konfrontace výsledků s dřívějšími pozorováními. Dalším cílem je sekvenace těchto kmenů, zjištění jejich fylogenetické pozice a konfrontace molekulárních výsledků s tradičním taxonomickým systémem.

1.3. Vymezení čeledi Oocystaceae

Čeď Oocystaceae zahrnuje převážně planktonní zelené kokální řasy, vyskytující se především ve sladkých vodách temperátní oblasti. Její zástupci žijí jednotlivě nebo utvářejí slizem obalené kolonie. Jednotlivé buňky se vyznačují vřetenovitým, vejčitým až oválným tvarem, někdy s mírnou asymetrií. Rozmnožování bylo pozorováno především nepohlavní pomocí autospor. Dva zástupci (*Eremosphaera viridis* a *Oocystaenium elegans*) se

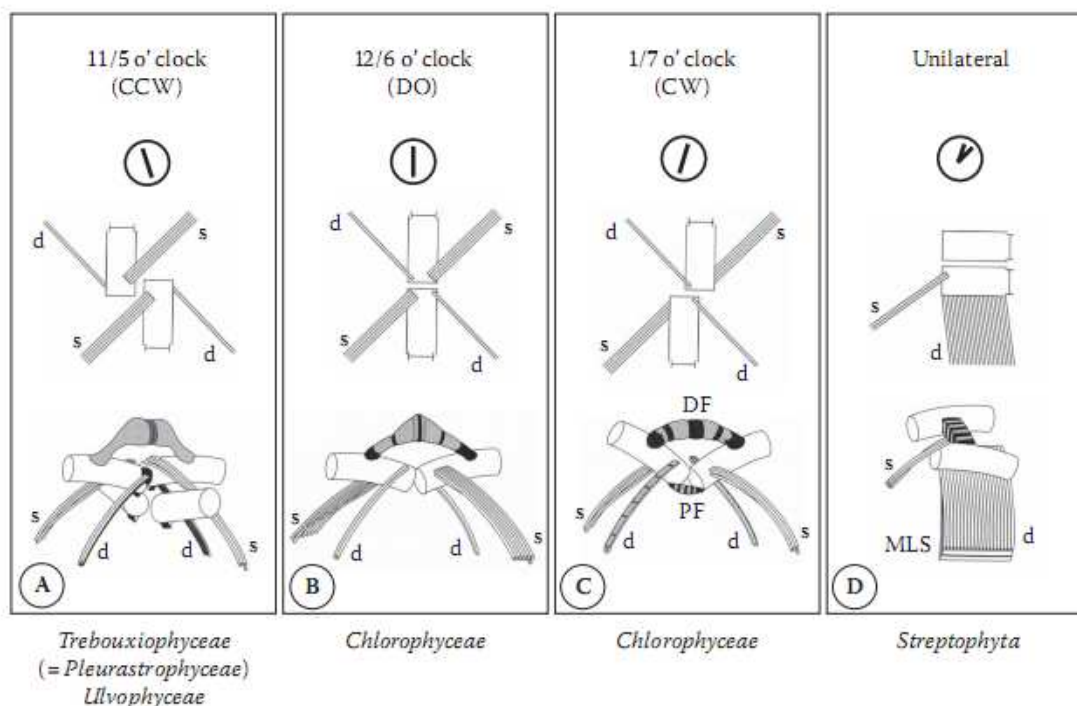
rozmnožují také pohlavně - oogamií. Dceřiné buňky často zůstávají určitou dobu nebo i celý život uzavřeny v mateřské buněčné stěně. Specifickým znakem zástupců čeledi Oocystaceae je absence sporopoleninové vrstvy v buněčné stěně a zvláštní struktura buněčné stěny, která je mnohvrstevná, přičemž každá její vrstva má krystalické fibrily celulózy orientované kolmo ke směru vláken vrstvy předchozí. (Komárek a Fott 1983)

Tato struktura buněčné stěny byla prvně objevena u rodu *Eremosphaera* (Bowen 1965). Později byla nalezena také u typového rodu čeledi, rodu *Oocystis* (Schnepf et al. 1966). Dodnes je známa u tří druhů tohoto rodu (*Oocystis apiculata* (Robinson and White 1972), *O. solitaria* (Schnepf et al. 1966) a *O. lacustris* (Stoyneva et al. 2009)) a tří dalších zástupců čeledi (*Lagerheimia subsalsa* (Hegewald et al. 1978), *Franceia amphitricha* (Hegewald et al. 1980) a *Neglectella peisonis* (Schagerl 1993)). Komárek (1979) označil tuto strukturu za hlavní společný znak čeledi Oocystaceae, který použil k její redefinici.

1.4. Zařazení čeledi v rámci Chlorophyta

Tradiční dělení zelených řas bylo založeno na morfologii. Podle organizačního stupně vegetativních stadií řas vytvořili Blackman and Tansley (1902) systém šesti řádů (Volvocales, Chlorococcales, Ulotrichales, Chaetophorales, Cladophorales a Siphonocladales). Čeleď Oocystaceae byla autory zařazena do řádu Chlorococcales, v němž byly sdruženy všichni kokální zástupci kmene Chlorophyta. Později se stal kritériem pro tvorbu systému Chlorophyta životní cyklus a stavba bičíkatých stadií. Ustanoveno bylo sedm tříd: Prasinophyceae, Chlamydoephyceae, Chlorophyceae, Codiolophyceae, Oedogoniophyceae, Bryopsidophyceae a Zygnematophyceae. Čeleď Oocystaceae byla zařazena do Chlorophyceae (Christensen 1962).

Novější ale stále ještě předmolekulární členění Chlorophyta bylo vytvořeno na základě postavení bazálního tělíska bičíků – tzv. absolutní konfigurace (znázorněno na obr. 1) a způsobu rozdělení buňky při mitóze. Zřízeno bylo pět tříd (Prasinophyceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, Ulvophyceae a Charophyceae – dnes Streptophyta (Lewis and McCourt 2004)) (Mattox and Stewart 1984). Přestože zástupci čeledi Oocystaceae bičíky nedisponují, byla Komárkem a Fottem (1983) vymezená čeleď Oocystaceae zařazena do třídy Trebouxiophyceae.



Obr. 1: Absolutní konfigurace postavení bičků jednotlivých tříd zelených řas podle Pröschold and Leliart (2007). Soustava se skládá z dvou nebo čtyř bazálních tělísek (znázorněných jako válce), mikrotubulárních ukončení (s nebo d) a spojujících vláken (distální - DF nebo proximální - PF).

(A) Bičkový aparát s křížovitými zakončeními bičků a basálními tělísky uspořádanými v counterclockwise (CCW) pozici (*Trebouxiophyceae* a *Ulvophyceae*). (B) Bičkový aparát s křížovitými zakončeními bičků a directly opposed (DO) postavení bazálních tělísek (*Chlorophyceae*). (C) Bičkový aparát s clockwise (CW) uspořádáním bazálních tělísek (*Chlorophyceae*). (D) Bičkový aparát s asymetrickým unilaterálním uspořádáním bičkových zakončení, tvořících charakteristickou vícevrstevnou strukturu (multilayered structure – MLS) (*Streptophyceae* - dnes *Streptophyta* (Lewis and McCourt 2004)). Pozn.: třída *Prasinophyceae* absolutní konfiguraci postrádá.

Dělení *Chlorophyta* do těchto pěti skupin i správnost zařazení čeledi *Oocystaceae* do třídy *Trebouxiophyceae* byla ověřena molekulárními analýzami sekvencí genu pro 18S rRNA (Friedl 1995, Hepperle et al. 2000). Srovnáním genomu chloroplastů *O. solitaria*, *Parachlorella kessleri* a jednobičkaté řasy *Pedinomonas minor* potvrdili Turmel et al. (2009) příslušnost řádu *Chlorellales* (zahrnujícího čeled' *Oocystaceae* a její sesterskou, také bezbičkatou čeled' *Chlorellaceae*) ke skupině *Trebouxiophyceae*. Absenci bičků u *Oocystaceae* považují Turmel et al. (2009) za odvozený znak.

1.5. Historie čeledi

1.5.1. Vznik čeledi, typový rod a typový druh čeledi

Historicky první zmínkou o *Oocystis* bylo použití pojmenování „*Oocystis*“ *geminata* jako synonymní k *Gleocapsa geminata* (Kützing 1849 citováno v Řeháková (1969)). Prvním regulérním zástupcem dnešní čeledi Oocystaceae byla ustanovena *O. naegelii*, zároveň označená jako typ rodu *Oocystis* (A. Braun 1855 citováno v Řeháková (1969)). Pro nedostatečný popis druhu *O. naegelii* později Řeháková (1969) ve své studii označila jako typ rodu *O. lacustris*. Tato retypifikace nedodržela pravidla botanického kódu (Lanjouw et al. 1954) a proto nebyla pozdějšími autory respektována. Komárek a Fott (1983) uznávají *O. naegelii* jako typ také na základě dodatečného studia materiálu, které provedl Skuja (1964). Čeleď samotná s typovým rodem *Oocystis* byla ustanovena v práci Bohlin (1901) a naposledy pomocí ultrastrukturních znaků redefinována v práci Komárek (1979).

1.5.2. Předmolekulární stav – vymezení čeledi podle morfologie a ultrastruktury

Vymezení čeledi samotné se v průběhu minulého století několikrát výrazně změnilo. Někteří autoři udávali rody blízké rodu *Oocystis* pouze jako podčeleď Chlorellaceae. Později došlo k utvoření samostatné čeledi se značně širokým vymezením zahrnujícím i další rody dnes řazené do jiných čeledí. Tyto rody, jako např. *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Radiococcus*, *Kirchneriella* či *Planktosphaeria*, se zástupci čeledi Oocystaceae sdílí rozmnožování pomocí autospor, ale morfologicky, např. tvarem buňky se odlišují (Smith 1950). Jiné vymezení a členění čeledi Oocystaceae použil Fott (1967), který ji rozdělil na čtyři podčeledi: Chlorelloideae (např. rody *Chlorella*, *Siderocelis*), Oocystoideae (*Oocystis*, *Nephrocystium*, *Kirchneriella*, *Glaucocystis*), Lagerheimioideae (*Lagerheimia*, *Chodatella*, *Franceia*) a Tetraedronoideae (*Tetraedron*).

Poslední velkou revizí a vymezením čeledi se zabývali Komárek a Fott (1983), kteří vytvořili komplexní přehled rodů a druhů patřících do této čeledi. Jednotlivé rody byly autory rozděleny do tří, resp. čtyř podčeledí podle morfologických znaků. Přítomnost ostnů je charakteristická pro podčeleď Lagerheimioideae, která je dále podle počtu a uspořádání ostnů dělena do 10 rodů (*Mycotetraedron*, *Trochiscia*, *Micracantha*, *Cryocystis*, *Pseudobohlinia*, *Franceia*, *Chodatellopsis*, *Lagerheimia*, *Diacanthos* a *Pilidiocystis*). Podčeleď Oocystoideae se vyznačuje hladkou buněčnou stěnou a jedním nebo několika chloroplasty. Zahrnuje 17

rodů (*Rhombocystis*, *Fusola*, *Sestosoma*, *Echinocoleum*, *Granulocystis*, *Granulocystopsis*, *Gleotaenium*, *Ecdysichlamys*, *Fotterella*, *Oocystidium*, *Oocystis*, *Oonephrys*, *Chondrosphaera*, *Neglectella*, *Nephrocytium*, *Juranyiella* a *Nephrochlamys*). Další podčeleď Eremosphaeroideae obsahuje pouze 3 rody (*Oocystaenium*, *Eremosphaera* a *Excentrosphaera*), pro něž je charakteristická hladká buněčná stěna a početné chloroplasty. Vymezení tří podčeledí a klíč k určování rodů Oocystaceae podle Komárka a Fotta (1983) je uveden v příloze 2.

Výčet rodů patřících do čeledi Oocystaceae doplnil Heynig (1991) o rod *Oocystopsis* a Schagerl (1993) o rod *Neglectella*. Podle morfologických pozorování (Hindák a Hindáková 2008) by měl být do čeledi Oocystaceae umístěn typový druh rodu *Amphikrikos* – *A. minutissimus* a s ním celý rod.

V publikaci od Komárka a Fotta (1983) patří do čeledi Oocystaceae ještě jedna podčeleď - Glaucocystoideae zahrnující rody *Glaucocystis* a *Glaucocystopsis*, ale i podle autorů samotných se jedná o zařazení provizorní. Podčeleď Glaucocystoideae byla do Oocystaceae umístěna pro svou podobnost tvaru buňky a setrvávání dceřiných buněk v rozšířené buněčné stěně mateřské buňky (Komárek a Fott 1983). Pozdější ultrastrukturní studie tuto skupinu z čeledi Oocystaceae vyčlenily. Dnes jsou zástupci „Glaucocystoideae“ řazeni do samostatného kmene Glaucophyta lišícího se od všech zelených řas především odlišnou stavbou golgiho aparátu a přítomností cyanel, zvláštních struktur představujících mezistupeň mezi sinicí a plastidem (Kies 1979, Kies and Krener 1986).

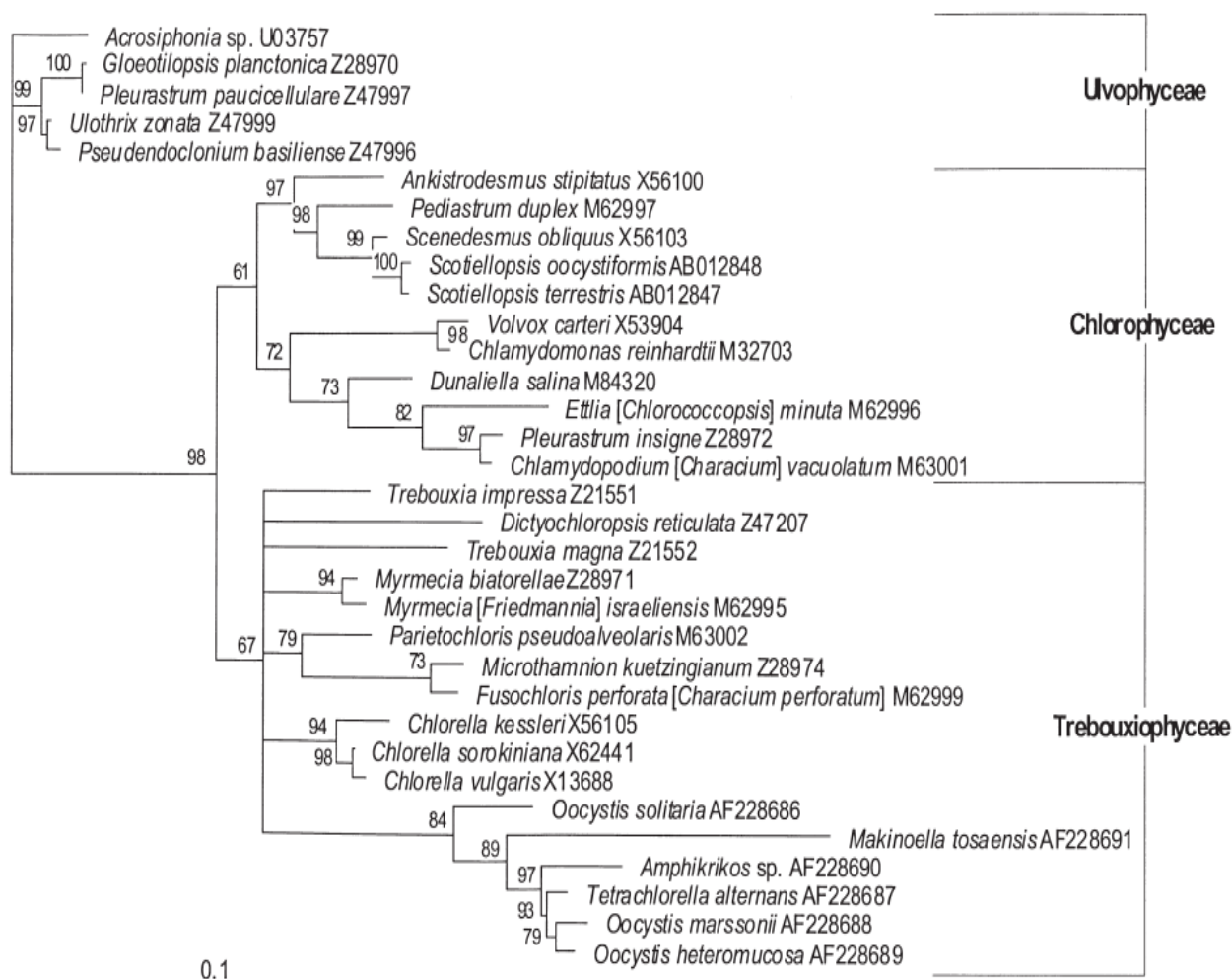
1.5.3. Molekulární revize

Rozvoj molekulárních metod v 90. letech minulého století s sebou přinesl vlnu revizí v celém systému živé přírody (Simpson and Rogers 2004), zelené řasy nevyjímaje (např. Friedl 1995).

Vyčlenění kmene Glaucophyta (jehož zástupci byli dříve do Oocystaceae řazeny) na základě ultrastrukturálních dat bylo potvrzeno analýzou sekvencí genu pro 18S rRNA, která sdružila zástupce kmene do monofyletické skupiny sesterské ke kmeni Cryptophyta (Bhattacharya et al. 1995). Toto uspořádání podporuje i monofyletický původ cyanel těchto zástupců (Helmchen et al. 1995).

