

Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

Katedra botaniky¹ & Katedra molekulárnej biológie²

**Fenotypová variabilita izolátov zelenej
vláknitej riasy *Klebsormidium*
crenulatum a jej molekulárno-
fylogenetické vzťahy v rámci
rodu *Klebsormidium***

Bohuslav Uher¹ & Katarína Šramková¹ & Gabriel Minárik²

Ciele:

zistiť taxonomicko-morfologické rozdiely rias
Klebsormidium crenulatum a *K. flaccidum*

analyzovať gén 18S rRNA riasy *Klebsormidium crenulatum*
zo zbierky kultúr Katedry botaniky PRIF UK

- štandardizovať PCR
- zistiť fylogenetické vzťahy

Pozn. V databáze GenBank zatiaľ chýba akákoľvek sekvencia
riasy *Klebsormidium crenulatum* !

Taxonomické a fylogenetické postavenie rodu *Klebsormidium*

Zelené rastliny (Viridiplantae, syn. Chlorobionta)

2 vývojové línie:

- zelené riasy (Chlorophytae)
- streptofyty (Streptophytae)

Chlorophytae:

- uzavretá mitóza
- fykoplást
- slepá vývojová línia

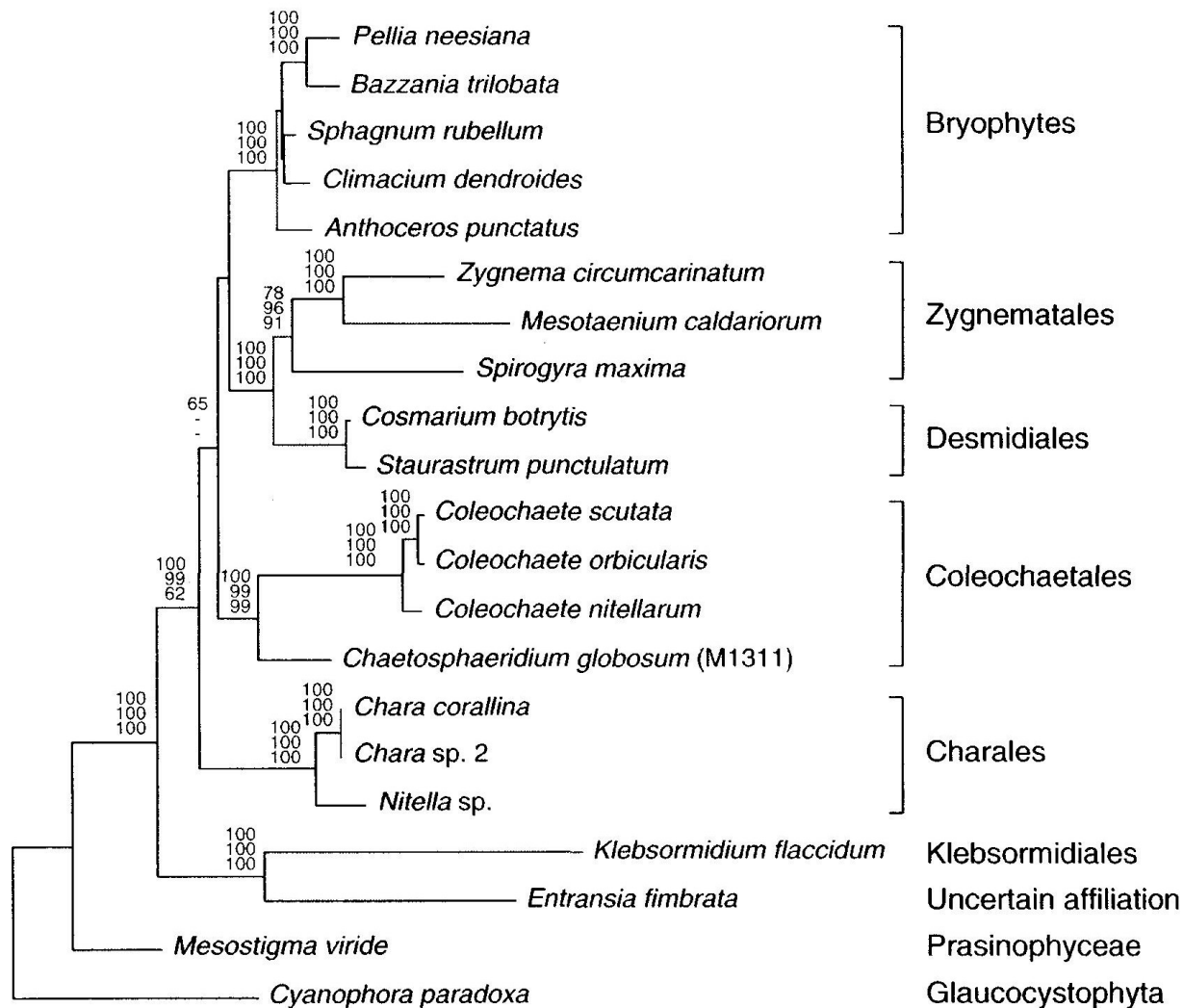
Streptophytae:

- ortomitóza
- fragmoplást
- Charophytae
- Bryophytae
- Cormophytae

Taxonomické a fylogenetické postavenie rodu *Klebsormidium*

Fylogenetické analýzy na základe sekvencií 18S rRNA potvrdzujú, že Charophyceae a suchozemské rastliny vytvárajú monofyletickú skupinu

Na základe štúdií fylogenetických vzťahov medzi rôznymi zástupcami všetkých piatich radov Charophyceae, je vetva radu Klebsormidiales umiestňovaná na bázu s ostatnými radmi Charophyceae, ako aj zástupcami Bryophyta



Fylogenetické vzťahy medzi 19 taxónmi streptofýt na základe chloroplastovej SSU a LSU rRNA, strom vypracovaný metódou ML (podľa Turmel et al.2002).

Ekológia druhov rodu *Klebsormidium*

terestrické, sladkovodné, antropogénne zaťažené a urbanizované biotopy

***K. crenulatum* agresívny kolonizátor terestrických biotopov priemyselných komplexov Porúria a Porýnia v severozápadnom Nemecku**

Ekológia skúmaných kmeňov *K. crenulatum*

- hydroterestrické biotopy, prímorská Antarktída
- hypogeický biotop, Gombasecká jaskyňa
- hypogeický biotop, krypta Chatama Sófera

Materiál a metodika

Kmene *Klebsormidium crenulatum*:

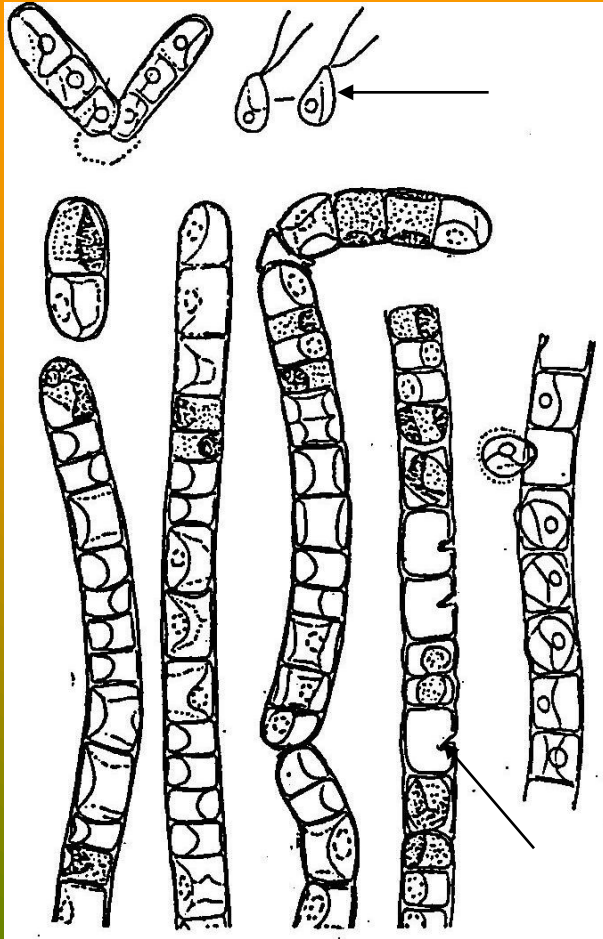
- 1- 4. Kmene ANT-2004/1-4 z hydro-terestrického biotopu ostrova Kráľa Juraja (subregión prímorská Antarktída)
5. Kmeň GO-2003/5-4, z Gombaseckej jaskyne
6. Kmeň CHS-1998/13, z náhrobku krypty Chatama Sófera

