

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Botanika



**Bc. Lukáš Janošík**

Evolúcia morfológie askospór a ich šírenie u bryofilných zástupcov radu Pezizales  
Evolution of ascospore morphology and their dispersal in bryophilous Pezizales

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Praha, 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 8. 2020

.....  
Bc. Lukáš Janošík

## PodĎakovanie

V prvom rade by som sa rád poĎakoval môjmu školiteľovi, Ondřejovi Koukolovi, za množstvo hodnotných rád, pripomienok, trpezlivosti a všetok drahocenný čas, ktorý mi venoval. Za pomoc s prietokovou cytometriou a množstvo cenných rád pri štúdiu veľkosti genómu Ďakujem Tereze Veselskej, Zuzane Chumovej, Pavlovi Trávníčkovi a Miroslavovi Kolaříkovi. Zuzane Chumovej pritom patrí moja veľká vĎaka aj za jej obetavé korektúry. Za pomoc s identifikáciou ťažko určiteľných machorastov Ďakujem Janovi Kučerovi a Janovi Ecksteinovi. Za zasvätenie do sveta machorastov a pomoc z bryologickou literatúrou Ďakujem patrí moja vĎaka Zdeňkovi Soldánovi. Marcelovi Vegovi som vĎačný za zaslanie cenného materiálu, pomoc v teréne a mnohé podnetné otázky. Za poskytnutie údajov k vybraným sekvenciám a množstvo diskusií o bryofilných Pezizales Ďakujem Zuzane Sochorovej. Za štatistické konzultácie Ďakujem Martinovi Weisserovi. Ďalej Ďakujem aj Grantovej agentúre Univerzity Karlovy za finančnú podporu projektu (GAUK 1380119). Moje veľké poĎakovanie pritom patrí Kláre Daňkovej, za jej pomoc v terén, s korektúrami, ale predovšetkým za to, že je mojou chápvou a tolerantnou partnerkou, pre ktorú je snáď každý živý organizmus niečím zaujímavý. V neposlednej rade ale patrí veľké poĎakovanie aj mojim rodičom, súrodencom a celej mojej rodine a kamarátom, ktorí ma k poznávaniu živej prírody priviedli.

## Abstrakt

Bryofilní zástupcovia radu Pezizales predstavujú druhovo bohatú skupinu húb úzko viazaných na machorasty. Vyznačujú sa veľmi rozmanitou morfológiou askospór, širokým rozsahom veľkosti genómu a rôznorodou ekológiou. Mali by tak byť aj zaujímavým modelovým systémom pre výskum evolúcie morfológie askospór a ich šírenia. Cieľmi mojej práce bolo zistiť, či morfológia askospór závisí na veľkosti genómu, počte jadier v askospórach, ekológii hostiteľských machorastov a experimentálne tiež otestovať, ako morfológia askospór ovplyvňuje ich aktívne vystreľovanie.

Sledoval som 52 druhov bryofilných Pezizales. Na základe sekvencií troch úsekov DNA som zrekonštruoval fylogenezu sledovaných druhov, ktorú som využil pri testovaní vzťahov medzi jednotlivými premennými pomocou metódy fylogenetických generalizovaných najmenších štvorcov. Väčšinu druhov som úspešne podrobil morfometrickej analýze a meraniu veľkosti genómu prietokovou cytometriou, a fluorescenčnou mikroskopiou som u nich stanovil počet jadier. Určil som miesto pripojenia infekčného aparátu a do analýz som zahrnul aj ekologické charakteristiky hostiteľských machorastov. Pomocou experimentov s horizontálnym vystreľovaním askospór som sledoval, do akej vzdialenosti sú askospóry aktívne vystrelené a či sú vystreľované samostatne, alebo tvoria klastre niekoľkých askospór.

Veľkosť genómu a aj počet jadier mali výrazný pozitívny vplyv na objem askospór. Objem askospór u bryofilných Pezizales tak zjavne závisí na celkovom množstve DNA, ktoré sa v askospórach nachádza. Objem askospór závisel ale aj na tolerancii hostiteľských machorastov k vysokým teplotám, a väčší objem by u niektorých druhov mohol byť adaptáciou na život v teplejšom prostredí. Výška ornamentiky, pokrytie povrchu askospór ornamentikou a tvar askospór výrazne záviseli najmä na mieste pripojenia infekčného aparátu. Askospóry druhov napojených na rhizoidy boli guľovitejšie a mali výraznejšiu ornamentiku. Ornamentika askospór by pritom teoreticky mohla pomáhať týmto druhom rozširovať svoje askospóry k podzemným orgánom hostiteľov pomocou pôdnych bezstavovcov. Sledované druhy sa výrazne líšili aj v tom, či vystreľovali askospóry samostatne, alebo ako väčšie klastre. Žiadna testovaná morfológická charakteristika ale tieto rozdiely vysvetliť nedokázala. Väčšie projektily boli aktívne vystrelené výrazne ďalej, pričom veľkosť projektilu a teda aj vzdialenosť ich vystrelenia môžu byť ovplyvnená buď priamo objemom askospóry (vrátane jej ornamentiky), alebo vystreľovaním askospór vo forme klastrov. Tvar askospór prekvapivo nemal u sledovaných druhov zreteľný vplyv na vzdialenosť do akej boli vystrelené.

Morfológia askospór bryofilných Pezizales a ich vystreľovanie sú teda na základe mojich výsledkov výrazne ovplyvnené viacerými rôznymi faktormi a minimálne časť ich diverzity by mohla odrážať rozdielne niky daných druhov a špecifické selekčné tlaky, ktoré na nich pôsobia.

**Kľúčové slová:** Pezizales, Ascomycota, machorasty, morfológia askospór, veľkosť genómu, počet jadier, ekológia hostiteľa, vystreľovanie askospór

## **Abstract**

Bryophilous Pezizales represent a species-rich group of fungi closely associated with bryophytes. Their ascospore morphology is highly variable and they strongly differ also in the genome size and ecology. They could thus represent an interesting model system for the research of evolution of ascospore morphology and their dispersal. The aims of my thesis were to test whether their genome size, number of nuclei in ascospores and ecology of host bryophyte influence their ascospore morphology and to experimentally test the effect of ascospore morphology on their active dispersal.

I studied 52 species of bryophilous Pezizales. I reconstructed their phylogeny based on the sequences of three DNA regions, which I then used for the testing of relationships between individual variables using the phylogenetic generalized least squares. For the majority of species, I obtained measurements from morphometric analysis, genome size measurements using flow cytometry, and determined the number of nuclei in their ascospores using the fluorescent microscopy. I localised the infection apparatus and included also the ecological characteristics of the host bryophytes into the analyses. Using the experiments with horizontal ascospore discharge, I measured the distance of active ascospore ejection and recorded whether these fungi discharge their ascospore individually, or in clusters of several ascospores.

Genome size and the number of nuclei had a strong positive effect on ascospore volume. The ascospore size in bryophilous Pezizales appears to be strongly influenced by the total DNA content of the ascospore. The ascospore volume was influenced also by the heat tolerance of the host bryophyte, with the larger ascospores of some species representing a possible adaptation to warmer environment. The ornamentation height, ornamentation coverage of ascospore surface, and ascospore shape depended mostly on the place of the attachment of infection apparatus. Ascospores of species attached to the rhizoids were more globose and strongly ornamented. Ornamentation of ascospores could theoretically help these species with their dispersal by the soil invertebrates. Studied species strongly differed also in the formation of ascospore clusters, however none of the tested morphological characteristics could explain this difference. Larger projectiles were actively discharged significantly further, and the total projectile volume can be influenced either directly by the ascospore volume (including the ornamentation) or by ejection of ascospores clumped into clusters. Surprisingly, the ascospore shape had no apparent effect on the distance its ejection in the studied species.

Ascospore morphology of bryophilous Pezizales and their dispersal appears to be influenced by various factors and at least a portion of the observed diversity could reflect differences in the niches of individual species and the specific selective pressures that affect them.

**Key words:** Pezizales, Ascomycota, bryophytes, ascospore morphology, genome size, number of nuclei, host ecology, ascospore discharge

# Obsah

1	Úvod	1
1.1	Šírenie askospór vrekatých húb	1
1.2	Morfologická diverzita askospór	2
1.3	Bryofilní zástupcovia radu Pezizales	4
1.3.1	Druhovú diverzita	4
1.3.2	Morfológia plodníc	4
1.3.3	Vzťah s machorastami	6
1.3.4	Morfológia askospór a počet jadier	8
1.3.5	Veľkosť genómu	10
1.3.6	Rozšírenie a ekológia	10
2	Ciele	12
3	Metodika	13
3.1	Výber sledovaných druhov, zber materiálu	13
3.2	Molekulárne fylogenetické analýzy	13
3.2.1	Izolácia DNA	14
3.2.2	PCR	14
3.2.3	Prečísťovanie PCR produktu a sekvenácia	15
3.2.4	Spracovanie získaných sekvencií a alignment	16
3.2.5	Bayesovská analýza (BA)	16
3.2.6	Maximálna vierohodnosť ( <i>Maximum Likelihood</i> – ML)	17
3.2.7	Tvorba ultrametrickeho fylogenetického stromu	17
3.2.8	Vizualizácia znakov na fylogenetickom strome	17
3.3	Morfometrická analýza askospór	18
3.3.1	Mikroskopické merania	18
3.3.2	Výpočet objemu askospór	18
3.4	Veľkosť genómu	19
3.4.1	Príprava vzoriek	19
3.4.2	Meranie prietokovou cytometriou a spracovanie dát	19
3.4.3	Štandardizácia	19
3.5	Počet jadier v askospórach	20
3.5.1	Fluorescenčná mikroskopia	20
3.5.2	Vplyv počtu jadier na veľkosť askospór	20
3.6	Hostiteľské machorasty a ich vzťah s morfológiou askospór	20
3.6.1	Identifikácia hostiteľa a sledovanie infekčného aparátu	20
3.6.2	Ekologické charakteristiky hostiteľských machorastov	21
3.7	Aktívne vystreľovania askospór	21
3.7.1	Tvorba klastrov askospór	23
3.7.2	Vplyv veľkosti klastru askospór na vzdialenosť jeho vystrelenia	24
3.7.3	Vplyv morfológie askospór na vzdialenosť ich vystrelenia	24
3.8	Štatistické vyhodnotenie	24
4	Výsledky	26
4.1	Molekulárne fylogenetické analýzy	26
4.2	Charakteristika morfológie askospór sledovaných druhov	28
4.3	Veľkosť genómu	33

4.3.1	Meranie prietokovou cytometriou .....	33
4.3.2	Veľkosť genómu sledovaných druhov .....	36
4.3.3	Vplyv veľkosti genómu na objem askospór .....	37
4.4	Počet jadier v askospórach .....	38
4.4.1	Fluorescenčná mikroskopia .....	38
4.4.2	Vplyv počtu jadier na objem askospór .....	41
4.5	Hostiteľské machorasty a ich vzťah s morfológiou askospór.....	43
4.5.1	Objem askospór .....	44
4.5.2	Výška ornamentiky.....	46
4.5.3	Relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou .....	47
4.5.4	Q hodnota.....	49
4.6	Aktívne vystreľovanie askospór .....	51
4.6.1	Tvorba klastrov askospór.....	51
4.6.2	Vplyv veľkosti klastru na vzdialenosť jeho vystrelenia .....	53
4.6.3	Vplyv morfológie askospór na vzdialenosť ich vystrelenia .....	55
5	Diskusia.....	60
5.1	Fylogéniza bryofilných zástupcov radu Pezizales .....	60
5.2	Veľkosť genómu a vplyv na objem askospór.....	60
5.3	Počet jadier v askospórach a vplyv na objem askospór.....	62
5.4	Vzťah medzi hostiteľskými machorastami a morfológiou askospór.....	63
5.5	Sledovanie vystreľovania askospór .....	64
5.6	Limitácie práce .....	67
6	Záver.....	68
7	Literatúra .....	70
8	Prílohy .....	77

# 1 Úvod

## 1.1 Šírenie askospór vreckatých húb

Mnohé druhy húb osídľujú špecifické substráty, a na to, aby boli schopné obsadiť v heterogénnej krajine nové lokality, musia často prekonávať veľké vzdialenosti. Väčšina z nich využíva k šíreniu výtrusy a výnimkou nie je ani druhovo najbohatšie oddelenie húb, vreckaté huby (Ascomycota). Tie k svojmu rozširovaniu využívajú askospóry (pohlavné výtrusy) a často tiež konídie (nepohlavné výtrusy) (Ingold, 1971). Askospóry vznikajú v špecializovaných bunkách – vreckách, v ktorých sa po meióze a následnej mitóze tvorí obvykle osem haploidných askospór. Bližšie informácie o funkcii a diverzite vreciek sú sumarizované napríklad aj v práci Koukol (2015).

Pohyb askospór pri ich šírení sa dá typicky rozdeliť na tri základné časti: aktívne vystrelenie, pasívne šírenie vzdušnými prúdmi a zachytenie na substráte (Ingold, 1971). K aktívnemu vystreľovaniu askospór pritom slúžia práve vrecká. Tie totiž nie sú len bunkami, v ktorých askospóry vznikajú, ale plnia aj úlohu miniatúrnych kanónov, ktoré askospóry aktívne vystreľujú do okolia (Ingold, 1971; Trail, 2017). U väčšiny vreckatých húb je pritom cieľom aktívneho vystreľovania askospór predovšetkým prekonať vrstvu nehybného vzduchu nad ich plodnicami (Pringle et al. 2017). V dôsledku trenia je totiž vzduch tesne nad povrchom plodníc prakticky nehybný. Konkrétna hrúbka tejto vrstvy závisí okrem iného aj na klimatických podmienkach, a počas slnečného dňa by sa mala pohybovať približne v ráde desiatín až jednotiek milimetrov (Gregory, 1961; Pringle et al. 2017). Následne sú už askospóry zachytené vzdušnými prúdmi, ktoré ich potom ďalej rozširujú na veľké vzdialenosti do okolia. Výnimkou sú napríklad rôzne línie vreckatých húb tvoriace podzemné plodnice, ktoré schopnosť aktívneho vystreľovania askospór sekundárne stratili (Ingold, 1971). Niektoré koprofilné druhy zase svoje askospóry aktívne vystreľujú až do vzdialenosti niekoľkých desiatok centimetrov priamo na povrch okolitej vegetácie, kde by mali byť následne spasené herbivormi (Ingold, 2001; Yafetto et al., 2008). Zásadný vplyv na vzdialenosť vystrelenia askospór by pritom mala mať ich veľkosť (Ingold, 1961; Pringle et al., 2017). Experimentálne ale bola táto závislosť testovaná len ojedinele a u niektorých skupín vreckatých húb nie je medzi veľkosťou askospór a vzdialenosťou ich vystrelenia žiadny zrejmy vzťah (Garrett, 1971; Walkey & Harvey, 1966).

Zásadný vplyv na šírenie húb môže mať aj spôsob akým sú vystreľované. V niektorých prípadoch totiž askospóry po vystrelení neletia z vrecka ako samostatné projektily, ale zostanú spojené vo forme klastru niekoľkých askospór (Garrett, 1971; Walkey & Harvey, 1966). Takýto projektil je väčší, a mal by tak byť aj ďalej aktívne vystrelený (Pringle et al., 2017). U niektorých vreckatých húb síce tento vzťah zjavne platí (Garrett, 1971; Ingold 1959; Walkey & Harvey, 1966), no merania vzdialenosti vystrelenia rôzne veľkých



klastrov askospór u mnohých iných druhov žiadnu takúto závislosť nezaznamenali (Garrett, 1971; Walkey & Harvey, 1966). Informácie o tom či jednotlivé druhy vystreľujú askospóry samostatne alebo vo forme väčších zhlukov sú však známe len u zlomku druhov vreckatých húb. Askospóry pritom môžu byť viditeľne pevne spojené už vo vrecku, ako je tomu napríklad u rodu *Saccobolus* (van Brummelen, 1967), prípadne môžu tvorbu väčších zhlukov zabezpečovať aj ich slizové obaly výtrusov či privesky na ich povrchu (Buller, 1922; Czymbek & Klomparens, 1992; Ingold 1933).

Mnohé druhy vreckatých húb dokážu vystreľovať askospóry hromadne a v priebehu zlomku sekundy u nich dochádza k synchronizovanému vystreleniu askospór, bežne aj z tisícov vreciek (Roper et al., 2010). Vystrelené askospóry by mali rozpochybovať vrstvu vzduchu nad plodnicou a vytvoriť stúpajúci prúd vzduchu. To má potom za následok, že askospóry doletia v priemere až niekoľkonásobne ďalej, ako keby ich vrecká vystrelili nezávisle na sebe. Tento jav sa označuje ako *puffing* a obzvlášť často sa vyskytuje u vreckatých húb tvoriacich väčšie apothécia. To, ako výrazne zvyšuje hromadné vystreľovanie vzdialenosť doletu askospór, by malo pritom závisieť predovšetkým na počte synchronizovane vystrelených askospór, a u druhov s väčšími plodnicami a väčším počtom vreciek by tak mal byť efekt výraznejší.

## 1.2 Morfológická diverzita askospór

Askospóry sú u vreckatých húb dôležitým a často používaným taxonomickým znakom. Vyznačujú sa totiž veľmi rozmanitou morfológiou a výrazne sa medzi druhmi líšia vo veľkosti, tvare, ornamentike na svojom povrchu, počte buniek, prítomnosti rôznych priveskov a mnohých ďalších znakov. Čo je ale príčinou tejto morfologickej diverzity askospór je už známe len vo veľmi obmedzenej miere.

Jedným z najzásadnejších selekčných tlakov pôsobiacich na tvar askospór je zrejme snaha o minimalizáciu odporu vzduchu, ktorý na nich pôsobí (Roper et al., 2008). Väčšina vreckatých húb, ktoré aktívne vystreľujú askospóry, má totiž tvar veľmi blízky rotačnému elipsoidu s minimálnym možným odporom vzduchu. Naopak druhy, ktoré aktívne askospóry nevystreľujú alebo sú rozširované hmyzom, majú tvar výrazne odlišný a často sú napríklad guľovité (Roper et al., 2008).

Zo spôsobu šírenia vreckatých húb vyplývajú aj určité veľkostné obmedzenia. Askospóry by mali byť dosť veľké na to, aby po vystrelení dokázali prekonať vrstvu nehybného vzduchu nad plodnicou, ale zároveň by nemali byť príliš ťažké a veľké, aby ich ešte boli schopné vzdušné prúdy zachytiť a ďalej pasívne unášať (Roper et al., 2008). U guľovitých askospór by sa napríklad teoreticky mal pohybovať ich polomer v rozmedzí 1,8 – 40  $\mu\text{m}$  (objem 24 – 268083  $\mu\text{m}^3$ ). Z modelov šírenia výtrusov u bazídiových húb (Basidiomycota) tiež vyplýva, že pri pasívnom šírení vzdušnými prúdmi má veľkosť výtrusov vplyv na

vzdialenosť do akej doletia, pričom väčšie výtrusy by mali dopadnúť bližšie k pôvodnej plodnici (Norros et al., 2014).

Na veľkosť askospór by ale mohla mať vplyv napríklad aj veľkosť genómu. Veľkosť buniek totiž naprieč väčšinou skupín eukaryotických organizmov pozitívne koreluje s veľkosťou genómu (Gregory, 2005). Priamo u askospór síce zatiaľ tento vzťah nebol detailne testovaný, ale napríklad u húb z rodov *Geosmithia* (Veselská & Kolařík, 2015) a *Epichloë* (Kulda et al., 1999) je známe, že veľkosť ich konídií koreluje práve s veľkosťou genómu. Na veľkosť askospór by pritom ale mohol mať vplyv aj samotný počet jadier, ktoré sa v nich nachádzajú. Evolučne konzervovaný sa totiž zdá byť samotný pomer objemu jadra (resp. jadier) k cytoplazme (Cavalier-Smith, 2005). Na vplyv počtu jadier na veľkosť výtrusov ukazuje napríklad to, že u rodu *Neurospora* majú abnormálne askospóry s nadštandardným počtom jadier výrazne väčší objem ako väčšina výtrusov (Raju, 1979; Raju & Burk, 2004). Podobne aj v prípade arbuskulárne mykorhíznej huby z rodu *Glomus* veľkosť spór zreteľne koreluje s počtom jadier (Marleau et al., 2011).

Morfológia výtrusov môže ale u húb úzko súvisieť aj s ich ekológiou a môže odrážať rozdiely v nikách jednotlivých druhov. U rodu *Geosmithia* napríklad zistili, že druhy tvoriace tesný mutualistický vzťah s ambróziovými chrobákmi majú výrazne väčšie konídie, ako ich príbuzní generalisti (Veselská & Kolařík, 2015). U rôznych skupín húb rastúcich vo vodnom prostredí zase majú často askospóry aj konídie rozmanité prívesky a výrastky, ktoré im môžu pomáhať prichytiť sa k substrátu, alebo sa dlhšie udržať vo vodnom stĺpci (Rees, 1980; Rees & Jones, 1984). U zástupcov oddelenia bazídiových húb bol zase zistený vzťah medzi veľkosťou výtrusov a klimatickými podmienkami (Kausserud et al., 2011). Druhy rastúce v kontinentálnejších oblastiach mali väčšie výtrusy, než druhy z oceánskych oblastí, čo by mohlo súvisieť s nárokmi na množstvo vody potrebnej k vyklíčeniu. Ektomykorhízne druhy húb majú pritom obecné oveľa častejšie ornamentované výtrusy ako ich príbuzní saprofyti (Calhim et al., 2018, Halbwachs et al., 2015), čo by podľa autov týchto prác mohlo súvisieť so šírením pomocou pôdnych bezstavovcov. Je však otázne do akej miery sa pozorovania u rôznych skupín húb dajú zovšeobecniť. Mnohé skupiny húb sa totiž napríklad v spôsobe šírenia výtrusov výrazne líšia a práce systematicky sledujúce vzťah medzi morfológiou výtrusov a ekológiou sú u vreckatých húb vzácne.

## 1.3 Bryofilní zástupcovia radu Pezizales

### 1.3.1 Druhov diverzita

Pyronemataceae predstavujú druhovo najbohatšiu čeľadí v ramci celeho radu Pezizales, ktor zahŕňa približne 660 druhov a 47 rodov s roznorodmi trofickými stratégiami (Kirk et al., 2008; Wijayawardene et al., 2018). Do tejto čeľade pat aj niekoľko rodov úzko viazaných na machorasty, ktoré sa v literatúre zvyknú súhrnne oznaovat ako bryofiln Pezizales (napr. Benkert, 1998a; Sochorová et al., 2019; Vega et al., 2017). Jedná sa konkretne o rody *Filicupula*, *Lamprospora*, *Noettiella*, *Octospora*, *Octosporella* a *Octosporopsis* a na zaklade vysledkov fylogenetických analýz sa zdá, že tvoria jednu monofyletick líniu (Hansen et al., 2013). Rod *Octospora* popísal už nemeck botanik Johann Hedwig v roku 1789 (Hedwig, 1789) a v suasnosti sa do tejto skupiny radí celkovo približne 170 druhov (Index Fungorum, 2020). Každoročne ale pribúdajú popisy nových druhov z roznych ast sveta (napr. Egertová et al., 2018a; Sochorová et al., 2019; Vega et al., 2017; Vega et al., 2019) a skuton druhov diverzita tejto skupiny húb bude určite eše vyrazne vyššia. Z uzemia eskej republiky by malo byť v suasnosti známych 42 druhov (Egertová et al., 2015).

### 1.3.2 Morfológia plodníc

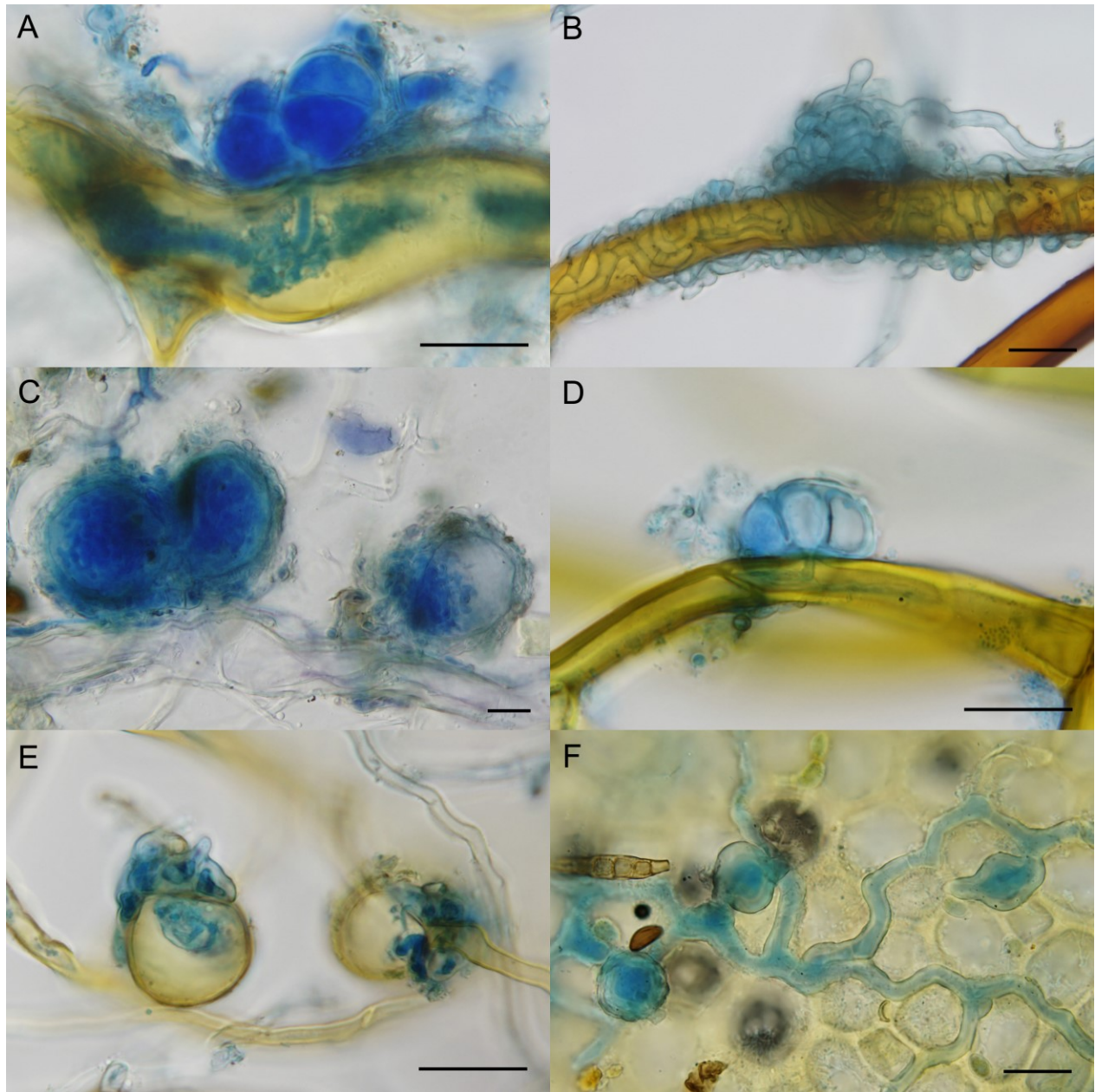
Bryofiln Pezizales najčastejšie tvoria drobn apotcia, ktoré môžu byť v priemere veľk od 0,2 mm, v prípade rodu *Octosporella*, až po 15 mm, u niektorých druhov rodu *Neottiella* (vlastn merania). Väčšina druhov tvorí sedace alebo krátko stopkat miskovit plodnice, no v prípade rodov *Octosporella* a *Filicupula* sú plodnice vyrazne privreté a tvarom tak pripomnj peritci. Obvykle majú erven, oranžov, žlt či belav farbu a u niektorých druhov môžu mat aj vyrazne diferencovan steriln okraj (obr. 1).



**Obrázok 1** Morfologická diverzita plodníc bryofilných zástupcov radu Pezizales: **A** – *Lamprospora ditrichi*; **B** – *Neottiella albocincta*; **C** – *Octospora grimmiae*; **D** – *Octospora itzerottii*; **E** – *Octosporella erythrostigma*; **F** – *Octosporopsis nicolai*; všetky mierky 1 mm.

### 1.3.3 Vzťah s machorastami

Zástupcovia tejto skupiny húb sa typicky považujú za biotrofné parazity machorastov (Benkert, 1993; Döbbeler, 1979). Infikované hostiteľské machorasty ale na prvý pohľad nie sú výrazne oslabené, a ako upozornili aj Davey & Currah (2006), presný charakter a fyziologická podstata vzťahu medzi mnohými bryofilnými hubami a ich hostiteľmi nie sú väčšinou presne známe. Viaceré skupiny húb sú pritom schopné s machorastami tvoriť aj prospešný mutualistický vzťah (Field et al., 2015; Pressel et al., 2014). Plodnice bryofilných Pezizales vyrastajú priamo na stielke hostiteľského machorastu, prípadne na okolitej pôde a na hostiteľa sú pripojené prostredníctvom špecializovaných infekčných hýf. Tie sú k povrchu tela machorastu prichytené apresóriom, ktoré môže byť jednoduché alebo rôzne priehradkované či obalené hýfovým plášťom. Z apresória potom prerastá do hostiteľskej bunky infekčný kanál, ktorý prechádza do rozvetveného haustória (obr. 2). Infikované môžu byť rôzne orgány machorastov, od povrchu lalokov stielky, cez palísky (fyloidy), pabyľky (kauloidy) až po pakorienky (rhizoidy). Napadnuté rhizoidy sú u viacerých druhov aj rôzne deformované a viaceré skupiny ich nafukujú do podoby guľovitých hálok (Benkert, 1998a; Vega et al., 2016). U mnohých druhov bryofilných Pezizales sa v minulosti uvádzali ako hostitelia jedného druhu zástupcovia rôznych, často len vzdialene príbuzných rodov machorastov (Benkert, 1987; Benkert, 2001; Benkert, 2002). Na základe sekvencií DNA sa ale zdá, že viaceré takéto druhy v skutočnosti predstavujú komplex niekoľkých, hostiteľsky špecializovaných druhov, ktoré sú viazané na konkrétny druh alebo len niekoľko blízko príbuzných druhov machorastov (Egertová et al., 2018b; Vega et al., 2017; Vega et al., 2019). Hostiteľmi bryofilných Pezizales pritom môžu byť jednak rôzne vrchoplodé a bokoplodé machy (Bryophyta), ale aj pečeňovky (Marchantiophyta) a jeden nepopísaný druh je dokonca viazaný aj na rožtek (Anthocerotophyta) (Vega & Moyne 2017).

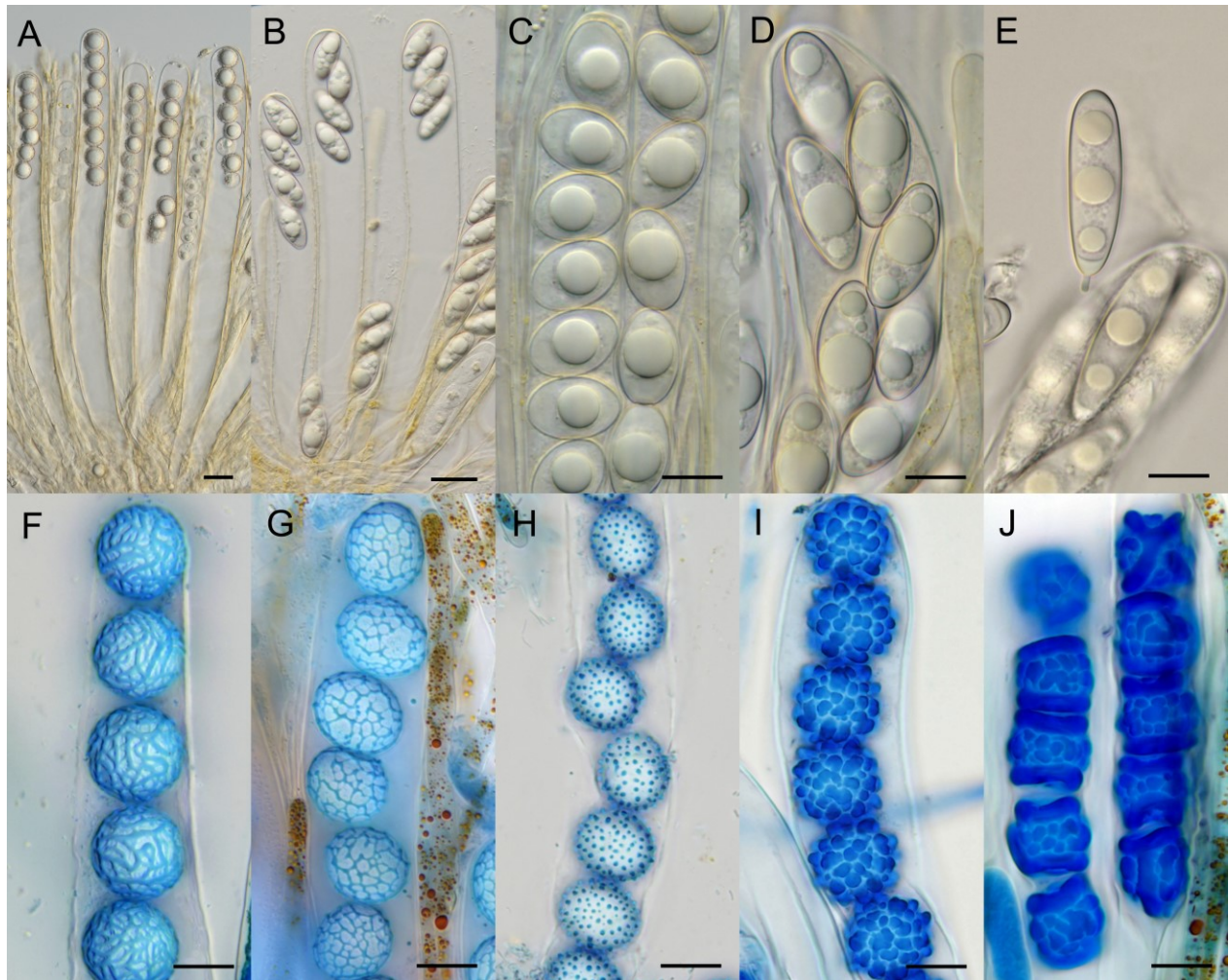


**Obrázok 2** Infekčné štruktúry rôznych bryofilných zástupcov radu Pezizales: **A** – *Lamprospora annulata*, dve priehradkované apresóriá, infekčný kanál a haustórium v rhizoide *Pleuridium* sp.; **B** – *Lamprospora retispora*, rhizoid *Syntrichia norvegica* kompletne obalený vrstvou hýf; **C** – *Lamprospora* sp., nafúknuté apikálne bunky rhizoidov *Campylopus schimperi* pokryté vrstvou hýf a vyplnené haustóriami; **D** – *Octospora affinis*, septované apresórium na rhizoide *Orthotrichum affine*; **E** – *Octospora rubens*, nafúknuté apikálne bunky rhizoidov *Ceratodon purpureus* so septovaným apresóriom a haustóriom; **F** – *Octosporella perforata*, hýfy a tri jednoduché apresóriá na palistku *Porella platyphylla*; všetky preparáty farbené bavlníkovou modrou; všetky mierky 20  $\mu\text{m}$ .

### 1.3.4 Morfológia askospór a počet jadier

Operkulátne vrecká bryofilných Pezizales obsahujú spravidla osem askospór a len u rodov *Octospora* a *Octosporella* je známych aj niekoľko druhov, ktoré majú vrecká so štyrmi (prípadne dvomi alebo tromi) askospórami (Benkert, 1998b; Döbbeler 1980). Askospóry týchto húb sa pritom vyznačujú veľkou diverzitou v tvare, ornamentike aj veľkosti (obr. 3). Môžu byť guľovité až subfiliformné, hladké, ale aj pokryté rôznorodou ornamentikou a ich dĺžka naprieč druhmi sa pohybuje v rozmedzí približne 11 – 115 µm (Benkert, 1998a; Caillet & Moyne, 1991; Döbbeler, 2018). V rámci jednotlivých druhov bryofilných Pezizales je ale morfológia askospór pomerne konštantná a často sa využíva ako jeden z hlavných znakov pri ich identifikácii (napr. Benkert, 1987; Schumacher, 1993; Vega et al., 2019). Na základe rekonštrukcie fylogénzy týchto húb v práci Perry et al. (2007), sa pritom zdá, že druhy s ornamentovanými askospórami sa u bryofilných Pezizales vyskytujú vo viacerých líniách a k vzniku resp. strate ornamentiky askospór u nich zjavne došlo viackrát nezávisle na sebe.

Zrelé askospóry týchto húb by sa medzi druhmi mali líšiť aj v počte jadier. Viaceré druhy z rodu *Octospora* majú pravdepodobne askospóry len s jedným jadrom (Berthet, 1964), ale napríklad *Octosporopsis nicolai* (Lindemann et al., 2014) a *Octospora leucoloma* var. *tetraspora* (syn. *Octospora tetraspora*) (Weber, 1992) by mali mať askospóry s dvoma jadrami a u druhu *Octosporella jungermanniarum* (syn. *Neottiella crozalsiana*) zrejme dokonca prevažujú askospóry so štyrmi jadrami (Corner, 1929).



**Obrázok 3** Vrecká a askospóry rôznych bryofílných zástupcov radu Pezizales: **A** – *Octospora moravecii*, vrecká s ôsmymi askospórami; **B** – *Octospora leucoloma* var. *tetraspora*, vrecká so štyrmi askospórami; **C** – *Octospora lilacina*, hladké elipsoidné askospóry; **D** – *Octospora gemmicola*, hladké úzko elipsoidné askospóry; **E** – *Octosporella erythrostigma*, hladké úzko elipsoidné askospóry s kužeľovitým príveskom na póle; **F** – *Lamprospora hispanica*, guľovité askospóry so sieťovitou ornamentikou; **G** – *Lamprospora densireticulata*, široko elipsoidné askospóry so sieťovitou ornamentikou; **H** – *Octospora hygrohypnophila*, široko elipsoidné askospóry s drobnými bradavičkami; **I** – *Lamprospora esterlechnerae*, guľovité askospóry s výraznými nepravidelnými bradavičkami; **J** – *Lamprospora annulata*, guľovité askospóry s nepravidelnými bradavičkami a kruhovými líštami na póloch; F – J farbené bavlníkovou modrou; mierky: A – B = 20  $\mu$ m, C – J = 10  $\mu$ m.



### 1.3.5 Veľkosť genómu

Bryofilné Pezizales sa v rámci húb vyznačujú aj neobvykle veľkým rozsahom veľkosti haploidného genómu, od 19 Mbp až po 5800 Mbp. Tento rozsah navyše vychádza len z údajov pre osem identifikovaných druhov a niekoľko bližšie neurčených bryofilných Pezizales, ktoré sú uvedené v databáze veľkostí hubových genómov (Kullman et al., 2005). Celková diverzita vo veľkosti genómu u týchto húb by tak mohla byť ešte väčšia. Konkrétne hodnoty veľkosti genómu pre dané druhy je však potrebné brať s istou rezervou. Jedná sa totiž o výsledky meraní iba malého počtu jadri pomocou obrazovej cytometrie alebo cytofotometrie. Vo všetkých prípadoch bolo navyše na farbenie jadri použité fluorescenčné farbivo DAPI, ktoré na meranie absolútnej veľkosti genómu nie je vhodné, keďže sa preferenčne viaže na AT bohaté oblasti genómu (Kapusinski, 1995). Pokiaľ by však mal druh *Neottiella rutilans* skutočne genóm veľký 5800 Mbp, jednalo by sa o najväčší známy genóm u húb. V rámci húb sa v súčasnosti za druh s najväčším genóm považuje *Jafnea semitosta*, ktorý by mal mať na základe merania prietokovou cytometriou genóm veľký 3624 Mbp (Egertová & Sochor, 2017). Vďaka veľkému genómu a chromozómom boli zástupcovia rodu *Neottiella* aj vďačným objektom výskumu mitózy a meiózy u húb už od začiatku 20. storočia (Fraser, 1908; Rossen & Westergaard, 1966).

### 1.3.6 Rozšírenie a ekológia

Bryofilné Pezizales sú celosvetovo veľmi široko rozšírenou skupinou húb. Najviac ich je známych z Európy (napr. Benkert, 1987; Caillet & Moyne, 1991; Döbbeler, 1979), no viaceré druhy boli zbierané aj v Severnej Amerike (Seaver, 1912; Seaver, 1914), Južnej Amerike (Döbbeler, 1978; Döbbeler, 2011), Ázii (Egertová et al., 2018a), Austrálii (McLennan Cookson, 1923; Rifai, 1968) či Antarktíde (Olech & Mleczko, 2000). To ktoré lokality tieto huby osídľujú je pritom zrejme obmedzené predovšetkým ekologickými nárokmi a rozšírením ich hostiteľov. Veľké množstvo druhov uprednostňuje pravidelne narušované biotopy, na ktorých sa darí rozmanitým machorastom. Často sa tak dajú stretnúť na okrajoch ciest, polí či medzi dlažbovými kockami v mestách. Tam ale škála osídľovaných biotopov rozhodne nekončí a mnohí zástupcovia tejto skupiny húb sa vyskytujú aj vysoko v horách, na xerothermných stráňach či v tropických lesoch, kde môžu dokonca rásť aj na epifylických pečeňovkách na povrchu listov miestnych rastlín (Döbbeler, 2011) (obr. 4). Viaceré druhy sa tak medzi sebou s istotou výrazne líšia v tom, aké klimatické podmienky na ich lokalitách obvykle panujú.