První fylogenetická studie zabývající se přímo čeledí Oocystaceae (Hepperle et al. 2000) zkoumala postavení tří druhů rodu *Oocystis* (*O. solitaria*, *O. marssonii* a *O.*

heteromucosa). Ukázalo se, že rod je parafyletický. Druh *O. solitaria* se umístil na bázi čeledi, zatímco vzájemně sesterské *O. marssonii* a *O. heteromucosa* tvoří relativně dobře podpořenou samostatnou linii. Tato práce také rozšířila pojetí čeledi Oocystaceae o několik nových druhů (viz obr. 2). Došlo k přeřazení druhu *Tetrachlorella alternans*, (původně Scenedesmaceae, Crucigenoideae *sensu* Komárek a Fott (1983) na základě tvorby čtyřčetných coenobií). V souladu s morfologickou studií Hindák a Hindáková (2008) byl do čeledi Oocystaceae zahrnut také *Amphikrikos* sp. (původně Chlorellaceae *sensu* Komárek a Fott (1983)). *Makinoella tosaensis*, z čeledi Oocystaceae (Okada 1949) přemístěná Komárkem a Fottem (1983) na základě tvorby coenobií do Scenedesmaceae, byla opětovně přesunuta do Oocystaceae. Těchto šest zástupců nově rozšířené čeledi Oocystaceae vytvořilo monofyletickou skupinu uvnitř třídy Trebouxiophyceae (viz obr. 2).



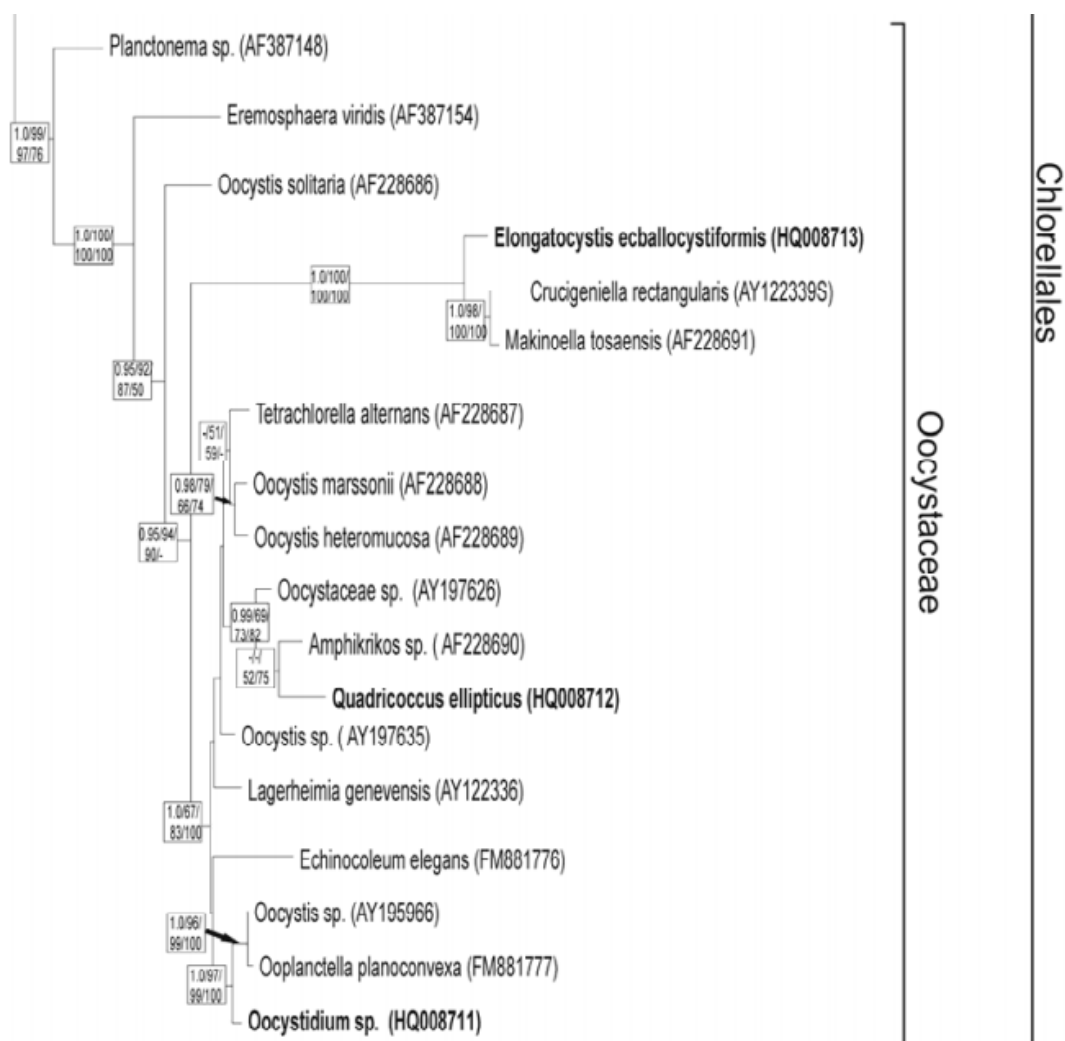
Obr. 2: Fylogenetický strom čeledi Oocystaceae z práce Hepperle et al. (2000). Konsenzuální strom vytvořený ze sekvencí genu SSU rRNA metodou MP. Čísla nad větvemi označují bootstrapovou podporu. Délka větví představuje vzdálenost vypočítanou podle Kimura-2-parameter modelu.

Další změny v čeledi Oocystaceae provedli Krienitz et al. (2003). Byla potvrzena příslušnost *Lagerheimia genevensis* k Oocystaceae. Dále byla do čeledi Oocystaceae přemístěna *Crucigeniella rectangularis* původně na základě tvorby slizových kolonií řazená do Scenedesmaceae, Crucigenoideae. *Schizochlamydelia capsulata* byla přesunuta do Oocystaceae na základě příbuznosti s *Amphikrikos* sp. po analýze molekulárních dat v práci Wolf et al. (2003).

Jediným zástupcem vyřazeným z čeledi Oocystaceae *sensu* Komárek a Fott 1983 na základě molekulární analýzy (Krienitz et al. 2004) je druh *Diacanthos belenophorus*, jenž byl autory na základě přítomnosti ostnů umístěn do podčeledi Lagerheimioideae. Nové příslušnost *Diacanthos belenophorus* k čeledi Chlorellaceae je v souladu se starším návrhem Hindáka (1980).

Studie Pažoutová a kol. (2010) zkoumala fylogenetickou pozici dvou druhů tvořících podobné slizové struktury: *Coenochloris planconvexa* (původně Radiococcaceae) a *Echinocoleum elegans* (Oocystaceae). Dle molekulárních dat oba studovaní zástupci přísluší do čeledi Oocystaceae. *Coenochloris planconvexa* byl přejmenován na *Ooplanctella planconvexa* a stanovena jako typ nového rodu *Ooplanctella*. V této fylogenetické analýze byla také zpracována sekvence druhu *Eremosphaera viridis* (Buchenheim and Buchenheim, unpublished), jehož pozice byla podle analýzy nalezena na úplné bázi čeledi.

Poslední změny v pojetí čeledi Oocystaceae přinesla práce Krienitz and Bock, (in press). Čeleď byla rozšířena o druh *Quadricoccus ellipticus*, podle Komárka a Fotta (1983) umístěný do čeledi Botryococcaceae a o nově popsany druh *Elongatocystis eballocystiformis*, jehož fylogenetická pozice byla nalezena vedle dvojice zástupců tvořících pravidelná coenobia (*Crucigeniella rectangularis* a *Makinoella tosaensis*). V této studii byla také potvrzena příslušnost rodu *Oocystidium* do čeledi Oocystaceae. Tyto výsledky jsou znázorněny na obr. 3. Současné poznatky o fylogenezi čeledi Oocystaceae jsou shrnuty v příloze 3.



Obr. 3: Stav čeledi Oocystaceae podle Krienitz and Bock (in press). Fylogenetická analýza genu SSU rRNA. Čísla u větví ukazují posteriorní pravděpodobnost (MB), bootstrapovou podporu (ML 100 opakování, MP a NJ 1000 opakování).

1.6. Otázky vyplývající ze současného stavu čeledi Oocystaceae

Radikální změnou v rámci čeledi Oocystaceae bylo nalezení parafylie typového rodu čeledi - rodu *Oocystis sensu* Komárek a Fott (1983). Tento rod byl jasně vymezen na základě morfologie. V práci Hepperle et al. (2000) byly objeveny dvě linie tohoto rodu. Rod *Oocystis* podle autorů potřebuje revizi. Z tohoto důvodu jsem ze sbírek vybrala šest kmenů (*Oocystis marssonii*, *O. lacustris*, *O. solitaria* f. *major*, *O. cf. nephrocytioides*, *O. cf. bispora* a *O. cf. pusilla*). Od těchto zástupců očekávám nalezení jejich fylogenetické pozice uvnitř Oocystaceae, popřípadě přiřazení k některé ze dvou již nalezených linií.

Rozpad rodu *Oocystis* a některých dalších rodů ustanovených na základě morfologických znaků (např. *Chlorella* (Krienitz et al. 2004)) mě přivedl ke zkoumání

monofylie rodu *Lagerheimia*. Pomocí molekulární analýzy chci v této práci nalézt fylogenetickou pozici kmene *Lagerheimia marssonii* a určit jeho vztah k již molekulárními metodami studovanému druhu *Lagerheimia genevensis* (Krienitz et al. 2003).

Do současné doby bylo molekulárními analýzami zkoumáno patnáct kmenů dnes zahrnutých do čeledi Oocystaceae. Sedm z nich bylo podle morfologických znaků řazeno do jiných čeledí (Komárek a Fott 1983). Z této změny vymezení čeledi vyplývá otázka, které další rody by měly být do čeledi zahrnuty. V této práci se zabývám kmenem *Willea* sp. (Scenedesmaceae *sensu* Komárek a Fott (1983)), u něž předpokládám přearazení do čeledi Oocystaceae.

Výsledky molekulární analýzy budu porovnávat s morfologickými pozorováními.

1.7. Variabilita morfologicky významných znaků

1.7.1. Znaký zkoumané u kokálních řas

Z relativně primitivní stavby kokálních řas vyplývá omezené množství morfologických znaků, jež u nich můžeme zkoumat. Jsou to znaky jako způsob výskytu buněk (jednotlivě nebo v koloniích či coenobiích), tvar kolonií a uspořádání buněk uvnitř kolonií, tvar a velikost buněk, charakteristika buněčné stěny (tloušťka, rovnoměrnost její tloušťky či místní ztluštění, hladkost či granulovitost, inkrustace, výčnělky, ostny), počet chloroplastů a jejich uspořádání, tvar a vzhled chloroplastu, viditelnost a charakter pyrenoidu, počet a pozice autospor, způsob uvolňování autospor a setrvávání v mateřské buněčné stěně, charakter buněčné stěny mateřské buňky, tvorba a charakter slizu. Každý z těchto znaků je různě variabilní na různých taxonomických úrovních.

1.7.2. Variabilita znaků u čeledi Oocystaceae

Znaků společných všem (nebo alespoň většině) zástupců čeledi Oocystaceae není moc. Kromě ultrastruktury buněčné stěny snad jen žlábkovitý parietální chloroplast, rozmnožování pomocí autospor a jejich setrvání alespoň nějaký čas v buněčné stěně mateřské buňky. V dalších znacích je čeleď více či méně variabilní.

Podle poslední publikace věnující se morfologii (Komárek a Fott 1983) je jednotlivý výskyt buněk či vytváření kolonií nebo coenobií rysem relativně dobře determinující rody čeledi Oocystaceae. Mezi těmito rody se vyskytuje určitá variabilita uspořádání buněk od jednotlivě žijících zástupců rodu *Lagerheimia*, po rody *Eremosphaera*, *Oonephris* a většina

druhů *Oocystis* žijících buď jednotlivě, nebo v koloniích dvou až čtyř buněk. Zvláštností čeledi je rod *Dendrocystis* se svými rozvětvenými k substrátu přisedlými koloniemi.

Tvar buněk je pro čeleď typický oválný či eliptický se zakulacenými konci (*Lagerheimia*, *Franceia*) nebo na pólech zašpičatělý, větvenovitý (*Oocystis*, *Granulocystis*) u některých rodů téměř kulovitý (*Trochiscia*), u jiných naopak značně protáhlý a větvenovitý (*Oocystaenium*, *Fusola*). Pro rod *Excentrosphaera* je typický hruškovitý tvar buňky, pro *Mycotetraedron* tvar podobný čtyřstěnu a pro *Rhombocystis* kosočtverečný. Někteří zástupci mají tvar asymetrický: mírně, jako u *Ecdysichlamys*, u níž jsou obě podélné strany konvexní, nebo více, tak, že jedna ze stran buňky je prohnutá dovnitř, což můžeme pozorovat u ledvinitých až srpkovitých rodů *Nephrocystium* a *Nephrochlamys*, nebo rohlíkovitě zatočeného rodu *Juranyiella*.

Velikost je znak poměrně hodně různorodý i mezi druhy téhož rodu (extrémem je rod *Oocystis* kdy nejmenší druhy – *O. tainoensis* (3,5-9,5 x 2-4,8 μm), *O. bispora* (3,8-9,5 x 2,2-4,6 μm), *O. parva* (3,2-12 x 1,5-6,8 μm) a největší – *O. hunanensis* (42-48 x 25-30 μm), *O. solitaria* (12-52,8 x 4,9-29,7 μm), *O. panduriformis* (30-60 x 11-30 μm) se od sebe v tomto znaku řádově liší). K menším rodům patří *Micracantha* (*M. minutissima* 5 x 4 μm), *Pseudobohlinia* (*P. americana* 9,5 x 4,3 μm), *Rhombocystis* (*R. lacryma* 2,5-5 x 1,2-3 μm) a *Echinocoleum* (*E. elegans* 5-8 x 3,5-6 μm) a k těm větším *Neglectella* (*N. permagna* 66-86 x 35-59 μm), *Eremosphaera* (*E. viridis* 90-200 μm v průměru) a *Oocystaenium* (*O. elegans* 37-64 x 150-216 μm).

Buněčná stěna zástupců čeledi Oocystaceae může být hladká (*Oocystis*, *Echinocoleum*, *Oonephris*, *Eremosphaera*) nebo pokrytá výčnělky nebo ostny (*Lagerheimia*, *Franceia*, *Pseudobohlinia*), jejichž počet, uspořádání a délka jsou důležitým systematickým znakem. Některé rody (*Granulocystis*, *Granulocystopsis*, *Juranyiella*) mají buněčnou stěnu granulovitou. Granule mohou být rozmístěné po celém povrchu (*Granulocystis*, *Juranyiella*) nebo pouze v určitých místech (*Granulocystopsis*). U rodu *Gleotaenium* se vyskytují vápenaté inkrustace buněčné stěny. Tloušťka buněčné stěny je u této čeledi různá a do jisté míry souvisí s velikostí jednotlivých buněk. Významným znakem je rovnoměrnost tloušťky buněčné stěny (*Oocystidium*, *Echinocoleum*, *Lagerheimia*) nebo výskyt polárních ztlustěnin, na obou pólech (*Rhombocystis*, některé druhy rodu *Oocystis*) nebo pouze na jednom pólu buňky (*Excentrosphaera*).

Počet chloroplastů v buňkách jednotlivých zástupců se od sebe liší. Rody *Lagerheimia*, *Pseudobohlinia*, *Franceia* se vyznačují přítomností pouze jednoho chloroplastu ve vegetativních buňkách, který se dělí až při tvorbě autospor. Další rody mají dva (*Oocystidium*), jeden až čtyři (*Granulocystopsis*) chloroplasty. Velkým počtem chloroplastů je typický rod *Eremosphaera*, jež může dosáhnout i šedesáti. Rod *Oocystis* (*sensu* Komárek a Fott 1983) je v tomto pohledu značně variabilní. Většina druhů obsahuje jeden až čtyři chloroplasty (*O. tainoensis*), některé až osm (*O. natans*), některé mají vždy více než osm chloroplastů (*O. solitaria* až kolem dvaceti).

Uspořádání chloroplastů je většinou nepravidelné. Výjimkou je rod *Neglectella* s chloroplasty uspořádanými radiálně kolem středu buňky. Charakteristický tvar chloroplastu čeledi Oocystaceae je parietální a žlábkovitý s pravidelně zaobleným okrajem (*Lagerheimia*, většina druhů rodu *Oocystis*) někdy nepravidelně laločnatý (*Oocystis solitaria*) až hvězdicovitý nebo spongiomorfní (*Oonephris*). U rodu *Oocystaenium* se vyskytují chloroplasty značně podlouhlé, u rodu *Eremosphaera* hrudkovité či kotoučovitě.

V chloroplastech některých zástupců čeledi Oocystaceae jsou patrné pyrenoidy. Jejich počet je obvykle jeden v každém chloroplastu. Pouze u rodu *Fusola* se mohou vyskytovat až dva, u rodů *Eremosphaera*, *Excentrosphaera* a *Oocystaenium* až tři pyrenoidy v chloroplastu.

Až na dvě výjimky (*Eremosphaera viridis* a *Oocystaenium elegans*) se zástupci čeledi Oocystaceae rozmnožují pouze pomocí autospor. Jejich počet se pohybuje v rozmezí dvou až osmi u většiny rodů a druhů. Dceřiné buňky často zůstávají po určitou dobu uzavřeny v buněčné stěně mateřské buňky – krátce (*Oocystis lacustris*) nebo delší dobu až po celý svůj život (buněčná stěna pak tvoří vrstevnaté obaly – např. *Oocystis marina*), nebo ji buňky záhy opouštějí (rod *Lagerheimia*). K jejich uvolnění dochází po prasknutí buněčné stěny mateřské buňky (*Oocystis marssonii*) nebo po jejím zeslizovatění (*Oocystis nephrocytioides*).