Laboratórna kultivácia kmeňov

paralelne pestované v laboratórnych podmienkach:

- 20-22°C
- svetelnom režime 16:8
- agarom spevnené a tekuté minerálne kultivačné médiu BBM.
testované na organických médiách (0,1% kvasničný extrakt a 0,1% glukóza), kvôli vylúčeniu potenciálnej kontaminácie

Markery druhu *Klebsormidium flaccidum* – na základe laboratórnych kultivácií



Klebsormidium flaccidum

Na agarových platniach:

- tenké homogénne kolónie, bez vnitej štruktúry

V roztoku:

- zelený prstenec na hladine roztoku v skúmavke a hustý chumáč na dne skúmavky

Vlákná:

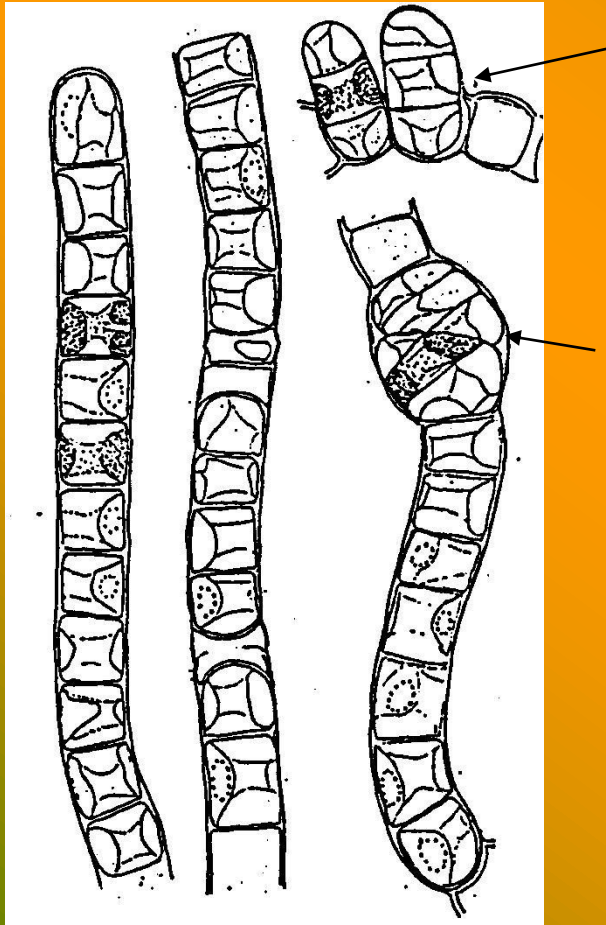
- 40-50 bunkové, rovné

Zoosporogenéza:

- prítomnosť biflagelátnych zoospór

- póry v bunkovej stene

Markery druhu *Klebsormidium crenulatum* – na základe laboratórnych kultivácií



Na agarových platniach:

-stredovo súmerné, zreteľne vlnité kolónie (veľmi dobre rastúce)