**Obrázok 4** Rôzne typy biotopov, ktoré bryofilní zástupcovia radu Pezizales môžu osídľovať: **A** – antické ruiny, Pompeje, Taliansko, *Octosporopsis nicolai*; **B** – tropický horský les, Boquete, Panama, *Neottiella albocincta*; **C** – vysokohorská sutina, Dachstein, Rakúsko, *Lamprospora retispora*; **D** – borovicový les, Šaštín-Stráže, SR, *Neottiella vivida*; **E** – snehové výležísko, Sportgastein, Rakúsko, *Lamprospora dicranellae*; **F** – breh vodnej nádrže, Veľká Hradná, SR, *Octospora echinospora*.

## 2 Ciele

Bryofilní zástupcovia radu Pezizales sú kozmopolitnou a druhovo bohatou monofyletickou skupinou húb, ktorá sa vyznačuje veľmi rozmanitou morfológiou askospór, rôznym počtom jadier v askospórach, širokým rozsahom veľkosti genómu a aj veľmi rôznorodou ekológiou. Predstavujú preto pomerne unikátny modelový systém, ktorého výskum by mohol pomôcť poodhaliť a lepšie pochopiť dôležité faktory pôsobiace pri evolúcii morfológie askospór a šírení vrekatých húb.

Konkrétne ciele mojej diplomovej práce boli nasledovné:

- Otestovať či veľkosť askospór vybraných zástupcov bryofilných Pezizales závisí na veľkosti ich genómu.
- Určiť či sa sledované druhy odlišujú v počte jadier v askospórach a či počet jadier ovplyvňuje veľkosť askospór.
- Zistiť či u bryofilných zástupcov radu Pezizales súvisí morfológia askospór s ekológiou ich hostiteľských machorastov a miestom pripojenia infekčných štruktúr.
- Zistiť ako morfológia askospór ovplyvňuje vzdialenosť ich vystreľovania a tvorbu klastrov askospór.

## 3 Metodika

### 3.1 Výber sledovaných druhov, zber materiálu

Predstaviateľov bryofilných Pezizales som pre jednotlivé analýzy zbieral v rokoch 2019 a 2020 na území Českej republiky, Slovenska a Rakúska a niekoľko druhov mi zaslali mykológovia aj z Nemecka, Španielska a Cypru. Lokality som vytypoval na základe mojich zberov z predchádzajúcich rokov tak, aby som podchytil čo možno najširšie druhové spektrum rôznych skupín bryofilných Pezizales. Plodnice som v teréne odobral aj so substrátom a okolitými machorastami, aby ich bolo možné v laboratóriu pozorovať vo vitálnom stave. Jednotlivé zbery som následne svetelným mikroskopom identifikoval na základe rozmerov ich askospór, ornamentiky a hostiteľských machorastov. Na určenie sledovaných húb som využíval predovšetkým práce Benkert (1987), Benkert (1998a) a Caillet & Moyne (1991). Medzi meraniami prietokovou cytometriou a pokusmi s vystreľovaním askospór som plodnice so substrátom uchovával v chladničke pri teplote 4 °C po dobu 1 – 2 týždňov.

Dostatočné množstvo čerstvého materiálu (>20 plodníc) sa mi podarilo získať celkom u 52 druhov a variet, patriacich do rodov *Octospora* (28 druhov a variet), *Lamprospora* (17 druhov), *Neottiella* (3 druhy), *Octosporella* (3 druhy) a *Octosporopsis* (1 druh). V následných analýzach tak boli zastúpení predstavitelia všetkých v súčasnosti rozlišovaných rodov bryofilných Pezizales s výnimkou monotypického rodu *Filicupula*. Podrobné informácie o jednotlivých sledovaných zberoch sú uvedené v prílohe v tabuľke P1.

### 3.2 Molekulárne fylogenetické analýzy

Cieľom tejto časti práce bolo na základe troch úsekov DNA zrekonštruovať fylogézu vybraných zástupcov bryofilných Pezizales. Nešlo mi pritom o riešenie taxonomických problémov tejto skupiny húb, ale primárne iba o získanie informácií o príbuzenských vzťahoch medzi sledovanými druhmi. V ďalších častiach práce sa totiž venujem testovaniu vzťahov medzi rôznymi premennými u širokého druhového spektra bryofilných Pezizales. Keby som ale v štatistických modeloch nezohľadnil príbuzenské vzťahy medzi druhmi, zásadne by som porušil predpoklad nezávislosti pozorovaní, čo by mohlo mať za následok veľmi nepresné výsledky (Grafen, 1989). Príbuzné druhy totiž môžu mať napríklad podobné hodnoty dvoch znakov len preto, že ich zdedili od spoločného predka, a nie preto, že by medzi týmito znakmi bol nejaký kauzálny vzťah.

### 3.2.1 Izolácia DNA

V závislosti na veľkosti plodníc jednotlivých druhov som DNA extrahoval z 1 – 10 čerstvých alebo sušených plodníc pomocou komerčného kitu Zymo Research Fungal/Bacterial kit (Zymo Research, USA). Vyzolovanú DNA som následne uchovával v mrazničke pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2 PCR

Pre analýzu som vybral tri úseky DNA – časť sekvencie veľkej ribozomálnej podjednotky LSU (28S rDNA), malej ribozomálnej podjednotky SSU (18S rDNA) a fragment translačného elongačného faktoru (EF1- $\alpha$ ), ktoré už boli v minulosti úspešne použité vo viacerých štúdiách zameraných na taxonómiu tejto skupiny húb (napr. Hansen et al., 2013; Sochorová et al., 2019) a v databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) je pre nich dostupné dostatočné množstvo referenčných sekvencií.

Pri amplifikácii úsekov LSU a EF1- $\alpha$  s použitím štandardných primérov (NL1, NL4; 983F, 1567R) dochádzalo niekedy k namnoženiu sekvencie nežiadúcich kontaminantov. Na základe alignmentu niekoľkých sekvencií získaných s použitím nešpecifických primérov a sekvencií dostupných v databáze GenBank som preto navrhol špecifické priméry pre bryofilných zástupcov radu Pezizales. Kvalitu týchto primérov (vylúčenie tvorby dimérov, kompatibilitu teplôt topenia) som kontroloval pomocou programu OligoEvaluator (<http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet>). Priméry, ktoré som použil, sú uvedené v tabuľke 1.

**Tabuľka 1** Zoznam použitých primérov

Úsek DNA	Priamy primér	Sekvencia (5'-3')	Reverzný primér	Sekvencia (5'-3')	Zdroj
LSU	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O'Donnell (1993)
	LSU octoF	CAACAGGGATTGCCTYAGTAACT	LSU octoR	GGTCCGTGTTTCAAGACGGGT	nanovo navrhnutý
SSU	NS1	GTAGTCATATGCTTGCTC	NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC	White et al. (1990)
EF1- $\alpha$	983F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	1567R	ACHGTRCCRATAACCACCRATCTT	Rehner & Buckley (2005)
	EF1 octoF	GCYGAGCGTGARCGTGGWAT	EF1 octoR	GGTGTCATYTCMACRGACTTG	nanovo navrhnutý

Zvolené úseky som amplifikoval v termocykléri Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Nemecko) a detaily podmienok, ktoré som použil pre jednotlivé úseky a kombinácie primérov sú zhrnuté v tabuľke 2. Reakcie pre amplifikáciu jednotlivých úsekov v celkovom objeme 15  $\mu\text{l}$  som pripravil v nasledujúcom zložení: 10  $\mu\text{l}$  deionizovanej vody, 3  $\mu\text{l}$  pufru MyTaq Bioline 5x obsahujúceho deoxynukleotidy a  $\text{MgCl}_2$  (Bioline, Veľká Británia), 0,4  $\mu\text{l}$  priameho priméru (25 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 0,4  $\mu\text{l}$  reverzného priméru (25 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 0,2  $\mu\text{l}$  polymerázy MyTaq HS Red DNA (Bioline, Veľká Británia) a 1  $\mu\text{l}$  templátovej DNA.

V prípade úseku LSU som u vzoriek, u ktorých sa amplifikovala zjavná kontaminácia, použil metódu *nested* PCR. V prvej fáze som spravil PCR reakciu s použitím štandardných nešpecifických primérov (NL1, NL4). Následne som produkt tejto reakcie použil ako templát pre druhú PCR reakciu, v ktorej som na amplifikáciu použil navrhnuté špecifické priméry (LSU octoF, LSU octoR).

**Tabuľka 2** Nastavenie podmienok PCR pre jednotlivé úseky DNA a kombinácie primérov

	Úsek DNA							
	LSU				SSU		EF1- $\alpha$	
<b>Kombinácie primérov</b>	NL1 / NL4		LSU octoF / LSU octoR ( <i>nested</i> )		NS1 / NS6		983F / 1567R; EF1 octoF / EF1 octoR; 983F / EF1 octoR	
<b>Úvodná denaturácia</b>	95 °C – 1 min		95 °C – 1 min		95 °C – 1 min		95 °C – 1 min	
<b>Denaturácia</b>		95 °C – 30 s		95 °C – 30 s		95 °C – 30 s		95 °C – 30 s
<b>Nasadanie priméru</b>	5×	55 °C – 30 s	5×	59 °C – 30 s	32×	48 °C – 30 s	10×	66 °C – 57 °C – 30 s ( <i>touchdown</i> )
<b>Elongácia</b>		72 °C – 1 min		72 °C – 50 s		72 °C – 75 s		72 °C – 40 s
<b>Denaturácia</b>		95 °C – 30 s		95 °C – 30 s				95 °C – 30 s
<b>Nasadanie priméru</b>	30×	52 °C – 30 s	23×	55 °C – 30 s			32×	56 °C – 30 s
<b>Elongácia</b>		72 °C – 1 min		72 °C – 50 s				72 °C – 40 s
<b>Finálna elongácia</b>	72 °C – 10 min							
<b>Chladenie</b>	4 °C							

Úspešnosť amplifikácie som overoval vizualizáciou PCR produktov gélovou elektroforézou, pri ktorej som u každej reakcie naniesol 2,5  $\mu$ l PCR produktu na 1% agarózový gél s prímiesou etídium bromidu v TAE pufri.

### 3.2.3 Prečisťovanie PCR produktu a sekvenácia

PCR produkty som prečistil pomocou magnetických guľičiek AMPure XP (Beckman Coulter, USA) podľa pokynov výrobcu. Koncentráciu prečistených produktov som zmeral spektrofotometrom MaestroNano (Maestrogen, Taiwan) a zriedil deionizovanou vodou tak, aby 7  $\mu$ l roztoku obsahovalo 5 ng DNA/100 bp

dĺžky produktu. K 7  $\mu$ l zriedeného PCR produktu som následne pridal 1  $\mu$ l priméru s koncentráciou 5 pmol/ $\mu$ l. Sekvenácia vzoriek prebiehala v Laboratoři sekvenace DNA PŘF UK (Biocev, Vestec).

### 3.2.4 Spracovanie získaných sekvencií a alignment

Každá vzorka bola osekvenovaná v oboch smeroch. Pomocou aplikácie BLAST (Zhang et al., 2000) som najskôr overil, že sekvencie nepredstavujú kontamináciu. V programe Geneious (Biomatters, Nový Zéland) som u oboch sekvencií jednotlivých vzoriek skontroloval ich kvalitu, odstránil prípadné chyby a následne ich spojil do konsenzuálnej sekvencie. Alignments pre jednotlivé úseky som vytvoril pomocou programu MAFFT (Kato & Standley, 2013) s použitím iteratívnej metódy E-INS. Pomocou programu GUIDANCE 2 dostupnom na serveri <http://guidance.tau.ac.il/> (Penn et al., 2010; Sela et al., 2015) som následne ešte z jednotlivých alignmentov odstránil pozície, ktoré neboli spoľahlivo alignované a mali konfidenčné hodnoty nižšie ako 0,75. Do alignmentov jednotlivých úsekov som zahrnul aj sekvencie bryofilných *Pezizales* z databáze GenBank (tab. P2).

### 3.2.5 Bayesovská analýza (BA)

Na rekonštrukciu fylogenetických vzťahov sledovaných druhov som použil Bayesovskú analýzu v programe MrBayes 3.2.3 (Ronquist et al., 2012). Optimálny substitučný model som pre jednotlivé úseky vybral pomocou programu PartitionFinder 2.1.1 (Lanfear et al., 2017) s použitím nasledovných parametrov: *branchlengths = linked; models = mrbayes; model\_selection = BIC; search = greedy*. Aby som mohol overiť, že sú lokusy kongruentné, vytvoril som najskôr samostatný strom pre každý z troch úsekov DNA. Počet generácií Markov chain Monte Carlo (mcmc) som nastavil na 5 miliónov, pričom bol ukladaný každý 1000. strom. Výstupy jednotlivých analýz som kontroloval v programe Tracer 1.7 (Rambaut et al. 2018). Ako burn-in som odstránil prvých 25 % stromov, ostatné stromy som použil na vytvorenie konsenzuálneho stromu. Porovnal som topológiu dobre podporených nódov (posteriórna pravdepodobnosť  $PP > 0,95$ ) medzi jednotlivými stromami, a keďže sa medzi sebou nelíšili (obr. P3, P4, P5), všetky tri alignmenty som konkatenoval a ďalej analyzoval spoločne. Konkatenovaný alignment som potom analyzoval opäť v programe MrBayes 3.2.3, tentokrát s použitím 10 miliónov generácií a samostatnými substitučnými modelmi pre jednotlivé lokusy. Inak som postupoval rovnako ako v prípade jednolokusových analýz. Nódy z nízkou podporou ( $PP < 0,75$ ) vo výslednom konsenzuálnom strome som v programe R 4.0.2 (R Core Team, 2020) skolaboval do polytómii. Finálny strom som potom vizualizoval a editoval v programe FigTree 1.4.3 (Rambaut, 2017).

### 3.2.6 Maximálna vierohodnosť (*Maximum Likelihood* – ML)

Analýzu konkatenovaného alignmentu metódou maximálnej vierohodnosti som robil v programe RAxML 8.2.10 (Stamatakis, 2014) s použitím grafického rozhrania raxmlGUI 2.0 (Edler et al., 2019; Silvestro & Michalak, 2012). Použil som substitučný model GTRCAT, pričom hodnoty jednotlivých parametrov boli odhadované samostatne pre každý úsek. Získaný strom som podrobil bootstrapovej analýze metódou rapid bootstrap s použitím 1000 opakovaní. Bootstrapové hodnoty som vyznačil na konsenzuálny strom z Bayesovskej analýzy.

### 3.2.7 Tvorba ultrametrickeho fylogenetického stromu

Aby som v následných analýzach zohľadnil, že všetky sledované taxóny predstavujú recentné druhy, vytvoril som ultrametrický fylogenetický strom. Konsenzuálny strom z Bayesovskej analýzy konkatenovaného datasetu som transformoval v programe R 4.0.2 (R Core Team, 2020) pomocou funkcie „chronos“ v knižnici „ape“ (Paradis et al., 2004). Optimálny model molekulárných hodín (korelovaný/diskrétny/relaxovaný) a hodnotu parametru lambda  $\lambda$  (0/1/10) som vybral na základe hodnôt penalizovanej vierohodnosti jednotlivých modelov. Ako najlepší sa javil model s relaxovanými hodinami a hodnotou  $\lambda = 0$ . Z tohto stromu som potom ešte odstránil druhy, ktoré pochádzali z databáze GenBank a do ďalších analýz neboli zahrnuté.

### 3.2.8 Vizualizácia znakov na fylogenetickom strome

Na zobrazenie vybraných znakov na ultrametrickom fylogenetickom strome som použil funkciu „contMap“ z knižnice „phytools“ (Revell, 2012) v programe R 4.0.2 (R Core Team, 2020). Tá odhaduje ancestrálne hodnoty príslušného znaku pre jednotlivé uzly vo fylogenetickom strome pomocou metódy maximálnej vierohodnosti s použitím modelu Brownovho pohybu. Keďže táto analýza vyžaduje, aby bol použitý strom plne dichotomický, odstránil som polytómie z ultrametrickeho stromu pomocou funkcie „multi2di“ z knižnice „ape“ (Paradis et al., 2004).



### 3.3 Morfometrická analýza askospór

#### 3.3.1 Mikroskopické merania

Všetky merania morfológických znakov askospór, ale aj ostatné mikroskopické merania v tejto práci, som robil v programe ImageJ 1.48v (Schneider et al., 2012) na fotografiách získaných mikroskopom Olympus BX-51 (Olympus, Japonsko) s kamerou Olympus DP72 (Olympus, Japonsko).

U každého sledovaného druhu som u jednej plodnice zmeral: dĺžku a šírku 20 zreých askospór (bez započítania ornamentiky, merané vo vitálnom stave v preparáte vo vode); výšku ornamentiky askospór – t. j. výšku 30 bradavičiek alebo líšt (po farbení bavlníkovou modrou) a relatívne pokrytie 10 askospór ornamentikou (po farbení bavlníkovou modrou). Výšku ornamentiky som meral na 10 askospórach, vždy tri bradavičky/lišty na okraji každej askospóry, kde bola ornamentika vidieť zboku. Pokrytie askospór ornamentikou som meral na fotografiách zložených metódou *focus stacking* v programe Helicon Focus 7 (HeliconSoft, Ukrajina), zložené fotografiu som najskôr rozdelil na jednotlivé RGB farebné kanály a v červenom kanáli, kde boli hranice ornamentiky najvýraznejšie, som pomocou funkcie „Threshold“ oddelil ornamentiku od okolia. Keďže sa na okrajoch askospór často ornamentika prekrývala a zakrývala aj voľný povrch askospóry, meral som relatívne pokrytie ornamentikou iba v strede askospóry v kruhu s priemerom 5 – 10  $\mu\text{m}$ . Relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou, ktoré som takto určil, pritom môže mať hodnotu 0 – 1 (resp. 0 – 100 %), od askospór úplne hladkých až po askospóry s povrchom kompletne pokrytím ornamentikou.

#### 3.3.2 Výpočet objemu askospór

Vzhľadom k pravidelnosti tvaru askospór som zvolil ich objem ( $V$ ) ako najlepšiu charakteristiku ich veľkosti. Pri jeho výpočte som tvar askospór aproximoval rotačným elipsoidom a objem vypočítal podľa vzorca: , kde  $a$  je polovica dĺžky askospóry a  $b$  je polovica šírky askospóry. Vzhľadom na to, že dĺžku a šírku askospór som ale meral bez započítania ornamentiky, vyjadruje aj objem  $V$  veľkosť askospór bez ornamentiky. To síce umožňuje lepšie medzi druhmi porovnať samotné množstvo cytoplazmy, no mierne skresľuje analýzy, v ktorých by nás zaujímala skôr celková veľkosť askospóry vrátane ornamentiky. Pri analýze vplyvu morfológie na dolet askospór som tak okrem objemu  $V$  pracoval aj s celkovým objemom askospóry  $V_{tot}$ , ktorý som počítal podľa vzorca:

, kde  $a$  je polovica dĺžky askospóry,  $b$  je polovica šírky askospóry,  $c$  je výška ornamentiky a  $d$  je relatívne pokrytie povrchu askospóry ornamentikou.

## 3.4 Veľkosť genómu

### 3.4.1 Príprava vzoriek

Metodika prípravy vzoriek na meranie prietokovou cytometriou vychádza z práce Veselská et al. (2014). Plodnice očistené od substrátu (1 – 10 v závislosti na ich veľkosti) som inkuboval 60 minút pri teplote 4 °C v 500 µl fixačného roztoku MA+ (metanol : kyselina octová (3:1 v/v), 10% DMSO, 0,1% Triton-X 100). Následne som odstránil fixačný roztok a premyl jeho zvyšky pomocou 500 µl detergentu Triton X-100 (0,1%). Po odstránení detergentu som k plodniciam pridal 500 µl roztoku s RNázou A (MP Biomedicals, USA) s koncentráciou 0,1 mg/ml v pufrí Tris MgCl<sub>2</sub> s pH 7,5 (200 mM Tris, 4 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,5% Triton X-100) a nasekal ich v ňom žiletkou. Túto suspenziu som potom prefiltraval cez 30 µm filter CellTrics (Partec, Nemecko) a inkuboval 15 minút pri teplote 37 °C. Suspenziu jadier som na záver farbíl fluorescenčným farbivom propídium jodid (PI) vo výslednej koncentrácii 50 µg/ml.

### 3.4.2 Meranie prietokovou cytometriou a spracovanie dát

Veľkosť genómu som meral pomocou cytometru BD LSRII (Becton Dickinson, USA) s použitím laseru Melles Griot 85-YCA-025 s vlnovou dĺžkou 561 nm. Emitovaná fluorescencia bola zachytávaná cez filtre 590 LP a následne 610/20 BP. U každej vzorky som vždy zmeral aspoň 2000 častíc v oblasti grafu bočného rozptylu SSC-A a fluorescencie PI-A, ktoré zodpovedali haploidným jadrom vo fáze G1/G0 (1C). Získané dáta som spracovával v programe Flowing Software 2.5.1 (<http://www.flowingsoftware.com>). V bodovom grafe bočného rozptylu SSC-A a fluorescencie PI-A som vybral oblasť, v ktorej sa nachádzala populácia haploidných jadier (1C). Túto subpopuláciu som následne zobrazil v histograme fluorescencie PI-A a vypočítal som priemernú intenzitu fluorescencie a variačný koeficient (CV).

### 3.4.3 Štandardizácia

Ako externý štandard som pri meraní použil listy sedmokrásky obyčajnej (*Bellis perennis*), ktorá má jadrá veľké 2C = 3306 Mbp (Schönswetter et al., 2007), bola dobre dostupná, nebolo nutné ju kultivovať a od veľkosti genómov sledovaných húb by sa nemala líšiť príliš výrazne (priemerná veľkosť genómu druhov bryofilných Pezizales uvedených v databáze Kullman et al. (2005) je 1220 Mbp).

Keďže je ale známe, že u rastlín môžu niektoré metabolity interagovať s fluorescenčným farbením (Loureiro et al., 2006), použil som sedmokrásku aj pre internú štandardizáciu. Štandard som v tomto prípade fixoval a farbíl spoločne s meranou vzorkou v jednej skúmavke. Interná štandardizácia by mala prípadný efekt

redukovať, keďže rastlinné metabolity interagujú súčasne s jadrami štandardu aj meranej vzorky a nemali by teda na skresliť samotný pomer medzi veľkosťou ich genómov.

Pokiaľ som mal k dispozícii dostatok čerstvých plodníc, snažil som sa u každého druhu získať tri úspešné merania s použitím externej štandardizácie a jedno meranie s internou štandardizáciou.

### **3.5 Počet jadier v askospórach**

#### **3.5.1 Fluorescenčná mikroskopia**

Na určenie počtu jadier v askospórach som použil fluorescenčnú mikroskopiu s farbivom DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol), ktoré sa viaže na AT bohaté oblasti DNA. K vystreleným askospóram (získaným v kap. 3.7), prípadne kúsku hyménia, som pridal kvapku roztoku DAPI s koncentráciou 1 µg/ml. Preparát som zľahka zahrial nad kahanom a pred pozorovaním nechal 5 minút inkubovať. Následne som mikroskopom Olympus BX51 (Olympus, Japonsko) s použitím UV excitácie (excitačný rozsah 360 – 370 nm, emisný rozsah >420 nm) pozoroval jadrá v askospórach a zaznamenal ich počet.

#### **3.5.2 Vplyv počtu jadier na veľkosť askospór**

V prípade, že som v rámci jedného druhu zaznamenal zrelé askospóry s rôznym počtom jadier, zmeral som dĺžku a šírku 10 – 30 askospór s každým pozorovaným počtom jadier. Viac askospór som nemeral, pretože askospóry s iným ako dominantným počtom jadier sa u väčšiny druhov vyskytovali len veľmi vzácne. Objem askospór som aj v tomto prípade počítal podľa vzorca:  $V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{a}{2}\right)^2 \left(\frac{b}{2}\right)$ , kde  $a$  je polovica dĺžky askospóry a  $b$  je polovica šírky askospóry.

### **3.6 Hostiteľské machorasty a ich vzťah s morfológiou askospór**

#### **3.6.1 Identifikácia hostiteľa a sledovanie infekčného aparátu**

Machorasty z okolia plodníc som najskôr opatrne premyl vo vode, aby bolo možné pozorovať aj ich rhizoidy. Celé rastliny som následne farbil bavníkovou modrou a pozoroval svetelným mikroskopom. Na základe prítomnosti infekčného aparátu som určil, ktorý z druhov machorastov v okolí plodníc je hostiteľom, a po prehliadnutí celej rastliny som tiež určil, na ktoré orgány bol infekčný aparát pripojený najčastejšie. Rozlišoval som pritom, či je huba pripojená na rhizoidy, pabyľky alebo palísky, resp. na rhizoidy, alebo samotný povrch stielky v prípade lupeňovitých pečeňoviek. V niektorých prípadoch som nebol schopný s istotou určiť, ktorý orgán je preferovaný, často boli totiž napríklad silne infikované súčasne

palísky aj pabyľky. V štatistických analýzach som preto sledované druhy rozdelil iba do troch kategórií, konkrétne na: druhy infikujúce rhizoidy, druhy infikujúce nadzemné časti machorastov (palísky, pabyľky, povrch stielky) a druhy súčasne pripojené na rhizoidy aj nadzemné časti.

### 3.6.2 Ekologické charakteristiky hostiteľských machorastov

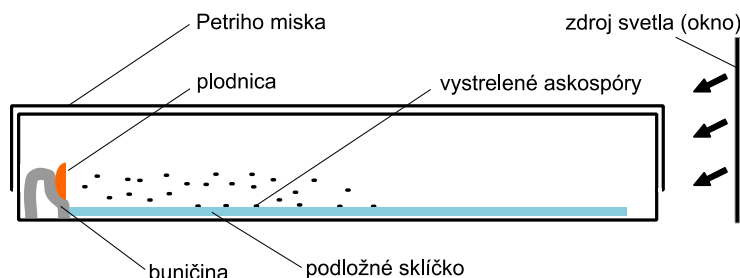
Viacere druhy bryofilných zástupcov radu Pezizales, ktoré som v rámci tejto práce sledoval, sú aj v súčasnosti známe len z niekoľkých lokalít. Nedostatok dát o rozšírení a lokalitách mnohých z nich má preto za následok, že sa ekologické charakteristiky samotných bryofilných Pezizales nedajú jednoducho porovnať. Pomerne dobrým ukazovateľom podmienok stanovišť, ktoré tieto huby môžu osídľovať, by ale vzhľadom na ich vysokú mieru hostiteľskej špecializácie mali byť aj ekologické požiadavky ich hostiteľov. Tie sú pritom pre väčšinu európskych machorastov sumarizované v práci Dierßen (2001), v ktorej autor štandardizovane uvádza ekologické charakteristiky pre jednotlivé druhy machorastov.

Na sledovanie vzťahu medzi morfológiou askospór a ekologickými faktormi som vybral štyri premenné, konkrétne: pH prostredia, vlhkosť, množstvo svetla a odolnosť k vysokým teplotám (*heat balance*). Tie som podľa tabuľky P6 previedol na kvantitatívnu diskretnú stupnicu. V prípadoch, kedy bol u druhu uvedený širší rozsah hodnôt, som použil priemernú hodnotu. Okrem týchto premenných som do analýzy zahrnul aj životné formy hostiteľských machorastov uvedené v rovnakej publikácii. Tie vychádzajú z delenia v práci During (1992) a rozdeľujú machorasty do niekoľkých skupín na základe ich dĺžky života, reprodukčného úsilia a veľkosti spór. Niektoré menšie skupiny, ktoré boli medzi hostiteľskými machorastami zastúpené len vzácné, som vo výslednej analýze zlúčil. Konkrétne skupiny *ephemeral colonists* a *pioneer colonists* som zlúčil so skupinou *colonists* a skupiny *competitive perennials* a *stress tolerant perennials* so skupinou *perennials*. Pôvodné rozsahy hodnôt ekologických charakteristík, životná forma a informácie o mieste pripojenia infekčných štruktúr aparát sú pre jednotlivé druhy sumarizované v prílohe v tabuľke P7. Druhy, u ktorých chýbali údaje pre niektoré z vybraných ekologických charakteristík, neboli do analýzy zahrnuté.

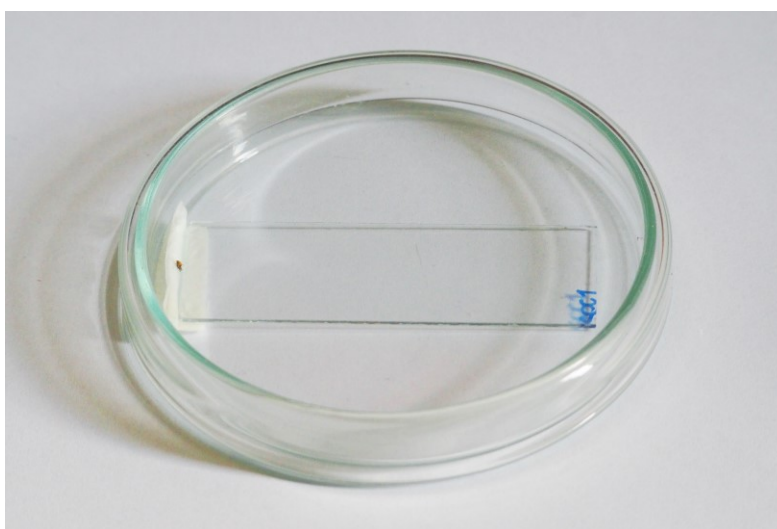
### 3.7 Aktívne vystreľovania askospór

Metodika sledovania aktívneho vystreľovania askospóry, ktorú som použil, vychádza z práce Bailey & Garrett (1968) a je založená na sledovaní askospór horizontálne vystrelených na podložné sklíčko. Tento pokus som robil pri izbovej teplote  $t \approx 23$  °C. Jednu čerstvú plodnicu som umiestnil na okraj Petriho misky (priemer 9 cm) na prehnutý buničinový obdĺžnik s rozmermi 2×1 cm, ktorý som navlhčil 100 µl vody. Priamo pred plodnicu som následne umiestnil podložné sklíčko. Plodnicu som nasmeroval tak, aby povrch jej hyménia zvieral pravý uhol s podložným sklíčkom, svojou bázou sa opierala o ohyb buničiny a jej stred

bol vo výške približne 3 mm nad povrchom sklíčka (obr. 5, 6). Keďže vrecká sú schopné otáčať sa za svetlom (Ingold, 1971), misky som otočil tak, aby bol predpokladaný smer vystreľovania orientovaný k oknu. Petriho miska bola v priebehu experimentu uzavretá, aby som minimalizoval efekt prúdenia vzduchu v okolí a nedochádzalo k rýchlemu vysychaniu plodnice. U každého sledovaného druhu som sa snažil získať tri úspešné opakovania.



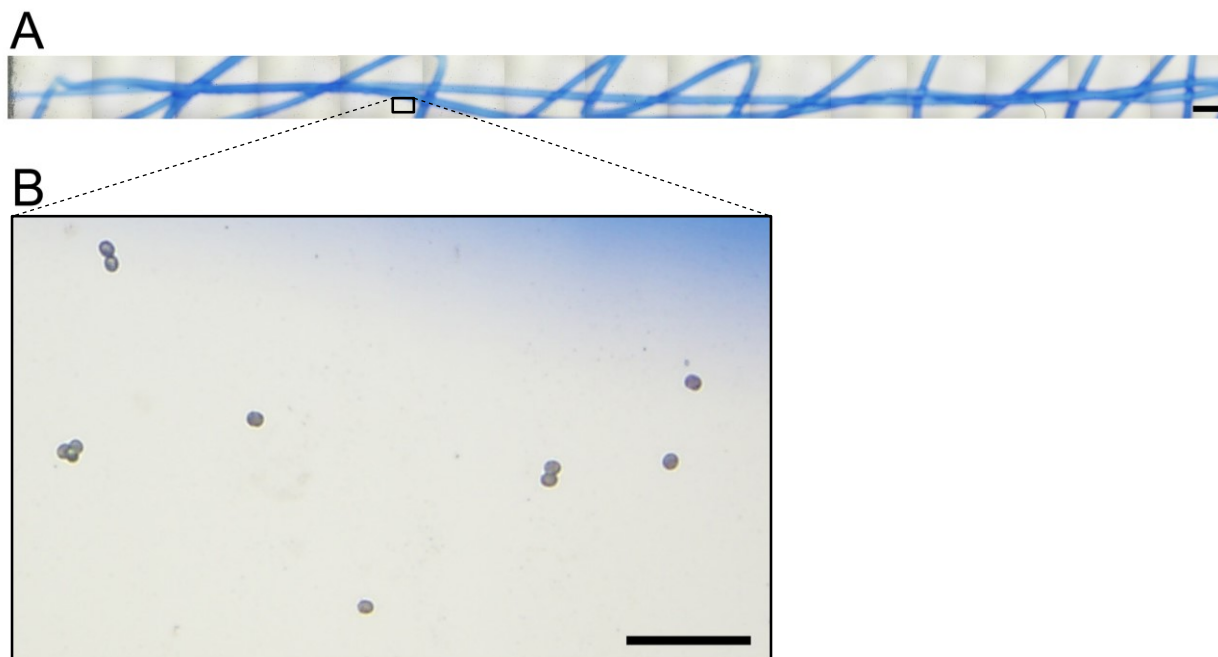
**Obrázok 5** Schematické znázornenie pokusu na sledovanie vystreľovania askospór.



**Obrázok 6** Ukážka pokusu sledujúceho vystreľovanie askospór. Na navlhčenom kúsku buničiny je na ľavom okraji misky umiestnená plodnica druhu *Octospora coccinea* (LJDP24).

Po 24 hodinách som podložné sklíčko z Petriho misky opatrne vybral a prehliadol mikroskopom. Pokiaľ došlo k úspešnému vystreleniu dostatočného množstva askospór, popisovačom som označil bod, kde doleteli najďalej vystrelené askospóry. Ak sa línia vystrelených askospór blížila k jednému z bočných okrajov sklíčka, nebol konkrétny experimenty ďalej analyzovaný. Hrozilo totiž, že by časť askospór vystrelených do väčšej vzdialenosti nebola na sklíčku zachytená. Pri zväčšení 64× som u úspešných pokusov nafotografoval celú spojnicu označeného bodu a okraja sklíčka, pri ktorom bola umiestnená plodnica. Fotografie som robil tak, aby sa vždy na okraji aspoň čiastočne prekrývali. Kvôli uľahčeniu spájania fotografií som ešte na spodnú stranu sklíčka popisovačom nakreslil nepravidelnú čiaru. Všetky získané

fotografie z každého experimentu som potom manuálne spojil v programe GIMP 2.10.14 (The GIMP Team, 2019). Príklad výslednej zloženej fotografie a detailný výrez ukazujúci vystrelené askospóry sú na obrázku 7.



**Obrázok 7** A – Ukážka výslednej zloženej fotografie sklíčka, na ktorej boli merané vystrelené askospóry u druhu *Octospora erzbergeri* (LJDP26); B – výrez ukazujúci niekoľko vystrelených askospór; mierka: A = 1 mm, B = 100  $\mu$ m.

Vzdialenosť, do akej boli askospóry vystrelené, som meral v programe ImageJ 1.48v (Schneider et al., 2012), ako kolmú vzdialenosť askospóry od okraja fotografie, pri ktorom sa nachádzala plodnica. Takýmto spôsobom som u každého opakovania zmeral všetky askospóry na zloženej fotografii v páse širokom 1 mm (dĺžka pásu závisela na najďalej dostrelených askospórach príslušného druhu). Pokiaľ bolo v tomto páse málo askospór (<100), meral som všetky askospóry na celej spojenej fotografii – čo zodpovedá pásu širokému 3,1 mm. Vždy som si pritom aj poznamenal, či boli príslušné askospóry vystrelené samostatne, alebo ako zhluk niekoľkých askospór. Získal som tak dáta nie len o tom, ako ďaleko jednotlivé druhy svoje askospóry vystreľujú, ale aj tom, ako veľké klastre askospór tvoria.

### 3.7.1 Tvorba klastrov askospór

Ako je vidieť aj na obrázku 7B, askospóry sa po vystrení z vrečka môžu rozdeliť a letieť samostatne, alebo ich niekoľko môže zostať spojených do väčšieho klastru. Pre každé opakovanie som vypočítal priemernú veľkosť klastrov askospór zaznamenaných na analyzovanej časti podložného sklíčka. Priemernú hodnotu pre jednotlivé druhy som potom počítal ako priemer z troch opakovaní. Testoval som závislosť veľkosti

klastrov askospór na nasledovných vybraných morfológických charakteristikách: objem askospór (pri započítaní ornamentiky aj bez ornamentiky), výška ornamentiky, relatívne pokrytie povrchu ornamentikou a  $Q$  hodnota (t. j. pomer dĺžky a šírky askospór). Keďže je ale maximálna možná veľkosť klastru limitovaná počtom askospór vo vrecku, zahrnul som pri analýze do modelu okrem morfológických charakteristík aj počet askospór vo vrecku.

### 3.7.2 Vplyv veľkosti klastru askospór na vzdialenosť jeho vystrelenia

Aby som otestoval, či je vzdialenosť, do akej sú askospóry vystrelené ovplyvnená veľkosťou klastru, analyzoval som vzdialenosti vystrelenia rôzne veľkých klastrov v rámci jednotlivých druhov. V rámci druhu sa totiž medzi sebou askospóry líšia len minimálne a samotný efekt veľkosti klastru by tak mal byť výraznejší. U jednotlivých druhov som pre každé opakovanie vypočítal priemernú vzdialenosť vystrelenia klastrov rôznej veľkosti a následne som vypočítal priemernú hodnotu vzdialenosti vystrelenia rôzne veľkých klastrov askospór pre príslušný druh. Keďže klastre zložené z viac ako štyroch askospór boli u väčšiny druhov veľmi vzácne, analyzoval som iba klastre tvorené 2 – 4 askospórmi. U jednotlivých druhov som vypočítal relatívny rozdiel vo vzdialenosti vystrelenia rôzne veľkých klastrov askospór a samostatných askospór podľa vzorca:  $d_r = (d_n - d_1)/d_1$ , kde  $d_n$  je priemerná vzdialenosť vystrelenia klastra danej veľkosti a  $d_1$  je vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór. Následne som testoval, či sa táto hodnota u rôzne veľkých klastrov signifikantne odlišuje od nuly.

### 3.7.3 Vplyv morfológie askospór na vzdialenosť ich vystrelenia

Jednotlivé druhy bryofilných Pezizales sa medzi sebou výrazne líšia v tom či askospóry vystreľujú samostatne alebo vo väčších klastroch. Aby som odfiltroval rozdiely vo vzdialenosti dopadu askospór v dôsledku tvorby rôzne veľkých klastrov, porovnával som medzi druhmi len vzdialenosť do akej boli vystrelené samostatné askospóry. Vypočítal som najskôr priemernú vzdialenosť doletu samostatných askospór pre jednotlivé opakovania a následne som z nich vypočítal priemernú vzdialenosť doletu pre jednotlivé druhy. Testoval som závislosť vzdialenosti doletu samostatných askospór na nasledovných vybraných morfológických charakteristikách askospór: objem askospór (pri započítaní ornamentiky aj bez ornamentiky), výška ornamentiky, relatívne pokrytie povrchu ornamentikou a  $Q$  hodnota.

## 3.8 Štatistické vyhodnotenie

Všetky štatistické analýzy som robil v programe R 4.0.2 (R Core Team, 2020). Na základe diagnostických grafov som premenné v niektorých prípadoch logaritmicke transformoval. Pri testovaní vplyvu jednotlivých

premenných na vybrané morfológické charakteristiky a šírenie askospór som použil metódu fylogenetických generalizovaných najmenších štvorcov (PGLS) v knižnici „caper“ (Orme et al., 2013). Táto fylogenetická komparatívna metóda totiž na rozdiel od klasických lineárnych modelov pracuje aj s informáciou o príbuzenských vzťahoch analyzovaných organizmov a zohľadňuje, že jednotlivé merania nie sú nezávislé. Pre tvorbu PGLS modelov som použil ultrametrický fylogenetický strom (kap. 3.2.7). Pomocou metódy maximálnej vierohodnosti (ML) som v každom modeli odhadol škálovací parameter lambda (Pagel, 1999), ktorý vyjadruje mieru fylogenetického signálu reziduálov. Hodnota lambda = 1 zodpovedá situácií, kedy majú reziduály silný fylogenetický signál, lambda = 0 vyjadruje absenciu fylogenetického signálu v reziduáloch. V prípade, že sa lambda signifikantne nelíšila od 0 alebo 1, je v konfidenčnom intervale uvedený „?“ . Pri testovaní vplyvu počtu jadier na objem askospór v rámci jednotlivých druhov som použil metódu vážených najmenších štvorcov (WLS). Najskôr som vždy vytvoril celkový model, ktorý obsahoval všetky prediktory, ktoré ma v príslušnej časti zaujímali. Postupne som potom z celkového modelu odstraňoval nesignifikantné premenné, až kým som nevytvoril model, ktorý sa javil ako najvhodnejší.

