

Uniwersytet Pedagogiczny  
im. Komisji Edukacji Narodowej  
Wydział Geograficzno - Biologiczny  
Instytut Biologii  
Zakład Fizjologii Roślin



**Patrycja Zagata Leśnicka**

**Analiza molekularna wybranych fragmentów DNA  
endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria***

Praca doktorska napisana pod kierunkiem  
Pani dr hab. Magdaleny Greczek-Stachury, prof. UP

Kraków 2016

## ***Podziękowania***

*Składam serdeczne podziękowania mojej promotor Pani dr hab. Magdalenie Greczek-Stachurze, prof. UP za opiekę naukową, poświęcony czas, cierpliwość oraz wszelką pomoc okazaną mi w realizacji pracy doktorskiej.*

*Dziękuję również Panu dr hab. Sebastianowi Tarczowi za okazaną pomoc przy wykonywaniu badań oraz za udzielone cenne wskazówki.*

*Składam także podziękowania pracownikom Instytutu Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie oraz pracownikom Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.*

*Dziękuję także swoim najbliższym – Mężowi i Rodzinie za nieodzowne wsparcie, wyrozumiałość oraz wiarę we mnie.*

*Patrycja Zagata Leśnicka*





## Spis treści

1. Wykaz skrótów stosowanych w pracy.....	6
2. Wprowadzenie .....	8
2.1. Zjawisko i rola symbiozy w świecie organizmów żywych .....	8
2.2. Układ symbiotyczny <i>Paramecium bursaria</i> – glony .....	8
2.2.1. Charakterystyka <i>Paramecium bursaria</i> .....	10
2.2.2. Powstawanie wakuoli perialgalnej oraz mechanizm rozpoznawania endosymbiontów przez komórkę gospodarza.....	11
2.2.3. Przepływ substancji pomiędzy <i>Paramecium bursaria</i> a symbiotycznymi glonami.....	13
2.2.4. Rola światła w aktywności biologicznej <i>Paramecium bursaria</i> i endosymbiotycznych glonów .....	14
2.2.5. Poziomy transfer genów w układzie symbiotycznym <i>Paramecium bursaria</i> – glony .....	15
2.2.6. Charakterystyka zielenic .....	16
2.2.7. Systematyka endosymbiotycznych glonów <i>Paramecium bursaria</i> .....	18
2.2.8. Identyfikacja endosymbiotycznych glonów <i>Paramecium bursaria</i> .....	21
2.3. Biologia molekularna jako narzędzie do identyfikacji organizmów .....	22
2.3.1. Markery molekularne wykorzystane w pracy.....	23
2.3.2. Teoretyczne podstawy metod badawczych stosowanych w pracy .....	25
2.3.2.1. Izolacja DNA .....	25
2.3.2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy .....	25
2.3.2.3. Elektroforeza w żelu agarozowym .....	26
2.3.2.4. Sekwencjonowanie metodą Sangera.....	27
2.3.2.5. Konstruowanie drzew filogenetycznych oraz sieci haplotypów.....	27
3. Cel pracy .....	30
4. Materiał i metody.....	31
4.1. Szczepy symbiotycznych glonów <i>Paramecium bursaria</i> wykorzystane w pracy.....	31
4.2. Hodowla <i>Paramecium bursaria</i> .....	34
4.3. Wykonywanie mikrofotografii endosymbiotycznych glonów <i>Paramecium bursaria</i> .....	34
4.4. Izolacja DNA z komórek symbiotycznych glonów <i>Paramecium bursaria</i> .....	34
4.5. Warunki i przebieg reakcji łańcuchowej polimerazy .....	35
4.6. Elektroforeza w żelu agarozowym .....	38
4.7. Oczyszczanie DNA z żelu agarozowego .....	40
4.8. Sekwencjonowanie metodą Sangera.....	41

4.9. Usuwanie terminatorów po reakcji sekwencjonowania.....	41
4.10. Analiza otrzymanych sekwencji .....	41
5. Wyniki .....	43
5.1. Analiza mikrofotografii endosymbiotycznych glonów <i>Paramecium bursaria</i> .....	43
5.2. Analiza molekularna wybranych fragmentów DNA endosymbiotycznych glonów występujących u <i>Paramecium bursaria</i> .....	44
5.2.1. Analiza fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA) .....	45
5.2.1.1. Analiza chromatogramów fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA) otrzymanych przy użyciu programu Chromas Lite .....	45
5.2.1.2. Analiza obrazu sekwencji fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA) uzyskanego w programie BioEdit.....	46
5.2.1.3. Analiza kladogramów wykonanych w programie Mega 5.1 na podstawie analizy sekwencji fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA) .....	50
5.2.1.4. Analiza sieci haplotypów wykonana w programie Network 4.6.1.3 na podstawie analizy sekwencji fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA) .....	55
5.2.2. Analiza fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA.....	57
5.2.2.1. Analiza chromatogramów sekwencji fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA otrzymanych przy użyciu programu Chromas Lite .....	57
5.2.2.2. Analiza obrazu sekwencji fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA uzyskanego w programie BioEdit.....	58
5.2.2.3. Analiza kladogramów wykonanych w programie Mega 5.1 na podstawie analizy sekwencji fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA .....	62
5.2.2.4 Analiza sieci haplotypów wykonana w programie Network 4.6.1.3 na podstawie analizy fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S.....	66
5.2.3. Analiza fragmentów genów chloroplastowych: <i>rpl36</i> oraz <i>infA</i> .....	68
5.2.3.1. Analiza chromatogramów sekwencji genów chloroplastowych: <i>rpl36</i> oraz <i>infA</i> otrzymanych przy użyciu programu Chromas Lite .....	68
5.2.3.2. Analiza obrazu sekwencji genów chloroplastowych: <i>rpl36</i> oraz <i>infA</i> uzyskanego w programie BioEdit.....	69

5.2.3.3. Analiza kladogramów wykonanych w programie Mega 5.1 na podstawie analizy sekwencji fragmentów genów chloroplastowych: <i>rpl36</i> oraz <i>infA</i> .....	73
5.2.3.4. Analiza sieci haplotypów wykonana w programie Network 4.6.1.3 na podstawie analizy fragmentów genów chloroplastowych: <i>rpl36</i> oraz <i>infA</i> .....	77
5.3. Analiza związku pomiędzy pochodzeniem geograficznym szczepów <i>Paramecium bursaria</i> a gatunkami endosymbiotycznych glonów .....	79
5.4. Analiza związku pomiędzy syngeniem <i>Paramecium bursaria</i> a gatunkami endosymbiotycznych glonów .....	79
6. Dyskusja.....	84
6.1. Identyfikacja endosymbiotycznych glonów <i>Paramecium bursaria</i> .....	84
6.2. Analiza pochodzenia geograficznego szczepów <i>Paramecium bursaria</i> i gatunków endosymbiotycznych glonów .....	86
6.3. Analiza związku pomiędzy syngeniem <i>Paramecium bursaria</i> a gatunkiem endosymbionta .....	94
6.4. Użyteczność markerów molekularnych wykorzystanych w pracy .....	98
7. Podsumowanie .....	102
8. Streszczenie .....	104
9. Piśmiennictwo.....	106

## 1. Wykaz skrótów stosowanych w pracy

BLAST (ang. *basic local alignment search tool*)

ddNTP – trifosforan dideoksyrybonukleozydu

dNTP – trifosforan deoksyrybonukleozydu

DV (ang. *digestive vacuole*) – wakuola trawienna

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

Eta (ang. *total number of mutations*) – całkowita liczba mutacji

F<sub>1</sub> – pierwsze pokolenie potomne

Hd (ang. *haplotype diversity*) – różnorodność haplotypów

ITS (ang. *internal transcribed spacer*) – wewnętrzna sekwencja transkrybowana

kpz – kilo par zasad

LD – cykl oświetleniowy: 12 godzin światła i 12 godzin ciemności

LL – cykl oświetleniowy: 24 godziny światła

ML (ang. *maximum likelihood*) – metoda Największej Wiarygodności

NJ (ang. *neighbor joining*) – metoda Łączenia Sąsiadów

PBCV – *Paramecium bursaria Chlorella virus*

PCR (ang. *polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy

PV (ang. *perialgal vacuole*) – wakuola perialgalna

pz – par zasad

RFT – reaktywne formy tlenu

rpm (ang. *revolution per minute*) – obroty na minutę



S (ang. *number of polymorphic sites*) – liczba miejsc polimorficznych

Polimeraza *Taq* – enzym wyizolowany z termofilnej bakterii *Thermophilus aquaticus*

TRIS – tris (hydroksymetylo)aminometan

đ (ang. *nucleotide diversity*) – zróżnicowanie nukleotydów

## 2. Wprowadzenie

### 2.1. Zjawisko i rola symbiozy w świecie organizmów żywych

Termin „symbioza” został wprowadzony przez botanika Antona de Bary w XIX wieku, który definiował to pojęcie poprzez pozostawanie organizmów w ścisłych wzajemnych relacjach. Do symbiozy zaliczył również: mutualizm, komensalizm i pasożytnictwo. Obecnie pojęcie symbiozy definiowane jest jako długotrwała i ścisła relacja pomiędzy przynajmniej dwoma gatunkami należącymi do różnych typów, gdzie jeden z organizmów jest eukariotyczny (Margulis i Sagan 2002). Używane jest także pojęcie mutualizmu, czyli zjawiska, gdzie związek pomiędzy organizmami jest korzystny dla każdego z nich (Douglas 1994). Tradycyjnie organizm, który jest większy, nazywany jest gospodarzem, natomiast mniejszy – symbiontem. W zależności od lokalizacji symbionta, symbiozę dzielimy na ektosymbiozę, w przypadku której symbiont żyje na zewnątrz komórki gospodarza i endosymbiozę, w której symbiont znajduje się wewnątrz komórki (Reisser 1986). Symbiozy nie są wyjątkiem u eukariotów, co wynika z postulatów teorii endosymbiozy sformułowanej przez Lynn Margulis w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku. Według tej teorii mitochondria, plastydy oraz kinetosomy wici pochodzą od bakteryjnych endosymbiontów (Margulis 1981; Gray 1983; Margulis 1988). Symbioza postrzegana jest zatem jako źródło genetycznych zmian prowadzących do powstania korzystnych zmian fenotypowych organizmów (Nowack i Melkonian 2010).

Huss (1999) opisał szeroką grupę organizmów żyjących w symbiozie z glonami. Wśród nich wymienił ameby, orzęski, gąbki, jamochłony, wirki, jak również mięczaki. Wśród jamochłonów dobrze poznanym przedstawicielem żyjącym w symbiozie z glonami należącymi do rodzajów: *Chlorella* i *Desmodesmus* jest *Hydra viridis* (Douglas 1994; Rajević i in. 2015). Spośród orzęsków aż dwadzieścia pięć gatunków, takich jak *Climacostomum virens* (Reisser 1984), *Paramecium bursaria* (Reisser i Widowski 1992) czy *Vorticella* sp. (Graham i Graham 1978) żyje w symbiozie z glonami należącymi do rodzaju *Chlorella*.

### 2.2. Układ symbiotyczny *Paramecium bursaria* – glony

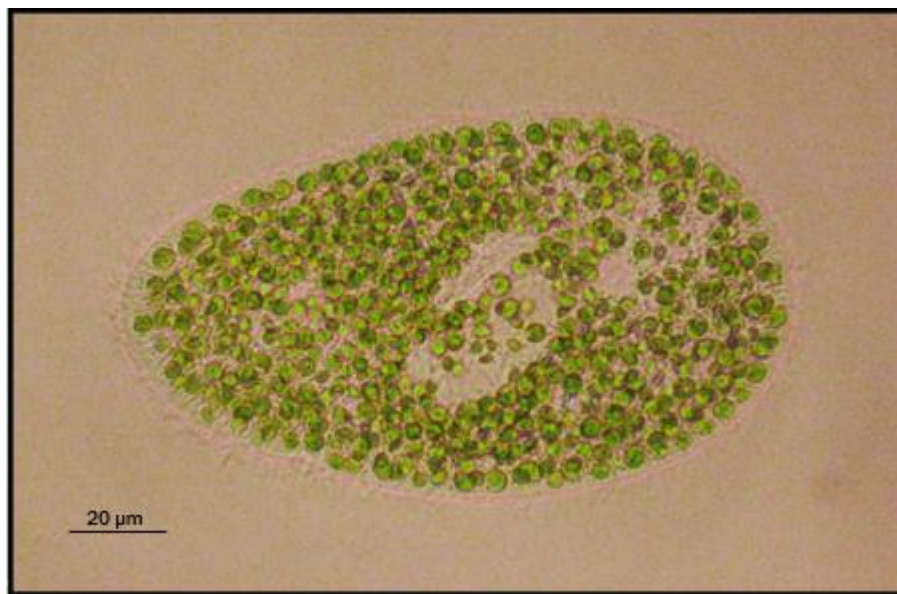
*P. bursaria* posiada w swej komórce setki endosymbiotycznych glonów (Ryc. 1). Każdy endosymbiont zamknięty jest w wakuoli perialgalnej – PV, która powstaje poprzez zróżnicowanie się wakuoli trawiennej gospodarza – DV (Karakashian

i Rudzinska 1981; Gu i in. 2002). Ta relacja określana jest mianem symbiozy mutualistycznej. Gospodarz (*P. bursaria*) korzysta z produktów fotosyntezy prowadzonej przez glony, w tym głównie z maltozy i tlenu, a glonom dostarcza związków azotowych wraz z dwutlenkiem węgla potrzebnych do przeprowadzenia tego procesu. Ponadto pierwotniak ochrania symbionty przed infekcją wirusem PBCV oraz zapewnia odpowiednie warunki do prowadzenia fotosyntezy poprzez przemieszczanie się komórki w strefę optymalnego oświetlenia (Brown i Nielsen 1974; Reisser 1980; Albers i Wiessner 1985). Podziały komórkowe obydwu partnerów są ściśle ze sobą skorelowane, w wyniku czego endosymbiotyczne glony są przekazywane komórkom potomnym gospodarza (Kadono i in. 2004).

Symbioza pomiędzy *P. bursaria* i glonami jest przykładem mutualizmu fakultatywnego, gdzie obydwa organizmy mogą występować w środowisku osobno. Aposymbiotyczny *P. bursaria* można otrzymać przez prowadzenie hodowli w warunkach ciemności (Siegel 1960; Karakashian 1963), naświetlanie promieniami Rentgena (Wichterman 1948), traktowanie cykloheksymidem (4-[2R)-2-[(1S,3S,5S)-3,5-dimetylo-2-oksycykloheksan]-2-hydroksyetylo]piperidyn-2,6-dion) (Kodama i Fujishima 2008; Kodama i Fujishima 2010) czy też traktowanie inhibitorem fotosyntezy – diuronem (DCMU, 3-(3,4-dichlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik) (Reisser 1976). Tanaka i in. (2002) wykazali, iż otrzymanie komórek *P. bursaria* zupełnie pozbawionych symbiontów jest niemożliwe poprzez inkubowanie w ciemności. Badania obejmowały amplifikację genu małej podjednostki karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO). Odnotowano zamplifikowane DNA odpowiadające sekwencji genu chloroplastowego wyizolowanego z kultury *P. bursaria* inkubowanej w ciemności, co dowiodło obecności glonów. Ponowne uzyskanie związku symbiotycznego jest możliwe poprzez zmieszanie obydwu organizmów. Przywrócenie wymiany substancji pomiędzy partnerami rozpoczyna się po trzech lub czterech dniach od zainfekowania (Kinoshita i in. 2009).

Utworzenie związku symbiotycznego modyfikuje cechy partnerów. Wykazano, iż wewnątrz komórki gospodarza glony produkują więcej tlenu niż w hodowli izolowanej poza komórką *Paramecium* (Reisser 1980). Również zielone komórki pierwotniaka dzielą się częściej oraz wykazują wyższą przeżywalność w warunkach stresowych, np. w obecności chlorku niklu, nadtlenu wodoru (Karakashian 1963), wysokiej temperatury (Iwatsuki i in. 1998) czy dużego natężenia promieni UV

(Summerer i in. 2009), w porównaniu z pierwotniakami pozbawionymi symbiontów. Iwatsuki i in. (1998) udowodnili, iż symbiotyczny *P. bursaria* przeżywa około trzech miesięcy w pożywce pozbawionej bakterii, natomiast aposymbiotyczny ginie w ciągu tygodnia. W przyrodzie znane są szczepy *P. bursaria* pozbawione symbiontów. Wykazano, iż są one zdolne do tworzenia związku symbiotycznego, który nie jest trwały, ponieważ w wyniku podziału komórki tylko jedna z komórek potomnych otrzymuje symbionty (Tonooka i Watanabe 2002). Kodama i in. (2014) porównywali DNA symbiotycznej komórki *P. bursaria* do aposymbiotycznej. Spośród 10 557 transkryptów aż 6 698 różniło obydwa organizmy, co może wiązać się z przepływem genów z komórki symbionta do komórki gospodarza. Symbiotyczny *P. bursaria* poprzez tworzenie związku symbiotycznego jest mniej wrażliwy na działanie stresu oksydacyjnego, co także może świadczyć o nabyciu obcych genów (Hörtnagl i Sommaruga 2007).



Rycina 1. Komórka *Paramecium bursaria* z komórkami symbiotycznych glonów  
(foto: autor).

### 2.2.1. Charakterystyka *Paramecium bursaria*

*P. bursaria* (Ehrenberg 1831) jest organizmem jednokomórkowym należącym do typu orzęsków, liczącego około 8000 gatunków (Corliss 1979). Komórka *P. bursaria* osiąga rozmiary 100-200 μm. Posiada charakterystyczne orzęsienie oraz złożoną powłokę zewnętrzną (pelikulę) typową dla kladu *Alveolata* (Fokin i Görtz 2009). *P. bursaria* charakteryzuje się występowaniem podwójnego aparatu jądrowego,

składającego się z jednego makrojądra pełniącego funkcje vegetatywne i jednego generatywnego mikrojądra (Vivier 1974). Jest organizmem heterotroficznym, odżywiającym się bakteriami i innymi mikroorganizmami. Cząstki pokarmowe napędzane są do lejka peristomalnego, następnie przechodzą przez cytostom i są trawione na drodze fagocytozy (Fok i Allen 1988). *P. bursaria* korzysta również z produktów fotosyntezy prowadzonej przez glony, w tym głównie z maltozy i tlenu. Wydalanie u *P. bursaria* odbywa się poprzez wodniczki tętniące otoczone przez część cytoplazmy, zwanej nefroplazmą (Kazubski 1984). *P. bursaria* oddycha całą powierzchnią ciała. Ponadto tlen dostarczany jest także jako produkt fotosyntezy prowadzonej przez symbiotyczne glony (Sommaruga i Sonntag 2009). Ruch u *P. bursaria* odbywa się dzięki obecnym rzęskom o budowie typowej dla eukariontów (Bontis i in. 1983). *P. bursaria* rozmnaża się przez poprzeczny podział komórki, podczas którego mikrojądro przechodzi mitozę, zaś makrojądro dzieli się amitotycznie. Charakterystycznym procesem płciowym jest koniugacja opisana przez Müllera pod koniec XVIII wieku, podczas której osobniki należące do uzupełniających się typów koniugacyjnych łączą się ze sobą. W czasie koniugacji mikrojądro przechodzi trzy podziały pregamiczne. Podczas trzeciego podziału mitotycznego mikrojądro dzieli się na dwa pronukleusy: wędrujący i stacjonarny. W następnym etapie dochodzi do wymiany pronukleusów wędrujących między partnerami koniugacji (Chen 1940). Istotą koniugacji jest zatem rekombinacja materiału genetycznego, a przez to zwiększenie żywotności populacji. Gatunek *P. bursaria* został podzielony na syngeny, które zdefiniowano jako nieróżniące się morfologicznie grupy uzupełniających się typów koniugacyjnych (Sonneborn i Dippell 1946). Są one rozrodczo izolowane poprzez odmienną specyfikę procesu koniugacji i odmienną wymaganych warunków do uzyskania dojrzałości. *P. bursaria* wykazuje „*outbreeding*” w odniesieniu do typu kojarzenia, co przejawia się krzyżowaniem klonów o dalekim pokrewieństwie, dzięki czemu możliwa jest rekombinacja materiału genetycznego. W obrębie *P. bursaria* Bomford (1966) wyróżnił sześć syngenów (B), natomiast w obecnej kolekcji występuje pięć syngenów (R) (Greczek-Stachura i in. 2012).

### 2.2.2. Powstawanie wakuoli perialgalnej oraz mechanizm rozpoznawania endosymbiontów przez komórkę gospodarza

U *P. bursaria* utworzenie trwałej symbiozy z glonami wiąże się z powstaniem wakuol perialgalnych (Gu i in. 2002). Proces infekcji odbywa się na drodze fagocytozy.

Kodama i Fujishima (2005) wykazali, że przed utworzeniem związku symbiotycznego występują cztery cytologiczne fazy. Podczas pierwszej fazy niektóre glony wykazują oporność na działanie enzymów lizosomalnych i pozostają niestrawione; kolejnym etapem jest oddzielenie się glonów od wakuol trawiennych poprzez uwypuklenie ich błon do wnętrza cytoplazmy. Podczas kolejnego etapu komórki symbionta zostają otoczone przez błonę wakuoli perialgalnej przekształconej z błony wakuoli trawiennej, po czym lokalizują się pod ektoplazmą komórki gospodarza, co stanowi ostatni etap cytologiczny. Zanim jednak dojdzie do utworzenia wakuoli perialgalnej, wakuola trawienna przechodzi stadia sklasyfikowane ze względu na różnice morfologiczne (stan błony komórkowej oraz kolor komórek symbiotycznych) (Kodama i Fujishima 2011). Podziały komórkowe glonów rozpoczynają się po 24 godzinach od zmieszania komórek (Kodama i Fujishima 2005).

Wakuola perialgalna zawsze zawiera jedną komórkę symbionta. Szerokość przestrzeni pomiędzy ścianą komórkową symbionta a błoną wakuoli perialgalnej mieści się w granicach 0.05  $\mu\text{m}$ . Kolejną cechą jest stała średnica wakuoli mieszcząca się w zakresie 2.5-4.5  $\mu\text{m}$  oraz jej lokalizacja pod ektoplazmą komórki gospodarza, co uniemożliwia połączeniu się wakuoli z lizosomami (Kodama i in. 2007).

Wpływ na rozpoznawanie symbionta przez komórkę *P. bursaria* mogą mieć komponenty ściany komórkowej glonu. Takeda i in. (1998) wykazali, iż wszystkie gatunki endosymbiotycznych glonów charakteryzują się występowaniem glukozaminy jako składnika ściany komórkowej, podczas gdy glony niesymbiotyczne posiadają kompleks glukozowo-mannozowy. Fujishima i Kodama (2012) zaobserwowali, że budowa ściany komórkowej glonów nie jest czynnikiem decydującym o sukcesie symbiozy, ale możliwość lokalizacji pod ektoplazmą. Kodama i Fujishima (2009) wykazali, iż na tworzenie związku symbiotycznego pomiędzy pierwotniakiem a glonem ma wpływ określony gatunek glonu oraz jego szczep. Kodama i Fujishima (2008) badali wpływ cykloheksymidu hamującego syntezę białek na aktywność fotosyntetyczną symbiontów *P. bursaria*. Cykloheksymid wywołuje pęcznienie wakuol perialgalnych, co powoduje zwiększanie się przestrzeni pomiędzy ścianą komórkową glonu a błoną wakuoli, odłączenie wakuol od ektoplazmy, przejście w głąb cytoplazmy oraz trawienie glonów. Podobnego zjawiska nie obserwuje się w ciemności oraz w świetle przy dodatkowym wpływie inhibitora fotosyntezy – diuronu. Blanc i in. (2010) odnotowali wzrost liczby genów kodujących białka transportujące aminokwasy

u symbiotycznego gatunku *Chlorella* sp. (NC64A), co wskazuje na ekspresję tych białek podczas symbiozy z *P. bursaria*. Proces fotosyntezy u symbiotycznych glonów *P. bursaria* wiąże się także z narażeniem komórki gospodarza na działanie reaktywnych form tlenu (RFT) (Asada 1999). Kawano i in. (2004) poddali analizie tolerancję trzech gatunków *Paramecium* (*P. bursaria*, *P. caudatum*, *P. trichium*) na RFT i zaobserwowali, że najmniej wrażliwym gatunkiem jest *P. bursaria*. Ponadto wykazano, iż po zastosowaniu herbicydu – parakwatu (dichlorek 1,1'-dimetylo-4,4'-bipirydyniowy), który stymuluje produkcję RFT, komórka gospodarza redukuje liczbę symbiontów (Babbs i in. 1989; Kawano i in. 2010). Lokalizacja wakuol perialgalnych pod ektoplazmą komórki gospodarza jest bardzo ważnym czynnikiem sprzyjającym tworzeniu się związku symbiotycznego, ponieważ miejsce to nie wykazuje aktywności kwaśnej fosfatazy, a tym samym wskazuje na brak lizosomów (Kodama i Fujishima 2009). Udowodniono, że gatunki glonów opisywane przez Takeda i in. (1998) jako niezdolne do tworzenia symbiozy, są w stanie uniknąć strawienia przez enzymy lizosomalne gospodarza, jednak nie mogą umiejscowić się pod ektoplazmą. Pod ektoplazmą komórki *P. bursaria* znajdują się trichocysty wystrzeliwane w przypadku zagrożenia (Harumoto i Miyake 1991). Kodama i Fujishima (2011) poprzez poddanie komórek *P. bursaria* działaniu lizozymu stymulującego wystrzeliwanie trichocyst wykazali, iż nie biorą one udziału w lokalizowaniu wakuol perialgalnych.

### 2.2.3. Przepływ substancji pomiędzy *Paramecium bursaria* a symbiotycznymi glonami

*P. bursaria* jest zdolny do rozwoju w środowisku tlenowym, w którym jest dostęp do związków nieorganicznych, jednocześnie pozbawionym aminokwasów i węglowodanów. Wskazuje to jednoznacznie na to, iż niezbędne związki pozyskuje od swojego symbiotycznego partnera (Loefer 1936). Wydzielanymi produktami fotosyntezy jest głównie dwucukier – maltoza, natomiast związkami eksportowanymi przez komórkę gospodarza są węgiel i azot (Albers i in. 1982). Glony wolnożyjące wydzielają do środowiska niewielkie ilości organicznych związków wytworzonych podczas fotosyntezy, natomiast symbiotyczne glony wydzielają aż do 87 % produktów fotosyntezy (Watt i in. 1966; Muscatine i in. 1967). Reisser (1988) porównywał wydzielanie węglowodanów w różnym pH przez symbiotyczne glony i glony wolnożyjące. Wykazano, iż pH ma istotny wpływ na wydzielanie cukrów u symbiotycznych glonów – w środowisku kwasowym wydzielanie jest znacznie wyższe, natomiast u glonów wolnożyjących nie obserwuje się wpływu pH.

Cechą charakterystyczną symbiotycznych glonów jest wykorzystywanie azotu. Wykazano, iż rozwijają się one bardzo dobrze na podłożu zawierającym kwasy kazaminowe, trochę wolniej na podłożu wzbogaconym w amon i jeszcze wolniej na podłożu wzbogaconym w pepton Bacto. Nie zaobserwowano natomiast wzrostu kultury na podłożach zawierających azotany i azotyny (Kamako i in. 2005). Zaobserwowano, że symbiotyczne glony szczepu NC64A rozwijają się na podłożu zawierającym azotany jako jedyne źródło azotu (Reisser 1988; Reisser i Widowski 1992). Według Albers i in. (1982), symbiotyczne glony mogą posiadać mutację w genie NR kodującym reduktazę azotanową i jest to swego rodzaju przystosowanie do życia w symbiozie. Organizmy te wykorzystują również poszczególne aminokwasy jako źródło azotu: argininę, asparaginę, glutaminę, serynę, alaninę i glicynę, natomiast glony wolnożyjące tylko argininę (Kato i in. 2006). U glonów wolnożyjących glukoza i jej analogi mają znaczny wpływ na transport aminokwasów (Cho i in. 1981). Glukoza jest pierwszym metabolitem rozkładu maltozy będącej główną substancją produkowaną przez symbiotyczne glony (Kato i Imamura 2008). Wykazano, iż pobieranie aminokwasów przez symbionty jest zwiększone w obecności glukozy oraz zależne od pH (Kato i Imamura 2009). Węgiel jest jednym z głównych substratów procesu fotosyntezy. Wiązanie dwutlenku węgla przez symbiotyczne glony jest zależne od pH. W środowisku zasadowym wiązanie zwiększa się, natomiast u glonów wolnożyjących obserwuje się odwrotną tendencję (Kamako i Imamura 2006). Wytwarzanie maltozy jest także procesem zależnym od pH i jest wyższe przy kwaśnym odczynie środowiska (McAuley i in. 1996). Kationy wapniowe i magnezowe przyspieszają transport aminokwasów (Smith 1978; Rickauer i Tanner 1986; Lew 1989). Wykazano, że u glonów wolnożyjących kationy wapniowe i magnezowe są odpowiedzialne za zwiększone pobieranie aminokwasów, natomiast u glonów symbiotycznych obserwuje się spadek pobierania seryny przy działaniu kationu wapniowego. Ponadto zbadano wpływ kationów jednowartościowych i udowodniono, że nie mają one wpływu na pobieranie aminokwasów (Kato i Imamura 2009).

#### 2.2.4. Rola światła w aktywności biologicznej *Paramecium bursaria* i endosymbiotycznych glonów

Niemal wszystkie organizmy żywe wykazują rytm biologiczny i jest to podstawowe przystosowanie do zmian światła i temperatury występujących na Ziemi (Kondo i in.1993). Zarówno *P. bursaria*, jak i symbiotyczne glony wykazują rytmy



biologiczne działające w tej samej komórce gospodarza, stąd ciekawym zagadnieniem jest kontrola tych dwóch organizmów. Koniugacja u *P. bursaria* rozpoczyna się w momencie zbliżenia dwóch komórek należących do uzupełniających się typów koniugacyjnych pod warunkiem, że znajdują się w fazie stacjonarnej, są dojrzałe płciowo i znajdują się w warunkach oświetlenia w cyklu LD. Po przeniesieniu hodowli do warunków ciągłego oświetlenia (LL) aktywność płciowa staje się nierytmiczna i powraca do normy po umieszczeniu hodowli w ciemności przynajmniej przez okres dziewięciu godzin (Hiwatashi 1981; Miwa i in. 1989).

Podział komórek symbiotycznych glonów jest zjawiskiem kontrolowanym przez komórkę gospodarza. Kadono i in. (2004) zaobserwowali, że zaraz przed podziałem komórki *P. bursaria* następuje dokładne podwojenie liczby komórek glonów.

Komórki *P. bursaria* wykazują fototaksję dodatnią w oświetlonym obszarze (Saji i Oosawa 1974). Inne gatunki *Paramecium* nie wykazują fotoakumulacji, co potwierdza rolę komórek symbiotycznych w tym mechanizmie (Miwa 2009).

#### 2.2.5. Poziomy transfer genów w układzie symbiotycznym *Paramecium bursaria* – glony

Woese (2002) określił transfer genów jako siłę napędową w powstawaniu wyspecjalizowanych organizmów. Nabywane geny są odpowiedzialne za zdolność fotosyntezy, wiązanie azotu, chorobotwórczość bakterii czy antybiotykooporność (Dagan i in. 2008). Transfer ten jest korzystny dla organizmu nabywającego geny, jeśli geny spełniają ważną rolę. Może także być postrzegany niekorzystnie, jeśli geny nie niosą za sobą żadnej funkcji, są niekompatybilne z istniejącym zestawem genów lub są samoreplikującymi się elementami ruchomymi (Thomas i Nielsen 2005). U wielu organizmów fotosyntetyzujących ilość genów pochodzących z plastydów w jądrze komórkowym waha się od 10 do 25 % (Reyes-Prieto i in. 2006). Obecność genów pochodzących od glonów została potwierdzona u przedstawicieli grupy *Chromalveolata*, takich jak *Cryptosporidium* (Abrahamensen i in. 2004), *Oomycota* (łęgnowce) (Tyler i in. 2006) i *Ciliata* (orzęski) (Reyes-Prieto i in. 2008). U wiciowców kołnierzykowatych: *Monosiga brevicollis* stwierdzono obecność ponad stu genów pochodzących od glonów (Sun i Huang 2011). Reyes-Prieto i in. (2008) wykryli u *Tetrahymena termophila* i *Paramecium tetraurelia* obecność szesnastu białek pochodzących od glonów. Vorobyev i in. (2009) wykazali u symbiotycznego szczepu

*Chlorella* sp. występowanie fragmentu 18S rRNA pochodzącego od wirusa PBCV. Według Hoshina i Imamura (2009a), symbiotyczne glony nie rozwijają się samodzielnie w środowisku naturalnym, co wskazuje na to, że relacja między tymi dwoma organizmami znajduje się w fazie przejściowej pomiędzy stałą symbiozą a etapem poziomego transferu genów. Kiedy symbioza staje się zjawiskiem stałym, geny pochodzące od endosymbionta są stopniowo przekazywane do jądra gospodarza albo tracone, gdyż produkty ich translacji nie są potrzebne (van Dooren i in. 2001). Zmniejszająca się autonomia endosymbiotycznych glonów może być wynikiem redukcji materiału genetycznego potrzebnego do samodzielnego wzrostu (Hoshina i Imamura 2009a).

#### 2.2.6. Charakterystyka zielenic

Takson *Viridiplantae* tworzy jedną z największych grup fotosyntetyzujących organizmów eukariotycznych obejmujących zielenice oraz rośliny lądowe. W obrębie taksonu wyróżniono dwa główne kłady: *Chlorophyta* obejmujący większość zielonych glonów i *Streptophyta* z kilkoma taksonami glonów i roślinami telomowymi (Lewis i McCourt 2004; Peterson i in. 2006; Pröschold i Leliaert 2007; Leliaert i in. 2012). W skład *Chlorophyta* wchodzi prasinofity oraz organizmy stanowiące rdzeń *Chlorophyta*, w obrębie którego wyróżniono cztery klasy: *Chlorodendrophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyceae* oraz *Ulvophyceae* (Turmel i in. 2007; Marin i Melkonian 2010). Zielenice są grupą bardzo zróżnicowaną, występującą zarówno w środowisku wodnym, jak i lądowym (Leliaert i in. 2012). Powstanie roślin lądowych, począwszy od przodka należącego do glonów było przełomowym momentem w historii żywych organizmów i doprowadziło do znaczących zmian w środowisku, których efektem był rozwój całego ekosystemu lądowego (Kenrick i Crane 1997). Zielenice zawdzięczają swój początek symbiozie, w której komórki cyjanobakterii zostały przechwycone przez eukariotycznego heterotroficznego gospodarza, w wyniku czego powstały plastydy (Keeling 2010). Ta pierwotna endosymbioza datowana jest na okres sprzed półtora miliarda lat (Hedges i in. 2004).

Zielenice posiadają wiele wspólnych cech, takich jak podwójna błona otaczająca chloroplast, tylakoidy zgrupowane w lamelle, występowanie charakterystycznych barwników: chlorofilu *a* i *b* oraz dodatkowych barwników – karotenoidów i ksantofili. Pirenoidy osadzone są w chloroplaście i otoczone są odkładającym się materiałem

zapasowym (najczęściej skrobią). Budowa ściany komórkowej jest typowa dla komórek roślinnych, a budowa wici typowa dla komórek eukariotycznych (Melkonian 1984). Pomimo wielu łączących cech, zielenice stanowią bardzo różnorodną grupę organizmów. Pod względem morfologicznym można wyróżnić najmniejszy wolnożyjący organizm eukariotyczny, jakim jest *Ostreococcus tauri*, a także olbrzymie organizmy, jak np. *Caulerpa* (3 m). Zielenice preferują środowisko słodkowodne. Tylko dwie grupy znane są z występowania w morzach (np. *Ulvophyceae*). Niektóre z nich także zaadaptowały się do skrajnie ekstremalnych warunków, takich jak gorące pustynie (Schmidt i in. 2011). Znanych jest wiele przykładów glonów tworzących związki symbiotyczne z grzybami, otwornicami, orzęskami, a nawet mięczakami (Kovacević i in. 2010). Wśród zielenic znany jest także gatunek pasożyta z rodzaju *Iprothoteca*, wywołującego u ludzi prototekozę charakteryzującą się występowaniem zakażeń skóry, tkanki podskórnej oraz tkanek leżących głębiej (Sudman 1974).

Zielenice posłużyły wielokrotnie jako organizmy modelowe w badaniach ekologicznych. Melvin Calvin wykorzystał hodowlę *Chlorella* do opisu i wyjaśnienia cyklu Calvina (Calvin i Benson 1948). Organizmy te mają również znaczenie ekonomiczne. *Dunaliella salina* jest wykorzystywana do produkcji biopaliw przez wzgląd na wytwarzanie  $\beta$ -karotenu (Tafresh i Shariati 2009).

Systematyka zielenic jest przedmiotem badań od ponad stu lat i nadal jest kwestią sporną. Tradycyjnie klasyfikowano je na podstawie różnic w morfologii i według takiego podziału jednokomórkowe wiciowce były najbardziej prymitywną grupą, która ewoluowała początkowo tworząc kokoidalne i sarkoidalne chlorofity a następnie nitkowate i plechowate kolonie (Blackman 1900). W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych ubiegłego wieku metoda została zmodyfikowana i w oparciu o badania nad cyklami życiowymi i strukturą komórek opatrzonych organellami ruchu wyróżniono siedem klas: *Prasinophyceae*, *Chlamydoephyceae*, *Chlorophyceae*, *Codiolophyceae*, *Oedogoniophyceae*, *Bryopsidophyceae* oraz *Zygnematophyceae* (Christensen 1962; Kornmann 1973; Ettl i Komárek 1982). Kolejna metoda klasyfikowania glonów oparta była na ultrastrukturze ciała bazalnego komórek opatrzonych wiciami oraz na przebiegu cytokinezy w trakcie mitozy komórki. Według tej metody, pierwsza radiacja zielenic miała miejsce na poziomie wiciowców, co doprowadziło do ich różnorodności. Część z nich dała początek nieruchliwym formom kokoidalnym, sarkoidalnym, nitkowatym oraz plechowatym. Wyróżniono

wówczas klasę *Micromonadophyceae* charakteryzującą się występowaniem najbardziej prymitywnych cech (polisacharydowa osłonka ciała występująca również na wiciach), klasy: *Pleurastrorhynchophyceae* oraz *Ulvophyceae* charakteryzujące się orientacją ciała bazalnego CCW (ang. *counterclockwise*) oraz klasę *Chlorophyceae* z orientacją DO (ang. *directly opposite*) lub CW (ang. *clockwise*) (Melkonian 1982). W roku 1988 van den Hoek i in. wprowadzili dodatkowe cechy diagnostyczne: budowę komórki wegetatywnej, przebieg mitozy i podziału komórki oraz skład ściany komórkowej. Na podstawie przebiegu podziału komórki grupę podzielono na dwie sekcje: *Streptophyta* (zawierającą *Zygnematophyceae*, *Charophyceae* oraz rośliny telomowe) charakteryzującą się powstawaniem fragmoplastu podczas podziału oraz sekcję – *Chlorophyta* charakteryzującą się tworzeniem fykoplastu (Picket-Heaps 1975). Obecna systematyka została utworzona na podstawie analizy molekularnej z wykorzystaniem markerów: jądrowego rybosomalnego operonu, genów chloroplastowych (np. *rbcL*) i mitochondrialnych (np. *nad5*). Według ostatniego podziału, w skład zielenic wchodzi prasinofity oraz cztery klasy stanowiące rdzeń *Chlorophyta*: *Chlorodendrophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyceae* oraz *Ulvophyceae* (Turmel i in. 2007; Marin i Melkonian 2010).

#### 2.2.7. Systematyka endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*

Symbiotyczne glony występujące w komórkach *P. bursaria* należą do dwóch klas: *Trebouxiophyceae* i *Chlorophyceae*. *Trebouxiophyceae* określono pierwotnie na podstawie cech ultrastrukturalnych, takich jak orientacja ciała bazalnego – CCW, nietrwale wrzeciono podziałowe oraz tworzenie fykoplastu podczas cytokinezy (Mattox i Stewart 1984). Klasa obejmuje ruchliwe i nieruchliwe organizmy jednokomórkowe, a także wielokomórkowe formy kolonijne. Glony należące do tej klasy żyją głównie w wodach słodkich, choć znane są także przykłady z wód morskich czy środowiska lądowego. Kilka gatunków tworzy związki symbiotyczne z grzybami (tworząc porosty) (Friedl i Bhattacharya 2002), pierwotniakami (Hoshina i Imamura 2008; Summerer i in. 2008), bezkręgowcami (Lewis i Muller-Parker 2004; Letsch i in. 2009) czy roślinami (Tremouillaux-Guiller i in. 2002). Druga klasa – *Chlorophyceae* jest bardzo różnorodna pod względem morfologicznym, od organizmów jednokomórkowych do form plechowatych. Podczas podziału komórki tworzy się fykoplast, natomiast orientacja ciała bazalnego przybiera wszystkie formy (van den Hoek 1995).