V roztoku:

-ponorené chumáče na dne skúmavky (slabo vyvinuté)

Vlákná:

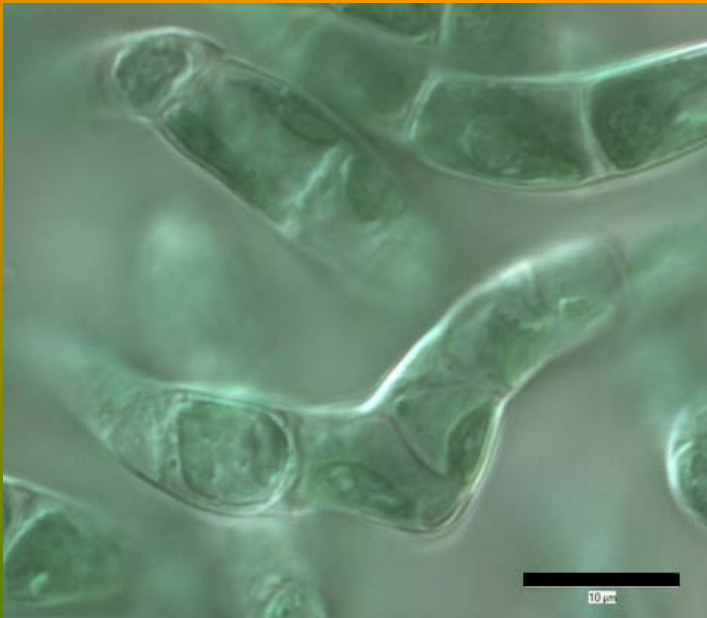
-50-85 bunkové, špirálovito zvlínené

Aplanosporogenéza

Nepravé rozkonárovanie

Klebsormidium crenulatum

Klebsormidium crenulatum



15 dní, agar BBM



20 dní roztok BBM

mierka 10µm

Čiastkové výsledky

Izolácia DNA

kit na izoláciu celkovej DNA (NucleoSpin, Macherey-Nagel)

PCR

Použité primery pre amplifikáciu úsekov 18S rRNA:

5'-3' CTGGTTGATC CTGCCAGTAG (Oligo 1)

5'-3' GTGAACCTGC AGAAGGATCA (Oligo 2)

Štandardizácia podmienok PCR:

1. PCR premix TrueAllele (ďalej TA) od firmy Applied Biosystems (USA),

4 μL H_2O , 9 μL TA premixu, po 0.5 μL 10pmol/ μL oboch primerov, 1.5 μL DNA, výsledný objem reakcie 15 μL ,

- anelačná teplota 50 °C

- primery sú dobré, ale PCR ma slabý výt'azok

PCR

2. Long PCR Core kit od firmy IzogenLab (Rusko),

- 10 μL H_2O , po 2.5 μL 1pmol/ μL oboch primerov (podľa odporúčaní výrobcu), 5 μL DNA, výsledný objem reakcie 20 μL ,

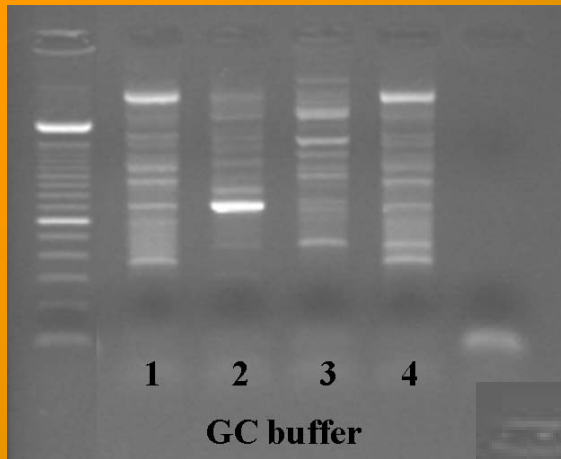
- anelačná teplota 50 °C

- PCR na templátoch z rias vôbec nebežala

3. Reakcie s Phusion polymerázou;

10.4 μL H_2O , 4 μL 5xGC rich pufru pre Phusion polymerázu, 0.4 μL 10mmol/l dNTPs , po 1 μL 10pmol/ μL oboch primerov, 0.2 μL 2U/ μL Phusion polymerázy, 3 μL DNA, výsledný objem reakcie 20 μL ,

