

**Univerzita Komenského v Bratislave**  
**Prírodovedecká fakulta**

**Katedra botaniky<sup>1</sup> & Katedra molekulárnej biológie<sup>2</sup>**

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

**Bohuslav Uher<sup>1</sup> & Katarína Šramková<sup>1</sup> & Gabriel Minárik<sup>2</sup>**

## 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  
rias *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

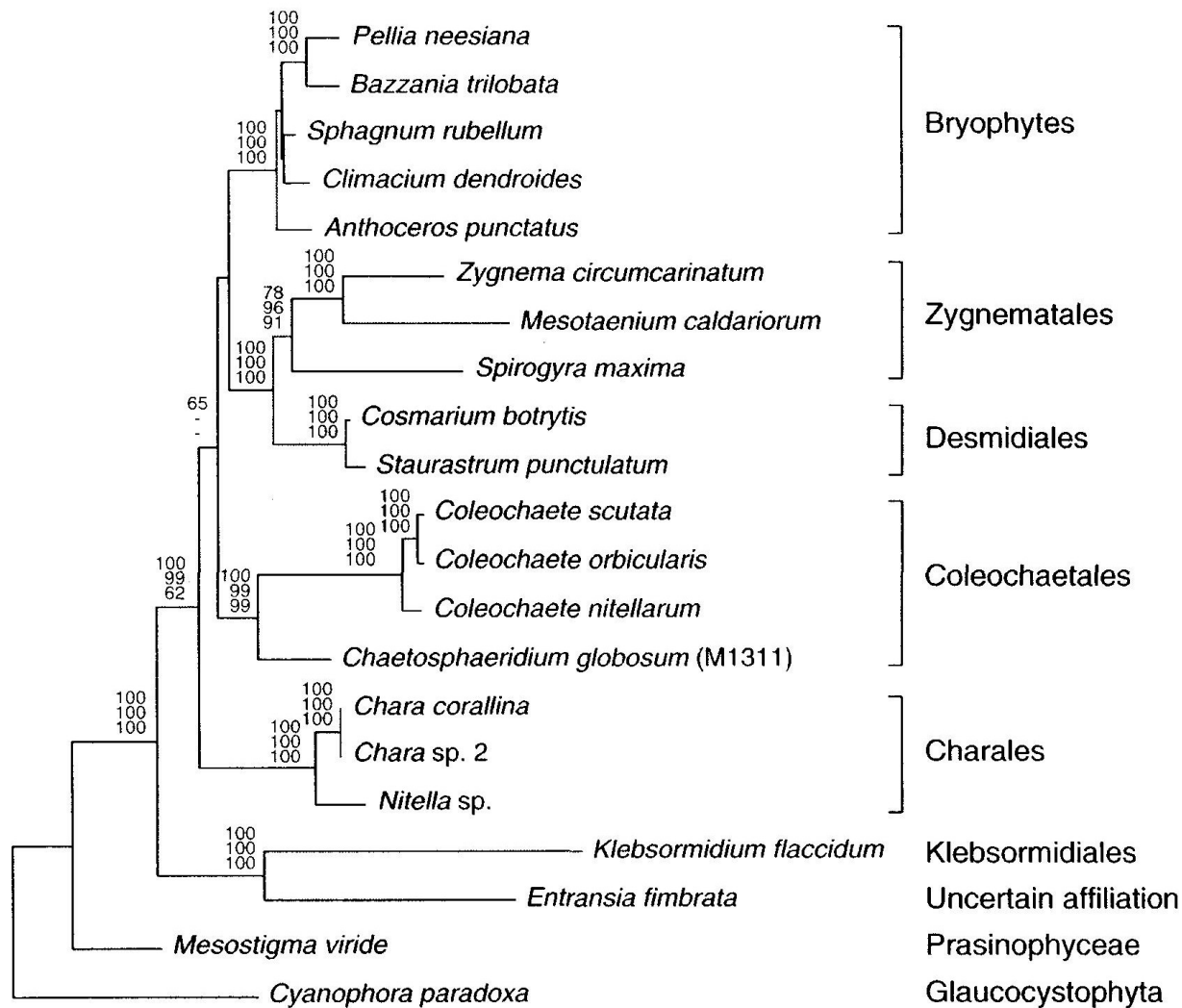
## Streptophytae:

- 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*:**

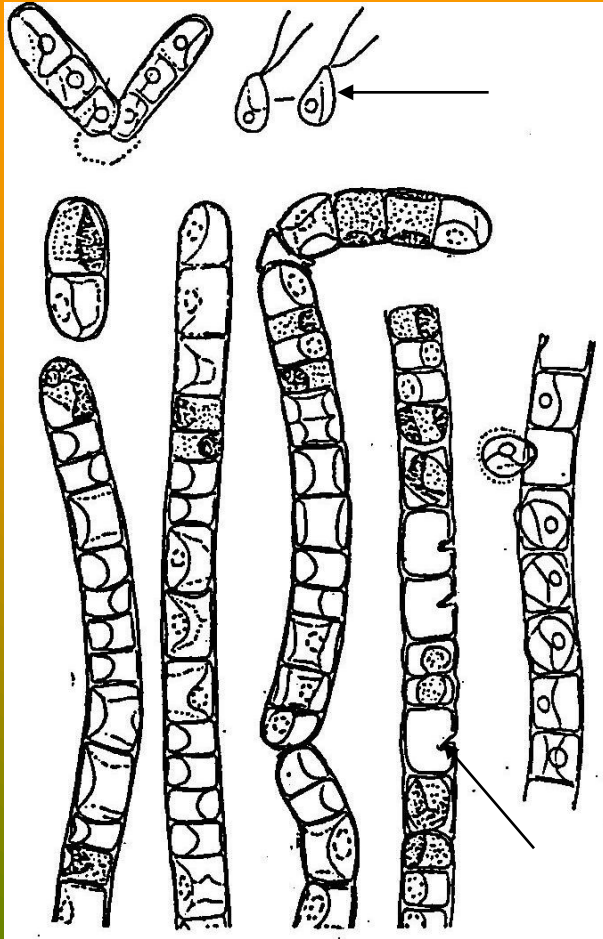
- 1- 4. Kmene ANT-2004/1-4 z hydro-terestrického biotopu ostrova Kráľa Juraja (subregión prímorská Antarktída)
5. Kmeň GO-2003/5-4, z Gombaseckej jaskyne
6. Kmeň CHS-1998/13, z náhrobku krypty Chatama Sófera

## **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



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:

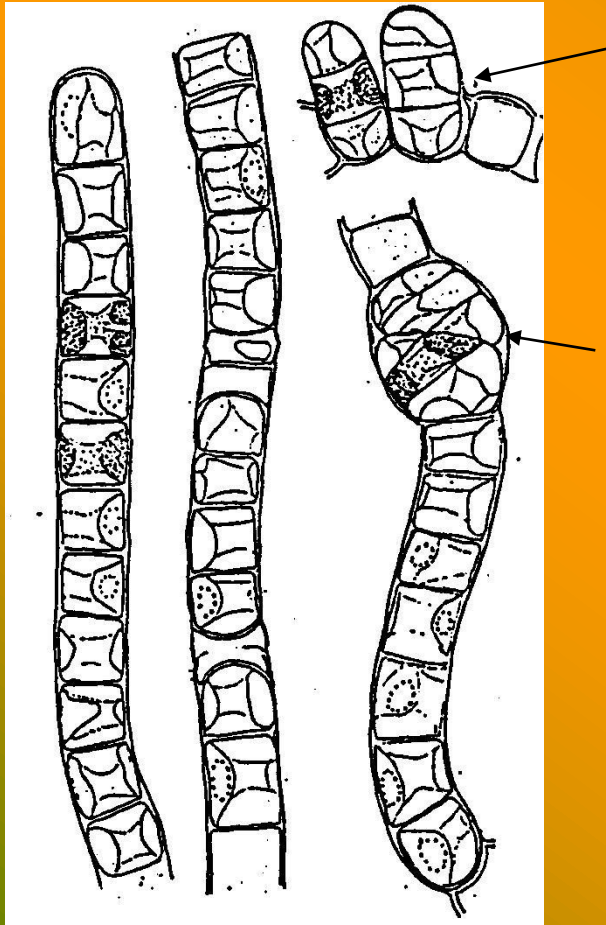
-prítomnosť biflagelátnych zoospór

-póry v bunkovej stene

*Klebsormidium flaccidum*



# 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:

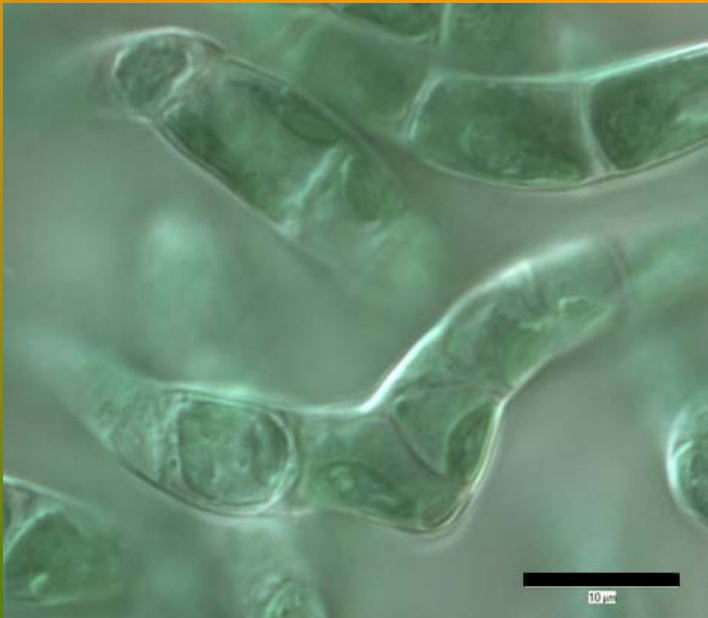
-50-85 bunkové, špirálovito zvlínené

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  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 9  $\mu\text{L}$  TA premixu, po 0.5  $\mu\text{L}$  10pmol/ $\mu\text{L}$  oboch primerov, 1.5  $\mu\text{L}$  DNA, výsledný objem reakcie 15  $\mu\text{L}$ ,

- anelačná teplota 50 °C

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

## PCR

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

- 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , po 2.5  $\mu\text{L}$  1pmol/ $\mu\text{L}$  oboch primerov (podľa odporúčaní výrobcu), 5  $\mu\text{L}$  DNA, výsledný objem reakcie 20  $\mu\text{L}$ ,

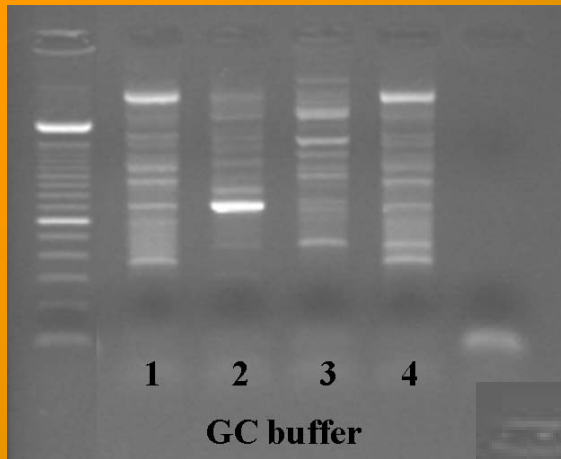
- anelačná teplota 50 °C

- PCR na templátoch z rias vôbec nebežala

3. Reakcie s Phusion polymerázou;

10.4  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 4  $\mu\text{L}$  5xGC rich pufru pre Phusion polymerázu, 0.4  $\mu\text{L}$  10mmol/l dNTPs , po 1  $\mu\text{L}$  10pmol/  $\mu\text{L}$  oboch primerov, 0.2  $\mu\text{L}$  2U/ $\mu\text{L}$  Phusion polymerázy, 3  $\mu\text{L}$  DNA, výsledný objem reakcie 20  $\mu\text{L}$ ,

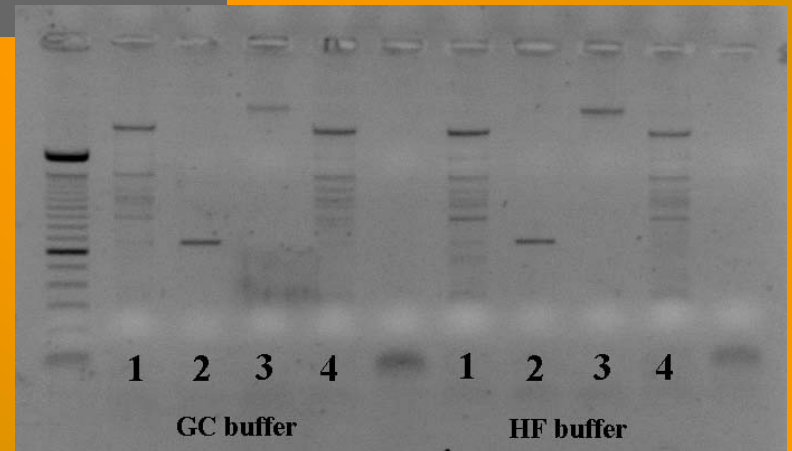
# PCR s Phusion polymerázou



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