Tvorba slizu obklopujícího jednotlivé buňky či celou kolonii je charakteristická pro jednotlivé rody čeledi Oocystaceae. Některé druhy sliz neprodukují (*Micracantha*, *Cryocystis*), u jiných může být sliz přítomen pouze v podobě tenké vrstvy na povrchu buňky (*Rhombocystis*, *Lagerheimia*) nebo tvořit široké slizové obaly (*Oocystidium*: velikost buňky 10-19 x 8-14 μ m, slizový obal až 50 μ m v průměru). Někteří zástupci vytváří slizové panožky - *Sestosoma* menší výběžky, *Echinocoleum* značně rozměrné (velikost buňky 5-8 x 3,5-6 μ m, panožky až 17 μ m dlouhé a až 4 μ m široké).

Shrnutí variability morfologických znaků rodů čeledi Oocystaceae se zaměřením na znaky systematicky významné je k dispozici v příloze 2 - určovacím klíči podle Komárka a Fotta (1983).

2. Metodika

2.1. Materiál

Pro morfologická pozorování i laboratorní práci byly jako materiál zvoleny vyizolované kmeny ze tří sbírek: ze Sbírký autotrofních organizmů AVČR v Třeboni (CCALA 515 *Willea* sp., CCALA 365 *Lagerheimia marssonii*, CCALA 396 *Oocystis lacustris*, CCALA 397 *Oocystis* cf. *nephrocytioides*), ze Sbírký kultur řas katedry botaniky PřF UK v Praze (CAUP H 1110 *Oocystis marssonii* a CAUP H 1106 *Oocystis solitaria* f. *major*) a ze soukromé sbírky Christiny Bock (KR 210 *Oocystis* cf. *pusilla* a CH 99 *Oocystis* cf. *bispora*). Detailní přehled těchto kmenů je uveden v příloze 1.

Při výběru kmenů jsem zohlednila jejich dostupnost a také potencionální přínos výsledků. Vybrala jsem šest zástupců parafyletického rodu *Oocystis*, od nichž jsem očekávala zjištění jejich příslušnosti k jednotlivým liniím (Hepperle et al. 2000), případně nalezení další linie. Druh *O. marssonii* již analyzován byl (Hepperle et al. 2000). Jednalo se však o jiný kmen a pouze parciální sekvenci. *O. solitaria* je také již molekulárními metodami zkoumaný druh (Hepperle et al. 2000) Autoři však ve své studii neuvodli formu druhu. V této práci se jedná o jiný kmen s uvedenou formou *major*. Další čtyři druhy rodu *Oocystis* zpracovávané v této práci (*O. cf. nephrocytioides*, *O. lacustris*, *O. cf. pusilla* a *O. cf. bispora*) analyzované dosud nebyly. Kmen *Lagerheimia marssonii* jsem vybrala pro ověření příslušnosti do rodu *Lagerheimia*, protože již byl osekvenován typ rodu (*L. genevensis*) (Krienitz et al. 2003). Kmen *Willea* sp. zařazovaný Komárkem a Fottem (1983) do Scenedesmaceae Crucigenoideae jsem zařadila do výběru na základě značné morfologické podobnosti s druhem *Crucigeniella rectangularis*, jenž byl ze Scenedesmaceae Crucigenoideae do čeledi Oocystaceae přerazen (Krienitz et al. 2003).

Názvy taxonů používané v této práci jsem sjednotila podle práce Komárek a Fott (1983).

2.2. Kultivace

Kmeny byly uchovávány ve zkumavkách – pro izolaci DNA, a na Petriho miskách – pro morfologická pozorování, s pevným BBM médiem (Bischoff and Bold 1963), pro jehož polymeraci byla použita agaróza o koncentraci 1,5%. Zkumavky a misky byly kultivovány při světelnosti $22 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a teplotě 18°C.

2.3. Morfologie

Pro morfologická pozorování byl použit mikroskop Olympus BX 51 s fotoaparátem Olympus DP 71. Pro barvení slizu a buněčné stěny byla použita methylenová modř. Z fotografií byly pomocí programu CorelDRAW 12 zhotoveny obrazové tabule (příloha 4).

2.4. Molekulární biologie

Izolace DNA jsem provedla po zhomogenizování buněk kultury pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex) soupravy podle přiloženého návodu. Koncentrace vyizolované DNA jsem změřila na spektrofotometru Biowave II od firmy WPA.

Pro molekulární analýzy jsem vybrala gen pro 18S rRNA a za ním následující ITS oblast, které obsahují optimální množství polymorfismů mezi druhy. Gen 18S rRNA jsem zvolila také pro dostatečný počet dostupných sekvencí v internetové databázi sekvencí NCBI. K získání genu 18S rRNA a ITS oblasti jsem provedla PCR amplifikaci. Namíchala jsem PCR reakci skládající se z DNA, primerů uvedené v tabulce (Tab. I), Mixu s DNA polymerázou a vody o celkovém objemu 20 μ l. Amplifikace jsem provedla pomocí cyclerů T 300 Thermocycler značky Biometra a XP Cycler značky Bioer. Použitý program pro reakci měl následující nastavení:

Denaturace: 95°C, 1min,

(Denaturace: 95°C, 1min; aneeling 54°C, 1min; elongace 72°C, 3min) 35x,

Elongace: 72°C, 10min,

Hold: 10°C.

Tab. I: Primery používané při PCR amplifikaci

| Název | Sekvence | Specifita | Citace |
|--------------|------------------------|------------------------|---------------------------|
| NS1F | GTAGTCATATGCTTGTCT | - | White et al. (1990) |
| 895F | GTCAGAGGTGAAATTCTTGGAT | - | Marek Eliáš (pers. comm.) |
| 1150R | ACGCCTGGTGGTGCCCTTCCGT | Pro čeled' Oocystaceae | Pažoutová a kol. (2010) |
| 1170R | TTTGACTCAACACGGG | - | McCombie et al. (1992) |
| 1500aF | GCGCGCTACACTGATGC | Řasová | Helms et al. (2001) |
| Vivi (1650R) | TCACCAGCACACCCAAT | Řasová | Kipp (2004) |
| ITS4R | TCCTCCGCTTATTGATATGC | Původně houbová | White et al. (1990) |

Úspěšnost PCR amplifikace jsem ověřila gelovou elektroforézou na 1% agarózovém gelu v TBE pufru. DNA jsem barvila SYBR GREENem a vizualizovala pomocí elektronického UV transiluminátoru ULTRA LUM. INC – gel imager s použitím software Scion VisiCapture.

Pro přečištění PCR produktu jsem použila JetQuick PCR Purification Kit (Genomed), nebo QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) v případě přečištění PCR produktu vyříznutého z gelu. Tento postup jsem zvolila v případě kontaminací PCR produktu. Při používání obou kitů jsem postupovala podle přiloženého návodu. Koncentraci PCR produktu jsem změnila na spektrofotometru Biowave II od firmy WPA.

Pro sekvenaci jsem namíchala směs amplifikované DNA (20 - 30ng), primeru (2,5pmol) a vody a poslala na sekvenaci na přístroji ABI PRISM 3130xl. Primery použité pro sekvenační reakci jsou uvedeny v tabulce (Tab. II).

Tab. II: Primery používané při sekvenaci.

| Název | Sekvence | Specifita | Citace |
|--------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|
| NS1F | GTAGTCATATGCTTGTCT | - | White et al. (1990) |
| 34F | GTCTCAAAGATTAAGCCATGC | - | Fiedl (unpublished) |
| 402F | GCTACCACATCCAAGGAAGGCA | - | Katana et al.(2001) |
| 895F | GTCAGAGGTGAAATTCTTGGAT | - | Marek Eliáš (pers. comm.) |
| 1122F | GGCTGAAACTTAAAGGAATTG | - | Fiedl (unpublished) |
| 1150R | ACGCCTGGTGGTGCCCTTCCGT | Pro čeleď Oocystaceae | Pažoutová a kol. (2001) |
| 1170R | TTGACTCAACACGGG | - | McCombie et al. (1992) |
| 1263R | GAACGGCCATGCACCACC | - | Fiedl (unpublished) |
| 1500aF | GCGCGCTACACTGATGC | Řasová | Helms et al. (2001) |
| Vivi (1650R) | TCACCAGCACACCCAAT | Řasová | Kipp (2004) |
| 18SR | TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG | - | Katana et al.(2001) |
| ITS1F | TCCGTAGGTGAACCTGCGG | Původně houbová | White et al, 1990 |
| ITS4R | TCCTCCGCTTATTGATATGC | Původně houbová | White et al. (1990) |

2.5. Fylogenetická analýza molekulárních dat

Kvůli značné délce genu 18S rRNA (přibližně 2000bp bez intronů, které se v sekvenci u některých zástupců vyskytují) bylo potřeba celkovou sekvenci sestavit

z jednotlivých úseků. Sestavení celkové sekvence jsem provedla v programu SeqAssem© (Hepperle 2004).

Matici jsem sestavila ze sekvencí zástupců čeledi Oocystaceae. Sekvence kmenů *Oocystis* cf. *bispora*, *Oocystis* cf. *pusilla*, *Lagerheimia marssonii* a *Willea* sp. jsem použila vlastní, ostatní sekvence jsem získala z internetové databáze NCBI (AH012990 *Crucigeniella rectangularis*, AF387154 *Eremosphaera viridis*, FM881777 *Ooplanctella planoconvexa*, AF228691 *Makinoella tosaensis*, FM881776 *Echinocoleum elegans*, AF228686 *Oocystis solitaria*, AF228690 *Amphikrikos* sp., AF228687 *Tetrachlorella alternans*, AF228688 *Oocystis marssonii*, AF228689 *Oocystis heteromucosa*, AY122336 *Lagerheimia genevensis*, AY195966 *Oocystis* sp. AN 2/29-4, AY197635 *Oocystis* sp. Tow 6/3 P-10w a AY197626 *Oocystaceae* sp. MDL6-7). Jako kořen jsem použila tři sekvence kmenů nacházejících se vně čeledi (AF387149 *Planctonema* sp., X74003 *Prototheca wickerhamii* a X06425 *Nanochlorum eukaryotum*). Alignment jsem provedla pomocí programu MAFFT (Katoh et al. 2002) a poté ručně upravila v programu BioEdit (Hall 1999).

Hotovou matici (1194 pozic) jsem analyzovala metodami Maximum Parsimony a Maximum Likelihood v programu PAUP verze 4.0b10 (Swofford 2000). Pro metodu ML jsem vypočítala model evoluce (TIM2+I+G) z dat pomocí programu jModelTest (Posada 2008). Pro obě metody jsem vypočítala bootstrap (pro MP 1000 a pro ML 100 opakování). Dále jsem provedla Bayesovskou analýzu v programu MrBayes (Huelsenbeck and Ronquist 2001) a zjistila posteriorní pravděpodobnost jednotlivých větví.

3. Výsledky

3.1. Morfologie

Osm studovaných kmenů jsem pozorovala ve světelném mikroskopu. Pro jednotlivé kmény jsem sestavila morfologický popis. Fotografie dokumentující tato mikroskopická pozorování jsou k dispozici v příloze 4.

Oocystis cf. bispora CH 99

Kmen jsem pojmenovala na základě určovacího klíče od Komárka a Fotta (1983). Vegetativní buňky se v kultuře vyskytují nejčastěji soliterně nebo po dvou. Buňky jsou velmi malé, oválné se zašpičatělými konci a polárními ztluštěninami. Buňky obsahují vždy jeden parietální chloroplast s pyrenoidem. Autospory se vyskytují výhradně po dvou a často zůstávají delší dobu uzavřeny v buněčné stěně mateřské buňky. K uvolnění autospor dochází po prasknutí mateřské buněčné stěny. Pozorované rozměry byly v rozmezí udávaném Komárkem a Fottem (1983) – délka 3,8-8 a šířka 2,2-4,6 μ m.

Oocystis lacustris CCALA 396

Podle pozorování se vegetativní buňky vyskytují soliterně nebo v nepravidelných shlucích. Tvar buněk je oválný až větvenovitý. Buněčná stěna je zřetelně ztloustlá na pólech. V buňkách se vyskytuje jeden až čtyři ke stěně přiléhající chloroplasty, které mají žlábkovitý tvar a dobře pozorovatelné pyrenoidy. Buňky se rozmnožují nejčastěji dvěma až čtyřmi autosporami, které brzy opouští mateřskou buněčnou stěnu. Buněčná stěna mateřské buňky praská. Kolem buněk se často vyskytuje tenký rovnoměrný slizový obal. Velikost buněk: naměřené rozměry buňky jsou v rozmezí udávaném Komárkem a Fottem (1983) – délka 4,8-14,4 a šířka 1,6-8 μ m.

Oocystis marssonii CAUP H 1110

Jednotlivé soliterně žijící buňky jsou jasně protaženého, větvenovitého až oválného tvaru. Buněčná stěna na pólech mírně ztloustlá. Mladé buňky obsahují jeden, starší až dva nebo čtyři žlábkovité parietální chloroplasty s jedním pyrenoidem. Ve starších buňkách jsou pozorovatelné velké vakuoly, často ležící u pólů buňky. Rozmnožování probíhá pomocí dvou nebo (často) čtyř autospor. Dceřiné buňky zůstávají po určitou dobu spojeny mateřskou buněčnou stěnou, někdy i značně rozšířenou, a uvolňují se po jejím prasknutí. Vegetativní

buňky leží v jasně ohraničeném slizovém obalu. Velikost buněk: naměřené rozměry buňky jsou v rozmezí udávaném Komárkem a Fottem (1983) – délka 10-25 a šířka 6-14 μ m.

***Oocystis cf. nephrocytioides* CCALA 397**

Buňky se vyskytují v koloniích po dvou nebo čtyřech. Tvar buněk je v kultuře často eliptický, někdy asymetrický až lehce zatočený se zaoblenými konci bez ztloustlé buněčné stěny na pólech. V jednotlivých buňkách je jeden až čtyři parietální chloroplasty žlábkovitého tvaru, každý s jedním značně velikým pyrenoidem. Autospory se vyskytují nejčastěji po čtyřech, někdy po dvou. Dceřiné buňky dlouho zůstávají uzavřeny v mateřské buněčné stěně. Kolem starších buněk se někdy vytvářejí i vícevrstevné slizové obaly, tvořící široké pruhy. Velikost buněk: naměřené rozměry buňky jsou v rozmezí udávaném Komárkem a Fottem (1983) – délka 9-18,5 a šířka 6-10,5 μ m.

***Oocystis cf. pusilla* KR 210**

Kmen jsem pojmenovala na základě určovacího klíče od Komárka a Fotta (1983). Jednotlivé buňky žijí soliterně nebo v koloniích po dvou až čtyřech. Tvar buňky je oválný, jasně podlouhlý, bez ztlouštěnin buněčné stěny na pólech buňky. V každé buňce se vyskytuje jeden až tři parietální chloroplasty s pyrenoidem. V kultuře jsem pozorovala autospory po dvou nebo po čtyřech, z buněčné stěny mateřské buňky se uvolňují po jejím prasknutí. Někdy zůstávají dceřiné buňky dlouho uzavřeny v buněčné stěně mateřské buňky, která je pak značně rozšířená a ostře ohraničená. Pozorované rozměry byly v rozmezí udávaném Komárkem a Fottem (1983) – délka 6-12 a šířka 4,4-6,4 μ m.

***Oocystis solitaria f. major* CAUP H 1106**

Vegetativní buňky se v kultuře nachází jednotlivě nebo po dvou až osmi. Tvar buněk je oválný až jasně vřetenovitý, se silnými ztlouštěninami buněčné stěny na pólech buňky. Chloroplasty uvnitř buněk jsou často početné a těžko spočítatelné, nepravidelného tvaru, s viditelným pyrenoidem. Autospory obsahují taktéž více chloroplastů - čtyři a více. Autospory se vyskytují často po dvou, orientované kolmo na osu mateřské buňky, někdy také po čtyřech a více. Dceřiné buňky zůstávají dlouho v mateřské buněčné stěně, někdy i po více generací. Mateřská buněčná stěna praská. Kolem starších buněk se tvoří vícevrstevné slizové obaly, někdy opravdu široké. Uvnitř starších buněk se někdy vyskytují velké apikální vakuoly. Velikost buněk: naměřené rozměry buňky jsou v rozmezí udávaném Komárkem a Fottem (1983) – délka 12,8-52,8 a šířka 5,9-29,7 μ m.

***Lagerheimia marssonii* CCALA 365**

Buňky se v kultuře vyskytují jednotlivě a samostatně. Buňky mají oválný až vřetenovitý tvar. Buněčná stěna je jemně ztloustlá na pólech buňky a hladká i po barvení methylenovou modří, které mělo zviditelnit ostny. V každé buňce je zřetelný jeden žlábkovitý parietální chloroplast s dobře viditelným pyrenoidem. Autospory - nejčastěji dvě až čtyři, velmi záhy opouští mateřskou buněčnou stěnu, která při jejím opouštění dceřinými buňkami praská. Slizový obal je jemný a ostře ohraničený. Velikost buněk: naměřené rozměry buňky jsou v rozmezí udávaném Komárkem a Fottem (1983) – délka 5-12 a šířka 3-8,5 μm .