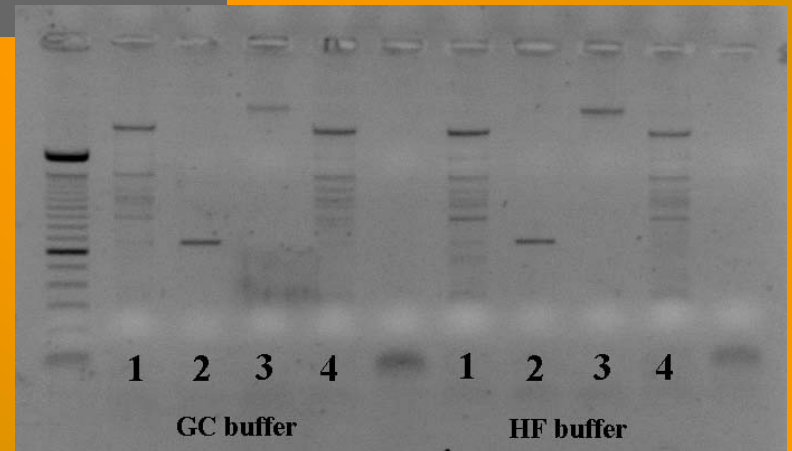
PCR s Phusion polymerázou



50°C



53°C



55°C

Sekvencia zo vzorky č.2 (*Klebsormidium crenulatum*)

```
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   CGCTTCGGGACGCAGCCCATCTTTTAAAAGACGTTCAGTCAAAGAGAAAGGGCCCTCTTTGCCGCGTCAGACCCGCCGACGGTAAAAATCTGRAGCAAC

      110     120     130     140     150     160     170     180     190
101 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    AGCTGCTCTACAGCAACGTCAAACCTCAAAGGAGGTGAGGGGAGGCTGCGGCTGGTATAAATCGGGTTGGACAGAAATCATAAACCTTGATTTCGAGGATGC

      210     220     230     240     250     260     270     280     290
201 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    TTGGTCAGGTAGTGGACGCGTATTCGAAGAGTGTGCCACAAAAGCGTCCAGTCAAATGCAAGATCATAAAGTGCTTTACAAGATTCCGCTCTCTCTCTC

      310     320     330     340     350     360     370     380     390
301 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    AGTAGACCAGTGCTTTGTTAGTGCGGCGTCTGGAGTCTTTGTGACGCCTCGACAAATTAGTCAAAAATGATCAGAGCCCGTTGGTTTGGGGTTTGCGT

      410     420     430     440     450     460     470     480     490
401 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    TGTCTTTTCAAAGCTCCGAAATGCATCGCCCCATCTCTATCGATTTTGA AAAATTCTGCTCTGGTTTGAAAAACCCCGAATTAAAAGACAGATCTTGCTG

      510     520     530     540     550     560     570     580     590
501 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    CTTATCCCTGGTCCTCTTCCCTCAGGTGAACCATWATGGGGTCCCGTCAAACAGCCCGTCCCTTCCYTGACAKGTCTCGCCCAATTGATACA AACTAA

      610     620     630     640
601 .....|.....|.....|.....|
    TGCCGGTCCTTAACTTGATTCCCTTCTGCAGGTTTCCACA
```

640 bp

G+C 50,47%

A+T 48,91%

Pod'akovanie

- Grant UK 209/2005
- Grant VEGA 1/2343/05
- Grant UK 222/2006



Ďakujem za pozornosť