Systematyka endosymbiotycznych glonów jest przedmiotem badań od ponad wieku, jednak pomimo tego nadal pozostaje zagadnieniem wzbudzającym kontrowersje. Występowanie tak zwanych „ciałek zawierających chlorofil” u pierwotniaków i bezkręgowców słodkowodnych opisywane było już ponad sto lat temu. Brandt (1882) po raz pierwszy wykazał, że struktury te posiadają jądro komórkowe i na tej podstawie sklasyfikował je jako organizmy niezależne. Utworzył nowy rodzaj *Zoochlorella* i wyróżnił w nim dwa gatunki, nazwane odpowiednio *Zoochlorella conductrix* występujący u *P. bursaria*, *Stentor polymorphus*, *Hydra viridis* i *Zoochlorella parasitica* wykryty u *Spongilla lacustris*. Beijerinck (1890) uznał, iż gatunki opisane przez Brandt'a są bardzo podobne do glonów wolnożyjących i utworzył rodzaj *Chlorella* z dwoma gatunkami: *Chlorella conductrix* i *Chlorella parasitica*. Podczas Szesnastego Międzynarodowego Kongresu w St. Louis w 1999 r. nazwa *Chlorella* została uznana jako ta poprawna i w takiej postaci funkcjonuje w Międzynarodowym Kodeksie Nomenklatury Botanicznej. Endosymbiotyczne glony zazwyczaj określane są mianem *Zoochlorellae* lub są nazywane gatunkami należącymi do *Chlorella*, czy też gatunkami podobnymi do *Chlorella*. Organizmy te klasyfikowano głównie na podstawie cech morfologicznych, co dawało mylące efekty, zwłaszcza podczas porównywania blisko spokrewnionych taksonów. Fawley i in. (2005) wykazali, iż opis glonów w obrębie rodziny *Selenastraceae* utworzony w oparciu o cechy morfologiczne odzwierciedla jedynie adaptacje fenotypowe do warunków środowiska, takich jak temperatura. Podobną sytuację obserwuje się w przypadku rodzaju *Chlorella*, gdzie opisano ponad sto gatunków. Fott i Nováková (1969) oraz Andreyeva (1975) opisali odpowiednio dziewięć i jedenaście gatunków w obrębie rodzaju *Chlorella* na podstawie cech morfologicznych i reprodukcji. Analizy filogenetyczne odcinka SSU rDNA wykazały, iż uprzednio opisane gatunki należące do rodzaju *Chlorella* należą do przynajmniej siedmiu linii rozwojowych w obrębie *Trebouxiophyceae* i *Chloropyceae* (Krientez i in. 2004).

Wirusy należące do *Phycodnaviridae*, które infekują endosymbiotyczne glony zgrupowane są w sześć rodzajów w zależności od organizmu gospodarza, który infekują: *Chlorovirus* (infekuje glony z rodzaju *Chlorella*), *Coccolithovirus* (infekuje glony należące do gatunku *Emiliana huxleyi*), *Prasinovirus* (infekuje glony z rodzaju *Ostreococcus*), *Prymnesiovirus* (infekuje glony z rodzaju *Chrysochromulina*), *Phaeovirus* (infekuje glony w obrębie rzędu *Ectocarpales*) i *Raphidovirus* (infekuje

glony w obrębie klasy *Raphidophyceae*) (Wilson i in. 2005). Wirusy należące do rodzaju *Chlorovirus* reprezentują trzy gatunki: wirusy Pbi infekujące symbiotyczne glony *P. bursaria* pochodzące z Europy i Australii, wirusy NC64A infekujące symbiotyczne glony *P. bursaria* pochodzące z obu Ameryk i Chin oraz wirusy infekujące symbiotyczne glony *Hydra viridis* (Reisser i in. 1988a; Wilson i in. 2005). Wirusy te są stosunkowo duże o średnicy nawet do 160 nm i symetrii ikozahedralnej (van Etten i in. 1991). Występują na zewnątrz komórki *P. bursaria*, w większości przyłączone do pelikuli (Yaschenko i in. 2012). Wirusy Pbi i NC64A są bardzo specyficzne. Wirusy Pbi infekują symbiotyczne glony szczepów *P. bursaria* pochodzących z Europy i Australii, natomiast nie infekują glonów pochodzących z obydwu Ameryk i Chin. Wirusy NC64A infekują symbiotyczne glony szczepów *P. bursaria* pochodzących z Ameryk i Chin, natomiast nie infekują glonów europejskich i australijskich (Kang i in. 2005). Na tej podstawie endosymbiotyczne glony *P. bursaria* podzielono na dwie grupy: Amerykańską (Południową) i Europejską (Północną).

Gapanova i in. (2007) potwierdzili występowanie różnic między symbiontami należącymi do grup: Amerykańskiej i Europejskiej na poziomie molekularnym. Glony należące do grupy Amerykańskiej posiadają o jeden intron więcej niż glony należące do grupy Europejskiej w środkowej części genu 18S rRNA (ponad 500 pz w pozycji pomiędzy 1315 a 1766). W badaniach Hoshina i in. (2005) wykazano, iż między glonami należącymi do dwóch grup różnice w sekwencjach wynoszą 0.39 % (18S rDNA) i 19.2 % (ITS2). Hoshina i Imamura (2008) odnotowali większe różnice wynoszące odpowiednio 0.50-0.83 % i 22.6-26.6 %. Hoshina i in. (2010) potwierdzili genetyczną odrębność tych grup i przypisali je do dwóch gatunków: grupę Amerykańską do gatunku *Chlorella variabilis* i grupę Europejską do *Micractinium reisseri*. Pröschold i in. (2011) przypisali do grupy Amerykańskiej gatunki: *C. variabilis* i *C. vulgaris*, natomiast do grupy Europejskiej gatunki: *M. reisseri* i *C. vulgaris*. Ponadto wykazano, iż symbiotyczne glony różnią się od wolnożyjących posiadaniem intronów na początku genu 18S rRNA (ponad 300 pz) w pozycji pomiędzy 106 a 1296) (Gapanova i in. 2007).

### 2.2.8. Identyfikacja endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*

Symbiotyczne glony występujące w komórkach *P. bursaria* należą do dwóch klas: *Trebouxiophyceae* i *Chlorophyceae*. W obrębie *Trebouxiophyceae* symbiotyczne glony zgrupowane są w dwa kłady: *Chlorella* oraz *Choricystis/Botryococcus* (Friedl i Rybalka 2012). Kład *Chlorella* obejmuje symbiotyczne glony należące do rodzajów: *Chlorella* (Hoshina i in. 2010) i *Micractinium* (Pröschold i in. 2011). Huss (1999) w obrębie rodzaju *Chlorella* wymienił cztery gatunki: *C. vulgaris*, *C. lobophora*, *C. sorokiniana* i *C. kessleri*. Krienitz i in. (2004) rozdzielił te gatunki na dwa kłady: *Chlorella* z gatunkami *C. vulgaris*, *C. lobophora*, *C. sorokiniana* i kład *Parachlorella* z *C. kessleri*. Rodzaj *Chlorella* to komórki o małych rozmiarach (2-10  $\mu\text{m}$ ), kulistym kształcie, występujące najczęściej jako pojedyncze osobniki. Charakteryzują się posiadaniem pojedynczego jądra komórkowego, mitochondrium, kilku peroksysomów, wakuoli oraz kubkowatego chloroplastu z elipsoidalnym pirenoidem otoczonym ziarnami skrobi. Cechą charakterystyczną jest przechodzenie błon tylakoidów przez matriks pirenoиду. Ściana komórkowa nie jest pokryta żadnymi strukturami typu kolce czy szczeciny. Rozmnażanie bezpłciowe odbywa się poprzez autospory (Andreyeva 1975; Kessler i Huss 1992; Hoshina i in. 2010; Ullmann 2006). Rodzaj *Micractinium* to organizmy podobne do *Chlorella* (Hoshina i in. 2010) i obejmuje komórki o kulistym kształcie oraz rozmiarach od 3 do 8  $\mu\text{m}$ . Chloroplast jest zazwyczaj kubkowaty, z elipsoidalnym pirenoidem pokrytym ziarnami skrobi i lamellami tylakoidów wewnątrz matriksu pirenoиду. Rodzaj ten charakteryzuje się występowaniem rozmnażania bezpłciowego jak u przedstawicieli rodzaju *Chlorella* (Hoshina i in. 2010). Różnice pomiędzy przedstawicielami tych dwóch rodzajów ograniczają się do występowania szczecin na powierzchni ściany komórkowej *Micractinium*, a także występowaniem komórek *Micractinium* w postaci kolonii (Schnepf i in. 1980). Ciekawym zjawiskiem jest pozbywanie się szczecin przez *Micractinium* oraz brak tworzenia kolonii w sytuacji, gdy osobniki żyją w gęstej hodowli (Krienitz i in. 2004). Luo i in. (2006) wykazali, że tworzenie szczecin oraz życie w kolonii u *Micractinium* determinowane jest obecnością drapieżnika *Brachionus calyciflorus*. Drugi kład w obrębie *Trebouxiophyceae* – *Choricystis/Botryococcus* obejmuje symbiotyczne glony należące do rodzajów *Choricystis* (Fott 1976; Nakahara i in. 2004) i *Coccomyxa* (Pröschold i in. 2011). Rodzaj *Choricystis* obejmuje komórki o kształcie elipsoidalnym, wielkości od 1.5 do 3  $\mu\text{m}$ , zawierające przyścienny chloroplast nieotoczony pirenoidem

(Fott 1976). Rodzaj *Coccomyxa* obejmuje osobniki podobne morfologicznie do komórek w obrębie rodzaju *Choricystis*. Jediną różnicą jest wielkość, jaką osiągają komórki *Coccomyxa* (6-11  $\mu\text{m}$ ) (Pröschold i in. 2011). W obrębie drugiej klasy – *Chlorophyceae* symbiotyczne glony *P. bursaria* należą do rzędu *Sphaeropleales* i rodzaju *Scenedesmus* (Pröschold i in. 2011). Przedstawiciele tego rodzaju tworzą zazwyczaj kolonie składające się od czterech do ośmiu komórek o wielkości od 5 do 12  $\mu\text{m}$  ułożonych w rzędzie (Hegewald i Schnepf 1997).

Takeda (1991; 1993) badał strukturę ściany komórkowej symbiotycznych glonów *Chlorella* spp. i wykazał, że głównym składnikiem jest glukozamina lub glukoza, oraz mannoza. Wykazano również obecność sporopoleniny (Jolley i Smith 1980; Yamamoto i in. 2005). Reisser i Widowski (1992) wykazali, iż *C. sorokiniana* jest organizmem ciepłolubnym, co odróżnia go od *C. vulgaris*. Symbiotyczne glony *Chlorella* spp. charakteryzują się występowaniem aktywności hydrogenazy, brakiem formowania karotenoidów wtórnych, jak również brakiem wzrostu na podłożu zawierającym mannitol. Ponadto, wymagają obecności witamin B<sub>1</sub> i B<sub>12</sub>, rozwijają się w środowisku o pH nieprzekraczającym 5.5 i preferują temperatury w zakresie od 26 do 30 °C. Cechą charakterystyczną jest także wysoka zawartość zasad GC w DNA (Kessler i Huss 1990; Reisser i Widowski 1992). Udowodniono, iż zarówno *C. variabilis* jak i *M. conductrix* wymagają organicznych związków azotowych i są wrażliwe na infekcję wirusem *Chlorovirus* (Yamada i in. 2006; Kamako i in. (2005). Pröschold i in. (2011) wykazali, że *C. variabilis* do rozwoju potrzebuje amonu bądź organicznych związków azotowych, natomiast nie rozwija się na podłożach azotanowych. *M. conductrix* z kolei preferuje obecność azotanów w podłożu. Nazwa gatunkowa *M. reisseri* stanowi synonim nazwy gatunkowej *M. conductrix* (Pröschold i in. (2011).

### 2.3. Biologia molekularna jako narzędzie do identyfikacji organizmów

Rozwój biologii molekularnej nastąpił po zbadaniu struktury DNA przez Watson'a i Crick'a w 1953 roku. Odkrycie transkrypcji, translacji oraz replikacji pozwoliło na naśladowanie tych procesów *in vitro*, a to z kolei zapoczątkowało rozwój metod molekularnych. W latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku rozpoczęła się także rewolucja w biologii ewolucyjnej wywołana właśnie przez rozwój genetyki i biologii molekularnej, które dostarczyły narzędzi do badań mutacji, zmienności genetycznej,



czy też filogenetycznej historii życia. Początkowo zwolennicy metod molekularnych twierdzili, że lepiej odzwierciedlają powiązania filogenetyczne, niż dane morfologiczne, ponieważ wykorzystują zmiany na poziomie genów, a to wiąże się z mniejszą podatnością na konwergencję czy paralelizm. Zaletą metod molekularnych jest także ilość danych molekularnych. Wszystkie cechy dziedziczne organizmu są kodowane przez DNA, stąd łatwo jest wywnioskować, że cechy morfologiczne są tylko małym podzbiorem danych molekularnych. Analizy molekularne są przydatne szczególnie wtedy, gdy rozrodczo izolowane gatunki są trudne do rozróżnienia na podstawie cech morfologicznych (Duellman i Hillis 1987; Echelle i Mosier 1981). Analiza genów rybosomalnych (rDNA) pozwoliła wyjaśnić pochodzenie głównych linii ewolucyjnych (Pace i in. 1986).

Stosowanie metod molekularnych w połączeniu z danymi morfologicznymi jest powszechne w analizach filogenetycznych (Soltis i in. 2005; Savolainen i in. 2005). Używanie starterów uniwersalnych do amplifikacji genomu chloroplastowego stało się kluczowym narzędziem w badaniach ewolucyjnych roślin (Dumoli-Lapegue i in. 1997). Odpowiednia analiza molekularna powinna spełniać następujące wymagania: (i) występowanie markerów w pojedynczej kopii (charakterystyczne dla genów jądrowych i mitochondrialnych), (ii) długość analizowanego fragmentu powinna być jednakowa u badanych organizmów (Kjer 1995), (iii) stosunek substytucji w badanym odcinku powinien dostarczyć wystarczającej ilości miejsc informatywnych, (iv) startery nie powinny być zbyt uniwersalne, gdyż mogą amplifikować produkty niespecyficzne (Yli-Mattila i in. 2000), (v) wyniki analiz filogenetycznych powinny być oparte na więcej niż jednej parze starterów, gdyż jedna para przedstawia ewolucję tylko określonego odcinka DNA, a różne fragmenty DNA danego organizmu mogą prezentować odmienne tempo ewolucji, a tym samym przedstawiać odmienne powiązania ewolucyjne (Pupko i in. 2002; Rokas i Carroll 2005; Patwardhan i in. 2014). Według del Campo i in. (2010), należy dobierać kombinację co najmniej dwóch markerów pochodzących z różnych genomów.

### 2.3.1. Markery molekularne wykorzystane w pracy

W niniejszej pracy analizowano trzy markery DNA: fragment dużej podjednostki rybosomalnej (28S LSU rDNA), fragment wewnętrznych sekwencji transkrybowanych: ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S pomiędzy nimi oraz fragmenty

genów chloroplastowych: *rpl36* kodującego białko L36 oraz *infA* kodującego czynnik inicjacji translacji IF-1.

RNA rybosomalny uważany jest za jeden z najlepszych markerów molekularnych ze względu na jednoczesne występowanie odcinków konserwatywnych, a także tych charakteryzujących się dużą zmiennością. Duża podjednostka rybosomalna zawiera geny: 28S, 5.8S oraz 5S, wchodzące w skład jednostki transkrypcyjnej, zwanej rybosomalnym operonem (Dover 1988). Sekwencje wygenerowane bezpośrednio z jądrowych genów kodujących rybosomalne DNA (rDNA) są dużo mniej podatne na błędy niż sekwencje uzyskane z bezpośredniego sekwencjonowania rRNA (Zimmer 1989).

U glonów długość ITS1 mieści się w zakresie od 100 do 400 pz, natomiast długość ITS2 od 200 do 500 pz (Maruyama i in. 2004). Popularność regionów ITS w badaniach filogenetycznych związana jest z częstymi substytucjami, co pozwala porównywać stosunkowo niedawno rozdzielone taksony. Wyniki uzyskiwane poprzez amplifikację ITS są zazwyczaj bardzo wiarygodne ze względu na wysoką jednorodność kopii w obrębie jednego genomu (Kovarik i in. 2005). Hu i in. (2009) wykazali, iż wyniki uzyskiwane poprzez sekwencjonowanie ITS charakteryzują się dużą jednoznacznością. Analiza sekwencji ITS często wykorzystywana była w badaniach systematycznych roślin (Kress i in. 2005) oraz glonów (Lindstrom 2008). Na podstawie sekwencji ITS określono zmienność genetyczną fotobiontów występujących w porostach (Kroken i Taylor 2000).

Genom plastydowy charakteryzuje się mniejszymi rozmiarami niż genom mitochondrialny i liczy do 200 kpz. Charakteryzuje się także wolniejszym tempem ewolucji, co wpływa na jego wysoką konserwatywność. Substytucje występują trzy razy rzadziej niż w przypadku genomu jądrowego (Zurawski i Clegg 1987; Jansen i Ruhlman 2012). Genom plastydowy można podzielić na trzy funkcjonalne jednostki: geny kodujące białka, introny i odcinki międzygenowe (Wakasugi i in. 1998). Każdy chloroplast zawiera liczne kopie genomu, co oznacza, że komórka roślinna pod względem genomu plastydowego jest wysoce poliploidalna (Bendich 1987). Genom chloroplastowy u glonów jest mniejszy niż u roślin telomowych i liczy około 140 kpz i 110 genów (Odintsova i Yurina 2006). Analiza genomu chloroplastowego w obrębie *Charophyta* potwierdziła bliskie pokrewieństwo pomiędzy *Zygnematophyceae* i roślinami lądowymi (Civán i in. 2014). W pracy wykorzystano fragmenty genu *rpl36*

kodującego białko rybosomalne L36 oraz fragment genu *infA* kodującego czynnik inicjacji translacji IF-1 (Bock 2007).

### 2.3.2. Teoretyczne podstawy metod badawczych stosowanych w pracy

Metody biologii molekularnej należą do jednych z najbardziej dynamicznie rozwijających się działów biologii. Pierwsze eksperymenty z zakresu biologii molekularnej zostały wykonane ponad trzydzieści lat temu, wtedy odbywało się to tylko w najbardziej wyspecjalizowanych laboratoriach. Obecnie można już wskazać kierunki badań rutynowych. Postępy w badaniach molekularnych skierowane są ku skróceniu czasu analizy, zwiększeniu wydajności, czułości i dokładności oraz zmniejszeniu kosztów związanych z badaniami (Słomski 2011).

#### 2.3.2.1. Izolacja DNA

Badania z wykorzystaniem DNA powinny być prowadzone z dużą dokładnością. Ważnymi etapami jest prawidłowe pobranie materiału biologicznego, izolacja DNA oraz jego przechowywanie. Izolacja DNA powinna być wykonywana niezwłocznie po pobraniu materiału biologicznego. Pobrany materiał może być przechowywany w temp. 4 °C przez kilka dni, jednak zalecane jest w przypadku odstąpienia od izolacji przechowywanie w temp. -20 °C bądź -80 °C. Wydajność izolacji oraz jakość analizowanego DNA obniżają się przy dłuższym przechowywaniu. Umieszczenie DNA w buforze lizującym zapobiega degradacji i pozwala na dłuższe przechowywanie (Słomski 2011).

Izolacja DNA prowadzi do uzyskania z maksymalną wydajnością DNA wysokocząsteczkowego pozbawionego innych zanieczyszczeń, jak białka czy inhibitory enzymów. Wiązanie DNA odbywa się na membranie wykonanej z żelu krzemionkowego, co pozwala na selektywne wiązanie kwasów nukleinowych w obecności wysokich stężeń soli chaotropowych. Kolejno dodawane bufony mają za zadanie usunięcie zanieczyszczeń odpowiednio przy przemywaniu, jak i wypłukiwaniu DNA z membrany (Słomski i in. 2011a).

#### 2.3.2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) jest podstawową techniką stosowaną w biologii molekularnej, pozwalającą na powielenie wybranego fragmentu DNA. Reakcja ta została opracowana przez Mullis'a w 1987 r. Może być stosowana

do powielenia fragmentu DNA, pojedynczego genu lub nawet części genu (Rahman i in. 2013). Podstawowym założeniem reakcji jest zwielokrotnienie konkretnego odcinka DNA z wykorzystaniem krótkich jednoniciowych fragmentów DNA (starterów) jako matrycy, w obecności enzymu polimerazy oraz wolnych nukleotydów (Brown 2009). Mieszaninę reakcyjną stanowią:

- izolat DNA bądź cDNA zawierający region DNA amplifikowany,
- termostabilny enzym polimeraza *Taq* amplifikujący DNA,
- dwa startery determinujące początek i koniec amplifikowanego fragmentu DNA,
- mieszanina nukleotydów stanowiących substrat reakcji,
- bufor reakcyjny zawierający  $MgCl_2$  i zapewniający stabilny przebieg reakcji (Rahman i in. 2013).

Specyficzność produktów zapewniają komplementarne startery o długości mieszczącej się w zakresie od 16 do 30 nukleotydów. Odcinki oligonukleotydowe powinny charakteryzować się zawartością nukleotydów: guaniny i cytozyny w granicach 50-60 %, co wiąże się bezpośrednio z temperaturą topnienia starterów ( $T_m$ ). Pary starterów powinny wykazywać podobną  $T_m$  mieszczącą się w zakresie 55-72 °C (Słomski i in. 2011b).

Typowa reakcja PCR obejmuje powtarzające się cyklicznie denaturacje (podgrzanie mieszaniny do 94 °C, co powoduje rozerwanie się wiązań wodorowych, które utrzymują strukturę podwójnej nici, efektem czego jest powstanie dwóch cząsteczek DNA — jednoniciowych), przyłączania starterów (temperatura zostaje obniżona do 50-60 °C, co umożliwia ponowne złączenie się nici oraz przyłączenie starterów w odpowiednich miejscach) oraz syntezy z zastosowaniem termostabilnej polimerazy *Taq* (temperatura wzrasta do 72 °C, co stanowi optimum do działania polimerazy *Taq*, rozpoczyna się synteza DNA) (Słomski i in. 2011b).

#### 2.3.2.3. Elektroforeza w żelu agarozowym

Elektroforeza polega na ruchu jonów i naładowanych cząsteczek w polu elektrycznym. Dzięki obecności grup fosforanowych, kwasy nukleinowe naładowane są ujemnie, w związku z czym migrują w stronę dodatniej elektrody. Rozdziały elektroforetyczne prowadzone są bezpośrednio w objętości elektrolitu lub też stosowane są nośniki elektroforetyczne, takie jak: bibuła, agarozą czy poliakryloamid. Nośniki agarozowe charakteryzują się większymi porami (100-300 nm średnicy), co pozwala na rozdzielanie większych fragmentów kwasów nukleinowych, sięgających nawet

30000 pz. Elektroforezę kwasów nukleinowych prowadzi się zwykle w 1 % żelu agarozowym, który otrzymuje się ze sproszkowanej agarozy. Do określania wielkości amplifikowanych fragmentów stosuje się wzorce molekularne o znanej wielkości mas cząsteczkowych, natomiast wyniki rozdziału elektroforetycznego obrazuje się z wykorzystaniem fluorescencji bromku etydyny pod wpływem promieniowania UV (Słomski i in. 2011c).

#### 2.3.2.4. Sekwencjonowanie metodą Sangera

Sekwencjonowanie DNA to technika pozwalająca na odczytanie kolejności ułożenia nukleotydów w analizowanym fragmencie DNA. Odczyt reakcji sekwencjonowania sporządzany jest z wykorzystaniem automatycznych sekwenatorów poprzez detekcję światła emitowanego przez znakowaną zasadę i odczytanie zakresu jej fluorescencji. Sygnały zbierane są przez fotokomórkę i przetwarzane do postaci kolorowych linii, które stanowią wizualny wynik sekwencjonowania (Węgleński 2000). Jedną z najczęściej stosowanych metod jest metoda terminacji łańcucha, zwana metodą Sangera. Matrycą w tym przypadku jest jednoniciowa cząsteczka DNA otrzymana wcześniej w reakcji PCR bądź poprzez klonowanie. Matryca po reakcji PCR jest oczyszczana z komponentów mieszaniny reakcyjnej, a także z żelu agarozowego, jeśli po PCR przeprowadzano elektroforezę (Lipiński i in. 2008). Istotą metody terminacji łańcucha jest zastosowanie polimerazy DNA oraz ddNTP, pozbawionych grupy hydroksylowej w pozycji 3' rybozy, co uniemożliwia przyłączenie się kolejnego nukleotydu do syntetyzowanego łańcucha DNA. Reakcja rozpoczyna się od jednego startera, a kończy się na wbudowaniu ddNTP, które dodawane są w stężeniach umożliwiających powstawanie pełnego zestawu fragmentów DNA o różnej długości (Słomski i in. 2011d).

#### 2.3.2.5. Konstruowanie drzew filogenetycznych oraz sieci haplotypów

Filogenetyka molekularna stanowi kombinację technik molekularnych i statystycznych, mających na celu wnioskowanie relacji ewolucyjnych pomiędzy danymi organizmami bądź genami i prezentację ich w postaci drzew ewolucyjnych czy też kladogramów. Filogenetyka molekularna wywodzi się z tradycyjnych sposobów klasyfikacji organizmów. Linneusz w XVIII wieku podzielił organizmy w hierarchicznie ułożone kategorie na podstawie podobieństwa cech morfologicznych i w ten sposób stworzył podstawy do później stosowanych schematów ewolucyjnych.

W 1957 r. wprowadzono pojęcie fenetyki, która klasyfikowała organizmy w oparciu o jak największą ilość cech, analizowanych następnie metodami matematycznymi. Kladystyka, w odróżnieniu od fenetyki, porównywanym cechom przypisywała niejednakową wagę (Brown 2009).

Drzewo filogenetyczne to struktura składająca się z gałęzi, zwanych również krawędziami, które zaczynają się i kończą węzłami. Węzły zewnętrzne znajdujące się na końcach gałęzi reprezentują taksony istniejące współcześnie. Natomiast węzły wewnętrzne odpowiadają ostatniemu wspólnemu przodkowi. Wszystkie taksony wywodzące się od jednego węzła wewnętrznego (sekwencje potomne) tworzą grupę, zwaną kladem. Drzewa mogą być utworzone na podstawie analizy jednego genu u wszystkich badanych taksonów lub mogą opierać się na rodzinach wielogenowych (Baldauf 2003; Huson i Bryant 2006; Hall 2008). Strukturę taką uważa się za ukorzenioną, jeżeli istnieje konkretny węzeł lub grupa zewnętrzna, z której wychodzą pozostałe taksony. Grupę zewnętrzną możemy zdefiniować jako jedną lub kilka sekwencji, które są dalej spokrewnione z pozostałymi sekwencjami. Gałęzie drzewa mogą być ułożone względem siebie w różny sposób. Grupa monofiletyczna tworzona jest przez wewnętrzny węzeł wspólnego przodka i wszystkie taksony wychodzące z niego. Wszyscy członkowie grupy pochodzą od wspólnego przodka i posiadają zestaw unikalnych odziedziczonych cech wspólnych. Grupa parafyletyczna jest grupą monofiletyczną, z której wyłączono niektórych potomków umieszczonych w innych taksonach (np. ssaki z wyłączeniem torbaczy). Grupa polifyletyczna grupuje daleko spokrewnione taksony o podobnym fenotypie, lecz nie pochodzące bezpośrednio od wspólnego przodka (Li 1997; Baldauf 2003; Futuyma 2004; Hall 2008). W pracy zastosowano dwie metody konstruowania drzew filogenetycznych, metodę Łączenia Sąsiadów (ang. *neighbor joining*, NJ) oraz Największej Wiarygodności (ang. *maximum likelihood*, ML). Metoda NJ (Saitou i Nei 1987) jest łatwa i powszechnie stosowana, szczególnie przy konstruowaniu rozbudowanych drzew filogenetycznych. Porównywane sekwencje przekształcane są do postaci macierzy różnic między parami sekwencji (Hall 2008). Z kolei metoda ML (Felsenstein 1981) jest bardziej skomplikowana i przewyższa metodę NJ pod względem wiarygodności (Ota i Li 2000).

Metoda NJ tworzy ściśle dychotomiczne drzewo, w którym z każdego węzła wychodzą dokładnie dwie gałęzie. Odległości wyrażone są w ułamkach miejsc, którymi różnią się między sobą dane dwie sekwencje. Na początku algorytm oblicza oddalenie

każdego z taksonów od pozostałych. Następnie, w oparciu o te odległości, oblicza macierz. Wybierana jest para taksonów, którą dzieli najmniejsza odległość, po czym obliczana jest odległość każdego z nich od wspólnego węzła. Następnie tworzy się nową macierz, w której węzeł zastępuje te dwa taksony (Hall 2008).

Metoda ML to metoda o wielu możliwościach, która konstruuje drzewo o danych najbardziej prawdopodobnych. Zdefiniowane kryterium, jakim jest tutaj logarytm wiarygodności drzewa, wykorzystywane jest w celu porównania i dopasowania różnych modeli wymiany nukleotydów do określonych danych. Jeszcze niedawno metoda ta nie należała do często wykorzystywanych ze względu na jej czasochłonność. Problem ten został jednak rozwiązany poprzez unowocześnienie oprogramowania, dzięki czemu metoda ta jest chętnie wykorzystywana i przewyższa pozostałe ze względu na wiarygodność uzyskiwanych wyników (Hall 2008).

Przy konstruowaniu drzew filogenetycznych należy mieć świadomość, że nie zawsze są one zgodne z faktycznym przebiegiem ewolucji. Dla drzewa złożonego ze stu sekwencji można znaleźć około  $3 \times 10^{74}$  różnych topologii, do których właśnie odnosi się rzetelność drzewa. Rzetelność mierzona jest jako prawdopodobieństwo tego, że wszyscy członkowie danego kladu zawsze będą do niego należeć. W filogenetyce stosowana jest metoda, zwana samopróbkowaniem (ang. *bootstrap*), symulująca powtarzanie zbierania danych w celu oszacowania wiarygodności drzewa. Zazwyczaj stosuje się od 100 do 2000 powtórzeń samopróbkowania. W efekcie powstaje drzewo, gdzie każdy kład opatrzony jest liczbą znajdującą się przy węźle wyrażoną w procentach, informującą o częstości występowania wszystkich sekwencji w powtórzeniach samopróbkowania (Hall 2008).

Sieci haplotypów są to nieukorzone sieci filogenetyczne obrazujące relacje pomiędzy analizowanymi taksonami. Węzły reprezentujące różne haplotypy w obrębie grupy zazwyczaj blisko spokrewnionych taksonów połączone są odcinkami, na których zaznaczono zmiany nukleotydowe różnicujące połączone węzły. W pracy posłużono się metodą *median joining algorithm* do obliczenia sieci haplotypów (Bandelt i in. 1999).

### 3. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy była identyfikacja gatunków endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* na podstawie analizy molekularnej wybranych fragmentów DNA. W pracy postawiono następujące hipotezy badawcze:

1. Określony syngen *Paramecium bursaria* tworzy związek symbiotyczny z konkretnym gatunkiem glonu.
2. Gatunek symbiotycznego glonu jest związany z pochodzeniem geograficznym szczepu *Paramecium bursaria*, z którego został wyizolowany.
3. Zastosowanie trzech markerów molekularnych niezależnych genomów pozwala na uzyskanie najbardziej wiarygodnych wyników.

W ramach pracy doktorskiej zrealizowano kolejne etapy badań:

1. Izolacja DNA z komórek symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*.
2. Amplifikacja fragmentu genomu jądrowego kodującego dużą podjednostkę rybosomalną (28S LSU rDNA).
3. Amplifikacja fragmentu genomu jądrowego obejmującego wewnętrzne sekwencje transkrybowane: ITS-1 i ITS-2 (ang. *internal transcribed spacer*) wraz z 5.8S między nimi.
4. Amplifikacja fragmentów: genomu chloroplastowego kodującego białko L36 dużej podjednostki rybosomalnej (*rpl36*) oraz genu chloroplastowego kodującego czynnik inicjacji translacji IF-1 (*infA*).
5. Sekwencjonowanie zamplifikowanych fragmentów DNA.
6. Analiza otrzymanych sekwencji w programach: ChromasLite i BioEdit.
7. Konstrukcja drzew filogenetycznych w programie Mega5.2 przy użyciu metod: Łączenia Sąsiadów i Największej Wiarygodności.
8. Zbadanie polimorfizmu genetycznego pomiędzy szczepami symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*.
9. Ustalenie, czy istnieje związek pomiędzy gatunkiem endosymbionta a określonym syngeniem *Paramecium bursaria*.
10. Ustalenie, czy istnieje związek pomiędzy gatunkiem symbiotycznego glonu a pochodzeniem geograficznym szczepu *Paramecium bursaria*, z którego wyizolowano endosymbionty.



#### 4. Materiał i metody

##### 4.1. Szczepy symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* wykorzystane w pracy

Endosymbiotyczne glony zostały wyizolowane z czterdziestu trzech szczepów *Paramecium bursaria*, pochodzących z odległych stanowisk geograficznych i należących do pięciu syngenów (Tab. 1). Szczepy znajdują się w kolekcji CCCS (Culture Collection of Ciliates and their Symbionts) w Uniwersytecie w Petersburgu. Ponadto do analizy filogenetycznej wykorzystano sekwencje szczepów glonów pozyskane z Banku Genów ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Tab. 2).

Tabela 1. Zestawienie szczepów *Paramecium bursaria* wraz z oznaczonym syngeniem (R) (Greczek-Stachura i in. 2012) i pochodzeniem geograficznym (geoschemat ONZ), z których wyizolowano endosymbiotyczne glony.

Nr	Nazwa szczepu <i>Paramecium bursaria</i>	Syngen <i>Paramecium bursaria</i>	Pochodzenie geograficzne szczepu <i>Paramecium bursaria</i>
<b>Stany Zjednoczone Ameryki Północnej</b>			
1.	Ard7	R4	Ardmore, USA
2.	Ard10-3	R4	Ardmore, USA
3.	AB2-51	R4	Boston, USA
<b>Europa</b>			
4.	GB15-2	R2	Jezioro Loch Linnhe, Szkocja
5.	GB7-2	R2	Jezioro Loch Linnhe, Szkocja
6.	Wien4a-12	R1	Wiedeń, Austria
7.	GT-2	R2	Tübingen, Niemcy
8.	KZ-126	R2	Kaliningrad, Rosja
9.	BS-7	R5	Ogród Botaniczny w Petersburgu, Rosja
10.	MS-1	R1	Petersburg, Rosja
11.	PMP1-3-1	R1	Petersburg, Rosja
12.	TR54-4	R2	Twer, Rosja
13.	RN88-4	R2	Twer, Rosja
14.	TR54-1	R1	Twer, Rosja
15.	Bya129-5	R2	Jarosław, Rosja
16.	VM-14	R2	Walaam, Rosja
17.	B4-1	R1	Wołgograd, Rosja
18.	AZ21-3	R2	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja
19.	AZ20-1	R5	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja
20.	AZ10-1	R5	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja
21.	AZ7-14	R2	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja
22.	AZ8-2	R2	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja
23.	AZ20-4	R2	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja
24.	TOS1-7	R2	Togliatti, Rosja
25.	IP	R3	Piza, Włochy
26.	SRB9-1	R2	Rzeka Dunaj, Serbia
<b>Azja Środkowa</b>			
27.	SHT-56	R1	Tadżykistan
28.	RA2-1	R2	Przedgórze Gór Altaj, Rosja
<b>Azja Północna</b>			
29.	BBR180-10	R2	Jezioro Bajkał, Rosja
30.	BBR178-9	R2	Jezioro Bajkał, Rosja
31.	BBR51-1	R2	Jezioro Bajkał, Rosja
32.	BL15-3	R2	Jezioro Bajkał, Rosja
33.	HKV19-12	R3	Chabarowsk, Rosja
34.	HZ85-1	R3	Rezerwat Przyrody Khanka, Rosja
35.	KD64	R2	Kamczatka, Rosja
36.	11 231-2	R2	Kamczatka, Rosja
37.	11 35-2	R2	Kamczatka, Rosja
38.	11 42-2	R2	Kamczatka, Rosja
39.	4 231-1	R2	Kamczatka, Rosja
<b>Azja Wschodnia</b>			
40.	Cs2	R3	Szanghaj, Chiny
41.	MitR	R3	Japonia
42.	JR-16	R3	Japonia
43.	Yad1-g	R3	Yamaguchi, Japonia

Tabela 2. Zestawienie szczepów glonów wykorzystanych w analizie filogenetycznej pozyskanych z Banku Genów.

Nr	Gatunek glonu	Nazwa szczepu glonu	Nr akcesyjny GenBank			Piśmiennictwo
			LSU rDNA	ITS1-5.8S-ITS2	3' <i>rpl36</i> -5' <i>infA</i>	
1.	<i>Micractinium inermum</i>	NLP-F014	KF597304.1	bd	bd	Dane nieopublikowane
2.	<i>Chlorella sorokiniana</i>	UTEX 1665	KJ676113.1	bd	bd	Rosenberg i in. (2014)
3.	<i>Micractinium</i> sp.	KNUA029	KM243321.1	bd	bd	Hong i in. (2015)
4.	<i>Micractinium reisseri</i> ( <i>conductrix</i> )	SW1-ZK, (SW1)	AB437256.1	AB437244.1	bd	Hoshina i Imamura (2009b)
5.	<i>Micractinium</i> sp.	MCWWW15	bd	KP204593.1	bd	Park i in. (2015)
6.	<i>Micractinium</i> sp.	MCWWW4	bd	KP204582.1	bd	Park i in. (2015)
7.	<i>Micractinium</i> sp.	MCWWW5	bd	KP204583.1	bd	Park i in. (2015)
8.	<i>Micractinium</i> sp.	MCWWW10	bd	KP204588.1	bd	Park i in. (2015)
9.	<i>Micractinium</i> sp.	MCWWW11	bd	KP204589.1	bd	Park i in. (2015)
10.	<i>Micractinium</i> sp.	KNUA032	bd	KM243324.1	bd	Hong i in. (2015)
11.	<i>Micractinium reisseri</i> ( <i>conductrix</i> )	EdL_C11_MAF	bd	KF887345.1	bd	Dane nieopublikowane
12.	<i>Micractinium pusillum</i>	SAG 13.81	bd	FM205866.1	bd	Luo i in. (2010)
13.	<i>Chlorella</i> sp.	CB4	bd	JQ710683.1	bd	Dane nieopublikowane
14.	<i>Chlorella</i> sp.	IFRPD	bd	AB260898.1	bd	Hoshina i Imamura (2008)
15.	<i>Chlorella sorokiniana</i>	KLL-G018	bd	KP726221.1	bd	Kaplan-Levy i in. (2016)
16.	<i>Chlorella sorokiniana</i>	KU219	bd	KM061463.1	bd	Dane nieopublikowane
17.	<i>Chlorella variabilis</i>	CCAP 211/84	bd	FN298923.1	bd	Pröschold i in. (2011)
18.	<i>Chlorella variabilis</i>	SAG 211-6	bd	FM205849.1	bd	Luo i in. (2010)
19.	<i>Chlorella variabilis</i>	EdL_C12_3NB	bd	KF887350.1	bd	Dane nieopublikowane
20.	<i>Chlorella vulgaris</i>	DRL3	bd	JX139000.1	bd	Dane nieopublikowane
21.	<i>Coccomyxa chodatii</i>	SAG: 216-2	HG972989.1	bd	bd	Darienko i in. (2015)
22.	<i>Stigeoclonium tenue</i>	CCAP 477/11A	HF920680.1	bd	bd	Caisova i in. (2013)
23.	<i>Stigeoclonium variabile</i>	CCAP 477/13	HF920679.1	bd	bd	Caisova i in. (2013)
24.	<i>Parachlorella kessleri</i>	SAG: 211-11g	bd	bd	X65099.1	Ustinova i in. (2001)
25.	<i>Actinastrum hantzschii</i>	SAG 2015	bd	FM205841.1	bd	Luo i in. (2010)

#### 4.2. Hodowla *Paramecium bursaria*

Badania w ramach pracy doktorskiej wykonano w Instytucie Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego, we współpracy z Instytutem Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Hodowlę *Paramecium bursaria* prowadzono w szklanych zlewkach (100 ml) na pożywce sałatowej według Sonneborn'a (1970), zaszczipionej bakteriami *Klebsiella pneumoniae* (SMC). Hodowlę prowadzono w cyklu dobowym 12D/12L w temperaturze 18 °C (Ryc. 2, Ryc. 3). Identyfikację syngenów *P. bursaria* przeprowadzono wykonując reakcję krzyżowania badanych szczepów ze szczepami standardowymi reprezentującymi wszystkie typy koniugacyjne każdego z syngenów. Analizowany szczep przypisywany był do określonego syngenu, po zaobserwowaniu wyraźnego przylegania do siebie komórek uzupełniających się typów koniugacyjnych na początku procesu koniugacji, jego właściwego przebiegu oraz żywotności pokolenia F<sub>1</sub>.