***Willea* sp. CCALA 515**

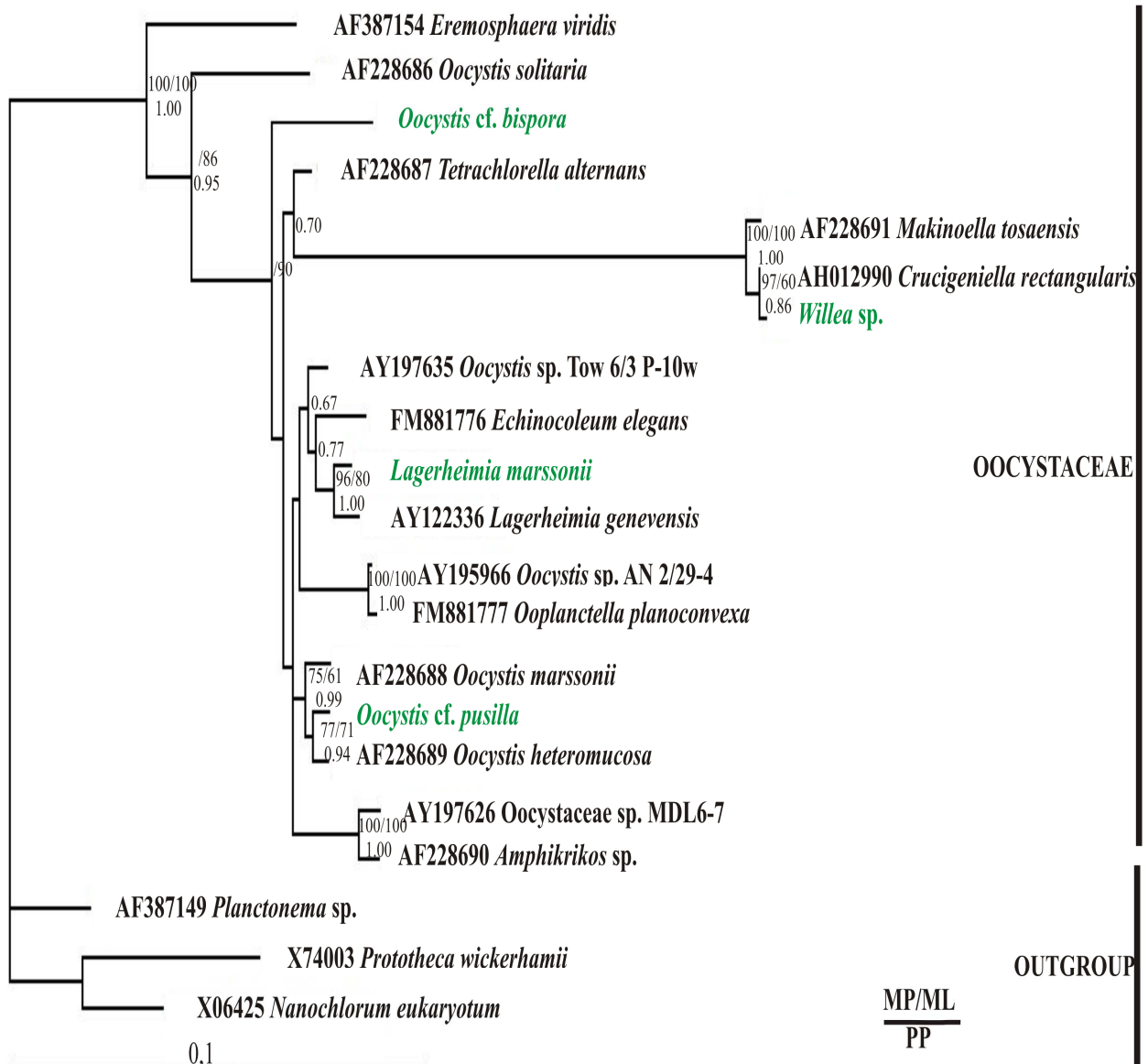
Jednotlivé buňky tvoří coenobia po čtyřech až šestnácti, nejčastěji však čtyřčetná. Coenobia jsou plochá a buňky hustě nahloučené. Skládají se ze čtyřbuněčných jednotek (dvě a dvě buňky spojené podélnou stranou). Mezi čtyřmi buňkami uvnitř této jednotky se nachází kosočtverečná mezera. Buňky jsou vejčitého až válcovitého tvaru, na pólech zakulacené, bez ztloustlé buněčné stěny na pólech. Starší buňky obklopují široké mnohvrstevné slizové obaly. V každé buňce se vyskytuje jeden žlábkovitý parietální chloroplast, ve starších buňkách i více chloroplastů. Pyrenoidy jsou zřetelné. Buňky se rozmnožují pomocí dvou až čtyř autospor. Dceřiné buňky dlouho zůstávají uzavřeny v buněčné stěně mateřské buňky. Velikost buněk: naměřené rozměry buňky byly v rozmezí udávaném Komárkem a Fottem (1983) – délka 8-12 a šířka 3-5 μm .

3.2. Sekvenace

Od všech osmi kmenů (uvedených v příloze 3) se mi podařilo vyizolovat DNA. PCR amplifikace a sekvenace genu pro 18S rRNA i s ITS oblastí se zdařila pro kmeny *Lagerheimia marssonii* a *Oocystis* cf. *pusilla*. U kmene *Willea* sp. a *Oocystis* cf. *bispora* byl úspěšně amplifikován a osekvenován úsek genu 18S rRNA o délce přibližně 1600bp.

Pro kmeny *Oocystis marssonii* a *Oocystis solitaria* f. *major* jsem úspěšně osekvenovala ITS oblast a terminální oblast genu 18S rRNA o přibližné délce 600bp. Tyto úseky jsem neanalyzovala.

3.3. Molekulární fylogenetika



Obr. 4: Fylogenetický strom ukazující strukturu čeledi Oocystaceae. Topologie stromu byla vytvořena metodou Maximum Likelihood. Délka větví představuje evoluční vzdálenost (model TIM2+I+G). U jednotlivých větví je uveden bootstrap s hodnotou vyšší než 60 pro Maximum Parsimony (MP) 1000 a Maximum Likelihood (ML) 100 opakování a posteriorní pravděpodobnost (PP) s hodnotou nad 60% z Bayesovské analýzy. Mé kmeny jsou označeny zeleně.

4. Diskuze

4.1. Morfologie

Výsledky mých pozorování jsem srovnávala s popisy jednotlivých druhů z práce Komárka a Fotta (1983). Během pozorování jsem našla pouze malé odlišnosti, které mohly být způsobené rozdílným charakterem čerstvého materiálu (často používaného pro morfologické studie) a mých kmenů kultivovaných na pevném médiu.

Oocystis cf. bispora CH 99

Buňky tohoto kmene byly opravdu velice malé, čímž bylo jejich pozorování ve světelném mikroskopu a následné určení kmene značně ztíženo. Podle Komárka a Fotta (1983) chloroplasty druhu *Oocystis bispora* obsahují jeden pyrenoid, který je nejasně viditelný. U zkoumaného kmene jsem pyrenoidy viděla zcela jasně. Při mikroskopickém pozorování jsem nezaznamenala přítomnost slizového obalu, v němž by měly být uloženy několikabuněčné nepravidelné kolonie a to ani po barvení methylenovou modří. Pro neúplnost popisu jsem kmen pojmenovala *Oocystis cf. bispora*.

Oocystis lacustris CCALA 396

Oproti tvrzení Komárka a Fotta (1983), kteří označili ztlustěliny buněčné stěny na pólech jako nezřetelné, při mém pozorování tyto ztlustěliny byly jasně viditelné.

Oocystis marssonii CAUP H 1110

Pozorování mého kmene bylo v souladu s prací Komárek a Fott (1983). Navíc jsem pozorovala jen značně velké vakuoly v apikální části buňky u starších buněk kmene.

Oocystis cf. nephrocytioides CCALA 397

Podle Komárka a Fotta (1983) se tento druh rozmnožuje pomocí dvou až osmi autospor. Při mém pozorování se nejčastěji vyskytovaly autospory po dvou nebo čtyřech, po osmi jsem autospory neviděla. Taktéž jsem nezaznamenala vakuolizované chloroplasty. Pyrenoidy v chloroplastu byly velice dobře viditelné a značně velké.

Oocystis cf. pusilla KR 210

Komárek a Fott (1983) u tohoto druhu udávají solitérní výskyt, nebo tvorbu kolonií po dvou až osmi buňkách. Při pozorování tohoto kmene jsem pozorovala kolonie s nejvýše čtyřmi buňkami. Dále autoři uvádí, že výskyt pyrenoidu byl popsán pouze některými staršími

autory. V případě mého kmenu jsem pyrenoidy v chloroplastech pozorovala. Podle Komárka a Fotta (1983) tento kmen tvoří až osm autospor, což jsem v této kultuře nezaznamenala – autospory se vyskytovaly po dvou nebo po čtyřech. Pro tyto nesrovnalosti jsem kmen určila pouze přibližně a pojmenovala *Oocystis cf. pusilla*.

***Oocystis solitaria f. major* CAUP H 1106**

Podle popisu kmene se jedná o formu *major*, vyznačující se v rámci svého druhu většími rozměry než forma *solitaria*. Morfologická pozorování tohoto kmene potvrdila, že se skutečně jedná o formu *major*, buňky byly značně rozměrné. Komárek a Fott (1983) udávají výskyt kanálků ve ztluštěninách buněčné stěny na pólech, které jsem u mého kmene nepozorovala. Dále autoři udávají více než osm, někdy i více než dvacet chloroplastů ve vegetativní buňce, u autospor nejčastěji čtyři nebo osm chloroplastů s viditelným pyrenoidem a někdy zvlněným okrajem, což přibližně odpovídalo mému pozorování, chloroplasty uvnitř buňky byly pro své množství a překryvy těžko spočítatelné.

***Lagerheimia marssonii* CCALA 365**

Podle Komárka a Fotta (1983) by měly být buňky oválné se zakulacenými konci bez ztluštěnin buněčné stěny na pólech. Při mém pozorování jsem zjistila, že buňky měly často konce zašpičatělé a byly spíše větvenovitého tvaru. Buněčná stěna na pólech byla jemně ztloustlá. Ostny (kratší nebo jen o trochu delší než šířka buňky), jenž by měly být uspořádány na pólech po jednom a v ekvatoriální rovině buňky po třech až čtyřech, jsem nepozorovala a to ani po barvení buněk methylenovou modří. Absence ostnů mohla být způsobená kultivací na pevném mediu (Hindák 1978). Funkci ostnů zkoumali Verschoor et al. (2004) a Luo et al. (2005). Pozorovali rody *Scenedesmus* a *Micractinium* v přítomnosti a nepřítomnosti predátora *Brachionus*. Bylo zjištěno, že vytváření ostnů je podmíněno potřebou ochrany před predací zooplanktonu. Tento stav by mohl vysvětlovat absenci ostnů u buněk kultivovaných kmenů.

Od dalšího již osekvenovaného kmene *Lagerheimia genevensis* (typového druhu rodu) se *L. marssonii* liší podle Komárka a Fotta (1983) právě počtem a rozložením ostnů. U druhu *L. genevensis* jsou ostny vždy po dvou umístěné na koncích buňky v subapikální oblasti. Dále se *L. genevensis* odlišuje tvorbou většího množství autospor (čtyř až osmi). V ostatních znacích se oba druhy shodují. U obou zástupců také Komárek a Fott udávají podobné rozměry.

***Willea* sp. CCALA 515**

Má pozorování byla v několika bodech v rozporu s prací Komárek and Fott (1983). Autoři udávají výskyt vždy jednoho chloroplastu bez pyrenoidu, přičemž u mého kmenu se objevovaly vícečetné (až čtyřčetné) chloroplasty a pyrenoidy byly zřetelné. Buňky se často držely po 2 nebo 4, velká coenobia byla spíše vzácná, což by mohlo být zapříčiněno kultivací. Podle Komárka a Fotta (1983) byl tento druh zařazen do čeledi Scenedesmaceae, podčeledi Crucigenoideae na základě tvorby plochých coenobií se čtvercovitým až křížovitým uspořádáním buněk a podle podlouhlého oválného tvaru buňky. Z podčeledi Crucigenoideae byla do čeledi Oocystaceae přeřazena podle molekulární analýzy *Crucigeniella rectangularis* (Krienitz et al. 2003). Podle popisu Komárka a Fotta (1983) se tyto dva druhy liší pouze v počtu buněk v coenobiu (*Crucigeniella rectangularis* 16-64, *Willea* sp. maximálně 32 buněčná coenobia) a přítomností pyrenoidu u *Crucigeniella rectangularis*. Při mém pozorování byl zřetelný pyrenoid i u *Willea* sp.. Na základě této podobnosti bylo předpokládáno přeřazení *Willea* sp. do Oocystaceae. Vysoká podobnost by mohla znamenat blízkou příbuznost těchto taxonů, nebo by se dokonce mohlo jednat o jeden druh.

Morfologická pozorování jsem provedla pouze ve světelném mikroskopu. Pro podrobnější zjištění - především ultrastruktury buňky by bylo vhodné provést pozorování v elektronovém mikroskopu. Toto ultrastrukturální studium buňky by bylo potřebné především pro zjištění charakteru buněčné stěny zkoumaných zástupců, jež je podle Komárka (1979) významným znakem odlišujícím čeleď od ostatních Trebouxiophyceae.

4.2. Sekvenace

PCR amplifikace genu pro 18S rRNA nebyla vždy úspěšná, což mohlo být způsobeno komplikacemi při nasedání primerů. Lepších výsledků jsem dosáhla při použití řasově nebo dokonce pro čeleď Oocystaceae specifických primerů. Další překážkou pro úspěšnou amplifikaci je četný výskyt intronů v sekvenci genu, které prodlužují jednotlivé amplifikované úseky genu. Tyto problémy byly ještě patrnější při sekvenaci genu. Získání čisté sekvence také mohly komplikovat kontaminace (pocházejícími již z původních kultur nebo vnesenými při neopatrné manipulaci s DNA) nebo výskyt přirozených polymorfismů DNA v populaci.

4.3. Molekulární fylogenetika

V této práci jsem se zabývala především vnitřními vztahy zástupců čeledi Oocystaceae. V práci Hepperle et al. (2000) byly nalezeny dvě linie parafyletického rodu *Oocystis*. Kmen *O. bispora*, analyzovaný v této práci, nebyl přiřazen ani k jedné z nich. V této práci tak byla objevena třetí linie. Tento stav je poměrně dobře podpořen bootstrapem. Kmen

O. pusilla byl analýzou umístěn do skupiny dalších dvou zástupců rodu *Oocystis* (*O. marssonii*, *O. heteromucosa*). Vzhledem k tomu, že dosud nebyl sekvenován typový druh rodu *Oocystis* (*O. naegelii*), nelze jednoznačně rozhodnout, která z linií je pravou linií rodu.

Dále byly k sobě molekulární analýzou přiřazeny kmeny *Lagerheimia marssonii* a *L. genevensis*. Monofylii této skupiny velmi dobře podporuje bootstrap i posteriorní pravděpodobnost.

Kmen *Willea* sp. molekulární analýza umístila do skupiny coenobiálních kmenů (*Makinoella tosaensis* a *Crucigeniella rectangularis*). Všechny tři druhy byly Komárkem a Fottem (1983) řazeny do stejné čeledi (Scenedesmaceae) i podčeledi (Crucigenoideae), dnes tvoří jednu linii uvnitř čeledi Oocystaceae. Určitá samostatnost skupiny je dobře podporována bootstrapy a posteriorní pravděpodobností.

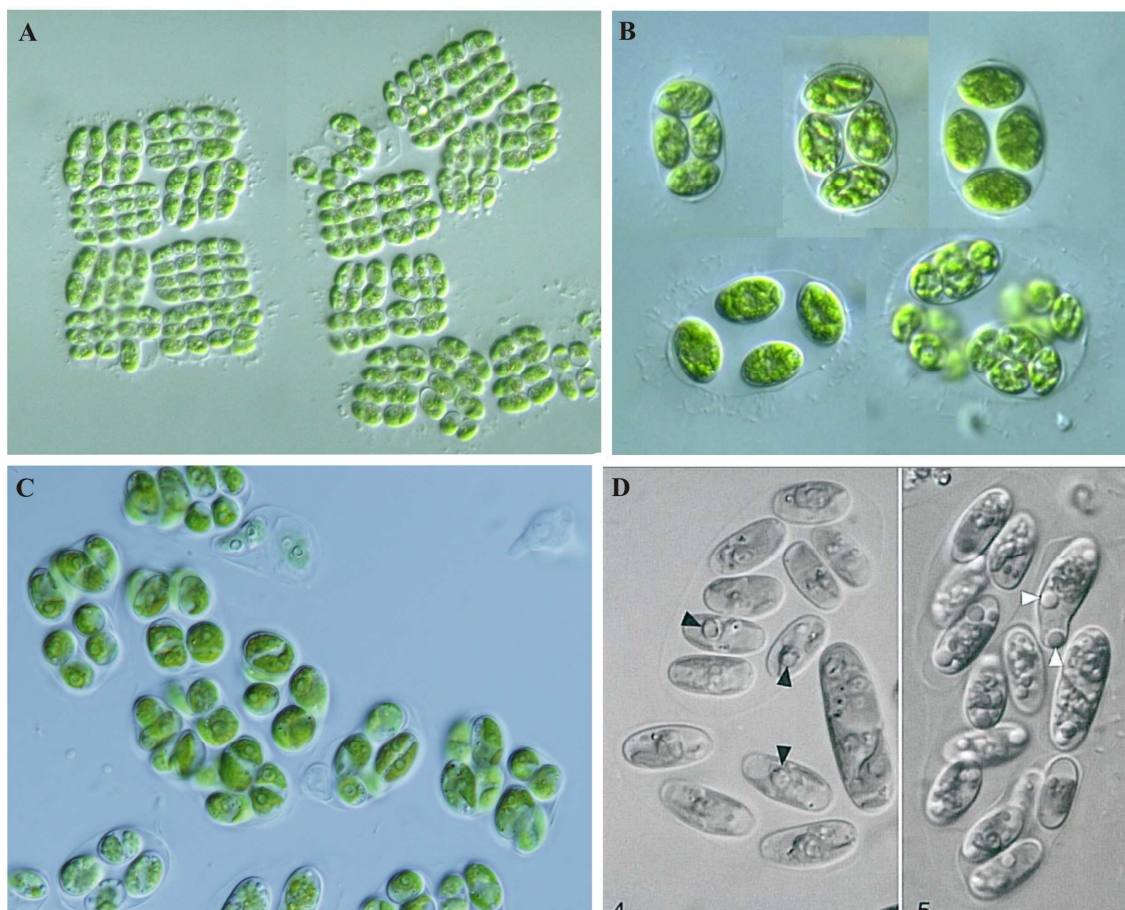
Kromě některých oddělených linií zůstávají vztahy uvnitř čeledi nejasné. Koncept podčeledí *sensu* Komárek a Fott (1983) byl vyvrácen např. v práci Pažoutová a kol. (2010). Pro vyjasnění vztahů v čeledi je potřeba prostudovat více zástupců čeledi. Podle Hepperle et al. (2000) je problémem v rekonstrukci fylogeneze této čeledi rychlá radiace některých zástupců. Další komplikací podle autorů jsou dlouhé větve, které podporují výskyt homoplasíí. Ucelenější informace ohledně vnitřní struktury čeledi by mohly poskytnout analýzy jiného úseku DNA než 18S rDNA, např. ITS oblasti nebo genu *rbcL*.