Pri grafickom znázornení vplyvu jednotlivých prediktorov som v prípade modelov s viacerými signifikantnými prediktormi na osi y zobrazil reziduály vysvetľovanej premennej. Tie som získal z pomocného modelu, ktorý obsahoval všetky prediktory finálneho modelu okrem premennej, ktorej efekt som chcel zobrazit'. Graf tak ukazuje čistý efekt daného prediktoru na vysvetľovanú premennú. Parameter lambda som v pomocnom modeli nastavil fixne podľa jej hodnoty vo finálnom najvhodnejšom modeli.

Parameter lambda pre samotné morfológické charakteristiky askospór som pritom použil aj na odhad sily fylogenetického signálu u týchto znakov.



## 4 Výsledky

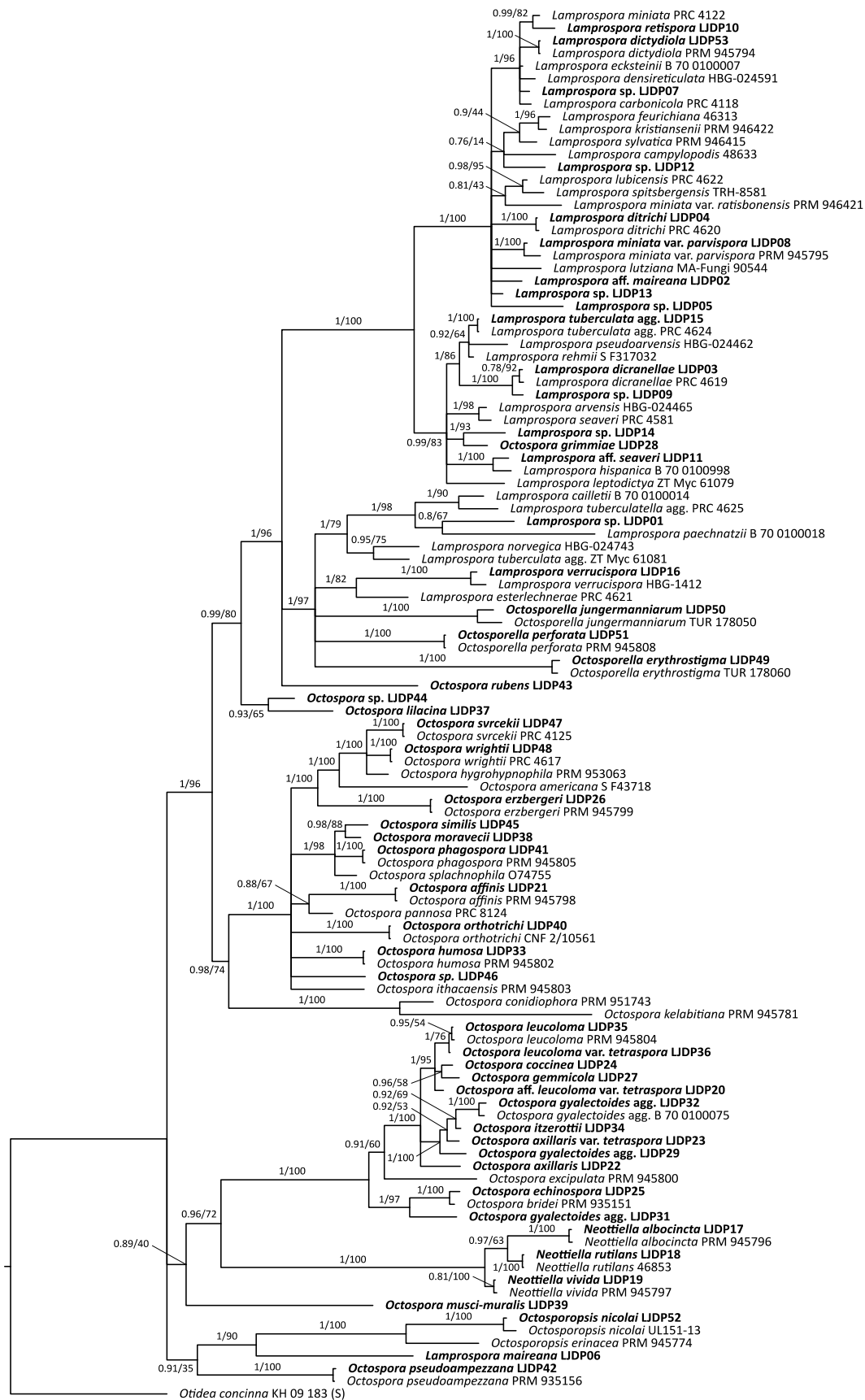
### 4.1 Molekulárne fylogenetické analýzy

Celkovo som u 52 čerstvo nazbieraných zástupcov bryofilných Pezizales získal 140 sekvencií (LSU 52, SSU 48, EF1- $\alpha$  40). Úsek LSU sa mi podarilo úspešne osekvenovať u všetkých sledovaných druhov. Do alignmentov jednotlivých úsekov som zahrnul ďalších 131 sekvencií z databáze GenBank (LSU 58, SSU 40, EF1- $\alpha$  33) a ako *outgroup* som použil sekvencie epitypu druhu *Otidea concinna*. Charakteristiky jednotlivých úsekov spolu s vybraným evolučným modelom sú sumarizované v tabuľke 3. Je zjavné, že úsek SSU bol v porovnaní so zvyšnými dvoma úsekmi výrazne menej variabilný. Úsek EF1- $\alpha$  pritom obsahoval okrem kódujúcich častí sekvencie aj jeden intrón dlhý 31 – 53 bp. Bližšie informácie o jednotlivých zberoch, ktoré som vo fylogenetickej analýze použil, sú uvedené v prílohe v tabuľkách P1 a P2.

**Tabuľka 3** Charakteristika jednotlivých alignmentov po odstránení nespoľahlivo alignovaných pozícií.

Úsek DNA	Dĺžka (počet báz)	Variabilné pozície	Parsimónne informatívne pozície	Evolučný model (Partition Finder 2.1.1)
LSU	541	227 (42,0 %)	190 (35,1 %)	GTR+I+G
SSU	1314	206 (15,7 %)	121 (9,2 %)	GTR+I+G
EF1- $\alpha$	584	231 (39,6 %)	212 (36,3 %)	GTR+I+G

Konsenzuálny fylogenetický strom vytvorený Bayesovskou analýzou mal rovnakú topológiu, ako strom vytvorený metódou maximálnej vierohodnosti. Získané dáta ale neboli v niektorých prípadoch dostatočné na presné zrekonštruovanie všetkých príbuzenských vzťahov medzi druhmi. Výsledný strom tak obsahuje niekoľko polytómii. Napriek tomu sú v ňom ale dobre podporené viaceré fylogenetické línie, ktoré by mohli rámcovo zodpovedať rodom v užšom vymedzení. Ako je vidieť na rovnomernom zastúpení mojich sekvencií, do ďalších analýz som zahrnul druhy z väčšiny línií bryofilných Pezizales, pre ktoré sú v súčasnosti dostupné molekulárne dáta (obr. 8).



**Obrázok 8** Konsenzuálny fylogenetický strom bryofilných zástupcov radu Pezizales, vytvorený Bayesovskou analýzou konkatenovaného alignmentu úsekov LSU, SSU a EF1- $\alpha$ . Hodnoty nad jednotlivými vetvami predstavujú štatistickú podporu: posteriornú pravdepodobnosť (BA) / bootstrapové hodnoty (ML). Tučne sú vyznačené druhy, ktoré boli získané v rámci tejto práce. Detailné informácie o jednotlivých zberoch sú sumarizované v prílohe v tabuľkách P1 a P2.

## 4.2 Charakteristika morfológiá askospór sledovaných druhov

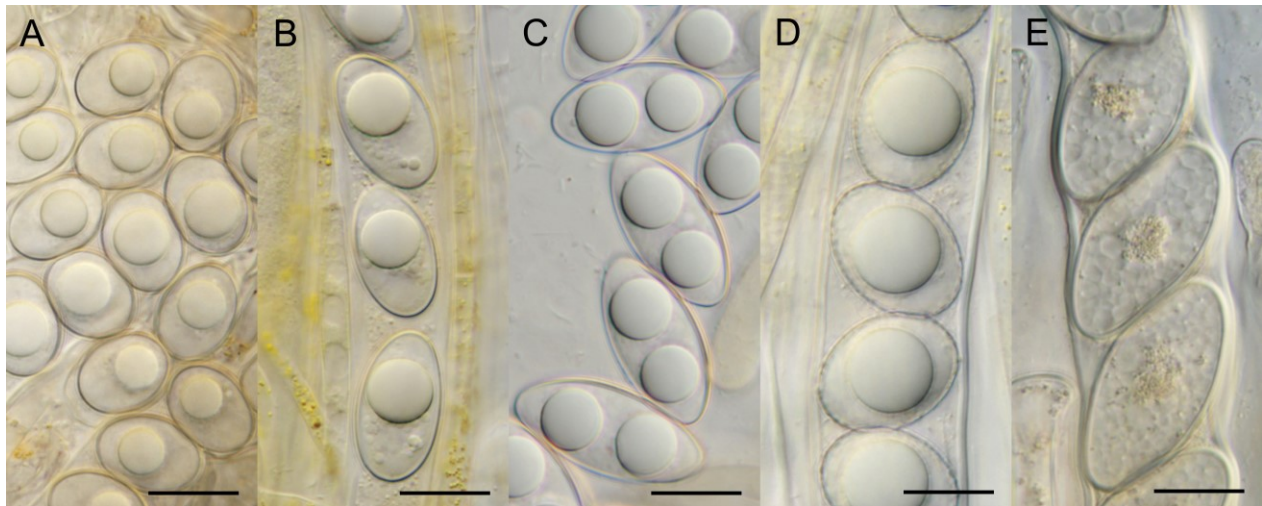
Aby som obmedzil množstvo korelovaných premenných, ktoré vstupovali do rôznych analýz, vybral som štyri hlavné morfológické charakteristiky askospór, ktorými sa v práci ďalej bližšie zaoberám.

**Objem askospór** sa u sledovaných druhov pohyboval v rozmedzí 800 – 3826  $\mu\text{m}^3$  (bez započítania ornamentiky) (obr. 9, 10, P8). Najväčšie askospóry mali dva príbuzné druhy *Octosporpsis nicolai* (LJDP52) a *Lamprospora maireana* (LJDP06). Najmenšie askospóry mal naopak druh *Octospora rubens* (LJDP43). Škálovací parameter lambda mal hodnotu 0,652 (95% konfidenčný interval 0,205 – 0,931), čo ukazuje na stredne silný fylogenetický signál tohto znaku.

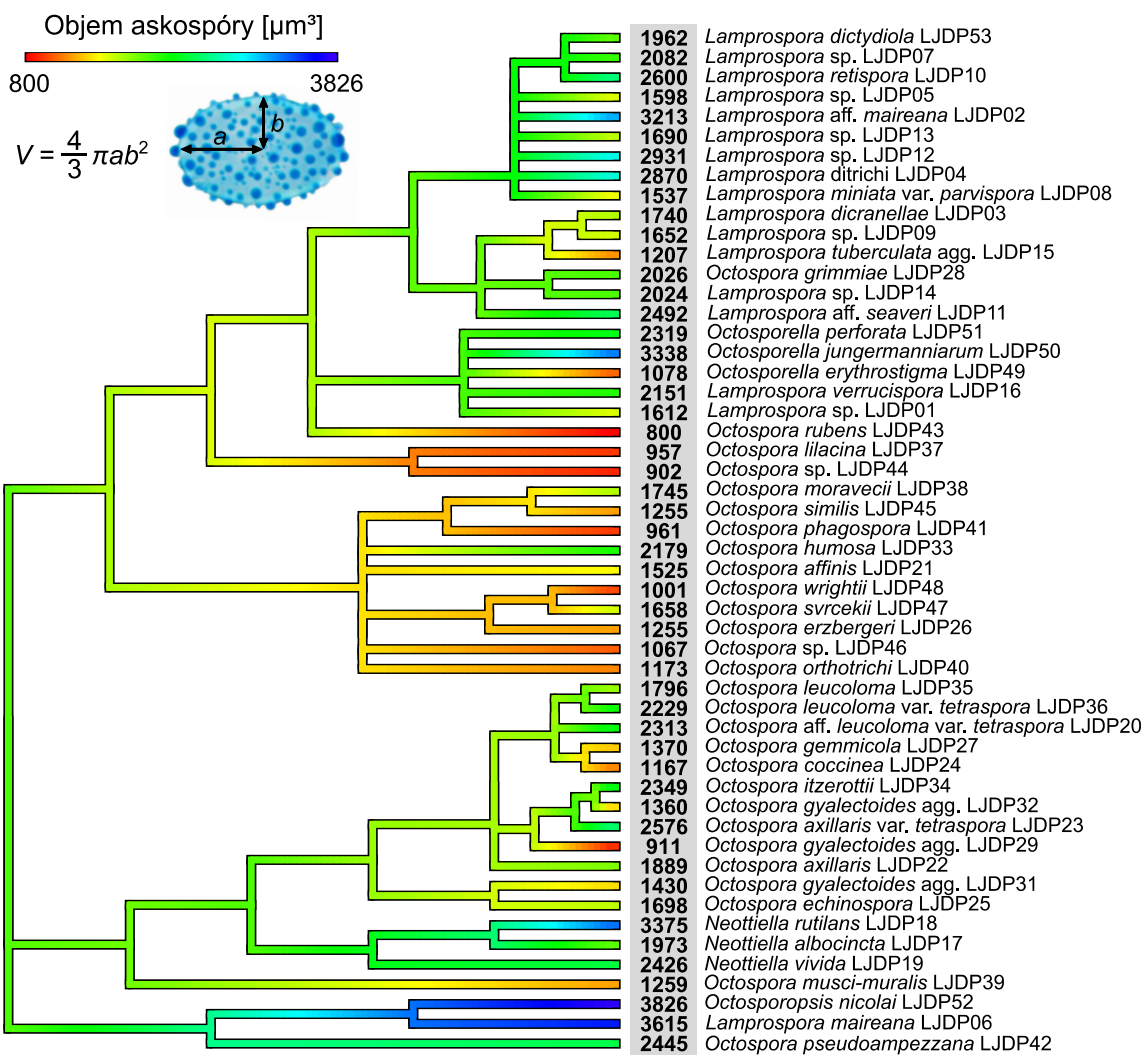
**Výška ornamentiky** sa u sledovaných druhov pohybovala v rozmedzí 0 – 2,5  $\mu\text{m}$  (obr. 11, 12, P9). Zastúpené tak boli jednak druhy, ktorých askospóry sú úplne hladké (celkom 20 druhov), ale aj druhy s výraznou vysokou ornamentikou. Najvyššiu ornamentiku mali druhy *Lamprospora tuberculata* agg. (LJDP15) a *Lamprospora* aff. *maireana* (LJDP02). V rámci niektorých línií sa pritom síce zdá byť konzervovaná prítomnosť či absencia ornamentiky, no samotná výška ornamentiky sa menila pomerne výrazne aj medzi blízko príbuznými druhmi (napríklad u *Lamprospora* sp. LJDP09 a *Lamprospora tuberculata* agg. LJDP15). O relatívne slabom fylogenetickom signáli tohto znaku svedčí aj nízka hodnota parametru lambda = 0,262 (95% konfidenčný interval 0,026 – 0,690).

**Relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou** sa u sledovaných druhov pohybovalo v rozmedzí 0 – 85 % (obr. 13, 14, P10). Najväčšiu časť povrchu askospór mal pokrytú ornamentikou druh *Lamprospora maireana* (LJDP06). Na rozdiel od samotnej výšky ornamentiky sa pritom zdá byť tento znak viac fylogeneticky konzervovaný a medzi príbuznými druhmi sa príliš nemenil. Na stredne silný fylogenetický signál ukazuje aj parameter lambda = 0,633 (95% konfidenčný interval 0,163 – 0,994).

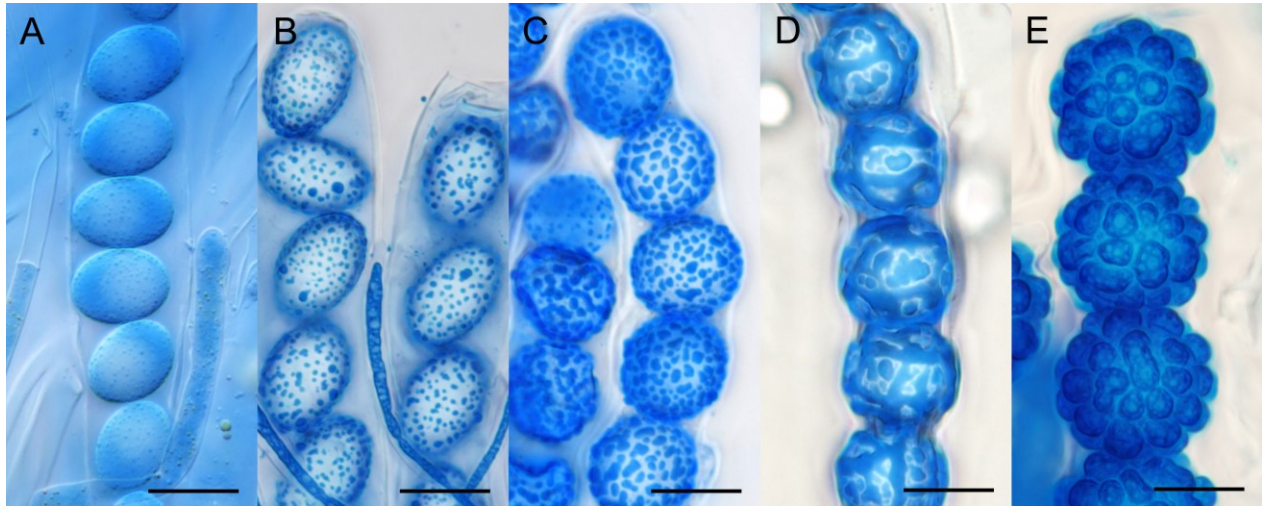
**Pomer dĺžky a šírky askospór** (*Q* hodnota) sa u sledovaných druhov pohyboval v rozmedzí 1,01 – 3,54 (obr. 15, 16, P11). Guľovité askospóry boli pritom dominantné najmä u druhov, ktoré sa obvykle radia do rodu *Lamprospora*. Pretiahnuté elipsoidné askospóry boli naopak časté u rodov *Octosporella*, *Neottiella* a niektorých línií rodu *Octospora*. Tento znak vykazoval stredne silný fylogenetický signál a parameter lambda mal hodnotu 0,577 (95% konfidenčný interval 0,182 – 0,938).



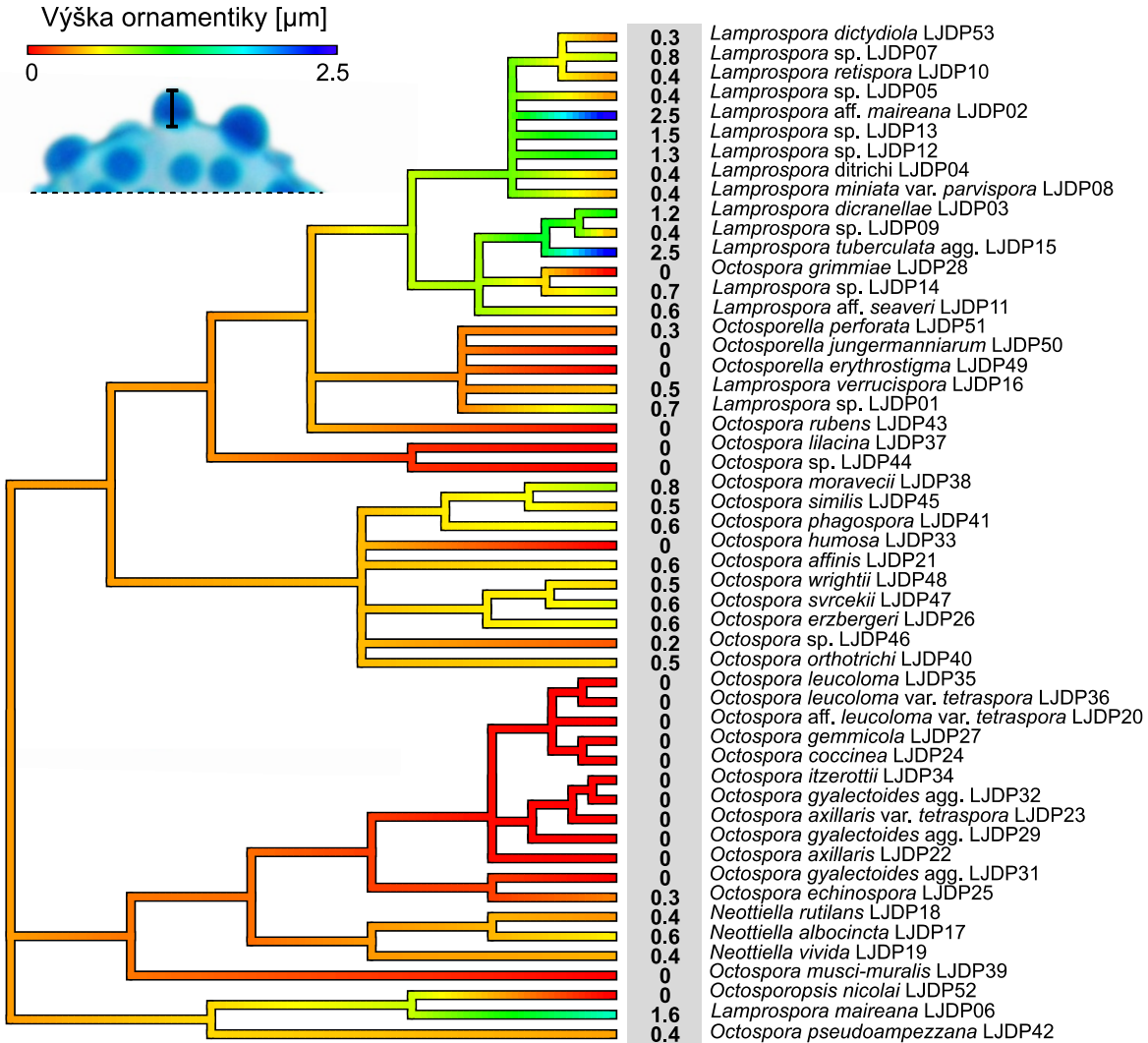
**Obrázok 9** Vybrané druhy bryofilných Pezizales s rôznym priemerným objemom askospór: **A** – *Octospora rubens* (LJDP43), 800  $\mu\text{m}^3$ ; **B** – *Octospora gyalectoides* agg. (LJDP32), 1360  $\mu\text{m}^3$ ; **C** – *Octospora axillaris* (LJDP22), 1889  $\mu\text{m}^3$ ; **D** – *Octospora pseudoampezzana* (LJDP42), 2445  $\mu\text{m}^3$ ; **E** – *Octosporopsis nicolai* (LJDP52), 3826  $\mu\text{m}^3$ ; všetky mierky 10  $\mu\text{m}$ .



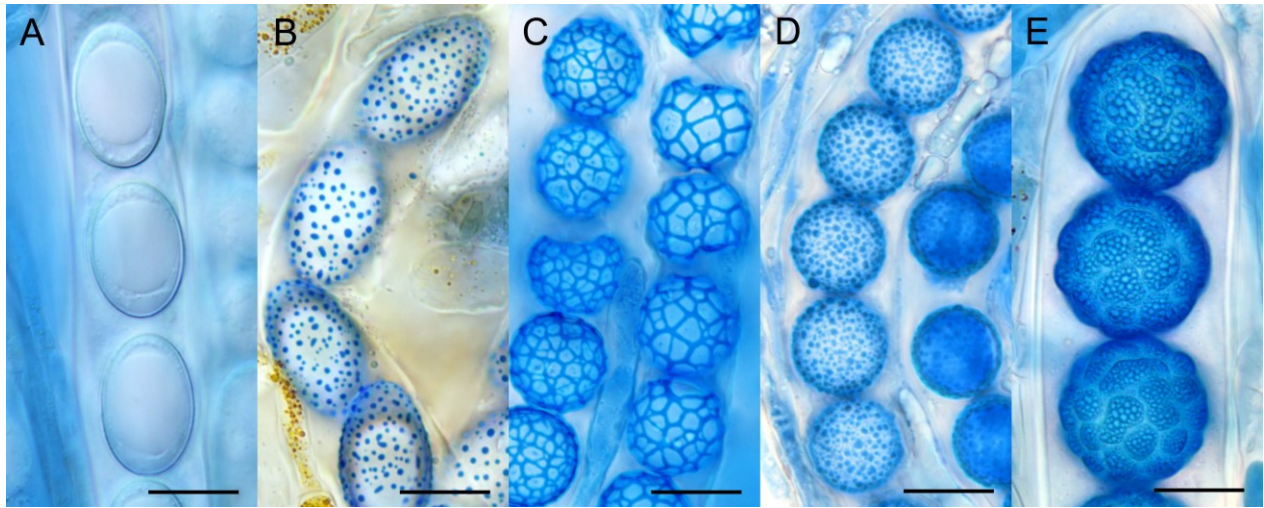
**Obrázok 10** Priemerný objem askospóry sledovaných druhov bryofilných Pezizales. Vo fylogenetickom strome sú farebne zobrazené aj odhady ancestrálnej hodnoty znaku. V šedom obdĺžniku je uvedený priemerný objem askospóry pre príslušné druhy [ $\mu\text{m}^3$ ].



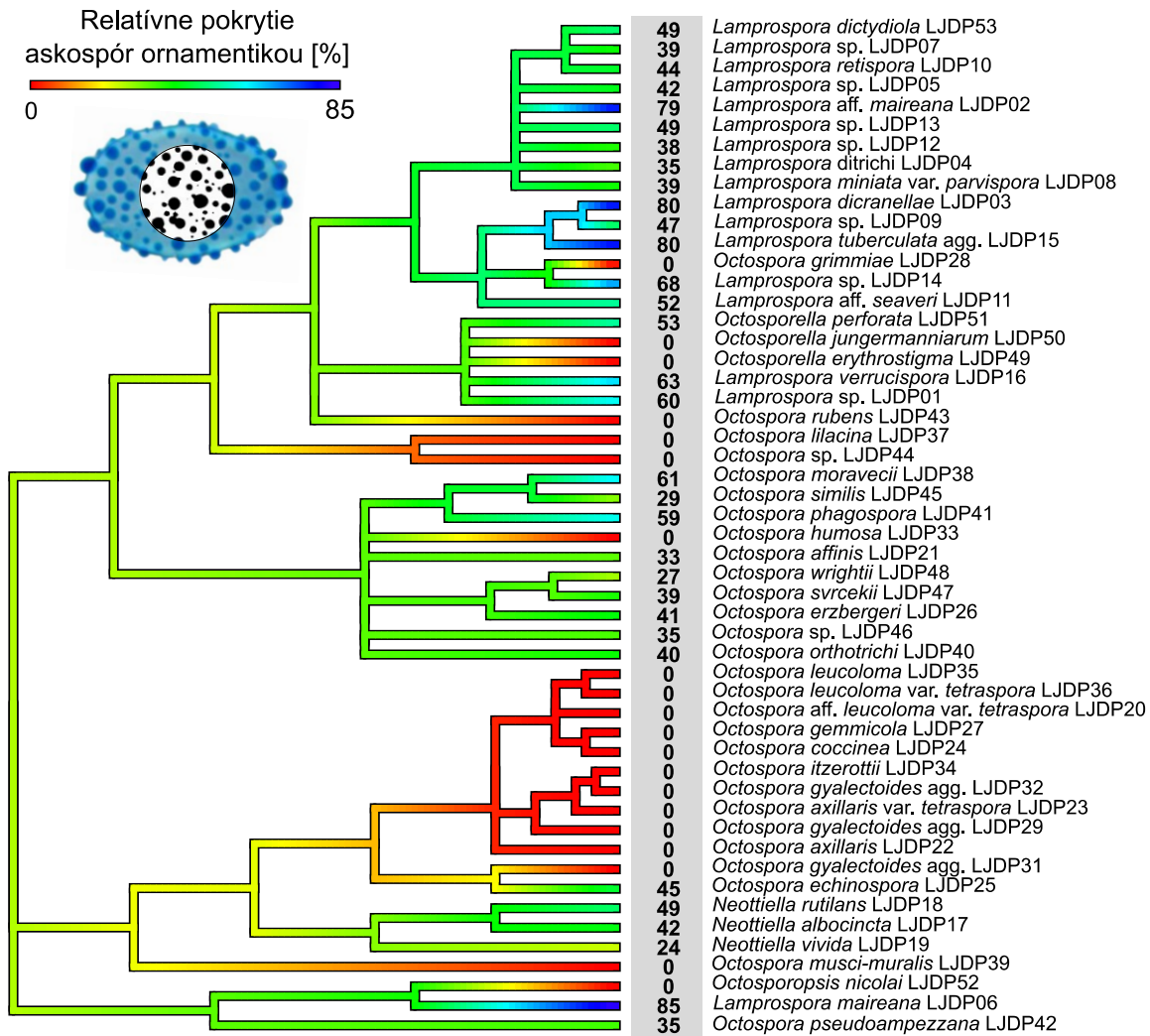
**Obrázok 11** Vybrané druhy bryofilných Pezizales s rôznou priemernou výškou ornamentiky askospór: **A** – *Octospora* sp. (LJDP46), 0,2  $\mu\text{m}$ ; **B** – *Octospora similis* (LJDP45), 0,5  $\mu\text{m}$ ; **C** – *Octospora moravecii* (LJDP38), 0,8  $\mu\text{m}$ ; **D** – *Lamprospora dicranellae* (LJDP03), 1,2  $\mu\text{m}$ ; **E** – *Lamprospora* aff. *maireana* (LJDP02), 2,5  $\mu\text{m}$ ; všetky preparáty farbené bavlníkovou modrou; všetky mierky 10  $\mu\text{m}$ .



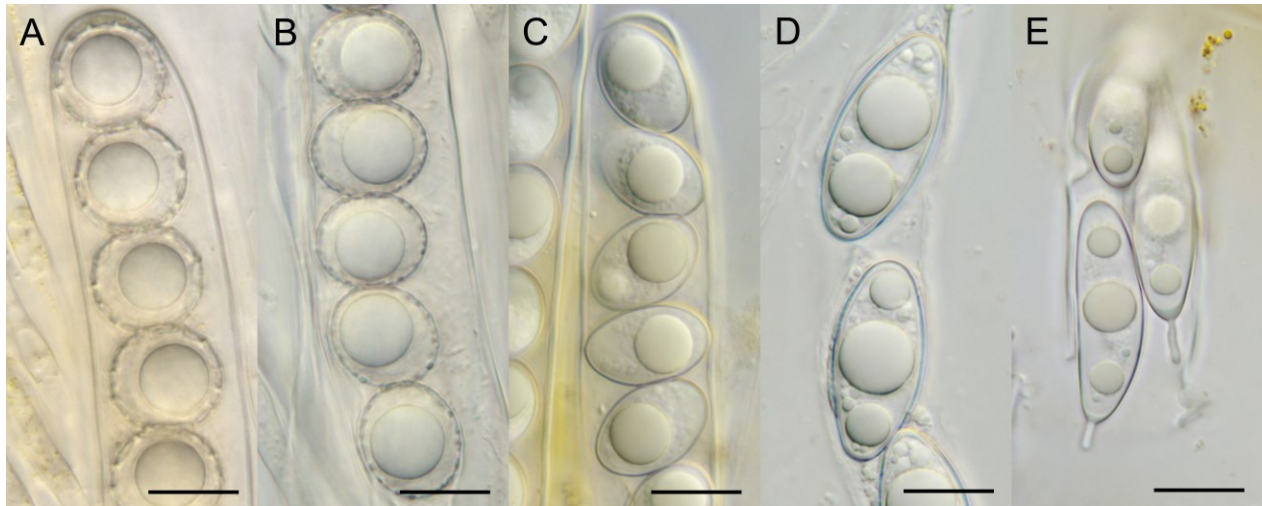
**Obrázok 12** Priemerná výška ornamentiky u sledovaných druhov bryofilných Pezizales. Vo fylogenetickom strome sú farebne zobrazené aj odhady ancestrálnej hodnoty znaku. V šedom obdĺžniku je uvedená priemerná výška ornamentiky u príslušných druhov [ $\mu\text{m}$ ].



**Obrázok 13** Vybrané druhy bryofilných Pezizales s rôznym relatívnym pokrytím askospór ornamentikou: **A** – *Octospora humosa* (LJDP33), 0 %; **B** – *Neottiella vivida* (LJDP19), 24 %; **C** – *Lamprospora* sp. (LJDP05), 42 %; **D** – *Lamprospora verrucispora* (LJDP16), 63 %; **E** – *Lamprospora maireana* (LJDP06), 85 %; všetky preparáty farbené bavlníkovou modrou; všetky mierky 10  $\mu$ m.



**Obrázok 14** Relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou u všetkých sledovaných druhov bryofilných Pezizales. Vo fylogenetickom strome sú farebne zobrazené aj odhady ancestrálnej hodnoty znaku. V šedom obdĺžniku sú uvedené priemerné hodnoty relatívneho pokrytia povrchu askospór ornamentikou u príslušných druhov [%].



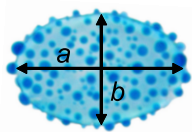
**Obrázok 15** Vybrané druhy bryofilných Pezizales s rôznou priemernou  $Q$  hodnotou askospór: **A** – *Lamprospora miniata* var. *parvispora* (LJDP08), 1,01; **B** – *Octospora affinis* (LJDP21), 1,20; **C** – *Octospora gyalectoides* agg. (LJDP29), 1,72; **D** – *Octospora axillaris* var. *tetraspora* (LJDP23), 2,55; **E** – *Octosporrella erythrostigma* (LJDP49), 3,54; všetky mierky 10  $\mu$ m.

Pomer dĺžky a šírky askospóry

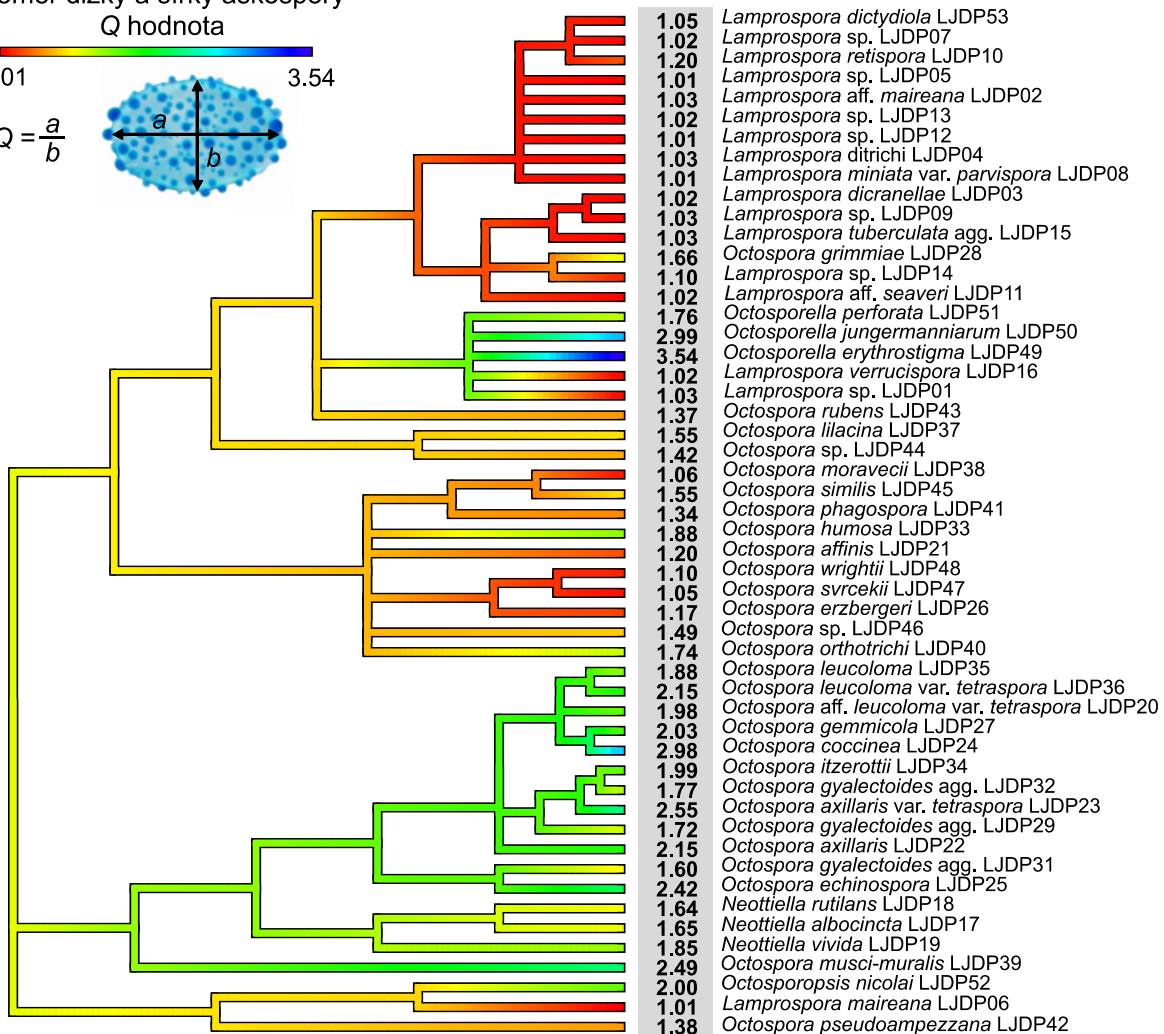
$Q$  hodnota

1.01

$$Q = \frac{a}{b}$$



3.54

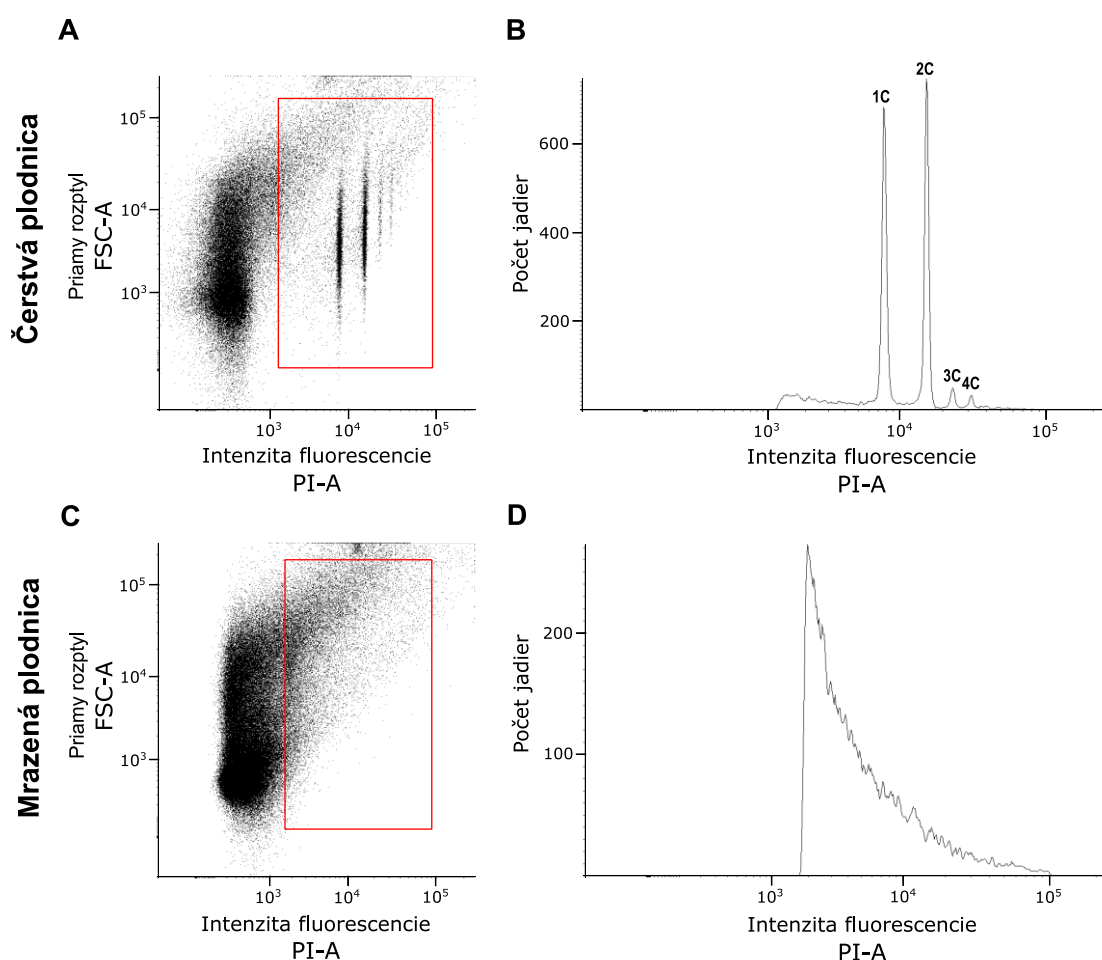


**Obrázok 16** Priemerná  $Q$  hodnota u všetkých sledovaných druhov bryofilných Pezizales. Vo fylogenetickom strome sú farebne zobrazené aj odhady ancestrálnej hodnoty znaku. V šedom obdĺžniku sú uvedené priemerné  $Q$  hodnoty pre príslušné druhy.