Rycina 2. Kolonia bakterii szczepu *Klebsiella pneumoniae* (SMC) hodowana na szalce Petriego z agarem wzbogaconym (BTL) (foto: autor).

#### 4.3. Wykonywanie mikrofotografii endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*

Komórki endosymbiotycznych glonów obserwowano wykorzystując mikroskopię świetlną (mikroskop Nikon Eclipse Ni-U wyposażony w system DIC i kamerę cyfrową Digital Slight DS Fi1c) przy powiększeniu 1000 x. Zdjęcia analizowano wykorzystując oprogramowanie NIS-Elements (BR 4,11).

#### 4.4. Izolacja DNA z komórek symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*

Izolację DNA wykonywano z zastosowaniem zestawu GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific) według protokołu (Tab. 3).

Tabela 3. Przebieg procesu izolacji DNA.

Etap izolacji DNA	Objętość kultury/odczynnika	Czas i temperatura inkubacji	Czas i prędkość (rpm – obroty na minutę) wirowania
Przygotowanie próbki	1 ml zawiesiny komórek	—	10 min, 7000 rpm
	Zwirowane komórki pierwotniaków zamrażano w ciekłym azocie	—	—
Liza ściany komórkowej, wytrącanie DNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>250 µl buforu A, traktowanie ultradźwiękami</li> <li>50 µl buforu B</li> <li>20 µl RNazy</li> </ul>	15 min, 65 °C	—
	130 µl buforu strącającego	5 min na lodzie	5 min, 13500 rpm
Wiązanie DNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>400 µl roztworu wiążącego</li> <li>400 µl etanolu</li> </ul>	—	1 min, 8000 rpm (2x)
Przemywanie membrany krzemionkowej oraz osuszanie membrany krzemionkowej	500 µl buforu płuczącego (2x)	—	1 min, 10000 rpm
			3 min, 13500 rpm
Elucja oczyszczonego DNA	100 µl buforu elucyjnego (2x)	5 min, temperatura pokojowa (2x)	1 min, 10000 rpm (2x)

#### 4.5. Warunki i przebieg reakcji łańcuchowej polimerazy

Do reakcji PCR wykorzystano zestaw *Taq* DNA Polymerase (EURx). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły (podane objętości przeliczone na jedną próbkę DNA matrycowego – 38 µl):

- 28 µl wody,
- 4 µl buforu A,
- 4 µl buforu zawierającego jony MgCl<sub>2</sub>,
- 0.8 µl dNTP,
- 0.8 µl każdego z dwóch starterów (Tab. 4, Tab. 5),
- 0.4 µl polimerazy *Taq*.

Amplifikacje DNA były przeprowadzane w termocyklerze według profiliów termiczno-czasowych przedstawionych w tabeli (Tab. 6). Startery zostały zaprojektowane według poniżej przedstawionego schematu:

- porównanie kilku sekwencji (fragmentu DNA, który planowano zamplifikować) glonów pozyskanych z Banku Genów w programie BioEdit oraz wyszukanie krótkich fragmentów konserwatywnych (podobnych we wszystkich porównywanych sekwencjach),

- odwrócenie wybranych fragmentów sekwencji przy pomocy narzędzia Reverse Complement ([http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)),
- ustalenie temperatur topnienia (Tm) dla starterów Forward (sekwencja 5'-3') i Reverse (sekwencja 3'-5') (temperatury obydwu starterów powinny być zbliżone) w programie Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/prime-r-blast/>) oraz zamówienie starterów w firmie Genomed.

Tabela 4. Zestawienie sekwencji starterów testowanych w ramach pracy doktorskiej.

Kod	Sekwencja (5'-3')	Piśmiennictwo
INT-4F	TGGTGAAGTGTTCCGGATTGG	Hoshina i in. (2005)
HLR0F	GGCAAGACTACCCGCTGAA	Hoshina i Imamura (2008)
HLR3R	TCCCAAACAACCCGACTCT	Hoshina i in. (2005)
HLR4R	TTTCAAGACGGGCCGATT	Hoshina i Imamura (2008)
HLR4F	AAACCCATGAAGCGCAAG	Hoshina i Imamura (2008)
HLR5F	GACTTGGGTATAGGGGCGAA	Hoshina i Imamura (2008)
LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	Hopple i Vilgalys (1999)
HLR7F	GTTGGCCCTGGGAAGAGTT	Hoshina i Imamura (2008)
LR8	CACCTTGAGACCTGCT	Hopple i Vilgalys (1999)
LR12K	TTCTGACTTAGAGGCGTTCA	Hoshina i Imamura (2008)
UCP1F	CAAGCWCCDGCAGAAGACC	Provan i in. (2004)
UCP1R	CCMAAACATAAAACAAMSWCAGG	Provan i in. (2004)
UCP2F	CCTTGWCKTTGTTTATGTTTKGG	Provan i in. (2004)
UCP2R	GTCATGTYTCHGGBAAAATWCG	Provan i in. (2004)
UCP3F	CGWATTTTTVCCDGAGATATGGGC	Provan i in. (2004)
UCP3R	ATGTATGCKTTTTTAGATCGT	Provan i in. (2004)
UCP4F	ACGATCTAAAAAMGCATACAT	Provan i in. (2004)
UCP4R	AATTGTWTCDDTDCACCDGAAGT	Provan i in. (2004)
UCP5F	ACTTCHGGTGCHAGHGAWATAATT	Provan i in. (2004)
UCP5R	GAAACHCGDATGGGDTCKGG	Provan i in. (2004)
UCP6F	CCMGAHCCCATHCGDGTTC	Provan i in. (2004)
UCP6R	GGBMGHTTWAATGGHGCHGAWAT	Provan i in. (2004)
UCP7F	ATWTCDCGCCATTWAGDCKVCC	Provan i in. (2004)
UCP7R	ATGGTWGGWCAWAAATDGGTGAGTTT	Provan i in. (2004)
UCP8F	AAATTCGCCCHAGTTTWTGWCCWATCAT	Provan i in. (2004)
UCP8R	GCHCAAHTDGTDCNAAAGAGGG	Provan i in. (2004)
rbcLa-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	Levin i in. (2003)
rbcLa-R	GTAATCAAGTCCACCRCG	Kress i in. (2009)
SR-1	TACCTGGTTGATCCTGCCAG	Nakayama i in. (1996)
SR-4	AGCCGCGGTAATTCCAGCT	Nakayama i in. (1996)
SR-5	ACTACGAGCTTTTAACTGC	Nakayama i in. (1996)
SR-9	AACTAAGAACGGCCATGCAC	Nakayama i in. (1996)
ITS1F	CCACTTTGGTAACCACTCGTCCCC	Starter zaprojektowany w ramach pracy doktorskiej
ITS2F	AATCTATCGAATCCACTTTGGTAACCACTCGT	Starter zaprojektowany w ramach pracy doktorskiej
ITS1R	GATGGATGGTTCGGTAATGGGACG	Starter zaprojektowany w ramach pracy doktorskiej
ITS2R	TAATGGGACGCTTGCCCCAGGTACG	Starter zaprojektowany w ramach pracy doktorskiej
ITS3R	CTACCTACCAAGCCATTACC	Starter zaprojektowany w ramach pracy doktorskiej
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White i in. (1990)
EA3	TCGACAATCTGGTTGATCCTGCCAG	Marin i in. (2003)
ITS055R	CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG	Marin i in. (2003)

Tabela 5. Zestawienie par starterów testowanych w ramach pracy doktorskiej oraz wynik amplifikacji. “+” oznacza pozytywny wynik amplifikacji oraz sekwencjonowania (kolor zielony), natomiast “-” oznacza negatywny wynik amplifikowania bądź sekwencjonowania (sekwencja niespecyficzna lub nieczytelna).

Testowana para starterów	Amplifikowany odcinek DNA	Wynik reakcji
HLR0F i HLR3R	LSU rDNA	-
HLR0F i HLR4R	LSU rDNA	+
INTF i HLR3R	LSU rDNA	-
HLR0F i LR5	LSU rDNA	-
HLR5F i LR8	LSU rDNA	-
HLR7F i LR12K	LSU rDNA	-
HLR4F i LR8	LSU rDNA	-
UCP1F i UCP1R	<i>rps11-rpl2</i> genomu chloroplastowego	-
UCP2F i UCP2R	<i>rps11-rpl2</i> genomu chloroplastowego	+
UCP3F i UCP3R	<i>rps11-rpl2</i> genomu chloroplastowego	-
UCP4F i UCP4R	<i>rps11-rpl2</i> genomu chloroplastowego	-
UCP5F i UCP5R	<i>rps11-rpl2</i> genomu chloroplastowego	-
UCP6F i UCP6R	<i>rps11-rpl2</i> genomu chloroplastowego	-
UCP7F i UCP7R	<i>rps11-rpl2</i> genomu chloroplastowego	-
UCP8F i UCP8R	<i>rps11-rpl2</i> genomu chloroplastowego	-
rbcLa-F i rbcLa-R	gen dużej podjednostki karboksylazy/oksygenazy rybulozo 1 5-bisfosforanu	-
SR-1 i SR-9	SSU rDNA	-
SR-1 i SR-5	SSU rDNA	-
SR-4 i SR-9	SSU rDNA	-
ITS1F i ITS1R	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	-
ITS1F i ITS2R	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	+
ITS1F i ITS3R	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	-
ITS2F i ITS1R	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	-
ITS2F i ITS2R	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	-
ITS2F i ITS3R	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	-
ITS1 i ITS2R	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	+
EAF3 i ITS055R	SSU rDNA- ITS1-5.8S rDNA-ITS2	-
EAF3 i ITS2R	SSU rDNA- ITS1-5.8S rDNA-ITS2	-

Tabela 6. Profile termiczno-czasowe reakcji PCR przeprowadzanych w ramach pracy doktorskiej.

Amplifikacja fragmentu LSU rDNA			
Etap reakcji PCR	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	94 °C	5 min	1
Denaturacja	94 °C	30 s	30
Przyłączanie starterów	55 °C	30 s	
Elongacja	72 °C	1 min	
Końcowa elongacja	72 °C	5 min	1
-	12 °C	∞	1
Amplifikacja fragmentu ITS1-5.8S rDNA-ITS2			
Etap reakcji PCR	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95 °C	5 min	1
Denaturacja	95 °C	1 min	30
Przyłączanie starterów	54 °C	2 min	
Elongacja	72 °C	3 min	
Końcowa elongacja	72 °C	5 min	1
-	12 °C	∞	1
Amplifikacja fragmentów genów chloroplastowych: <i>rpl36</i> i <i>infA</i>			
Etap reakcji PCR	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	94 °C	3 min	1
Denaturacja	94 °C	1 min	35
Przyłączanie starterów	56 °C	1 min	
Elongacja	72 °C	1 min	
Końcowa elongacja	72 °C	5 min	1
-	12 °C	∞	1

#### 4.6. Elektroforeza w żelu agarozowym

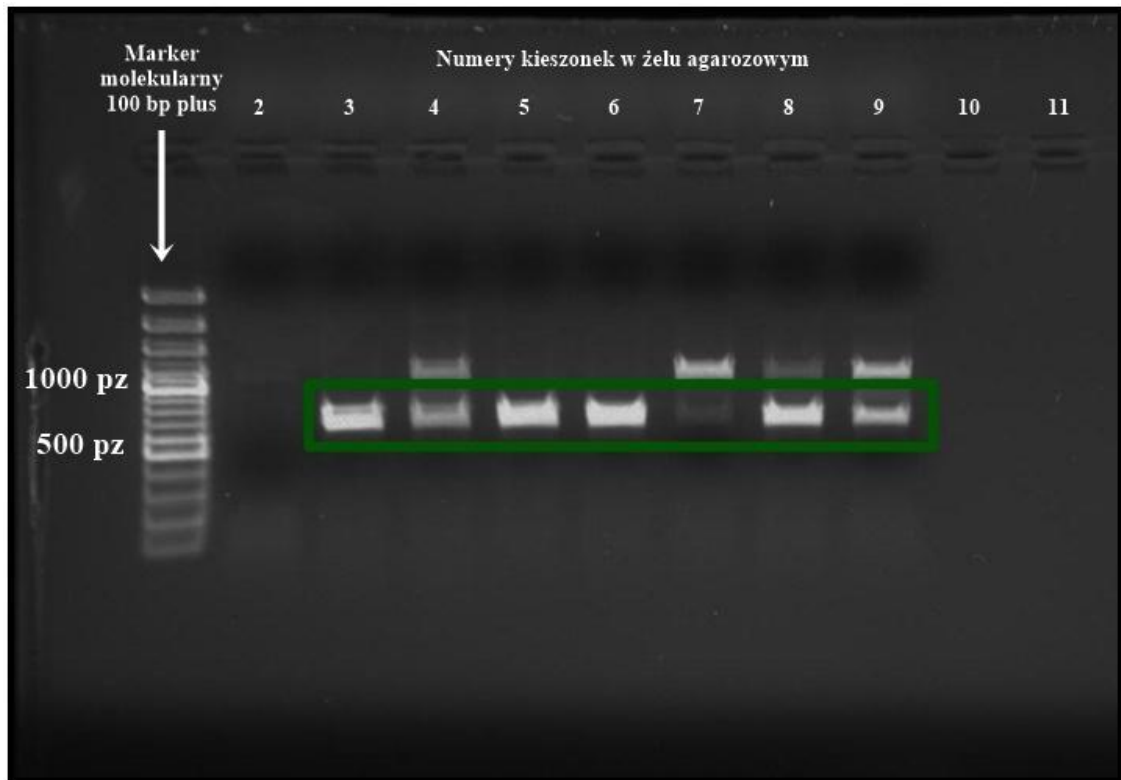
Elektroforeza pozioma była wykonywana w 1 % żelu agarozowym, który sporządzono z podanych produktów:

- agaroz (Prona Agarose),
- bufor TBE (10x, EURx):
  - 89 mM TRIS,
  - 89 mM kwasu borowego,
  - 2 mM EDTA,
- mieszaninę ogrzano do wrzenia,
- po schłodzeniu dodano 5 µl bromku etydy (Sigma).

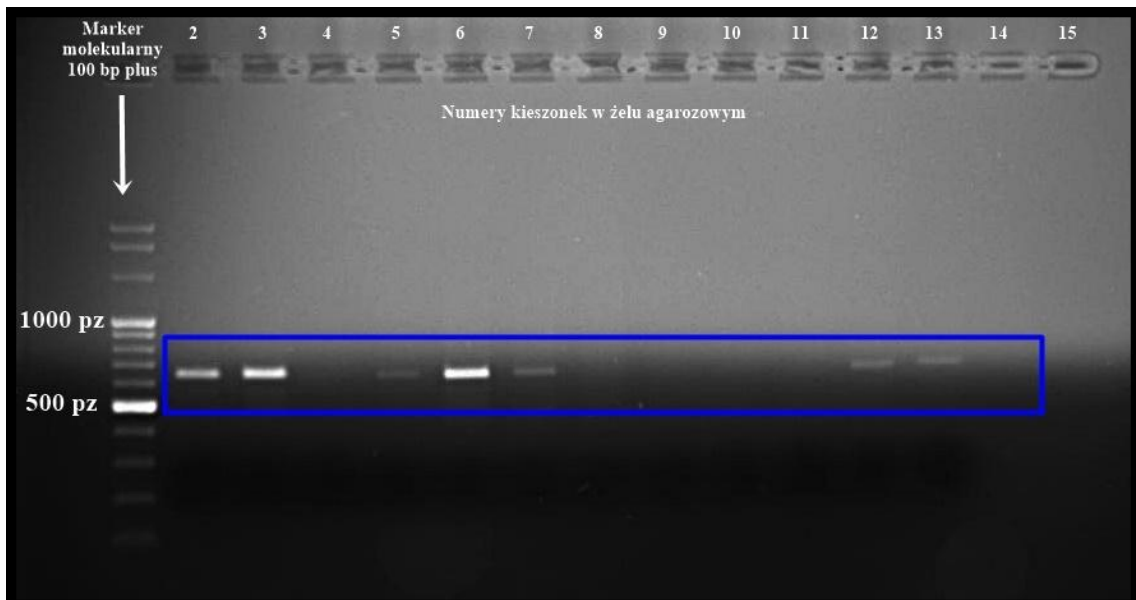
Zamplifikowane w reakcji PCR DNA w objętości 40 µl obciążano barwnikiem (LD, 6x orange DNA loading dye, Fermentas) w objętości 8 µl. Elektroforezę przeprowadzano pod napięciem 80 V przez okres 90 min w obecności markera molekularnego 100 bp plus DNA Ladder (ThermoFischer Scientific). Wyniki elektroforezy obserwowano przy pomocy systemu dokumentacji obrazu (GelDoc-It 310) wyposażonego w kamerę



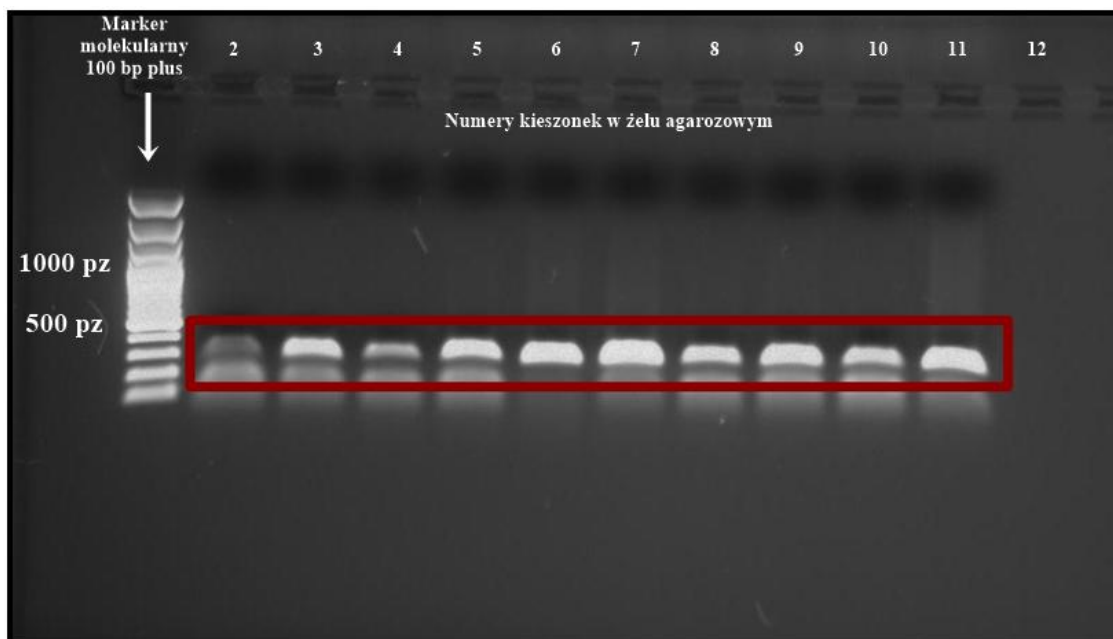
cyfrową z matrycą o rozdzielczości 1600 × 1200 pikseli, transiluminator (302 nm) oraz czteropozycyjny zmieniający filtrów (Ryc. 3, Ryc. 4, Ryc. 5).



Rycina 3. Przykładowe zdjęcie żelu przedstawiającego produkt amplifikacji fragmentu genu LSU rDNA liczący około 800 pz (foto: autor).



Rycina 4. Przykładowe zdjęcie żelu przedstawiającego produkt amplifikacji fragmentu ITS1-5.8S rDNA-ITS2 liczący około 650 pz (foto: autor).



Rycina 5. Przykładowe zdjęcie żelu przedstawiającego produkt amplifikacji odcinka zawierającego fragmenty genów chloroplastowych: *rpl36-infA* liczący około 350 pz (foto: autor).

#### 4.7. Oczyszczanie DNA z żelu agarozowego

Zamplifikowane fragmenty DNA migrujące w żelu w postaci prążków wycinano a następnie oczyszczano używając zestawu GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit (EURx) według schematu producenta (Tab. 7).

Tabela 7. Przebieg procesu oczyszczania produktów PCR z żelu agarozowego.

Odczynnik	Czas i temperatura inkubacji	Czas i prędkość (rpm – obroty na minutę) wirowania
600 µl buforu Orange A	5 min, 55 °C	1 min, 12000 rpm
500 µl buforu płuczającego (2x)	—	1 min, 12000 rpm (2x)
50 µl buforu elucyjnego	2 min, temperatura pokojowa	1 min, 12000 rpm

Po zakończeniu procesu oczyszczania produktów PCR z żelu agarozowego, wykonywano kontrolną elektroforezę w celu oceny jakości oczyszczonego fragmentu w badanych próbkach.

#### 4.8. Sekwencjonowanie metodą Sangera

Reakcję sekwencjonowania wykonywano używając zestawu BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Przygotowano mieszaninę reakcyjną, w skład której wchodziły:

- 3 µl matrycy (oczyszczony product PCR),
- 1 µl mieszaniny złożonej z polimerazy DNA, czterech dNTP i czterech ddNTP,
- 1.5 µl buforu,
- 1 µl odpowiedniego startera (Forward lub Reverse, Tab. 4),
- wodę dejonizowaną do uzyskania ogólnej pojemności 10 µl.

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzano w termocyklerze według odpowiedniego profilu termiczno-czasowego (Tab. 8).

Tabela 8. Profil termiczno-czasowy reakcji sekwencjonowania.

<b>Etap reakcji sekwencjonowania</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>	<b>Liczba cykli</b>
Wstępna denaturacja	94 °C	3 min	1
Wydłużanie startera	96 °C	10 s	25
Wydłużanie startera	55 °C	5 s	
Wydłużanie startera	60 °C	2 min	

#### 4.9. Usuwanie terminatorów po reakcji sekwencjonowania

Reakcję usuwania terminatorów po reakcji sekwencjonowania przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu ExTermiantor (A&A Biotechnology) według schematu (Tab. 9).

Tabela 9. Przebieg procesu usuwania terminatorów po reakcji sekwencjonowania.

<b>Odczynnik</b>	<b>Czas i temperatura inkubacji</b>	<b>Czas i prędkość (rpm – obroty na minutę) wirowania</b>
5 µl buforu Mix Blue	—	—
100 µl buforu wiążąco-płuczającego WP	—	3600 rpm
400 µl buforu wiążąco-płuczającego WP		13200 rpm
30 µl formamidu	2 min, temperatura pokojowa	1 min, 13200 rpm

#### 4.10. Analiza otrzymanych sekwencji

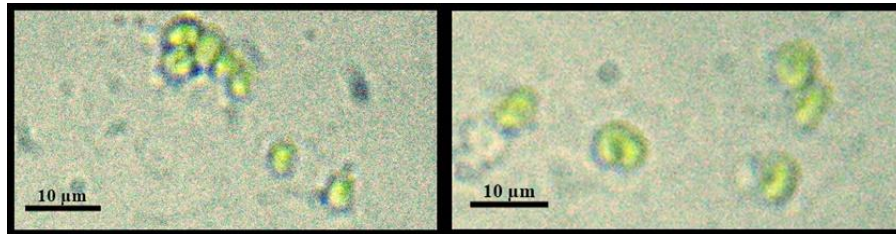
Otrzymane w formie chromatogramu sekwencje badanych fragmentów DNA były analizowane w programie Chromas Lite (Technylesium). Następnie,

z wykorzystaniem programu BioEdit (Hall 1999), porównywano otrzymane sekwencje między sobą. Kladogramy tworzone były w programie Mega 5.1 (Tamura i in. 2007), metodą Łączenia Sąsiadów (NJ) i Największej Wiarygodności (ML), dodając samopróbkowanie (ang. *bootstrap*) w liczbie 1000 powtórzeń (Felsenstein 1985). Analizy różnorodności haplotypów (Hd) oraz różnorodności nukleotydów obliczano przy użyciu programu DnaSP v5.10.01 (Librado i Rozas 2009). Sieci haplotypów zostały utworzone w programie Network 4.6.1.3 z wykorzystaniem metody *median joining algorithm* (<http://www.fluxus-engineering.com/>; Bandelt i in. 1999). Identyfikacja gatunków endosymbiotycznych glonów *P. bursaria* oparta była na podstawie porównania otrzymanych sekwencji z sekwencjami dostępnymi w Banku Genów z wykorzystaniem narzędzia BLAST (ang. *basic local alignment search tool*). Analizowano trzy wartości: „Query cover” informującą o długości pokrywania się otrzymanej sekwencji z danymi sekwencjami z Banku Genów (0-100 %), „Ident” informującą o podobieństwie układu nukleotydów między porównywanymi sekwencjami (0-100 %) oraz „E-value” – wskaźnika istotności statystycznej danego porównania sekwencji (im niższa, tym lepszy wynik).

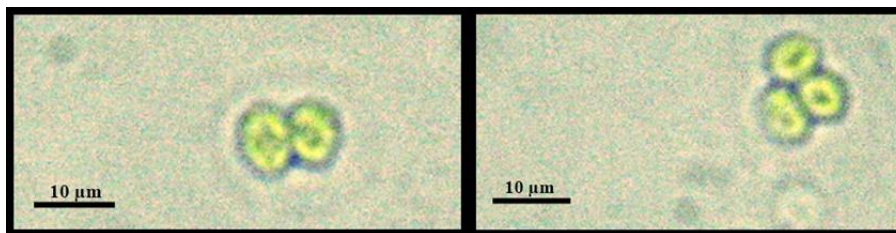
## 5. Wyniki

### 5.1. Analiza mikrofotografii endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*

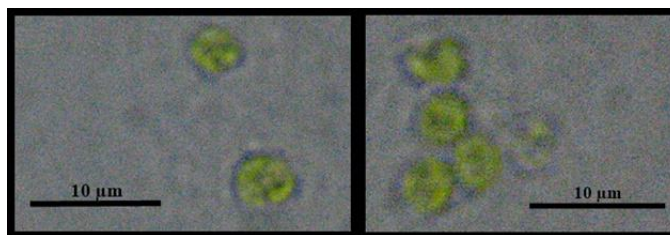
Zestawione mikrofotografie przedstawiają cztery gatunki symbiotycznych glonów *P. bursaria*. Komórki *C. vulgaris* charakteryzują się niewielkim rozmiarem (około 5  $\mu\text{m}$  średnicy) i kulistym kształtem. *C. variabilis* to komórki o rozmiarze zbliżonym do *C. vulgaris* (7-8  $\mu\text{m}$ ) i także kulistym kształcie (Ryc. 6). Komórki *M. reisseri* osiągają rozmiary 10  $\mu\text{m}$ , podobnie, jak *C. sorokiniana*. Nie stwierdzono obecności szczecin u *M. reisseri*, co jest charakterystyczne dla tego organizmu żyjącego w gęstych hodowlach (Ryc. 7). Na kolejnych mikrofotografiach można także zaobserwować występowanie kubkowatego chloroplastu u wszystkich czterech gatunków (Ryc. 8, Ryc. 9).



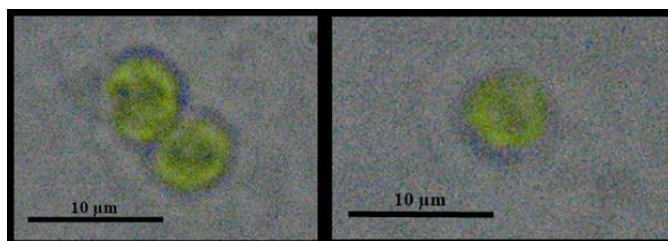
Rycina 6. Komórki *Chlorella vulgaris* (po lewej stronie) i *Chlorella variabilis* (po prawej stronie). Mikrofotografie wykonane przy pomocy mikroskopu świetlnego (Nikon Eclipse Ni-U wyposażony w system DIC i kamerę cyfrową Digital Slight DS Fi1c) przy powiększeniu 1000x (foto: autor).



Rycina 7. Komórki *Micractinium reisseri* (po lewej stronie) i *Chlorella sorokiniana* (po prawej stronie). Mikrofotografie wykonane przy pomocy mikroskopu świetlnego (Nikon Eclipse Ni-U wyposażony w system DIC i kamerę cyfrową Digital Slight DS Fi1c) przy powiększeniu 1000x (foto: autor).



Rycina 8. Komórki *Chlorella vulgaris* (po lewej stronie) i *Chlorella variabilis* (po prawej stronie). Mikrofotografie wykonane przy pomocy mikroskopu świetlnego (Nikon Eclipse Ni-U wyposażony w system DIC i kamerę cyfrową Digital Slight DS Fi1c) przy powiększeniu 1500x (1000x-powiększenie mikroskopu x powiększenie aparatu 1.5x) (foto: autor).



Rycina 9. Komórki *Chlorella sorokiniana* (po lewej stronie) i *Micractinium reisseri* (po prawej stronie). Mikrofotografie wykonane przy pomocy mikroskopu świetlnego (Nikon Eclipse Ni-U wyposażony w system DIC i kamerę cyfrową Digital Slight DS Fi1c) przy powiększeniu 1500x (1000x-powiększenie mikroskopu x powiększenie aparatu 1.5x) (foto: autor).

## 5.2. Analiza molekularna wybranych fragmentów DNA endosymbiotycznych glonów występujących u *Paramecium bursaria*

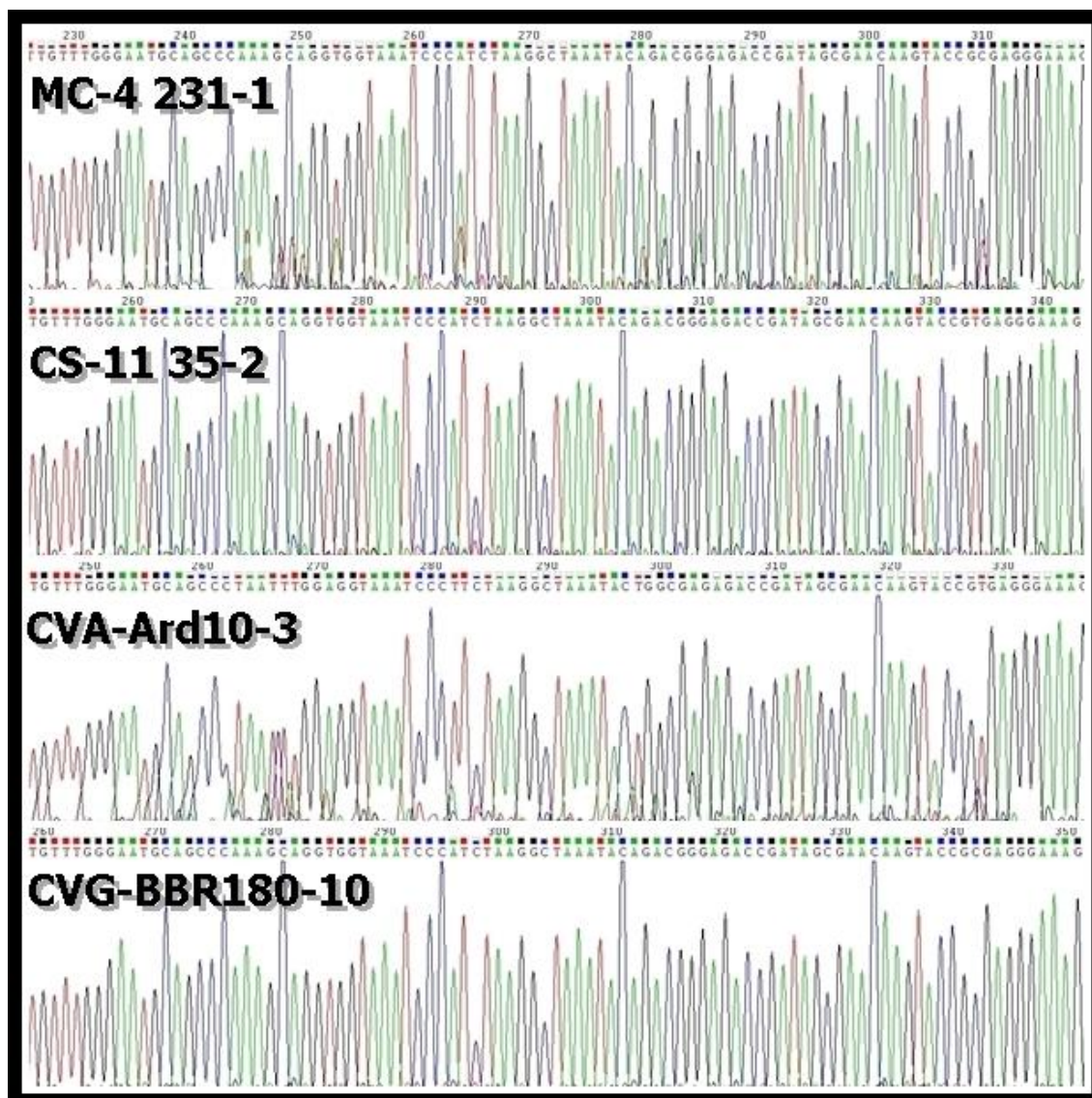
W pracy analizowano trzy fragmenty DNA: fragment kodujący dużą podjednostkę rybosomalną (LSU rDNA), fragmenty wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA pomiędzy nimi oraz fragmenty genów chloroplastowych: *rpl36* kodującego białko L36 oraz *infA* kodującego czynnik inicjacji translacji IF-1. Odcinki wybrano przez wzgląd na to, iż są to fragmenty dwóch różnych genomów – jądrowego i chloroplastowego. Odcinek dużej podjednostki rybosomalnej charakteryzuje się większym zróżnicowaniem niż odcinek małej podjednostki rybosomalnej (Hoshina i Imamura 2008). Fragmenty genów chloroplastowych wybrano także ze względu na obecność fragmentów międzygenowych posiadających więcej substytucji niż regiony kodujące.

### 5.2.1. Analiza fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA)

Odczytano sekwencję LSU rDNA wyizolowanego z komórek czterdziestu trzech szczepów endosymbiotycznych glonów *P. bursaria* pochodzących z różnych regionów geograficznych. Sekwencja liczy 555 pz. Zidentyfikowano dwadzieścia dziewięć haplotypów, ponadto wyliczono zróżnicowanie haplotypów  $Hd=0.908$  oraz zróżnicowanie nukleotydów  $\delta=0.03165$ . Frekwencja nukleotydów przedstawia się następująco: A=26.7 %, T=18.7 %, C=23.8 % oraz G=30.8 %.

#### 5.2.1.1. Analiza chromatogramów fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA) otrzymanych przy użyciu programu Chromas Lite

Obraz sekwencji nukleotydowej analizowano w programie Chromas Lite. Poniżej przedstawiono przykładowy obraz fragmentów czterech sekwencji, reprezentujących cztery gatunki endosymbiotycznych glonów: *M. reisseri*, *C. sorokiniana*, *C. variabilis* i *C. vulgaris*. Zestawiono fragmenty liczące ponad 90 pz. Ze względu na podobny rozkład pików można wnioskować o małym zróżnicowaniu analizowanego fragmentu (Ryc. 10).



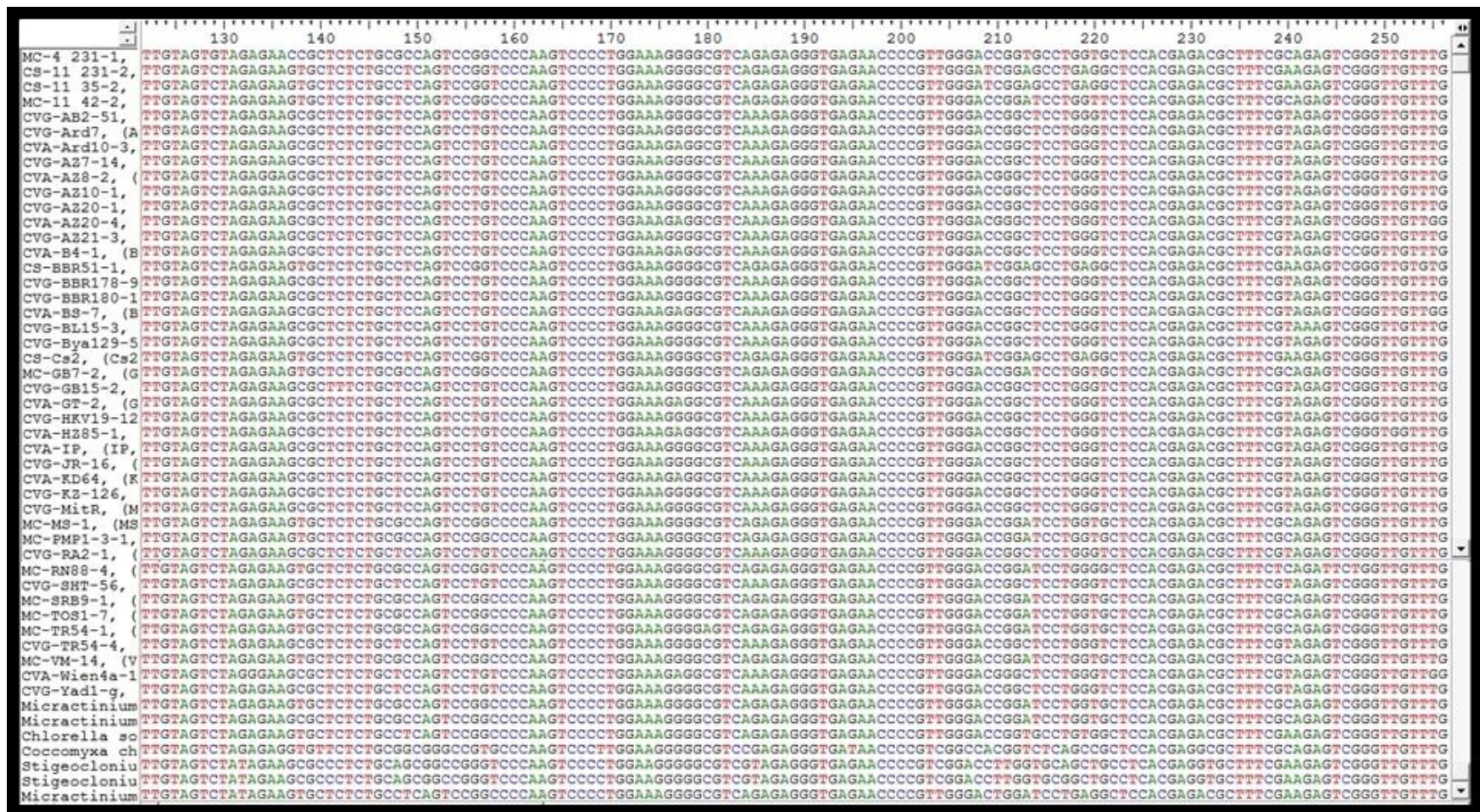
Rycina 10. Chromatogram szczepów: MC-4 231-1, CS-11 35-2, CVA-Ard10-3, CVG-BBR180-10 przedstawiający fragment LSU rDNA o długości 90 nukleotydów, uzyskany w programie Chromas Lite.

#### 5.2.1.2. Analiza obrazu sekwencji fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA) uzyskanego w programie BioEdit

W programie BioEdit uzyskano obrazy wszystkich analizowanych sekwencji w postaci literowej. Przedstawiono fragmenty sekwencji liczą około 140 nukleotydów i posiadają zarówno fragmenty podobne we wszystkich badanych szczepach, jak i różniące się. Na dole zestawienia przedstawione są trzy sekwencje: *Stigeoclonium tenue*, *S. variable* oraz *Coccomyxa chodatii* pełniące funkcję grupy zewnętrznej w analizie relacji filogenetycznych (Ryc. 11). Po porównaniu sekwencji wykropkowano pozycje nukleotydowe identyczne w stosunku do pozycji nukleotydowych w pierwszej sekwencji, natomiast postać literowa pozostaje w miejscach różnic pomiędzy



analizowanymi pozycjami nukleotydowymi. W pozycji 138 odnotowano tranzycję cytozyny na tyminę, co jest charakterystyczne dla *C. sorokiniana* i większości szczepów *M. reisseri*. Obszar od 158 pozycji do 205 jest bardzo jednorodny, z wyjątkiem tranzycji guaniny na adeninę w pozycji 177, charakterystycznej dla *C. variabilis* oraz takiej samej tranzycji w pozycji 185 występującej u *C. vulgaris* i *C. variabilis*. Dla rodzaju *Micractinium* charakterystyczne jest występowanie tyminy i guaniny w pozycjach: 220 i 221. Analiza przedstawionego fragmentu wskazuje na duże podobieństwo układu zasad nukleotydowych u *C. vulgaris* i *C. variabilis* (Ryc. 12).



Rycina 11. Obraz sekwencji odcinka LSU rDNA wszystkich analizowanych szczepów liczący 140 nukleotydów (pozycja od 120 do 260 zasady) uzyskany za pomocą programu BioEdit.