4.4. Konfrontace molekulární analýzy a morfologických pozorování

Rozpad rodu *Oocystis sensu* Komárek a Fott (1983) na tři linie v důsledku molekulárních analýz do značné míry podporuje i morfologie jednotlivých rodů. V práci Hepperle et al. (2000) se druh *O. solitaria* ocitl na bázi čeledi mimo skupinu tvořenou zbylými studovanými zástupci rodu (*O. marssonii* a *O. heteromucosa*). *O. solitaria* se od těchto dvou druhů (a dle práce Komárek a Fott (1983) i od většiny ostatních druhů rodu *Oocystis*) liší i morfologicky, především velikostí a velkým počtem chloroplastů. Také její autospory mají dva a více chloroplastů, na rozdíl od jednoho u autospor většiny zástupců rodu *Oocystis*. Rozdílný je i tvar chloroplastů. Kmen *Oocystis* cf. *pusilla* byl molekulárními analýzami v této práci přiřazen k dvojici morfologicky podobných zástupců *O. marssonii* a *O. heteromucosa*. Naproti tomu *Oocystis* cf. *bispora* lišící se od těchto zástupců zejména velikostí, přítomností pouze jednoho chloroplastu a tvorbou pouze dvou autospor byla zařazena mimo tuto skupinu.

Kmen *Lagerheimia marssonii* byl podle molekulární analýzy určen jako sesterský taxon kmene *L. genevensis*. Podle morfologie se tyto dva druhy liší jen několika znaky. Podle očekávání se jedná o zástupce téhož rodu.

Fylogenetické analýzy potvrdily na morfologických pozorováních založený předpoklad o fylogenetické pozici kmene *Willea* sp.. Z čeledi Scenedesmaceae, podčeledi Crucigenoideae (Komárek a Fott 1983) byla přeřazena do čeledi Oocystaceae, kde spolu s dalšími kmeny původně řazenými do Scenedesmaceae, Crucigenoideae (Komárek a Fott 1983) *Makinoella tosaensis* a *Crucigeniella rectangularis* tvoří samostatně stojící skupinu uvnitř čeledi Oocystaceae. Všechny tři tyto kmeny spojuje vytváření pravidelných kolonií, ale liší se mezi sebou počty buněk v jednotlivých koloniích. Do této skupiny coenobiálních zástupců byl zařazen také druh *Elongatocystis ecballocystiformis* (Krienitz and Bock, in press). Tato sekvence nebyla v této práci analyzována. Srovnání coenobií těchto čtyř kmenů je znázorněno na obr. 5.



Obr. 5: Coenobiální zástupci čeledi Oocystaceae. (A) *Crucigeniella rectangularis* (Protist information server - <http://protist.i.hosei.ac.jp>), (B) *Makinoella tosaensis* (Protist information server - <http://protist.i.hosei.ac.jp>), (C) *Willea* sp. (tato práce), (D) *Elongatocystis ecballocystiformis* (Krienitz and Bock, in press).

4.5. Přehodnocení některých morfologických znaků na základě molekulárních analýz

Změny ve vymezení čeledi Oocystaceae provedené na základě molekulárních analýz (např. Hepperle et al. 2000, Krienitz et al. 2003, Krienitz and Bock, in press) způsobili rozšíření variability některých morfologických znaků čeledi oproti staršímu jejímu pojetí (Komárek a Fott 1983).

Takovým znakem je zejména způsob života buněk. Variabilita tohoto znaku byla doplněna o coenobiální formu výskytu buněk (Hepperle et al. 2000, Krienitz et al. 2003). Coenobia tvoří zástupci sdružení do oddělené skupiny uvnitř čeledi Oocystaceae. Tento stav nabízí přehodnocení tohoto znaku z hlediska taxonomického významu. Forma výskytu buněk byla Komárkem a Fottem (1983) používána jako zásadní pro vymezení některých čeledí - např. Scenedesmaceae. Z této čeledi byly někteří coenobiální zástupci přeřazeni do Oocystaceae. Tvorbou typických slizových kolonií byla Komárkem a Fottem 1983 charakterizována i čeleď Radiococcaceae, jejíž polyfylie byla objevena v práci Wolf et al. (2003).

Poměrně hodně variabilním znakem u zástupců čeledi Oocystaceae *sensu* Komárek and Fott (1983) je tvar buňky. Molekulárními metodami dosud zkoumané druhy mají buňky vřetenovité, oválné nebo eliptické. Podle Komárka a Fotta (1983) patří do čeledi i rody s atypickým tvarem (např. *Juranyiella*, *Nephrochlamys*, *Rhombocystis*). Tyto rody nebyly z hlediska molekulární fylogenetiky studované.

Jediným současným zástupcem čeledi Oocystaceae s ostny na povrchu buněčné stěny, který byl zkoumán molekulárními metodami je rod *Lagerheimia* (Krienitz et al. 2003). Další rod s ostny - *Diacanthos* (Oocystaceae *sensu* Komárek a Fott (1983)) byl z čeledi přemístěn do Scenedesmaceae (Krienitz et al. 2004). Pro zjištění systematického významu ostnů v rámci čeledi Oocystaceae bude potřeba analyzovat další zástupce čeledi vytvářející ostny.

Důležitým znakem z hlediska členění čeledi Oocystaceae je podle Hepperle et al. počet chloroplastů v buňce. Podle studie mají bazální druhy početnější chloroplasty než druhy odvozené. Tuto hypotézu podpořila fylogenetická analýza (Pažoutová a kol. 2010) druhu *Eremosphaera viridis*. Tento druh s opravdu velkým počtem chloroplastů (až kolem šedesáti podle Komárka a Fotta (1983)) byl umístěn na úplnou bázi čeledi. Další podporou hypotézy je fylogenetická pozice dvou zástupců rodu *Lagerheimia* (Krienitz et al. 2003, tato práce). Tento

podle analýzy odvozený rod je charakteristický výskytem pouze jednoho chloroplastu v buňce Komárek a Fott (1983).

Systematickým znakem používaným na úrovni rozlišování rodů čeledi je přítomnost nebo absence pyrenoidu. Komárek a Fott 1983 řadí do rodu *Oocystis* zástupce s i bez pyrenoidu. Autoři podotýkají, že rod potřebuje revizi. Na základě variability tohoto znaku u rodu *Oocystis* navrhuje Hindák (1988) rozdělení rodu na *Oocystis* (osm rodů bez pyrenoidu) a *Oocystella* (třináct rodů s pyrenoidem). Potřeba revize tohoto rodu byla potvrzena molekulárními analýzami (např. Hepperle et al. 2000). Právě molekulární analýza více druhů rodu včetně typového druhu (*O. naegelii*) by mohla pomoci rod *Oocystis* nově definovat.

5. Závěr

V této práci jsem studovala osm kmenů po morfologické stránce a z hlediska molekulární fylogenetiky. Čtyři z nich jsem úspěšně osekvenovala a zanalyzovala. Nalezení fylogenetické pozice těchto kmenů zapříčinilo rozšíření čeledi o nový rod (*Willea*) a potvrzení příslušnosti kmenů *Lagerheimia marssonii*, *Oocystis* cf. *pusilla* a *Oocystis* cf. *bispora* do čeledi Oocystaceae. Tyto poznatky se shodují s mými předpoklady a morfologickými pozorováními.

6. Literatura.

- BHATTACHARYA, D., HELCHEN, T., BEBEAU, C. and MELKONIAN, M.** (1995) Comparisons of nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNAs reveal the evolutionary position of Glaucocystophyta. *Molecular Biology and Evolution* 12:415-420.
- BISCHOFF, H.W. and BOLD, H.C.** (1963) Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. The University of Texas Publications No. 6318, Austin.
- BLACKMAN, F.F. and TANSLEY, A.G.** (1902) A revision of the classification of the green algae. *New Phytologist* 1:67-72.
- BOHLIN K.** (1901) Étude sur la flore algologique d'eaudouce des Açores. K. Svenska Vet.-Akad. Förhandl., Stockholm 3:1-85.
- BOWEN, W.R.** (1965) The fine structure of the unicellular green algae *Eremosphaera* and *Haematococcus*. Diss. Abstr. 25:4924-4925.
- BRAUN, A.** (1855) *Algarum unicellularium genera nova vel minus cognita I-III*. W. Engelmann, Leipzig. Pp 111.
- BUCHHEIM, M.A. AND BUCHHEIM, J.A.** (Unpublished) Phylogeny of *Geminella* (Chlorophyta) and allies: a study of 18S rDNA sequences.
- FAWLEY, M.W., FAWLEY, K.P. and BUCHHEIM, M.A.** (2004) Molecular diversity among communities of freshwater microchlorophytes. *Microbial Ecology* 48:489-499.
- FOTT, B.** (1967) *Sinice a Řasy*. Akademie věd, Praha.
- 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.). *Journal of Phycology* 31:632-639.
- HALL, T.A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

- HEGEWALD, E., ALDAVE, A. and SCHNEPF, E.** (1978) Investigations on lakes of Peru and their phytoplankton .2. algae of pond la-Laguna, Huanuco, with special reference to *Scenedesmus intermedius* and *Scenedesmus armatus*. Archiv für Hydrobiologie 82:207-215.
- HEGEWALD, E., SCHNEPF, E. and ALDAVE, A.** (1980) Investigations on the lakes of Peru and their phytoplankton. 5. The algae of Laguna Piuray and Laguna Huaypo, Cuzco, with special reference to *Franceia*, *Oocystis* and *Scenedesmus*. Algological Studies 25:387-420.
- HELMCHEN, T., BHATTACHARYA, D., and MELKONIAN, M.** (1995) Analyses of ribosomal RNA sequences from Glaucocystophyte cyanobacteria provide new insights into the evolutionary relationships of plastids. Journal Of Molecular Evolution 41:203-210.
- HELMS, G., FRIEDL, T., RAMBOLD, G. and MAYRHOFER, H.** (2001) Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. Lichenologist 33:73-86.
- HEPPERLE, D., HRGERWALD, E. and KRIENITZ, L.** (2000) Phylogenetic position of the Oocystaceae (Chlorophyta). Journal of Phycology 36:590-595.
- HEPPERLE, D.** (2004): SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. <http://www.sequentix.de>.
- HEYNIG, H.** (1991) *Oocystopsis* ng. - a new genus of Chlorophyceae (Chlorellales, Oocystaceae). Protist 139:291-294.
- HINDÁK, F.** (1978) Genus *Lagerheimia*-Chod and *Lagerheimia*-like unicells in genus *Scenedesmus* Meyen (Chlorophyceae). Biologia 33:795-808.
- HINDÁK F.** (1980) Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae) II. – Biol. Práce. Veda, Bratislava 26:1–196.
- HINDÁK F.** (1988) International algology symposium on progress in algal taxonomy. Biologia 43: 281-283.
- HINDÁK, F. and HINDÁKOVÁ, A.** (2008) Morphology and taxonomy of some rare chlorococcalean algae (Chlorophyta). Biologia 63:781-790.
- HUELSENBECK J.P. and RONQUIST F.** (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. – Bioinformatics Application Note 17:754-755.

CHRISTENSEN, T. (1962) Systematik Botanik, Alger. In: **BÖCHER, T.W., LANGE, M. and SORENSEN, T.** (eds) Botanik. Munksgaard, København. Pp. 1–178.

KATANA, A., KWIATOWSKI, J., SPALIK, K., ZAKRYS, B., SZALACHA, E. and SZYMANSKA, H. (2001) Phylogenetic position of *Koliella* (chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. *Journal of Phycology* 37:443-451.

KATOH, K., MISAWA, K., KUMA, K. and MIYATA, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30:3059-3066.

KIES, L. (1979) Zur systematischen Einordnung von *Cyanophora paradoxa*, *Gloeochaete wittrockiana* und *Glaucocystis nostochinearum*. *Berichte Deutsch. Bot. Ges. Bd.* 92:445-454.

KIES, L. and KREMER, B.P. (1986) Typification of the Glaucocystophyta. *Taxon* 35:128-133.

KIPP, V. (2004) Biodiversität und phylogenetische Stellung eukaryotischer Algen in kalzifizierenden Biofilmen. – Diploma thesis. Depon. in: Universität Göttingen.

KOMÁREK, J. (1979) Änderungen in der Taxonomie der Chlorokokkalgen. *Algological Studies* 24:239-263.

KOMÁREK, J. and FOTT, B. (1983) Chlorococcales. In **HUBER-PESTALOZZI, G.** (ed.) *Das Phytoplankton des Süßwassers.* Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart. Band 7. Pp. 1044.

KRIENITZ, L., USTINOVA, I., FRIEDL, T., and HUSS, V.A.R. (2001) Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 37:852–865.

KRIENITZ, L., HEGERWALD, E.H., HEPERLE, D. and WOLF, A. (2003) The systematics of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology. *Biologia.* 58:437–446.

KRIENITZ, L., HEGERWALD, E.H., HEPERLE, D., HUSS, V.A.R., ROHRS, T. and WOLF, M. (2004) Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* 43:529-542.

KRIENTZ, L. and BOCK, CH. (In press) *Elongatocystis ecballocystiformis* gen. et comb. nov., and some reflections on systematics of Oocystaceae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Fottea*.

KÜTZING, F. T. (1849) *Species algarum*. F. A. Brockhaus, Leipzig. Pp 922.

LANJOUW, J., BAEHNI, C., ROBYNS, W., ROLLINS, R.C., ROSS, R., ROUSSEAU, J., SCHULZE, G.M., SMITH, A.C., VILMORIN, R. DE and STAFLEU, F.A. (1956) International code of botanical nomenclature, adopted by the Eighth International Botanical Congress, Paris, July 1954. *Regnum vegetabile* 46.

LEWIS, L.A. and MCCOURT, R.M. (2004) Green algae and the origine of land plants. *American Journal of Botany* 91:1535-1556.

LUO, W., PFLUGMACHER, S., PROSHOLD, T., WALZ, N. and KRIENTZ, L. (2006): Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist* 157:315–333

MATTOX, K.R. and STEWARD, K.D. (1984) Classification of the green algae:a concept based on comparative cytology. In: **IRVINE D.E.G. and JOHN D.M.**, (eds) *The systematics of the green algae*. London, Academic Press. Pp. 29–72

MCCOMBIE, W.R., HEINER, C., KELLEY, J.M. and GOCAYNE, J.D. (1992) Rapid and reliable fluorescent cycle sequencing of double-stranded templates. *DNA Seq.* 2. Pp. 289–296.

OKADA, Y. (1949) *Makinoella tosaensis*, a new genus of the Oocystaceae. *Japanese Journal of Botany* 24:166–168.

PAŽOUTOVÁ, M., ŠKALOUD, P. and NEMJOVÁ, K. (2010) Phylogenetic position of *Ooplanctella planoconvexa*, gen. Et comb. nova and *Echinocoleum elegans* (Oocystaceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Fottea* 10:75-83.

POSADA, D. (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253-1256.

PRÖSHOLD, T. and LELIART, F. (2007) Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In: **BRODIE, J. and LEWIS, J.** (eds): *Unravelling the Algae: the Past, Present, and Future of the Algae Systematics*. Taylor and Francis, London. Pp 123–153.

ROBINSON, D.G., PRESTON, R.D. and WHITE, R.K. (1972) Fine-structure of swarmers of *Cladophora* and *Chaetomorpha*. 3. wall synthesis and development. *Planta* 107:131-144.

ŘEHÁKOVÁ, H. (1969) Die Variabilität der gattung *Oocystis* A. Braun. In: **FOTT, B.** (ed) *Studies in phycology*. Academia, Praha. Pp 145-198.

SCHAGERL, M. (1993) Light-microscopy and ultrastructure of *Neglectella peisonis* spec. nov. - a new alga (Oocystaceae) from Neusiedler See (Austria). *Nova Hedwigia* 56:61-74.