## 4.3 Veľkosť genómu

### 4.3.1 Meranie prietokovou cytometriou

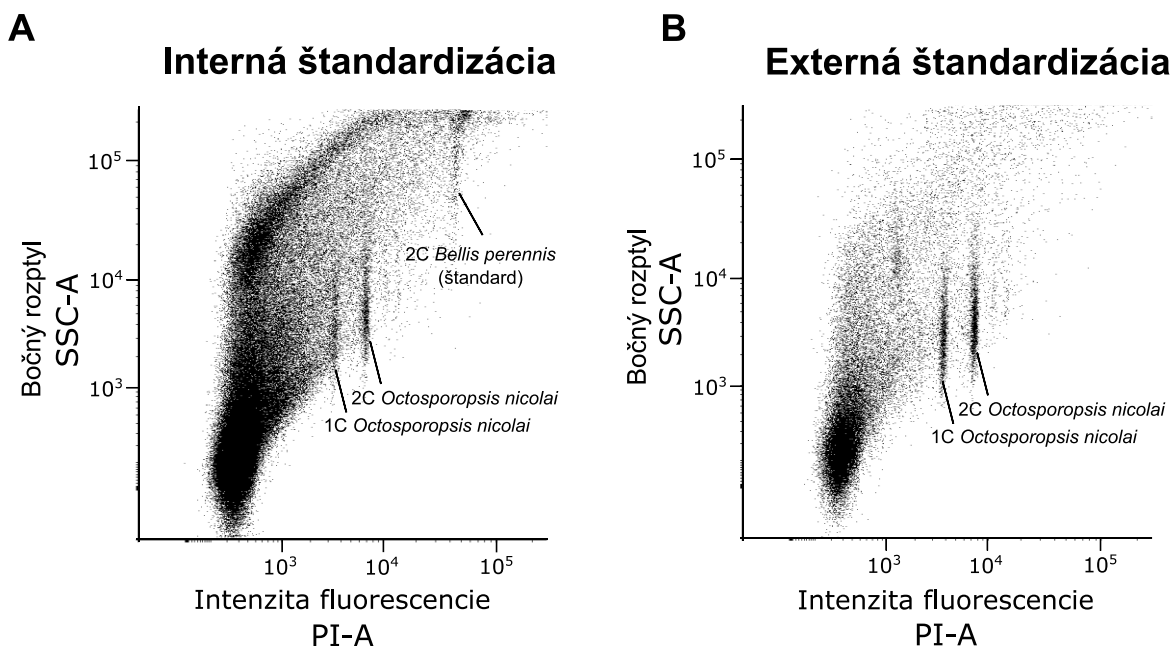
Veľkosť genómu sa mi podarilo zmerať u všetkých sledovaných druhov. Pri použití externej štandardizácie som získal tri úspešné merania u 47 druhov a dve úspešné merania u zvyšných 5 druhov. Pri použití čerstvých vzoriek bola celková úspešnosť meraní 88 % (148/169 meraných vzoriek). Vzorky, ktoré som pred meraním uchovával v mrazničke pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v 25% glycerole, mali úspešnosť meraní iba 20 % (3/15 meraných vzoriek) a obvykle u nich nebol viditeľný žiadny signál, ktorý by zodpovedal fluorescenčne farbeným jadrom (obr. 17).



**Obrázok 17** Výsledky merania veľkosti genómu u druhu *Octospora humosa* (LJDP33): **A** – bodový graf priameho rozptylu (FSC-A) a intenzity fluorescencie (PI-A) pri použití čerstvej plodnice, jadrá tvoria výrazné vertikálne línie, červený obdĺžnik vyznačuje oblasť ktorá je zobrazená v histograme; **B** – histogram intenzity fluorescencie (PI-A) vybranej oblasti pri použití čerstvej plodnice. Dominantné sú populácie 1C, ktorá zodpovedá haploidným jadrom vo fáze G1/G0 bunkového cyklu a 2C, ktorá predstavuje haploidné jadrá vo fáze G2 a diploidné jadrá vo fáze G1/G0; **C** – bodový graf priameho rozptylu (FSC-A) a intenzity fluorescencie (PI-A) pri použití plodnice, ktorá bola dva týždne uchovávaná v mrazničke. Červený obdĺžnik vyznačuje oblasť, ktorá je zobrazená v histograme; **D** – histogram intenzity fluorescencie (PI-A) vybranej oblasti pri použití plodnice, ktorá bola dva týždňov uchovávaná v mrazničke. Nie sú rozlíšiteľné žiadne populácie jadier.



Pri použití internej štandardizácie sa mi podarilo zmerať veľkosť genómu u 18 druhov. Úspešnosť meraní bola 75 % (18/24 meraných vzoriek). Jadrá meranej huby však boli typicky v porovnaní s meraniami bez interného štandardu horšie viditeľné (obr. 18). U 39 % úspešných vzoriek (7/18) som tak veľkosť haploidného genómu musel prepočítať na základe intenzity fluorescence populácie 2C jadier. Tá totiž bola lepšie vidieť kvôli menej výraznému šumu pri vyššej intenzite fluorescence. Pri použití externej štandardizácie som pritom tento prepočet musel robiť len v 2 % meraní (3/151). Výsledky všetkých úspešných meraní oboch typov štandardizácie sú sumarizované v prílohe v tabuľke P12.



**Obrázok 18** Výsledky merania veľkosti genómu u druhu *Octosporopsis nicolai* (LJDP52): **A** – bodový graf bočného rozptylu (SSC-A) a intenzity fluorescence (PI-A) pri internej štandardizácii s *Bellis perennis*. Jadrá sledovaného druhu sú horšie viditeľné kvôli výraznému šumu. **B** – bodový graf bočného rozptylu (SSC-A) a intenzity fluorescence (PI-A) pri použití externej štandardizácii (*Bellis perennis* bola farbená a meraná samostatne).

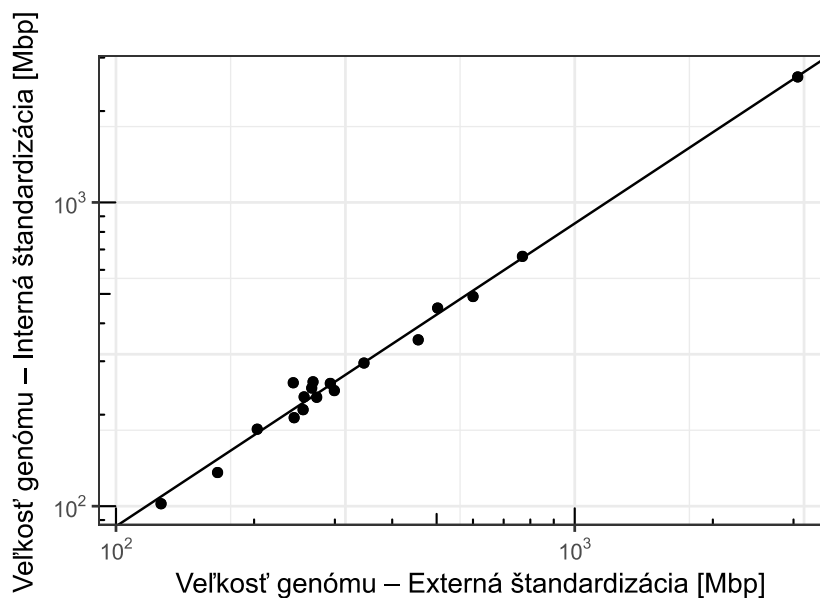
Pri použití externej štandardizácie bola priemerná veľkosť genómu spravidla vyššia, než hodnoty získané pri použití internej štandardizácie (v priemere o 17 %). Líšili sa medzi sebou pritom už samotné hodnoty intenzity fluorescence meraných vzoriek v závislosti na použitej metóde štandardizácie. Hodnoty intenzity fluorescence štandardu boli naopak pri oboch typoch štandardizácie v rámci jednej série meraní približne rovnaké. To naznačuje, že použitý štandard zrejme obsahuje látky, ktoré nejakým spôsobom interagujú s farbením jadier a systematicky znižujú nameranú intenzitu fluorescence. Pri použití externej štandardizácie sa ale tento efekt prejaví iba na nameranej fluorescencii štandardu, čo má potom za následok, že je vypočítaná absolútnu veľkosť genómu všetkých meraných vzoriek nadhodnotená.

V tejto práci ma ale zaujímali hlavne relatívne rozdiely vo veľkosti genómu medzi druhmi. Rozhodol som sa preto pracovať ďalej práve s hodnotami z meraní s externou štandardizáciou, ktoré som mal k dispozícii

pre všetky sledované druhy v niekoľkých opakovaniach. Aby som ale aj napriek tomu získal čo možno najpresnejší odhad absolútnej veľkosti genómu, pokúsil som sa skorigovať chybu meraní s použitím externej štandardizácie. Vytvoril som PGLS model závislosti veľkosti genómu pri použití internej štandardizácie na priemernej veľkosti genómu pri použití externej štandardizácie (tab. 4, obr. 19). Obe premenné som logaritmicky transformoval, aby som tak zmenšil efekt druhov s výrazne väčším genómom, ktoré predstavovali odľahlé hodnoty. Na základe koeficientov tohto modelu som pre jednotlivé druhy vypočítal predikovanú veľkosť genómu pri použití internej štandardizácie a tieto hodnoty používam v nasledovných analýzach pod označením „veľkosť genómu“.

**Tabuľka 4** Výsledky PGLS modelu závislosti veľkosti genómu pri použití internej štandardizácie na veľkosti genómu pri použití externej štandardizácie. Obe premenné sú logaritmicky transformované, lambda = 0 (95% konfidenčný interval ? – 0,940), N = 18.

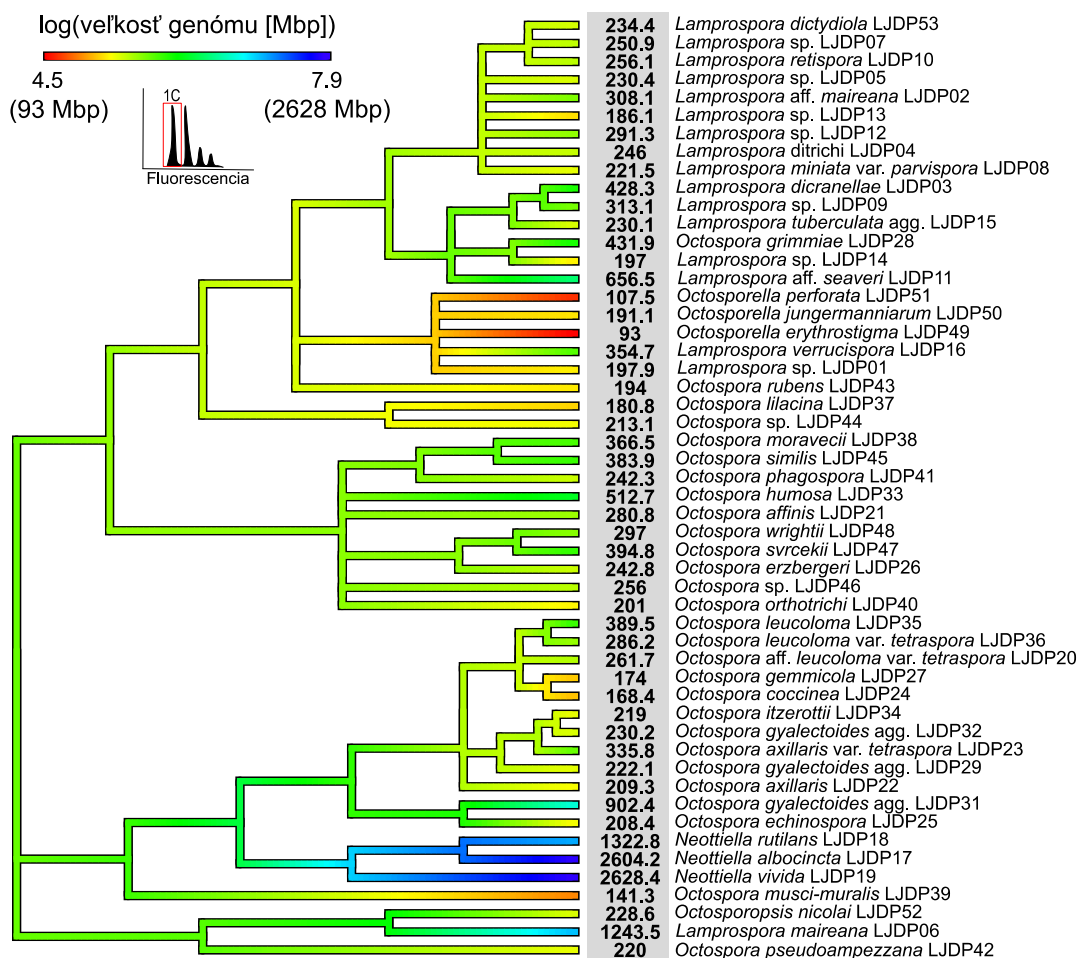
log(veľkosť genómu – interná štandardizácia)~ log(veľkosť genómu – externá štandardizácia)						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
log(veľkosť genómu – externá štandardizácia)	1	9,7562	9,7562	1354,38	<0,00001	***
Reziduály	16	0,1153	0,0072			



**Obrázok 19** Závislosť veľkosti genómu pri použití internej štandardizácie na veľkosti genómu pri použití externej štandardizácie. Obe premenné sú logaritmicky transformované. Osi zobrazujú pôvodné hodnoty zobrazené na logaritmickej škále.

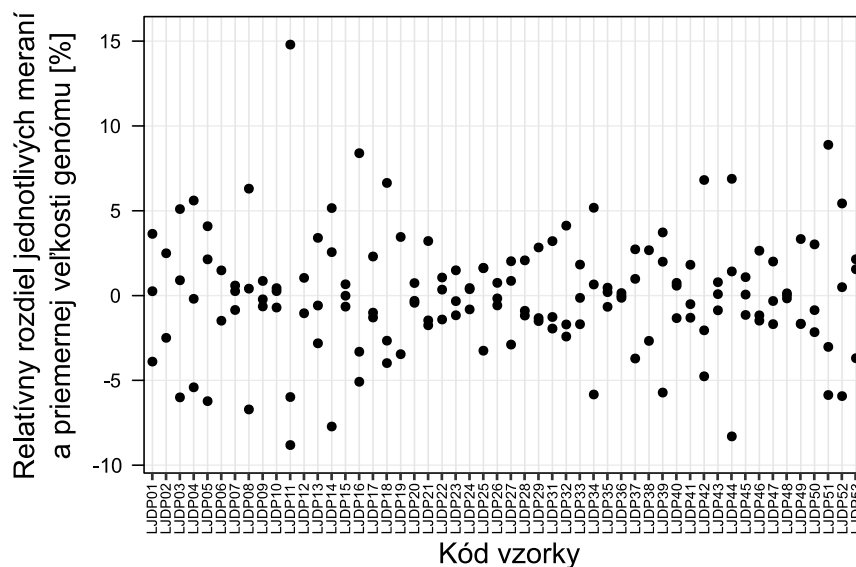
### 4.3.2 Veľkosť genómu sledovaných druhov

Veľkosť genómu sa medzi sledovanými druhmi výrazne líšila a pohybovala sa v rozsahu 93 – 2628 Mbp (obr. 20). Najväčší genóm som zaznamenal u druhu *Neottiella vivida* (LJDP19), naopak najmenší u druhu *Octosporella erythrostigma* (LJDP49). Priemerná veľkosť genómu naprieč druhmi bola 407 Mbp (medián 244 Mbp).



**Obrázok 20** Priemerná veľkosť genómu u sledovaných bryofilných zástupcov radu Pezizales. Vo fylogenetickom strome sú farebne zobrazené odhady ancestrálnej hodnoty znaku po logaritmickej transformácii. V šedom obdĺžniku sú uvedené priemerná veľkosť genómu u jednotlivých druhov [Mbp].

Veľkosť genómu sa pritom u sledovaných druhov zdá byť na základe opakovaných meraní pri použití externej štandardizácie pomerne konštantná a vo väčšine prípadov bola odchýlka konkrétnych meraní od priemernej veľkosti genómu daného druhu menšia ako 10 % (obr. 21).



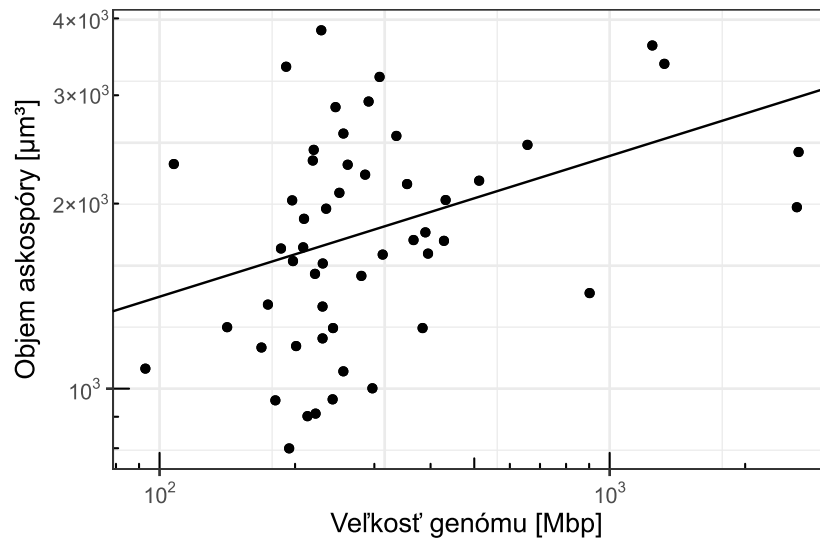
**Obrázok 21** Variabilita v nameraných hodnotách veľkosti genómu u jednotlivých sledovaných druhov (pri použití externej štandardizácie). U každého druhu sú zobrazené rozdiely medzi jednotlivými meraniami a priemernou veľkosťou genómu daného druhu, vydelené priemernou veľkosťou genómu [%]. Jednotlivé druhy sú označené kódom vzorky.

### 4.3.3 Vplyv veľkosti genómu na objem askospór

Objem askospór u sledovaných druhov signifikantne závisel na veľkosti genómu ( $p = 0,0069$ , tab. 5). Druhy s väčším genómom mali askospóry s výrazne väčším objemom (obr. 22). Tento vzťah ale nie je príliš silný a pomerne veľkú časť variability v objeme askospór vysvetliť nedokáže.

**Tabulka 5** Výsledky PGLS modelu testujúceho vplyv veľkosti genómu na objem askospór,  $\lambda = 0,585$  (95% konfidenčný interval 0,124 – 0,903),  $N = 52$ .

log(objem askospóry) ~ log(veľkosť genómu)						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
log(veľkosť genómu)	1	1,5872	1,5872	7,9355	<b>0,0069</b>	<b>**</b>
Reziduály	50	10,0003	0,2000			



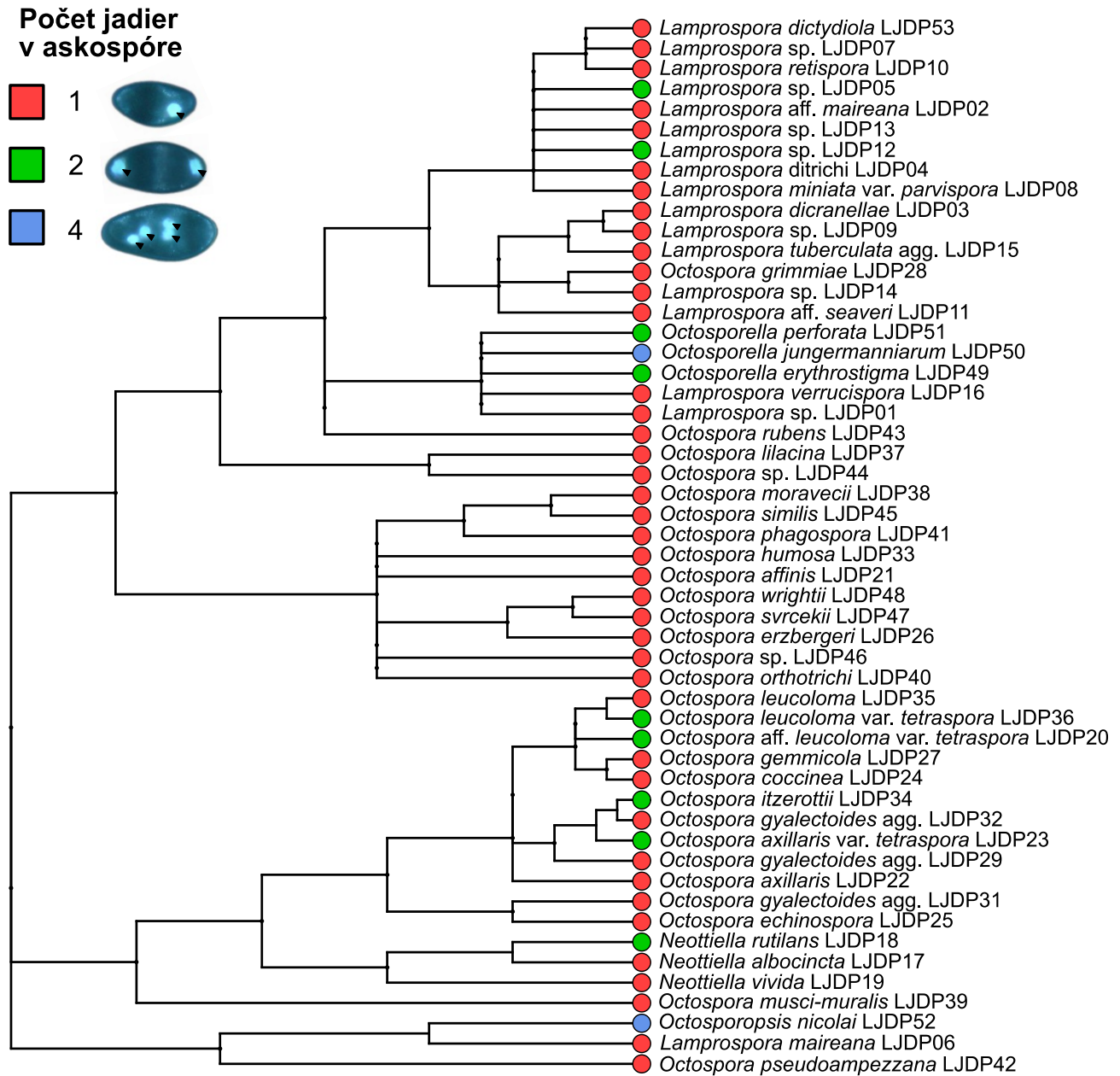
**Obrázok 22** Závislosť objemu askospóry na veľkosti haploidného genómu. Obe premenné sú logaritmicke transformované. Osi zobrazujú pôvodné hodnoty zobrazené na logaritmickej škále.

## 4.4 Počet jadier v askospórach

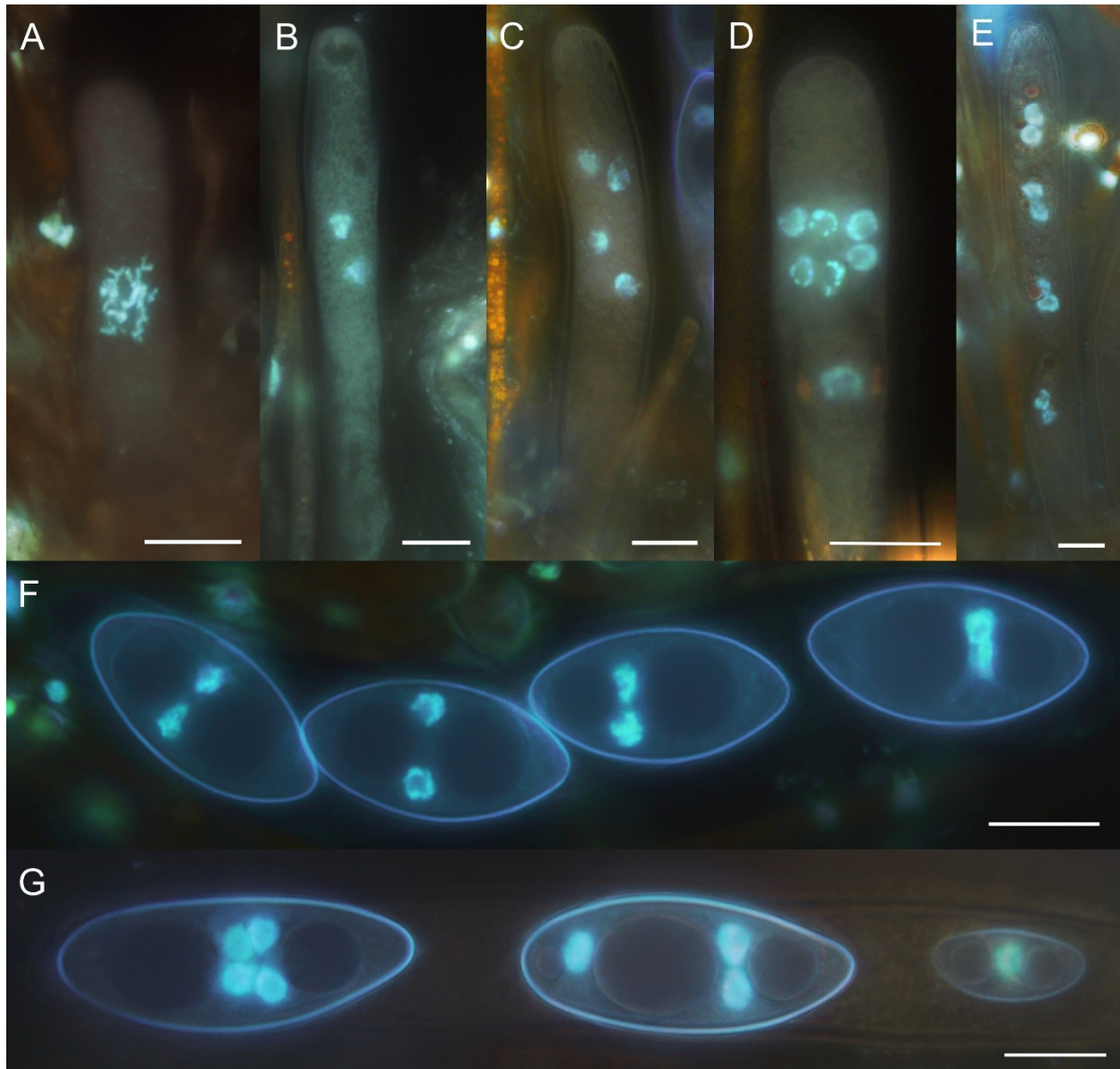
### 4.4.1 Fluorescenčná mikroskopia

Počet jadier v askospórach som fluorescenčnou mikroskopiou úspešne zistil u všetkých 52 sledovaných druhov. Jadrá boli vždy dobre viditeľné, bez ohľadu na to či som použil čerstvé, sušené, mrazené plodnice alebo samostatné vystrelené askospóry. Väčšina sledovaných zástupcov bryofilných Pezizales mala askospóry len s jedným jadrom. U niektorých druhov vo viacerých líniách ale zjavne došlo nezávisle na sebe k prechodu k askospóram s dvoma alebo štyrmi jadrami (obr. 23).

Rozdiely v počte jadier som ale pozoroval aj v rámci druhu. Jeden počet jadier bol síce pre druh spravidla dominantný, no vzácné som u niektorých druhov zaznamenal aj askospóry s vyšším alebo nižším počtom jadier. Najčastejšie sa pritom takéto askospóry vyskytovali druhov rodu *Octospora* s vreckami so štyrmi askospórami. Príčinou tohto fenoménu je pritom zrejme neštandardné rozdelenie 8 jadier, ktoré vznikli pri meioze a mitóze dozrievajúceho vrečka (obr. 24).



**Obrázok 23** Fylogenetický strom sledovaných bryofilných zástupcov radu Pezizales, na ktorom je pri jednotlivých druhoch farebne vyznačený prevažujúci počet jadier v ich askospórach.



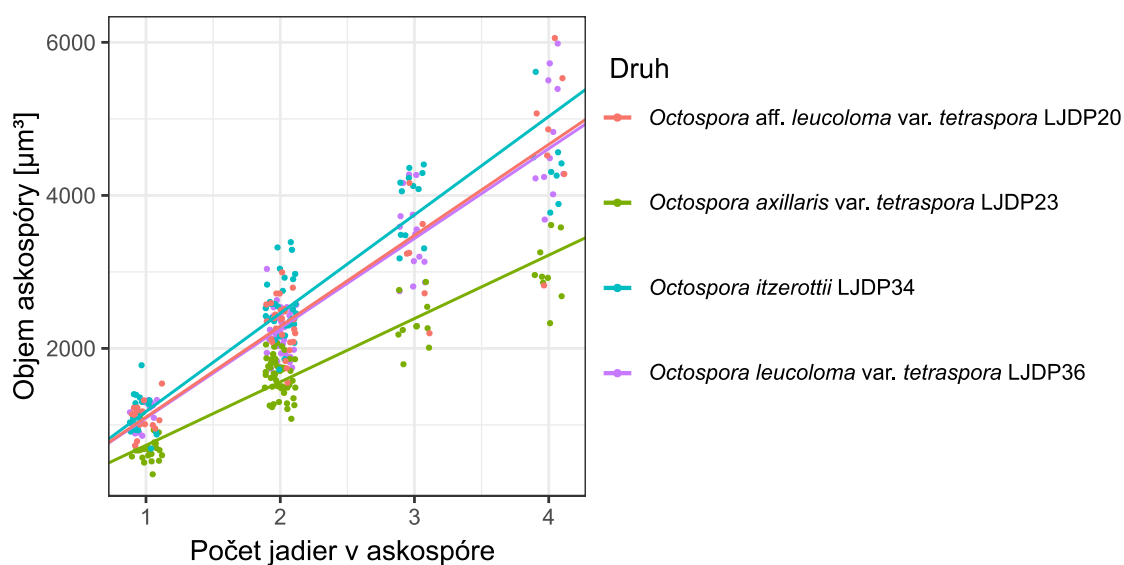
**Obrázok 24** Rôzne štádiá dozrievania vrečka a tvorby askospór u druhu *Octospora axillaris* var. *tetraspora* (LJDP23): **A** – prvé meiotické delenie diploidného jadra s dobre viditeľnými špiralizovanými chromozómami; **B** – vrečko s dvoma jadrami, ktoré vznikli po prvom meiotickom delení; **C** – vrečko so štyrmi jadrami, ktoré vznikli po druhom meiotickom delení; **D** – vrečko s ôsmymi jadrami, ktoré vznikli mitotickým rozdelením jadier (ôsme jadro je mimo roviny ostrosti); **E** – vrečko v ktorom sa začínajú diferencovať askospóry; **F** – vrečko zo štyrmi diferencovanými askospórami s dvoma jadrami. **G** – vrečko s iba tromi diferencovanými askospórami s atypickým rozdelením ôsmich jadier medzi askospóry; všetky mierky – 10 μm.

## 4.4.2 Vplyv počtu jadier na objem askospór

Vplyv počtu jadier na objem askospór som sledoval u štyroch druhov, u ktorých sa mi podarilo zmerať dostatočné množstvo askospór s rôznym počtom jadier. Vzhľadom na výraznú heteroschedasticitu reziduálov som použil na analýzu u všetkých druhov metódu vážených najmenších štvorcov (WLS). Počet jadier mal na objem askospór vo všetkých prípadoch vysoko signifikantný vplyv (pre všetky štyri druhy  $p < 0,00001$ , tab. 6). Askospóry s vyšším počtom jadier mali výrazne väčší objem (obr. 25).

**Tabuľka 6** Výsledky WLS modelov testujúcich vplyv počtu jadier na objem askospór u štyroch analyzovaných druhov, N = 56, 94, 74 a 80.

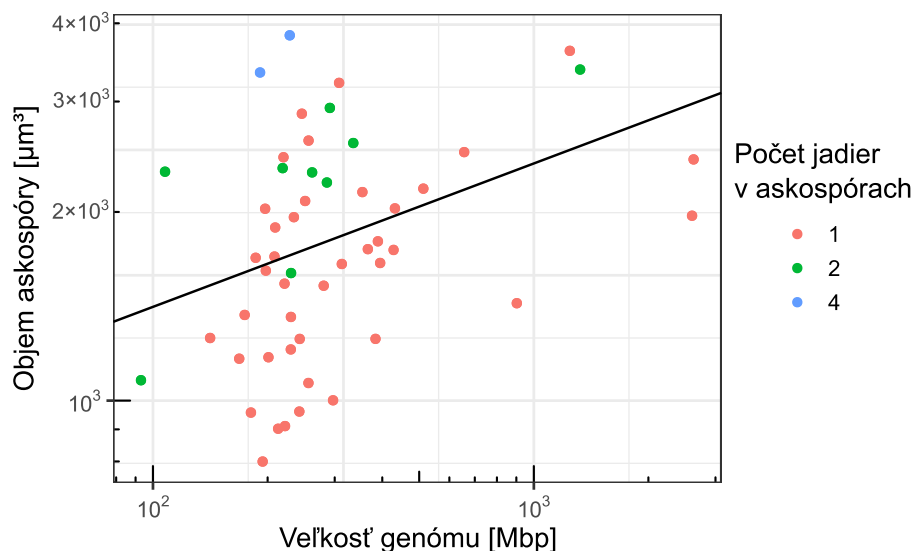
objem askospóry ~ počet jadier						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
<b><i>Octospora aff. leucoloma var. tetraspora</i> LJDP20</b>						
počet jadier	1	618,6054	618,6054	295,4101	<0,00001	***
Reziduály	54	113,079	2,0941			
<b><i>Octospora axillaris var. tetraspora</i> LJDP23</b>						
počet jadier	1	895,9376	895,9376	620,7322	<0,00001	***
Reziduály	92	132,7888	1,4434			
<b><i>Octospora itzerottii</i> LJDP34</b>						
počet jadier	1	817,4111	817,4111	544,0821	<0,00001	***
Reziduály	72	108,1704	1,5024			
<b><i>Octospora leucoloma var. tetraspora</i> LJDP36</b>						
počet jadier	1	1091,84	1091,84	707,0659	<0,00001	***
Reziduály	78	120,4464	1,5442			



**Obrázok 25** Závislosť objemu askospór na počte jadier u štyroch rôznych sledovaných druhov. Body na grafe majú hodnotu na osi x mierne posunutú tak, aby sa jednotlivé merania menej prekrývali. Reálne ale nadobúdali iba celočíselné hodnoty.



Keď pritom v grafe vplyvu veľkosti genómu na objemu askospór (analyzovanom v kap. 4.3.3) farebne vyznačí počet jadier u jednotlivých druhov, je dobre vidieť, že práve druhy s vyšším počtom jadier predstavujú veľkú časť odľahlejších hodnôt (obr. 26).

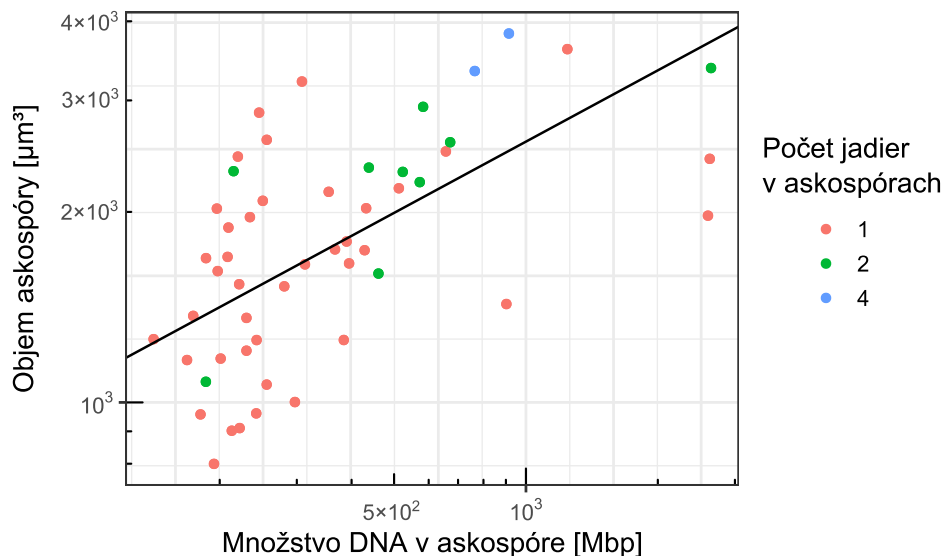


**Obrázok 26** Závislosť objemu askospóry na veľkosti haploidného genómu. Obe premenné sú logaritmicke transformované. Osi zobrazujú pôvodné hodnoty zobrazené na logaritmickej škále. Farebne je vyznačený počet jadier jednotlivých druhov.

Vytvoril som PGLS model, ktorý testoval vplyv celkového množstva DNA v askospóre (násobku počtu jadier a veľkosti genómu) na objem askospór. Celkové množstvo DNA v askospóre malo naprieč sledovanými druhmi vysoko významný vplyv na objem askospór ( $p < 0,00001$ , tab. 7). Druhy s väčším celkovým množstvom DNA v askospórach majú askospóry s výrazne väčším objemom (obr. 27). Tento model pritom vysvetľuje variabilitu v objeme askospór výrazne lepšie než model, ktorý bral do úvahy iba samotnú veľkosť genómu. Veľkosť genómu a počet jadier mali naprieč druhmi významný vplyv aj v prípade, že som ich do modelu zahrnul ako samostatné prediktory (tab. 8).

**Tabuľka 7** Výsledky PGLS modelu testujúceho vplyv celkového množstva DNA v askospórach na objem askospór,  $\lambda = 0,657$  (95% konfidenčný interval 0,187 – 0,971),  $N = 52$ .

log(objem askospóry) ~ log(celkové množstvo DNA v askospóre)						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
log(celkové množstvo DNA)	1	4,5872	4,5872	28,8581	<0,00001	***
Reziduály	50	7,9479	0,1590			



**Obrázok 27** Závislosť objemu askospóry na celkovom množstve DNA v askospóre – násobku veľkosti haploidného genómu a počtu jadier. Obe premenné sú logaritmicke transformované. Osi zobrazujú pôvodné hodnoty zobrazené na logaritmickej škále. Farebne je vyznačený dominantný počet jadier jednotlivých druhov.

**Tabuľka 8** Výsledky PGLS modelu testujúceho samostatne vplyv počtu jadier a veľkosti genómu na objem askospór,  $\lambda = 0,554$  (95% konfidenčný interval 0,080 – 0,939),  $N = 52$ .

log(objem askospóry) ~ log(veľkosť genómu) + počet jadier						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
log(veľkosť genómu)	1	1.5503	1.5503	11.3434	<b>0.0015</b>	**
počet jadier	1	3.0081	3.0081	22.0102	<b>&lt;0.0001</b>	***
Reziduály	49	6.6969	0.1367			

## 4.5 Hostiteľské machorasty a ich vzťah s morfológiou askospór

Hostiteľské machorasty sa mi podarilo identifikovať vo všetkých prípadoch s výnimkou druhu *Octospora* aff. *leucoloma* var. *tetraspora* (LJDP20). Jeho hostiteľom bol totiž druh z rodu *Bryum*, na ktorého presné určenie by bolo potrebné mať k dispozícii aj toboľky s výtrusmi, ktoré som ale na lokalite nenašiel.

Infekčný aparát sa mi na hostiteľovi podarilo nájsť u všetkých sledovaných druhov. Bližšie informácie o hostiteľoch, mieste pripojenia infekčného aparátu a ich ekologických charakteristikách a životných formách sú sumarizované v prílohe v tabuľke P7. Keďže ale práca Dierßen (2001) neuvádza u hostiteľov ôsmich druhov ich toleranciu k vysokým teplotám, do analýz som ich nezahrnul.

### 4.5.1 Objem askospór

Miesto infekcie ani žiadna z testovaných ekologických charakteristík hostiteľov nemala na základe celkového modelu signifikantný vplyv na objem askospór sledovaných bryofilných Pezizales (tab. 9). Z výsledkov kapitoly 4.4.2 je ale zrejmé, že objem askospór je silne ovplyvnený veľkosťou genómu a počtom jadier v askospóre. Aby som zohľadnil vplyv týchto premenných, zahrnul som ich preto tiež do analýzy. Okrem známeho efektu počtu jadier a veľkosti genómu mala v tomto celkovom modeli signifikantný vplyv na objem askospór aj tolerancia hostiteľských machorastov k vysokým teplotám ( $p = 0,0303$ , tab. 10). Po odstránení nesignifikantných prediktorov boli výsledky finálneho modelu veľmi podobné. Aj v tomto prípade mala tolerancia hostiteľských machorastov k vysokým teplotám signifikantný vplyv ( $p = 0,0138$ , tab. 11). Druhy viazané na machorasty schopné tolerovať vysoké teploty mali askospóry s väčším objemom, ako druhy viazané na machorasty rastúce v chladnejších oblastiach (obr. 28).