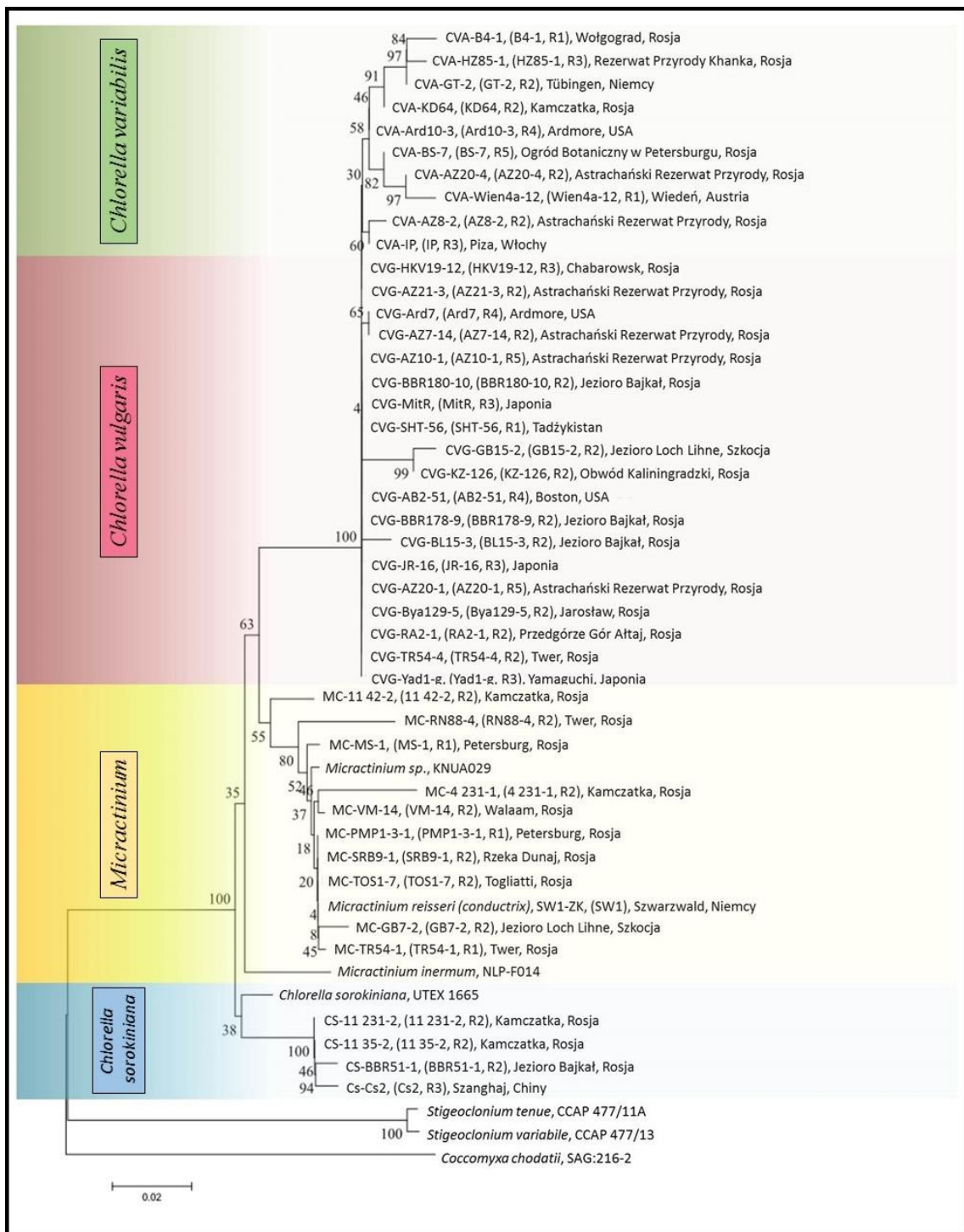


Rycina 12. Obraz sekwencji odcinka LSU rDNA wszystkich analizowanych szczepów liczący 140 nukleotydów (pozycja od 120 do 260 zasady) uzyskany za pomocą programu BioEdit. Miejsca oznaczone za pomocą kropek przedstawiają identyczne nukleotydy z sekwencją pierwszą, natomiast postać literowa pozostaje w miejscach różniących się. Na kolor zielony zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Chlorella variabilis*, na kolor czerwony zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Chlorella vulgaris*, na kolor niebieski zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Chlorella sorokiniana*, na kolor żółty zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Micractinium reisseri*.

### 5.2.1.3. Analiza kladogramów wykonanych w programie Mega 5.1 na podstawie analizy sekwencji fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA)

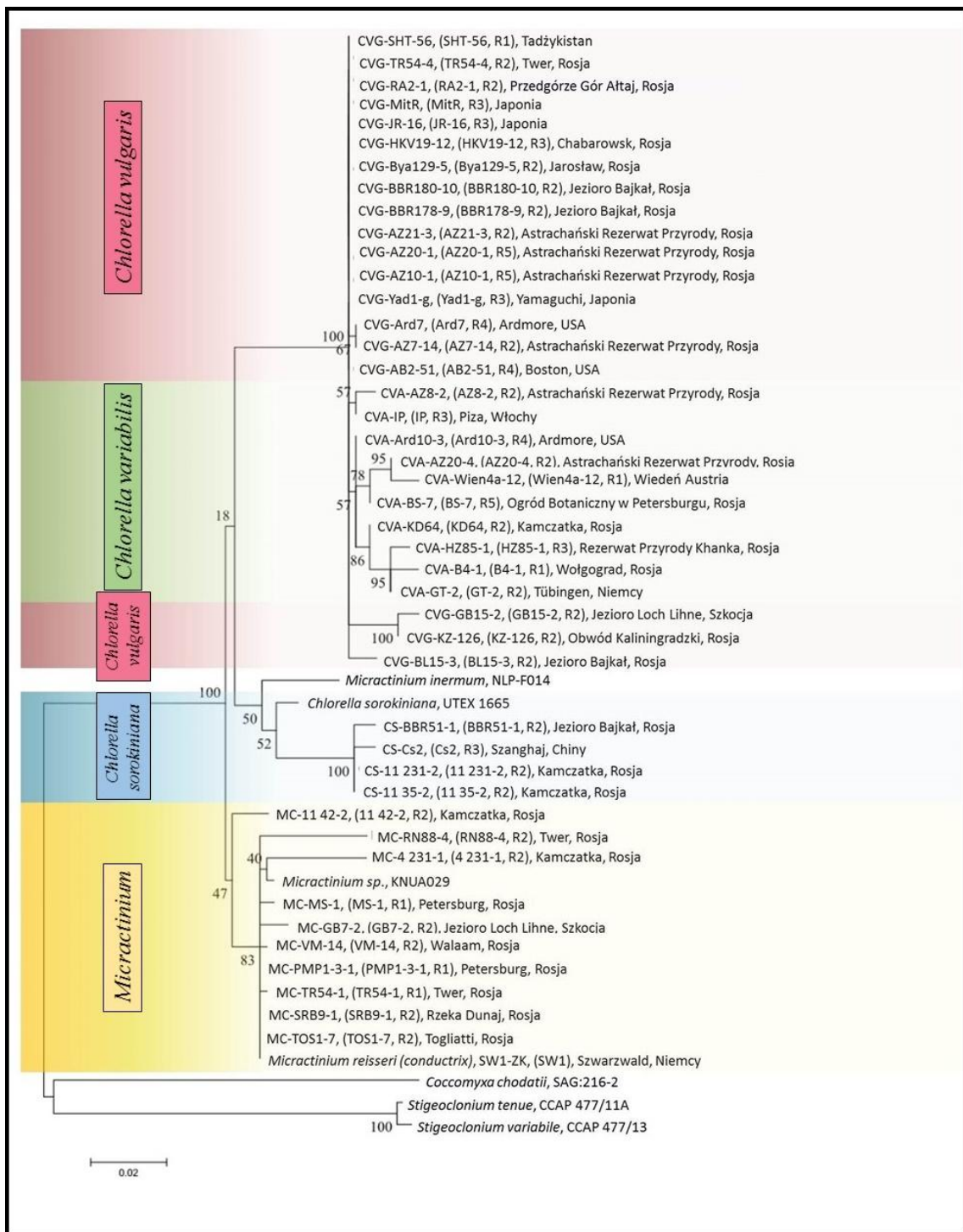
Kladogram wykonano z wykorzystaniem metody Łączenia Sąsiadów (NJ). Przy konstrukcji wykorzystano sekwencje czterdziestu trzech szczepów endosymbiotycznych glonów wyizolowanych z komórek *P. bursaria*. Ponadto posłużono się sekwencjami dostępnymi w Banku Genów: szczep *Micractinium* sp. (KNUA029), *Micractinium reisseri* (*conductrix*) (SW1-ZK), *Micractinium inermum* (NLP-F014), *Chlorella sorokiniana* (UTEX 1665) oraz szczepy *Stigeoclonium tenue* (CCAP 477/11A), *Stigeoclonium variable* (CCAP 477/13) oraz *Coccomyxa chodatii* (SAG:216-2), wykorzystane jako grupa zewnętrzna. Przy węzłach przedstawiono procentowe wartości samopróbkowania. Na przedstawionym kladogramie obserwuje się grupowanie szczepów w główne cztery klady. Pierwszy z nich wyróżniony na kolor zielony grupuje szczepy symbiotycznych glonów wyizolowane z komórek *P. bursaria* należących do określonych syngenów (R): B4-1 (Wołgograd, Rosja, R1), HZ85-1 (Rezerwat Przyrody Khanka, Rosja, R3), GT-2 (Tübingen, Niemcy, R2), KD64 (Kamczatka, Rosja, R2), Ard10-3 (Ardmore, USA, R4), BS-7 (Ogród Botaniczny w Petersburgu, Rosja, R5), AZ20-4 (Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja, R2), Wien4a-12 (Wiedeń, Austria, R1), AZ8-2 (Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja, R2) i IP (Piza, Włochy, R3). Zgrupowane szczepy przypisano do gatunku *C. variabilis* na podstawie porównania otrzymanych sekwencji z sekwencjami dostępnymi w Banku Genów z wykorzystaniem narzędzia BLAST. Kolejny kład wyróżniony na kolor czerwony grupuje glony pochodzące z komórek *P. bursaria* należących do określonych syngenów (R): HKV19-12 (Chabarowsk, Rosja, R3), AZ21-3 (Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja, R2), Ard7 (Ardmore, USA, R4), AZ7-14, (Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja, R2), AZ10-1 (Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja, R5), BBR180-10 (jezioro Bajkał, Rosja, R2), MitR (Japonia, R3), SHT-56 (Tadżykistan, R1), GB15-2 (jezioro Loch Linnhe, Szkocja, R2), KZ-126 (Obwód Kaliningradzki, R2), AB2-51 (Boston, USA, R4), BBR178-9 (jezioro Bajkał, Rosja, R2), BL15-3, (jezioro Bajkał, Rosja, R2), JR-16 (Japonia, R3), AZ20-1 (Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja, R5), Bya129-5 (Jarosław, Rosja, R2), RA2-1 (przedgórze gór Ałtaj, Rosja, R2), TR54-4 (Twer, Rosja, R2) oraz Yad1-g (Yamaguchi, Japonia, R3). Na podstawie porównania z sekwencjami dostępnymi w Banku Genów, glony zidentyfikowano jako *C. vulgaris*. Szczepy symbiotycznych glonów zgrupowane w kład trzeci wyróżniony na kolor żółty

wyizolowano z komórek *P. bursaria* należących do poszczególnych syngenów (R): 11 42-2 (Kamczatka, Rosja, R2), RN88-4 (Twer, Rosja, R2), MS-1 (Petersburg, Rosja, R1), 4 231-1 (Kamczatka, Rosja, R1), VM-14 (Walaam, Rosja, R2), PMP1-3-1 (Petersburg, Rosja, R1), SRB9-1 (rzeka Dunaj, Rosja, R2), TOS1-7 (Togliatti, Rosja, R2), GB7-2 (jezioro Loch Linnhe, Szkocja, R2) oraz TR54-1 (Twer, Rosja R1). Dodatkowo, w obrębie kladu znajdują się szczepy *Micractinium* sp. (KNUA029) oraz *Micractinium reisseri (conductrix)* (SW1-ZK, Szwarzwald, Niemcy). Na podstawie porównania z sekwencjami z Banku Genów oraz grupowania się ze szczepami oznaczonymi jako rodzaj *Micractinium*, glony przypisano do gatunku *M. reisseri*. Ostatni z kładów – niebieski grupuje szczepy symbiotycznych glonów wyizolowanych z komórek *P. bursaria* należących do określonych syngenów (R): 11 231-2 (Kamczatka, Rosja, R2), 11 35-2 (Kamczatka, Rosja, R2), BBR51-1 (jezioro Bajkał, R2) oraz Cs2 (Szanghaj, Chiny, R3). Dodatkowo wykorzystano sekwencję szczepu *Chlorella sorokiniana* (UTEX 1665) pozyskaną z Banku Genów. Szczepy oznaczono jako *C. sorokiniana*. Biorąc pod uwagę wartości samopróbkowania można stwierdzić, że klady oznaczone jako *C. variabilis* i *C. vulgaris* są ze sobą blisko spokrewnione (wartość samopróbkowania 100 %). Klady: *Micractinium* i *C. sorokiniana* są wyraźnie wyodrębnione, co świadczy o dalszym pokrewieństwie pomiędzy tymi gatunkami a *C. vulgaris* i *C. variabilis* (Ryc. 13).



Rycina 13. Kladogram skonstruowany w programie Mega 5.1 metodą Łączenia Sąsiadów na podstawie analizy sekwencji fragmentu LSU rDNA pięćdziesięciu szczepów glonów, w tym szczepów: *Coccomyxa chodatii*, *Stigeoclonium tenue* i *Stigeoclonium variabile* użytych jako grupy zewnętrznej.

Kladogram skonstruowano z wykorzystaniem metody Największej Wiarygodności (ML). Obserwuje się grupowanie szczepów w trzy wyraźnie wyodrębnione klady. Pierwszy z nich składa się ze szczepów należących do gatunków: *C. vulgaris* i *C. variabilis*. W przypadku tej metody wysoka wartość samopróbkowania (100 %) świadczy o wysokim pokrewieństwie tych dwóch gatunków. Pozostałe klady są wyraźnie wyodrębnione i opisane wysokimi wartościami samopróbkowania (100 % dla *C. sorokiniana* i 83 % dla *Micractinium*) (Ryc. 14).

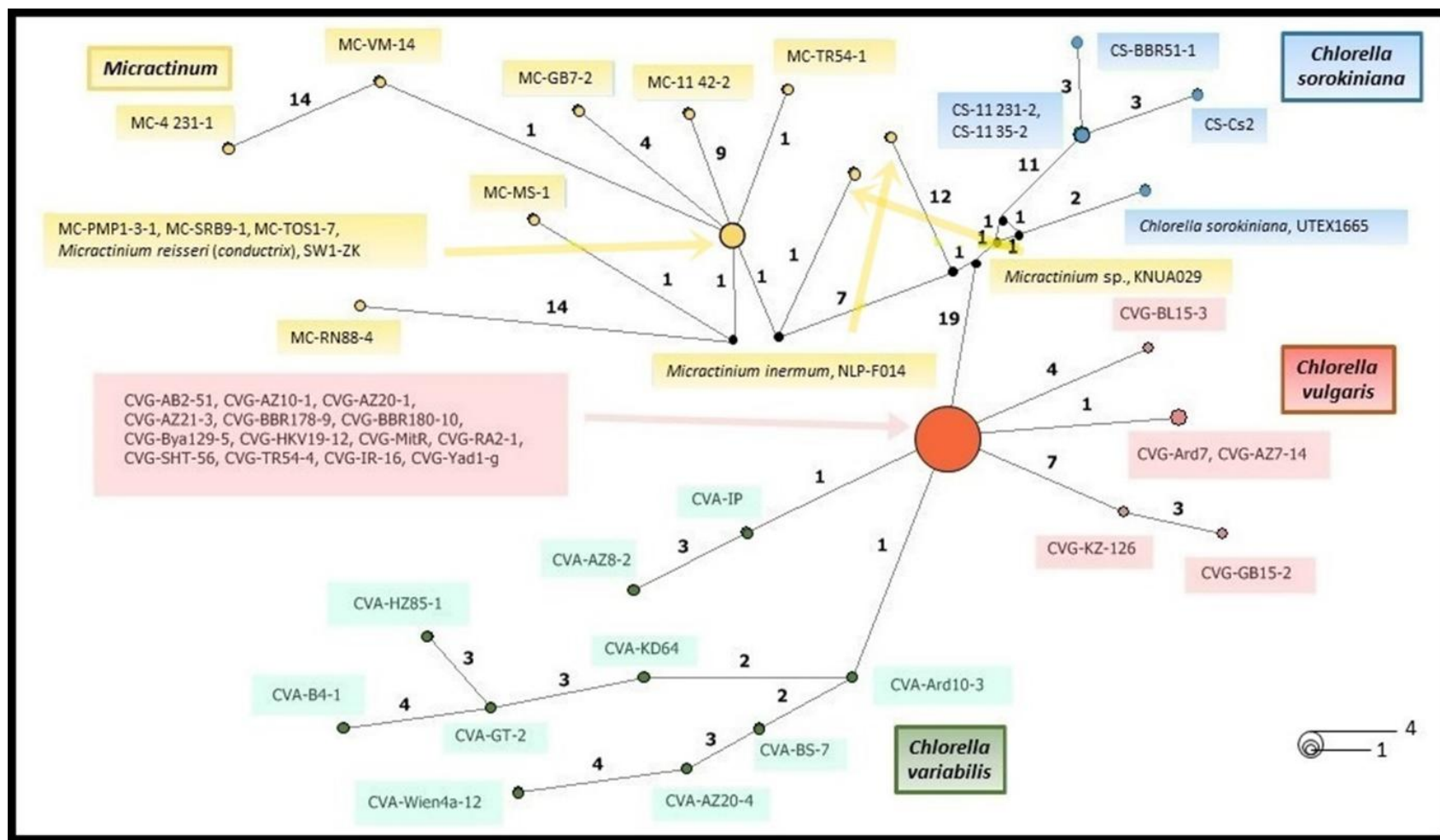


Rycina 14. Kladogram skonstruowany w programie Mega 5.1 metodą Największej Wiarygodności (model T92+G) na podstawie analizy sekwencji fragmentu LSU rDNA pięćdziesięciu szczepów glonów, w tym szczepów: *Coccomyxa chodatii*, *Stigeoclonium tenue* i *Stigeoclonium variabile* użytych jako grupy zewnętrznej.



#### 5.2.1.4. Analiza sieci haplotypów wykonana w programie Network 4.6.1.3 na podstawie analizy sekwencji fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA)

Sieć haplotypów utworzono z wykorzystaniem metody *median joining algorithm*. Na podstawie analizy czterdziestu siedmiu sekwencji fragmentu LSU rDNA wykryto obecność dwudziestu dziewięciu haplotypów. Wyliczono także całkowitą liczbę mutacji  $\text{Eta}=232$  oraz liczbę miejsc polimorficznych  $\text{S}=106$ . Analiza zależności między haplotypami wykazała obecność czterech kładów określonych odpowiednio nazwami gatunków. Kład *C. variabilis* złożony jest z dziesięciu unikalnych haplotypów, każdy z nich odpowiada poszczególnemu szczepowi endosymbionta. Pomędzy szczepami występują substytucje (od 2 do 9), co świadczy o dosyć niskim stopniu zróżnicowania wewnątrzgatunkowego. Kład *C. vulgaris* składa się z pięciu haplotypów, z czego trzy odnoszą się do trzech pojedynczych szczepów, kolejny z nich jest reprezentowany przez dwa szczepy, ostatni zaś zawiera aż czternaście szczepów symbiotycznych glonów. Taki układ haplotypów oraz niewielka ilość zmian nukleotydowych pomiędzy szczepami (od 1 do 7) świadczy o wysokim podobieństwie genetycznym analizowanego odcinka DNA. Trzeci z kładów – *C. sorokiniana* składa się z czterech haplotypów, z czego trzy reprezentują po jednym szczepie, natomiast czwarty zawiera dwa szczepy. Ostatni kład oznaczony jako *Micractinium* składa się z dziesięciu unikalnych haplotypów, z czego jeden odpowiada pięciu szczepom symbiotycznych glonów, a pozostałe dziewięć odpowiada pojedynczym szczepom. Zróżnicowanie międzygatunkowe jest wyższe, jeśli porównywane są gatunki *C. vulgaris* i *M. reisseri* (od 28 do 58 substytucji) lub *C. variabilis* i *M. reisseri* (od 28 do 58 substytucji). Niewielkie różnice występują pomiędzy *C. variabilis* i *C. vulgaris* (od 1 do 20 substytucji) (Ryc. 15).



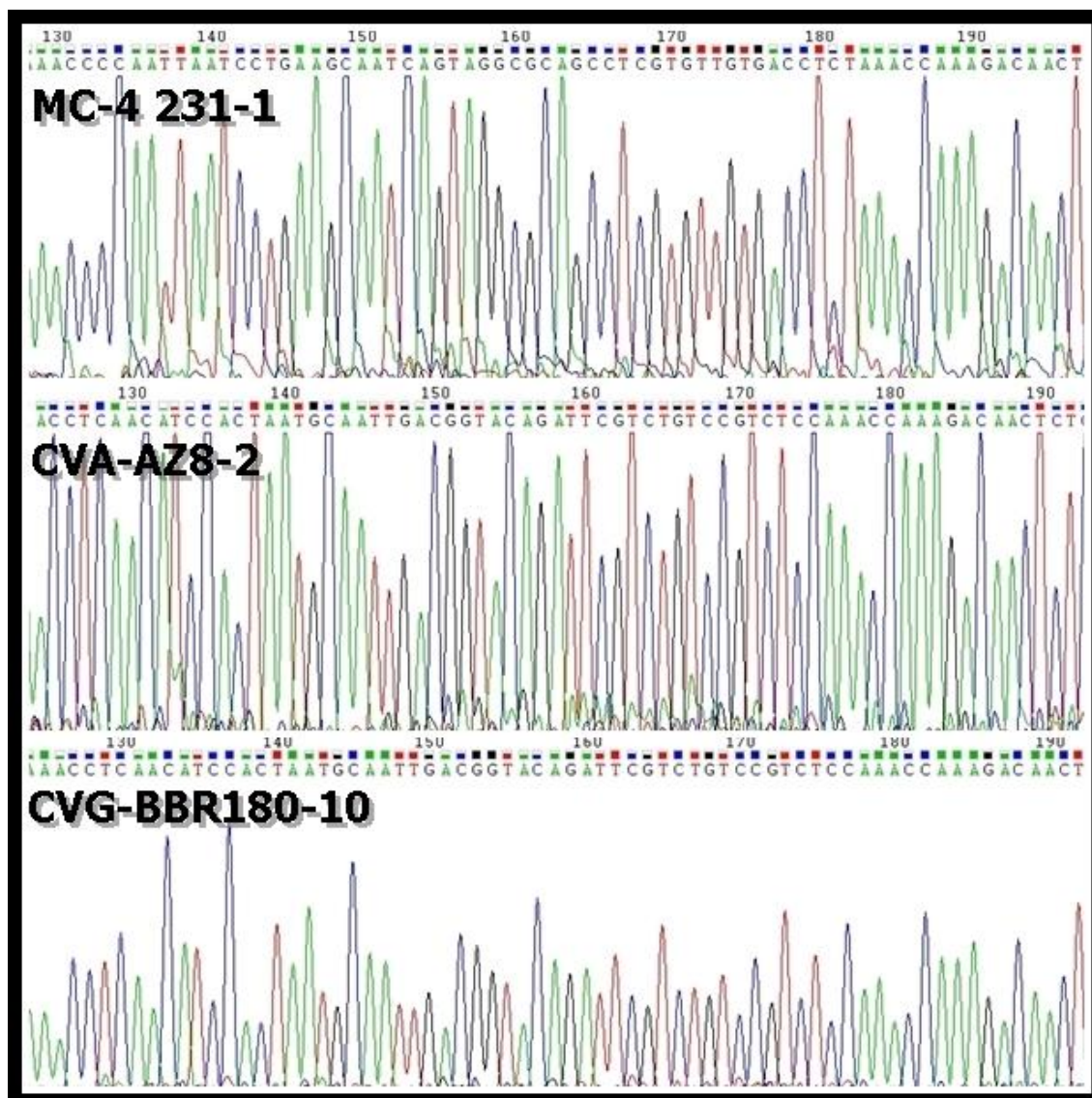
Rycina 15. Sieć haplotypów skonstruowana w programie Network 4.6.1.3 metodą *median joining algorithm* na podstawie analizy sekwencji fragmentu LSU rDNA czterdziestu siedmiu szczepów glonów, w tym czterdziestu trzech symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*. Rozmiar kółek jest proporcjonalny do frekwencji haplotypów.

### 5.2.2. Analiza fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA

Odczytano sekwencję fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA, wyizolowanego z komórek dwudziestu szczepów endosymbiotycznych glonów *P. bursaria* pochodzących z różnych regionów geograficznych. Sekwencja liczy 543 pz. Siedemnaście sekwencji glonów wykorzystanych w analizie pozyskano z Banku Genów. Zidentyfikowano dwadzieścia dziewięć haplotypów, ponadto wyliczono zróżnicowanie haplotypów  $Hd=0.987$  oraz zróżnicowanie nukleotydów  $\delta=0.16040$ . Frekwencja nukleotydów przedstawia się następująco: A=20.5 %, T=22.6 %, C=30.1 % oraz G=26.8 %.

#### 5.2.2.1. Analiza chromatogramów sekwencji fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA otrzymanych przy użyciu programu Chromas Lite

Poniżej przedstawiono obraz trzech sekwencji, reprezentujących trzy gatunki endosymbiotycznych glonów: *M. reisseri*, *C. variabilis* i *C. vulgaris*. Zestawione fragmenty przedstawiają obszar DNA liczący 90 pz. Analiza obszaru wskazuje na niewielkie zróżnicowanie pomiędzy sekwencjami (Ryc. 16).



Rycina 16. Chromatogram szczepów: MC-4 231-1, CVA-AZ8-2, CVG-BBR180-10 przedstawiający fragment ITS1-5.8S rDNA-ITS-2 o długości 90 nukleotydów, uzyskany w programie Chromas Lite.

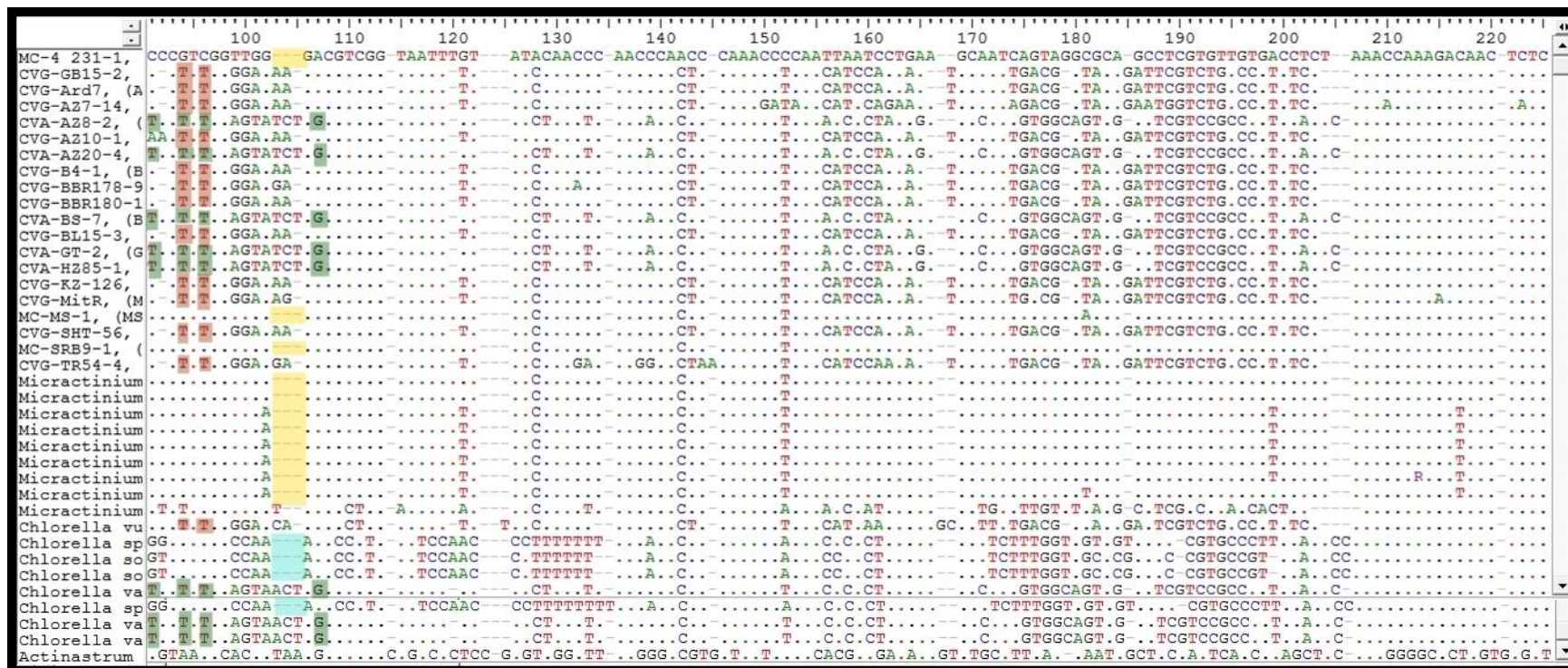
5.2.2.2. Analiza obrazu sekwencji fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA uzyskanego w programie BioEdit

Poniżej przedstawiono fragmenty sekwencji liczące około 140 pz. Na końcu przedstawiono sekwencję grupy zewnętrznej – *Actinastrium hantzschii* (Ryc. 17). Analizowany odcinek charakteryzuje się wysoką zmiennością. Sekwencje *C. vulgaris* i *C. variabilis* charakteryzuje między innymi występowanie transwersji guaniny na tyminę w pozycji 94 oraz tranzycji cytozyny na tyminę w pozycji 96. U *C. variabilis* obserwuje się występowanie tranzycji cytozyny na tyminę w pozycji 91 czy tranzycji

adeniny na guaninę w pozycji 107. U *Micractinium*, *Chlorella* sp. i *C. sorokiniana* stwierdza się delecję w pozycjach: 103-105 (Ryc. 18).

	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
MC-4 231-1,	CCCCTCGGTTGG	GACGTCGG	TAATTTGT	ATACAACCC	AACCCACCC	CAAACCCCAATTAATCCTGAA	GCAATCAGTAGGCGCA	GCCTCGTGTGTGACCTCT	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-GB15-2,	C-CTTTGGGAGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATCCACTAA	TGCAATTGACG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-Ard7, (A	C-CTTTGGGAGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATCCACTAA	TGCAATTGACG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-AZ7-14,	C-CTTTGGGAGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAAGATAAACATACAGAAAA	TGCAATGACG	GTACAGAAATGGTCTGTCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TATC			
CVG-AZ8-2,	TCCTTTGGAGTATCTGGCGTCGG	TAATTT	GT	ATCTAACTC	AACACACCC	CAAACCTCAAAATCACTATGGA	GCCATCGTGGCAGTCG	GCTCGTCCGCTGTCCACTC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-AZ10-1,	AACTTTGGGAGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATCCACTAA	TGCAATTGACG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-AZ20-4,	TCCTTTGGAGTATCTGGCGTCGG	TAATTT	GT	ATCTAACTC	AACACACCC	CAAACCTCAAAATCACTATGGA	GCCATCGTGGCAGTCG	GCTCGTCCGCTGTCCACTC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-B4-1, (B	C-CTTTGGGAGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATCCACTAA	TGCAATTGACG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-BBR178-9	C-CTTTGGGAGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATCCACTAA	TGCAATTGACG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-BBR180-1	C-CTTTGGGAGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATCCACTAA	TGCAATTGACG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-BS-7, (B	TCCTTTGGAGTATCTGGCGTCGG	TAATTT	GT	ATCTAACTC	AACACACCC	CAAACCTCAAAATCACTATGGA	GCCATCGTGGCAGTCG	GCTCGTCCGCTGTCCACTC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-BL15-3,	C-CTTTGGGAGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATCCACTAA	TGCAATTGACG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-GT-2, (G	TCCTTTGGAGTATCTGGCGTCGG	TAATTT	GT	ATCTAACTC	AACACACCC	CAAACCTCAAAATCACTATGGA	GCCATCGTGGCAGTCG	GCTCGTCCGCTGTCCACTC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-HZ85-1,	TCCTTTGGAGTATCTGGCGTCGG	TAATTT	GT	ATCTAACTC	AACACACCC	CAAACCTCAAAATCACTATGGA	GCCATCGTGGCAGTCG	GCTCGTCCGCTGTCCACTC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-KZ-126,	C-CTTTGGGAGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATCCACTAA	TGCAATTGACG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-MitR, (M	C-CTTTGGGAGAG	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATCCACTAA	TGCAATTGGCG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
MC-MS-1, (MS	CCCCTCGGTTGG	GACGTCGG	TAATTTGT	ATCCAACCC	AACCCACCC	CAAACCTCAATTAATCCTGAA	GCAATCAGTAGGAGCA	GCCTCGTGTGTGACCTCT	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-SHT-56,	C-CTTTGGGAGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAACCC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATCCACTAA	TGCAATTGACG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
MC-SRB9-1, (	CCCCTCGGTTGG	GACGTCGG	TAATTTGT	ATCCAACCC	AACCCACCC	CAAACCTCAATTAATCCTGAA	GCAATCAGTAGGCGCA	GCCTCGTGTGTGACCTCT	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
CVG-TR54-4,	C-CTTTGGGAGGAA	GACGTCGG	TAATTT	ATCCAAGAC	AAGGCACTAA	CAAACCTCAACATCCAATAA	TGCAATTGACG	GTACAGATTCGTCGTCCGCTCC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Micractinium	CCCCTCGGTTGG	GACGTCGG	TAATTTGT	ATCCAACCC	AACCCACCC	CAAACCTCAATTAATCCTGAA	GCAATCAGTAGGCGCA	GCCTCGTGTGTGACCTCT	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Micractinium	CCCCTCGGTTGG	GACGTCGG	TAATTTGT	ATCCAACCC	AACCCACCC	CAAACCTCAATTAATCCTGAA	GCAATCAGTAGGCGCA	GCCTCGTGTGTGACCTCT	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Micractinium	CCCCTCGGTTGA	GACGTCGG	TAATTTTT	ATCCAACCC	AACCCACCC	CAAACCTCAATTAATCCTGAA	GCAATCAGTAGGCGCA	GCCTCGTGTGTGACCTCT	AAACCAAAGATAAC	TCTC			
Micractinium	CCCCTCGGTTGA	GACGTCGG	TAATTTTT	ATCCAACCC	AACCCACCC	CAAACCTCAATTAATCCTGAA	GCAATCAGTAGGCGCA	GCCTCGTGTGTGACCTCT	AAACCAAAGATAAC	TCTC			
Micractinium	CCCCTCGGTTGA	GACGTCGG	TAATTTTT	ATCCAACCC	AACCCACCC	CAAACCTCAATTAATCCTGAA	GCAATCAGTAGGCGCA	GCCTCGTGTGTGACCTCT	AAACCAAAGATAAC	TCTC			
Micractinium	CCCCTCGGTTGA	GACGTCGG	TAATTTTT	ATCCAACCC	AACCCACCC	CAAACCTCAATTAATCCTGAA	GCAATCAGTAGGCGCA	GCCTCGTGTGTGACCTCT	AAACCAAAGATAAC	TCTC			
Micractinium	CTCTTCGGTTGGT	GACGTCGG	AAATTTAT	ATCCAACCTC	AACCCACCC	CAAACCCAATAATCACTGAA	GCTCTTGTGTGACG	CCTCGGCTAGCACTCT	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Chlorella vu	CCCTTTGGGAGCA	GACGTCGG	TAATTT	TATCCAACC	AACCCACTC	CAAACCTCAACATAACTGAA	GCAATCAGTAGGCGCA	GCCTCGTGTGTGACCTCT	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Chlorella sp	GGCGTCGGCCAA	AACCCCTG	TATCCAAC	CCTTTTTTTT	AACACACCC	CAAACCAACATCACTGAA	GCAATCTTGGTGGTGTGCT	CGTGCCCTTCCACTCCAACCAAAGACAAC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Chlorella so	GTGTCGGGCCAA	AACCCCTG	TATCCAAC	CCTTTTTTTT	AACACACCC	CAAACCAACCAACTCTGAA	GCAATCTTGGTGGCCGGGCC	CGTGCCCTTCCACTCCAACCAAAGACAAC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Chlorella so	GTGTCGGGCCAA	AACCCCTG	TATCCAAC	CCTTTTTTTT	AACACACCC	CAAACCAACCAACTCTGAA	GCAATCTTGGTGGCCGGGCC	CGTGCCCTTCCACTCCAACCAAAGACAAC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Chlorella va	TCCTTTGGAGTAACTGGCGTCGG	TAATTT	GT	ATCTAACTC	AACCCACCC	CAAACCTCAACATCACTGAA	GCCATCGTGGCAGTCG	GCTCGTCCGCTGTCCACTC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Chlorella sp	GGCGTCGGCCAA	AACCCCTG	TATCCAAC	CCTTTTTTTT	AACACACCC	CAAACCAACATCACTGAA	GCAATCTTGGTGGTGTGCT	CGTGCCCTTCCACTCCAACCAAAGACAAC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Chlorella va	TCCTTTGGAGTAACTGGCGTCGG	TAATTT	GT	ATCTAACTC	AACCCACCC	CAAACCTCAACATCACTGAA	GCCATCGTGGCAGTCG	GCTCGTCCGCTGTCCACTC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Chlorella va	TCCTTTGGAGTAACTGGCGTCGG	TAATTT	GT	ATCTAACTC	AACCCACCC	CAAACCTCAACATCACTGAA	GCCATCGTGGCAGTCG	GCTCGTCCGCTGTCCACTC	AAACCAAAGACAAC	TCTC			
Actinastrium	CGTAAACGACCGGTAAAGCGTCGGCTGACTCTCC	GAGTCGGCTT	AAGGACGTG	TATCCAACG	TGATGAA	GTGCTG	GAATAGCTCCCA	TTCCAGCAAGCTTC	AAAGGGGGCTAGTGTGTT				

Rycina 17. Obraz sekwencji odcinka ITS1-5.8S rDNA-ITS2 wszystkich analizowanych szczepów liczący 140 nukleotydów (pozycja od 90 do 230 zasady) uzyskana za pomocą programu BioEdit.

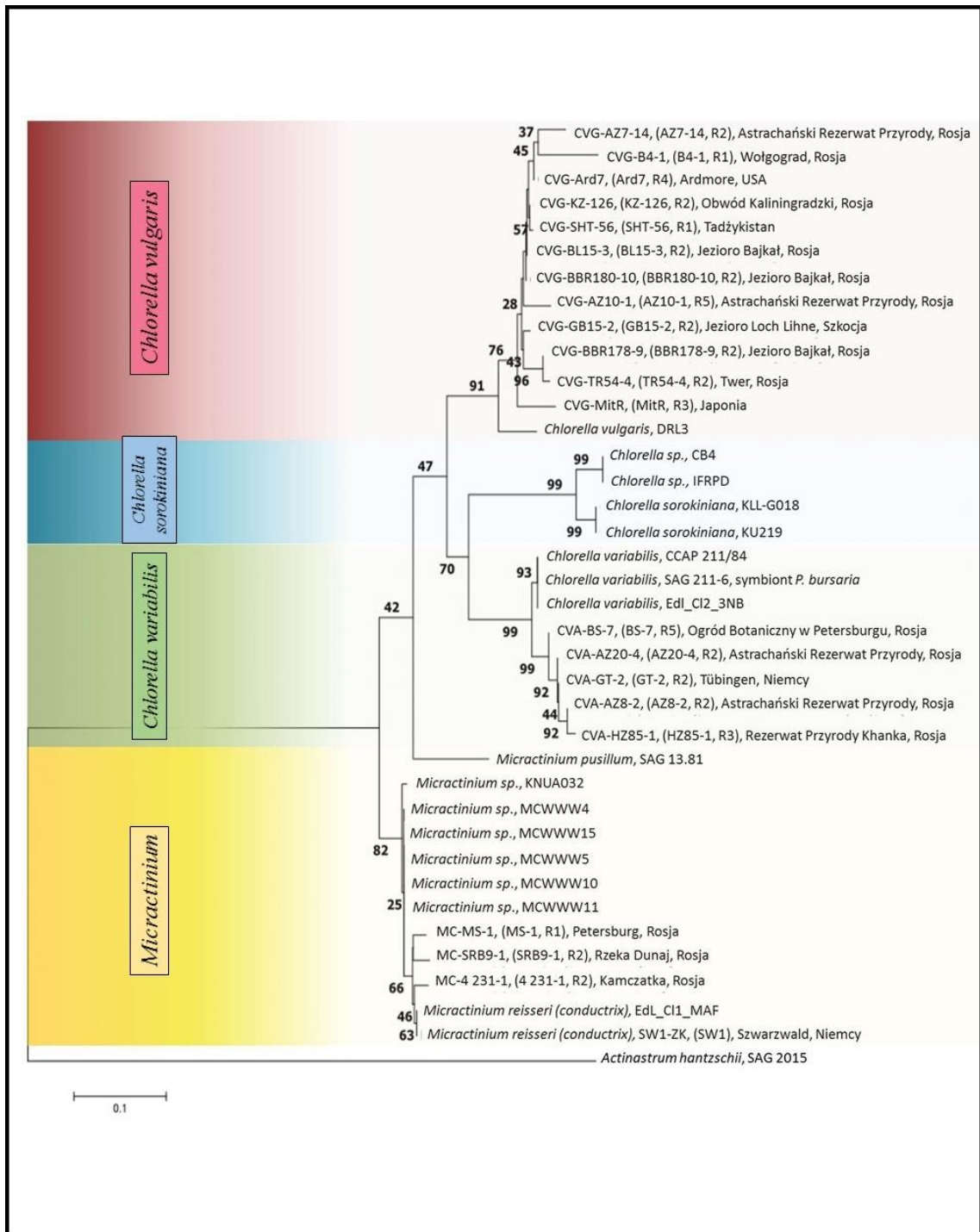


Rycina 18. Obraz sekwencji odcinka ITS1-5.8S rDNA-ITS2 wszystkich analizowanych szczepów liczący 140 nukleotydów (pozycja od 90 do 230 zasady) uzyskany za pomocą programu BioEdit. Miejsca oznaczone są pomocą kropek przedstawiają identyczne nukleotydy z sekwencją pierwszą, natomiast postać literowa pozostaje w miejscach różniących się. Na kolor zielony zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Chlorella variabilis*, na kolor czerwony zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Chlorella vulgaris*, na kolor niebieski zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Chlorella sorokiniana*, na kolor żółty zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Micractinium reisseri*.