SCHNEPF, E., KOCH, W. and DEICHGRA, G. (1966) Zur Cytologie und taxonomischen Einordnung von *Glaucocystis*. *Archiv für Mikrobiologie* 55:149–174.

SIMPSON, A.G.B. and ROGER, A.J. (2004) Excavata and the origin of the amitochondriate eukaryotes. In: **HIRT, P.H. and HORNER, D.S.** (eds), *Organelles, genomes and eukaryotic phylogeny*. CRC Press, Boca Raton, FL. Pp. 27–53.

SKUJA, H. (1964) Grundzuge der Algenflora und Algenvegetation der Fjeldgegenden urn Abisko in Schwedisch-Lappland. *Nova Acta Reg. SOC. Sci. Upsaliensis Ser. IV* 18.

SMITH, G.M. (1950) *The freshwater algae of the United States*. McGraw-Hill Book Company, New York. Pp 719.

STOYNEVA, M., INGOLIC, E., GARTNER, G. and VYVERMAN, W. (2009) The pyrenoid ultrastructure in *Oocystis lacustris* Chodat (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Fottea* 9:149-154.

SWOFFORD, D.L. (2000) *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*, Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

TURMEL, M., OTIS, CH., and LEMIEUX, C. (2009) The Chloroplast Genomes of the Green Algae *Pedinomonas minor*, *Parachlorella kessleri*, and *Oocystis solitaria* Reveal a Shared Ancestry between the Pedinomonadales and Chlorellales. *Molecular Biology and Evolution* 26:2317–2331.

VERSCHOOR, A.M., VAN DEAR STAP, I., HELMISING, N.R., LURLING, M. and VAN DONK, E. (2004) Inducible colony formation within the Scenedesmaceae: Adaptive responses to infochemicals from two different herbivore taxa. *Journal of Phycology* 40:808-814.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J. and WHITE, T.J.** (eds) PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York. Pp. 315-322.

WOLF, M., HEPERLE, D. and KRIENITZ, L. (2003) On the phylogeny of *Radiococcus*, *Planktosphaeria* and *Schizochlamydeella* (Radiococcaceae, chlorophyta). *Biologia* 58:759-765.

Protist information server - <http://protist.i.hosei.ac.jp>

7. Přílohy

7.1. Příloha 1: Seznam kmenů

CH 99 *Oocystis cf. bispora* KOMÁREK 1983

Strain Bock

Loc. : Lake Nakuru, Kenya

CCALA 396 *Oocystis lacustris* CHODAT 1897

Strain Řeháková 1960/7

Loc. : Czech Republic, fishpond Vira near town Trebon

CAUP H 1110 *Oocystis marssonii* LEMMERMANN 1898

Strain Punčochářová 1981/6

Loc. : Sázava river, Czech-Moravian Highlands, Czech Republic

CCALA 397 *Oocystis cf. nephrocytioides* FOTT and ČADO 1966

Strain Fott 1965/1

Loc. : Macedonia, lake Ohrid, a channel of hatchery

KR 210 *Oocystis cf. pusilla* HANSGIRG 1890

Strain Bock

Loc. : Lake Victoria, Homa Bay, Kenya

CAUP H 1106 *Oocystis solitaria* WITTROX 1879 f. *major* WILLE 1879

Strain Manguin

Loc. : France

CCALA 365 *Lagerheimia marssonii* LEMMERMANN 1900

Strain Hindák 1981/2

Loc. : Slovakia, Stupava, fishpond Stavek

CCALA 515 *Willea sp.* (rod SCHMIDLE 1900)

Strain Kováčik 1987/12

Loc. : Slovakia, Mts. Vysoke Tatry, lake Strbske pleso, phytoplankton

7.2. Příloha 2: Přehled a určovací kritéria pro rody čeledi Oocystaceae podle Komárka a Fotta (1983)

Podčeledi:

1. Buňky oválné kulovité až ve tvaru čtyřstěnu, ve vegetativním stavu s jedním chloroplastem s hlavním pyrenoidem; buněčná stěna s dlouhými ostny.....1. **Lagerheimioideae**
2. Buňka větvenovitá, eliptická, oválná nebo skoro kulovitá, někdy kosočtverečného nebo fazolovitěho tvaru, ve vegetativním stavu s jedním nebo několika chloroplasty s nebo bez pyrenoidy; buněčná stěna hladká.....2. **Oocystoideae**
3. Buňky větvenovité, oválné až kulovité s početnými kotoučovitými až hruškovitými chloroplasty, které každý obsahuje jeden až tři pyrenoidy s velkými škrobovými zrny; buněčná stěna hladká.....3. **Eremosphaeroideae**

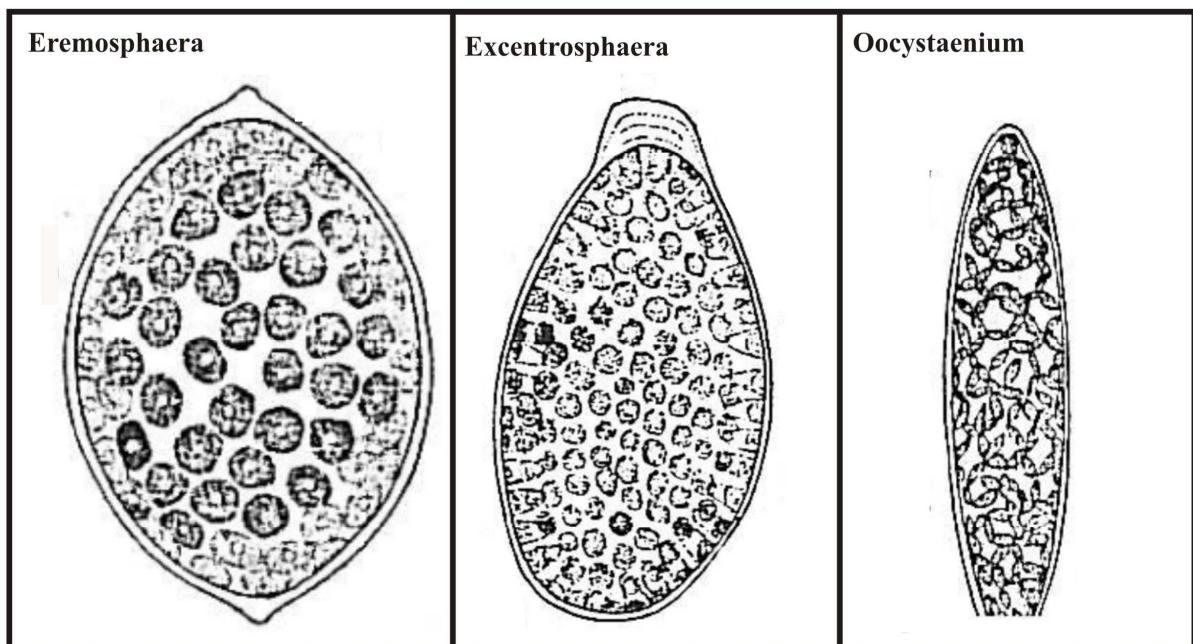
Eremosphaeroideae:

1A Buňky větvenovité, oválné nebo kulovité.

2A Buňky větvenovité.1. *Oocystaenium*

2B Buňky široce oválné nebo kulovité.2. *Eremosphaera*

1B Buňky hruškovité, s kloboukovitou ztluštěninou na užším konci.3. *Excentrosphaera*



Obr. 1: Tabulka rodů podčeledi Eremosphaeroideae.

Lagerheimioideae:

1A Buňky s krátkými ostny (s kratšími než šířka buňky).

2A Buňky +/- kulovité až ve tvaru čtyřstěnu se zaoblenými rohy a hranami.

3A Buňky s třemi až čtyřmi krátkými ostny uspořádanými do rohů čtyřstěnu.
..... 1. *Mycotetraedron*

3B Buňky s celým povrchem rovnoměrně pokrytým krátkými ostny nebo výstupky.
..... 2. *Trochiscia*

2B Buňky eliptické nebo oválné.

4A Buňky samostatně žijící, bez slizového obalu.

5A Buňky s krátkými mohutnými ostny na bázi ztloustlými... 3. *Micracantha*

5B Buňky hustě posázené tenkými, po celé délce stejně širokými ostny někdy redukovanými na pouhé výstupky. 4. *Cryocystis*

4B Buňky tvořící kolonie obklopené slizovým obalem. 5. *Pseudobohlinia*

1B Buňky s dlouhými ostny, většinou delšími než šířka buňky.

6A Ostny po celém povrchu +/- rovnoměrně rozmístěné.

7A Ostny tenké, jemné, na bázi nejsou ztloustlé, nebo jen lehce, většinou hustě umístěné, často lehce zahnuté. 6. *Franceia*

7B Ostny na bázi pozvolna ztloustlé, tuhé, ohnuté. 7. *Chodatellopsis*

6B Ostny pouze na některých místech povrchu buňky (na pólech a v ekvatoriální rovině).

8A Ostny více než dva.


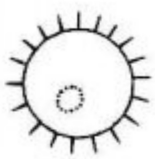

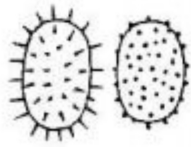
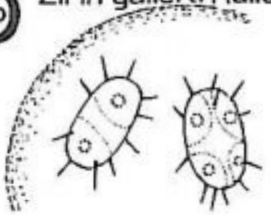
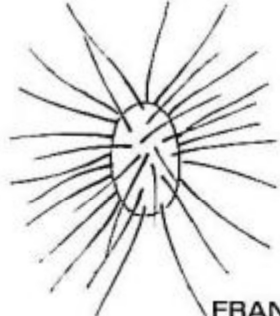
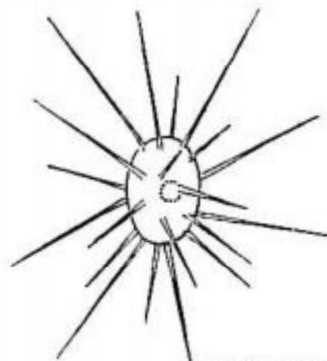
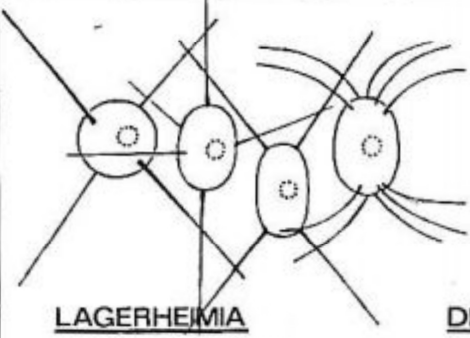


9A Jednotlivé samostatně žijící buňky, autospory nezůstávají uzavřeny v mateřské buněčné stěně; chloroplasty s pyrenoidem. 8. *Lagerheimia*

9B Buňky zůstávají spojené zbytky mateřské buněčné stěny a tvoří větvené kolonie přichycené k substrátu; chloroplasty bez pyrenoidů. .. 9. *Dendrocystis*

8B Jeden až dva ostny na pólech buňky.

10A Dva ostny, na každém pólu jeden. 10. *Diacanthos*

10B Jeden ostn na jednom pólu podlouhlé buňky. 11. *Pilidiocystis*

| | |
|---|--|
| Borsten < Zll-Breite: (1a) | |
| Zll ± kugelig (2a) | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p><u>MYCOTETRAEDRON</u></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><u>TROCHISCIA</u></p> </div> </div> |
| Zll ± oval (2b) | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p><u>MICRACANTHA</u></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><u>CRYOCYSTIS</u></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><u>PSEUDOBOHLINIA</u></p> </div> </div> |
| Borsten > Zll-Breite: (1b) | |
| Mehrere Borsten auf ganze Zll-Oberfläche (6a) | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p><u>FRANCEIA</u></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><u>CHODATELLOPSIS</u></p> </div> </div> |
| Borsten lokalisiert (6b) | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p><u>LAGERHEIMIA</u></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><u>DIACANTHOS</u></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><u>PILIDIOCYSTIS</u></p> </div> </div> |

Obr. 2: Tabulka rodů podčeledi Lagerheimioidea.

Oocystoideae:

1A Buňky kulaté, oválné, eliptické nebo kosočtverečné, symetrické podle podélné osy nebo jen mírně asymetrické (s oběma stranami konvexními).

2A Buněčná stěna mateřské buňky přilehlá na vegetativní buňce, nikdy netvoří rozšířený obal kolem buňky (srov. Také některé druhy *Oocystis*).

3A Buňky pravidelně oválné, hladké, bez ztlustěnin; mladé buňky uspořádané do kříže. 1. *Fotterella*

3B Buňky oválné až vřetenovité, lehce asymetrické, na jedné straně vypouklejší, se ztlustěninami na pólech; buňky tvoří kolonie.2. *Ecdysichlamys*

2B Rozšířená nebo zeslizovatělá buněčná stěna mateřské buňky tvoří obal kolem buňky, jen málokdy přiléhá k buňce.

4A Jeden nebo více ke stěně přiléhajících, miskovitých, protáhlých nebo kotoučovitých chloroplastů, které nejsou nikdy uspořádány houbovitě ani hvězdovitě.

5A Buňky +/- kosočtverečné, zploštělé, s jedním ke stěně přiléhajícím chloroplastem s pyrenoidem.3. *Rhombocystis*

5B Buňky oválné, eliptické, někdy až kulovité.

6A Buněčná stěna mateřské buňky hladká nebo granulovitá, vždy bez nápadných (pruhových či křížových) povrchových inkrustací.

7A Buňky +/- široce oválné, s jedním či několika chloroplasty s nebo bez pyrenoidu.

8A Buněčná stěna mateřské buňky je většinou zeslizovatělá, tvoří kolem buňky široký slizový obal nebo různorodé slizové útvary.

9A Buněčná stěna mateřské buňky (nebo vnější vrstva buněčné stěny) zeslizovatělá pravidelně; v oválném obalu zůstává jen několik zbytků pevné mateřské BS, jeden až dva ke stěně přiléhajících chloroplastů.4. *Oocystidium*

9B Buněčná stěna mateřské buňky zeslizovatělá nerovnoměrně, tvoří kolem buňky malé či velké slizové panožky nebo trnovité (do tvaru hvězdy uspořádané) útvary.

10A Slizové panožky nápadné, delší než průměr buňky; jeden chloroplast.5. *Echinocoleum*

10B Slizové panožky malé, nikdy delší než polovina šířky buňky; jeden až čtyři chloroplasty.6. *Sestosoma*

8B Buněčná stěna mateřské buňky většinou rozšířená a tvoří kolem buňky ohraničený obal někdy (částečně) ležící na povrchu vegetativní buňky.

11A Buněčná stěna s výstupky na celém povrchu nebo jen na některých místech.

12A Buňky s po celém povrchu nerovnoměrně rozmístěnými výstupky.7. *Granulocystis*

12B Povrch buňky pokryt několika načernalými inkrustovanými výstupky uspořádanými pravidelně do několika skupin.8. *Granulocystopsis*

11B Buněčná stěna hladká, jen na pólech někdy ztloustlá.9. *Oocystis*

7B Buňky +/- vřetenovité, s více, často se dotýkajícími, ke stěně přiléhajícími chloroplasty s jedním až dvěma pyrenoidy.10. *Fusola*

6B Buněčná stěna mateřské buňky hladká, vrstevnatá, s nápadnými širokými pruhovými nebo křížovými načernalými povrchovými inkrustacemi.11. *Gleotaenium*

4B Chloroplasty pásovité, hvězdčovitě a radiálně nebo houbovitě uspořádané, sbíhající se do středu buňky.

13A Chloroplasty pásovité, hvězdčovitě uspořádané, sbíhající se do středu buňky.

14A Buňky oválné až eliptické; buněčná stěna mateřské buňky rozšířena rovnoměrně.12. *Neglectella*

14B Buňky kruhové; buněčná stěna mateřské buňky zeslizovatělá, v obalu zůstávají zbytky buněčné stěny.13. *Chondrosphaera*

13B Jen jeden chloroplast, na povrchu houbovitý, nepravidelně hvězdčovitý, rozbíhá se ze středu buňky, kde leží jeden velký pyrenoid.14. *Oonephris*


















1B Buňky vždy zatočené, půlměsícovité, srpkovité, fazolovité až ledvinovité, se zaoblenými nebo tupě zašpičatělými konci.

15A Buněčná stěna hladká.

16A Buňky půlměsícovité až fazolovité, chloroplasty přiléhající ke stěně, velké, s jedním (často špatně viditelným) pyrenoidem.15. *Nephrocytium*

16B Buňky půlměsícovitě až srpkovitě zatočené, chloroplasty přiléhající ke stěně, miskovité, bez pyrenoidu.16. *Nephrochlamys*

15B Buněčná stěna nepravidelně pokryta výstupky, chloroplast přiléhající ke stěně, miskovitý, s pyrenoidem.17. *Juranyiella*

| | | | | | | | |
|---------------------------|---|---|---|---|---|---|-------------------------------------|
| Zil. |  | flach Ch wandständig, 1 Py + | (5a) | <u>RHOMBOCYSTIS</u> | | | |
| Zil. |  | Ch wandständige, mehrere Py 1-2 | (7b) | <u>FUSOLA</u> | | | |
| Zil. |  | mit lappiger Hülle | (9b) | 1-4 Ch <u>SESTOSOMA</u> |  | 1 Ch <u>ECHINOCOLEUM</u> | |
| Zil. |  | Zil-Wand warzig oder inkrustiert | (11a) |  | <u>GRANULOCYSTIS</u> |  | <u>GRANULOCYSTOPSIS</u> |
| (6b) | |  | <u>GLOEOTAENIUM</u> | | | | |
| Mutter-Zil-Wand anliegend | | (2a) |  | <u>ECDYSICHLAMYS</u> |  | <u>FOTTERELLA</u> | |
| Zil-Wand glatt | | Mutter-Zil-Wand eine Hülle bildend | Ch 1-4, wandständig | Mutterzellwandreste + | <u>OOCYSTIDIUM</u> | Mutterzellwandreste - | <u>OOCYSTIS</u> |
| (4b) | Ch 1 - mehrere, sternförmig angeordnet |  | <u>CHONDROSPHAERA</u> |  | <u>NEGLECTELLA</u> |  | <u>OONEPHRIS</u> Ch spongiomorph |
| Zil. |  | Py + | Zil. |  | <u>NEPHROCYTIUM</u> |  | <u>JURANYIELLA</u> |
| (1b) | | Py - |  | <u>NEPHROCHLAMYS</u> | | | |

Obr. 3: Tabulka rodů podčeledi Oocystoideae.