**Tabuľka 9** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných ekologických charakteristík hostiteľa na objem askospór, lambda = 0,551 (95% konfidenčný interval ? – 0,993), N = 43.

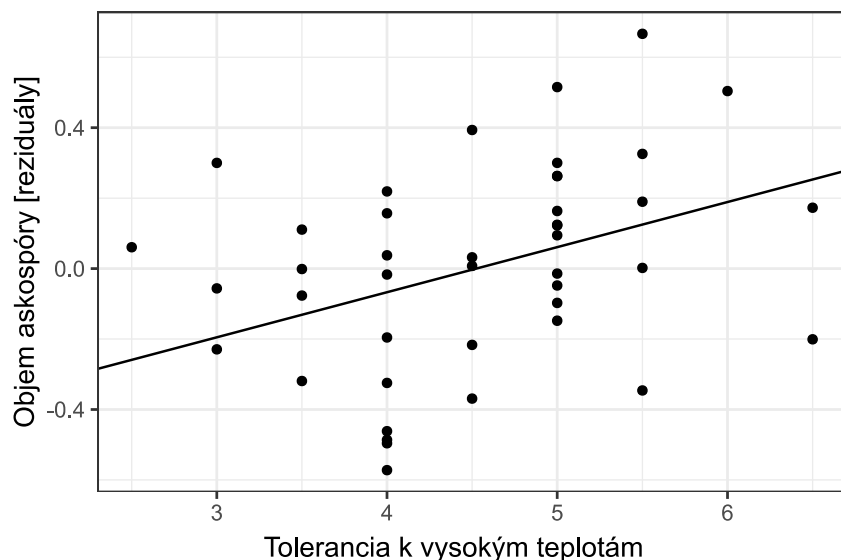
log(objem askospóry) ~ pH prostredia (hostiteľ) + vlhkosť prostredia (hostiteľ) + množstvo svetla (hostiteľ) + tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ) + životná forma (hostiteľ) + miesto pripojenia infekcie					
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota
pH prostredia (hostiteľ)	1	0,1308	0,1308	0,5103	0,4799
vlhkosť prostredia (hostiteľ)	1	0,2098	0,2098	0,8184	0,3720
množstvo svetla (hostiteľ)	1	0,0822	0,0822	0,3208	0,5748
tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ)	1	0,0060	0,0060	0,0232	0,8798
životná forma (hostiteľ)	2	0,5316	0,2658	1,0371	0,3654
miesto pripojenia infekcie	2	0,2312	0,1156	0,4510	0,6407
Reziduály	34	8,7140	0,2563		

**Tabuľka 10** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných ekologických charakteristík na objem askospór po zohľadnení veľkosti genómu a počtu jadier, lambda = 0,133 (95% konfidenčný interval ? – ?), N = 43.

log(objem askospóry) ~ log(veľkosť genómu) + počet jadier + pH prostredia (hostiteľ) + vlhkosť prostredia (hostiteľ) + množstvo svetla (hostiteľ) + tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ) + životná forma (hostiteľ) + miesto pripojenia infekcie						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
log(veľkosť genómu)	1	1,4969	1,4969	15,6998	<b>0,0004</b>	***
počet jadier	1	2,3000	2,3000	24,1229	<b>&lt;0,0001</b>	***
pH prostredia (hostiteľ)	1	0,0505	0,0505	0,5296	0,4721	
vlhkosť prostredia (hostiteľ)	1	0,0908	0,0908	0,9525	0,3364	
množstvo svetla (hostiteľ)	1	0,0428	0,0428	0,4485	0,5079	
tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ)	1	0,4899	0,4899	5,1387	<b>0,0303</b>	*
životná forma (hostiteľ)	2	0,0836	0,0418	0,4382	0,6490	
miesto pripojenia infekcie	2	0,2395	0,1198	1,2562	0,2984	
Reziduály	32	3,0510	0,0953			

**Tabuľka 11** Výsledky finálneho PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných ekologických charakteristík hostiteľa na objem askospór po zohľadnení veľkosti genómu a počtu jadier, lambda = 0,269 (95% konfidenčný interval ? – 0,886), N = 43.

log(objem askospóry) ~ log(veľkosť genómu) + počet jadier + tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ)						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
log(veľkosť genómu)	1	1,5947	1,5947	17,0486	<b>0,0002</b>	***
počet jadier	1	2,3483	2,3483	25,1056	<b>&lt;0,0001</b>	***
tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ)	1	0,6220	0,6220	6,6497	<b>0,0138</b>	*
Reziduály	39	3,6480	0,0935			



**Obrázok 28** Závislosť objemu askospór na tolerancii hostiteľského machorastu k vysokým teplotám. Na ose y sú zobrazené reziduály zastupujúce objem askospór, graf teda ukazuje čistý efekt tolerancie hostiteľského machorastu k vysokým teplotám na objem askospór. Hodnota 4 na ose x zodpovedá mezotermofytom, vyššie hodnoty predstavujú termofyty, nižšie kryofyty.

#### 4.5.2 Výška ornamentiky

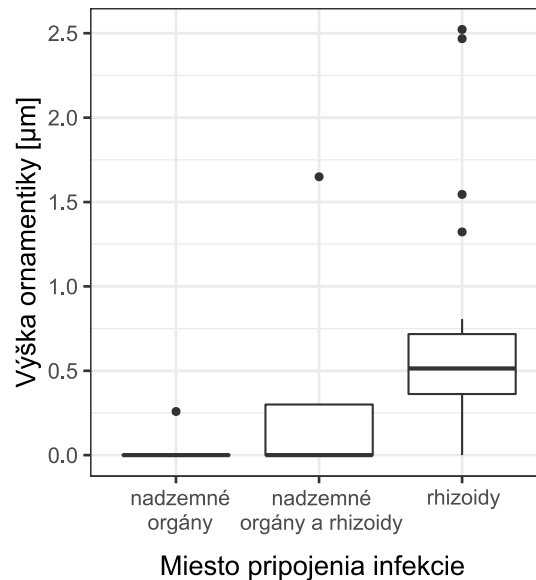
Výška ornamentiky signifikantne závisela na mieste pripojenia infekčného aparátu ( $p = 0,0004$ , tab. 12). Po odstránení nesignifikantných prediktorov boli výsledky finálneho modelu veľmi podobné. Aj v tomto prípade výška ornamentiky signifikantne závisela na mieste pripojenia infekčného aparátu ( $p = 0,0260$ , tab. 13). Druhy pripojené na rhizoidy machorastov mali vyššiu ornamentiku (obr. 29).

**Tabuľka 12** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných ekologických charakteristík hostiteľov na výšku ornamentiky askospór, lambda = 0 (95% konfidenčný interval ? – 0,409), N = 43.

výška ornamentiky ~ pH + vlhkosť + množstvo svetla + tolerancia k vysokým teplotám + životná forma + miesto infekcie						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
pH prostredia (hostiteľ)	1	0,0098	0,0098	0,0315	0,8602	
vlhkosť prostredia (hostiteľ)	1	0,3299	0,3299	1,0567	0,3112	
množstvo svetla (hostiteľ)	1	0,0938	0,0938	0,3005	0,5872	
tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ)	1	0,8151	0,8151	2,6111	0,1154	
životná forma (hostiteľ)	2	0,4544	0,2272	0,7278	0,4903	
miesto pripojenia infekcie	2	6,3160	3,1580	10,1157	<b>0,0004</b>	***
Reziduály	34	10,6144	0,3122			

**Tabuľka 13** Výsledky finálneho PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných ekologických charakteristík hostiteľov na výšku ornamentiky askospór, lambda = 0,085 (95% konfidenčný interval ? - 0,591), N = 43.

výška ornamentiky ~ miesto pripojenia infekcie						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
miesto pripojenia infekcie (hostiteľ)	2	2,9343	1,4671	4,0042	<b>0,0260</b>	*
Reziduály	40	14,6561	0,3664			



**Obrázok 29** Závislosť výšky ornamentiky askospór na mieste pripojenia infekčného aparátu. Na ose y sú zobrazené reziduály zastupujúce výšku ornamentiky askospór, graf teda ukazuje čistý efekt miesta pripojenia infekčného aparátu na výšku ornamentiky askospór.

### 4.5.3 Relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou

V celkovom modeli signifikantne záviselo relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou na tolerancii hostiteľských machorastov k vysokým teplotám ( $p = 0,0051$ ), životnej forme machorastov ( $p = 0,0308$ ) a mieste pripojenia infekčného aparátu ( $p = 0,0054$ ) (tab. 14). Po odstránení nesignifikantných prediktorov boli výsledky finálneho modelu podobné. Relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou signifikantne záviselo na tolerancii hostiteľských machorastov k vysokým teplotám ( $p = 0,0225$ ) a mieste pripojenia infekčného aparátu ( $p = 0,0120$ ). Vplyv životnej formy hostiteľských machorastov bol v tomto prípade už len marginálne signifikantný ( $p = 0,0503$ ) a marginálne signifikantný bol aj vplyv vlhkosti prostredia hostiteľských machorastov ( $p = 0,0755$ ) (tab. 15). Väčšia časť povrchu askospór bola pokrytá ornamentikou u druhov viazaných na machorasty rastúce vo vlhkejšom prostredí (obr. 30A), u druhov viazaných na machorasty tolerantné k vysokým teplotám (obr. 30B) a u druhov pripojených infekčným aparátom na

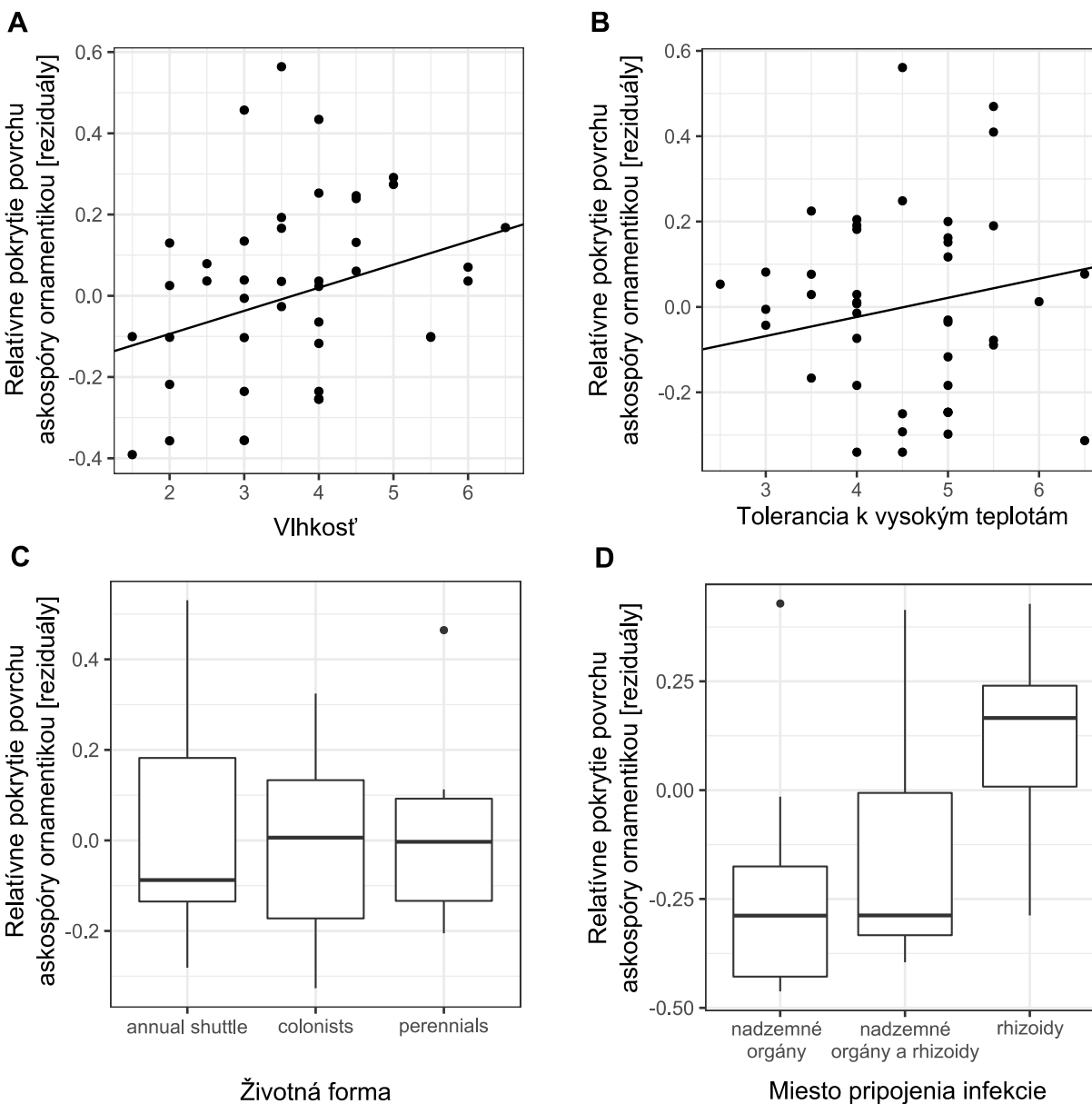
rhizoidy hostiteľov (obr. 30D). Čistý efekt životnej formy nebol výrazný (obr. 30C), podľa koeficientov modelu mali v priemere askospóry najviac pokryté ornamentikou druhy viazané na machorasty zo skupiny *annuals* a najmenej druhy napojené na machorasty zo skupiny *perennials*.

**Tabuľka 14** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných ekologických charakteristík na relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou, lambda = 1 (95% konfidenčný interval ? – ?), N = 43.

pokrytie askospór ornamentikou ~ pH prostredia (hostiteľ) + vlhkosť prostredia (hostiteľ) + množstvo svetla (hostiteľ) + tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ) + životná forma (hostiteľ) + miesto pripojenia infekcie						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
pH prostredia (hostiteľ)	1	0,0824	0,0824	0,6459	0,4272	
vlhkosť prostredia (hostiteľ)	1	0,1868	0,1868	1,4654	0,2344	
množstvo svetla (hostiteľ)	1	0,0063	0,0063	0,0496	0,8251	
tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ)	1	1,1431	1,1431	8,9648	<b>0,0051</b>	**
životná forma (hostiteľ)	2	0,9853	0,4927	3,8637	<b>0,0308</b>	*
miesto infekcie	2	1,5602	0,7801	6,1181	<b>0,0054</b>	**
Reziduály	34	4,3353	0,1275			

**Tabuľka 15** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných ekologických charakteristík hostiteľov na relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou, lambda = 0,742 (95% konfidenčný interval 0,053 – ?), N = 43.

pokrytie askospór ornamentikou ~ vlhkosť prostredia (hostiteľ) + tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ) + životná forma (hostiteľ) + miesto pripojenia infekcie						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
vlhkosť prostredia (hostiteľ)	1	0,2698	0,2698	3,3506	0,0755	.
tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ)	1	0,4578	0,4578	5,6848	<b>0,0225</b>	*
životná forma (hostiteľ)	2	0,5237	0,2618	3,2517	0,0503	.
miesto pripojenia infekcie	2	0,8068	0,4034	5,0096	<b>0,0120</b>	*
Reziduály	36	2,8989	0,0805			



**Obrázok 30** Závislosť relatívneho pokrytia povrchu askospór ornamentikou na: **A** – vlhkosti prostredia hostiteľských machorastov; **B** – tolerancii machorastov k vysokým teplotám; **C** – životnej forme machorastov; **D** – mieste pripojenia infekčného aparátu. Na ose y sú zobrazené reziduály zastupujúce relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou, graf teda ukazuje čistý efekt daného prediktora na pokrytie povrchu askospór. Na grafe A zodpovedá hodnota 4 na ose x mezofytom, vyššie hodnoty predstavujú hygropyty, nižšie xerofyty. Na grafe B zodpovedá hodnota 4 na ose x mezotermofytom, vyššie hodnoty predstavujú termofyty, nižšie kryofyty.

#### 4.5.4 Q hodnota

Pomer dĺžky a šírky askospór signifikantne závisel na životnej forme hostiteľského machorastu ( $p = 0,0047$ ) a mieste pripojenia infekčných štruktúr ( $p = 0,0029$ ) (tab. 16). Po odstránení nesignifikantných prediktorov boli výsledky finálneho modelu veľmi podobné. Aj v tomto prípade Q hodnota signifikantne závisela na



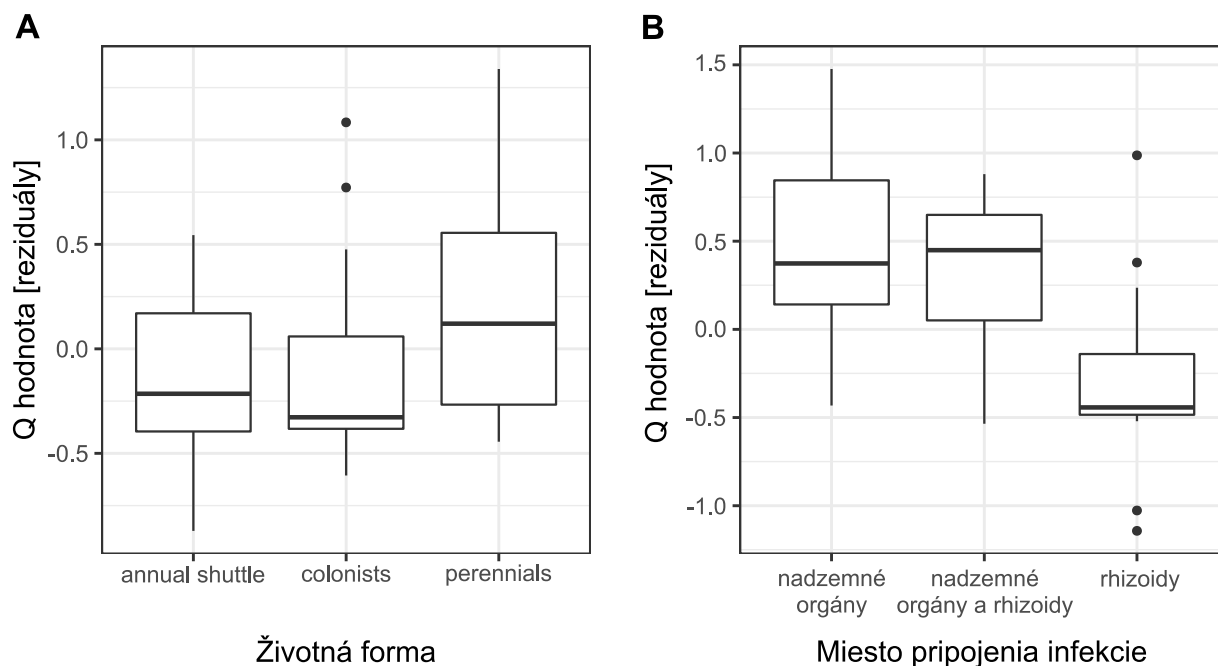
životnej forme hostiteľských machorastov ( $p = 0,0064$ ) a mieste pripojenia infekčných štruktúr ( $p = 0,0040$ ) (tab. 17). Druhy viazané na machorasty so životnou formou *colonists* a *annual shuttle* mali askospóry výrazne guľovitejšie (s nižšou  $Q$  hodnotou), ako druhy viazané machorasty zo skupiny *perennials* (obr. 31A). Druhy pripojené na rhizoidy mali askospóry s nižšou  $Q$  hodnotou, ako druhy viazané na nadzemné orgány svojich hostiteľov (obr. 31B).

**Tabuľka 16** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných ekologických charakteristík hostiteľa na  $Q$  hodnotu askospór,  $\lambda = 0,287$  (95% konfidenčný interval ? – 0,893),  $N = 43$ .

Q hodnota ~ pH prostredia (hostiteľ) + vlhkosť prostredia (hostiteľ) + množstvo svetla (hostiteľ) + tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ) + životná forma (hostiteľ) + miesto pripojenia infekcie						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
pH prostredia (hostiteľ)	1	0,1034	0,1034	0,3789	0,5423	
vlhkosť prostredia (hostiteľ)	1	0,0049	0,0049	0,0178	0,8946	
množstvo svetla (hostiteľ)	1	0,9180	0,9180	3,3648	0,0754	.
tolerancia k vysokým teplotám (hostiteľ)	1	0,0350	0,0350	0,1284	0,7223	
životná forma (hostiteľ)	2	3,4437	1,7219	6,3112	<b>0,0047</b>	**
miesto infekcie	2	3,8176	1,9088	6,9964	<b>0,0029</b>	**
Reziduály	34	9,2760	0,2728			

**Tabuľka 17** Výsledky finálneho PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných ekologických charakteristík hostiteľa na  $Q$  hodnotu askospór,  $\lambda = 0,330$  (95% konfidenčný interval ? – 0,869),  $N = 43$ .

Q hodnota ~ životná forma (hostiteľ) + miesto infekcie						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
životná forma (hostiteľ)	2	3,3248	1,6624	5,7859	<b>0,0064</b>	**
miesto infekcie	2	3,6756	1,8378	6,3964	<b>0,0040</b>	**
Reziduály	38	10,9180	0,2873			



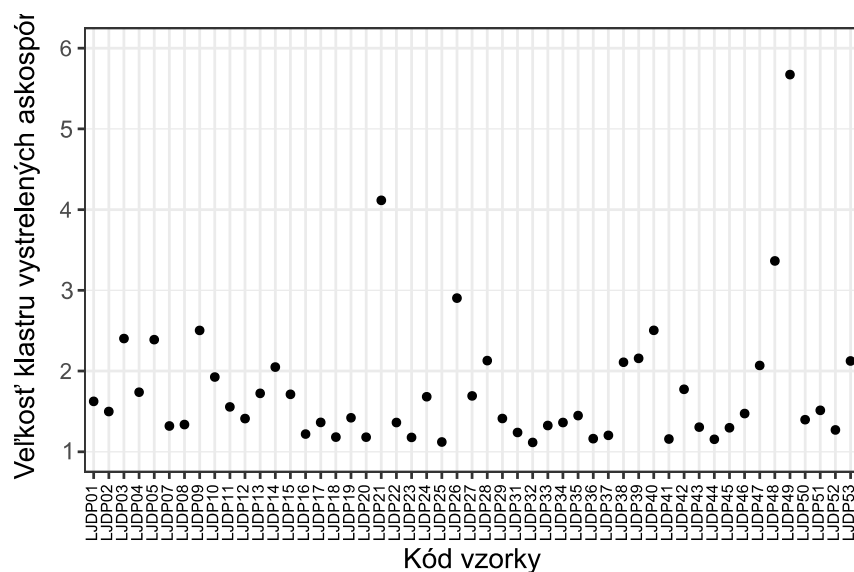
**Obrázok 31** Závislosť  $Q$  hodnoty askospór na: **A** – životnej forme hostiteľských machorastov; **B** – mieste pripojenia infekčného aparátu. Na ose  $y$  sú zobrazené reziduály zastupujúce  $Q$  hodnotu, graf teda ukazuje čistý efekt daného prediktora na  $Q$  hodnotu.

## 4.6 Aktívne vystreľovanie askospór

Tri úspešné opakovania pokusov sledujúcich horizontálne vystreľovanie askospór sa mi podarilo získať u všetkých sledovaných druhov s výnimkou druhu *Lamprospora maireana* (LJDP06), u ktorého som nemal dostatočné množstvo čerstvých plodníc, a do tejto analýzy som ho preto nezahrnul.

### 4.6.1 Tvorba klastrov askospór

Väčšina sledovaných druhov vystreľovala askospóry ako samostatné projektily alebo tvorila prevažne malé klastre tvorené z dvoch až štyroch askospór (resp. sa aspoň rozpadli na samostatné askospóry skôr než dopadli na podložné sklíčko). Naprieč druhmi bola priemerná veľkosť klastru presne 1,79 askospóry (obr. 32). Najväčšie klastre (v priemere 5,7 askospór) tvoril druh *Octosporella erythrostigma* (LJDP49), ktorý veľmi často vystreľoval všetkých osem askospór z vrečka spoločne ako jeden projektíl.



**Obrázok 32** Priemerná veľkosť vystrelených klastrov askospór u sledovaných druhov bryofilných Pezizales. Jednotlivé druhy sú označené ich kódom vzorky.

Do PGLS modelu som okrem hlavných morfológických charakteristík askospór zahrnul aj prevažujúci počet askospór vo vrecku u jednotlivých druhov, keďže je ním limitovaná maximálna možná veľkosť klastrov. V počiatočnom modeli mali na veľkosť klastrov askospór významný vplyv objem askospóry ( $p = 0,0436$ ) a  $Q$  hodnota ( $p = 0,0059$ ) (tab. 18). V diagnostických grafoch bolo ale vidieť, že výsledky tohto modelu môžu byť skreslené odľahlou hodnotou druhu *O. erythrostigma* (LJDP49).

**Tabuľka 18** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných morfológických charakteristík na priemernú veľkosť klastru askospór pri zahrnutí všetkých druhov,  $\lambda = 0,817$  (95% konfidenčný interval ? - ?),  $N = 51$ .

veľkosť klastru askospór ~ počet askospór vo vrecku + objem askospóry + typ ornamentiky + výška ornamentiky + pokrytie askospór ornamentikou + Q hodnota						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
počet askospór vo vrecku	1	1,2961	1,2961	1,0239	0,3170	
objem askospóry	1	5,4587	5,4587	4,3124	<b>0,0436</b>	*
výška ornamentiky	1	1,1570	1,1570	0,9140	0,3442	
pokrytie askospór ornamentikou	1	0,9714	0,9714	0,7674	0,3857	
Q hodnota	1	10,5625	10,5625	8,3443	<b>0,0059</b>	**
Reziduály	45	56,9625	1,2658			

Askospóry *O. erythrostigma* (LJDP49) sa pritom vyznačujú dlhým valcovitým prívěskom na ich póle (obr. 15E) a je možné, že práve tento znak je príčinou tvorby neobvykle veľkých klastrov. Po odstránení tohto druhu nemala významný vplyv na veľkosť klastrov žiadna testovaná morfológická charakteristika

askospór, ani počet askospór vo vrecku (tab. 19). Výsledky predchádzajúceho modelu sú teda zrejme len dôsledkom odľahlej hodnoty.

**Tabuľka 19** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných morfológických charakteristík na priemernú veľkosť klastru askospór po odstránení odľahlej hodnoty druhu *O. erythro stigma* (LJDP49), lambda = 0,912 (95% konfidenčný interval 0,264 – ?), N = 50.

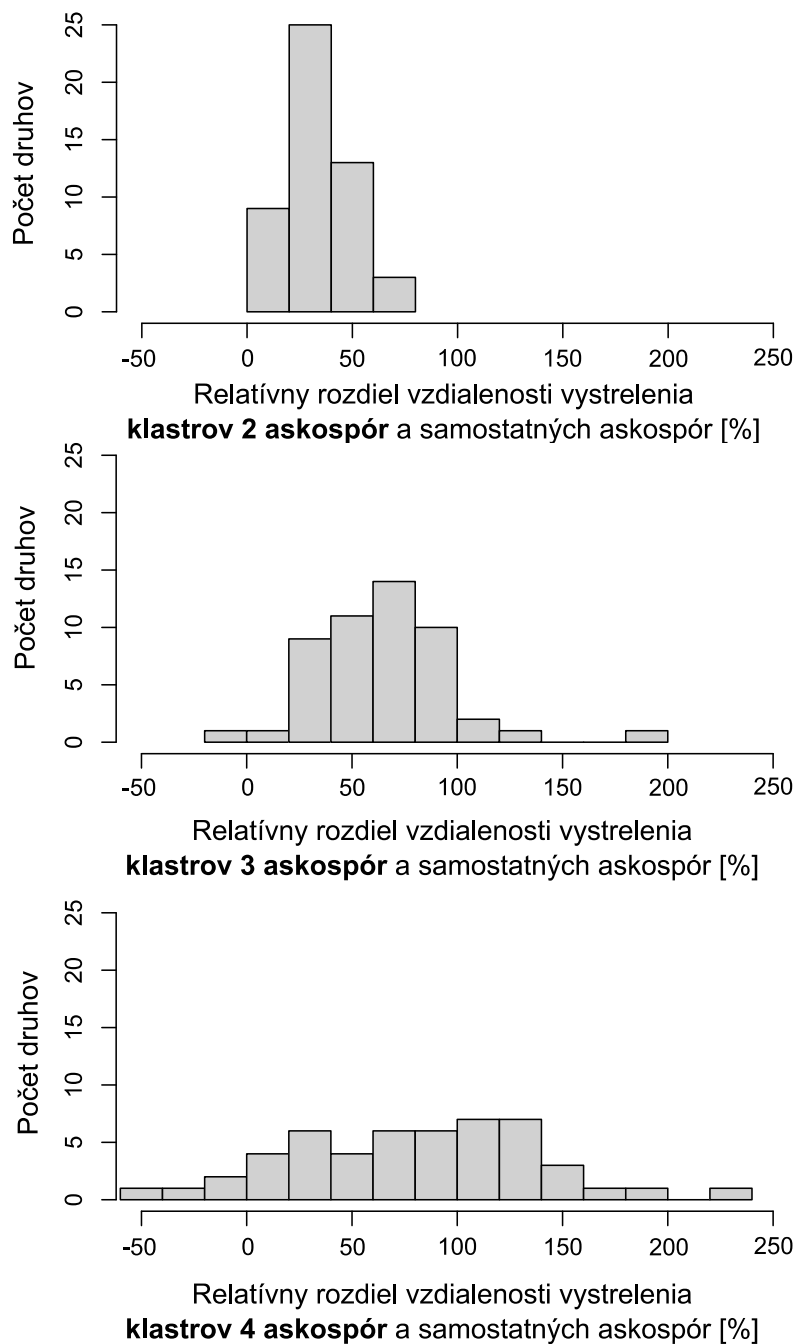
veľkosť klastru askospór ~ počet askospór vo vrecku + objem askospóry + typ ornamentiky + výška ornamentiky + pokrytie askospór ornamentikou + Q hodnota					
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota
počet askospór vo vrecku	1	1,3413	1,3413	1,6510	0,2055
objem askospóry	1	0,5300	0,5300	0,6524	0,4236
výška ornamentiky	1	0,6666	0,6666	0,8206	0,3699
pokrytie askospór ornamentikou	1	0,8218	0,8218	1,0116	0,3200
Q hodnota	1	0,0056	0,0056	0,0066	0,9344
Reziduály	44	35,7437	0,8124		

#### 4.6.2 Vplyv veľkosti klastru na vzdialenosť jeho vystrelenia

Klastre askospór rôznej veľkosti boli v určitej miere zastúpené u všetkých sledovaných druhov. Mohol som tak porovnať vzdialenosť vystrelenia rôzne veľkých klastrov priamo v rámci jednotlivých druhov. Vďaka tomu som mohol vyhodnotiť samotný vplyv veľkosti klastru a odfiltrovať efekt iných premenných, ako je napríklad morfológia askospór. Tie sú totiž typicky v rámci jednotlivých druhov pomerne stále a medzi rôzne veľkými klastrami jedného druhu by sa nemali líšiť.

Veľkosť klastru askospór výrazne zvyšovala vzdialenosť ich vystrelenia u takmer všetkých sledovaných druhov (obr. 33). Klastre tvorené z dvoch askospór boli naprieč druhmi vystrelené signifikantne ďalej ako samostatné askospóry daného druhu ( $p < 0,00001$ , v priemere o 36 % ďalej, tab. 20A). U žiadneho druhu nebola priemerná vzdialenosť vystrelenia klastru dvoch askospór nižšia ako vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór. Klastre tvorené z troch askospór boli naprieč druhmi vystrelené signifikantne ďalej ako samostatné askospóry daného druhu ( $p < 0,00001$ , v priemere o 65 % ďalej, tab. 20B). Len u jedného druhu (LJDP50) bola priemerná vzdialenosť vystrelenia klastru troch askospór mierne nižšia ako priemerná vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór. Klastre tvorené zo štyroch askospór boli naprieč druhmi vystrelené signifikantne ďalej ako samostatné askospóry daného druhu ( $p = 0,0073$ , v priemere o 65 % ďalej, tab. 20C). U štyroch druhov (LJDP32, LJDP41, LJDP42, LJDP52) bola priemerná vzdialenosť vystrelenia klastru štyroch askospór mierne nižšia ako priemerná vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór. V týchto prípadoch to ale môže byť len artefakt nepresného odhadu vzdialenosti vystrelenia

klustrov štyroch askospór, keďže tie boli u týchto druhov zriedkavé. Vzďialenosť vystrelenia väčších klustrov som už ďalej neanalyzoval, pretože boli veľmi vzácné u väčšiny sledovaných druhov.



**Obrázok 33** Histogramy relatívneho rozdielu vzdialenosti vystrelenia rôzne veľkých klustrov askospór a samostatných askospór. Hodnoty na osi x vyjadrujú percentuálny nárast vo vzdialenosti, do ktorej boli vystrelené klaster príslušnej veľkosti v porovnaní so samostatne vystrelenými askospórmi toho istého druhu.

**Tabuľka 20** Výsledky PGLS modelov, ktorými som testoval vplyv veľkosti klastrov na vzdialenosť vystrelenia askospór. Samotný model vždy testoval, či sa naprieč druhmi relatívny rozdiel v priemernej vzdialenosti vystrelenia klastrov príslušnej veľkosti a samostatných askospór líši od nuly, SE – stredná chyba odhadu, N = 50 vo všetkých troch prípadoch.

A) relatívny nárast vzdialenosti vystrelenia klastru 2 askospór ~ 1					
lambda = 0 (95% konfidenčný interval ? – 0,520)					
Premenná	Odhad	SE	t hodnota	p hodnota	
relatívny nárast vzdialenosti vystrelenia klastru 2 askospór (intercept)	0,3576	0,021	16,808	<0,00001	***

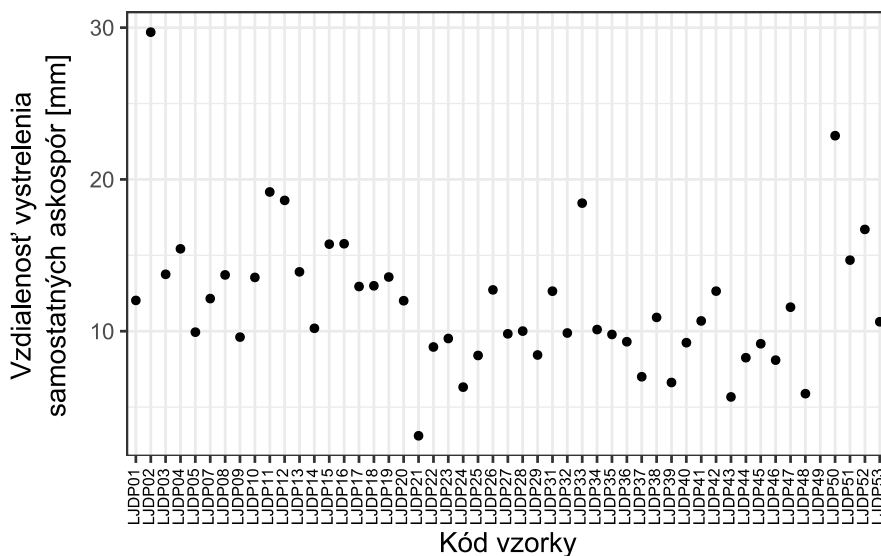
B) relatívny nárast vzdialenosti vystrelenia klastru 3 askospór ~ 1					
lambda = 0 (95% konfidenčný interval ? – 0,303)					
Premenná	Odhad	SE	t hodnota	p hodnota	
relatívny nárast vzdialenosti vystrelenia klastru 3 askospór (intercept)	0,6525	0,0472	13,826	<0,00001	***

C) relatívny nárast vzdialenosti vystrelenia klastru 4 askospór ~ 1					
lambda = 0,637 (95% konfidenčný interval ? – ?)					
Premenná	Odhad	SE	t hodnota	p hodnota	
relatívny nárast vzdialenosti vystrelenia klastru 4 askospór (intercept)	0,6512	0,2327	2,7985	0,0073	**

### 4.6.3 Vplyv morfológie askospór na vzdialenosť ich vystrelenia

Pri testovaní vplyvu vybraných morfológických charakteristík na vzdialenosť, do akej sú askospóry vystrelené, som použil iba hodnoty vzdialenosti vystrelenia samostatných askospór. Rôzna priemerná veľkosť klastrov medzi jednotlivými druhmi by inak túto analýzu mohla skresľovať. Z predchádzajúcej kapitoly je totiž zrejmé, že veľkosť klastru má zásadný vplyv na to, ako ďaleko sú askospóry vystrelené. Do analýzy nebol zahrnutý druh *Octosporella erythro stigma* (LJDP49), ktorý samostatne askospóry vôbec nevystrelil. Priemerná vzdialenosť všetkých vystrelených askospór je zobrazená v prílohe na obrázku P13.

Priemerná vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór bola u sledovaných druhov 11,9 mm. Medzi jednotlivými druhmi sa pritom pomerne výrazne líšila a u druhu *Lamprospora aff. maireana* (LJDP02) dosahovala až hodnotu 29,7 mm (obr. 34).



**Obrázok 34** Priemerná vzdialenosť, do akej boli vystrelené samostatné askospóry u sledovaných druhov bryofilných Pezizales. Jednotlivé druhy sú označené ich kódom vzorky.

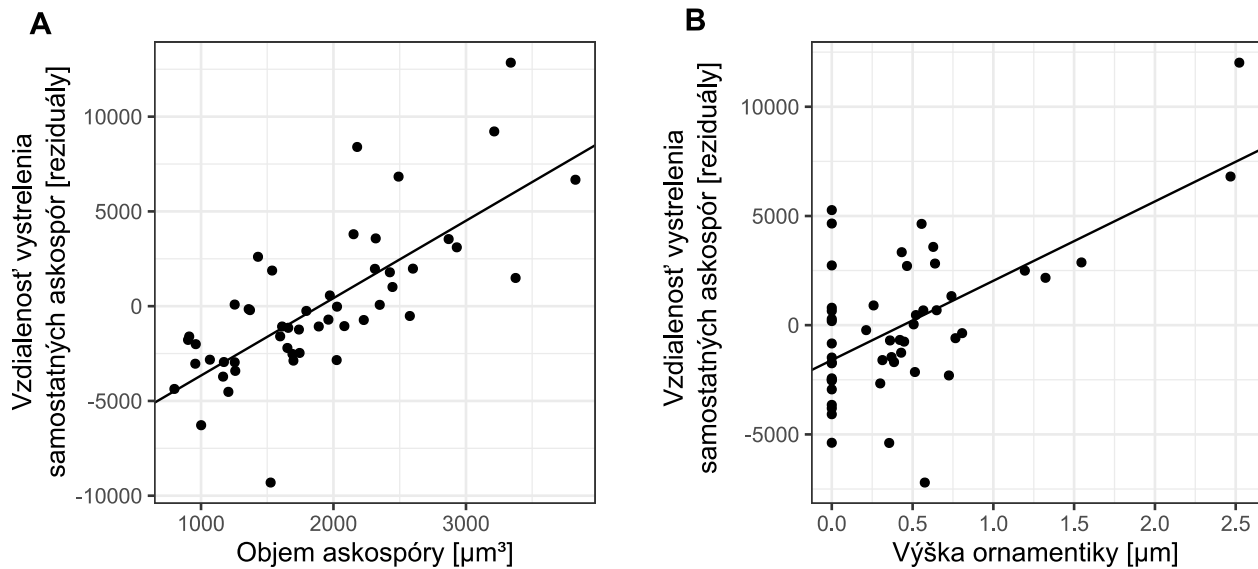
Vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór vysoko signifikantne závisela na objeme askospór ( $p < 0,00001$ ) a výške ornamentiky ( $p < 0,00001$ ), ostatné testované morfológické charakteristiky nemali signifikantný vplyv (tab. 21, 22). Keďže na základe diagnostických grafov sa ale zdalo, že druh *Lamprospora* aff. *maireana* (LJDP02) predstavuje pomerne výrazne odľahlú hodnotu, skúsil som ho z analýzy preventívne vylúčiť. Výsledky sa ale ani po jeho odstránení z modelu výrazne nezmenili (tab. P14, P15). Druhy s väčším objemom askospór a vyššou ornamentikou vystreľovali askospóry výrazne ďalej (obr. 35)

**Tabuľka 21** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných morfológických charakteristík na priemernú vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór, lambda = 0 (95% konfidenčný interval ? – 0,532), N = 50.

vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór ~ objem askospóry (bez ornamentiky) + výška ornamentiky + pokrytie askospór ornamentikou + Q hodnota						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
objem askospóry (bez ornamentiky)	1	558484741	558484741	62,368	<0,00001	***
výška ornamentiky	1	235176333	235176333	26,263	<0,00001	***
pokrytie askospór ornamentikou	1	5062129	5062129	0,5653	0,4560	
Q hodnota	1	5013	5013	0,0006	0,9812	
Reziduály	45	402956913	8954598			

**Tabuľka 22** Výsledky finálneho PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných morfológických charakteristík na priemernú vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór, lambda = 0 (95% konfidenčný interval ? – 0,357), N = 50.

vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór ~ objem askospóry + výška ornamentiky						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
objem askospóry (bez ornamentiky)	1	558484741	558484741	64,3315	<0,00001	***
výška ornamentiky	1	235176333	235176333	27,0898	<0,00001	***
Reziduály	47	408024055	8681363			



**Obrázok 35** Závislosť priemernej vzdialenosti vystrelenia samostatných askospór na: **A** – objeme askospór (bez ornamentiky); **B** – výške ornamentiky askospór. Na ose y sú zobrazené reziduály zastupujúce priemernú vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór, graf teda ukazuje čistý efekt danej premennej na vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór.