### 5.2.2.3. Analiza kladogramów wykonanych w programie Mega 5.1 na podstawie analizy sekwencji fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA

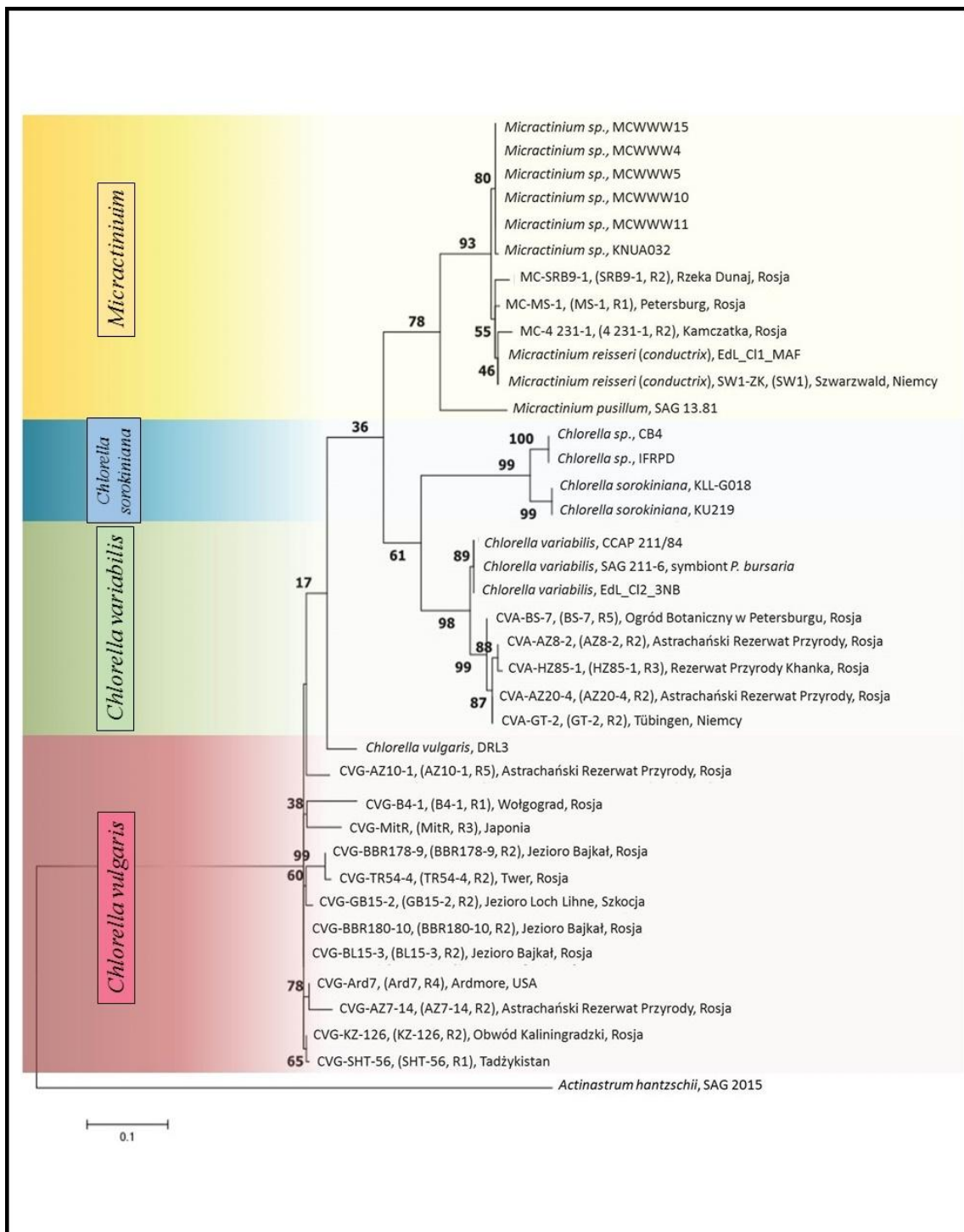
Kladogram skonstruowano metodą Łączenia Sąsiadów (NJ), wykorzystując dwadzieścia sekwencji szczepów symbiotycznych glonów *P. bursaria*. Ponadto posłużono się szczepami dostępnymi w Banku Genów: *C. vulgaris* (DRL3), *C. sorokiniana* (KLL-G018, KU219), *C. variabilis* (CCAP 211/84, SAG 211-6, EdL\_C12\_3NB), *M. reisseri* (*conductrix*) (EdL\_C11\_MAF, SW1-ZK), *M. pusillum* (SAG 18.81), *Chlorella* sp. (CB4, IFRPD) oraz *Micractinium* sp. (KNUA032, MCWWW4, MCWWW5, MCWWW10, MCWWW11, MCWWW15). Jako grupę zewnętrzną wykorzystano sekwencję szczepu *A. hantzschii* (SAG 2015). Na przedstawionym kladogramie obserwuje się grupowanie szczepów w cztery klady. Pierwszy z nich wyróżniony na kolor czerwony jest złożony ze szczepów symbiotycznych glonów wyizolowanych ze szczepów *P. bursaria*: AZ7-14, B4-1, Ard7, KZ-126, SHT-56, BL15-3, BBR180-10, AZ10-1, GB15-2, BBR178-9, TR54-4, MitR oraz *C. vulgaris* (DRL3). Analizowane szczepy oznaczono jako *C. vulgaris* poprzez porównanie z sekwencjami dostępnymi w Banku Genów oraz grupowanie się ze szczepem *C. vulgaris* (DRL3). Drugi kład oznaczony kolorem niebieskim grupuje szczepy należące do gatunku *C. sorokiniana* (KLL-G018, KU219) oraz *Chlorella* sp. (CB4, IFRPD). Trzeci kład – zielony składa się ze szczepów należących do gatunku *C. variabilis* wyizolowanych ze szczepów *P. bursaria*: BS-7, AZ20-4, GT-2, AZ8-2, HZ85-1 oraz szczepów *C. variabilis*: CCAP 211/84, SAG:211-6, EdL\_C12\_3NB. Ostatni kład wyróżniony na żółto grupuje szczepy należące do rodzaju *Micractinium*. Sześć z nich to szczepy *Micractinium* sp.: KNUA032, MCWWW4, MCWWW15, MCWWW5, MCWWW10 i MCWWW11. Kolejne trzy szczepy to szczepy symbiontów wyizolowanych z komórek *P. bursaria*: MS-1, SRB9-1, 4 231-1 oraz ostatnie dwa to szczepy dostępne w Banku Genów oznaczone jako *M. reisseri* (*conductrix*): EdL\_C11\_MAF i SW1-ZK. Poszczególne klady są wyraźnie od siebie odizolowane z przypisanymi wysokimi wartościami samopróbkowania (*Micractinium* 82 % (NJ), 93 % (ML), *C. sorokiniana* 99 % (NJ), 99 % (ML), *C. variabilis* 99 % (NJ), 98 % (ML), *C. vulgaris* 91 % (NJ), 60 % (ML)), co świadczy o licznych różnicach w sekwencjach pomiędzy nimi (Ryc. 19).





Rycina 19. Kladogram skonstruowany w programie Mega 5.1 metodą Łączenia Sąsiadów na podstawie analizy sekwencji fragmentu ITS1-5.8S rDNA-ITS2 trzydziestu siedmiu szczepów glonów, w tym dwudziestu szczepów symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* oraz szczepu *Actinastrum hantzschii* użytego jako grupy zewnętrznej.

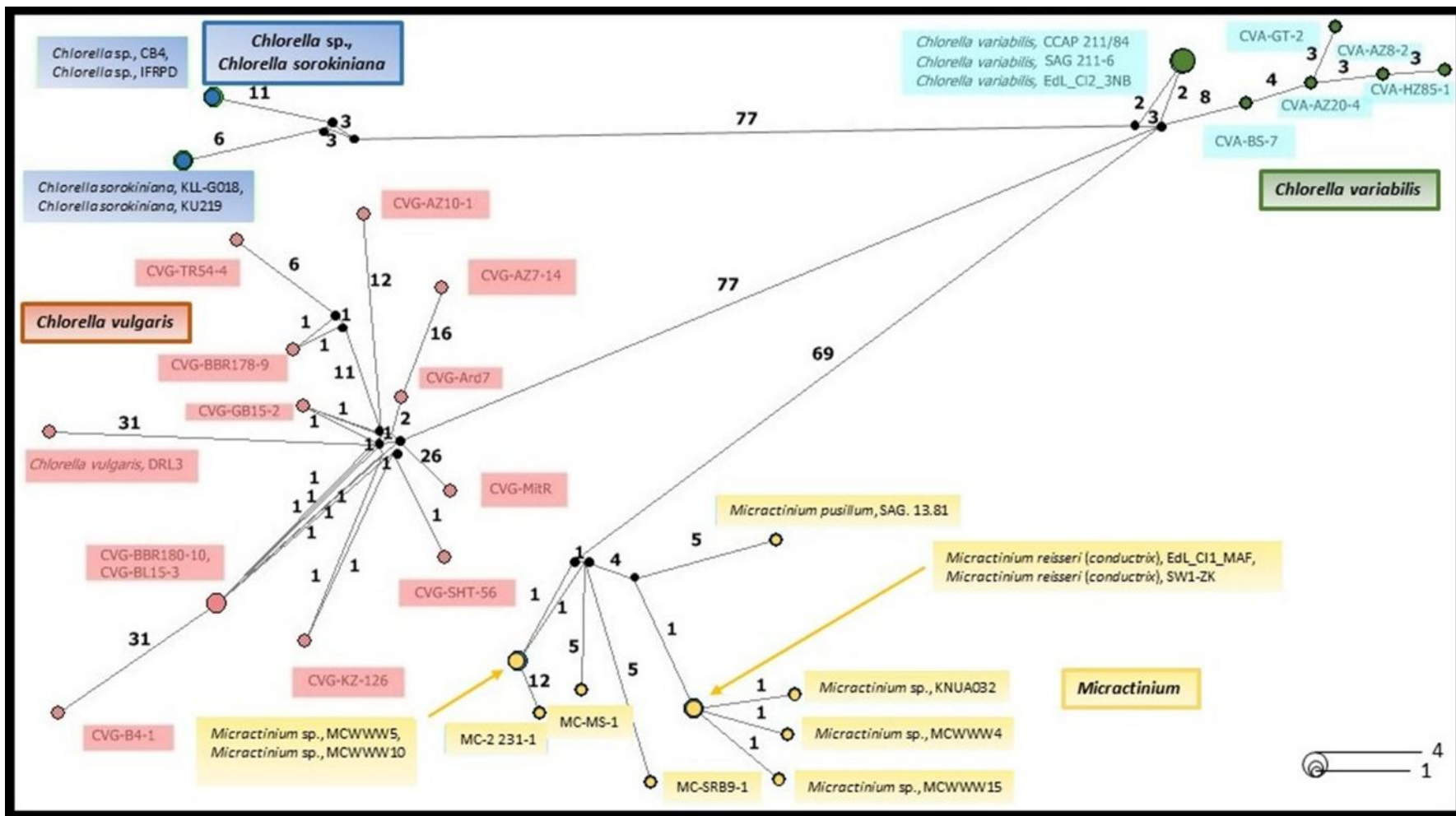
Drugi z kladogramów skonstruowany z wykorzystaniem metody Największej Wiarygodności przedstawia podobny układ grupowania się szczepów, a także wyraźne wyodrębnianie się gatunków, o czym świadczą wysokiej wartości samopróbkowania (Ryc. 20).



Rycina 20. Kladogram skonstruowany w programie Mega 5.1 metodą Największej Wiarygodności (model T92+G) na podstawie analizy sekwencji fragmentu ITS1-5.8S rDNA-ITS2 trzydziestu siedmiu szczepów glonów, w tym dwudziestu szczepów symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* oraz szczepu *Actinastrum hantzschii* użytego jako grupy zewnętrznej.

#### 5.2.2.4. Analiza sieci haplotypów wykonana w programie Network 4.6.1.3 na podstawie analizy fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S

Sieć haplotypów utworzono z wykorzystaniem metody *median joining algorithm*. Na podstawie analizy trzydziestu sześciu sekwencji fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA wykryto obecność dwudziestu dziewięciu haplotypów. Wyliczono także całkowitą liczbę mutacji  $\text{Eta}=315$  oraz liczbę miejsc polimorficznych  $\text{S}=224$ . Analiza zależności między haplotypami wykazała obecność czterech kładów. Pierwszy z nich – *C. sorokiniana* złożony jest z dwóch haplotypów, każdy z nich złożony z dwóch szczepów. Drugi kład grupuje szczepy należące do gatunku *C. vulgaris*. W tym przypadku występuje jedenaście haplotypów, z tego jeden reprezentujący dwa szczepy *C. vulgaris*. Kolejny kład – *Micractinium* składa się z dziewięciu haplotypów. Siedem z nich reprezentowanych jest przez siedem szczepów, natomiast dwa haplotypy grupują po dwa szczepy. Ostatni z kładów przypisany jest gatunkowi *C. variabilis* i zawiera sześć unikalnych haplotypów, z czego pięć reprezentuje pięć szczepów a szósty grupuje trzy szczepy *C. variabilis*. Różnice pomiędzy poszczególnymi gatunkami w przypadku analizy fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA są najwyższe ze wszystkich analizowanych odcinków DNA. Różnice pomiędzy *C. variabilis* i *C. sorokiniana* wynoszą od 88 do 112 substytucji nukleotydowych. Podobny poziom różnic obserwowany jest pomiędzy *C. variabilis* i *C. vulgaris* – od 81 do 128 substytucji. *Micractinium* dzieli od *C. variabilis* od 72 do 100 substytucji. Jeszcze większe różnice dzielą *Micractinium* i *C. vulgaris* (149 do 192 substytucji) oraz *C. vulgaris* i *C. sorokiniana* (168 do 204 substytucji). Różnice wewnątrzgatunkowe w większości mieszczą się w granicach kilkunastu substytucji (Ryc. 21).



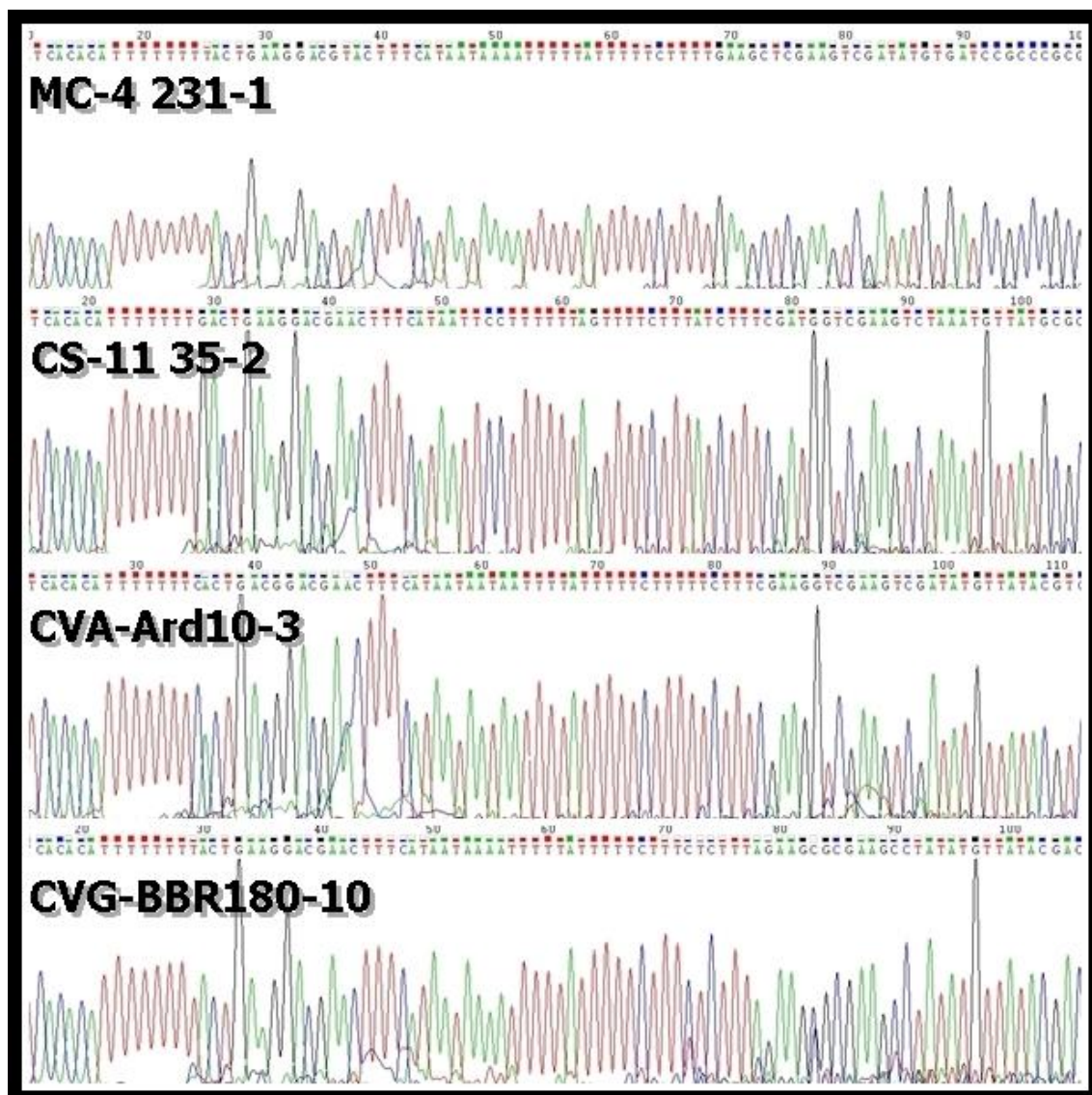
Rycina 21. Sieć haplotypów skonstruowana w programie Network 4.6.1.3 metodą *median joining algorithm* na podstawie analizy sekwencji fragmentu ITS1-5.8S rDNA-ITS2 trzydziestu siedmiu szczepów glonów, w tym dwudziestu szczepów symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*. Rozmiar kółek jest proporcjonalny do frekwencji haplotypów.

### 5.2.3. Analiza fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* oraz *infA*

Odczytano sekwencję fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* oraz *infA* wyizolowanych z komórek czterdziestu trzech szczepów endosymbiotycznych glonów *P. bursaria* pochodzących z różnych regionów geograficznych. Sekwencja liczy 267 pz. Zidentyfikowano trzydzieści sześć haplotypów, ponadto wyliczono zróżnicowanie haplotypów  $Hd=0.984$  oraz zróżnicowanie nukleotydów  $\delta=0.07886$ . Frekwencja nukleotydów przedstawia się następująco: A=29.6 %, T=36 %, C=18.5 % oraz G=15.9 %.

#### 5.2.3.1 Analiza chromatogramów sekwencji genów chloroplastowych: *rpl36* oraz *infA* otrzymanych przy użyciu programu Chromas Lite

Poniżej przedstawiono obraz czterech sekwencji, reprezentujących cztery gatunki endosymbiotycznych glonów: *M. reisseri*, *C. sorokiniana*, *C. variabilis* i *C. vulgaris*. Zestawiono fragmenty liczące 90 pz. Analizując przedstawione chromatogramy można stwierdzić wyższe zróżnicowanie fragmentów genów chloroplastowych w porównaniu do fragmentu LSU rDNA, co szczególnie widać w przypadku gatunków: *M. reisseri* i *C. sorokiniana* (Ryc. 22).



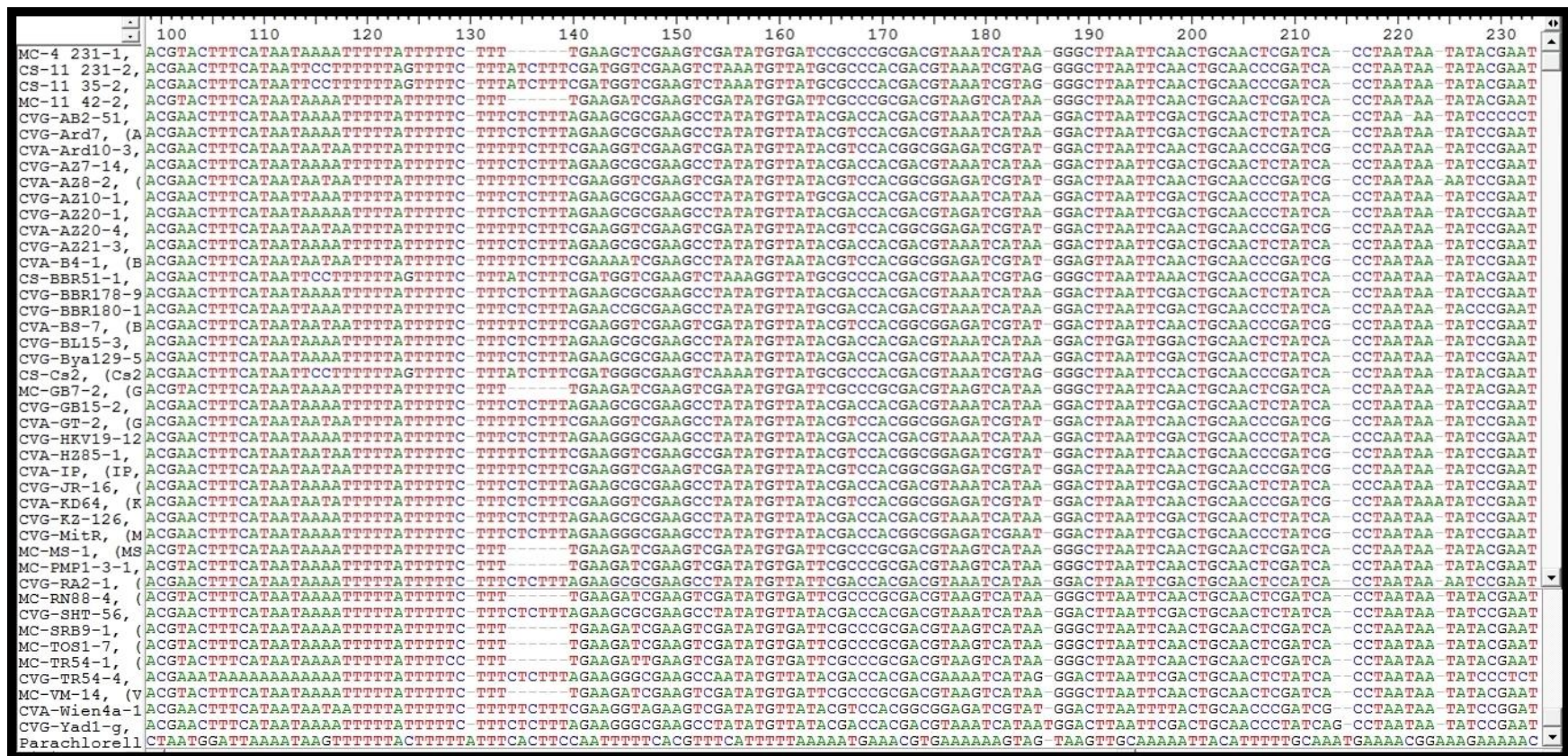
Rycina 22. Chromatogram szczepów: MC-4 231-1, CS-11 35-2, CVA-Ard10-3, CVG-BBR180-10 przedstawiający fragment genów chloroplastowych: *rpl36* i *infA* o długości 90 nukleotydów, uzyskany w programie Chromas Lite.

### 5.2.3.2. Analiza obrazu sekwencji genów chloroplastowych: *rpl36* oraz *infA* uzyskanego w programie BioEdit

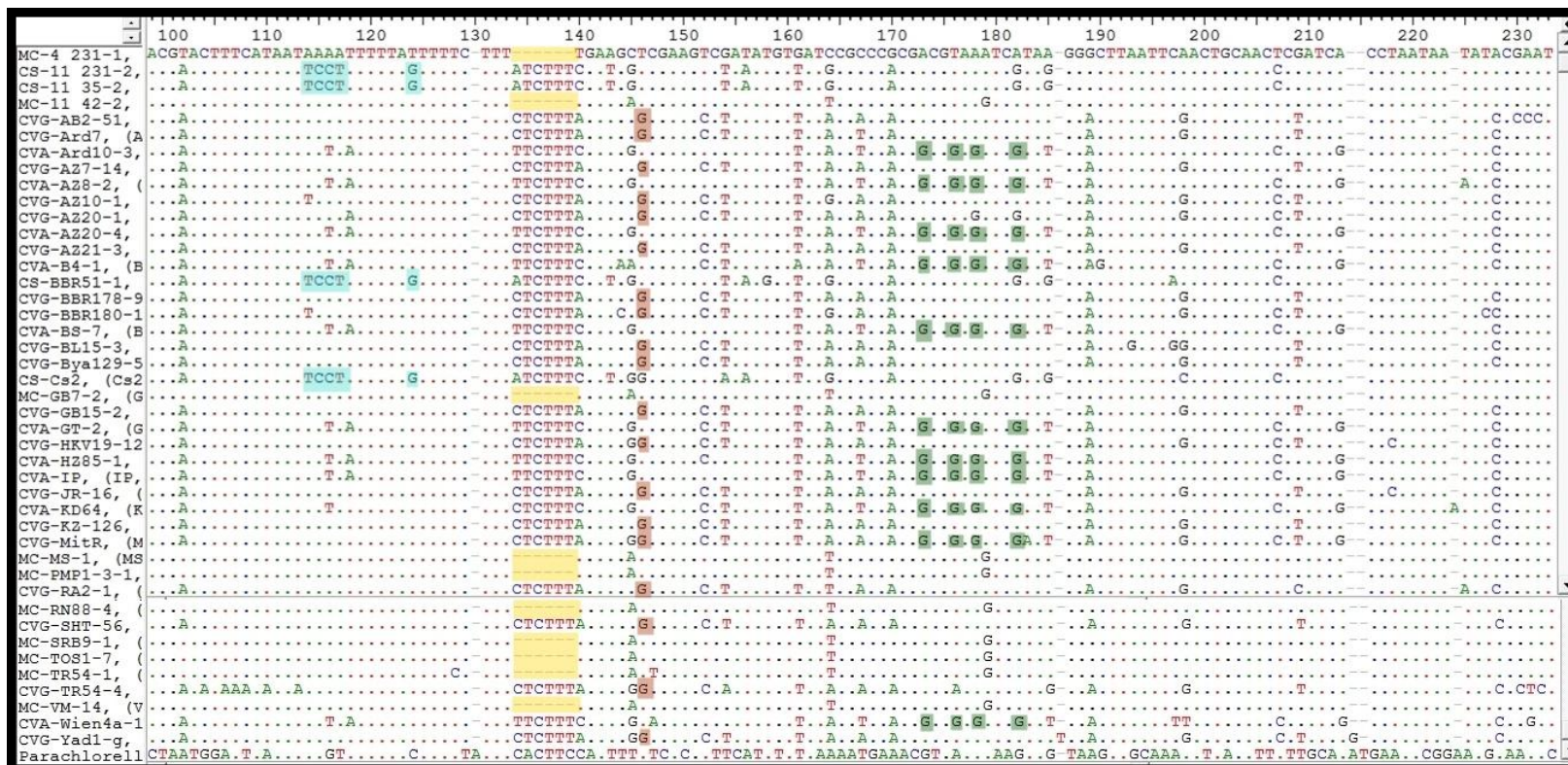
Poniżej przedstawiono fragmenty sekwencji liczące około 140 pz. Na końcu przedstawiona jest sekwencja *Parachlorella kessleri* pełniąca funkcję grupy zewnętrznej (Ryc. 23). Analizowany fragment charakteryzuje się wysokim zróżnicowaniem w układzie zasad nukleotydów. W przypadku *C. sorokiniana* odnotowano transwersje adeniny na: tyminę, guaninę, guaninę i tyminę w pozycjach 114-117, transwersję tyminy na guaninę w pozycji 124 oraz inne liczne substytucje. *M. reisseri* charakteryzuje się występowaniem delecji w pozycjach: 134-139. U *C. variabilis* odnotowano tranzycję adeniny na guaninę w pozycjach: 173, 176, 178

oraz 182. U *C. vulgaris* występuje guanina w pozycji 146 w porównaniu do pozostałych gatunków, u których w tym miejscu znajduje się tymina. Taki obraz układu nukleotydów świadczy o wysokiej różnorodności fragmentu genomu chloroplastowego (Ryc. 24).





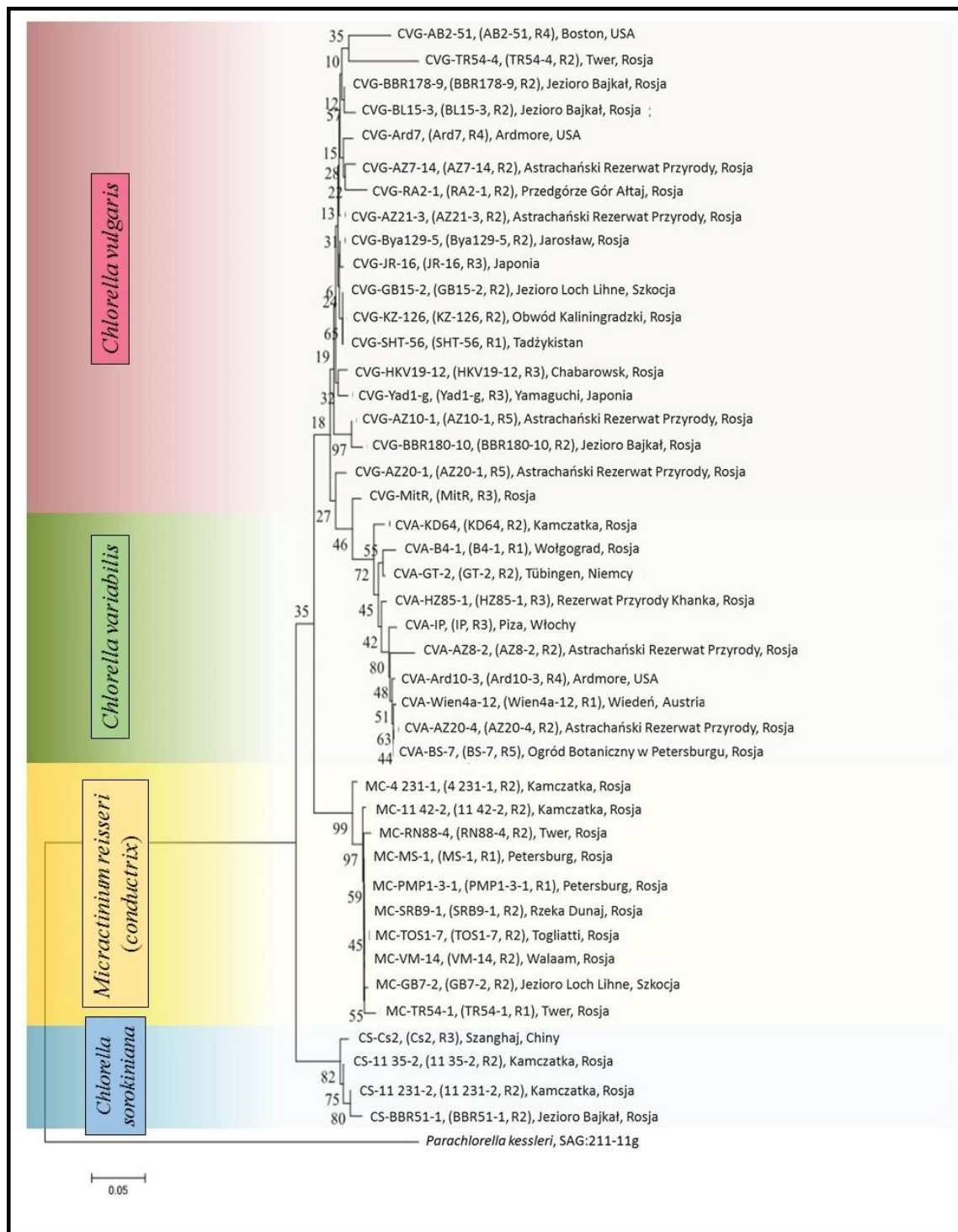
Rycina 23. Obraz sekwencji fragmentu genów chloroplastowych: *rpl36* i *infA* wszystkich analizowanych szczepów liczący 140 nukleotydów (pozycja od 98 do 238 zasady) uzyskany za pomocą programu BioEdit.



Rycina 24. Obraz sekwencji fragmentu genów chloroplastowych: *rpl36* i *infA* wszystkich analizowanych szczepów liczący 140 nukleotydów (pozycja od 98 do 238 zasady) uzyskany za pomocą programu BioEdit. Miejsca oznaczone za pomocą kropek przedstawiają identyczne nukleotydy z sekwencją pierwszą, natomiast postać literowa pozostaje w miejscach różniących się. Na kolor zielony zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Chlorella variabilis*, na kolor czerwony zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Chlorella vulgaris*, na kolor niebieski zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Chlorella sorokiniana*, na kolor żółty zaznaczono układ zasad charakterystyczny dla *Micractinium reisseri*.

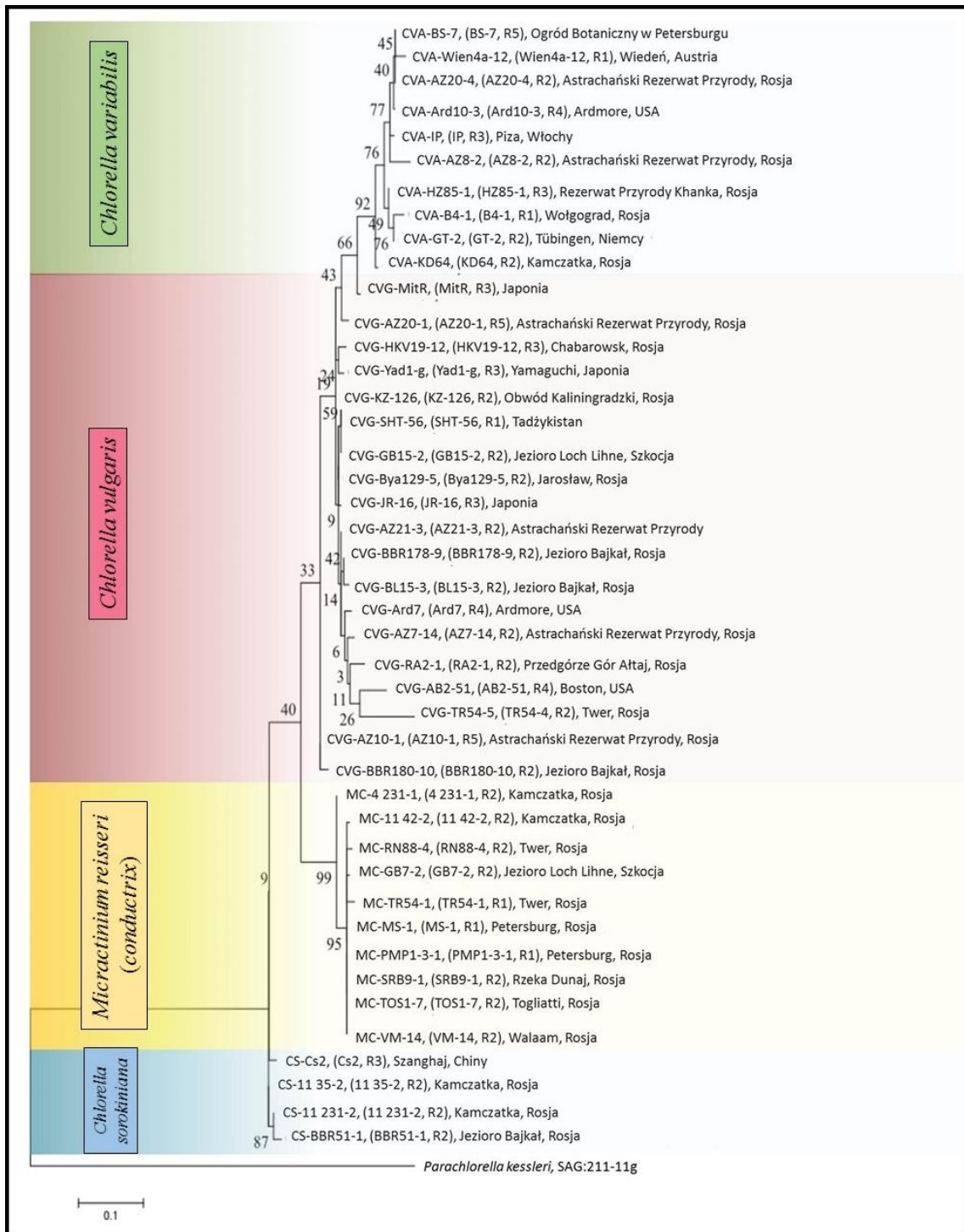
5.2.3.3. Analiza kladogramów wykonanych w programie Mega 5.1 na podstawie analizy sekwencji fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* oraz *infA*

Kladogram skonstruowano przy pomocy metody Łączenia Sąsiadów (NJ) z wykorzystaniem czterdziestu trzech szczepów symbiotycznych glonów *P. bursaria* oraz szczepu *Parachlorella kessleri* (SAG:211-11g) jako grupy zewnętrznej. Obserwuje się układanie szczepów w cztery kłady. Pierwszy kład oznaczony jako *C. vulgaris* składa się z dziewiętnastu szczepów glonów pochodzących ze szczepów *P. bursaria*: HKV19-12, AZ21-3, Ard7, AZ7-14, AZ10-1, BBR180-10, MitR, SHT-56, GB15-2, KZ-126, AB2-51, BBR178-9, BL15-3, JR-16, AZ20-1, Bya129-5, RA2-1, TR54-4 oraz Yad1-g. Drugi z kładów – *C. variabilis* grupuje dziesięć szczepów wyizolowanych z komórek *P. bursaria*: B4-1, HZ85-1, GT-2, KD64, Ard10-3, BS-7, AZ20-4, Wien4a-12, AZ8-2 i IP. Kolejny kład złożony jest z dziesięciu szczepów oznaczonych jako *Micractinium reisseri* pochodzących ze szczepów *P. bursaria*: 11 42-2, RN88-4, MS-1, 4 231-1, VM-14, PMP1-3-1, SRB9-1, TOS1-7, GB7-2 oraz TR54-1. Ostatni z kładów grupuje szczepy *C. sorokiniana* wyizolowane z komórek *P. bursaria*: 11 231-2, 11 35-2, BBR51-1 oraz Cs2 (Ryc. 25).



Rycina 25. Kladogram skonstruowany w programie Mega 5.1 metodą Łączenia Sąsiadów na podstawie analizy sekwencji fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* i *infA* czterdziestu trzech szczepów symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* oraz szczepu *Parachlorella kessleri* użytego jako grupy zewnętrznej.