Určovací klíč druhů rodu *Oocystis*:

1A Vegetativní buňky obsahují 1-4-(8-10?) chloroplastů (jejich počet závisí na budoucím počtu autospor), autospóra obsahuje pouze 1 autosporu.

2A Buňky v buněčné stěně mateřské buňky většinou zůstávají uzavřené po dvou a více generací (vrstevnatý sliz okolo buněk).

3A Buňky jasně vřetenovité nebo eliptické, nanejvýš 12 μ m dlouhé.

4A Buňky 3,5-9,5 x 2-4,8 μ m velké, výskyt v tropických zarostlých vodách.*O. tainoensis*

4B Buňky 7-12 x 4-7 μ m velké, známé z Baltského moře.*O. marina*

3B Buňky oválné až válcovité (uprostřed), 7-20 μ m dlouhé.

5A Buňky oválné, na pólech jasně zakulacené, bez ztlustěnin na pólech.*O. novae-semliae*

5B Buňky uprostřed +/- válcovité nebo lehce podlouhlé a vřetenovité, na pólech lehce zakulacené, až tupě špičaté, často s malými ztlustěninami na pólech.*O. submarina*

2B Buňky jednotlivě nebo v jednom jednoduché +/- ohraničené, ne vrstevnaté buněčné stěně mateřské buňky uzavřené.

6A Buňky v koloniích volné, ne spojené řetízky ze zbytků buněčné stěny mateřské buňky.

7A Dceřiné buňky se uvolňují po zeslizovatění buněčné stěny mateřské buňky, buňky jsou uloženy v jemném, ne jasně ohraničeném slizovém obalu.

8A Buňky podlouhle oválné až válcovité, na pólech zakulacené, bez ztlustěnin na pólech, občas lehce asymetrické (zatočené), 9-18,5 x 6-10,5 μ m velké.*O. nephrocytioides*

8B Buňky vřetenovité až oválné, symetrické.

9A Slizový obal kolem buněk stejně široký.

10A Buňky 4,8-14,4 x 1,6-8 μ m velké. *O. lacustris*

10B Buňky (12)-13-32-(38) μ m dlouhé.

11A Vegetativní buňky obsahují (1)-2-(4) chloroplasty.*O. socialis*

11B Vegetativní buňky obsahují 4-8-(10) chloroplastů.*O. natans*

9B Slizový obal kolem buněk nestejně široký, kolem ekvatoriální roviny buňky rozšířený.*O. heteromucosa*

7B Dceřiné buňky se uvolní po prasknutí buněčné stěny mateřské buňky, ta je +/- ostře ohraničená, přiléhá k buňkám, později je i rozšířená, na okrajích neslizovatí nebo až druhotně leží ve slizovém obalu.

12A Buňky zřetelně podlouhlé.

13A Vegetativní buňky +/- vřetenovité až oválné, symetrické, se stejnými konci.

14A Vegetativní buňky v populaci nejčastěji kratší než 10 μ m.

15A Vegetativní buňky +/- vřetenovité, na pólech lehce a tupě špičaté, někdy lehce ztloustlé.

16A 2 autospory, buněčná stěna mateřské buňky jen lehce rozšířená, zachovává si svůj vřetenovitý tvar a praská brzy. Buňky nejvýše 8 μ m dlouhé.*O. bispora*

16B 2-4-(8) autosport, které často dlouho zůstávají v +/- oválné buněčné stěně mateřské buňky, buňky až 12 μ m (někdy víc?) dlouhé.*O. parva*

15B Vegetativní buňky +/- oválné, na pólech jasně zakulacené.

17A Buňky v koloniích leží od buněčné stěny mateřské buňky a jedna od druhé vzdáleny. ...*O.pusilla*

17B Buňky v koloniích nahlučeny, buněčná stěna mateřské buňky leží po delší dobu na buňkách.*O.rhomboidea*

14B Vegetativní buňky v populaci z větší části delší než 10 μ m.

18A Vegetativní buňky většinou kratší než 20 μ m.

19A Buňky široce vřetenovité až eliptické, na pólech slabě ztloustlé, většinou 10-25 x 6-14 μ m velké.*O. marssonii*

19B Buňky široce oválné, bez ztluštěnin na pólech, většinou 9-20 x 8,5-13 μ m velké.*O. borgei*

18B Vegetativní buňky většinou delší než 20 μ m, oválné.

20A Disponuje pyrenoidem, výskyt na vlhkých skálách.*O. rupestris*

20B Pyrenoid chybí, výskyt ve vodě.*O. naegeli*

13B Vegetativní buňky +/- úzce větvenovité, někdy velmi lehce asymetrické, na jednom konci často více zakulacené (zvláště u autosport a mladých buněk)

21A Ohraničení buněčné stěny mateřské buňky +/- kulaté nebo oválné, buňky většinou 10-25 x 5-15 μ m velké.*O. apiculata*

21B Ohraničení buněčné stěny mateřské buňky nepravidelně oválné nebo piškotovité, buňky 8-14,5 x 3,5-7 μ m velké.*O. ecballocystiformis*

12B Obrys buněk nepravidelně kulatý.

22A Buňky +/- krátce hruškovité, na jednom póle papilovitá ztluštěnina, 16-19 x 14-16 μ m velké.*O. pyriformis*

22B Buňky nepravidelně zakulacené, bez ztluštěnin na pólech, 24-30 x 16-20 μ m velké.*O. irregularis*

6B Buňky ve slizových koloniích spojeny do řetízků zbytky buněčné stěny mateřské buňky.*O. cohaerens*

1B Vegetativní buňky vždycky s více než 4 (běžně s více než 8) chloroplasty, autospory se dvěma či více chloroplasty.

23A Buňky malé +/- 12 x 7 μ m, s velkým počtem malých kotoučkovitých chloroplastů.*O. pelagica*

23B Buňky delší (11-80 μ m).

24A Buňky +/- oválné.

25A buňky bez ztluštěnin na pólech.

26A Pyrenoid vždycky chybí, buňky 11-30 x 6,8-15,6 μ m velké.*O. elliptica*

26B Disponuje pyrenoidem, buňky delší než 30 μ m.

27A Buňky +/- 31-35 x 19-24 μ m.*O. kumaonensis*

27B Buňky +/- 41-50 x 33-40 μ m.*O. hunanensi*

25B Buňky se ztluštěninami na pólech, +/- 12,8-52,8 x 4,9-29,7 μ m velké.*O. solitaria*

24B Buňky piškotovité, s 15-25 chloroplasty, 30-80 x 12-35 μ m velké.*O. panduriformis*

7.3. Příloha 3: Tabulka současného stavu čeledi Oocystaceae

Tab. 1: Přehled současného stavu čeledi Oocystaceae. V tabulce jsou uvedeny všechny kmeny, jež byly předmětem zkoumání od práce Komárek and Fott (1983). Jsou to druhy, u nichž se potvrdila příslušnost do čeledi Oocystaceae, druhy, jež byly nově popsány a zařazeny do čeledi Oocystaceae, druhy, jež byly do čeledi Oocystaceae přearženy z jiné čeledi a o druhy z čeledi vyřazené.

(A) Změny provedené na základě molekulárních analýz.

| Druh | Původní zařazení (Komárek and Fott 1983) | Práce |
|---|--|--|
| Potvrzena příslušnost k čeledi Oocystaceae | | |
| <i>Oocystis heteromucosa</i> | Oocystaceae | Hepperle et al. 2000 |
| <i>Oocystis marssonii</i> | Oocystaceae | Hepperle et al. 2000 |
| <i>Oocystis solitaria</i> | Oocystaceae | Hepperle et al. 2000 |
| <i>Lagerheimia genevensis</i> | Oocystaceae | Krienitz et al. 2003 |
| <i>Echinocoleum elegans</i> | Oocystaceae | Pažoutová a kol. 2010 |
| <i>Oocystidium sp.</i> | Oocystaceae | Krienitz and Bock, in press |
| <i>Eremosphaera viridis</i> | Oocystaceae | Buchenheim and Buchenheim in Pažoutová a kol. 2010 |
| <i>Lagerheimia marssonii</i> | Oocystaceae | Tato práce |
| <i>Oocystis cf. pusilla</i> | Oocystaceae | Tato práce |
| <i>Oocystis cf. bispora</i> | Oocystaceae | Tato práce |
| Nové druhy | | |
| <i>Elongatocystis ecballocystiformis</i> | - | Krienitz and Bock, in press |
| Přearženo do Oocystaceae z jiné čeledi | | |
| <i>Tetrachlorella alternans</i> | Scenedesmaceae | Hepperle et al. 2000 |
| <i>Amphikrikos sp.</i> | Chlorellaceae | Hepperle et al. 2000 |
| <i>Makinoella tosaensis</i> | Scenedesmaceae | Hepperle et al. 2000 |
| <i>Crucigeniella rectangularis</i> | Scenedesmaceae | Krienitz et al. 2003 |
| <i>Schizochlamydeella capsulata</i> | Radiococcaceae | Wolf et al. 2003 |
| <i>Coenochloris planoconvexa*</i> | Radiococcaceae | Pažoutová a kol. 2010 |

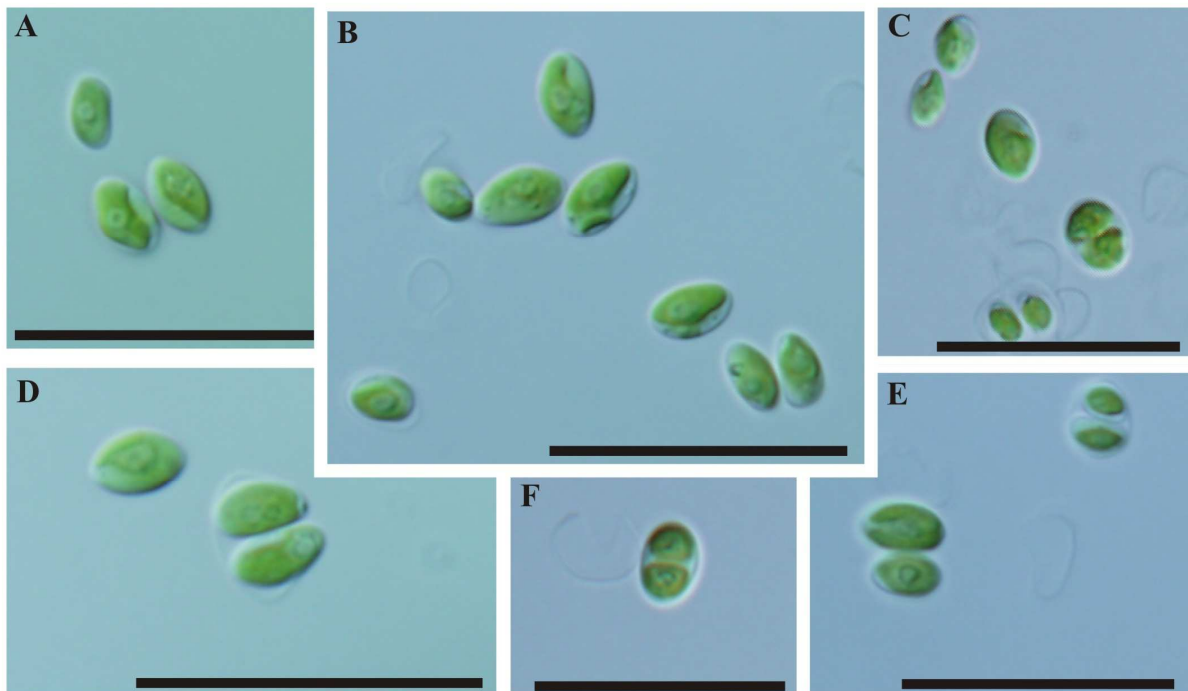
| | | |
|---|--------------------------|-----------------------------|
| <i>Quadricoccus ellipticus</i> | Botryococcaceae | Krienitz and Bock, in press |
| <i>Willea</i> sp. | Scenedesmaceae | Tato práce |
| Druh | Současné zařazení | Práce |
| Přeřazeno z Oocystaceae do jiné čeledi | | |
| <i>Diacanthos belenophorus</i> | Chlorellaceae | Krienitz et al. 2004 |

*Přejmenována na *Ooplanctella planoconvexa*

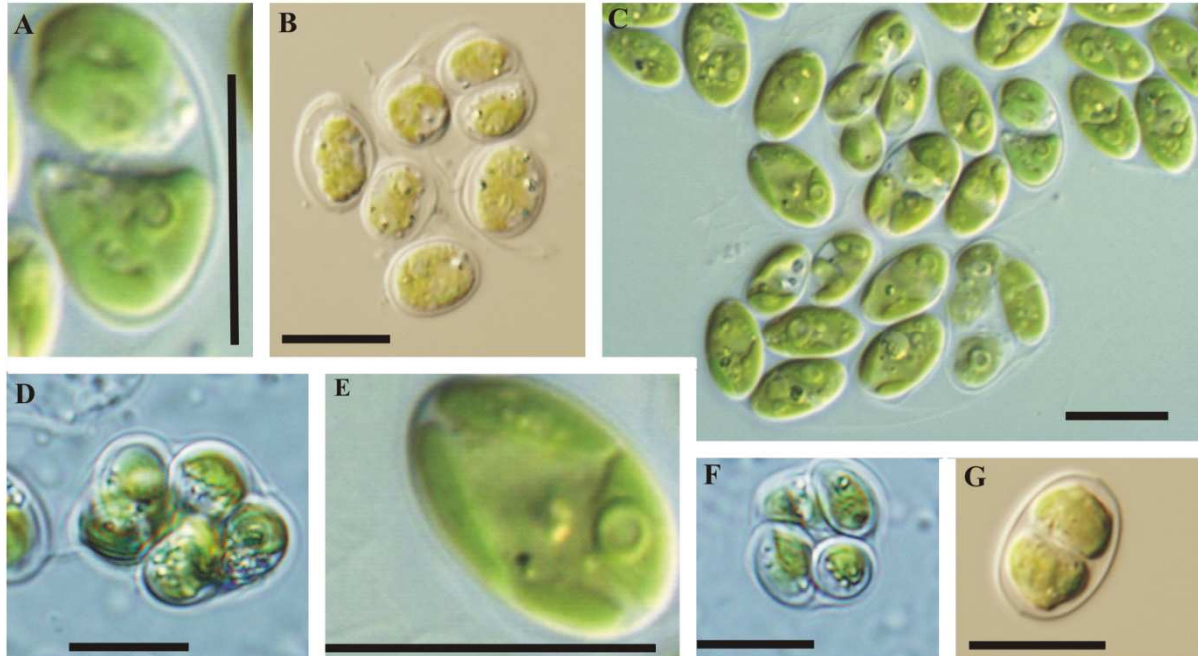
(B) Změny provedené na základě morfologického pozorování.

| | | |
|---|-------------------------|-------------------------|
| Druh | Původní zařazení | Práce |
| Nové druhy | | |
| <i>Neglectella peisonis</i> | - | Schagerl 1993 |
| <i>Oocystopsis granulata</i> . | - | Heynig 1991 |
| Přeřazeno do Oocystaceae z jiné čeledi | | |
| <i>Amphikrikos minutissimus</i> | Chlorellaceae | Hindák a Hindáková 2008 |