Vplyv výšky ornamentiky je pritom pravdepodobne dôsledok toho, že ornamentika zväčšuje celkový objem askospór. Objem askospór, ktorý som totiž doteraz v modeloch používal, vyjadruje len veľkosť samotnej askospóry bez ornamentiky. Aby som otestoval, či má vplyv aj samotná výška ornamentiky nezávisle na objeme, vytvoril som nový model, ktorý mal ako jeden z prediktorov celkový objem askospór ( $V_{tot}$ ), do ktorého som započítal aj objem ornamentiky (viď kap. 3.3.2). Vysoko signifikantný vplyv na vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór mal v tomto prípade už len celkový objem ( $p < 0.00001$ ), ostatné prediktory vrátane výšky ornamentiky boli nesignifikantné (tab. 23, 24, obr. 36). Vyradenie odľahlej hodnoty (LJDP02) nemalo ani v tomto prípade výrazný vplyv na výsledky modelu (tab. P16, P17).

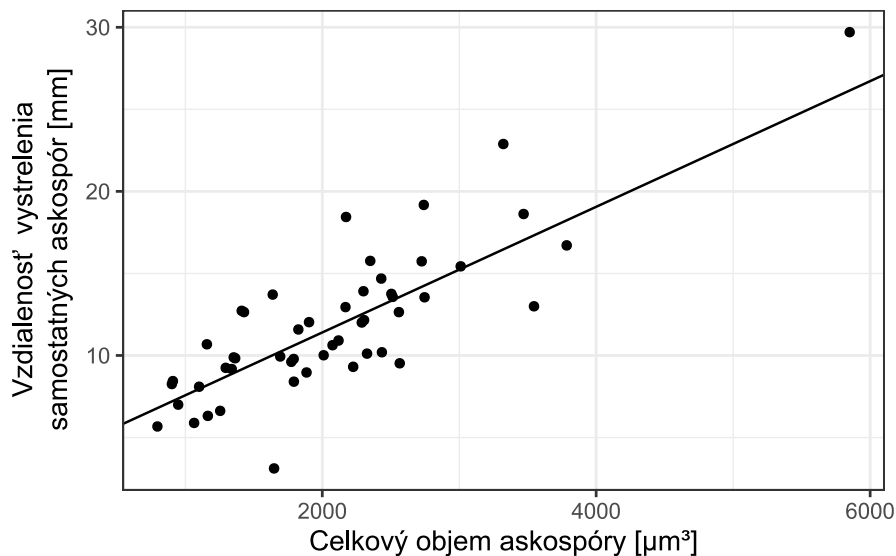


**Tabuľka 23** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných morfológických charakteristík na priemernú vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór, lambda = 0 (95% konfidenčný interval ? – 0,753), N = 50.

vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór ~ celkový objem askospóry (pri započítaní ornamentiky) + typ ornamentiky + výška ornamentiky + pokrytie askospór ornamentikou + Q hodnota						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
celkový objem askospóry (pri započítaní ornamentiky)	1	827849106	827849106	103.1242	<0,00001	***
výška ornamentiky	1	10578536	10578536	1.3178	0.2571	
pokrytie askospór ornamentikou	1	433036	433036	0.0539	0.8174	
Q hodnota	1	1578231	1578231	0.1966	0.6596	
Reziduály	45	361246221	8027694			

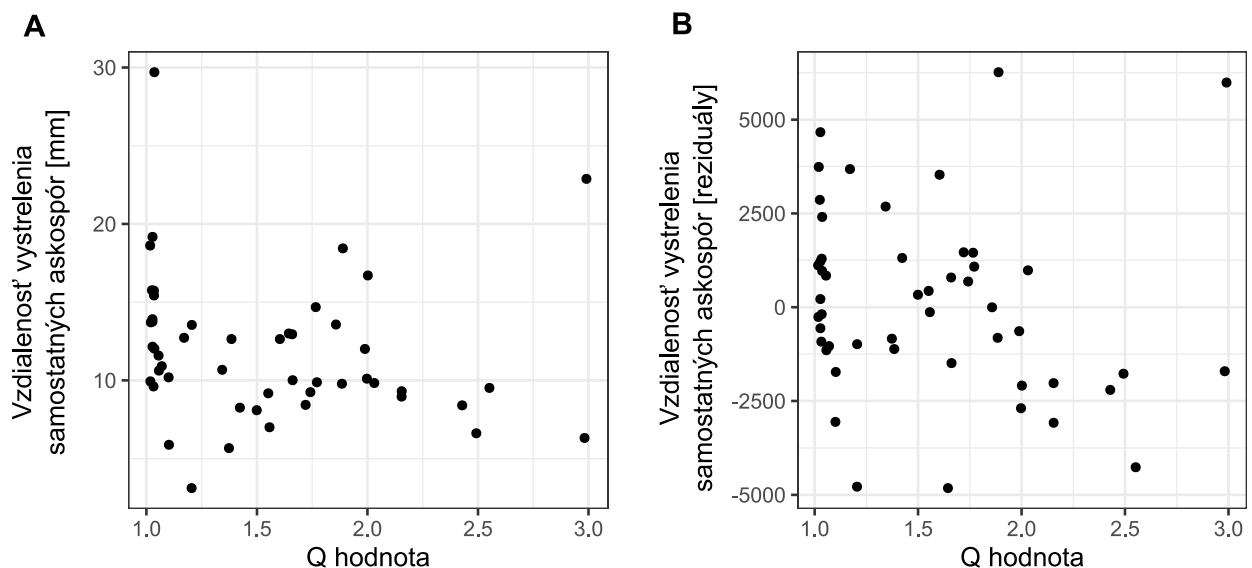
**Tabuľka 24** Výsledky finálneho PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných morfológických charakteristík na priemernú vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór, lambda = 0,068 (95% konfidenčný interval ? – 0,586), N = 50.

vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór ~ celkový objem askospóry (pri započítaní ornamentiky)						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
celkový objem askospóry (pri započítaní ornamentiky)	1	782708634	782708634	100,5420	<0,00001	***
Reziduály	48	373674880	7784893			



**Obrázok 36** Závislosť priemernej vzdialenosti vystrelenia samostatných askospór na celkovom objeme askospór (pri započítaní ornamentiky).

To, že tvar askospór nemá v použitom modeli signifikantný vplyv na vzdialenosť ich vystrelenia, by ale mohol byť aj dôsledok nelinearity tohto vzťahu. Pre askospóry totiž existuje optimálna  $Q$  hodnota približne 2 – 2,5, pri ktorej má rotačný elipsoid, veľkosti zodpovedajúcej väčšine askospór, minimálny možný odpor vzduchu (Roper et al., 2008). Odchýlka od tejto hodnoty na obe strany potom zvyšuje odpor vzduchu, ktorý na nich pôsobí. V grafe závislosti vzdialenosti vystrelenia samostatných askospór na ich  $Q$  hodnote však ani pri hodnote 2 – 2,5 nie je vidieť žiadny výrazný nárast vzdialenosti vystrelenia askospór (obr. 37A). Žiadny zrejmy vzťah medzi týmito veličinami nie je vidieť ani po odfiltrovaní vplyvu celkového objemu askospór, keď sú na ose y zobrazené hodnoty reziduálov modelu z tabuľky 24 (obr. 37B).



**Obrázok 37** Závislosť priemernej vzdialenosti vystrelenia samostatných askospór na  $Q$  hodnote askospór. Na grafe **A** je na ose y zobrazená priemerná vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór. Na grafe **B** sú na ose y zobrazené reziduály modelu z tabuľky 24. Graf teda ukazuje závislosť vzdialenosti vystrelenia samostatných askospór na  $Q$  hodnote po odfiltrovaní efektu celkového objemu askospór.

## 5 Diskusia

### 5.1 Fylogenéza bryofilných zástupcov radu Pezizales

Podarilo sa mi zrekonštruovať fylogenézu sledovaných druhov bryofilných Pezizales, ktorú som využil v ďalších analýzach. Podobne ako práce Hansen et al. (2013), Perry et al. (2007) a Sochorová et al. (2019) aj výsledky mojej fylogenetickej analýzy pritom ukázali, že niektoré v súčasnosti rozlišované rody sú polyfyletické (obr. 8). Konkrétne druhy radené do rodov *Octospora* a *Lamprospora* tvorili v mojom fylogenetickom strome niekoľko samostatných línií. Súčasné rozdelenie bryofilných Pezizales do jednotlivých rodov tak bude s istotou vyžadovať výraznú revíziu. Na presnejšiu rekonštrukciu príbuzenských vzťahov v niektorých skupinách pritom ale bude zrejme potrebné použiť väčší počet úsekov DNA. Tri vybrané úseky, ktoré som v použil v tejto práci, totiž neboli vo viacerých prípadoch dostatočné a výsledný strom obsahoval niekoľko polytómii.

### 5.2 Veľkosť genómu a vplyv na objem askospór

Pri meraní veľkosti genómu prietokovou cytometriou sa ukázalo, že skladovanie plodníc v mrazničke výrazne znižuje úspešnosť meraní. Ako optimálne sa javí používať čerstvé plodnice, čo však značne sťažuje merania. Výber optimálneho štandardu na meranie veľkosti genómu týchto húb je pritom tiež pomerne komplikovaný. Štandard pri prietokovej cytometrii by sa ideálne totiž nemal líšiť svojou veľkosťou viac ako 3× od genómu meranej vzorky (Doležal et al., 1992) a nemal by ani patriť do príliš vzdialenej taxonomickej skupiny (Suda & Leitch, 2010). Viaceré druhy bryofilných Pezizales ale majú jedny z najväčších genómov v rámci húb a aj najväčšie navrhované hubové štandardy, ktoré by bolo možné kultivovať, sú približne 13× menšie (Talhinhas et al., 2017). Rastlinné štandardy sú tak v prípade bryofilných Pezizales zrejme vhodnejšou alternatívou. Sedmokráska obyčajná (*Bellis perennis*), ktorú som v tejto práci používal, ale nie je ideálna pretože má príliš veľký genóm (2C = 3306 Mbp, Schönswetter et al., 2007). Na základe mojich výsledkov je totiž zrejmé, že väčšina bryofilných Pezizales má genóm veľkosti približne 200 – 400 Mbp. Vhodnejším štandardom na meranie veľkosti genómu bryofilných Pezizales by tak bol druh s menším genómom, napríklad *Arabidopsis thaliana* (2C = 323 Mbp, Praça-Fontes et al., 2011), *Raphanus sativus* (2C = 1037 Mbp, Praça-Fontes et al., 2011) a pre skupiny s menším genómom aj navrhovaný hubový štandard *Cenococcum geophilum* (1C = 203 Mbp, Talhinhas et al., 2017). Lepšou alternatívou k presnému určeniu absolútnej veľkosti genómu by pritom mala byť cytometria s internou štandardizáciou, pri ktorej sú jadrá vzorky a štandardu farbené súčasne a podmienky pri ich farbení a meraní sú rovnaké (Doležal & Bartoš, 2005). Aj v prípade bryofilných Pezizales sa ukázalo, že externá štandardizácia môže viesť k skreslenému odhadu absolútnej veľkosti genómu (viď kap. 4.3.1). Pri internej štandardizácii bol ale u tejto

skupiny húb pomerne často problém rozlíšiť populáciu 1C jadier, úspešnosť meraní bola mierne nižšia a v porovnaní s externou štandardizáciou vyžadovala aj väčšie množstvo plodníc. U bryofilných Pezizales je ale množstvo materiálu zásadným limitujúcim faktorom a externá štandardizácia je tak k určeniu približnej veľkosti genómu o niečo efektívnejšia.

Rozsah veľkosti genómu sledovaných bryofilných zástupcov radu Pezizales bol 93 – 2628 Mbp a najväčší genóm bol teda až 28x väčší ako ten najmenší. Všetky druhy sledované v tejto práci mali väčší genóm, ako je odhadovaná priemerná veľkosť genómu vreckatých húb – 36,9 Mbp (Mohanta & Bae, 2015) a aj samotného radu Pezizales – 89,3 Mbp (Talhinhas et al., 2015). Za neobvyklú veľkosť genómov týchto druhov môže byť zodpovedných viacero rôznych mechanizmov. Tobias et al. (2020) napríklad u hrdze *Austropuccinia psidii* (1020 Mbp) uvádzajú na základe analýzy sekvencie genómu tohto druhu, ako hlavnú príčinu zväčšenia jeho genómu akumuláciu transpozómov. Veľké genómy by ale mohli byť aj dôsledkom polyploidizácie. Tá je síce u húb popísaná predovšetkým u kvasiniek, no došlo k nej zjavne aj u zástupcov vreckatých húb z pododdelenia Pezizomycotina, napríklad u rodov *Botrytis*, *Phyllactinia*, *Stephensia* a *Xylaria* (Albertin & Marullo, 2012). V rámci niektorých fylogenetických línií sledovaných bryofilných Pezizales pritom veľkosť genómu rástla skokovo a približne sa zdvojnásobovala (napr. u zástupcov rodov *Neottiella* a *Octosporella*), čo by práve mohlo naznačovať, že u nich dochádza k polyploidizácii. Genómy veľké až 5289 Mbp, resp. 5800 Mbp, uvedené v databáze veľkostí hubových genómov (Kullman et al., 2005) u druhov *Neottiella vivida* a *N. rutilans*, som ale v mojej práci nezaznamenal. Zber *N. vivida* (LJDP19) by mal mať na základe mojich meraní genóm veľký 2628 Mbp a *N. rutilans* (LJDP18) iba 1323 Mbp. Veľkosť genómu u *N. vivida* (2690 Mbp) určená v práci Egertová & Sochor (2017) prietokovou cytometriu s farbením s PI pritom mojím výsledkom dobre zodpovedá. Je preto možné, že vysoké hodnoty veľkosti genómu u vyššie menovaných druhov v databáze Kullman et al. (2005) sú nadhodnotené kvôli použitiu nevhodného fluorescenčného farbiva a metódy merania. Nedá sa ale vylúčiť ani možnosť, že spomínané druhy predstavujú komplex niekoľkých morfológicky podobných taxónov, líšiacich sa vo veľkosti genómu, prípadne že je u nich veľkosť genómu v rámci druhu variabilná.

Objem askospór u sledovaných druhov signifikantne závisel na veľkosti ich genómu a druhy s väčším genómom mali aj výrazne väčšie askospóry. Tento vzťah tak zodpovedá výsledkom štúdií u rodov *Geosmithia* (Veselská & Kolařík, 2015) a *Epichloë* (Kuldau et al., 1999), ktoré zistili koreláciu medzi veľkosťou konidií (nepohlavných výtrusov) a veľkosťou genómu. Moje výsledky sú ale zatiaľ prvé, ktoré preukázali vplyv veľkosti genómu aj na objem aktívne vystreľovaných askospór (pohlavných výtrusov). Je zaujímavé, že (Tamm et al., 2010) v prípade rodu *Geopora* medzi veľkosťou genómu a veľkosťou askospór podobný vzťah nepozorovali. Autori tejto práce ale analyzovali len malý počet vzoriek, ktoré porovnávali len v rámci jednotlivých fylogenetických línií. Jednotlivé vzorky sa navyše v porovnaní s mnou sledovanými druhmi medzi sebou vo veľkosti genómu a askospór líšili len nevýrazne. Samotná veľkosť

haploidného genómu však aj v mojom prípade dokázala u bryofilných Pezizales vysvetliť len zlomok variability v objeme askospór. Jedným z možných vysvetlení je skutočnosť, že samotné jadrá v askospórach sledovaných druhov by sa medzi sebou mohli v dôsledku endoreduplikácie líšiť v úrovni ploidity a teda aj v množstve DNA, ktoré obsahujú, ako je tomu zrejme napríklad u druhov *Neottiella rutilans* a *N. vivida* (Kullman, 2002). V mojej práci som pri prietokovej cytometrii totiž meral veľkosť genómu voľných haploidných jadier (1C), u ktorých ale nie je zrejme, z akej časti plodnice pochádzajú. Jadrá priamo v askospórach som nemohol merať kvôli ornamentike na ich povrchu, ktorá interferovala s fluorescenciou jadier v askospórach.

### 5.3 Počet jadier v askospórach a vplyv na objem askospór

Sledované druhy tvorili askospóry s jedným, dvoma alebo štyrmi jadrami. Počet jadier v rámci jednotlivých druhov bol už ale typicky konštantný a len vzácné som u jedného druhu zaznamenal askospóry s rôznym počtom jadier. V rámci čeľade Pyronemataceae sú tak bryofilné Pezizales pomerne unikátnou skupinou, keďže ostatné druhy tejto čeľade majú askospóry typicky len s jedným jadrom (Berthet, 1964). Jednojadrové askospóry sa dokonca považujú za jednu z hlavných morfológických charakteristík tejto čeľade (Perry et al., 2007). Počet jadier sa pritom často líšil aj medzi blízko príbuznými druhmi a zdá sa, že vyšší počet jadier nie je s výnimkou rodu *Octospora* konzervovaný v žiadnej skupine sledovaných húb. Aj v tomto rode sa navyše medzi sebou druhy v počte jadier odlišovali. Zvlášť u druhov rodu *Lamprospora* by sa pritom zrejme dal počet jadier použiť aj na rozlíšenie niektorých morfológicky podobných druhov, ktoré sa inak výrazne líšia len hosťiteľskými machorastami. Výhodou pozorovania jadier fluorescenčnou mikroskopiou je fakt, že sa ňou dajú sledovať aj jadrá v zrelých askospórach s hrubou bunkovou stenou aj ornamentikou. Vďaka tomu som napríklad zistil, že u druhu *Octosporopsis nicolai* (LJDP52) majú zrelé askospóry až štyri jadrá a nie len dve, ako uvádzajú Lindemann et al. (2014) na základe pozorovania nezrelých askospór svetelnou mikroskopiou.

U štyroch analyzovaných druhov s variabilným počtom jadier v askospórach (LJDP20, LJDP23, LJDP34, LJDP36) mali askospóry s väčším počtom jadier aj výrazne väčší objem. Dominantný počet jadier v askospórach mal pritom silný vplyv na objem askospór aj naprieč všetkými sledovanými druhmi a práve rozdiely v počte jadier medzi druhmi sú zrejme jednou z hlavných príčin nevysvetlenej variability v modeli testujúcom samotný vplyv veľkosti genómu na objem askospór (kap. 4.3.3). Veľká diverzita v objeme askospór sledovaných bryofilných Pezizales je tak na základe mojich výsledkov zjavne dôsledkom rôzneho celkového množstva DNA v askospóre, ktoré môže byť ovplyvnené buď priamo veľkosťou genómu alebo počtom jadier. Je však otázne či by selekčný tlak na zvýšenie objemu askospór mohol v nejakom prípade uprednostniť priamo zväčšenie veľkosti genómu. Pokiaľ by totiž daná huba iba zvýšila počet jadier

vo svojich askospórah, nemusela by zbytočne replikovať veľký genóm pri každom mitotickom delení. Práve veľké mnohoadrové aktívne vystreľované askospóry pritom často nájdeme aj u zástupcov iných čeľadí v rámci radu Pezizales, napríklad u rodov *Gyromitra*, *Morchella*, *Sarcoscypha* či *Urnula* (Berthet, 1964).

## 5.4 Vzťah medzi hostiteľskými machorastami a morfológiou askospór

Objem askospór u sledovaných bryofilných Pezizales signifikantne závisel aj na tolerancii ich hostiteľských machorastov k vysokým teplotám. Zdá sa ale, že tolerancia hostiteľských machorastov k vysokým teplotám, má v porovnaní s veľkosťou genómu a počtom jadier u sledovaných druhov menej výrazný vplyv. Respektíve má vplyv skôr na relatívny objem askospór v pomere k množstvu DNA, ktoré sa v nich nachádza. Pokiaľ totiž v modeli nebola zohľadnená veľkosť genómu a počet jadier sledovaných druhov, tolerancia hostiteľských machorastov k vysokým teplotám nemala na objem askospór signifikantný vplyv. Je možné, že väčšie askospóry u druhov viazaných na termofyty, sú adaptáciou na rast v teplejšom prostredí. Tento výsledok zodpovedá práci Kauserud et al. (2011), v ktorej zistili, že aj u bazídiových húb veľkosť výtrusov výrazne závisí na teplote prostredia a druhy rastúce v teplejších a suchších kontinentálnych oblastiach majú výtrusy s väčším objemom. Vysvetlením tohto fenoménu by podľa autorov mohlo byť to, že výtrusy húb rastúcich v týchto podmienkach sú náchylnejšie k vysychaniu a k úspešnému vyklíčeniu musia obsahovať viac vody a sú preto väčšie. Výtrusy s väčším objemom by ale teoreticky mohli byť výhodnejšie aj v prípadoch, kedy musia výtrusy pred vyklíčením prečkať dlhé obdobie sucha či iných nepriaznivých podmienok v dormantnej fáze a mohli by potrebovať väčšie množstvo zásobných látok (Halbwachs et al., 2017). Bryofilné Pezizales rastúce v teplejších podmienkach, typicky napríklad v mediteráne, totiž obvykle fruktifikujú len počas niekoľkých týždňov v priebehu zimy, kedy je na ich lokalitách dostatočne vlhko (Jukić et al., 2018).

Výška ornamentiky aj relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou výrazne záviseli predovšetkým na mieste pripojenia infekčného aparátu a druhy pripojené na rhizoidoch hostiteľských machorastov mali askospóry s oveľa výraznejšou ornamentikou. Vysvetlenie tohto vzťahu by u bryofilných Pezizales mohlo byť podobné, ako sa navrhuje aj v prípade ektomykoríznych húb. Tie totiž majú v porovnaní s ich saprotrofnými príbuznými tiež výrazne častejšie ornamentované výtrusy (Calhim et al., 2018; Halbwachs et al., 2015). Podľa autorov týchto prác by príčinou mohlo byť to, že ornamentované výtrusy sa lepšie zachytávajú na pôdne bezstavovce, ako sú napríklad chvostoskoky a roztoče. Tieto bezstavovce môžu následne roznášať výtrusy bližšie ku koreňom ich mykoríznych partnerov, kde by sa inak pasívne dostali zrejme len ťažko. Výrazne ornamentované askospóry sa pritom u bryofilných Pezizales vyskytujú práve u druhov, ktoré sú obvykle pripojené na podzemné časti svojich hostiteľov a je tak možné, že aj u týchto

húb slúži ornamentika k zachytávaniu askospór na pôdne bezstavovce. Žiadna práca však zatiaľ experimentálne neoverila či ornamentika reálne ovplyvňuje zachytávanie výtrusov na povrch tela bezstavovcov, na čo poukázali aj Pringle et al. (2015) a Vašutová et al. (2019). U *Tomentella sublilacina* je síce známe, že sa ostnité výtrusy tohto druhu dobre zachytávajú na povrchu rôznych bezstavovcov (Lilleskov & Bruns, 2005), autori však už netestovali akú úlohu pri tomto procese hrá samotná ornamentika a či by sa podobne efektívne neprichytávali aj hladké výtrusy. Viaceré štúdie totiž našli na povrchu pôdnych roztočov a chvostoskokov prichytené aj hladké výtrusy rôznych druhov húb (Behan, 1978; Jacot, 1930; Visser, 1987). Relatívne pokrytie povrchu askospór u sledovaných bryofilných Pezizales záviselo aj na vlhkosti prostredia hostiteľa, tolerancii hostiteľa k vysokým teplotám a životnej forme hostiteľa. Dalo by sa špekulovať, že by sa askospóry s hustejšou ornamentikou napríklad mohli v určitých klimatických podmienkach lepšie zachytávať na povrch pôdnych bezstavovcov, prípadne že sa jedná adaptáciou na rozdielne bezstavovce, ktoré na lokalitách žijú. Žiadne práce však zatiaľ podobný vzťah u húb netestovali. Z obrázka 30 sa navyše zdá, že čistý efekt týchto prediktorov je pomerne malý.

$Q$  hodnota askospór sledovaných druhov signifikantne závisela na mieste pripojenia infekčného aparátu. Je zaujímavé, že práve druhy pripojené na rhizoidy mali guľovitejšie askospóry. Tie totiž rovnako ako v prípade ornamentiky, pripomínajú tvarom výtrusy ektomykorizných húb (Calhim et al., 2018; Halbwachs et al., 2015). Autori tejto práce ako možné vysvetlenie navrhli, že nižší pomer povrchu k objemu u guľovitých výtrusov môže znižovať pravdepodobnosť ich poškodenia. Druhy ktoré sa snažia infikovať podzemné časti špecifických hostiteľov by totiž mohli potrebovať odolnejšie výtrusy. Podobne aj výrazná ornamentika askospór, diskutovaná v predchádzajúcom odstavci, by pritom teoreticky mohla zvyšovať mechanickú odolnosť askospór. Ďalším hypotetickým vysvetlením by mohlo byť to, že aj tvar výtrusov hrá nejakú úlohu aj pri ich prichytávaní na pôdne bezstavovce. O niečo menej výrazný vplyv na  $Q$  hodnotu mala u sledovaných druhov aj životná forma hostiteľského machorastu. Vysvetlenie tohto vzťahu by aj v tomto prípade mohlo spočívať vo zvýšenej odolnosti guľovitých askospór. Guľovitejšie askospóry totiž nájdeme u druhov viazaných na skupiny *annuals* a *colonists*, ktoré typicky osídľujú intenzívnejšie narušované lokality (Glime, 2017). Je tak možné, že pre bryofilné Pezizales viazané na tieto machorasty je výhodné mať odolnejšie askospóry.

## 5.5 Sledovanie vystreľovania askospór

Zo 40220 zmeraných vystrelených askospór sa na poslednom centimetri podložného sklíčka nachádzalo len 41 askospór a vo všetkých prípadoch sa jednalo o väčšie klastre niekoľkých askospór. Použitie podložného sklíčka dlhého 7,6 cm sa tak na zachytenie aktívne vystrelených askospór týchto húb zdá byť dostatočné a vhodné pre sledovanie vzdialenosti vystrelenia askospór a veľkosti klastrov askospór. Horizontálna

vzdialenosť vystrelenia askospór, ktorú som v tejto práci meral, by sa pritom nemala výrazne líšiť od vertikálnej vzdialenosti. Z matematických modelov vystreľovania askospór a ich trajektórie je totiž zrejme, že za spomalenie vystrelených askospór môže predovšetkým odpor vzduchu a gravitácia sa na ňom podieľať len minimálne (Trail et al., 2005; Yafetto et al., 2008).

Väčšina sledovaných druhov bryofilných Pezizales vystreľovala svoje askospóry prevažne samostatne alebo v klastroch dvoch až štyroch askospór. Žiadna z testovaných morfológických charakteristík askospór ale nedokázala vysvetliť rozdiely v tvorbe klastrov medzi druhmi. U druhu s najväčšími klastrami – *Octosporella erythrostigma* (LJDP49), by snáď za ich tvorbu mohli byť zodpovedné prívesky na póloch askospór. Podobné prívesky sa nevyskytujú u žiadneho iného známeho druhu bryofilných Pezizales, no napríklad u viacerých koprofilných pyrenomycétov rodu *Podospora* sa práve slizovité prívesky na póloch askospór považujú za príčinu tvorby veľkých klastrov týchto druhov (Ingold, 1933). Ostatné druhy tvoriace veľké klastre askospór už ale podobné výrazné morfológické znaky nezdieľajú. Dôležitú úlohu pri ich tvorbe by však mohli zohrávať napríklad aj morfológia vreciek či vzájomné usporiadanie askospór vo vrecku, ktorým som sa ale v tejto práci nevenoval. O pohlavnom systéme bryofilných Pezizales nie sú známe žiadne informácie. V prípade že by ale boli tieto huby heterothalické, tvorba klastrov askospór by mohla významne urýchľovať aj ich pohlavné rozmnožovanie a následné šírenie. Pokiaľ totiž dopadne k hostiteľovi klaster niekoľkých askospór, je pomerne pravdepodobné, že sa v ňom budú nachádzať súčasne oba párovacie typy. Daná huba by sa tak mohla hneď ďalej pohlavne rozmnožovať, tvoriť nové askospóry a nemusí čakať na opačne pohlavne ladeného partnera. U bryofilných Pezizales by tento spôsob vystreľovania askospór mohol byť obzvlášť výhodný, keďže nepohlavné rozmnožovanie u nich nie je vôbec známe a bolo zatiaľ zistené len nedávno u druhu *Octospora conidiophora* (Sochorová et al., 2019). Táto skupina húb sa teda musí pri kolonizácii nových lokalít zrejme spoliehať najmä na tvorbu askospór.

Väčšie klastre boli u sledovaných druhov spravidla aktívne vystrelené výrazne ďalej ako samostatné askospóry. Tento výsledok zodpovedá predpokladom matematických modelov (Pringle et al., 2017) a aj pozorovaniam u zástupcov rodu *Sordaria*, u ktorých tiež väčšie klastre spravidla doleteli výrazne ďalej (Ingold & Hadland, 1959; Walkey & Harvey, 1966). Na základe mojich výsledkov je teda zrejme, že aj u bryofilných Pezizales má veľkosť klastrov zásadný vplyv na vzdialenosť do akej sú askospóry aktívne vystrelené. Druhy, ktoré vystreľujú askospóry vo väčších klastroch, tak môžu prekonať hrubšiu vrstvu nehybného vzduchu nad povrchom ich plodníc a väčšia časť ich askospór by aj mala byť zachytená vzdušnými prúdmi. Vystreľovanie samostatných askospór ale naopak maximalizuje množstvo nezávislých projektilov a môže zvýšiť šancu, že aspoň niektoré z askospór sa dostanú k vhodnému hostiteľovi.

Vrstva nehybného vzduchu, ktorú sa vreckaté huby snažia aktívnym vystreľovaním askospór prekonať, by za slnečného dňa mala mať hrúbku v ráde desiatín až jednotiek milimetrov (Gregory, 1961; Pringle et al.



2017). Aj väčšina samostatne vystrelených askospór sledovaných druhov by tak na základe mojich výsledkov zrejme mala byť schopná túto vrstvu preletieť. Jediný druh, ktorý vystreľoval samostatné askospóry v priemere do vzdialenosti menšej ako 5 mm bol *Octospora affinis* (LJDP21). Tento druh ale askospóry vystreľoval väčšinou vo forme väčších klastrov, ktoré už doleteli výrazne ďalej (obr. P13).

Z výsledkov mojej práce je zrejme, že veľmi výrazný efekt na aktívnu vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór má ich objem. Vplyv má aj ornamentika na povrchu askospór, ktorá u niektorých druhov tiež výrazne zväčšuje ich celkový objem. Askospóry s väčším celkovým objemom sú aktívne vystrelené výrazne ďalej a mali by tak byť schopné prekonať hrubšiu vrstvu nehybného vzduchu nad povrchom plodníc. To zodpovedá výsledkom práce Ingold (1961) aj predpokladom matematických modelov (Pringle et al., 2017) a ukazuje, že minimálne u príbuzných druhov má objem vystreleného projektilu veľmi zásadný vplyv na vzdialenosť do akej sú askospóry aktívne vystrelené. Na veľkosť askospór pritom ale zjavne pôsobia viaceré, zrejme aj protichodné selekčné tlaky. Väčšie askospóry sú síce aktívne vystreľované ďalej, vzdušnými prúdmi by už ale mali byť následne väčšie výtrusy pasívne rozširované do výrazne kratších vzdialeností, ako malé výtrusy (Norros et al., 2014). Je tak možné, že rozdiely v objeme askospór a vzdialenosti ich aktívneho vystrelenia sú aj dôsledkom rozdielnej intenzity niektorých selekčných tlakov u jednotlivých druhov. Príčinou by mohla byť napríklad rôzna hrúbka vrstvy nehybného vzduchu na lokalitách jednotlivých druhov alebo aj rozdiely v charaktere rozšírenia hostiteľských machorastov v krajine. V niektorých prípadoch, by totiž nemusela byť maximalizácia celkovej vzdialenosti doletu askospór optimálnou stratégiou šírenia daného druhu. Príkladom by mohli byť huby rastúce na slaniskách, skalách či vysoko v horách. Tieto biotopy a machorasty, ktoré sú na nich viazané sa totiž v krajine vyskytujú obvykle len pomerne lokálne v konkrétnych oblastiach. Pre niektoré bryofilné Pezizales by tak mohlo byť výhodnejšie, keby veľká časť ich askospór dopadla skôr blízko plodníc, kde sa hostiteľský machorast vyskytuje s väčšou pravdepodobnosťou. Pokiaľ by vzdušné prúdy rozniesli všetky askospóry ďaleko od pôvodnej lokality, hrozí že sa žiadna askopóra k vhodnému hostiteľovi nedostane. Je však otázne do akej miery je súčasný charakter rozšírenia rôznych machorastov stabilný a zodpovedá ich rozšíreniu v minulosti a či by z evolučného hľadiska mohlo byť pre niektoré druhy výhodné morfológiu svojich spór na niečo takéto optimalizovať.

Roper et al. (2008) ukázali, že askospóry väčšiny druhov vrekatých húb, ktoré ich aktívne vystreľujú, majú tvar optimalizovaný na minimalizáciu odporu vzduchu. Je preto pomerne prekvapivé, že  $Q$  hodnota nemala u sledovaných bryofilných Pezizales výrazný vplyv na vzdialenosť vystrelenia askospór a ani zrejme optimum. Napríklad ani druhy s guľovitými askospórami nevystreľovali samostatné askospóry do kratšej vzdialenosti, ako druhy s elipsoidnými askospórami, ktorých tvar by mal odpor vzduchu minimalizovať ( $Q$  hodnota približne 2 – 2,5). Zostáva však otázkou, prečo má potom veľká časť vrekatých húb práve takto

tvarované askospóry. Je možné, že tento tvar je výhodný aj z iného dôvodu, než je samotné zníženie odporu vzduchu. Pri konštantnom objeme askospór by teoreticky napríklad mohol tvar askospór limitovať aj rozmery a tvar vreciek, či veľkosť otvoru na ich vrchole.

## 5.6 Limitácie práce

Väčšina sledovaných premenných je v rámci jednotlivých druhov bryofilných Pezizales stabilná alebo sa nimi aspoň nedá jednoducho manipulovať. Kausálny vzťah medzi premennými preto nie je možné jednoznačne určiť a táto práca má tak skôr exploratívny charakter. Interpretáciu výsledkov sťažuje aj to, že pozorované morfológické charakteristiky askospór a rozdiely v ich šírení sú zrejme výsledkom pôsobenia rôznych faktorov a selekčných tlakov a ich vzájomných interakcií. Signifikantné vzťahy, ktoré som medzi niektorými premennými pozoroval, je tak potrebné interpretovať opatrne, keďže môžu byť napríklad aj dôsledkom korelácie daného prediktoru s inou premennou. Pri testovaní pomocou PGLS som porovnával vždy len priemerné hodnoty znaku jednotlivých druhov, čo by mohlo tiež mierne skresľovať výsledky modelov, keďže tým zanedbávam vnútrodruhovou variabilitu. Viaceré znaky som navyše meral len na jednej plodnici, ktorá nemusela daný druh adekvátne reprezentovať. Aj vybrané morfológické charakteristiky askospór pritom predstavujú pomerne výrazné zjednodušenie skutočnej morfológickej diverzity askospór bryofilných Pezizales a je možné, že niektoré dôležité znaky som v práci zanedbal.

## 6 Záver

V tejto diplomovej práci som sa venoval analýze vybraných faktorov, ktoré by mohli byť zodpovedné za veľkú morfológickú diverzitu askospór bryofilných zástupcov radu Pezizales, a následne aj vplyvu morfológie askospór na ich aktívne vystreľovanie. Sledoval som 52 druhov naprieč väčšinou známymi fylogenetických línií bryofilných Pezizales, ktoré sa výrazne líšili vo veľkosti, tvare aj ornamentike svojich askospór. Na základe sekvencií troch úsekov DNA som zrekonštruoval fylogézu sledovaných druhov, ktorú som využil pri testovaní vzťahov medzi jednotlivými premennými pomocou metódy fylogenetických generalizovaných najmenších štvorcov. Takmer všetky druhy som úspešne podrobil morfometrickej analýze, meraniu veľkosti genómu prietokovou cytometriou a analýze počtu jadier fluorescenčnou mikroskopiou. U hostiteľov jednotlivých druhov som určil miesto pripojenia infekčného aparátu a získal informácie o ich ekológii. Pomocou experimentov sledujúcich horizontálne vystreľovanie askospór som následne tiež sledoval, do akej vzdialenosti sú askospóry vystrelené a či sú vystreľované samostatne alebo tvoria klastre.

Viacere druhy bryofilných Pezizales sa vyznačovali neobvykle veľkým genómom a askospóry niektorých druhov mali na rozdiel od väčšiny zástupcov čeľade Pyronemataceae aj viac ako jedno jadro. Veľkosť genómu a aj počet jadier mali pritom výrazný pozitívny vplyv na objem askospór. Veľká časť variability vo veľkosti askospór sa tak u sledovaných bryofilných Pezizales zjavne dá vysvetliť celkovým množstvom DNA v askospóre. Táto práca je pritom prvá, ktorá tento vzťah u vrekatých húb preukázala aj u askospór.

Na morfológiu askospór mali ale vplyv aj ekológia hostiteľských machorastov a miesto pripojenia infekčných štruktúr. Objem askospór závisel na tolerancii hostiteľských machorastov k vysokým teplotám a väčší objem askospór by u niektorých druhov mohol predstavovať aj adaptáciou na rast v teplejšom prostredí. Výška ornamentiky, pokrytie povrchu askospór ornamentikou a aj tvar askospór zase silne záviseli najmä na mieste pripojenia infekčného aparátu a askospóry druhov napojených na rhizoidy mali oveľa výraznejšiu ornamentiku. Ornamentika askospór by pritom u týchto húb mohla pomáhať rozširovať askospóry k podzemným orgánom hostiteľov pomocou pôdnych bezstavovcov. Túto hypotézu však bude ešte potrebné experimentálne otestovať.

Všetky sledované druhy bryofilných Pezizales svoje askospóry aktívne vystreľovali. Jednotlivé druhy sa ale líšili v tom či vystreľovali askospóry samostatne, alebo spoločne ako väčšie klastre. Žiadna sledovaná morfológická charakteristika ale variabilitu v tvorbe klastrov vysvetliť nedokázala. Vzdialenosť do akej boli askospóry vystrelené však zreteľne závisela na celkovom objeme vystreleného projektilu. Ten pritom môže byť ovplyvnený buď priamo objemom askospóry (vrátane jej ornamentiky), alebo vystreľovaním askospór

vo forme klastrov. Tvar askospór prekvapivo nemal u sledovaných druhov žiadny zrejmy vplyv na vzdialenosť do akej boli vystrelené.

Na morfológiu askospór má teda na základe mojich zistení vplyv viacero rôznych faktorov. Dôležitú úlohu hrá množstvo DNA v askospóre, ale aj ekológia hostiteľských machorastov a miesto pripojenia infekčného aparátu. Rozdiely v morfológií majú pritom zásadný vplyv na ich aktívne šírenie. Minimálne časť diverzity v morfológií askospór bryofilných Pezizales a ich šírení by zrejme mohla odrážať rozdielne niky jednotlivých druhov a špecifické selekčné tlaky, ktoré na nich pôsobia.