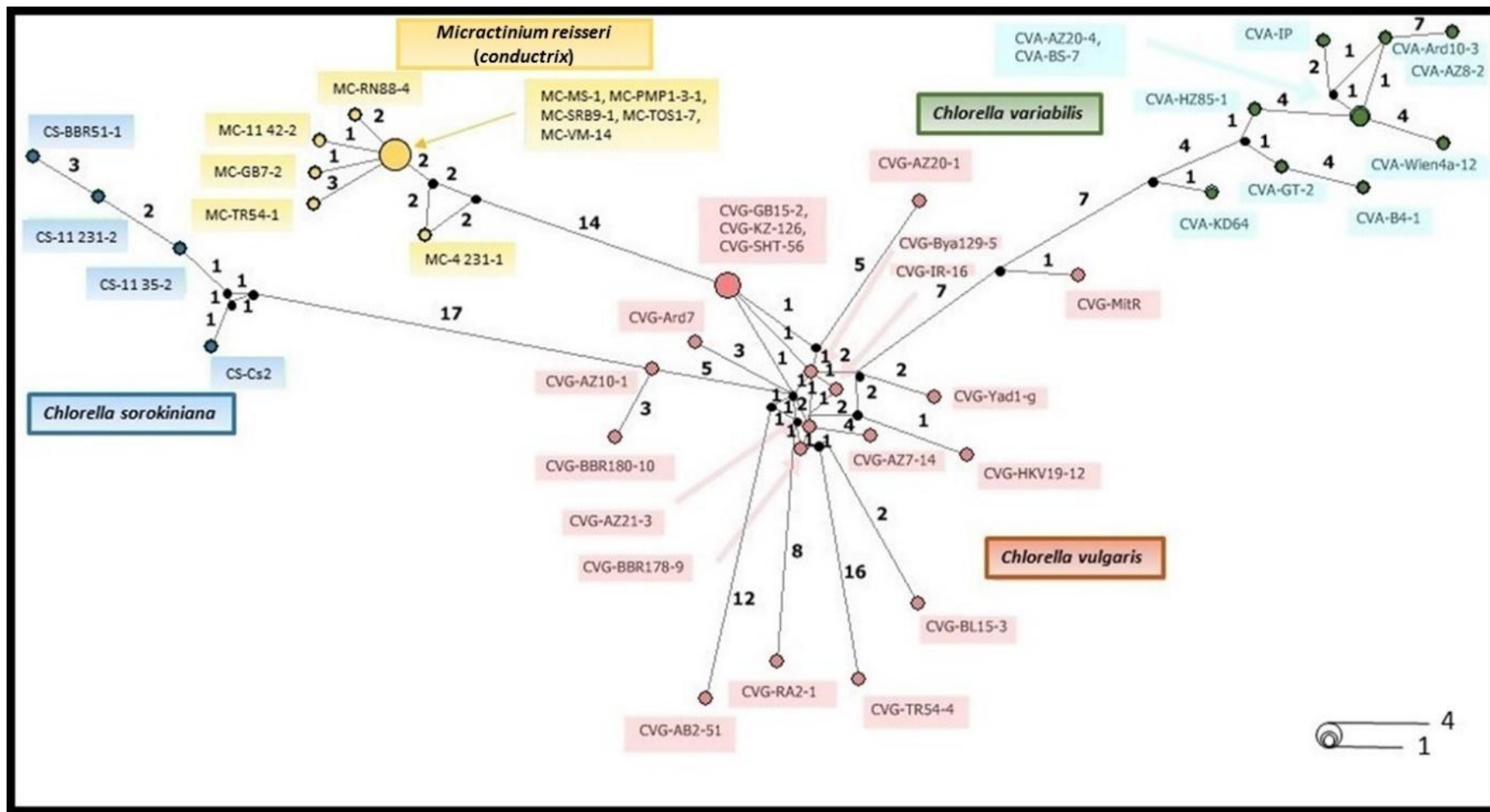
Kladogram skonstruowany z wykorzystaniem metody Największej Wiarygodności (ML) potwierdza grupowanie się szczepów w cztery klady. Analizując kladogramy utworzone na podstawie sekwencji fragmentów genów chloroplastowych można stwierdzić, iż wszystkie cztery klady są wyraźnie wyodrębnione i opatrzone wysokimi wartościami samopróbkowania (*M. reisseri* 99 % (NJ), 99 % (ML), *C. sorokiniana* 82 % (NJ), 87 % (ML), *C. variabilis* 72 % (NJ), 92 % (ML), *C. vulgaris* 42 % (ML)), co sugeruje, iż analizowany fragment DNA charakteryzuje się większą zmiennością niż odcinek genomu jądrowego (LSU rDNA) (Ryc. 26).



Rycina 26. Kladogram skonstruowany w programie Mega 5.1 metodą Największej Wiarygodności (model T92+G) na podstawie analizy sekwencji fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* i *infA* czterdziestu trzech szczepów symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* oraz szczepu *Parachlorella kessleri* użytego jako grupy zewnętrznej.

5.2.3.4. Analiza sieci haplotypów wykonana w programie Network 4.6.1.3 na podstawie analizy fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* oraz *infA*

Sieć haplotypów utworzono z wykorzystaniem metody *median joining algorithm*. Na podstawie analizy czterdziestu trzech sekwencji fragmentów genów chloroplastowych wykryto obecność trzydziestu sześciu haplotypów. Wyliczono także całkowitą liczbę mutacji  $\text{Eta}=112$  oraz liczbę miejsc polimorficznych  $S=80$ . Analiza zależności między haplotypami wykazała obecność czterech kładów. Pierwszy z nich – *C. sorokiniana* złożony jest z czterech unikalnych haplotypów odpowiadających pojedynczym szczepom. Kolejny kład – *M. reisseri* zawiera sześć haplotypów, z czego pięć reprezentuje pięć szczepów symbiotycznych glonów, natomiast piąty reprezentuje pięć szczepów *M. reisseri*. Kład *C. vulgaris* liczy siedemnaście haplotypów, z czego jeden z nich odpowiada trzem szczepom *C. vulgaris*, natomiast reszta reprezentuje pojedyncze szczepy. Ostatni z kładów – *C. variabilis* składa się z dziewięciu haplotypów: ośmiu reprezentujących pojedyncze szczepy i jednego złożonego z dwóch szczepów *C. variabilis*. Pomiędzy gatunkami: *C. vulgaris* i *C. variabilis* różnica wynosi od 18 do 43 nukleotydów. Różnice pomiędzy *C. vulgaris* i *C. sorokiniana* sięgają od 19 do 49 nukleotydów, natomiast *C. sorokiniana* i *M. reisseri* dzieli od 41 do 51 nukleotydów. Różnica pomiędzy *M. reisseri* i *C. variabilis* wynosi od 35 do 57 substytucji. Taki obraz zróżnicowania międzygatunkowego świadczy o wysokiej zmienności analizowanego odcinka DNA (Ryc. 27).



Rycina 27. Sieć haplotypów skonstruowana w programie Network 4.6.1.3 metodą *median joining algorithm* na podstawie analizy sekwencji fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* i *infA* czterdziestu trzech szczepów symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*. Rozmiar kółek jest proporcjonalny do frekwencji haplotypów.



### 5.3. Analiza związku pomiędzy pochodzeniem geograficznym szczepów *Paramecium bursaria* a gatunkami endosymbiotycznych glonów

Zasięg występowania endosymbiotycznych glonów *P. bursaria* należących do gatunku *C. vulgaris* jest bardzo szeroki. Glony wyizolowano ze szczepów *P. bursaria* pochodzących z USA (dwa szczepy), Europy Północnej (jeden szczep), Europy Środkowo-Wschodniej (siedem szczepów), Azji Środkowej (dwa szczepy), Azji Północnej (cztery szczepy) oraz Azji Wschodniej (trzy szczepy). Podobnym zasięgiem charakteryzuje się występowanie glonów *P. bursaria* należących do gatunku *C. variabilis*. Analizowane glony wyizolowano ze szczepów *P. bursaria* pochodzących z USA (jeden szczep), Europy Zachodniej (dwa szczepy), Europy Południowej (jeden szczep) Europy Środkowo-Wschodniej (cztery szczepy) oraz z Azji Północnej (dwa szczepy). Zasięg występowania glonów z gatunku *C. sorokiniana* ograniczony jest do Azji Północnej (trzy szczepy) oraz Wschodniej (jeden szczep). Zasięg występowania *M. reisseri* jest dysjunktywny. Glony wyizolowano ze szczepów *P. bursaria* pochodzących z Europy Północnej (jeden szczep), Europy Południowej (jeden szczep), Europy Środkowo-Wschodniej (sześć szczepów) oraz z Azji Północnej (dwa szczepy) (Tab. 10, Ryc. 29).

### 5.4. Analiza związku pomiędzy syngeniem *Paramecium bursaria* a gatunkami endosymbiotycznych glonów

Analizowane szczepy endosymbiotycznych glonów zostały wyizolowane ze szczepów *P. bursaria* należących do pięciu syngeniów. Spośród dziesięciu szczepów *C. variabilis*, dwa z nich zostały wyizolowane ze szczepów *P. bursaria* należących do syngenu R1, cztery z nich do syngenu R2, dwa z nich do syngenu R3 oraz po jednym z nich do R4 i R5. Analizowano siedemnaście szczepów *C. vulgaris*, z czego jeden został wyizolowany z komórek *P. bursaria* należących do syngenu R1, dziesięć z komórek syngenu R2, cztery z komórek syngenu R3 i po jednym z komórek syngenu R4 i R5. Analizowane szczepy *C. sorokiniana* reprezentowały komórki *P. bursaria* syngenu R2 (trzy szczepy) i R3 (jeden szczep). Szczepy *M. reisseri* zostały wyizolowane z komórek *P. bursaria* należących do syngenu R1 (trzy szczepy) i R2 (siedem szczepów) (Tab. 10).

Tabela 10. Zestawienie szczepów gatunków endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* zidentyfikowanych w ramach pracy doktorskiej.

Nr	Gatunek endosymbionta/glonu	Nazwa szczepu endosymbionta/glonu	Nazwa szczepu <i>Paramecium bursaria</i>	Syngen <i>Paramecium bursaria</i>	Pochodzenie geograficzne szczepu <i>Paramecium bursaria</i>	Nr akcesyjny GenBank			Piśmiennictwo
						LSU rDNA	3' <i>rpl36</i> -5' <i>infA</i>	ITS1-5.8S-ITS2	
1.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-SHT-56	SHT-56	R1	Tadżykistan	KX639563	KX639603	KX639535	Badania w ramach pracy doktorskiej
2.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-TR54-4	TR54-4	R2	Twer, Rosja	KX639564	KX639604	KX639536	Badania w ramach pracy doktorskiej
3.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-RA2-1	RA2-1	R2	Przedgórze Gór Altaj, Rosja	KX639562	KX639602	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
4.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-MitR	MitR	R3	Japonia	KX639561	KX639601	KX639534	Badania w ramach pracy doktorskiej
5.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-JR-16	JR-16	R3	Japonia	KX639560	KX639600	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
6.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-HKV19-12	HKV19-12	R3	Chabarowsk, Rosja	KM203671	KM203663	bd	(Zagata i in. 2016)
7.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-Bya129-5	Bya129-5	R2	Jarosław, Rosja	KX639559	KX639598	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
8.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-BBR180-10	BBR180-10	R2	Jezioro Bajkał, Rosja	KX639557	KX639596	KX639531	Badania w ramach pracy doktorskiej
9.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-BBR178-9	BBR178-9	R2	Jezioro Bajkał, Rosja	KX639556	KX639595	KX639530	Badania w ramach pracy doktorskiej
10.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-AZ21-3	AZ21-3	R2	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja	KX639555	KX639594	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
11.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-AZ20-1	AZ20-1	R5	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja	KX639554	KX639593	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej

12.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-AZ10-1	AZ10-1	R5	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja	KM203670	KM203662	KX639528	(Zagata i in. 2016), badania w ramach pracy doktorskiej (ITS1-5.8S-ITS2)
13.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-Yad1-g	Yad1-g	R3	Yamaguchi, Japonia	KX639565	KX639605	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
14.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-Ard7	Ard7	R4	Ardmore, USA	KX639552	KX639591	KX639526	Badania w ramach pracy doktorskiej
15.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-AZ7-14	AZ7-14	R2	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja	KX639553	KX639592	KX639527	Badania w ramach pracy doktorskiej
16.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-AB2-51	AB2-51	R4	Boston, USA	KM203673	KM203661	bd	(Zagata i in. 2016)
17.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-GB15-2	GB15-2	R2	Jezioro Loch Linnhe, Szkocja	KX639551	KX639599	KX639525	Badania w ramach pracy doktorskiej
18.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-KZ-126	KZ-126	R2	Kaliningrad, Rosja	KM203672	KM203660	KX639533	(Zagata i in. 2016), badania w ramach pracy doktorskiej (ITS1-5.8S-ITS2)
19.	<i>Chlorella vulgaris</i>	CVG-BL15-3	BL15-3	R2	Jezioro Bajkał, Rosja	KX639558	KX639597	KX639532	Badania w ramach pracy doktorskiej
20.	<i>Chlorella variabilis</i>	CVA-AZ8-2	AZ8-2	R2	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja	KX639544	KX639584	KX639520	Badania w ramach pracy doktorskiej
21.	<i>Chlorella variabilis</i>	CVA-IP	IP	R3	Piza, Włochy	KX639549	KX639589	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
22.	<i>Chlorella variabilis</i>	CVA-Ard10-3	Ard10-3	R4	Ardmore, USA	KM203667	KM203658	bd	(Zagata i in. 2016)
23.	<i>Chlorella variabilis</i>	CVA-AZ20-4	AZ20-4	R2	Astrachański Rezerwat Przyrody, Rosja	KX639545	KX639585	KX639521	Badania w ramach pracy doktorskiej
24.	<i>Chlorella variabilis</i>	CVA-Wien4a-12	Wien4a-12	R1	Wiedeń, Austria	KX639550	KX639590	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej

25.	<i>Chlorella variabilis</i>	CVA-BS-7	BS-7	R5	Ogród Botaniczny w Petersburgu, Rosja	KM203669	KM203659	KX639522	(Zagata i in. 2016), badania w ramach pracy doktorskiej (ITS1-5.8S-ITS2)
26.	<i>Chlorella variabilis</i>	CVA-KD64	KD64	R2	Kamczatka, Rosja	KM203668	KM203657	bd	(Zagata i in. 2016)
27.	<i>Chlorella variabilis</i>	CVA-HZ85-1	HZ85-1	R3	Rezerwat Przyrody Khanka, Rosja	KX639548	KX639587	KX639524	Badania w ramach pracy doktorskiej
28.	<i>Chlorella variabilis</i>	CVA-B4-1	B4-1	R1	Wołgograd, Rosja	KX639546	KX639586	KX639529	Badania w ramach pracy doktorskiej
29.	<i>Chlorella variabilis</i>	CVA-GT-2	GT-2	R2	Tübingen, Niemcy	KX639547	KX639587	KX639523	Badania w ramach pracy doktorskiej
30.	<i>Chlorella sorokiniana</i>	CS-BBR51-1	BBR51-1	R2	Jezioro Bajkał, Rosja	KX639542	KX639582	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
31.	<i>Chlorella sorokiniana</i>	CS-Cs2	Cs2	R3	Szanghaj, Chiny	KX639543	KX639583	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
32.	<i>Chlorella sorokiniana</i>	CS-11 231-2	11 231-2	R2	Kamczatka, Rosja	KX639540	KX639580	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
33.	<i>Chlorella sorokiniana</i>	CS-11 35-2	11 35-2	R2	Kamczatka, Rosja	KX639541	KX639581	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
34.	<i>Micractinium reisseri</i>	MC-11 42-2	11 42-2	R2	Kamczatka, Rosja	KX639567	KX639574	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
35.	<i>Micractinium reisseri</i>	MC-RN88-4	RN88-4	R2	Twer, Rosja	KX639570	KX639577	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
36.	<i>Micractinium reisseri</i>	MC-4 231-1	4 231-1	R2	Kamczatka, Rosja	KX639566	KX639573	KX639537	Badania w ramach pracy doktorskiej
37.	<i>Micractinium reisseri</i>	MC-MS-1	MS-1	R1	Petersburg, Rosja	KM203675	KM203666	KX639538	(Zagata i in. 2016), badania w ramach pracy

									doktorskiej (ITS1-5.8S-ITS2)
38.	<i>Micractinium reisseri</i>	MC-GB7-2	GB7-2	R2	Jeziro Loch Linnhe, Szkocja	KX639568	KX639575	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
39.	<i>Micractinium reisseri</i>	MC-VM-14	VM-14	R2	Walaam, Rosja	KM203674	KM203664	bd	(Zagata i in. 2016)
40.	<i>Micractinium reisseri</i>	MC-PMP1-3-1	PMP1-3-1	R1	Petersburg, Rosja	KX639569	KX639576	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
41.	<i>Micractinium reisseri</i>	MC-TR54-1	TR54-1	R1	Twer, Rosja	KX639572	KX639579	bd	Badania w ramach pracy doktorskiej
42.	<i>Micractinium reisseri</i>	MC-SRB9-1	SRB9-1	R2	Rzeka Dunaj, Serbia	KX639571	KX639578	KX639539	Badania w ramach pracy doktorskiej
43.	<i>Micractinium reisseri</i>	MC-TOS1-7	TOS1-7	R2	Togliatti, Rosja	KM203676	KM203665	bd	(Zagata i in. 2016)

## 6. Dyskusja

### 6.1. Identyfikacja endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria*

Próby identyfikacji endosymbiotycznych glonów należących do rodzaju *Chlorella* prowadzone były w oparciu o cechy morfologiczne (Reisser 1984; Reisser i in. 1988b; Waddle i in. 1990) oraz fizjologiczne (Reisser 1984; Douglas i Huss 1986; Kessler i Huss 1990). Analizowano również skład chemiczny ściany komórkowej (Takeda 1995), izoenzymy, wrażliwość na wirusy (Linz i in. 1999), czy też stosunek zawartości guaniny i cytozyny w DNA (Kvitko i in. 2001). Charakterystyczną cechą endosymbiotycznych glonów jest wydzielanie maltozy do komórki gospodarza (Brown i Nielsen 1974), zapotrzebowanie na tiaminę (B<sub>1</sub>) oraz inne witaminy, a także zredukowany azot (Douglas i Huss 1986; Kessler i Huss 1990). Aktywność hydrogenazy nie została potwierdzona u endosymbiotycznych glonów *C. variabilis* (NC64A) i *M. reisseri* (Pbi) przez Reisser i in. (1988b), ale wykryto ją podczas eksperymentów prowadzonych przez Douglas i Huss (1986). Endosymbiotyczne glony *C. variabilis* szczepów SAG 211-6 oraz UTEX-130 pochodzą z jednego izolatu, natomiast różnią się zapotrzebowaniem na tiaminę, wykorzystywaniem azotanów, preferencjami dotyczącymi pH środowiska oraz zawartością guaniny i cytozyny (Douglas i Huss 1986; Kessler i Huss 1990). Różnice w wynikach eksperymentów prowadzonych na tym samym materiale mogą wynikać z odmiennych warunków prowadzenia hodowli lub różnych technik wykorzystywanych w badaniach. Według Albers i in. (1982), parametry fizjologiczne mogą zmieniać się podczas długiego czasu prowadzenia hodowli. Endosymbiotyczne glony *C. variabilis* (szczep F36-ZK) zostały wyizolowane z komórek *P. bursaria* pochodzącego z Japonii w 2002 r. Stwierdzono, iż sekwencje rDNA szczepu F36-ZK są identyczne z sekwencjami szczepu NC64A należącego do *C. variabilis*, który został wyizolowany ponad trzydzieści lat wcześniej. U szczepu NC64A stwierdzono niski stosunek wydzielanych produktów fotosyntezy w porównaniu do ogólnej ilości produkowanych związków (4.17 % całości) przy pH 4.8, natomiast szczep F36-ZK wydzieliał prawie połowę całej zawartości produktów fotosyntezy przy pH równym 5 (Kamako i Immura 2006), co także świadczy o zmienności parametrów podczas wydłużonego czasu hodowli. Analizy parametrów fizjologicznych wymagają bardzo starannych interpretacji prowadzonych w niedużych odstępach czasu oraz odpowiedniego doboru badanych cech. Wiele szczepów należących do tego samego ekotypu wykazuje identyczne parametry morfologiczne

i biochemiczne (Kessler i in. 1991). Fott i Nováková (1969) sugerują, iż pomimo tego, że cechy morfologiczne i biochemiczne są używane do identyfikacji endosymbiotycznych glonów, to rozmiar i kształt komórki są bardzo zmienne i zależą od wieku hodowli, odżywienia bądź czynników środowiskowych. Identyfikacja endosymbiontów *P. bursaria* na podstawie cech fizjologicznych i biochemicznych jest zatem bardzo trudna. Pod względem morfologicznym, szczepy symbiontów należące zarówno do grupy Amerykańskiej, jak i Europejskiej wykazują podobieństwo do *C. vulgaris* (Reisser i in. 1988b). Przedstawiciele rodzaju *Chlorella* charakteryzują się kulistym kształtem komórki, która nie wytwarza śluzu i wyrostków, takich jak kolce czy szczeciny. Są to zazwyczaj formy wolnożyjące (Andreyeva 1975). Gatunki należące do rodzaju *Micractinium* charakteryzuje również kulisty kształt komórek, lecz w tym przypadku są one w większości zorganizowane w kolonie. Ściana komórkowa zaopatrzona jest w szczeciny zbudowane z białek, niezawierających włókien celulozowych. (Schnepf i in. 1980). W przypadku obu taksonów, zarówno struktura ściany komórkowej, jak i budowa pirenoidów jest bardzo podobna (Krientz i in. 2004). *Micractinium* wykazuje olbrzymie podobieństwo do *Chlorella* w gęstych hodowlach, gdzie także funkcjonuje jako pojedyncza komórka pozbawiona szczecin. Luo i in. (2006) wykazali na podstawie eksperymentu w obecności *Brachionus*, iż *Micractinium* wytwarza w takiej sytuacji szczeciny oraz organizuje się w kolonie, natomiast *Chlorella* zawsze pozostaje w niezmienionej formie bez wyrostków jako pojedyncza komórka. Ponadto udowodnili, iż *Micractinium* hodowany na podłożu agarowym lub w gęstej zawieszynie traci szczeciny. Zarówno *C. vulgaris*, jak i *C. variabilis* tworzą pojedynczo występujące kuliste komórki o rozmiarach 2.3-5.8 x 2.5-6.6  $\mu\text{m}$  i cienkiej ścianie komórkowej. Są to komórki niewytwarzające śluzu z pojedynczymi kubkowatymi chloroplastami i elipsoidalnymi pirenoidami pokrytymi ziarnami skrobi (Shihira i Krauss 1965). *M. reisseri* tworzy również kuliste komórki o średnicy 3.7-8  $\mu\text{m}$  o cienkiej ścianie komórkowej. Struktura chloroplastów oraz pirenoidów jest taka sama, jak u *C. variabilis* (Hoshina i in. 2010). *C. sorokiniana* jest bardzo podobna pod względem cech morfologicznych do *C. vulgaris*. Jediną cechą różnicującą te dwa gatunki jest zdolność rozwoju *C. sorokiniana* w temperaturze powyżej 36 °C (Huss 1999). Dlatego bardzo trudne jest odróżnienie tych dwóch taksonów, a koncepcja podobieństwa morfologicznego jest zawodna ze względu na wysoką plastyczność fenotypową.

W niniejszej pracy przedstawiono mikrofotografie wszystkich zidentyfikowanych gatunków symbiotycznych glonów *P. bursaria*. Identyfikacja organizmów oparta była jednak głównie na analizach odcinków DNA, gdyż identyfikacja na podstawie różnic morfologicznych przy użyciu mikroskopu świetlnego była bardzo trudna. Obserwowane organizmy charakteryzują się kulistym kształtem komórki o średnicy od 5 do 10  $\mu\text{m}$ . Widoczne są także kubkowate chloroplasty oraz brak szczecin u *M. reisseri*. Nie udało się zaobserwować struktur pirenoidu. (Ryc. 6, Ryc. 7, Ryc. 8, Ryc. 9).

Podczas identyfikacji endosymbiotycznych glonów wykorzystano badania molekularne z użyciem odcinka 18S rDNA (Huss i Sogin 1990; Huss 1999). W oparciu o te analizy symbiotyczne glony, które morfologicznie były zupełnie różne, włączono do jednej grupy z rodzaju *Chlorella* (Ustinova i in. 2001). Dzięki badaniom molekularnym określono kilka cech charakterystycznych dla układu symbiotycznego *P. bursaria* – glony. Po pierwsze, komórka *P. bursaria* prawie zawsze zawiera endosymbionty należące do jednego klonu. Endosymbionty należą albo do grupy Amerykańskiej, albo Europejskiej i co więcej należą do kladu *Chlorella* (Krientz i in. 2004). Glony należące do tych dwóch grup różnią się genetycznie pod względem ilości intronów grupy I w odcinku małej podjednostki rybosomalnej (SSU rDNA). Grupy te różnią się sekwencjami egzonów w obrębie SSU rDNA o zaledwie kilka nukleotydów, natomiast odcinki ITS wykazują różnice sięgające 20 %. Przodek *P. bursaria* mógł wejść w związek symbiotyczny z glonami obydwu grup niezależnie (Hoshina i in. 2004; Gapanova i in. 2007; Hoshina i Imamura 2008; Luo i in. 2010).

## 6.2. Analiza pochodzenia geograficznego szczepów *Paramecium bursaria* i gatunków endosymbiotycznych glonów

Na podstawie analizy fragmentów: 18S rDNA oraz ITS2 prawie wszystkie endosymbiotyczne glony *P. bursaria* podzielono na dwie grupy: Amerykańską i Europejską (Hoshina i in. 2004; Hoshina i in. 2005). Stwierdzono, iż glony należące do obydwu grup wykazują inne cechy fizjologiczne i biochemiczne obejmujące między innymi: formowanie karotenoidów wtórnych czy wykorzystywanie nieorganicznego azotu. Późniejsze badania (Gapanova i in. 2007) potwierdziły podział endosymbiotycznych glonów na dwie grupy: Amerykańską i Europejską. Ponadto glony symbiotyczne porównano z glonami wolnożyjącymi i wykazano, że te pierwsze



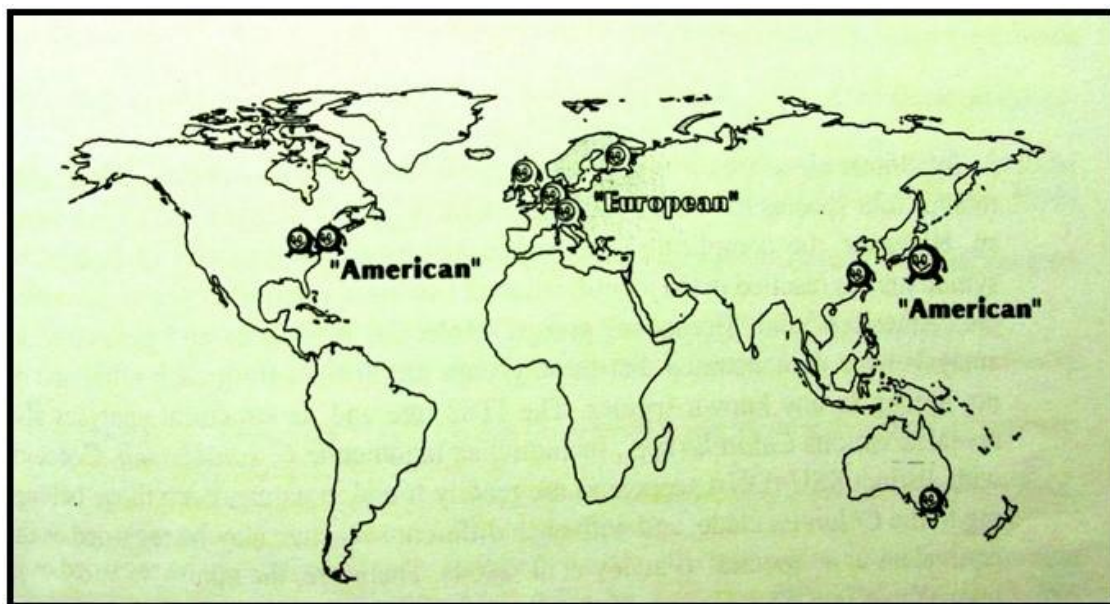
posiadają intron w początkowym fragmencie genu 18S rRNA. Endosymbionty grupy Amerykańskiej charakteryzują się obecnością dodatkowego intronu w środkowym fragmencie genu 18S rRNA w porównaniu do grupy Europejskiej i glonów wolnożyjących. Analiza liczby intronów w odcinku 18S rRNA może zatem posłużyć jako narzędzie do rozróżniania obydwu grup glonów symbiotycznych, jak również glonów symbiotycznych od glonów wolnożyjących. Na podstawie analizy drzewa filogenetycznego utworzonego z wykorzystaniem genu 18S rRNA wywnioskowano, iż endosymbiotyczne glony należące do obydwu grup są blisko spokrewnione z trzema gatunkami rodzaju *Chlorella*: *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* i *C. lobophora*. Podczas gdy glony grupy Amerykańskiej grupowały się w jednym kładzie razem z *C. lobophora* (wartości samopróbkowania 63 %), szczepy Europejskie wykazywały bliższe pokrewieństwo do *C. vulgaris* i *C. sorokiniana* (wartości samopróbkowania 51 %) (Gapanova i in. 2007).

Hoshina i Imamura (2009a) opisali zasięg geograficzny obu grup. Grupa Europejska zajmuje zachodnie tereny Europy, Europę Środkową oraz Obwód Kaliningradzki (Ryc. 28). Na podstawie analizy cech morfologicznych Reisser (1975), jak również Reisser i in. (1988b) stwierdzili, że szczepy należące do grupy Amerykańskiej i niektóre szczepy należące do grupy Europejskiej można oznaczyć jako *C. vulgaris*. Pröschold i in. (2011) wykazali, iż szczepy symbiotycznych glonów zebrane z terenów Europejskich należą do gatunków: *C. vulgaris* i *M. reisseri*. Hoshina i in. (2010) opisali rozmieszczenie *M. reisseri* na terenach Anglii, Niemiec, Austrii, północnej Europy oraz regionu Karelii w Rosji, co jest także analogiczne do rozmieszczenia szczepów należących do grupy Europejskiej. Ponadto stwierdzili, że szczepy europejskie należą do rodzaju *Micractinium*, co jest także zgodne z wynikami otrzymanymi przez Luo i in. (2006; 2010). Hoshina i Imamura (2008) przypisali szczep zebrany na terenie Anglii do gatunku *C. vulgaris*. W niniejszej pracy glony wyizolowane z komórek *P. bursaria*: GB7-2 i GB15-2 pochodzących ze Szkocji (jezioro Loch Linnhe) zostały przypisane odpowiednio do *M. reisseri* (wartości samopróbkowania dla LSU rDNA: NJ/ML: 80/84 % i dla genów: *rpl36* i *inA*: NJ/ML: 99/99 %) oraz *C. vulgaris* (wartości samopróbkowania dla ITS1-5.8S rDNA-ITS2: NJ/ML: 91/60 %) (Tab. 10, Ryc. 13, 14, 19, 20, 25, 26, 29). Szczepy *Chlorella* sp. analizowane przez Summerer i in. (2008) pochodzące z terenów Europy zostały przypisane do ekotypu europejskiego. Na podstawie analizy fragmentów

rybosomalnego DNA glony zebrane na terenie Obwodu Kaliningradzkiego zostały oznaczone jako *C. vulgaris* (Hoshina i Imamura 2009a). W niniejszej pracy glony wyizolowane ze szczepu *P. bursaria*: KZ-126 zebranego na terenie Obwodu Kaliningradzkiego zostały także przypisane do gatunku *C. vulgaris* (wartości samopróbkowania dla ITS1-5.8S rDNA-ITS2: NJ/ML: 91/60 %) (Tab. 10, Ryc. 19, 20, 29). Hoshina i Imamura (2009b) opisali szczep SW1-ZK pochodzący z Niemiec jako *Micractinium* sp. W niniejszej pracy glony wyizolowane ze szczepu *P. bursaria*: GT-2 zebranego w Niemczech zostały przypisane do *C. variabilis*, którego zasięg występowania według literatury nie obejmuje obszaru Niemiec (wartości samopróbkowania dla genów: *rpl36* i *infA*: NJ/ML: 72/92 % i dla ITS1-5.8S rDNA-ITS2: NJ/ML: 99/98 %) (Tab. 10, Ryc. 19, 20, 25, 26, 29). Endosymbiotyczne glony *P. bursaria* należące do grupy Amerykańskiej i Europejskiej określane są często jako *C. vulgaris* i/lub do *C. sorokiniana* (Douglas i Huss 1986). Hoshina i Imamura (2008) analizowali dwa szczepy pochodzące z Wielkiej Brytanii i USA, które zostały opisane na podstawie obecności intronów jako *C. sorokiniana*. Wynik otrzymany na podstawie analizy odcinka ITS2 wskazywał na bardzo małe podobieństwo do *C. vulgaris* (różnica 64 nukleotydów na 260) lub *C. sorokiniana* (65 nukleotydów na 265).

Hoshina i Imamura (2009a) dla grupy Amerykańskiej podają charakterystyczne geograficzne rozmieszczenie: tereny USA, Japonii, Chin oraz południowej Australii (Ryc. 28). Według Pröschold i in. (2011), szczepy symbiotycznych glonów należące do grupy Amerykańskiej mogą być oznaczone jako *C. variabilis* lub *C. vulgaris*. W niniejszej pracy szczepy wyizolowane z komórek *P. bursaria* (Ard7, Ard10-3) pochodzących z Ardmore w USA zostały przypisane odpowiednio do *C. vulgaris* (wartości samopróbkowania dla genów: *rpl36* i *infA*: ML: 59 % i dla ITS1-5.8S rDNA-ITS2: NJ/ML: 91/60 %) i *C. variabilis* (wartości samopróbkowania dla LSU rDNA: NJ: 58 % i dla genów: *rpl36* i *infA*: NJ/ML: 72/92 %). Ponadto kolejny szczep pochodzący z USA (Boston, AB2-51) został oznaczony jako *C. vulgaris* (Tab. 10, Ryc. 13, 14, 19, 20, 25, 26, 29). Hoshina i Imamura (2009a) analizowane szczepy zebrane na terenie USA (Nowy Jork, Ohio), Japonii (Aichi, Nagano, Shimane, Ibaraki, Hiroshima, Oita), Chin (Szanghaj) oraz Australii (Melbourne) przypisali do grupy Amerykańskiej. Ponadto szczepy z Japonii oznaczono jako *C. vulgaris*. Hoshina i in. (2004) analizowali sześć szczepów *P. bursaria* pochodzących z Japonii. Wyizolowane glony charakteryzowały się wysokim podobieństwem odcinka 18S rDNA w stosunku

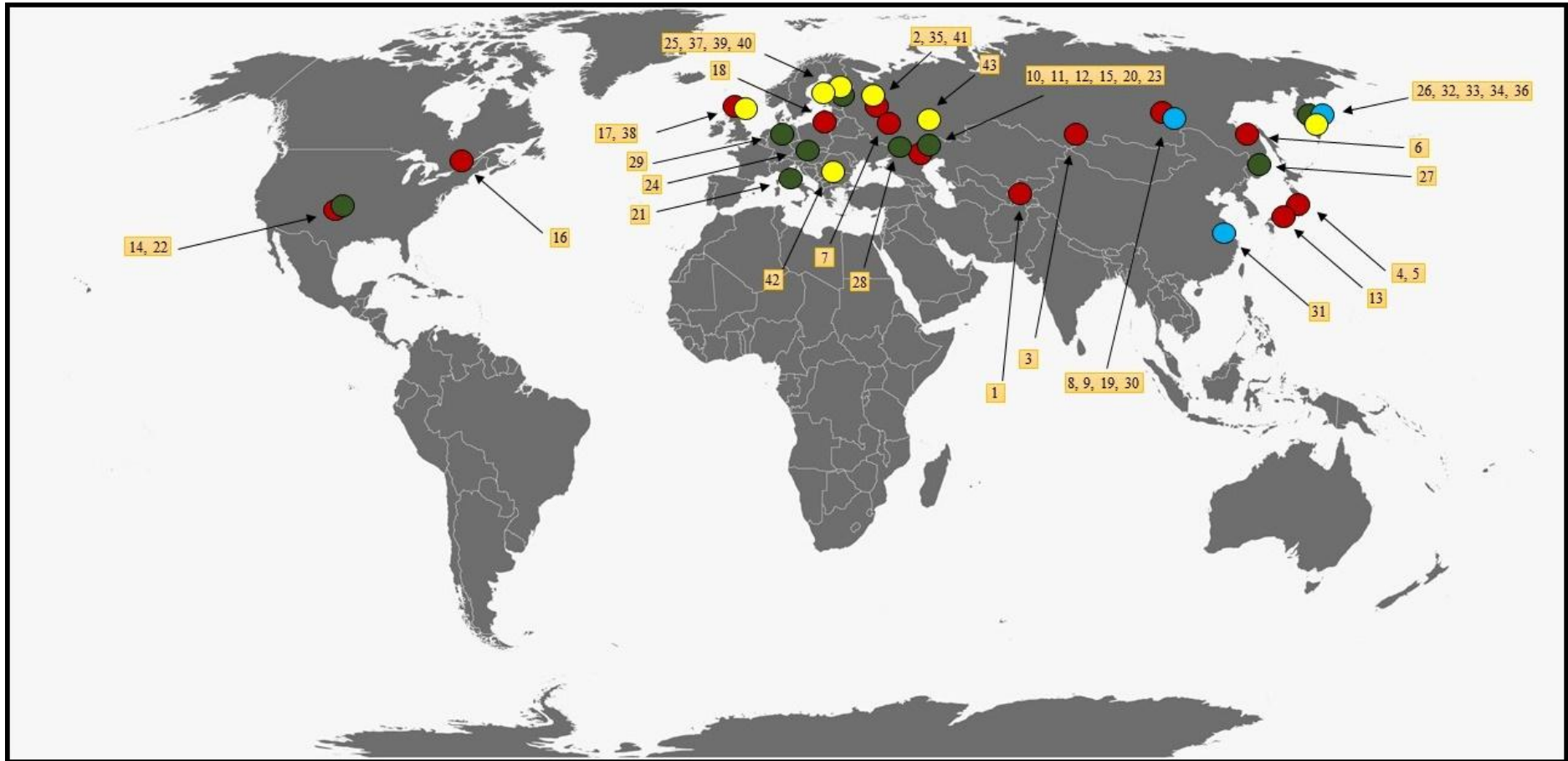
do czterech gatunków z rodzaju *Chlorella*: *C. vulgaris*, *C. lobophora*, *C. sorokiniana* i *C. kessleri*. Nakahara i in. (2004) na podstawie analizy cech morfologicznych oraz podobieństwa sekwencji odcinka 18S rDNA sklasyfikowali symbionty pochodzące z Japonii jako *C. vulgaris*. Natomiast na podstawie analizy odcinka ITS2 Hoshina i in. (2005) stwierdzili niewielkie pokrewieństwo szczepu pochodzącego z Japonii z *C. vulgaris*. Szczep ten oznaczono jako identyczny ze szczepem *C. variabilis* – NC64A, będącym wzorcowym szczepem Amerykańskiej grupy. Kodama i in. (2007) oraz Kodama i Fujishima (2008) wykazali, iż szczepy pochodzące z Japonii reprezentują *C. vulgaris*. Hoshina i Fujiwara (2013) na podstawie analizy odcinka SSU rDNA wykazali wysokie pokrewieństwo szczepu pochodzącego z Japonii, opisanego wcześniej jako *C. vulgaris* (Yamamoto i in. 2003) z glonami należącymi do *C. sorokiniana*. Analizowane w niniejszej pracy sekwencje glonów pochodzących z Japonii (wyizolowane ze szczepów *P. bursaria*: JR-16, MitR, Yad1-g, wartości samopróbkowania dla ITS1-5.8S rDNA-ITS2: NJ/ML: 91/60 %) przypisano do *C. vulgaris*, natomiast glony pochodzące z Chin do *C. sorokiniana* (wartości samopróbkowania dla LSU rDNA: NJ: 100 % i dla genów: *rpl36* i *inA*: NJ:87 %) (Tab. 10, Ryc. 13, 14, 19, 20, 25, 26, 29). Na podstawie analizy budowy ściany komórkowej Takeda (1995) stwierdził, iż szczepy pochodzące z Japonii i Chin są różne od tych należących do grupy Amerykańskiej i sklasyfikowali je jako *C. kessleri*. Hoshina i in. (2004) na podstawie analizy odcinka 18S rDNA wykazali wyższe pokrewieństwo tych szczepów do *C. vulgaris*, *C. lobophora* lub *C. sorokiniana*.



Rycina 28. Rozmieszczenie symbiotycznych glonów *Paramaecium bursaria* należących do dwóch grup: Europejskiej i Amerykańskiej (Hoshina i Imamura 2009a).