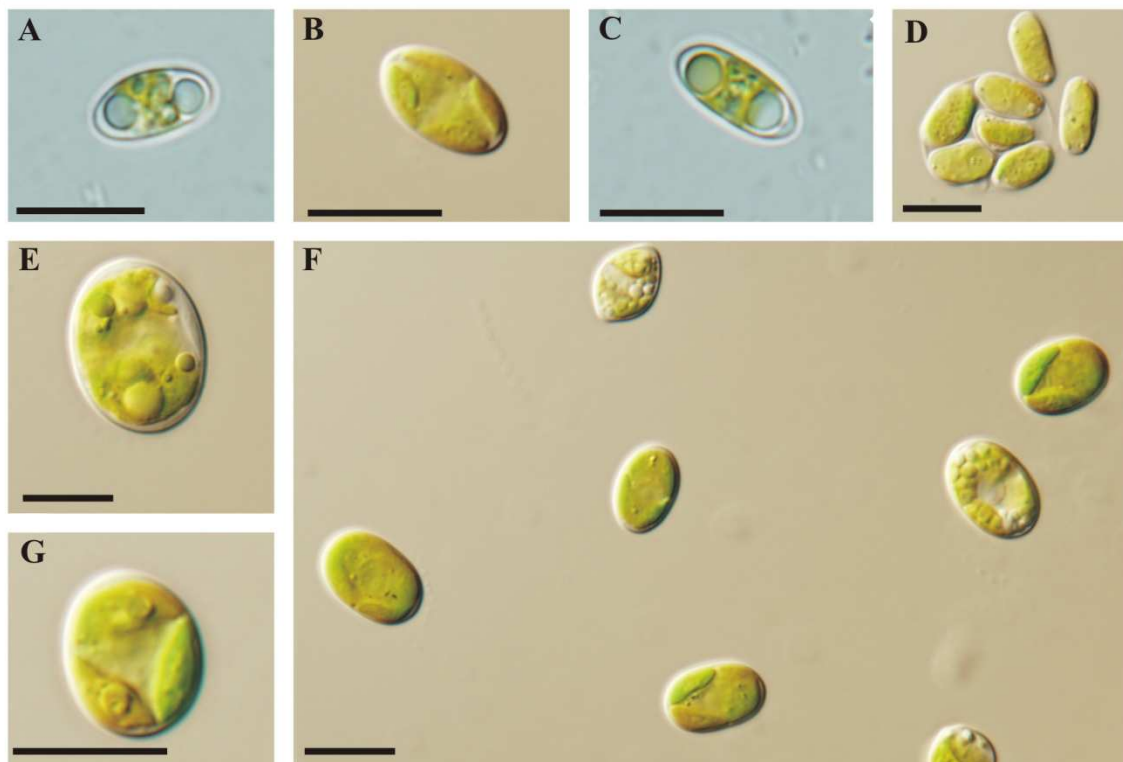
7.4. Příloha 4: Obrazové tabule



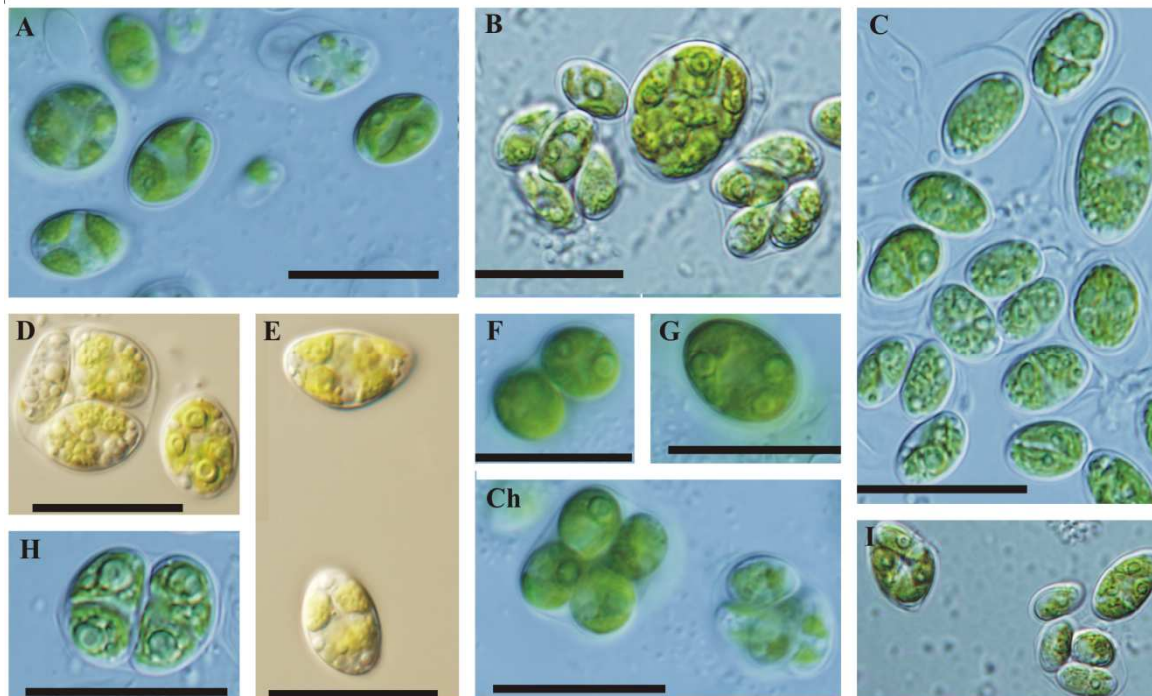
Obr. 4: *Oocystis cf. bispora*. A: dobře viditelný jeden chloroplast s pyrenoidem, B,C: rozmístění buněk v kultuře, D: autospory po dvou, E: praskání buněčné stěny při uvolňování autospor, F: dělící se buňka. (Měřítka je 20 μ m.)



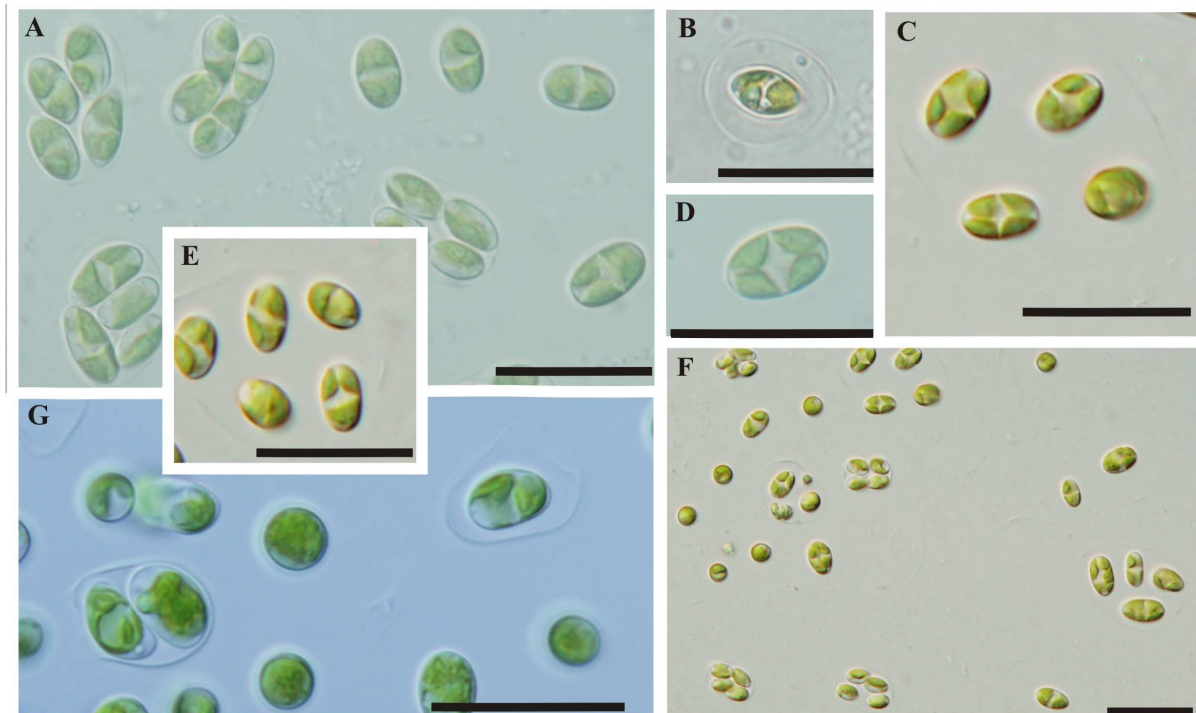
Obr. 5: *Oocystis lacustris*. A, E : detail buňky, viditelný pyrenoid, B, C: uspořádání buněk v kultuře, D: sporangium, F: buňky po čtyřech, G: dělící se buňka. (Měřítka je 10 μ m.)



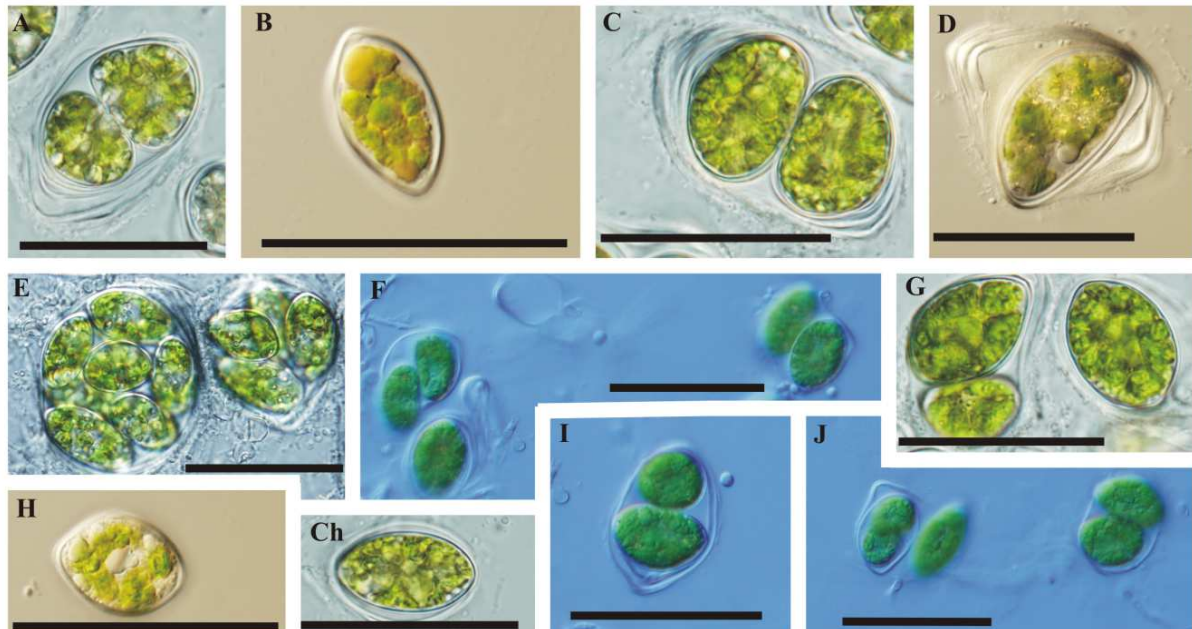
Obr. 6: *Oocystis marssonii*. A, C: velké vakuoly, B: typické čtyři chloroplasty s pyrenoidem, D: prasknutí sporangiální stěny, E, G: detail buňky, F: rozmístění buněk v kultuře. (Měřítka je 10 μ m.)



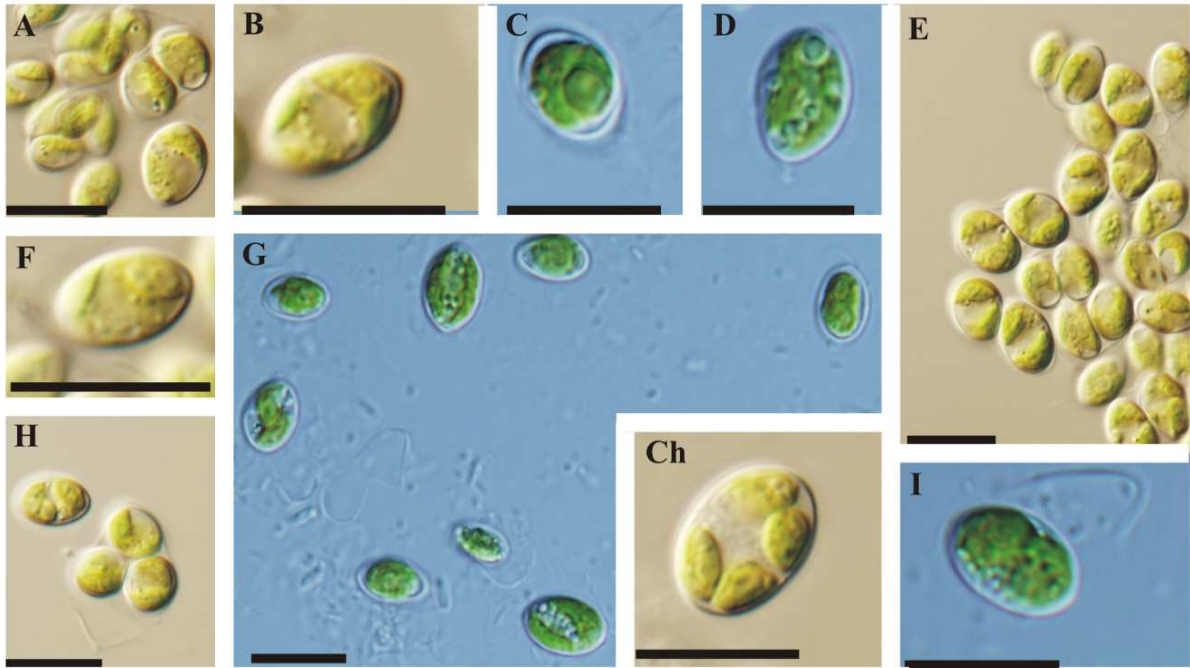
Obr. 7: *Oocystis* cf. *nephrocytioides*: A, C: rozmístění buněk v kultuře, B, I: sporangia, D: oválný a větvenovitý tvar buňky, E: asymetrický tvar, H: ledvinovitý tvar, F: buňky po dvou u sebe, G: solitérní buňka s viditelnými velkými pyrenoidy, Ch: buňky ve skupině po čtyřech. (Měřítka je 20 μ m.)



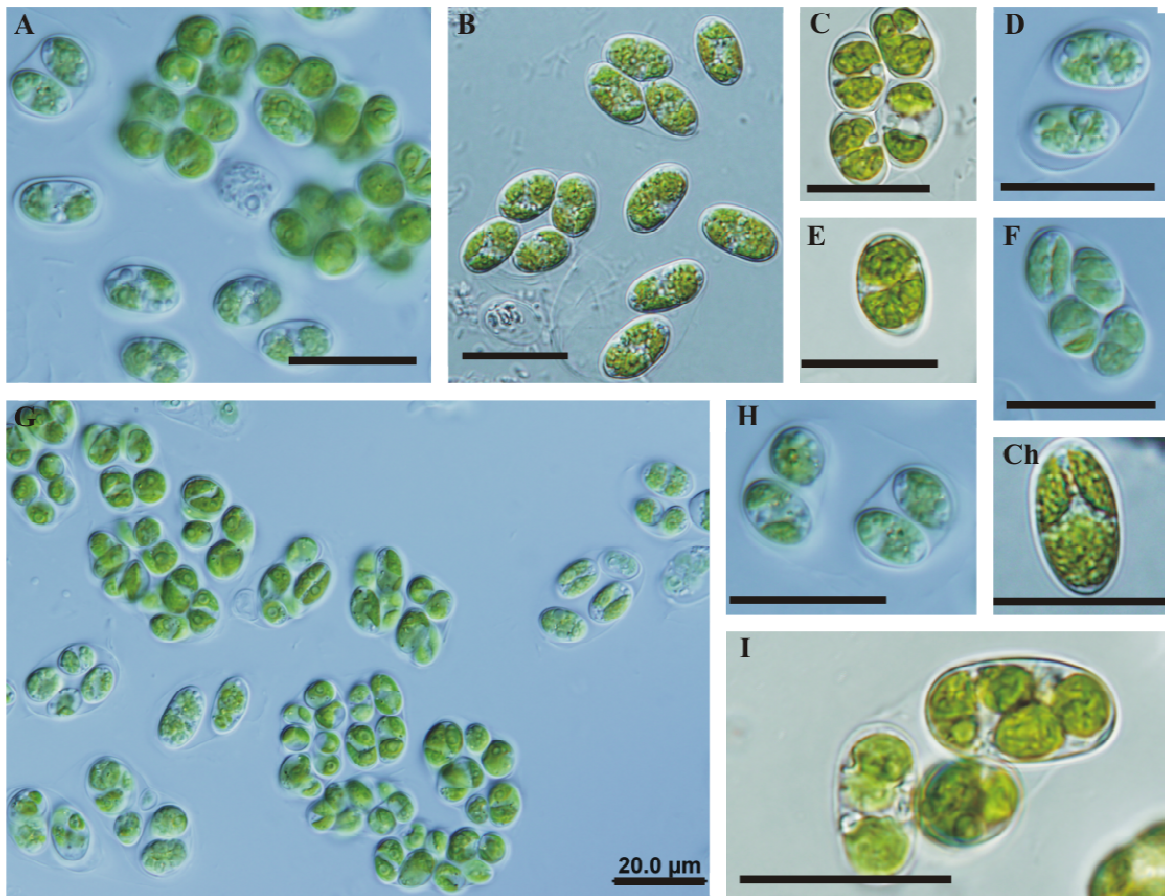
Obr. 8: *Oocystis* cf. *pusilla*. A: mladé buňky po čtyřech, B: soliterní buňka, C: čtyři buňky v rozšířené buněčné stěně mateřské buňky, D: detail buňky, E: shluk buněk, F: rozmístění buněk v kultuře, G: praskající buněčná stěna mateřské buňky. (Měřítka je 20 μ m.)



Obr. 9: *Oocystis solitaria* f. *major*. A, C, G: typický výskyt buněk po dvou v buněčné stěně mateřské buňky, B: viditelné pyrenoidy, D: zřetelné vakuoly v buňce, E: dobře zřetelné množství chloroplastů v buňce, F: mnohvrstevná zeslizovatělá buněčná stěna, H: sporangia, Ch: výskyt buněk v kultuře. (Měřítka je 50 μ m.)



Obr. 10: *Lagerheimia marssonii*. A: dělící se buňky, B, C, D, F: detail buňky, E, G, H: uspořádání buněk v kultuře, Ch: sporangium, I: praskající buněčná stěna. (Měřítko je 10 μ m.)



Obr. 11: *Willea* sp.. A: detail uspořádání coenobia, B: ploché coenobium, C: uspořádání po čtyřech buňkách, D: uspořádání po dvou buňkách, E, Ch: detail buňky, F, G: coenobia v kultuře, H: vrstvené obaly, I: sporangium, zřetelný pyrenoid. (Měřítko je 20 μ m.)