## 7 Literatúra

- Albertin, W., & Marullo, P. (2012). Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1738), 2497–2509.
- Bailey, R. H., & Garrett, R. M. (1968). Studies on the discharge of ascospores from lichen apothecia. *The Lichenologist*, 4(1), 57–65.
- Behan, V. M., & Hill, S. B. (1978). Feeding habits and spore dispersal of oribatid mites in the North American arctic. *Revue d'écologie et de biologie du sol*, 15(4), 497–516.
- Benkert, D. (1987). Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Lamprospora* (Pezizales). *Zeitschrift für Mykologie*, 53, 195–271.
- Benkert, D. (1993). Bryoparasitic Pezizales: Ecology and systematics. In Pegler, D. N., Boddy, L., & Kirk, P. M. (Eds.), *Fungi of Europe: Investigation, Recording and Conservation* (pp. 147–156). Kew, Royal Botanical Gardens, London, UK.
- Benkert, D. (1998a). Beiträge zur Kenntnis bryophiler Pezizales-Arten. 6. *Wrightoideae*, eine neue Sektion der Gattung *Octospora*. *Zeitschrift für Mykologie*, 64(1), 17–40.
- Benkert, D. (1998b). Beiträge zur Kenntnis bryophiler Pezizales-Arten. 8. Viersporige Taxa der Gattung *Octospora*. *Österreichische Zeitschrift für Pilzkunde*, 7, 39–63.
- Benkert, D. (2001). Neotypisierung von *Lamprospora miniata* De Not. (Ascomycetes, Pezizales) und die Problematik des “*Lamprospora miniata*-Komplexes”. *Micologia 2000*, 47–61.
- Benkert, D. (2002). Beiträge zur Kenntnis bryophiler Pezizales. 10. Variabilität und Verbreitung von *Lamprospora maireana* Seaver und *L. tuberculatella* Seaver. *Feddes Repertorium*, 113(1–2), 80–95.
- Berthet, P. (1964). *Essai biotaxonomique sur les Discomycètes*. Ph.D. thesis, Université de Lyon.
- Buller, A. H. R. (1909). *Researches on Fungi*. London, UK: Longmans, Green and Company.
- Caillet, M. & Moyne, G. (1991). Clé de détermination du genre *Octospora* et des genres voisins. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle du Doubs*, 84, 9–24.
- Calhim, S., Halme, P., Petersen, J. H., Læssøe, T., Bässler, C., & Heilmann-Clausen, J. (2018). Fungal spore diversity reflects substrate-specific deposition challenges. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9.
- Cavalier-Smith, T. (2005). Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion. *Annals of Botany*, 95(1), 147–175
- Corner, E. J. H. (1929). A humariaceous fungus parasitic on a liverwort. *Annals of Botany*, 43(171), 491–505.
- Czymmek, K. J., & Klomparens, K. L. (1992). The ultrastructure of ascosporegenesis in freeze-substituted *Thelebolus crustaceus*: enveloping membrane system and ascospore initial development. *Canadian Journal of Botany*, 70(8), 1669–1683.
- Davey, M. L., & Currah, R. S. (2006). Interactions between mosses (Bryophyta) and fungi. *Canadian Journal of Botany*, 84(10), 1509–1519.
- Dierßen, K. (2001). Distribution, ecological amplitude and phytosociological characterization of European bryophytes. *Bryophytorum bibliotheca*, 56, 1–289.
- Doležel, J., & Bartoš, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95(1), 99–110.
- Doležel, J., Sgorbati, S., & Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia plantarum*, 85(4), 625–631.
- Döbbeler, P. (1978). Moosbewohnende Ascomyceten I. Die pyrenocarpen, den Gametophyten besiedelnden Arten. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, 14, 1–360.

- Döbbeler, P. (1979). Untersuchungen on moosparasitischen Pezizales aus der Verwandtschaft von *Octospora*. *Nova Hedwigia*, 31, 817–864.
- Döbbeler, P. (1980). Moosbewohnende Ascomyceten IV. Zwei neue Arten der Gattung *Octosporella* (Pezizales). *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, 16, 471–484.
- Döbbeler, P. (2011). Two new hepaticolous species of the genus *Octosporella* (Pezizales). *Herzogia*, 24(2), 357–365.
- Döbbeler, P., Berger, F., Piñero, R. N., & Vega, M. (2018). *Octosporella microtricha* and *O. nematospora* – two new pezizalean ascomycetes on *Frullania*. *Herzogia*, 31(1), 101–108.
- During, H. J. (1992). Ecological classification of bryophytes and lichens. In J. W. Bates & A. M. Farmer (Eds.), *Bryophytes and lichens in a changing environment* (pp. 1–31). Oxford, UK: Oxford Science Publications.
- Edler, D., Klein, J., Antonelli, A., & Silvestro, D. (2019). raxmlGUI 2.0 beta: a graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *bioRxiv*: 800912.
- Egertová, Z., Döbbeler, P., & Sochor, M. (2018a). *Octosporopsis erinacea* and *Octospora kelabitiana* (Pezizales) – two new hepaticolous ascomycetes from Borneo. *Mycological Progress*, 17(1–2), 103–113.
- Egertová, Z., Eckstein, J., Sochor, M., & Vega, M. (2018b). *Lamprospora sylvatica* (Pyronemataceae), a new bryophilous ascomycete on *Dicranum montanum*. *Phytotaxa*, 357(1), 17–29.
- Egertová, Z., Eckstein, J., & Vega, M. (2015). *Lamprospora tuberculata*, *Octospora ithacaensis*, *O. orthotrichi* and *O. affinis* – four bryoparasitic ascomycetes new to the Czech Republic. *Czech Mycology*, 67(2), 119–133.
- Egertová, Z., & Sochor, M. (2017). The largest fungal genome discovered in *Jafnea semitosta*. *Plant Systematics and Evolution*, 303(7), 981–986.
- Field, K. J., Rimington, W. R., Bidartondo, M. I., Allinson, K. E., Beerling, D. J., Cameron, D. D., ... & Pressel, S. (2015). First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO<sub>2</sub>. *New Phytologist*, 205(2), 743–756.
- Fraser, H. C. I. (1908). Contributions to the cytology of *Humaria rutilans*, Fries. *Annals of Botany*, 22(1), 35–55.
- Garrett, R. M. (1971). Studies on some aspects of ascospore liberation and dispersal in lichens. *The Lichenologist*, 5(1–2), 33–44.
- Glime, J. M. (2017). Adaptive Strategies: Life Cycles. In *Bryophyte Ecology*. Retrieved from: <http://www.bryoecol.mtu.edu>.
- Grafen, A. (1989). The phylogenetic regression. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 326(1233), 119–157.
- Gregory, P. H. (1961) *The Microbiology of the Atmosphere*. London, UK: Leonard Hill.
- Gregory, T. R. (2005). Genome size evolution in animals. In *The evolution of the genome* (pp 3–87). Burlington, USA: Elsevier Academic Press.
- Halbwachs, H., Brandl, R., & Bässler, C. (2015). Spore wall traits of ectomycorrhizal and saprotrophic agarics may mirror their distinct lifestyles. *Fungal Ecology*, 17, 197–204.
- Halbwachs, H., Heilmann-Clausen, J., & Bässler, C. (2017). Mean spore size and shape in ectomycorrhizal and saprotrophic assemblages show strong responses under resource constraints. *Fungal Ecology*, 26, 59–64.
- Hansen, K., & Olariaga, I. (2015). Species limits and relationships within *Otidea* inferred from multiple gene phylogenies. *Persoonia*, 35, 148–165.

- Hansen, K., Perry, B. A., Dranginis, A. W., & Pfister, D. H. (2013). A phylogeny of the highly diverse cup-fungus family Pyronemataceae (Pezizomycetes, Ascomycota) clarifies relationships and evolution of selected life history traits. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67(2), 311–335.
- Hedwig, J. (1789). *Descriptio et adumbratio microscopico-analytica Muscorum frondosorum*. Tom. II. Lipsiae: in bibliopolio I. G. Mülleriano.
- Index Fungorum. (2020) Retrieved from: <http://www.indexfungorum.org>
- Ingold, C. T. (1933). Spore discharge in the Ascomycetes. I. Pyrenomycetes. *New Phytologist*, 32(3), 175–196.
- Ingold, C. T. (1971). *Fungal spores, their liberation and dispersal*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Ingold, C. T. (2001). Singling of meiospores. *Mycologist*, 15, 86–87.
- Ingold, C. T., & Hadland, S. A. (1959). The ballistics of *Sordaria*. *New Phytologist*, 58(1), 46–57.
- Jacot, A. P. (1930). Moss-mites as spore-bearers. *Mycologia*, 22(2), 94–96.
- Jukić, N., Tomić, S., Sabovljević, M., & Omerović, N. (2018). Notes on some bryophilous Pezizales (Fungi) in the Mediterranean part of Bosnia and Herzegovina. *Glasnik Šumarskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci*, (28), 71–83.
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220–233.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772–780.
- Kausrud, H., Heegaard, E., Halvorsen, R., Boddy, L., Høiland, K., & Stenseth, N. C. (2011). Mushroom's spore size and time of fruiting are strongly related: is moisture important? *Biology Letters*, 7(2), 273–276.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi* (10th ed.). Wallingford, UK: CAB International.
- Koukol, O. (2015). Když se řekne vřecko. *Živa*, 100(1), 8–11.
- Kuldau, G. A., Tsai, H. F., & Schardl, C. L. (1999). Genome sizes of *Epichloë* species and anamorphic hybrids. *Mycologia*, 91(5), 776–782.
- Kullman, B. (2002). Nuclear DNA content, life cycle and ploidy in two *Neottiella* species (Pezizales, Ascomycota). *Persoonia*, 18, 103–114.
- Kullman, B., Tamm, H., & Kullman, K. (2005). Fungal genome size database. Retrieved from: <http://www.zbi.ee/fungal-genomesize>.
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2017). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 34(3), 772–773.
- Lilleskov, E. A., & Bruns, T. D. (2005). Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella sublilacina*, via soil food webs. *Mycologia*, 97(4), 762–769.
- Lindemann, U., Vega, M., Richter, T., & Alvarado, P. (2014). *Octosporopsis nicolai* – ein rätselhafter Vertreter aus der Familie der Pyronemataceae. *Zeitschrift für Mykologie*, 80(2), 565–592.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., & Santos, C. (2006). Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Annals of Botany*, 98(3), 515–527.
- Marleau, J., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2011). Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC evolutionary biology*, 11, 11.

- Martínez-Gil, R., Vega, M., & De la Cruz, J. (2019). Contribución al conocimiento y distribución de *Lamprospora lutziana* (Pezizales), una especie poco citada, encontrada en el norte de España. *Ascomycete.org*, 11(6), 195–204.
- McLennan, E., & Cookson, I. (1923). Additions to the Australian ascomycetes. I. *Proceedings of the Royal Society of Victoria*, 35, 153–158.
- Mohanta, T. K., & Bae, H. (2015). The diversity of fungal genome. *Biological procedures online*, 17(1), 8.
- Norros, V., Rannik, Ü., Hussein, T., Petäjä, T., Vesala, T., & Ovaskainen, O. (2014). Do small spores disperse further than large spores? *Ecology*, 95(6), 1612–1621.
- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In Reynolds, D. R., & Taylor, J. W. (Eds.), *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics* (pp. 225–233). Wallingford, UK: CAB International.
- Olech, M., & Mleczko, P. (2000). New species and new combination in the fungal genus *Octospora* from Antarctica. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 69, 277–283.
- Orme, D., Freckleton, R., Thomas, G., Petzoldt, T., Fritz, S., & Isaac, N. (2013). The caper package: comparative analysis of phylogenetics and evolution in R. R package version 0.5.2. Retrieved from: <http://CRAN.R-project.org/package=caper>.
- Pagel, M. (1999). Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature*, 401(6756), 877–884.
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289–290.
- Penn, O., Privman, E., Ashkenazy, H., Landan, G., Graur, D., & Pupko, T. (2010). GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic acids research*, 38, W23–W28.
- Perry, B. A., Hansen, K., & Pfister, D. H. (2007). A phylogenetic overview of the family Pyronemataceae (Ascomycota, Pezizales). *Mycological Research*, 111(5), 549–571.
- Praça-Fontes, M. M., Carvalho, C. R., Clarindo, W. R., & Cruz, C. D. (2011). Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant Cell Reports*, 30(7), 1183–1191.
- Pressel, S., Bidartondo, M. I., Ligrone, R., & Duckett, J. G. (2014). Fungal symbioses in bryophytes: new insights in the twenty first century. *Phytotaxa*, 9(1), 238–253.
- Pringle, A., Brenner, M., Fritz, J., Roper, M., Seminara, A. 2017. Reaching the wind: boundary layer escape as a constraint on ascomycete spore dispersal. In Dighton, J., & White, J. F. (Eds.), *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem* (pp. 309–319), Boca Raton, USA: CRC.
- Pringle, A., Vellinga, E., & Peay, K. (2015). The shape of fungal ecology: does spore morphology give clues to a species' niche? *Fungal Ecology*, 100(17), 213–216.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved from: <https://www.R-project.org>.
- Raju, N. B. (1979). A four-spored mutant of *Neurospora crassa*. *Experimental Mycology*, 3(3), 270–280.
- Raju, N. B., & Burk, A. G. (2004). Abnormal ascospore morphology in the bud mutant of *Neurospora tetrasperma*. *Fungal Genetics and Biology*, 41(6), 582–589.
- Rambaut, A. (2017). FigTree-version 1.4.3, a graphical viewer of phylogenetic trees. Computer program distributed by the author. Retrieved from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901–904.



- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84–98.
- Rees, G. (1980). Factors affecting the sedimentation rate of marine fungal spores. *Botanica marina*, 27, 145–160.
- Rees, G., & Jones, E. B. G. (1984). Observations on the attachment of spores of marine fungi. *Botanica marina*, 23, 375–385.
- Revell, L. J. (2012). phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in ecology and evolution*, 3(2), 217–223.
- Rifai, M. A. (1968). The Australian Pezizales in the Herbarium of the Royal Botanic Gardens, Kew. *Verhandelingen der Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Afdeling Natuurkunde Tweede Reeks*, 57(3), 1–295.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539–542.
- Roper, M., Pepper, R. E., Brenner, M. P., & Pringle, A. (2008). Explosively launched spores of ascomycete fungi have drag-minimizing shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20583–20588.
- Roper, M., Seminara, A., Bandi, M. M., Cobb, A., Dillard, H. R., & Pringle, A. (2010). Dispersal of fungal spores on a cooperatively generated wind. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41), 17474–17479.
- Rossen, J. M., & Westergaard, M. (1966). Studies on the mechanism of crossing over. II. Meiosis and the time of meiotic chromosome replication in the ascomycete *Neottiella rutilans* (Fr.) Dennis. *Comptes-Rendus Des Travaux Du Laboratoire Carlsberg*, 35(9), 233–260.
- Seaver, F. J. (1912). The genus *Lamprospora*, with descriptions of two new species. *Mycologia*, 4(2), 45–48.
- Seaver, F. J. (1914) A preliminary study of the genus *Lamprospora*. *Mycologia*, 6(1), 5–24.
- Sela, I., Ashkenazy, H., Katoh, K., & Pupko, T. (2015). GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic acids research*, 43, W7–W14.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671–675.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246.
- Schönswetter, P., Suda, J., Popp, M., Weiss-Schneeweiss, H., & Brochmann, C. (2007). Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(1), 92–103.
- Silvestro, D., & Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*, 12, 335–337.
- Sochorová, Z., Döbbeler, P., Sochor, M., & van Rooy, J. (2019). *Octospora conidiophora* (Pyronemataceae) – a new species from South Africa and the first report of anamorph in bryophilous Pezizales. *MycoKeys*, 54, 49–76.

- Stamatakis, A. (2014). Raxml version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 1312–1313.
- Stenroos, S., Laukka, T., Huhtinen, S., Döbbeler, P., Myllys, L., Syrjänen, K., & Hyvönen, J. (2010). Multiple origins of symbioses between ascomycetes and bryophytes suggested by a five-gene phylogeny. *Cladistics*, 26(3), 281–300.
- Suda, J., & Leitch, I. J. (2010). The quest for suitable reference standards in genome size research. *Cytometry A*, 77(8), 717–720.
- Talhinhas, P., Ramos, A. P., Tavares, D., Tavares, S., & Loureiro, J. (2015). Genome size estimates for six rust (Pucciniales) species. *Revista de Ciências Agrárias*, 38(2), 176–183.
- Talhinhas, P., Tavares, D., Ramos, A. P., Gonçalves, S., & Loureiro, J. (2017). Validation of standards suitable for genome size estimation of fungi. *Journal of microbiological methods*, 142, 76–78.
- Tamm, H., Pöldmaa, K., & Kullman, B. (2010). Phylogenetic relationships in genus *Geopora* (Pyronemataceae, Pezizales). *Mycological Progress*, 9(4), 509–522.
- The GIMP Team (2019). GIMP – The GNU Image Manipulation Program. Version 2.10.14. Retrieved from: <http://gimp.org/>.
- Tobias, P. A., Schwessinger, B., Deng, C. H., Wu, C., Dong, C. M., Sperschneider, J., ... & Park, R. (2020). Long read assembly of the pandemic strain of *Austropuccinia psidii* (myrtle rust) reveals an unusually large (gigabase sized) and repetitive fungal genome. *bioRxiv*: 996108.
- Trail, F., Gaffoor, I., & Vogel, S. (2005). Ejection mechanics and trajectory of the ascospores of *Gibberella zeae* (anamorph *Fuarium graminearum*). *Fungal Genetics and Biology*, 42(6), 528–533.
- van Brummelen, J. (1967). A world-monograph of the genera *Ascobolus* and *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales). *Persoonia-Supplement*, 1, 1–260.
- Trail, F. (2007). Fungal cannons: explosive spore discharge in the Ascomycota. *FEMS microbiology letters*, 276(1), 12–18.
- Vašutová, M., Mleczko, P., López-García, A., Maček, I., Boros, G., Ševčík, J., ... & Páll-Gergely, B. (2019). Taxi drivers: the role of animals in transporting mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 29, 413–434.
- Vega, M., Eckstein, J., Friebe, G., Tena Lahoz, R. & Gube, M. (2017). *Lamprospora pseudoarvensis* sp. nov. (Pezizales) – a lookalike tracked down. *Ascomycete.org*, 9(5), 139–148.
- Vega, M., Eckstein, J., & van der Kolk, H. J. (2016). *Lamprospora verrucispora* sp. nov. (Pezizales). *Ascomycete.org*, 8(4), 163–171.
- Vega, M., Janošik, L., Martínez-Gil, R., & Moyne, G. (2018). Epitypification of *Lamprospora rehmi* Benkert (Pezizales). *Ascomycete.org*, 10(3), 97–106.
- Vega, M., Janošik, L., Sochorová, Z., Martínez-Gil, R., & Eckstein, J. (2019). *Lamprospora densireticulata* sp. nov., *L. dictydiola* and *L. carbonicola* (Pyronemataceae, Pezizales) – three very similar species from very different hosts and habitats. *Mycological Progress*, 18(8), 1013–1026.
- Vega, M. & Moyne, G. (2017). Considérations sur l'étude des genres *Lamprospora*, *Octospora* et *Neottiella*. *Mycologia Montenegrina*, 20, 67–78.
- Veselská, T., & Kolařík, M. (2015). Application of flow cytometry for exploring the evolution of *Geosmithia* fungi living in association with bark beetles: the role of conidial DNA content. *Fungal Ecology*, 13, 83–92.
- Visser, S., Parkinson, D., & Hassall, M. (1987). Fungi associated with *Onychiurus subtenuis* (Collembola) in an aspen woodland. *Canadian Journal of Botany*, 65(4), 635–642.

- Walkey, D. G. A., & Harvey, R. (1966). Studies of the ballistics of ascospores. *New Phytologist*, 65(1), 59–74.
- Weber, E. (1992). Untersuchungen zu Fortpflanzung und Ploidie verschiedener Ascomyceten, *Bibliotheca Mycologica*, 140, 1–186.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., Innis, M., ..., Westwood, A. M. (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). New York, USA: Academic Press.
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Lumbsch, H. T., Liu, J. K., Maharachchikumbura, S. S. N., Ekanayaka, A. H., ... Phookamsak, R. (2018). Outline of Ascomycota: 2017. *Fungal Diversity*, 88(1), 167–263.
- Yafetto, L., Carroll, L., Cui, Y., Davis, D. J., Fischer, M. W., Henterly, A. C., ... & Sugawara, Z. (2008). The fastest flights in nature: high-speed spore discharge mechanisms among fungi. *PLOS ONE*, 3(9), e3237.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational biology*, 7(1–2), 203–214.

## 8 Prílohy

**Tabuľka P1** Zoznam sledovaných druhov bryofilných Pezizales a informácie o jednotlivých zberoch; KD – Klára Daňková, LJ – Lukáš Janošík, MV – Marcel Vega, OK – Ondřej Koukol.

Kód zberu	Druh	Hostiteľ	Lokalita	Nadmorská výška [m n. m.]	Dátum	Leg. & Det.	Sekvencie zahrnuté do fylogenetickej analýzy
LJDP01	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Trichostomum crispulum</i>	SR, Beckov, Skalice	220	27.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP02	<i>Lamprospora</i> aff. <i>maireana</i>	<i>Archidium alternifolium</i>	ČR, Bor u Skutče, Toulouvcovy Maštale	420	20.9.2019	LJ & LJ	LSU SSU
LJDP03	<i>Lamprospora dicranellae</i>	<i>Ditrichum hereromallum</i>	Rakúsko, Sportgastein, Naßfeld	1620	20.7.2019	LJ & LJ	LSU
LJDP04	<i>Lamprospora ditrichi</i>	<i>Ditrichum flexicaule</i>	ČR, Srbsko, Chlum	280	14.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP05	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Bryum</i> cf. <i>pallens</i>	Rakúsko, Bad Hofgastein, Angertal	1250	23.7.2019	LJ & LJ	LSU SSU
LJDP06	<i>Lamprospora maireana</i>	<i>Fossombronia caespitiformis</i>	Cyprus, Peyia	450	28.2.2019	MV & MV	LSU SSU
LJDP07	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Tortula acaulon</i>	SR, Trenčianska Turná, intravilán obce	210	27.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP08	<i>Lamprospora miniata</i> var. <i>parvispora</i>	<i>Barbula unguiculata</i>	Rakúsko, Bad Hofgastein, Angertal	1300	23.7.2019	LJ & LJ	LSU SSU
LJDP09	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Ditrichum</i> cf. <i>pusillum</i>	Rakúsko, Sportgastein, Kolmkarspitz	2290	2.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP10	<i>Lamprospora retispora</i>	<i>Syntrichia ruralis</i>	ČR, Turnov, Chloumek	265	26.10.2019	OK & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP11	<i>Lamprospora</i> aff. <i>seaveri</i>	<i>Bryum dichotomum</i>	ČR, Luka pod Medníkem, Dakota	220	5.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP12	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Pohlia</i> cf. <i>annotina</i>	Rakúsko, Sportgastein, Naßfeld	1610	21.7.2019	MV & LJ	LSU
LJDP13	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Dicranella howei</i>	SR, Trenčianske Jastrabie, Mackove Jarky	295	21.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP14	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Ditrichum heteromallum</i>	Rakúsko, Sportgastein, Naßfeld	1960	2.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP15	<i>Lamprospora tuberculata</i> agg.	<i>Pleuroidium subulatum</i>	SR, Veľká Hradná, priehrada Svinica	295	21.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP16	<i>Lamprospora verrucispora</i>	<i>Campylopus flexuosus</i>	ČR, Bor u Skutče, Toulouvcovy Maštale	440	19.9.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP17	<i>Neottiella albocincta</i>	<i>Atrichum undulatum</i>	Nemecko, Hamburg, Friedhof Bornkamp	50	3.11.2019	MV & MV	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP18	<i>Neottiella rutilans</i>	<i>Oligotrichum hercynicum</i>	Rakúsko, Sportgastein, Naßfeld	1590	20.7.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP19	<i>Neottiella vivida</i>	<i>Polytrichum piliferum</i>	SR, Šaštín-Stráže, Jazero č. 3	195	16.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP20	<i>Octospora</i> aff. <i>leucoloma</i> var. <i>tetraspora</i>	<i>Bryum</i> sp.	SR, Zborov nad Bystricou, Kameňolom Klubina	470	26.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP21	<i>Octospora affinis</i>	<i>Orthotrichum affine</i>	Rakúsko, Liezen, Irenenweg	705	5.11.2019	KD & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP22	<i>Octospora axillaris</i>	<i>Tortula acaulon</i>	ČR, Srbsko, intravilán obce	225	14.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP23	<i>Octospora axillaris</i> var. <i>tetraspora</i>	<i>Tortula acaulon</i>	SR, Trenčianske Jastrabie, Mackove Jarky	295	21.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$

LJDP24	<i>Octospora coccinea</i>	<i>Bryum cf. klinggraeffii</i>	Rakúsko, Ardning, Ardningalm	1050	3.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP25	<i>Octospora echinospora</i>	<i>Ephemerum stoloniferum</i>	SR, Veľká Hradná, priehrada Svinica	295	21.10.2019	LJ & LJ	LSU
LJDP26	<i>Octospora erzbergeri</i>	<i>Pseudoleskeella nervosa</i>	Rakúsko, Liezen, Irenenweg	705	5.11.2019	KD & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP27	<i>Octospora gemmicola</i>	<i>Bryum cf. radiculosum</i>	ČR, Praha, Dívčí hrady	260	10.2.2020	LJ & LJ	LSU SSU
LJDP28	<i>Octospora grimmiae</i>	<i>Grimmia pulvinata</i>	ČR, Srbsko, Na Pláních	370	1.1.2020	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP29	<i>Octospora gyalectoides</i> agg.	<i>Dicranella varia</i>	Rakúsko, Sportgastein, Naßfeld	1715	22.7.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP31	<i>Octospora gyalectoides</i> agg.	<i>Tortella inclinata</i>	ČR, Srbsko, Chlum	300	14.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP32	<i>Octospora gyalectoides</i> agg.	<i>Tortula cf. acaulon</i>	ČR, Březová-Oleško, Tahiti	215	5.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP33	<i>Octospora humosa</i>	<i>Polytrichum piliferum</i>	SR, Šaštín-Stráže, Jazero č. 3	195	16.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP34	<i>Octospora itzerottii</i>	<i>Pterygoneurum ovatum</i>	ČR, Srbsko, Chlum	330	1.1.2020	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP35	<i>Octospora leucoloma</i>	<i>Bryum argenteum</i>	ČR, Srbsko, pod Barrandovou jaskyňou	220	14.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP36	<i>Octospora leucoloma</i> var. <i>tetraspora</i>	<i>Bryum argenteum</i>	Rakúsko, Ardning, Ardningalm	1030	3.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP37	<i>Octospora lilacina</i>	<i>Dicranella heteromalla</i>	SR, Trenčianske Jastrabie, Krásna dolina	355	26.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP38	<i>Octospora moravecii</i>	<i>Pohlia nutans</i>	Rakúsko, Sportgastein, Naßfeld	2430	24.7.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP39	<i>Octospora musci-muralis</i>	<i>Grimmia pulvinata</i>	ČR, Beroun, Židovská rokle	220	7.2.2020	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP40	<i>Octospora orthotrichi</i>	<i>Orthotrichum diaphanum</i>	SR, Trenčianske Jastrabie, intravilán obce	320	21.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP41	<i>Octospora phagospora</i>	<i>Pohlia lutescens</i>	SR, Trenčianske Jastrabie, Krásna dolina	355	26.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP42	<i>Octospora pseudoampezzana</i>	<i>Schistidium crassipilum</i>	ČR, Svätý Jan pod Skalou, U Stydlé vody	370	31.12.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP43	<i>Octospora rubens</i>	<i>Ceratodon purpureus</i>	Nemecko, Hamburg, Friedhof Bornkamp	50	3.11.2019	MV & MV	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP44	<i>Octospora</i> sp.	<i>Ditrichum cf. pusillum</i>	SR, Trenčianske Jastrabie, Krásna dolina	440	26.11.2019	LJ & LJ	LSU
LJDP45	<i>Octospora similis</i>	<i>Bryum cf. rubens</i>	SR, Trenčianske Jastrabie, Briezie	365	26.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP46	<i>Octospora</i> sp.	<i>Ditrichum flexicaule</i>	ČR, Srbsko, Chlum	275	14.10.2019	LJ & LJ	LSU SSU
LJDP47	<i>Octospora svrcekii</i>	<i>Cratoneuron filicinum</i>	Rakúsko, Ardning, Ardningalm	1030	3.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP48	<i>Octospora wrightii</i>	<i>Amblystegium serpens</i>	ČR, Praha, Botanická zahrada PŘF UK	210	21.2.2020	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP49	<i>Octosporella erythrostigma</i>	<i>Frullania dilatata</i>	Rakúsko, Weißenbach bei Liezen, Mosserkapelle	750	4.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP50	<i>Octosporella jungermanniarum</i>	<i>Chiloscyphus polyanthos</i>	Rakúsko, Liezen, Irenenweg	705	5.11.2019	LJ & LJ	LSU SSU
LJDP51	<i>Octosporella perforata</i>	<i>Porella platyphylla</i>	ČR, Srbsko, Na Pláních	285	31.12.2019	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP52	<i>Octosporopsis nicolai</i>	<i>Lunularia cruciata</i>	Španielsko, Córdoba, Jardín Botánico de Córdoba	95	20.2.2020	MV & MV	LSU SSU EF1- $\alpha$
LJDP53	<i>Lamprospora dictydiola</i>	<i>Tortula muralis</i>	ČR, Luka pod Medníkem, Dakota	215	9.3.2020	LJ & LJ	LSU SSU EF1- $\alpha$

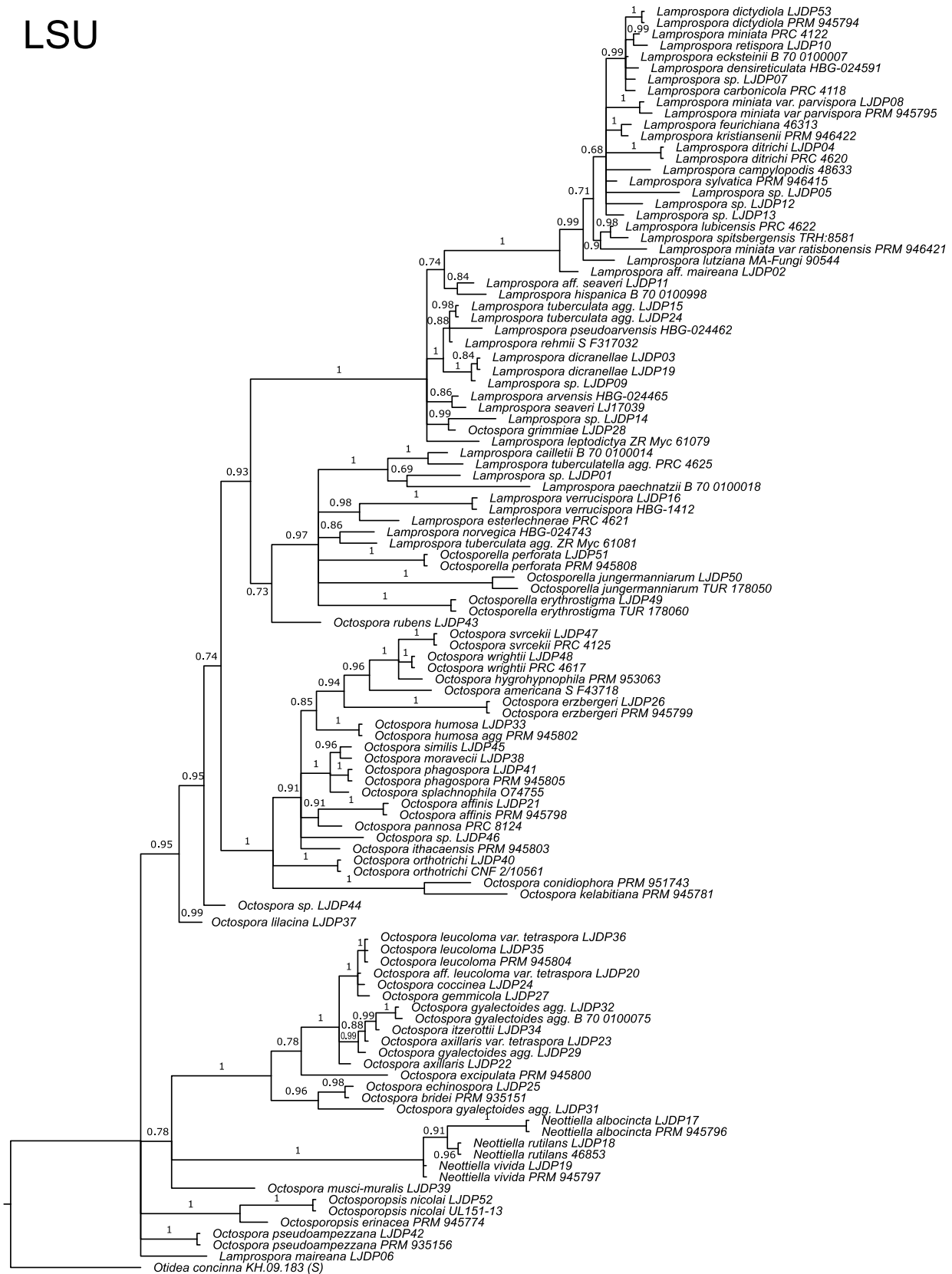
**Tabuľka P2** Zoznam druhov a sekvencií z databáze GenBank použitých vo fylogenetickej analýze.

Druh	Číslo zberu	Hostiteľ	Krajina zberu	Sekvencie zahrnuté do fylogenetickej analýzy			Publikácia
				LSU	SSU	EF1- $\alpha$	
<i>Lamprospora arvensis</i>	HBG-024465	<i>Ceratodon purpureus</i>	Nemecko	KY858950			Vega et al. (2017)
<i>Lamprospora cailletii</i>	B 70 0100014	<i>Tortella tortuosa</i>	Švajčiarsko	MN394604			
<i>Lamprospora campylopodis</i>	48633	<i>Campylopus pyriformis</i>	Nemecko	MF066054	MK569364	MK569289	Egertová et al. (2018b), Sochorová et al. (2019)
<i>Lamprospora carbonicola</i>	PRC 4118	<i>Funaria hygrometrica</i>	Česká republika	MH818440			Vega et al. (2019)
<i>Lamprospora densireticulata</i>	HBG-024591 (holotyp)	<i>Aloina ambigua</i>	Francúzsko	MH818451			Vega et al. (2019)
<i>Lamprospora dicranellae</i>	PRC 4619	<i>Ditrichum heteromallum</i>	Rakúsko	MT792686	MT792709	MT783995	
<i>Lamprospora dictydiola</i>	PRM 945794	<i>Tortula muralis</i>	Česká republika	MF754056	MK569365	MF754054	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Lamprospora ditrichi</i>	PRC 4620	<i>Ditrichum flexicaule</i>	Česká republika	MT792687	MT792710	MT783996	
<i>Lamprospora ecksteinii</i>	B 70 0100007	<i>Phascum curvicolle</i>	Nemecko	MT792688			
<i>Lamprospora esterlechnerae</i>	PRC 4621	<i>Dicranodontium denudatum</i>	Nemecko	MT792689			
<i>Lamprospora feurichiana</i>	46313	<i>Ceratodon purpureus</i>	Nórsko	MF066040			Egertová et al. (2018b)
<i>Lamprospora hispanica</i>	B 70 0100998	<i>Aloina aloides</i>	Španielsko	MN394607	MT792713	MT783998	
<i>Lamprospora kristiansenii</i>	PRM 946422	<i>Ceratodon purpureus</i>	Česká republika	MF066045			Egertová et al. (2018b)
<i>Lamprospora leptodictya</i>	ZT Myc 61079	<i>Aongstroemia longipes</i>	Švajčiarsko	MN394610	MT792714		
<i>Lamprospora lubicensis</i>	PRC 4622	<i>Henediella heimii</i>	Česká republika	MT792693	MT792715	MT783999	
<i>Lamprospora lutziana</i>	MA-Fungi 90544	<i>Philonotis fontana</i>	Španielsko	MN434188	MT792716	MT784000	Martínez-Gil et al. (2019)
<i>Lamprospora miniata</i>	PRC 4122	<i>Protobryum bryoides</i>	Slovensko	MH818444			Vega et al. (2019)
<i>Lamprospora miniata</i> var. <i>parvispora</i>	PRM 945795	<i>Barbula unguiculata</i>	Slovensko	MF066065	MK569366	MF754055	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Lamprospora miniata</i> var. <i>ratisbonensis</i>	PRM 946421	<i>Didymodon luridus</i>	Chorvátsko	MF066064			Egertová et al. (2018b)
<i>Lamprospora norvegica</i>	HBG-024743	<i>Ditrichum pusillum</i>	Švajčiarsko	MT792694	MT792717	MT784001	
<i>Lamprospora paechnatzii</i>	B 70 0100018	<i>Bryum</i> sp.	Nemecko	MN394613			
<i>Lamprospora pseudoarvensis</i>	HBG-024462 (holotyp)	<i>Pleuridium acuminatum</i>	Španielsko	NG 060353			Vega et al. (2017)
<i>Lamprospora rehmi</i>	S F317032 (epityp)	<i>Pleuridium acuminatum</i>	Španielsko	MH087070	MT792718		Vega et al. (2018)

<i>Lamprospora seaveri</i>	PRC 4581	<i>Ceratodon purpureus</i>	Čierna Hora	MT792695			
<i>Lamprospora spitsbergensis</i>	TRH:8581	<i>Hennediella heimii</i> var. <i>arctica</i>	Nórsko	MG949137			
<i>Lamprospora sylvatica</i>	PRM 946415 (holotyp)	<i>Dicranum montanum</i>	Ukrajina	MG947604	MK569367	MK569290	Egertová et al. (2018b), Sochorová et al. (2019)
<i>Lamprospora tuberculata</i> agg.	PRC 4624	<i>Pleuridium subulatum</i>	Slovensko	MT792703	MT792726	MT784008	
<i>Lamprospora tuberculata</i> agg.	ZT Myc 61081	<i>Pleuridium subulatum</i>	Švajčiarsko	MT792704	MT792727		
<i>Lamprospora tuberculatella</i> agg.	PRC 4625	cf. <i>Trichostomum crispulum</i>	Slovensko	MT792705	MT792728	MT784009	
<i>Lamprospora verrucispora</i>	HBG 1412 (holotyp)	<i>Campylopus pyriformis</i>	Nemecko	MN994551	MN994527	MN990993	
<i>Neottiella albocincta</i>	PRM 945796	<i>Atrichum undulatum</i>	Slovensko	MF754059			Egertová et al. (2018a)
<i>Neottiella rutilans</i>	46853	<i>Oligotrichum hercynicum</i>	Poľsko	MK569313	MK569336	MK569288	Sochorová et al. (2019)
<i>Neottiella vivida</i>	PRM 945797	<i>Polytrichum piliferum</i>	Česká republika	MF066068	MK569337	MF754051	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora affinis</i>	PRM 945798	<i>Orthotrichum affine</i>	Česká republika	MF754075	MK569347	MF754045	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora americana</i>	S F43718 (holotyp)	<i>Forsstroemia trichomitria</i>	USA	MN967346	MN994516	MT078729	
<i>Octospora bridei</i>	PRM 935151	<i>Ephemerum minutissimum</i>	Česká republika	MF754061	MT001890		Egertová et al. (2018a)
<i>Octospora excipulata</i>	PRM 945800	<i>Funaria hygrometrica</i>	Česká republika	MF754062	MK569369	MF754047	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora orthotrichi</i>	CNF 2/10561	<i>Orthotrichum diaphanum</i>	Chorvátsko	MK569314	MK569342	MK569311	Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora conidiophora</i>	PRM 951743 (holotyp)	<i>Trichosteleum perchlorosum</i>	Južná Afrika	MK569321	MK569351	MK569297	Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora erzbergeri</i>	PRM 945799	<i>Pseudoleskeella nervosa</i>	Česká republika	MF754068	MK569340	MF754042	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora gyalectoides</i> agg.	B 70 0100075	<i>Pottia lanceolata</i>	Nemecko	MT001891	MT001889	MN990995	
<i>Octospora humosa</i>	PRM 945802	<i>Polytrichum piliferum</i>	Česká republika	MF754074	MK569343	MF754043	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora hygrophynophila</i>	PRM 953063	<i>Hygrophynum luridum</i>	Francúzsko	MN994542	MN994522	MN990987	
<i>Octospora ithacaensis</i>	PRM 945803	<i>Marchantia polymorpha</i>	Česká republika	MF754071	MK569346		Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora kelabitiana</i>	PRM 945781	<i>Riccardia</i> sp.	Malajzia	MF754065	MK569372	MF754048	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora leucoloma</i>	PRM 945804	<i>Bryum argenteum</i>	Česká republika	MF754063	MK569370		Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora pannosa</i>	PRC 8124 (izotyp)	<i>Brachytheciastrum velutinum</i>	Nemecko	MN994529			

<i>Octospora phagospora</i>	PRM 945805	<i>Pohlia lutescens</i>	Nemecko	MF754072	MK569344	MF754046	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora pseudoampezzana</i>	PRM 935156	<i>Schistidium crassipilum</i>	Česká republika	MF754069	MK569339	MF754050	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octospora splachnophila</i>	O74755 (paratyp)	<i>Splachnum vasculosum</i>	Nórsko	MH886392			
<i>Octospora svrcekii</i>	PRC 4125	<i>Cratoneuron filicinum</i>	Slovensko	MN994537	MN994525	MN990991	
<i>Octospora wrightii</i>	PRC 4617	<i>Amblystegium serpens</i>	Česká republika	MN994534	MN994517	MN990994	
<i>Octosporella erythrostigma</i>	TUR 178060	<i>Frullania dilatata</i>	Dánsko	EU940108	EU940035		Stenroos et al. (2010)
<i>Octosporella jungermanniarum</i>	TUR 178050	<i>Plagiochila asplenioides</i>	Švajčiarsko	EU940133	EU940060		Stenroos et al. (2010)
<i>Octosporella perforata</i>	PRM 945808	<i>Porella platyphylla</i>	Česká republika	MF754060	MK569368	MF754052	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octosporopsis erinacea</i>	PRM 945774 (izotyp)	<i>Dumortiera hirsuta</i>	Malajzia	MF754057	MK569338	MF754041	Egertová et al. (2018a), Sochorová et al. (2019)
<i>Octosporopsis nicolai</i>	UL151-13	<i>Lunularia cruciata</i>	Nemecko	KF771033		KF771042	Lindemann et al. (2014)
<i>Otidea concinna</i>	KH.09.183 (S) (epityp)	-	Švédsko	NG 060279	NG 064990	KM823275	Hansen & Olariaga (2015), Schoch et al. (2012)



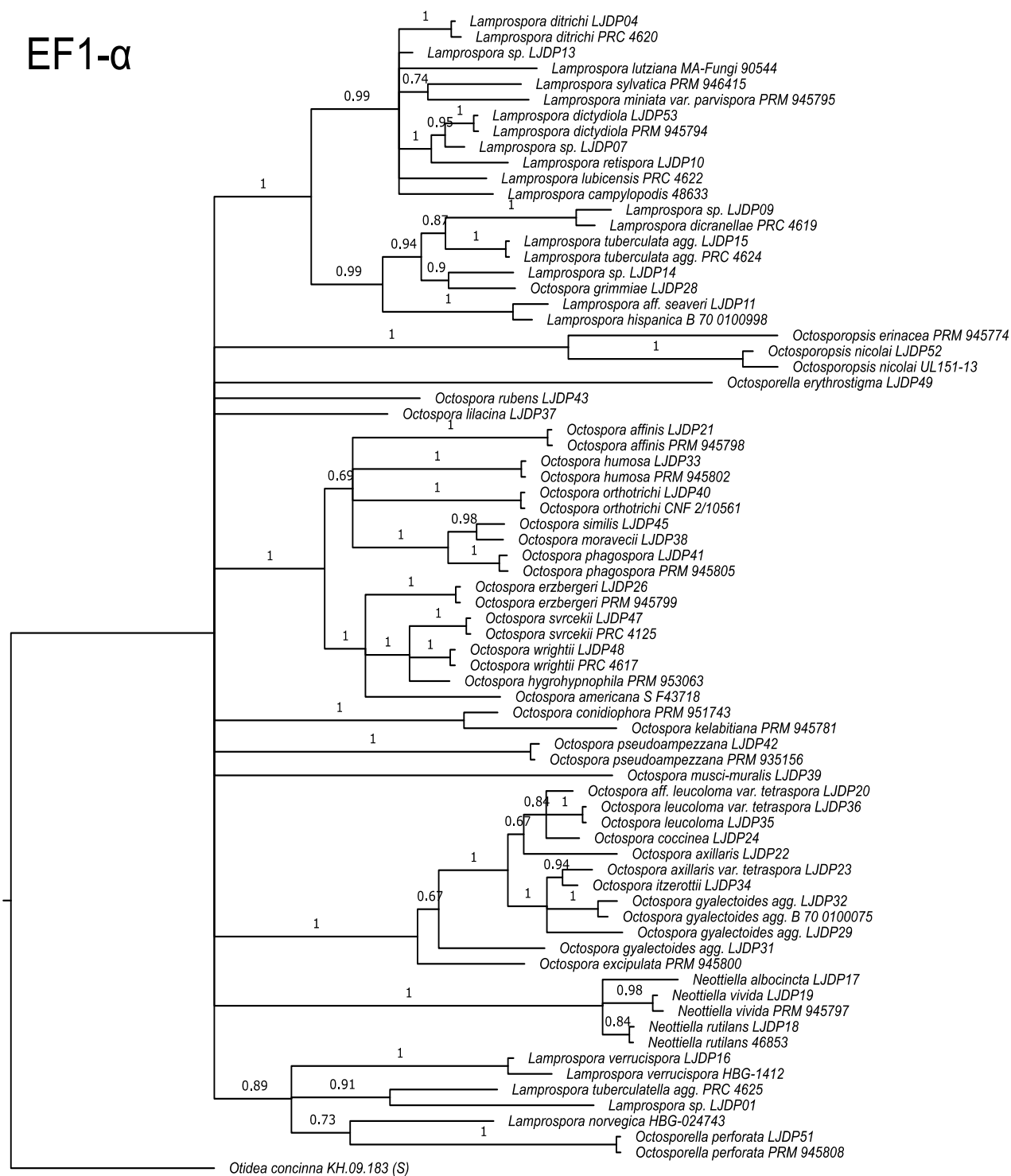


**Obrázok P3** Konsenzuálny fylogenetický strom bryofilných zástupcov radu Pezizales, vytvorený Bayesovskou analýzou úseku LSU. Hodnoty nad jednotlivými vetvami predstavujú štatistickú podporu – posteriornu pravdepodobnosť (BA). Detailné informácie o jednotlivých zberoch sú sumarizované v tab. P1 a tab. P2.