W niniejszej pracy analizowano czterdzieści trzy szczepy endosymbiotycznych glonów pochodzących z komórek *P. bursaria* zebranych w odległych stanowiskach geograficznych (Tab. 10, Ryc. 29). Zebrano je także z miejsc, które nie były wcześniej badane i przez to nie zostały uwzględnione przez autorów jako te, należące do grupy Amerykańskiej czy Europejskiej. Endosymbiotyczne glony wyizolowane ze szczepów *P. bursaria* pochodzących z Włoch zostały zidentyfikowane jako *C. variabilis*, choć ten obszar wskazywałby bardziej na obecność glonów charakterystycznych dla grupy Europejskiej (*C. vulgaris* lub *M. reisseri*). Endosymbionty wyizolowane ze szczepów *P. bursaria* pochodzących z Petersburga oraz Wałaaumu sklasyfikowano jako *C. variabilis* i *M. reisseri*. Na południu Europy zebrano glony z terenów Serbii i przypisano je także do *M. reisseri*. Ze stanowiska w Twerze na zachodzie Rosji zebrano trzy szczepy *P. bursaria*, z których wyizolowano endosymbionty i zidentyfikowano je jako *M. reisseri* i *C. vulgaris*. Z obszarów Jarosławia, Wołgogradu oraz Togliatti w Rosji zebrano szczepy *P. bursaria*, z których wyizolowano glony należące do trzech gatunków: *C. vulgaris*, *C. variabilis* oraz *M. reisseri*. Ze stanowiska w Astrachańskim Rezerwacie Przyrody w Rosji pozyskano sześć szczepów *P. bursaria*, z których wyizolowane glony reprezentowały *C. variabilis* i *C. vulgaris*. Przesuwając się dalej na wschód, kolejnymi stanowiskami był Tadżykistan i Góry Altaj. Endosymbionty szczepów *P. bursaria* zebranych z tych obszarów reprezentują *C. vulgaris*. Z jeziora Bajkał pozyskano szczepy *P. bursaria*, których endosymbionty

reprezentowały dwa gatunki: *C. sorokiniana* oraz *C. vulgaris*. Terenami należącymi do Azji Północnej położonymi najdalej na wschód, z których zebrano szczepy *P. bursaria* były: Chabarowsk, Khanka i Kamczatka. Pierwsze dwa reprezentowane są przez endosymbionty należące do *C. variabilis* oraz *C. vulgaris*. Natomiast na terenie Kamczatki pozyskano szczepy *P. bursaria*, z których wyizolowano glony należące do *C. sorokiniana*, *M. reisseri* oraz *C. vulgaris* (Tab. 10, Ryc. 29).



Rycina 29. Rozmieszczenie szczepów symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* analizowanych w ramach pracy doktorskiej. Kolorem czerwonym oznaczono szczepy należące do *Chlorella vulgaris*, kolorem zielonym oznaczono szczepy należące do *Chlorella vaiabilis*, kolorem żółtym oznaczono szczepy należące do *Micractinium reisseri*, kolorem niebieskim oznaczono szczepy należące do *Chlorella sorokiniana*. Numery szczepów zgodne z danymi zawartymi w tabeli 10.

W niniejszej pracy endosymbiotyczne glony wyizolowane ze szczepów *P. bursaria* reprezentują cztery gatunki: *C. vulgaris*, *C. variabilis*, *C. sorokiniana* i *M. reisseri*. Z piśmiennictwa wynika, że na terenach charakterystycznych dla grupy Europejskiej występują symbionty należące do *C. vulgaris* i *M. reisseri* (Pröschold i in. 2011). W ramach niniejszych badań na terenach Europy również stwierdzono obecność tych dwóch gatunków. Ponadto na terenie Austrii zebrano szczepy *P. bursaria*, których endosymbionty zostały zidentyfikowane jako *C. variabilis*. Obecność *C. variabilis* potwierdzono także na terenie Włoch. Zasięg *C. variabilis* jest charakterystyczny dla terenów zaliczanych do grupy Amerykańskiej (USA, Chiny, Japonia), natomiast obszar Austrii i Włoch zgodnie z danymi literaturowymi jest charakterystyczny dla endosymbiontów grupy Europejskiej (*C. vulgaris*, *M. reisseri*). Na terenach Europy Środkowo-Wschodniej i Azji Północnej, które nie były wcześniej badane potwierdzono obecność wszystkich czterech gatunków. W jeziorze Bajkał odnotowano występowanie *C. sorokiniana*, która była wcześniej potwierdzana w Japonii (Yamamoto i in. 2003). Zaskakującym faktem jest występowanie *M. reisseri* poza obszarem Europy. Analizowane w pracy szczepy *M. reisseri* zebrane były także na terenie Kamczatki (Tab. 11, Ryc. 29). Na podstawie powyższych rozważań można wysunąć wniosek, iż podział symbiotycznych glonów na dwie grupy: Amerykańską i Europejską odnosi się jedynie do liczby intronów w odcinku SSU rDNA, natomiast nie można wyznaczyć charakterystycznych zasięgów geograficznych dla żadnej z grup. W USA stwierdzono obecność *C. vulgaris* i *C. variabilis*, co jest zgodne z danymi literaturowymi. Należy jednak ostrożnie stwierdzać obecność jedynie tych dwóch gatunków, gdyż z tego obszaru analizowano niewielką ilość próbek. Na obszarach Dalekiego Wschodu Azji oraz Kamczatki (Azja Północna) stwierdzono obecność wszystkich czterech gatunków, podczas gdy w literaturze odnotowano obecność *C. sorokiniana* (Yamamoto i in. 2003) i *C. vulgaris* (Hoshina i in. 2004, Nakahara i in. 2004) (Tab. 11). Wcześniejsze analizy prowadzone były na szczepach pochodzących z kilku stanowisk odległych od siebie (np. zachód Europy i Daleki Wschód Azji). Nie badano natomiast przedstawicieli endosymbiontów pozyskanych z terenów Europy Środkowo-Wschodniej, Azji Środkowej czy Azji Północnej. Odnosząc się do analiz przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej nie można stwierdzić wyraźnych preferencji dotyczących rozmieszczenia geograficznego poszczególnych gatunków symbiontów. Ponadto aby można było odrzucić podział symbiontów na dwie grupy, należy rozszerzyć analizy

o nowe regiony geograficzne oraz zwiększyć liczbę badanych szczepów z nowo pozyskanych stanowisk.

Tabela 11. Zestawienie gatunków symbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* w poszczególnych regionach geograficznych. Na niebiesko zaznaczono gatunki symbiotycznych glonów występujące na terenie charakterystycznym dla grupy Europejskiej (Hoshina i Imamura 2009a), na zielono zaznaczono gatunki symbiotycznych glonów występujące na terenie charakterystycznym dla grupy Amerykańskiej (Hoshina i Imamura 2009a), na czerwono zaznaczono gatunki symbiotycznych glonów występujące na terenach analizowanych w niniejszej pracy. „+” – obecność gatunku endosymbionta, „-” – brak obecności endosymbionta. „! ” – obecność endosymbionta niestwierdzana w danych literaturowych w danym regionie geograficznym.

Polożenie geograficzne	Gatunek endosymbionta			
	<i>C. vulgaris</i>	<i>C. variabilis</i>	<i>C. sorokiniana</i>	<i>M. reisseri</i>
Wielka Brytania, Niemcy, Austria, Kaliningrad	+	+!	-	+
USA, Chiny, Japonia	+	+	+	-
Europa Południowa (Włochy, Serbia)	-	+!	-	+
Europa Środkowo-Wschodnia (Petersburg, Twer, Jarosław, Wołgograd, Astrachań)	+	+!	-	+
Azja Środkowa (Tadżykistan, góry Altaj)	+	-	-	-
Azja Północna (jeziro Bajkał, Chabarowski, Khanka, Kamczatka)	+	+	+	+!

### 6.3. Analiza związku pomiędzy syngeniem *Paramecium bursaria* a gatunkiem endosymbionta

W odniesieniu do danych literaturowych różne gatunki symbiotycznych glonów wykazują odrębny sposób dopasowania się do utworzenia stabilnego związku symbiotycznego z *P. bursaria* (Hirshon 1969; Weis 1978). Wykazano, że utworzenie związku symbiotycznego jest zależne od specyficzności gospodarza, w obrębie czego można wymienić rozpoznawanie antygenów powierzchniowych endosymbiotycznych glonów przez *P. bursaria* (Nishihara i in. 1998). Można wysunąć dwie hipotezy odnośnie utworzenia związku symbiotycznego pomiędzy glonami a *P. bursaria*. Pierwsza obejmuje stanowisko, iż symbioza miała miejsce przed wyodrębnieniem się syngonów, w rezultacie czego każdy gatunek symbionta może wchodzić w związek



symbiotyczny ze szczepami należącymi do różnych syngenów. Druga hipoteza zakłada, iż wyodrębnienie się syngenów miało miejsce u aposymbiotycznego *P. bursaria*, dopiero później u każdego syngenu rozwijała się symbioza z określonym gatunkiem glonu, wobec czego można mówić o ścisłej specyficzności gospodarza wobec symbionta. Gatunek *P. bursaria* początkowo dzielono na sześć syngenów (B), które definiowane są jako grupy płciowo izolowane (Bomford 1966), natomiast obecna kolekcja obejmuje pięć syngenów (R) (Greczek-Stachura i in. 2012). Poszczególne syngeny charakteryzują się specyficznym dla siebie rozmieszczeniem geograficznym (Jennings 1938; Jennings i Opitz 1944; Chen 1956; Bomford 1966; Hoshina i in. 2006; Greczek-Stachura i in. 2012). Szczepy *P. bursaria* należące do syngenu R1 i R2 zajmują tereny Europy i Azji począwszy od Wielkiej Brytanii aż po Syberię. W niniejszej pracy analizowano sześć szczepów *P. bursaria* należących do syngenu R1 pochodzących z Austrii, zachodnich terenów Rosji oraz Tadżykistanu. W obrębie syngenu R1 szczepy *P. bursaria* tworzą związek symbiotyczny z glonami należącymi do gatunków: *C. vulgaris*, *C. variabilis* i *M. reisseri*. Szczepy syngenu R2 analizowane w ramach pracy doktorskiej pochodziły z terenu Wielkiej Brytanii, Niemiec, Serbii, Obwodu Kaliningradzkiego, zachodnich terenów Rosji, jeziora Bajkał, przedgórze gór Ałtaj oraz z Kamczatki. W obrębie tego syngenu endosymbionty przypisano do wszystkich czterech gatunków: *C. vulgaris*, *C. variabilis*, *C. sorokiniana* i *M. reisseri*. Należy zaznaczyć, iż *C. sorokiniana* została wyizolowana ze szczepów *P. bursaria* pochodzących z jeziora Bajkał i Kamczatki, czyli z terenów, które nie są charakterystyczne dla występowania syngenu R2. Zasięg geograficzny szczepów należących do syngenu R3 jest dosyć szeroki. Autorzy wymieniają tereny Dalekiego Wschodu Azji, południowo-wschodniej Syberii, Chin, Japonii, Bostonu w USA, ale też Austrii i Włoch w Europie (Greczek-Stachura i in. 2012). W niniejszej pracy analizowane szczepy należące do syngenu R3 pochodziły z Japonii, Chin, Rezerwatu Przyrody w Khance i Chabarowska w Rosji oraz z Włoch. W obrębie analizowanych szczepów endosymbiotyczne glony przypisano do trzech gatunków: *C. vulgaris*, *C. variabilis* i *C. sorokiniana*. Szczepy należące do syngenu R4 charakteryzują się ograniczonym do USA rozmieszczeniem geograficznym (Greczek-Stachura i in. 2012). Analizowane w pracy szczepy pochodziły z Ardmore i Bostonu w USA oraz zawierały symbiotyczne glony należące do *C. vulgaris* i *C. variabilis*. Rozmieszczenie syngenu R5 ograniczone jest do terenów zachodniej Rosji (Ogród Botaniczny w Petersburgu oraz ujście rzeki Wołgi) (Greczek-Stachura i in. 2012). Szczepy syngenu R5 analizowane

w ramach niniejszej pracy pochodziły z Ogrodu Botanicznego w Petersburgu oraz z Astrachańskiego Rezerwatu Przyrody w Rosji. Endosymbionty wyizolowane z tych szczepów przypisano do *C. vulgaris* i *C. variabilis*. Summerer i in. (2007) analizowali specyficzność *P. bursaria* wobec symbiontów; w tym celu mieszała dwa aposymbiotyczne szczepy *P. bursaria* z glonami należącymi do rodzaju *Chlorella* wyizolowanymi z czterech szczepów *Paramecium*, kolejnych siedmiu wyizolowanych z innych orzęsków, dwóch wyizolowanych z *Hydra viridis* oraz z glonami wolnożyjącymi. Tworzenie związku symbiotycznego obserwowane było pomiędzy *P. bursaria* a wszystkimi glonami oprócz glonów wolnożyjących oraz tych wyizolowanych z *H. viridis*. Ponadto mieszała szczep *P. bursaria* z trzema szczepami symbiontów zdolnych do utworzenia związku symbiotycznego, w tym jednego wyizolowanego z *P. bursaria*. Związek symbiotyczny wytworzył się jedynie pomiędzy *P. bursaria* a szczepem wyizolowanym z tego samego organizmu, co świadczy o wyszukanim mechanizmie rozpoznawania potencjalnego symbionta przez *P. bursaria*. Hoshina i in. (2005) twierdzą, iż typ symbionta zależy nie tylko od lokalizacji geograficznej, ale też od syngenu *P. bursaria*. Badania Lewis i Muller-Parker (2004) prowadzone na ukwiałach dowiodły, iż w pięciu zbiornikach identyfikowany był jeden typ symbionta. Analizy filogenetyczne prowadzone przez Summerer i in. (2008) wykazały występowanie różnic między populacjami symbiontów tego samego gatunku gospodarza, ale pochodzącego z dwóch innych jezior w Austrii. W odniesieniu do danych literaturowych relacja pomiędzy *P. bursaria* i endosymbiotycznymi glonami jest bardzo elastyczna i sukces symbiozy zależy często od warunków panujących podczas hodowli. Reisser i in. (1988b) wykazali, iż dwa aposymbiotyczne szczepy *P. bursaria* o amerykańskim i europejskim pochodzeniu tworzą związek symbiotyczny z glonami pochodzącymi z Europy i USA, co świadczy o braku specyficzności gospodarza wobec partnera symbiotycznego. Weis (1978) sugeruje, iż nie istnieje związek pomiędzy syngeniem *P. bursaria* a określonym gatunkiem symbionta żyjącego wewnątrz komórki gospodarza. W przypadku *P. bursaria* zdolność symbiontów do wchodzenia w stabilny związek symbiotyczny skorelowana jest z tolerancją niskiego pH środowiska. Symbiotyczne glony, w przeciwieństwie do wolnożyjących, są w stanie rozwijać się w środowisku o pH poniżej 3.5 (Huss i in. 1993). Meier i Wiessner (1989) wykazali, iż *P. bursaria* może pozbywać się symbiontów, po czym nabywa nowe, ale mogą one także należeć do innego gatunku. Genetyczne różnice pomiędzy symbiotycznymi glonami *P. bursaria*

są dziesięć razy wyższe niż pomiędzy glonami wolnożyjącymi należącymi do tego samego gatunku (Hoshina i in. 2006). Takie rozbieżności sugerują, iż symbioza pomiędzy *P. bursaria* a glonami powstawała wielokrotnie równolegle, natomiast odrzucają hipotezę mówiącą, iż jeden typ symbionta dał początek wszystkim istniejącym dzisiaj. Podobna sytuacja ma miejsce u symbiontów wchodzących w skład porostów (Piercey-Normore i DePriest 2001). Uważa się, że *P. bursaria* w ciągu swojej ewolucji kilkakrotnie wymieniał swoje symbionty (Hoshina i Imamura 2008). Z powyższych rozważań można jednoznacznie wywnioskować, iż nie istnieje związek pomiędzy syngeniem *P. bursaria* a gatunkiem glonu żyjącego w komórce. Jedynym przypadkiem, gdzie można zaobserwować zależność jest syngen R4, u którego występują tylko *C. vulgaris* i *C. variabilis*. Jednak w tym przypadku należy bardzo ostrożnie mówić o istnieniu zależności, gdyż może być to bardziej związane z restrykcyjnym zasięgiem syngenu R4, jak również z małą ilością prób zebranych na terenie USA. W syngenie R1 nie spotyka się także *C. sorokiniana*, w syngenie R3 *M. reisseri*, a w syngenie R5 występuje tylko *C. vulgaris* i *C. variabilis*, chociaż jest to także bardziej uzależnione od rozmieszczenia geograficznego obydwu syngenów. Można także przyjąć jedną z hipotez, iż wyodrębnianie się syngenów u *P. bursaria* jest zdarzeniem młodszym ewolucyjnie niż powstawanie związków symbiotycznych, na co wskazuje różnorodność gatunków symbiontów w każdym z syngenów (Tab. 10, Ryc. 29).

Istnieją dwa modele rozmieszczenia organizmów w obrębie królestwa *Protista*. Pierwszy z nich określa rozmieszczenia pierwotniaków jako kosmopolityczne (Finlay 2002; 2004), natomiast według drugiej koncepcji zwanej “modelem umiarkowanego endemizmu” około 30 % pierwotniaków charakteryzuje się występowaniem endemicznym (Foissner 2007; 2008). Rozmieszczenie *P. bursaria* można zdecydowanie uznać za kosmopolityczne. *P. bursaria* wykazuje „*outbreeding*” w odniesieniu do typu kojarzenia, co przejawia się krzyżowaniem klonów o dalekim pokrewieństwie. Taka strategia pozwala także utrzymać genetyczną niezmienną szczepów należących do tego samego syngenu, lecz zajmujących odległe stanowiska, co umożliwiło osiągnąć *P. bursaria* zasięg kosmopolityczny. Komórki *P. bursaria* charakteryzują się dużą liczebnością, niewielkimi rozmiarami, co według pierwszego modelu stanowi wystarczającą siłę do utrzymania ciągłości w globalnym rozmieszczeniu. Nie można zakładać, że “wszystko jest wszędzie”, ale wolnożyjące pierwotniaki (np. *P. bursaria*)

mogą być znajdowane wszędzie tam, gdzie ich wymagania ekologiczne są spełnione. Można zatem stwierdzić, iż rozmieszczenie endosymbiotycznych glonów *P. bursaria* również jest bliższe modelowi zaproponowanemu przez Finlay (2002; 2004), jako że żyją w komórkach gospodarza charakteryzującego się rozmieszczeniem globalnym.

#### 6.4. Użyteczność markerów molekularnych wykorzystanych w pracy

Wykorzystanie analiz molekularnych jest kluczowe przy ustalaniu pokrewieństwa filogenetycznego w sytuacji, kiedy badane organizmy są nieodróżnialne morfologicznie. Taka sytuacja ma miejsce przy identyfikowaniu endosymbiotycznych glonów *P. bursaria*. Analizy filogenetyczne z użyciem małej podjednostki rybosomalnej (SSU rDNA) i dużej podjednostki rybosomalnej (LSU rDNA) były wykorzystywane w identyfikacji mykobiontów (Gutierrez i in. 2007) i fykobiontów (Friedl i in. 2000). Wykorzystywanie odcinka SSU rDNA jako jedynego markera często prowadzi do otrzymania wyników niezgodnych z wynikami otrzymywanymi z wykorzystaniem innych markerów, co wiąże się z niewielkim zróżnicowaniem w obrębie tego fragmentu DNA (Keeling i in. 2000). Natomiast wiarygodność i użyteczność LSU rDNA udowodniona została w analizie gąbek (Nichols 2005) grzybów (Blanco i in. 2004) czy krasnorostów (Skage i in. 2005). Del Campo i in. (2010) podają, iż analizowany odcinek LSU rDNA w obrębie gatunków *Trebouxia* jest bardzo zróżnicowany i bogaty w introny, wobec czego świetnie sprawdza się jako marker molekularny. Uważa się, iż LSU rDNA ewoluuje trzy razy szybciej niż SSU rDNA, ponadto 65 % substytucji występuje w pierwszych 800 pozycjach nukleotydowych (Hoshina i Imamura 2008). W związku z powyższym SSU rDNA nie może być wykorzystywany do oceny pokrewieństwa pomiędzy taksonami należącymi do *Chlorellaceae* (Hoshina i in. 2004; Krientz i in. 2005). Hoshina i in. (2010) wykorzystywali odcinek LSU rDNA do porównania symbiotycznych glonów *P. bursaria*. Wykazali, iż różnice pomiędzy *C. variabilis* a *M. reisseri* sięgały 70 substytucji, pomiędzy *M. reisseri* a *C. vulgaris* – 85, pomiędzy *C. variabilis* a *C. vulgaris* – 59 substytucji. W pierwszych 800 nukleotydach odcinka LSU rDNA różnice te wynosiły odpowiednio 41, 49 i 39 substytucji. W niniejszej pracy analizowany był początkowy fragment LSU rDNA liczący 555 nukleotydów. Pomędzy *C. variabilis* a *C. vulgaris* różnice wynosiły do 20 substytucji, pomiędzy *C. variabilis* a *M. reisseri* wynosiły od 28 do 58 substytucji, pomiędzy *C. vulgaris* a *M. reisseri* wynosiły także od 28 do 58 substytucji. Można zatem stwierdzić, iż spośród tych

czterech endosymbiotycznych gatunków najbardziej spokrewnione są *C. vulgaris* i *C. variabilis*.

Większość eksperymentów filogenetycznych wykorzystuje fragmenty wewnętrznych sekwencji transkrybowanych (ITS) do odtwarzania historii ewolucyjnej gatunków (Wattier i Maggs 2001). Popularność tych odcinków DNA zawdzięcza się wysokiemu stopniowi substytucji nukleotydowych, co pozwala na porównywanie blisko spokrewnionych ze sobą taksonów. Ponadto region ten jest łatwo amplifikowany i sekwencjonowany ze względu na uniwersalność starterów. Odcinki ITS były analizowane u symbiontów porostów, takich jak *Trebouxia*, *Coccomyxa* czy *Aterochloris* (Cordeiro i in. 2005). Fragmenty te wykorzystuje się często w badaniach filogenetycznych na poziomie gatunkowym (Nieto Feliner i Rosselló 2007; Miao i in. 2008). Hoshina i in. (2005) sugerują, iż odcinek ITS2 jest bardziej odpowiedni niż 18S rDNA do rozwiązywania relacji ewolucyjnych w obrębie blisko spokrewnionych gatunków *Chlorella* ze względu na dziesięciokrotnie szybsze tempo ewolucji. Dodatkowo baza danych w Banku Genów wzbogaca się nieustannie o sekwencje ITS. Kolejną zaletą wykorzystywania tego odcinka jest jego duże zróżnicowanie pomiędzy sekwencjami różnych gatunków, podczas gdy w obrębie jednego gatunku sekwencje są bardzo podobne (Hoshina i in. 2010), co także zostało potwierdzone w ramach niniejszej pracy. Müller i in. (2005) poddali analizie wewnątrzgatunkową różnorodność sekwencji ITS1-5.8S-rDNA-ITS2 prawie trzydziestu szczepów *C. vulgaris*, gdzie wykazali obecność sześciu niewielkich różnic w sekwencjach. Kopie ITS w obrębie jednego genomu są homologiczne, co czyni otrzymane wyniki wiarygodnymi (Kovarik i in. 2005; Hu i in. 2009). Bock i in. (2011) udowodnili wysoką użyteczność fragmentu 5.8S i ITS2 wykorzystując go do opisu i identyfikacji gatunków w obrębie rodzaju *Chlorella*. Hoshina i in. (2004) również wykazali użyteczność ITS1 dla grupy *C. vulgaris*. Hoshina i Fujiwara (2013) na podstawie analizy ITS2 przypisali szczep NIES-2173, uprzednio klasyfikowany jako *C. vulgaris*, do gatunku *C. sorokiniana* (otrzymano wysokie wartości samoprobkowania w drzewie filogenetycznym otrzymanym metodą ML). Hoshina i Imamura (2008) analizowali odcinek ITS2 w obrębie trzech symbiontów *P. bursaria* należących do kladu *Chlorella*. Różnice pomiędzy szczepami należącymi do grupy Europejskiej i Amerykańskiej wynosiły 62 substytucje na 251 nukleotydów (25%), 57 substytucji pomiędzy szczepem amerykańskim a innym szczepem należącym do *Chlorella* (CCAP 1660/10) (23%) i 67

substytucji pomiędzy szczepem Europejskim a szczepem CCAP 1660/10 (27 %). Kiedy porównano szczep amerykański ze wzorcowym szczepem *C. vulgaris*, różnice wynosiły 64 substytucje (25 %), natomiast pomiędzy szczepem amerykańskim a szczepem *C. sorokiniana* różnice wynosiły 65 substytucji (26 %). Szczep europejski różnił się od *C. vulgaris* i *C. sorokiniana* odpowiednio o 74 i 73 substytucje. W niniejszej pracy analizowano odcinek ITS1-5.8S-ITS2 liczący 543 nukleotydy. Pomędzy *C. vulgaris* i *C. variabilis* różnice wynosiły od 81 do 128 podstawień (15-24 %). Różnice pomiędzy *C. vulgaris* i *C. sorokiniana* wynosiły od 168 do 204 podstawień (31-38 %). Różnice pomiędzy *C. vulgaris* i *M. reisseri* wynosiły od 149 do 192 podstawień (27-35 %). Różnorodność w obrębie *C. variabilis* i *C. sorokiniana* wynosiła od 88 do 112 podstawień (16-21 %). Różnice pomiędzy *C. variabilis* a *M. reisseri* wynosiły od 72 do 100 podstawień (13-18 %). Zróżnicowanie pomiędzy *C. sorokiniana* a *M. reisseri* wynosiło od 159 do 176 podstawień (29-32 %).

Wu i in. (2001) wykazali, iż odcinki chloroplastowe jako markery wykazują dużo większe zróżnicowanie, niż odcinki genomu jądrowego. Provan i in. (2004) analizowali odcinek genów od *rps11* do *rpl2* w obrębie przedstawicieli zielenic. Uzyskali różnice sięgające od 40 % pomiędzy *Nephroselmis olivacea* i *Chaetosphaeridium globosum* do 69 % pomiędzy *C. vulgaris* i *C. globosum* w odcinku zamplifikowanym poprzez parę starterów UCP2, którą posłużono się także w niniejszych badaniach. W pracy zamplifikowano odcinek liczący 267 nukleotydów. Różnice pomiędzy *C. vulgaris* i *C. variabilis* wynosiły od 18 do 43 nukleotydów, co daje od 6 do 16 %. Różnice pomiędzy *C. vulgaris* a *C. sorokiniana* wynosiły od 19 do 49 nukleotydów, co daje od 7 do 18 %. Różnice pomiędzy *C. vulgaris* a *M. reisseri* wynosiły od 16 do 43 nukleotydów, co daje od 6 do 16 %. Różnice pomiędzy *C. variabilis* a *C. sorokiniana* i *C. variabilis* a *M. reisseri* wynosiły odpowiednio od 46 do 64 (17-24 %) substytucji i od 35 do 57 substytucji (13-21 %). Pomędzy *C. sorokiniana* a *M. reisseri* różnice wynosiły od 41 do 51 substytucji, co daje od 15 do 19 %. W obrębie analizowanego odcinka DNA najbardziej spokrewnionymi gatunkami były: *C. vulgaris* i *C. variabilis*, natomiast największe zróżnicowanie zaobserwowano między *C. variabilis* i *C. sorokiniana* oraz między *C. variabilis* i *M. reisseri*.

Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane z użyciem trzech markerów: fragmentu LSU rDNA, fragmentu ITS1-5.8S rDNA-ITS2 i fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* i *infA* można stwierdzić, iż najbardziej użytecznym w identyfikacji symbiontów

*P. bursaria* jest fragment ITS1-5.8S rDNA-ITS2, gdyż różnice w sekwencjach reprezentujących odrębne gatunki są najwyższe, podczas gdy zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe jest niskie. Ponadto klady tego samego gatunku opatrzone są najwyższymi wartościami samopróbkowania. Najmniej zróżnicowanym odcinkiem okazał się fragment LSU rDNA. Genom chloroplastowy charakteryzuje się wysokim zróżnicowaniem międzygatunkowym, wobec czego można go uznać za dobry marker molekularny. Jednak najlepszym rozwiązaniem jest jednoczesne stosowanie kilku markerów pochodzących z niezależnych genomów.

## 7. Podsumowanie

W obrębie czterdziestu trzech zebranych szczepów *Paramecium bursaria* wyizolowano endosymbiotyczne glony należące do czterech gatunków: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella variabilis*, *Chlorella sorokiniana* oraz *Micractinium reisseri*. Pomiędzy poszczególnymi gatunkami można zaobserwować występowanie polimorfizmu genetycznego.

Analizując wykonane mikrofotografie endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* można uznać, iż identyfikacja tych organizmów na poziomie gatunku z wykorzystaniem cech morfologicznych jest bardzo trudna i powinna być połączona z wynikami otrzymanymi za pomocą metod molekularnych.

Analizując otrzymane wyniki można stwierdzić, iż podział symbiotycznych glonów na dwie grupy: Amerykańską i Europejską jest umowny i odnosi się jedynie do liczby intronów w odcinku SSU rDNA. Niemniej jednak, aby jednoznacznie odrzucić podział symbiontów na dwie grupy należy rozszerzyć analizy o nowe regiony geograficzne oraz zwiększyć liczbę badanych szczepów z nowo pozyskanych stanowisk.

Wyznaczenie charakterystycznych zasięgów geograficznych dla poszczególnych gatunków jest bardzo trudne. Gatunki endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* charakteryzują się rozmieszczeniem kosmopolitycznym, jednak w celu udowodnienia tego założenia należy rozszerzyć analizy o nowe regiony geograficzne oraz zwiększyć liczbę badanych szczepów z nowo pozyskanych stanowisk.

Biorąc pod uwagę obecność danego gatunku endosymbiotycznego glonu w określonym syngenie *Paramecium bursaria*, można jednoznacznie odrzucić hipotezę istnienia zależności pomiędzy syngeniem *P. bursaria* a gatunkiem glonu żyjącego w komórce. Występujące nieliczne związki mogą być wynikiem ograniczonego zasięgu szczepów syngenu R4, jak również zbyt małej liczby prób zebranych na terenie USA. Na podstawie powyższych wniosków można także stwierdzić, iż wyodrębnianie się syngenów u *P. bursaria* jest zdarzeniem młodszym ewolucyjnie niż powstawanie związków symbiotycznych, na co wskazuje różnorodność gatunków symbiontów w każdym z syngenów.

Istnieją dwa modele rozmieszczenia organizmów w obrębie królestwa *Protista*: model rozmieszczenia kosmopolitycznego oraz model „umiarkowanego endemizmu”.



Rozmieszczenie *P. bursaria* można uznać za kosmopolityczne, zatem rozmieszczenie endosymbiontów *P. bursaria* również można określić jako globalne. Endosymbionty należące do *C. vulgaris* zostały wyizolowane ze szczepów *P. bursaria* pochodzących z USA, Europy Północnej, Europy Środkowo-Wschodniej, Azji Środkowej, Azji Północnej oraz Wschodniej. Endosymbionty należące do *C. variabilis* zostały wyizolowane ze szczepów *P. bursaria* pochodzących z USA, Europy Zachodniej, Południowej, Środkowo-Wschodniej oraz Azji Północnej. Endosymbionty należące do *C. sorokiniana* zostały wyizolowane ze szczepów *P. bursaria* pochodzących z Azji Północnej oraz Wschodniej. Endosymbionty należące do *M. reisseri* zostały wyizolowane ze szczepów *P. bursaria* pochodzących z Europy Zachodniej, Północnej, Środkowo-Wschodniej oraz z Azji Północnej.

Analizując wyniki sekwencjonowania otrzymane z użyciem trzech markerów: fragmentu LSU rDNA, fragmentu ITS1-5.8S rDNA-ITS2 i fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* i *infA* można przyjąć, iż fragment ITS1-5.8S rDNA-ITS2 charakteryzuje się najwyższym zróżnicowaniem międzygatunkowym, podczas gdy między sekwencjami należącymi do tego samego gatunku zróżnicowanie jest bardzo niskie, zatem można ten fragment uznać za najbardziej odpowiedni do ustalenia pokrewieństwa filogenetycznego między endosymbiotycznymi glonami *Paramecium bursaria*. Najmniej zróżnicowanym odcinkiem okazał się fragment LSU rDNA. Amplifikując fragmenty genomu chloroplastowego również otrzymuje się wysoki stopień zróżnicowania pomiędzy gatunkami, wobec czego można go także uznać za dobry marker molekularny. Jednak najlepszym rozwiązaniem jest jednoczesne stosowanie kilku markerów pochodzących z niezależnych genomów.

## 8. Streszczenie

*Paramecium bursaria* jest gatunkiem orzęska żyjącym w związku symbiotycznym z glonami. Głównym celem niniejszej pracy była identyfikacja endosymbiontów *Paramecium bursaria* na podstawie analizy molekularnej trzech fragmentów DNA: fragmentu LSU rDNA, fragmentu ITS1-5.8S rDNA-ITS2 i fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* i *infA*. Ponadto kolejnymi założeniami pracy doktorskiej było zbadanie istnienia zależności pomiędzy gatunkiem symbiotycznego glonu a pochodzeniem geograficznym szczepu *Paramecium bursaria*, z którego wyizolowano endosymbionty oraz zależności między gatunkiem symbiotycznego glonu a syngeniem *Paramecium bursaria*. W ramach niniejszej pracy analizowano czterdzieści trzy szczepy *Paramecium bursaria* należące do pięciu syngenów i pochodzące z odległych, niebadanych dotąd stanowisk geograficznych, z których wyizolowano endosymbiotyczne glony. W analizach molekularnych skonstruowano kladogramy dla każdego badanego fragmentu DNA wykorzystując metodę Łączenia Sąsiadów (ang. *neighbor joining*) oraz metodę Największej Wiarygodności (ang. *maximum likelihood*). Dla każdego badanego markera narysowano również sieć haplotypów z wykorzystaniem metody *median joining algorithm*. Analiza fragmentu LSU rDNA wykazała istnienie dwudziestu dziewięciu haplotypów oraz zróżnicowanie w obrębie haplotypów – Hd równe 0.908. Analiza fragmentu ITS1-5.8S rDNA-ITS2 wykazała istnienie dwudziestu dziewięciu haplotypów oraz zróżnicowanie w obrębie haplotypów – Hd równe 0.98736. Analiza fragmentów genów 3'*rpl36*-5'*infA* wykazała istnienie trzydziestu sześciu haplotypów oraz zróżnicowanie w obrębie haplotypów – Hd równe 0.984. W obrębie czterdziestu trzech zebranych szczepów *Paramecium bursaria* wyizolowano endosymbiotyczne glony należące do czterech gatunków: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella variabilis*, *Chlorella sorokiniana* oraz *Micractinium reisseri*. W niniejszej pracy wykazano, iż nie istnieje zależność pomiędzy gatunkiem endosymbiotycznego glonu a pochodzeniem geograficznym *Paramecium bursaria*, jak również nie istnieje zależność pomiędzy gatunkiem endosymbiotycznego glonu a syngeniem *Paramecium bursaria*. Można również uznać, iż dotychczasowy podział endosymbiontów *Paramecium bursaria* na grupę Amerykańską i Europejską dotyczy jedynie liczby intronów w odcinku SSU rDNA, natomiast nie ma odzwierciedlenia w rozmieszczeniu geograficznym poszczególnych gatunków.

## Summary

*Paramecium bursaria* is a ciliate species living in a symbiotic relationship with green algae. The studies objectives were to identify endosymbionts of *P. bursaria* originating from distant geographical locations and to answer the question whether geographical locations of *P. bursaria* strains are related to the specified symbiont species. Thus, I analyzed forty three symbionts strains of *P. bursaria* originating from distant geographical locations and extracted algae DNA from *P. bursaria* cells. Three DNA fragments were analyzed: two of a nuclear genome (a fragment of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and a fragment of a gene encoding large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA)) and the fragment of plastid genome containing 3'*rpl36*-5'*infA* genes. Three cladograms for each analysed DNA fragment were constructed using neighbor joining and maximum likelihood methods. Haplotype networks for each DNA fragment were drawn using median joining method. The analysis of two ribosomal sequences showed the existence of twenty nine haplotypes (haplotype diversity  $Hd = 0.98736$  for the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 and  $Hd = 0.908$  for LSU rDNA) and thirty six haplotypes were identified for 3'*rpl36*-5'*infA* genes ( $Hd = 0.984$ ). The endosymbionts were identified as *Chlorella vulgaris*, *Chlorella variabilis*, *Chlorella sorokiniana* and *Micractinium reisseri*. I rejected the hypotheses concerning: (i) the correlation between *P. bursaria* syngen and the symbiont species; (ii) the relationship between species of a symbiont and geographical distribution; and (iii) the occurrence of the geographical division of symbionts into an American and European group.

## 9. Piśmiennictwo

Abrahamsen M. S., Templeton T. T., Enomoto S., Abrahante J. E., Zhu G., Lancto C. A., Deng M., Liu C., Widmer G., Tzipori S., Buck G. A., Xu P., Bankier A. T., Dear P. H., Konfortov B. A., Spriggs H. F., Iyer L., Anantharaman V., Aravind L., Kapur V. 2004. Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, 304: 441-445.

Albers D., Reisser W., Wiessner W. 1982. Studies of the nitrogen supply of endosymbiotic chlorellae in green *Paramecium bursaria*. *Plant Sci Lett*, 25: 85-90.

Albers D., Wiessner W. 1985. Nitrogen nutrition of endosymbiotic *Chlorella* spec. *Endocytobiol Cell Res*, 2: 55-64.

Andreyeva V. M. 1975. Rod *Chlorella*: Morfologya, Sistematika, Prinzipy Klassifikaziyi. *Nauka, Leningrad*, 88.

Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol*, 50: 601-639.

Babbs C. F., Pham J. A., Coolbaugh R. C. 1989. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol*, 90: 1267-1270.

Baldauf S. L. 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics*, 19(6): 345-351.

Bandelt H. I., Forster P., Röthl A. 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Mol Biol Evol*, 16: 37-48.

Beijerinck M. W. 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Bot Ztg*, 48: 725-785.

Bendich A. J. 1987. Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *BioEssays*, 6: 279-282.

Blackman F. 1900. The primitive algae and the *Flagellata*. *Ann Bot*, 14: 647-688.

- Blanc G., Duncan G., Agarkova I., Borodovsky M., Gurnon J. 2010. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *Plant Cell*, 22: 2943-2955.
- Blanco O., Crespo A., Elix J. A., Hawksworth D. L. Lumbsch H. T. 2004. A molecular phylogeny and a new classification of parmelioid lichens containing *Xanthoparmelia*-type lichenan (*Ascomycota: Lecanorales*). *Taxon*, 53: 959-75.
- Bock R. 2007. Structure, function, and inheritance of plastid genomes [w:] *Cell and molecular biology of plastids*, red. Bock R. Wyd. Springer-Verlag, Berlin, 30-63.
- Bock C., Krientez L., Pröschold T. 2011. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, 11(2): 293-312.
- Bomford B. 1966. The syngens of *Paramecium bursaria*: New mating types and intersyngenic mating reactions. *J Protozool*, 13(3): 497-501.
- Bontis I., Foroglou-Kerameos C., Katsaros I., Manthos A. 1983. Presence of microcilia on the apical extremity of the cilia of the epithelium of the Fallopian tubes. *Acta Anat*, 115(2): 107-116.
- Brandt K. 1882. Über die morphologische und physiologische Bedeutung des Chlorophylls bei Thieren. *Arch Anat Physiol*, 1882: 125-151.
- Brown J. A., Nielsen P. J. 1974. Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic *Chlorellae* to *Paramecium bursaria*. *J Protozool*, 21: 569-570.
- Brown T. A. 2009. Genomy. Wyd. PWN SA, Warszawa.
- Caisova L., Marin B. and Melkonian M. 2013. A consensus secondary structure of ITS2 in the *Chlorophyta* identified by phylogenetic reconstruction. *Protist*, 164(4): 482-496.
- Calvin M., Benson A. A. 1948. The path of carbon in photosynthesis. *Science*, 107: 476-480.
- Chen T. T. 1940. Conjugation in *Paramecium bursaria* between animals with diverse nuclear constitution. *J Heredity*, 31: 185-196.

- Chen T. T. 1956. Varieties and mating types in *Paramecium bursaria*. *J Exp Zool*, 132: 255-268.
- Cho B. H., Sauer N., Komor E., Tanner W. 1981. Glucose induces two amino acid transport system in *Chlorella*. *Proc Natl Acad Sci*, 78: 3591-3594.
- Christensen T. 1962. Systematik Botanik, Alger [w:] *Botanik*, red. Böcher T. W., Lange M., Sorensen T. Wyd. Munksgaard, København, 1–178.
- Civáň P., Foster P. G., Embley M. T., Seneca A., Cox C. J. 2014. Analyses of charophyte chloroplast genomes help characterize the ancestral chloroplast genome of land plants. *Genome Biol Evo*, 6: 897–911.
- Cordeiro L. C. M., Carbonero E. R., Sasaki G. L., Reis R. A., Stocker-Wörgötter E., Gorin P. A. J., Iacomini M. 2005. A fungus-type  $\beta$ -galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 224: 193-198.
- Corliss J. O. 1979. The Ciliated Protozoa. *Pergamon Press*, Oxford
- Dagan T., Artzy-Randrup Y., Martin W. 2008. Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution. *Proc Natl Acad Sci*, 105: 10039-10044.
- Darienko T., Gustavs L., Eggert A., Wolf W., Pröschold, T. 2015. Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PLoS ONE*, 10(6).
- del Campo E. M., Casano L. M., Gasulla F., Barreno. 2010. Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming *Trebouxia* algae. *Mol Phylogent Evol*, 54: 437-444.
- Douglas A. E., Huss V. A. R. 1986. On the characteristics and taxonomic position of symbiotic *Chlorella*. *Arch Microbiol*, 145: 80-84.
- Douglas A. E. 1994. Symbiotic interactions. *Oxford University Press Inc*, Oxford.