**Obrázok P4** Konsenzuálny fylogenetický strom bryofilných zástupcov radu Pezizales, vytvorený Bayesovskou analýzou úseku SSU. Hodnoty nad jednotlivými vetvami predstavujú štatistickú podporu – posteriornu pravdepodobnosť. Detailné informácie o jednotlivých zberoch sú sumarizované v tab. P1 a tab. P2.

EF1- $\alpha$



**Obrázok P5** Konsenzuálny fylogenetický strom bryofilných zástupcov radu Pezizales, vytvorený Bayesovskou analýzou úseku EF1- $\alpha$ . Hodnoty nad jednotlivými vetvami predstavujú štatistickú podporu – posteriornu pravdepodobnosť. Detailné informácie o jednotlivých zberoch sú sumarizované v tab. P1 a tab. P2.

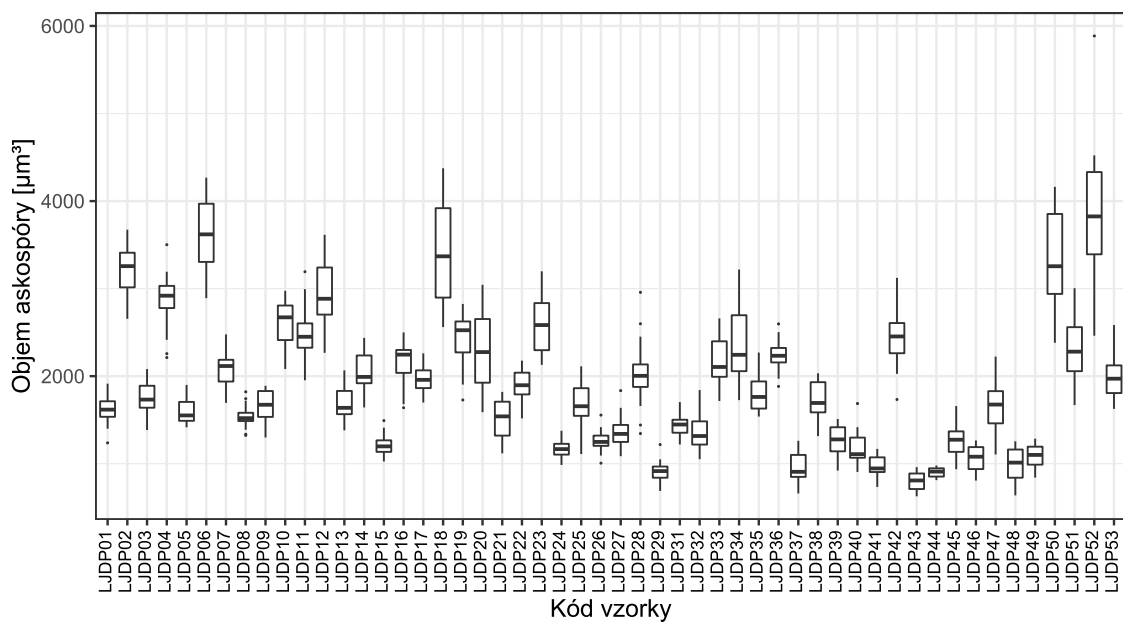
**Tabuľka P6** Klasifikácia ekologických charakteristík machorastov a delenie na životné formy použité v práci Dierßen (2001). Hodnoty na stupnici na ktorú som pôvodnú ordinálnu stupnicu previedol sú uvedené vedľa originálnych kategórií. Názvy životných foriem uvádzam v pôvodnom znení.

Ekologická charakteristika	Hodnota na použitej stupnici	Ekologická charakteristika	Hodnota na použitej stupnici	Životná forma	Kódové označenie
<b>pH prostredia (rozpätie hodnôt pH)</b>		<b>Množstvo svetla</b>		<i>fugitives</i>	f
e acidofyt (<3,3)	1	h sciofyt	1	<i>annual shuttle</i>	a
h acidofyt (3,4 – 4)	2	c sciofyt	2	<i>colonists</i>	c
c acidofyt (4,1 – 4,8)	3	m sciofyt	3	<i>ephemeral colonists</i>	ce
m acidofyt (4,9 – 5,6)	4	m fotofyt	4	<i>pioneer colonists</i>	cp
subneutrofyt (5,7 – 7(7,5))	5	c fotofyt	5	<i>short-lived shuttle</i>	s
bazifyt (>7)	6	h fotofyt	6	<i>geophyte</i>	g
<b>Vlhkosť prostredia</b>		<b>Tolerancia k vysokým teplotám</b>		<i>perennials</i>	p
h xerofyt	1	h kryofyt	1	<i>competitive perennials</i>	pc
c xerofyt	2	c kryofyt	2	<i>stress tolerant perennials</i>	ps
m xerofyt	3	m kryofyt	3	<i>long-lived shuttle</i>	l
mezofyt	4	mezotermofyt	4	<i>dominant</i>	d
m hygroyt	5	m termofyt	5		
c hygroyt	6	c termofyt	6		
h hygroyt	7	h termofyt	7		
e hygroyt	8				

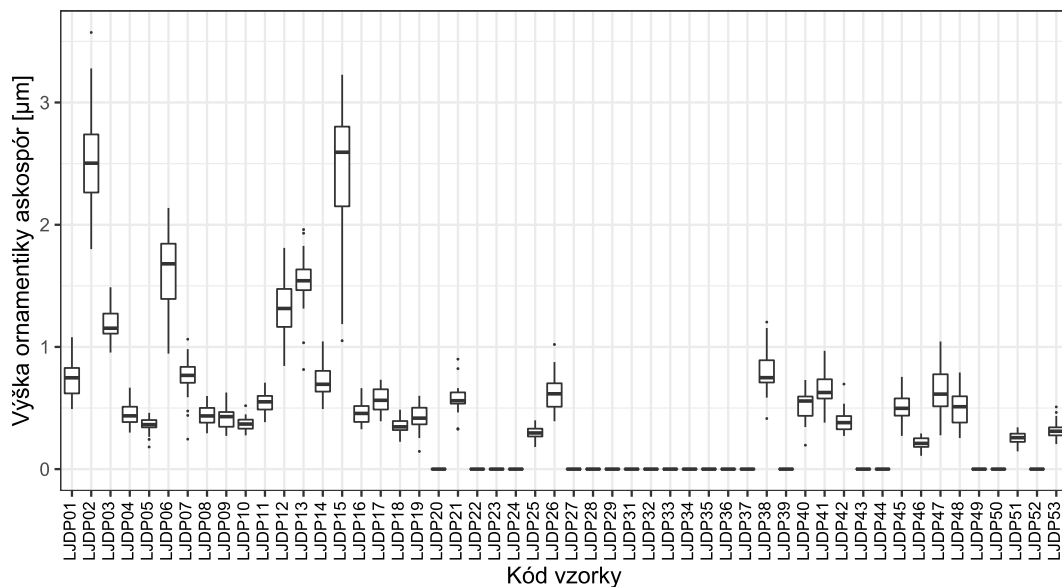
**Tabuľka P7** Hostiteľské machorasty, ich ekologické charakteristiky a miesto pripojenia infekčného aparátu u sledovaných bryofilných zástupcov radu Pezizales

Kód vzorky	Druh	Hostiteľ	Prevažujúce miesto infekcie	pH (rozsah)	Vlhkosť (rozsah)	Množstvo svetla (rozsah)	Tepelná rovnováha (rozsah)	Životná forma (pôvodné kategórie)
LJDP01	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Trichostomum crispulum</i>	rhizoidy	6	2 – 4	3 – 6	4 – 6	c
LJDP02	<i>Lamprospora</i> aff. <i>maireana</i>	<i>Archidium alternifolium</i>	rhizoidy	4 – 5	3 – 5	5	4 – 7	s
LJDP03	<i>Lamprospora dicranellae</i>	<i>Ditrichum heteromallum</i>	rhizoidy	3	4 – 5	5		c
LJDP04	<i>Lamprospora ditrichi</i>	<i>Ditrichum flexicaule</i>	rhizoidy	5 – 6	2 – 4	6		c
LJDP05	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Bryum</i> cf. <i>pallens</i>	rhizoidy	4 – 5	6	4 – 6	2 – 4	s
LJDP06	<i>Lamprospora maireana</i>	<i>Fossombronia caespitiformis</i>	rhizoidy, spodná strana stielky	3 – 6	2 – 4	4	5 – 6	a
LJDP07	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Tortula acaulon</i>	rhizoidy	4 – 5	4	5 – 6	5	a
LJDP08	<i>Lamprospora miniata</i> var. <i>parvispora</i>	<i>Barbula unguiculata</i>	rhizoidy	4 – 5	2 – 5	5 – 6	3 – 5	c
LJDP09	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Ditrichum</i> cf. <i>pusillum</i>	rhizoidy	4	4	5 – 6		c
LJDP10	<i>Lamprospora retispora</i>	<i>Syntrichia ruralis</i>	rhizoidy	5 – 6	2 – 3	4 – 5	4 – 6	c
LJDP11	<i>Lamprospora</i> aff. <i>seaveri</i>	<i>Bryum dichotomum</i>	rhizoidy	5 – 6	3 – 4	5 – 6	4 – 6	cp
LJDP12	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Pohlia</i> cf. <i>annotina</i>	rhizoidy	3 – 5	3 – 5	2 – 5	3 – 5	cp
LJDP13	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Dicranella howei</i>	rhizoidy	6	2	5 – 6	5 – 6	c
LJDP14	<i>Lamprospora</i> sp.	<i>Ditrichum heteromallum</i>	rhizoidy	3	4 – 5	5		c
LJDP15	<i>Lamprospora tuberculata</i> agg.	<i>Pleuroidium subulatum</i>	rhizoidy	5	5	4 – 5	4 – 5	a
LJDP16	<i>Lamprospora verrucispora</i>	<i>Campylopus flexuosus</i>	rhizoidy	1 – 3	4 – 6	3 – 6	4	c
LJDP17	<i>Neottiella albocincta</i>	<i>Atrichum undulatum</i>	rhizoidy	2 – 4	4 – 5	2 – 4		s
LJDP18	<i>Neottiella rutilans</i>	<i>Oligotrichum hercynicum</i>	rhizoidy	2 – 3	4 – 5	6	2 – 4	cp
LJDP19	<i>Neottiella vivida</i>	<i>Polytrichum piliferum</i>	rhizoidy	2 – 5	1 – 3	5 – 6	1 – 6	ps
LJDP20	<i>Octospora</i> aff. <i>leucoloma</i> var. <i>tetraspora</i>	<i>Bryum</i> sp.	palístky, pabyľky					
LJDP21	<i>Octospora affinis</i>	<i>Orthotrichum affine</i>	rhizoidy	4 – 5	3 – 4	3 – 6	4 – 6	c
LJDP22	<i>Octospora axillaris</i>	<i>Tortula acaulon</i>	palístky, pabyľky	4 – 5	4	5 – 6	5	a
LJDP23	<i>Octospora axillaris</i> var. <i>tetraspora</i>	<i>Tortula acaulon</i>	palístky, pabyľky	4 – 5	4	5 – 6	5	a
LJDP24	<i>Octospora coccinea</i>	<i>Bryum</i> cf. <i>klingsraeffii</i>	palístky, pabyľky	5 – 6	5 – 6	6	5	ce
LJDP25	<i>Octospora echinospora</i>	<i>Ephemerum stoloniferum</i>	rhizoidy, protonéma	4 – 5	4 – 5	5	4	a
LJDP26	<i>Octospora erzbergeri</i>	<i>Pseudoleskeella nervosa</i>	rhizoidy	4 – 6	3 – 4	5	2 – 6	ps

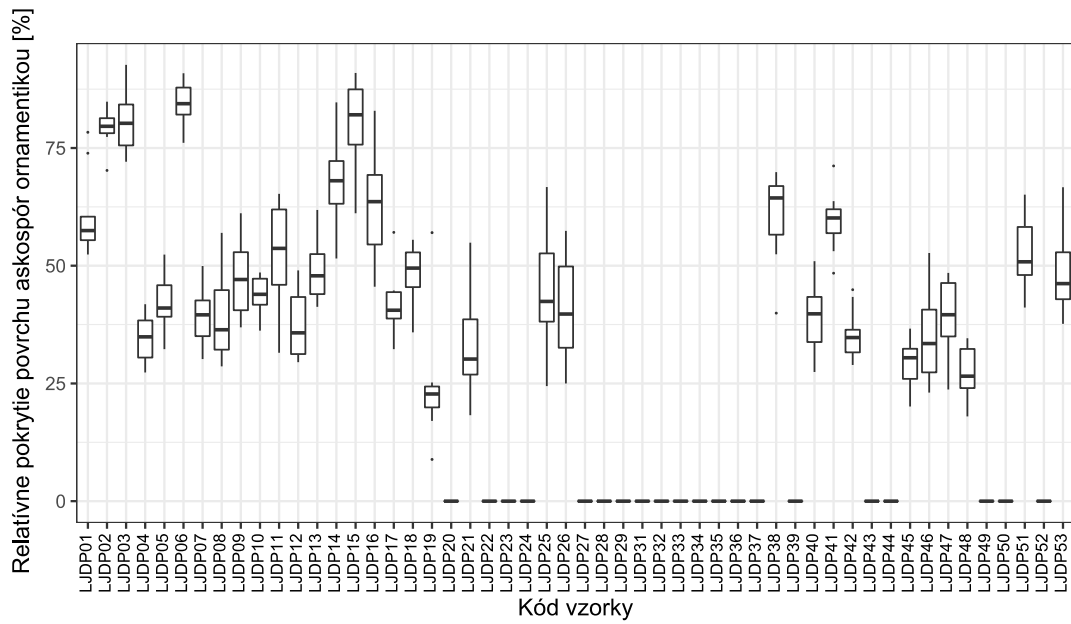
LJDP27	<i>Octospora gemmicola</i>	<i>Bryum cf. radiculosum</i>	palístky, pabyľky	6	3	4 – 6	5 – 6	ce
LJDP28	<i>Octospora grimmiae</i>	<i>Grimmia pulvinata</i>	palístky, pabyľky	4 – 6	1 – 3	4 – 6	4 – 6	c
LJDP29	<i>Octospora gyalectoides</i> agg.	<i>Dicranella varia</i>	pabyľky	6	5 – 6	4 – 6	3 – 5	ce
LJDP31	<i>Octospora gyalectoides</i> agg.	<i>Tortella inclinata</i>	palístky, pabyľky	6	1 – 2	5 – 6	3 – 5	c
LJDP32	<i>Octospora gyalectoides</i> agg.	<i>Tortula cf. acaulon</i>	palístky, pabyľky	4 – 5	4	5 – 6	5	a
LJDP33	<i>Octospora humosa</i>	<i>Polytrichum piliferum</i>	rhizoidy	2 – 5	1 – 3	5 – 6	1 – 6	ps
LJDP34	<i>Octospora itzerottii</i>	<i>Pterygoneurum ovatum</i>	palístky, pabyľky, rhizoidy	6	1 – 2	6	6 – 7	a
LJDP35	<i>Octospora leucoloma</i>	<i>Bryum argenteum</i>	rhizoidy	5	2 – 4	5 – 6	3 – 6	c
LJDP36	<i>Octospora leucoloma</i> var. <i>tetraspora</i>	<i>Bryum argenteum</i>	rhizoidy, pabyľky	5	2 – 4	5 – 6	3 – 6	c
LJDP37	<i>Octospora lilacina</i>	<i>Dicranella heteromalla</i>	protonéma, rhizoidy	2 – 4	4	3 – 4	4 – 5	c
LJDP38	<i>Octospora moravecii</i>	<i>Pohlia nutans</i>	rhizoidy	2 – 5	3 – 5	3 – 6	2 – 5	cp
LJDP39	<i>Octospora musci-muralis</i>	<i>Grimmia pulvinata</i>	rhizoidy	4 – 6	1 – 3	4 – 6	4 – 6	c
LJDP40	<i>Octospora orthotrichi</i>	<i>Orthotrichum diaphanum</i>	rhizoidy	5 – 6	2 – 3	5 – 6	6 – 7	c
LJDP41	<i>Octospora phagospora</i>	<i>Pohlia lutescens</i>	rhizoidy	3	4 – 5	3	4	c
LJDP42	<i>Octospora pseudoampezzana</i>	<i>Schistidium crassipilum</i>	rhizoidy	6	2 – 4	3 – 6	6	c
LJDP43	<i>Octospora rubens</i>	<i>Ceratodon purpureus</i>	rhizoidy	4 – 5	2 – 4	6	2 – 6	c
LJDP44	<i>Octospora</i> sp.	<i>Ditrichum cf. pusillum</i>	rhizoidy	4	4	5 – 6		c
LJDP45	<i>Octospora similis</i>	<i>Bryum cf. rubens</i>	rhizoidy	4 – 6	4	6	5 – 6	ce
LJDP46	<i>Octospora</i> sp.	<i>Ditrichum flexicaule</i>	rhizoidy	5 – 6	2 – 4	6		c
LJDP47	<i>Octospora svrcekii</i>	<i>Cratoneuron filicinum</i>	rhizoidy	6	6 – 7	6	3 – 4	pc
LJDP48	<i>Octospora wrightii</i>	<i>Amblystegium serpens</i>	rhizoidy	3 – 5	3 – 5	2 – 4		p
LJDP49	<i>Octosporella erythrostigma</i>	<i>Frullania dilatata</i>	palístky, pabyľky	2 – 5	3 – 5	3 – 4	4	p
LJDP50	<i>Octosporella jungermanniarum</i>	<i>Chiloscyphus polyanthos</i>	palístky, pabyľky	4 – 5	5 – 7	2 – 4	4	pc
LJDP51	<i>Octosporella perforata</i>	<i>Porella platyphylla</i>	palístky, pabyľky	4 – 6	3 – 4	1 – 4	4 – 5	ps
LJDP52	<i>Octosporopsis nicolai</i>	<i>Lumularia cruciata</i>	spodná strana stielky	5 – 6	2 – 4	2 – 4	5	p
LJDP53	<i>Lamprospora dictydiola</i>	<i>Tortula muralis</i>	rhizoidy	5 – 6	2 – 4	3 – 6	4 – 6	c



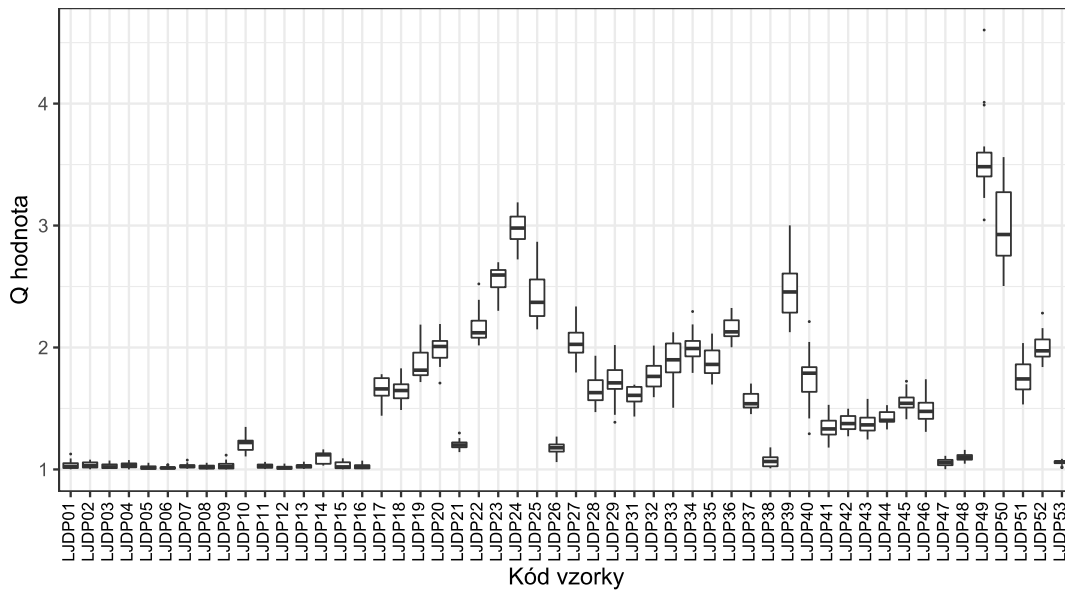
**Obrázok P8** Objem askospór u všetkých sledovaných druhov bryofilných Pezizales.



**Obrázok P9** Výška ornamentiky askospór u všetkých sledovaných druhov bryofilných Pezizales.



**Obrázok P10** Relatívne pokrytie povrchu askospór ornamentikou u všetkých sledovaných druhov bryofilných Pezizales.



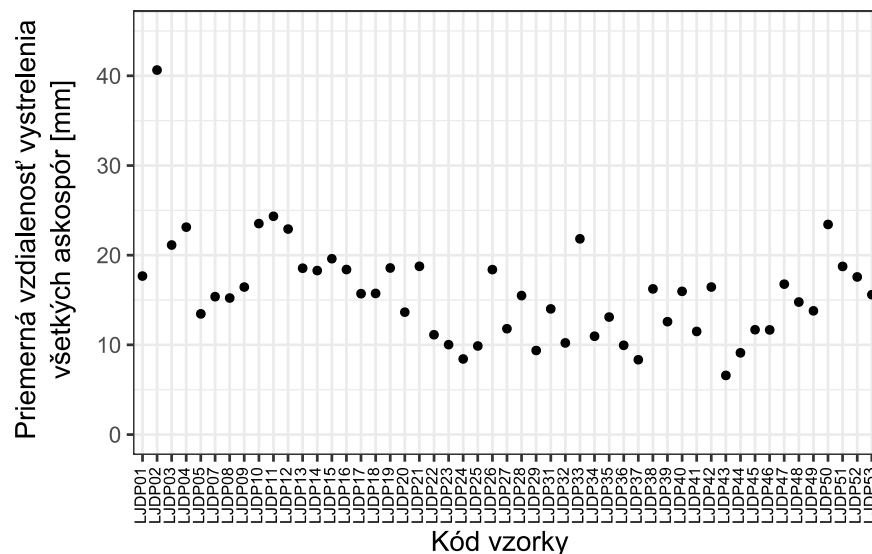
**Obrázok P11** Q hodnota – pomer dĺžky a šírky askospóry u všetkých sledovaných druhov bryofilných Pezizales.



**Tabuľka P12** Výsledky jednotlivých meraní veľkosti genómu prietokovou cytometriou pri použití externej a internej štandardizácie. Veľkosť genómu po korekcii vyjadruje priemernú veľkosť genómu meraní s použitím externej štandardizácie korigovaných podľa vzorca modelu z tab. 4, kvôli vplyvu štandardu na farbenie. Hodnoty z meraní mrazených vzoriek sú označené „\*\*“, hodnoty meraní u ktorých nebola rozlíšiteľná populácia 1C jadier a uvedená veľkosť genómu predstavuje polovicu veľkosti 2C jadier sú označené „<sup>2C</sup>“.

Kód zberu	Druh	Externá štandardizácia								Interná štandardizácia		Veľkosť genómu po korekcii [Mbp]
		Veľkosť genómu [Mbp]				Variačný koeficient CV [%]				Veľkosť genómu [Mbp]	Variačný koeficient CV [%]	
		Meranie č.1	Meranie č.2	Meranie č.3	Priemer	Meranie č.1	Meranie č.2	Meranie č.3	Priemer			
LJDP01	<i>Lamprospora</i> sp.	222,1	231,7	239,5	<b>231,1</b>	18,7	7,2	9,1	<b>11,7</b>			<b>197,9</b>
LJDP02	<i>Lamprospora</i> aff. <i>maireana</i>	369,2	351,2		<b>360,2</b>	10,4	7		<b>8,7</b>			<b>308,1</b>
LJDP03	<i>Lamprospora</i> <i>dicranellae</i>	471,1	505,7	526,8	<b>501,2</b>	8	6,6	6,4	<b>7</b>			<b>428,3</b>
LJDP04	<i>Lamprospora</i> <i>ditrichi</i>	286,9	303,5	271,9	<b>287,4</b>	8,5	7,9	9,2	<b>8,5</b>			<b>246</b>
LJDP05	<i>Lamprospora</i> sp.	274,9	252,4	280,1	<b>269,1</b>	8,2	9,7	10,3	<b>9,4</b>			<b>230,4</b>
LJDP06	<i>Lamprospora</i> <i>maireana</i>	1459,5	1416,8*		<b>1459,5</b>	5,9	7		<b>6,4</b>			<b>1243,5</b>
LJDP07	<i>Lamprospora</i> sp.	294,9	290,6	293,9	<b>293,1</b>	10,3	10,4	11,7	<b>10,8</b>	253,6	8,6	<b>250,9</b>
LJDP08	<i>Lamprospora</i> <i>miniata</i> var. <i>parvispora</i>	241,3	275	259,8	<b>258,7</b>	5,6	9,9	9,1	<b>8,2</b>			<b>221,5</b>
LJDP09	<i>Lamprospora</i> sp.	369,3	365,3	363,8	<b>366,1</b>	7,7	5,4	6,9	<b>6,7</b>			<b>313,1</b>
LJDP10	<i>Lamprospora</i> <i>retispora</i>	300	300,6	297,1	<b>299,3</b>	12,6	13,8	12,5	<b>13</b>			<b>256,1</b>
LJDP11	<i>Lamprospora</i> aff. <i>seaveri</i>	701,4	883	723,1	<b>769,2</b>	4,4	5,8	3,9	<b>4,7</b>	664,6	9,9	<b>656,5</b>
LJDP12	<i>Lamprospora</i> sp.	337	344,1		<b>340,6</b>	9,7	8,1		<b>8,9</b>			<b>291,3</b>
LJDP13	<i>Lamprospora</i> sp.	213	221,5	208,2 <sup>2C</sup>	<b>217,2</b>	10,3	11,8	9,3	<b>10,5</b>			<b>186,1</b>
LJDP14	<i>Lamprospora</i> sp.	212,3	235,9	241,9	<b>230</b>	6	9,4	9,6	<b>8,3</b>			<b>197</b>
LJDP15	<i>Lamprospora</i> <i>tuberculata</i> agg.	270,6	267,1	268,8	<b>268,9</b>	7,7	6,3	9	<b>7,7</b>	256,7 <sup>2C</sup>	6,6	<b>230,1</b>
LJDP16	<i>Lamprospora</i> <i>verrucispora</i>	438,5	391,2	384,0*	<b>414,8</b>	5,8	6,4	9,9	<b>7,4</b>			<b>354,7</b>
LJDP17	<i>Neottiella</i> <i>albocincta</i>	3023,3	3133,4	3032	<b>3062,9</b>	3,2	3,5	4,8	<b>3,8</b>	2590	4	<b>2604,2</b>
LJDP18	<i>Neottiella</i> <i>rutilans</i>	1511,6	1491	1656	<b>1552,9</b>	7	8,8	11,3	<b>9</b>			<b>1322,8</b>
LJDP19	<i>Neottiella</i> <i>vivida</i>	2984,6	3198,3		<b>3091,5</b>	3,4	4,6		<b>4</b>			<b>2628,4</b>
LJDP20	<i>Octospora</i> aff. <i>leucoloma</i> var. <i>tetraspora</i>	304,5	304,9	308,1	<b>305,8</b>	9,4	8,5	12,6	<b>10,2</b>			<b>261,7</b>
LJDP21	<i>Octospora</i> <i>affinis</i>	322,4	338,7	323,4	<b>328,2</b>	7,2	8,6	10,5	<b>8,8</b>			<b>280,8</b>
LJDP22	<i>Octospora</i> <i>axillaris</i>	241,1	247,1	245,4	<b>244,5</b>	5,3	8,1	9,2	<b>7,5</b>	195,6 <sup>2C</sup>	6,5	<b>209,3</b>
LJDP23	<i>Octospora</i> <i>axillaris</i> var. <i>tetraspora</i>	391,4	398,5	388,1	<b>392,7</b>	10,6	11,4	11,9	<b>11,3</b>			<b>335,8</b>
LJDP24	<i>Octospora</i> <i>coccinea</i>	197,3	194,9	197,4	<b>196,5</b>	11,5	11	9,5	<b>10,7</b>			<b>168,4</b>

<b>LJDP25</b>	<i>Octospora echinospora</i>	247,3	247,4	235,5	<b>243,4</b>	9,4	9,6	9,3	<b>9,5</b>	254,9 <sup>2C</sup>	8,3	<b>208,4</b>
<b>LJDP26</b>	<i>Octospora erzbergeri</i>	282,1	283,3	285,9	<b>283,7</b>	11,5	9,9	11,7	<b>11</b>			<b>242,8</b>
<b>LJDP27</b>	<i>Octospora gemmicola</i>	204,9	197,3	207,3	<b>203,1</b>	6,2	8,1	7,2	<b>7,2</b>	179,2 <sup>2C</sup>	5,8	<b>174</b>
<b>LJDP28</b>	<i>Octospora grimmiae</i>	498	512,9	496,6 <sup>2C</sup>	<b>505,5</b>	7,5	4,6	7,2	<b>6,4</b>	449,2 <sup>2C</sup>	5,7	<b>431,9</b>
<b>LJDP29</b>	<i>Octospora gyalectoides</i> agg.	255,5	256	266,8	<b>259,5</b>	7,9	15,8	9,5	<b>11,1</b>			<b>222,1</b>
<b>LJDP31</b>	<i>Octospora gyalectoides</i> agg.	1092,2	1037,6	1044,9	<b>1058,2</b>	6,7	6	8,3	<b>7</b>			<b>902,4</b>
<b>LJDP32</b>	<i>Octospora gyalectoides</i> agg.	280	262,4	264,3	<b>268,9</b>	9	9	10,4	<b>9,5</b>			<b>230,2</b>
<b>LJDP33</b>	<i>Octospora humosa</i>	599,5	590,1	611,2	<b>600,3</b>	4,5	5,4	5,7	<b>5,2</b>	490	8,4	<b>512,7</b>
<b>LJDP34</b>	<i>Octospora itzerottii</i>	240,9	269	257,5	<b>255,8</b>	9,5	10,2	8,6	<b>9,4</b>	207,8	8,4	<b>219</b>
<b>LJDP35</b>	<i>Octospora leucoloma</i>	456,6	452,7	457,8	<b>455,7</b>	4,4	3,5	8	<b>5,3</b>	352,9	6,7	<b>389,5</b>
<b>LJDP36</b>	<i>Octospora leucoloma</i> var. <i>tetraspora</i>	334,1	334,5	335	<b>334,5</b>	8,7	8,8	6,2	<b>7,9</b>			<b>286,2</b>
<b>LJDP37</b>	<i>Octospora lilacina</i>	203,2	216,8	213,1	<b>211</b>	10,4	7,6	9,4	<b>9,1</b>			<b>180,8</b>
<b>LJDP38</b>	<i>Octospora moravecii</i>	428,8	452,3*		<b>428,8</b>	5,2	9,2		<b>7,2</b>			<b>366,5</b>
<b>LJDP39</b>	<i>Octospora musci-muralis</i>	172,7	157	169,8 <sup>2C</sup>	<b>164,8</b>	9,8	10,5	11,1	<b>10,5</b>	129,1 <sup>2C</sup>	10,1	<b>141,3</b>
<b>LJDP40</b>	<i>Octospora orthotrichi</i>	236,1	231,6	236,5	<b>234,8</b>	11,7	14	13,4	<b>13</b>			<b>201</b>
<b>LJDP41</b>	<i>Octospora phagospora</i>	288,3	279,4	281,7	<b>283,1</b>	6,7	8,8	8,8	<b>8,1</b>			<b>242,3</b>
<b>LJDP42</b>	<i>Octospora pseudoampezzana</i>	274,5	251,8	244,8	<b>257</b>	12,4	6,7	9,8	<b>9,6</b>	229	15,3	<b>220</b>
<b>LJDP43</b>	<i>Octospora rubens</i>	226,8	228,4	224,6	<b>226,6</b>	8,4	7,5	7,9	<b>7,9</b>			<b>194</b>
<b>LJDP44</b>	<i>Octospora</i> sp.	266	252,4	228,2	<b>248,9</b>	8,7	11	8,2	<b>9,3</b>			<b>213,1</b>
<b>LJDP45</b>	<i>Octospora similis</i>	449,4	444	454	<b>449,1</b>	10,6	10	7,9	<b>9,5</b>			<b>383,9</b>
<b>LJDP46</b>	<i>Octospora</i> sp.	307,1	295,7	294,7	<b>299,2</b>	8,1	7,6	7,6	<b>7,8</b>	240,2	6,5	<b>256</b>
<b>LJDP47</b>	<i>Octospora svrcekii</i>	454,1	471,2	460,4	<b>461,9</b>	10,7	10,3	9,9	<b>10,3</b>			<b>394,8</b>
<b>LJDP48</b>	<i>Octospora wrightii</i>	346,6	347,7	347,3	<b>347,2</b>	9,5	8,8	8,7	<b>9</b>	296,0 <sup>2C</sup>	6,7	<b>297</b>
<b>LJDP49</b>	<i>Octosporella erythrostigma</i>	106,5	106,5	112	<b>108,3</b>	21,3	15,1	13,4	<b>16,6</b>			<b>93</b>
<b>LJDP50</b>	<i>Octosporella jungermanniarum</i>	218,3	229,8	221,2	<b>223,1</b>	12,4	10,1	15,7	<b>12,7</b>			<b>191,1</b>
<b>LJDP51</b>	<i>Octosporella perforata</i>	136,5	121,6	118	<b>125,4</b>	11,9	9,3	22,1	<b>14,4</b>	101,9	14,1	<b>107,5</b>
<b>LJDP52</b>	<i>Octosporopsis nicolai</i>	251,2	268,4	281,6	<b>267,1</b>	5,7	7,9	6,4	<b>6,7</b>	244,9	7,8	<b>228,6</b>
<b>LJDP53</b>	<i>Lamprospora dictydiola</i>	263,7	278,1	279,7	<b>273,8</b>	8,2	11,9	11,1	<b>10,4</b>	228,4	9,2	<b>234,4</b>



**Obrázok P13** Priemerná vzdialenosť, do akej boli vystrelené všetky askospóry (vrátane askospór v klastroch) u sledovaných druhov bryofilných Pezizales. Jednotlivé druhy sú označené ich kódom vzorky.

**Tabuľka P14** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných morfológických charakteristík na priemernú vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór po odstránení odľahlej hodnoty u druhu LJDP02, lambda = 0 (95% konfidenčný interval ? – 0,784), N = 49.

vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór ~ objem askospóry + výška ornamentiky + pokrytie askospór ornamentikou + Q hodnota						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
objem askospóry	1	363293701	363293701	43.6955	<0.00001	***
výška ornamentiky	1	92873616	92873616	11.1705	0.0017	**
pokrytie askospór ornamentikou	1	223160	223160	0.0268	0.8706	
Q hodnota	1	485500	485500	0.0584	0.8102	
Reziduály	44	365825509	8314216			

**Tabuľka P15** Výsledky finálneho PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných morfológických charakteristík na priemernú vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór po odstránení odľahlej hodnoty u druhu LJDP02, lambda = 0 (95% konfidenčný interval ? – 0,516), N = 49.

vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór ~ objem askospóry (bez ornamentiky) + výška ornamentiky						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
objem askospóry	1	364845008	364845008	45,8085	<0,00001	***
výška ornamentiky	1	91486294	91486294	11,4867	0,0014	**
Reziduály	46	366370184	7964569			

**Tabuľka P16** Výsledky celkového PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných morfológických charakteristík na priemernú vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór po odstránení odľahlej hodnoty u druhu LJDP02,  $\lambda = 0$  (95% konfidenčný interval ? – 0,777), N = 49.

vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór ~ celkový objem askospóry (pri započítaní ornamentiky) + typ ornamentiky + výška ornamentiky + pokrytie askospór ornamentikou + Q hodnota						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
celkový objem askospóry (pri započítaní ornamentiky)	1	456535859	456535859	56.0759	<0.00001	***
výška ornamentiky	1	6124758	6124758	0.7523	0.3905	
pokrytie askospór ornamentikou	1	37351	37351	0.0046	0.9463	
Q hodnota	1	1782397	1782397	0.2189	0.6422	
Reziduály	44	358221122	8141389			

**Tabuľka P17** Výsledky finálneho PGLS modelu testujúceho vplyv vybraných morfológických charakteristík na priemernú vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór po odstránení odľahlej hodnoty u druhu LJDP02,  $\lambda = 0,066$  (95% konfidenčný interval ? – 0,597), N = 49.

vzdialenosť vystrelenia samostatných askospór ~ celkový objem askospóry (pri započítaní ornamentiky)						
Prediktory	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F hodnota	p hodnota	
celkový objem askospóry (pri započítaní ornamentiky)	1	430013815	430013815	55,2437	<0,00001	***
Reziduály	47	365845090	7783938			