- Dover G. A. 1988. Molecular evolution. rDNA world falling to pieces. *Nature*, 336: 623-624.
- Duellman W. E., Hillis D. M. 1987. Marsupial frogs (Anura: *Hylidae*: *Gastrotheca*) of the Ecuadorian Andes: Resolution of taxonomic problems and phylogenetic relationships. *Herpetologica*, 43: 141-173.
- Echelle A. A., Mosier D. T. 1981. All-female fish: a cryptic species of *Menidia* (*Atherinidae*). *Science*, 212: 1411-1413.
- Ettl H., Komárek J. 1982. Was versteht man unter dem Begriff "kokkale Grünalgen"? *Archiv für Hydrobiologie*, 60: 345-374.
- Fawley M. W., Fawley K. P., Owen H. A. 2005. Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica*, gen. et sp. nov. *Phycologia*, 44: 35-48.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol*, 17: 368-376.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fitt W. K., Trench R. K. 1983. Endocytosis of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal by endodermal cells of the scyphistomae of *Cassiopeia xamachana* and resistance of the algae to host digestion. *J Cell Sci*, 64: 195-212.
- Finlay B. J. 2002. Global dispersal of free-living microbial Eukaryote species. *Science*, 296.
- Finlay B. J. 2004. Protist diversity is different? *Protist*, 155: 15-22.
- Foissner W. 2007. Dispersal and biogeography of Protists: recent advances. *J Protozool*, 40(1).
- Foissner W. 2008. Protist diversity and distribution: some basic consideration. *Biodiversity Conserv*, 17: 235-242.

- Fok A. K., Allen R. D. 1988. The lysosome system [w:] *Paramecium*, red. Görtz H. D. Wyd. Springer, Berlin, 301-324.
- Fokin S. I., Görtz H. D. 2009. Diversity of endosymbiotic bacteria in *Paramecium*, [w:] *Endosymbionts in Paramecium*, red. Fujishima M. Wyd. Springer-Verlag GmbH, 131-161.
- Fott B., Nováková M. 1969. A monograph of the genus *Chlorella*. The freshwater species [w:] *Studies in Phycology*, red. Fott B. Wyd. Academia, Prague, 10-74.
- Fott B. 1976. *Choricystis*, eine neue Gattung der *Chlorococcales* (*Chlorophyceae*). *Archiv für Hydrobiologie*, 17: 382-388.
- Friedl T., Besendahl A., Pfeiffer P., Bhattacharya D., 2000. The distribution of group I introns in lichen algae suggests that lichenization facilitates intron lateral transfer. *Mol Phylogenet Evol*, 14: 342–352.
- Friedl T., Bhattacharya D. 2002. Origin and evolution of green lichen algae [w:] *Symbiosis*, red. Seckbach J. Wyd. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands, 341-357.
- Friedl T., Rybalka N. 2012. Systematics of the green algae: a brief introduction to the current status. *Progr Bot*, 73: 259–280.
- Fujishima M., Kodama Y. 2012. Endosymbionts in *Paramecium*. *Eur J Protistol*, 48:124-137.
- Futuyma D. 2004. Ewolucja. Wyd. WUW, Warszawa.
- Gapanova I. N., Andronov E. E., Migunova A. V., Vorobyev K. P., Chizhevskaja E. P., Kvitko K. V. 2007. Genomic dactyloscopy of *Chlorella* sp., symbionts of *Paramecium bursaria*. *Protistol*, 4: 311-317.
- Graham L. E.; Graham J. M. 1978. Ultrastructure of endosymbiotic *Chlorella* in a *Vorticella*. *J Eukaryot Microbiol*, 25(2): 207-210.
- Gray M. W. 1983. Bacterial ancestry of mitochondria and plastids. *Bioscience*, 33: 693-699.



- Greczek-Stachura M., Potekhin A., Przyboś E., Rautian M., Skoblo I., Tarcz S. 2012. Identification of *Paramecium bursaria* syngens through molecular markers - comparative analysis of three loci in the nuclear and mitochondrial DNA. *Protist*, 1-14.
- Gu F., Chen L., Ni B., Zhang X. 2002. A comparative study on the electron microscopic enzyme-cytochemistry of *Paramecium bursaria* from light and dark cultures. *Europ J Protistol*, 38: 267-278.
- Gutierrez G., Blanco O., Divakar P.K., Lumbsch H.T., Crespo A. 2007. Patterns of group I intron presence in nuclear SSU rDNA of the lichen family *Parmeliaceae*. *J Mol Evol*, 64: 181-195.
- Hall B. G. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp*, 41: 95-98.
- Hall B. G. 2008. Łatwe drzewa filogenetyczne. Wyd. UW, Warszawa.
- Harumoto T., Miyake A. 1991. Defensive function of trichocysts in *Paramecium*. *J Exp Zool*, 260: 84-92.
- Hedges S. B., Blair J. E., Venturi M. L., Shoe J. L. 2004. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol Biol*, 4(2).
- Hegewald E., Schnepf E. 1997. Zur Struktur und Taxonomie bestachelter *Chlorellales*. *Nova Hedwigia*, 39: 297-383.
- Hirshon J.B. 1969. The response of *Paramecium bursaria* to potential endocellular symbionts. *Bio Bull*, 136: 33-42.
- Hiwatashi K. 1981. Sexual interactions of the cell surface in *Paramecium* [w:] *Sexual interactions in eukaryotic microbes*, red. Horgen P. A. Wyd. O'Day DH, New York.
- Hong J. W., Jo S. W., Cho H. W., Nam S. W., Shin W., Park K. M., Lee K. I., Yoon H. S. 2015. Phylogeny, morphology, and physiology of *Micractinium* strains isolated from shallow ephemeral freshwater in Antarctica. *Phycol Res*, 212-218.
- Hopple J. S., Vilgalys R. 1999. Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding

for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups, and monophyly. *Mol Phylogenet Evol*, 13: 1-19.

Hörtnagl P. H., Sommaruga R. 2007. Oxidative and UV-induced photooxidative stress in symbiotic and aposymbiotic strains of the ciliate *Paramecium bursaria*. *Photochem Photobiol Sci*, 6: 842-847.

Hoshina A. R., Kamako S. I., Imamura N. 2004. Phylogenetic position of endosymbiotic green algae in *Paramecium bursaria* Ehrenberg from Japan. *Plant Biol*, 6: 447-453.

Hoshina R., Kato Y., Kamako S.I., Imamura N. 2005. Genetic evidence of „American” and „European” type symbiotic algae of *Paramecium bursaria* Ehrenberg. *Plant Biol*, 7: 526-532.

Hoshina R., Hayashi S., Imamura N. 2006. Intraspecific genetic divergence of *Paramecium bursaria* and re-construction of paramecian phylogenetic tree. *Acta Protozool*, 45: 377-386.

Hoshina R. Imamura N. 2008. Multiple origins of the symbioses in *Paramecium bursaria*. *Protist*, 159: 53-63.

Hoshina R., Imamura N. 2009a. Origins of algal symbionts of *Paramecium bursaria* [w:] *Endosymbionts in Paramecium*, red. Fujishima M. Wyd. Springer-Verlag GmbH, 1-29.

Hoshina R., Imamura N. 2009b. Phylogenetically close group I introns with different positions among *Paramecium bursaria* photobionts imply a primitive stage of intron diversification. *Mol Biol Evol*, 26(6): 1309-1319.

Hoshina R., Iwataki M., Imamura N. 2010. *Chlorella variabilis* and *Micractinium reisseri* sp. nov. (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*): Redescription of the endosymbiotic green algae of *Paramecium bursaria* (*Peniculia*, *Oligohymenophorea*) in the 120th year. *Phycol Res*, 58: 188-201.

Hoshina R., Fujiwara Y. 2013. Molecular characterization of *Chlorella* cultures of the National Institute for Environmental Studies culture collection with description of

*Micractinium inermum* sp. nov., *Didymogenes sphaerica* sp. nov., and *Didymogenes soliella* sp. nov. (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*). *Phyc Res*, 61: 124-132.

Hu Z. M., Guiry M. D., Duan D. L. 2009. Using the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as a complement marker for species identification of red macroalgae. *Hydrobiologia*, 635: 279-287.

Huson D. H., Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*, 23(2): 254-267.

Huss V. A. R., Sogin M. L. 1990. Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the *Chlorococcales* based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. *J Mol Evol*, 31: 432-442.

Huss V. A. R., Holweg C., Seidel B., Reich V., Rahat M., Kessler E. 1993. There is an ecological basis for host / symbiont specificity in *Chlorella* / *Hydra* symbioses. *Endocytobiosis Cell Res*, 10: 35-46.

Huss V. A. R. 1999. Fresh water symbioses in protozoa and invertebrate [w:] *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*, red. Seckbach J. Wyd. Kluwer Academic Publishers, 643-650.

Iwatsuki K., Nishidoi M., Suehiro K. 1998. Symbiotic *Chlorella* enhances the thermal tolerance in *Paramecium bursaria*. *Comp Biochem Physiol Part A*, 121: 405-409.

Jansen R. K., Ruhlman T. A. 2012. Plastid genomes of seed plants [w:] *Genomics of Chloroplasts and Mitochondria, Advances in Photosynthesis and Respiration*, red. Bock R., Knoop V. Wyd. Springer, Dordrecht, 103-126.

Jennings H. S. 1938. Sex reaction types and their interrelations in *Paramecium bursaria*. Zoological laboratory. John Hopkins University. *Proc Natl Acad Sci*.

Jennings H. S., Opitz P. 1944. Genetics of *Paramecium bursaria*. IV. A fourth variety from Russia. Lethal crosses with an American variety. The University of California, Los Angeles.

Jolley E., Smith D. C. 1980. The green *Hydra* symbiosis. II. The biology of the establishment of the association. *Proc R Soc Lond B*, 27: 1168.

- Kadono T., Kawano T., Hosoya H., Kosaka T. 2004. Flow cytometric studies of the host-regulated cell cycle in algae symbiotic with green paramecium. *Protoplasma*, 223:133-141.
- Kamako S. I., Hoshina R., Ueno S., Imamura N. 2005. Establishment of axenic endosymbiotic strains of Japanese *Paramecium bursaria* and the utilization of carbohydrate and nitrogen compounds by the isolated algae. *Eur J Protistol*, 41, 193-202.
- Kamako S. I., Imamura N. 2006. Effect of Japanese *Paramecium bursaria* extract on photosynthetic carbon fixation of symbiotic algae. *J Eukaryot Microbiol*, 5: 136-141.
- Kang M., Dunigand D. D., van Elten J. L. 2005. *Chlorovirus* a genus of *Phycodnaviridae* that infects certain *Chlorella*-like green algae. *Mol Plant Pathol*, 6: 213-224.
- Kaplan-Levy R. N., Alster-Gloukhovski A., Benyamini Y., Zohary T. 2016. Lake Kinneret phytoplankton: integrating classical and molecular taxonomy. *Hydrobiologia*, 764: 283-302.
- Karakashian S. J. 1963. Growth of *Paramecium bursaria* as influenced by the presence of algal symbionts. *Physiol Zool*, 36: 52-68.
- Karakashian S. J., Rudzinska M. A. 1981. Inhibition of lysosomal fusion with symbiont-containing vacuoles in *Paramecium bursaria*. *Exp Cel Res*, 131: 387-393.
- Kato Y., Ueno S., Imamura N. 2006. Studies on the nitrogen utilization of endosymbiotic algae isolated from Japanese *Paramecium bursaria*. *Plant Sci*, 170: 481-486.
- Kato Y., Imamura N. 2008. Effect of sugars on amino acid transport by symbiotic *Chlorella*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(10): 911-917.
- Kato Y., Imamura N. 2009. Metabolic control between symbiont and host [w:] *Endosymbionts in Paramecium*, red. Fujishima M. Wyd. Springer-Verlag GmbH, 57-82.

- Kawano T., Kadono T., Kosaka T., Hosoya H. 2004. Green paramecia as an evolutionary winner of the oxidative symbiosis: A hypothesis and supportive data. *Z Naturforsch*, 59c: 538-542.
- Kawano T., Irie K., Kadono T. 2010. Oxidative stress-mediated development of symbiosis in green paramecia [w:] *Symbioses and Stress. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology (COLE) series*, red. Seckbach J. Wyd. Berlin: Springer, 179-195.
- Kazubski S. 1984. Podkrólestwo: *Protozoa - Pierwotniaki*, [w:] *Zoologia. Bezkręgowce*, red. Grabda E. Wyd. PWN SA, Warszawa, 1: 1.
- Keeling P. J., Luker M. A., Palmer J. D. 2000. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol*, 17: 23-31.
- Keeling P. J. 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365: 729-748.
- Kenrick P., Crane P. R. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, 389: 33-39.
- Kessler E., Huss V. A. R. 1990. Biochemical taxonomy of symbiotic *Chlorella* strains from *Paramecium* and *Acanthocystis*. *Bot Acta*, 103: 140-142.
- Kessler E., Kauer G., Rahat M. 1991. Excretion of the sugar by *Chlorella* species capable and incapable of symbiosis with *Hydra viridis*. *Bot Acta*, 104: 58-63.
- Kessler E., Huss V. A. R. 1992. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (*Chlorophyceae*) strains of the Culture Collection of the University of Texas at Austin. *J Phycol*, 28: 550-553.
- Kinoshita H., Oomori S., Nozaki M., Miwa I. 2009. Timing of establishing symbiosis during the re-infection of *Chlorella* sp. in *Paramecium bursaria*. *JPN J Protozool*, 42: 88-89.
- Kjer K. M. 1995. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs. *Mol Phylogenet Evol*, 4: 314-330.

Kodama Y., Fujishima M. 2005. Symbiotic *Chlorella* sp. of the ciliate *Paramecium bursaria* do not prevent acidification and lysosomal fusion of host digestive vacuoles during infection. *Protoplasma*, 225: 191-203.

Kodama Y., Nakahara M. Fujishima M. 2007. Symbiotic alga *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria* shows temporary resistance to host lysosomal enzymes during the early infection proces. *Protoplasma*, 230: 61-67.

Kodama Y., Fujishima M. 2008. Cycloheximide induces synchronous swelling of perialgal vacuoles enclosing symbiotic *Chlorella vulgaris* and digestion of the algae in the ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist*, 159: 483-494.

Kodama Y., Fujishima M. 2009. Localization of perialgalvacuoles beneath the host cell surface is not a prerequisite phe-nomenon for protection from the host's lysosomal fusion in the ciliate *Paramecium bursaria*. *Protist*, 160: 319-329.

Kodama Y., Fujishima M. 2010. Secondary symbiosis between *Paramecium* and *Chlorella* cells [w:] *International Review of Cell and Molecular Biology*, red. Jeon K.W. Wyd. Inc., San Diego, Burlington, London, Amsterdam, 2: 33-77.

Kodama Y., Fujishima M. 2011. Four important cytological events needed to establish endosymbiosis of symbiotic *Chlorella* sp. to the alga-free *Paramecium bursaria*. *JPN J Protozool*, 1: 1-20.

Kodama Y., Suzuki H., Dohra H., Sugii M., Kitazume T., Yamaguchi K., Shigenobu S., Fujishima M. 2014. Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. *BMC Genomics*, 15: 183.

Kondo T., Strayer C. A., Kulkarni R. D., Taylor W., Ishiura M., Golden S. S., Johnson C. H. 1993. Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci*, 90: 5672-5676.

Kornmann P. 1973. *Codiolophyceae*, a new class of *Chlorophyta*. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 25: 1–13.

- Kovacević G., Franjevic D., Jelencic B., Kalafatic M. 2010. Isolation and cultivation of endosymbiotic algae from green *Hydra* and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequences. *Folia Biol (Kraków)*, 58: 135-143.
- Kovarik A., Pires J. C., Leitch A. R., Lim K. Y., Sherwood A. M., Matyasek R., Rocca J., Soltis D. E., Soltis P. S. 2005. Rapid concerted evolution of nuclear ribosomal DNA in two *Tragopogon* allopolyploids of recent and recurrent origin. *Genetics*, 169: 931-944.
- Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A., Janzen D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci*, 102: 8369-8374.
- Kress W. J., Erickson D. L., Jones F. A., Swenson N. G., Perez R. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proc Natl Acad Sci*, 106: 18621-18626.
- Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D., Huss V.A.R., Rohr T., Wolf M. 2004. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*). *Phycologia*, 43: 529-542.
- Kroken S., Taylor J. W. 2000. Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green algae *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist*, 103: 645-660.
- Kvitko K. V., Migunova A. V., Karelov D. V., Prokosheva MJu. 2001. Molecular taxonomy of virus-sensitive *Chlorella* sp. symbionts of *Paramecium bursaria*. *Protistology*, 2: 96-104.
- Leliaert F., Smith D. R., Moreau H., Herron M. D., Verbruggen H., Delwiche C. F., De Clerck O. 2012. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31: 1-46.
- Letsch M. R., Muller-Parker G., Friedl T., Lewis L. A. 2009. *Elliptochloris marina* sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), symbiotic green alga of the temperate pacific sea anemones *Anthopleura xanthogrammica* and *A. elegantissima* (*Anthozoa*, *Cnidaria*). *J Phycol*, 45: 1127-1135.

- Levin R. A., Wagner W. L., Hoch P. C. 2003. Family-level relationships of *Onagraceae* based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data. *Am J Bot*, 90: 107-115.
- Lew R. R. 1989. Calcium activates an electrogenic proton pump in *Neurospora* plasma membrane. *Plant Physiol*, 91: 213-216.
- Lewis L. A., McCourt R. M. 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot*, 91: 1535-1556.
- Lewis L. A., Muller-Parker G. 2004. Phylogenetic placement of “Zoochlorellae” (*Chlorophyta*), algal symbiont of the temperate sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Biol Bull*, 207: 87-92.
- Li W. H. 1997. Molecular evolution. Sinauer Associates: Sunderland, MA.
- Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Lindstrom S. C. 2008. Cryptic diversity and phylogenetic relationships within the *Mastocarpus papillatus* species complex (*Rhodophyta*, *Phyllophoraceae*). *J Phycol*, 44: 1300-1308.
- Linz B., Linz A., Migunova A. V., Kvitko K. V. 1999. Correlation between virus-sensitivity and isoenzyme spectrum in symbiotic *Chlorella*-like algae. *Protistology*, 1: 76-78.
- Lipiński D., Nuc K., Pławski A., Słomski R., Wolko Ł. 2008. Sekwencjonowanie DNA [w:] *Analiza DNA – teoria i praktyka*, red. Słomski R. Wyd. UP, Poznań, 405-419.
- Loefer J. B. 1936. Isolation and growth characteristics of the „zoochlorella” of *Paramecium bursaria*. *Am Nat*, 70: 184-188.
- Luo W., Pflugmacher S., Pröschold T., Walz, N., Krienitz L. 2006. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*). *Protist*, 157: 315-333.
- Luo W., Pröschold T., Bock, C., Krienitz, L. 2010. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*). *Plant Biology*, 12: 545-553.



- Margulis L. 1981. Symbiosis in cel evolution. *W. H. Freeman*, San Francisco.
- Margulis L. 1988. Serial endosymbiotic theory (SET): Undulipodia, mitosis and their microtubule systems preceded mitochondria. *Internalt J of Endocytobiosis and Cell Research*, 5: 133-162.
- Margulis L., Sagan D. 2002. Acquiring genomes: A theory of the origin of species. *Basic Books*, Nowy Jork.
- Marin B., Palm A., Klingberg M., Melkonian M. 2003. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist*, 154: 99-145.
- Marin B., Melkonian M. 2010. Molecular phylogeny and classification of the *Mamiellophyceae* class. nov. (*Chlorophyta*) based on sequence comparisons of the nuclear- and plastid-encoded rRNA operons. *Protist*, 161: 304–336.
- Maruyama S., Misumi O., Ishii Y. 2004. The minimal eukaryotic ribosomal DNA units in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res*, 11: 83-91.
- Mattox K. R. Stewart K. D. 1984. Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology [w:] *The systematics of green algae*, red. Irvine D. E. G., John D. M. Wyd. Academic Press, London, 29–72.
- McAuley J. P., Dorling M., Hodge H. 1996. Effect of maltose release on uptake and assimilation of ammonium by symbiotic *Chlorella* (*Chlorophyta*). *J Phycol*, 32: 839-846.
- Meier R., Wiessner W. 1989. Infection of algae-free *Paramecium bursaria* with symbiotic *Chlorella sp.* isolated from green *paramecia* II: a time study. *J Cell Sci*, 93: 571-579
- Melkonian M. 1982. Structural and evolutionary aspects of the flagellar apparatus in green algae and land plants. *Taxon*, 31: 255-265.

- Melkonian M. 1984. Flagellar apparatus ultrastructure in relation to green algal classification [w:] *Systematics of the green algae*, red. Irvine D. E. G., John D. M. Wyd. Academic Press, London, 73-120.
- Miao M., Warren A., Song W. B., Wang S., Shang H. M. Chen Z. G. 2008. Analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of scuticociliates and related taxa (*Ciliophora*, *Oligohymenophora*) to infer their evolution and phylogeny. *Protist*, 159: 519-533.
- Miwa I., Kanazawa Y., Ishikawa K., Hirose M. 1989. Synchronization of mating reactivity rhythms in populations of *Paramecium bursaria*. *J Protozool*, 36: 24-28.
- Miwa I. 2009. Regulation of circadian rhythms of *Paramecium bursaria* by symbiotic *Chlorella* species [w:] *Endosymbionts in Paramecium*, red. Fujishima M. Wyd. Springer-Verlag, Berlin, 83-110.
- Müller K. M., Ellenor D. W., Sherwood A. R., Sheath R. G., Cannone J. J., Gutell R. R. 2005. Evidence for lateral transfer of an IE intron between fungal and red algal small subunit rRNA Genes. *J Phycol*, 41: 380-390.
- Muscatine L., Karakashian S. J., Karakashian M. W. 1967. Soluble extracellular products of algae symbiotic with a ciliate, a sponge and a mutant *Hydra*. *Comp Biochem Physiol*, 20: 1-12.
- Nakahara M., Handa S., Watanabe S., Deguchi H. 2004. *Choricystis minor* as a new symbiont of simultaneous two-species association with *Paramecium bursaria* and implications for its phylogeny. *Symbiosis*, 36: 127-151.
- Nakayama T., Watanabe S., Mitsui S., Uchida H., Inouye I. 1996. The phylogenetic relationship between the *Chlamydomonadales* and *Chlorococcales* inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycol Res*, 44: 47-55.
- Nichols S. A. 2005. An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class *Demospongiae* using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I. *Mol Phylogenet Evol*, 34: 81-96.

- Nieto Feliner G., Rosselló J.A. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Mol Phylogenet Evol*, 44: 911-919.
- Nishihara N., Horiike S., Takahashi T., Kosaka T., Shigenaka Y., Hosoya H. 1998. Cloning and characterization of endosymbiotic algae isolated from *Paramecium bursaria*. *Protoplasma*, 203: 91-99.
- Nowack E. C. M., Melkonian M. 2010. Endocytobiotic associations within protists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365: 699-712.
- Odintsova M. S., Yurina N. P. 2006. Chloroplast genomics of land plants and algae [w:] *Biotechnological applications of photosynthetic proteins: biochips, biosensors and biodevices*, red. Giardi M. T., Piletska E. V. Wyd. Landes bioscience, 58-72.
- Ota S., Li W. H. 2000. NJML: a hybrid algorithm for the neighbor-joining and maximum-likelihood methods. *Mol Biol Evol*, 17(9): 1401-1409.
- Pace N. R., Olsen G. J., Woese C. R. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*, 45: 325-326.
- Park K. C., Whitney C. G., Kozera C., O'Leary S. J., McGinn P. J. 2015. Seasonal isolation of microalgae from municipal wastewater for remediation and biofuel applications. *J App Microbiol*, 119(1): 76-87.
- Patwardhan A., Ray S., Roy A. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Phylogen Evolution Biol*, 2: 1-9.
- Peterson J., Teich R., Becker B., Cerff R., Binkmann H. 2006. The *GapA/B* gene duplication marks the origin of *Streptophyta* (charophytes and land plants). *Mol Biol Evol*, 23: 1109-1118.
- Pickett-Heaps J. D. 1975. Green algae: Structure, reproduction and evolution in selected genera. *Sinauer Associates*, Sunderland, USA.
- Piercey-Normore M. D., DePriest P. T. 2001. Algal switching among lichens symbioses. *Am J Bot*, 88: 1490-1498.

- Pröschold T., Leliaert F. 2007. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches [w:] *Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics*, red. Brodie J., Lewis J. Wyd. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Pröschold T., Darienko T., Silva P.C., Reisser W., Krienitz L. 2011. The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach. *Environ Microbiol*, 13: 350-364.
- Provan J., Murphy S., Maggs C.A. 2004. Universal plastid primers for Chlorophyta and Rodophyta. *Europ J Phycol*, 39: 43-50.
- Pupko T., Huchon D., Cao Y., Okada N., Hasegawa M. 2002. Combining Multiple Data Sets in a Likelihood Analysis: Which Models are the Best? *Mol Biol Evol*, 19: 2294-2307.
- Rahman M. T., Uddin M. S., Sultana R., Moue A., Setu M. 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *AKMMC J*, 4(1): 30-36.
- Rajević N., Kovačević G., Kalafatić M., Gould S. B., Martin W. F., Franjević D. 2015. Algal endosymbionts in European Hydra strains reflect multiple origins of the zoochlorella symbiosis. *Mol Phylogent Evol*, 55-62.
- Reisser W. 1975. Zur Taxonomie einer auxotrophen *Chlorella* aus *Paramecium bursaria*. *J Cell Sci*, 71: 121-140.
- Reisser W. 1976. Die stoffwechselphysiologischen Beziehungen zwischen *Paramecium bursaria* Ehrbg. und *Chlorella* spec. in der *Paramecium bursaria*-Symbiose I: der Stickstoff- und der Kohlenstoff-Stoffwechsel. *Arch. Microbiol*, 107: 357-360.
- Reisser W. 1980. The metabolic interactions between *Paramecium bursaria* Ehrbg. and *Chlorella* spec. in the *Paramecium bursaria*-symbiosis III. The influence of different CO<sub>2</sub> concentrations and of glucose on the photosynthetic and respiratory capacity of the symbiotic unit. *Arch Microbiol*, 125: 291-293.
- Reisser W. 1984. The taxonomy of green algae endosymbiotic in ciliates and a sponge. *Br Phycol J*, 19: 309-318.
- Reisser W. 1986. *Progress in Protistology*, 1: 195-214

- Reisser W. 1988. Signals in *Paramecium bursaria* – *Chlorella* sp. – association [w:] *Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis*, red. Scannerini S., Smith D., Bonfante-Fasolo P., Gianinazzi-Pearson V. Wyd. Springer, Berlin, 281-296.
- Reisser W., Burbank D.E., Meints S.M., Meints R.H., Becker B., van Etten J.L. 1988a. A comparison of viruses infecting two different *Chlorella*-like green algae. *Virology*, 167: 143-149.
- Reisser W., Vietze S., Widowski M. 1988b. Taxonomic studies on endocytobiotic chlorophycean algae isolated from different American and European strains of *Paramecium bursaria*. *Symbiosis*, 6: 253-270
- Reisser W., Widowski M. 1992. Taxonomy of eukaryotic algae endosymbiotic in freshwater associations [w:] *Algae and Symbioses*, red. Reisser W. Wyd. Biopress, 21-40.
- Reyes-Prieto A., Hackett J. D., Soares M. B., Bonaldo M. F., Bhattacharya D. 2006. Cyanobacterial contribution to algal nuclear genomes is primarily limited to plastid functions. *Current Biology*, 16: 2320-2325.
- Reyes-Prieto A., Moustafa A., Bhattacharya D. 2008. Multiple genes of apparent algal origin suggests ciliates may once have been photosynthetic. *Current Biology*, 18: 956-962.
- Rickauer M., Tanner W. 1986. Effect of  $Ca^{2+}$  on amino acid transport/accumulation in roots of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol*, 82: 41-46.
- Rokas A., Carroll S. B. 2005. More Genes or More Taxa? The Relative Contribution of Gene Number and Taxon Number to Phylogenetic Accuracy. *Mol Biol Evol*, 22(5): 1337-1344.
- Rosenberg J. N., Kobayashi N., Barnes A., Noel E. A., Btenbaugh M. J., Oyler G. A. 2014. Comparative Analyses of Three *Chlorella* Species in Response to Light and Sugar Reveal Distinctive Lipid Accumulation Patterns in the Microalga *C. sorokiniana*. *PLoS ONE*, 9(4): 1-13.

- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406-425.
- Saji M., Oosawa F. 1974. Mechanism of photoaccumulation in *Paramecium bursaria*. *J Protozool*, 21: 556-561.
- Savolainen V., Cowan R. S., Vogler A. P., Roderick G. K., Lane R. 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Phil Trans R Soc Lond B*, 360: 1850-1811.
- Schmidt S. K., Lynch R. C., King A. J., Karki D., Robeson M. S., Nagy L., Williams M.W., Mitter M. S., Freeman K. R. 2011. Phylogeography of microbial phototrophs in the dry valleys of the high Himalayas and Antarctica. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 278: 702-708.
- Schnepf E., Deichgraber G., Glaab M., Hegewald E. 1980. Bristles and spikes in Chlorococcales: Ultrastructural studies in *Acanthosphaera*, *Micractinium*, *Pediastrum*, *Polyedriopsis*, *Scenedesmus*, and *Siderocystopsis*. *J Ultrastruct Res*, 72: 367-379.
- Shihira I., Krauss R. W. 1965. *Chlorella*. Physiology and Taxonomy of Forty-one Isolates. Maryland, 97.
- Siegel R. W. 1960. Hereditary endosymbiosis in *Paramecium bursaria*. *Exptl Cell Res*, 19: 239-252.
- Skage M., Gabrielsen T. M., Rueness J. 2005. A molecular approach to investigate the phylogenetic basis of three widely used species groups in the red algal genus *Ceramium* (*Ceramiales*, *Rhodophyta*). *Phycologia*, 44: 353-60.
- Słomski R. 2011. Pobieranie materiału biologicznego. Przechowywanie i przewożenie próbek [w:] *Analiza DNA – teoria i praktyka*, red. Słomski R. Wyd. UP, Poznań, 41-43.
- Słomski R., Szalata M., Wolko Ł., Wielgus K. 2011a. Izolacja DNA [w:] *Analiza DNA – teoria i praktyka*, red. Słomski R. Wyd. UP, Poznań, 44-53.
- Słomski R., Szalata M., Wielgus K. 2011b. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) [w:] *Analiza DNA – teoria i praktyka*, red. Słomski R. Wyd. UP, Poznań, 131-142.

- Słomski R., Szalata M., Walkowiak B. 2011c. Elektroforeza kwasów nukleinowych [w:] *Analiza DNA – teoria i praktyka*, red. Słomski R. Wyd. UP, Poznań, 65-81.
- Słomski R., Nuc K., Pławski A., Lipiński D., Wolko Ł. 2011d. Sekwencjonowanie DNA [w:] *Analiza DNA – teoria i praktyka*, red. Słomski R. Wyd. UP, Poznań, 405-418.
- Smith I. K. 1978. Role of calcium in serine transport into tobacco cells. *Plant Physiol*, 62: 941-948.
- Soltis D. E., Soltis P. S., Endress P. K., Chase M. W. 2005. Phylogeny and evolution of the angiosperms. *Sinauer*, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Sommaruga R., Sonntag B. 2009. Photobiological aspects of the mutualistic association between *Paramecium bursaria* and *Chlorella* [w:] *Endosymbionts in Paramecium*, red. Fujishima M. Wyd. Springer-Verlag GmbH, 111-130.
- Sonneborn T. M., Dippell R. V. 1946. Mating reaction and conjugation between varieties of *Paramecium aurelia* in relation to conceptions of mating type and variety. *Physiol Zool*, 19: 1-18.
- Sonneborn T. M. 1970. Methods in *Paramecium* research [w:] *Methods in Cell Biology*, red. Prescott E. D. M. Wyd. Acad Press, Nowy Jork, 4: 241-339.
- Sudman M. S. 1974. Protothecosis: Critical review. *Am J Clin Pathol*, 61: 10-19.
- Summerer M., Sonntag B., Sommaruga R. 2007. An experimental test of the symbiosis specificity between the ciliate *Paramecium bursaria* and strains of the unicellular green alga *Chlorella*. *Environ Microbiol*, 9: 2117-2122.
- Summerer M., Sonntag B., Sommaruga R. 2008. Ciliate-symbiont specificity of freshwater endosymbiotic *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). *J Phycol*, 44: 77-84.
- Summerer M., Sonntag B., Hörtnagl P., Sommaruga R. 2009. Symbiotic ciliates receive protection against UV damage from their algae: a test with *Paramecium bursaria* and *Chlorella*. *Protist*, 160: 233-243.

- Sun G., Huang J. 2011. Horizontally acquired dap pathway as a unit of self-regulation. *J Evol Biol*, 24: 587-595.
- Tafresh A. H., Shariati M. 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J Appl Microbiol*, 107: 14-35.
- Takeda H. 1991. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (*Chlorophyceae*). *J Phycol*, 27: 224-232.
- Takeda H. 1993. Chemical composition of cell walls as a taxonomical marker. *J Plant Res*, 106: 195-200.
- Takeda H. 1995. Cell wall composition and taxonomy of symbiotic *Chlorella* from *Paramecium* and *Acanthocystis*. *Phytochemistry*, 40: 457-459.
- Takeda H., Sekiguchi T., Nunokawa S., Usuki I. 1998. Species-specificity of *Chlorella* for establishment of symbiotic association with *Paramecium bursaria* – Does infectivity depend upon sugar components of the cell wall? *Eur J Protistol*, 34: 133-137.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. 2007. Mega4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 5.1. *Mol Biol Evol*, 24: 1596-1599.
- Tanaka M., Murata-Hori M., Kadono T., Yamada T., Kawano T., Kosaka T., Hosoya H. 2002. Complete elimination of endosymbiotic algae from *Paramecium bursaria* and its confirmation by diagnostic PCR. *Acta Protozool*, 41: 255-261.
- Thomas C. M., Nielsen K. M. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 3: 711-721.
- Tonooka Y., Watanabe T. 2002. A natural strain of *Paramecium bursaria* lacking symbiotic algae. *Europ J Protistol*, 38: 55-58.
- Tremouillaux-Guiller J., Rohr T., Rohr R., Huss V. A. R. 2002. Discovery of an endophytic alga in *Ginkgo biloba*. *Am J Bot*, 89: 727-733.
- Turmel M., Pombert J. F., Charlebois P., Otis C., Lemieux C. 2007. The green algal ancestry of land plants as revealed by the chloroplast genome. *Int J Plant Sci*, 168: 679–689.



Tyler B. M., Tripathy S., Zhang X., Dehal P., Jiang R. H., Aerts A., Arredondo F. D., Baxter L., Bensasson D., Beynon J.L., Chapman J., Damasceno C. M., Dorrance A. E., Dou D., Dickerman A. W., Dubchak I.L., Garbelotto M., Gijzen M., Gordon S. G., Govers F., Grunwald N. J., Huang W., Ivors K. L., Jones R. W., Kamoun S., Krampis K., Lamour K. H., Lee M. K., McDonald W. H., Medina M., Meijer H. J., Nordberg E. K., Maclean D. J., Ospina-Giraldo M. D., Morris P. F., Phuntumart V., Putnam N. H., Rash S., Rose J. K., Sakihama Y., Salamov A. A., Savidor A., Scheuring C. F., Smith B. M., Sobral B. W., Terry A., Torto-Alalibo T. A., Win J., Xu Z., Zhang H., Grigoriev I. V., Rokhsar D. S., Boore J. L. 2006. Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 313: 1261-1266.

Ullmann J. 2006. The difference between *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Algomed*, 1.

Ustinova I., Krienitz L. Huss V.A.R. 2001. *Closteriopsis acicularis* (G.M. Smith) Belcher *et* Swale is a fusiform alga closely related to *Chlorella kessleri* Fott *et* Novakova (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*). *Eur J Phycol*, 36: 341-351.

van den Hoek C., Stam W. T., Olsen J. L. 1988. The emergence of a new chlorophyten system, and Dr. Kornmann's contribution thereto. *Helgol Meeresunters*, 42: 339-383.

van den Hoek C., Mann D. G., Jahns H. M. 1995. Algae: an introduction to phycology. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK.

van Dooren G. G., Schwartzbach S. D., Osafune T., McFadden G. I. 2001. Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim Biophys*, 1541: 34-53.

van Etten J. L., Lane L. C., Meints R. H. 1991. Viruses and virus like particles of eukaryotic algae. *Microbiol Rev*, 55: 586-620.

Vivier E. 1974. Morphology, taxonomy and general biology of the genus *Paramecium* [w:] *Paramecium. A current survey*, red. Wagtendonk W. J. Wyd. Elsevier scientific Publishing Co., USA.

Vorobyev K., Andronov E., Rautian M., Skoblo I., Migunova A., Kvitko K. 2009. An atypical *Chlorella* symbiont from *Paramecium bursaria*. *Protistology*, 6(1): 39-44.

- Waddle J. A., Schuster A. M., Lee K. W., Meints R. H. 1990. The mitochondrial genome of an exsymbiotic *Chlorella*-like green alga. *Plant Mol Biol*, 14: 187-195.
- Wakasugi T., Sugita M., Tsudzuki T. 1998. Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. *Plant Mol Biol Rep*, 16: 231-241.
- Watt W. D., Fogg G. E. 1966. The kinetics of extracellular glycolate production by *Chlorella pyrenoidosa*. *J Exp Bot*, 17: 117-134.
- Wattier R. A., Maggs C. A. 2001. Intraspecific variation in seaweeds: the application of new tools and approaches. *Adv Bot Res*, 35: 171-212.
- Weis D.S. 1978. Correlation of infectivity and concanavalin A agglutinability of algae exsymbiotic from *Paramecium bursaria*. *J Protozool*, 25: 366-370.
- Węgleński P. 2000. Genetyka molekularna. Wyd. PWN SA, Warszawa.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [w:] *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, red. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. Wyd. Academic Press, Inc., New York, 315-322.
- Wichterman R. 1948. The biological effects of X-rays on mating types and conjugation of *Paramecium bursaria*. *Biol Bull*, 93: 201.
- Wilson W. H., van Etten J. L., Schroeder D. S., Nagasaki K., Burssaard C., Delaroque N., Bratbak G., Suttle C. 2005. *Phycodnaviridae* [w:] *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*, red. Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. Wyd. London: Elsevier/Academis Press; 163-175.
- Woese C. R. 2002. On the evolution of cells. *Proc Natl Acad Sci*, 97: 8392-8396.
- Wu H. L., Hseu R. S., Lin L. P. 2001. Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. *Bot Bull Acad Sin*, 42: 115-121.
- Yamada T., Onimatsu H., van Etten J. L. 2006. *Chlorella* viruses. *Adv Virus Res*, 66: 293-336.

- Yamamoto M., Nozaki H., Miyazawa Y., Koide T., Kawano S. 2003. Relationship between presence of a mother cell wall and speciation in the unicellular microalga *Nannochloris* (Chlorophyta). *J Phycol*, 39: 172-84.
- Yamamoto M., Kurihara I., Kawano S. 2005. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta*, 221: 766-775.
- Yaschenko V. V., Gavrilova O. V., Rautian M. S., Jakobsen K. S. 2012. Association of *Paramecium bursaria* Chlorella viruses with *Paramecium bursaria* cells: Ultrastructural studies. *Eur J Protistol*, 48: 149-159.
- Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Fenton B., Tuovinen T. 2000. Species and strain identification of the predatory mite *Euseius finlandicus* by RAPD-PCR and ITS sequences. *Exp Appl Acarol*, 24: 863-880.
- Zagata P., Greczek-Stachura M., Tarcz S., Rautian M. 2016. The evolutionary relationships between endosymbiotic green algae of *Paramecium bursaria* syngens originating from different geographical locations. *Folia Biol (Kraków)*, 64(1): 47-54.
- Zimmer E. A. 1989. Ribosomal RNA phylogenies and flowering plant evolution [w:] *The hierarchy of life*, red. Fernholm B., Bremer K., Jornvall H. Wyd. Elsevier, Amsterdam.
- Zurawski G., Clegg M. T. 1987. Evolution of Higher-Plant Chloroplast DNA-Encoded Genes: Implications for Structure-Function and Phylogenetic Studies. *Ann Rev Plant Physiol*, 38: 391-418.