

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

KATONA SZABINA

**MOSONMAGYARÓVÁR
2020**

SZÉCHENYI ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
MOSONMAGYARÓVÁR
Növénytudományi Tanszék

Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi
Multidiszciplináris Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Ördög Vince egyetemi
tanár, az MTA doktora

Készült a „Haberlandt Gottlieb Növénytudományi Doktori Program”
keretében

Programvezető: Prof. Dr. Ördög Vince egyetemi tanár, az MTA
doktora

Témavezetők:

Prof. Dr. Ördög Vince egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. habil. Molnár Zoltán, PhD, egyetemi docens

**A MOSONMAGYARÓVÁRI ALGAGYÚJTEMÉNY (MACC)
KORÁBBAN ALAKTANI SZEMPONTBÓL
CHLAMYDOMONAS (CHLOROPHYTA,
CHLAMYDOMONADACEAE) NEMZETSÉGBE SOROLT
TÖRZSEINEK TAXONÓMIAI ÚJRAÉRTÉKELÉSE
MOLEKULÁRIS ADATOK FELHASZNÁLÁSÁVAL, ÉS
EGYES *CHLAMYDOMONAS* TÖRZSEK
EXTRACELLULÁRIS POLISZACHARID (EPS)
TERMELÉSÉNEK JELLEMZÉSE.**

Készítette: Katona Szabina
Mosonmagyaróvár
2020

**A MOSONMAGYARÓVÁRI ALGAGYŰJTEMÉNY (MACC) KORÁBBAN
ALAKTANI SZEMPONTBÓL *CHLAMYDOMONAS* (CHLOROPHYTA,
CHLAMYDOMONADACEAE) NEMZETSÉGBE SOROLT TÖRZSEINEK
TAXONÓMIAI ÚJRAÉRTÉKELÉSE MOLEKULÁRIS ADATOK
FELHASZNÁLÁSÁVAL, ÉS EGYES *CHLAMYDOMONAS* TÖRZSEK
EXTRACELLULÁRIS POLISZACHARID (EPS) TERMELÉSÉNEK
JELLEMZÉSE.**

Írta: Katona Szabina

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerésére

Készült a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és
Élelmiszertudományi Kar, Wittmann Antal Növény-, Állat- és
Élelmiszertudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola,
Haberlandt Gottlieb Növénytudományi Doktori program keretében

Témavezetők:

Prof. Dr. Ördög Vince, egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. habil. Molnár Zoltán, PhD, egyetemi docens

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton.....% -ot ért el,

Mosonmagyaróvár,.....

a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen /nem)

Bíráló neve: Dr. igen /nem

(aláírás)

Bíráló neve: Dr. igen /nem

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján.....% - ot ért el

Mosonmagyaróvár,.....

a Bírálóbizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

Az EDT elnöke

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
KIVONAT	9
ABSTRACT	12
1. BEVEZETÉS	15
2. CÉLKITŰZÉS	17
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	18
3.1. A <i>Chlamydomonas</i> nemzetség helye az algák rendszerében.....	20
3.2. A <i>Chlamydomonas</i> nemzetség jellemzése.....	21
3.3. A <i>Chlamydomonas</i> taxonok filogenetikai kutatására használt gének	25
3.4. <i>Chlamydomonas</i> -hoz hasonló nemzetségek, filogenetikai csoportok morfológiai jellemzői	28
3.5. Kihívások a <i>Chlamydomonas</i> taxonok rendszerezésében	33
3.6. A polifázikus megközelítés	34
3.7. A <i>Chlamydomonas</i> nemzetség algáinak biotechnológiai kutatása	35
3.7.1.Élettani kutatások <i>Chlamydomonas</i> fajokkal.....	35
3.7.2. A biodízel-, a biogáz- és a hidrogéntermelés lehetőségei.....	37
3.7.3. A mezőgazdasági alkalmazás lehetőségei	39
3.8. Extracelluláris poliszacharidok (EPS) és meghatározásuk.....	41
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	46
4.1. Taxonómiai újraértékelés molekuláris adatok felhasználásával...	46
4.1.1. Laboratóriumi alगतenyésztés	46
4.1.2. Alaktani vizsgálatok	48
4.1.3. A genomi DNS extrakciója és a PCR módszer, szekvenálás	48
4.1.4. A szekvencia igazítás és a filogenetikai elemzés	50

4.2. Az EPS vizsgálata.....	51
4.2.1. Az alगतörzsek szaporítása.....	51
4.2.2. Szárazanyag tartalom meghatározása	54
4.2.3. Az EPS kivonása.....	54
4.2.4. Szénhidrát mérés fenol-kénsavas módszerrel.....	55
5. EREDMÉNYEK	57
5.1. A filogenetikai és morfológiai elemzés	57
5.1.1. A <i>Chlamydomonadales</i> rend.....	61
5.1.2. A <i>Sphaeropleales</i> rend és a Scenedesmaceae filogenetikai csoport	73
5.1.3. A <i>Chlorellales</i> rend és a Chlorella filogenetikai csoport.....	75
5.1.4. A négy „megoldatlan” törzs.....	76
5.2. Az EPS elemzése	84
5.2.1. A kiválasztott alga törzsek növekedésének és biomassza hozamának vizsgálata	84
5.2.2. A törzsek sEPS és bEPS termelése.....	84
5.2.3. Az EPS termelés és a növekedési jellemzők kapcsolata	85
5.2.4. Az EPS termelés és a filogenetikai eredmények kapcsolata .	86
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	89
6.1. A molekuláris vizsgálatok eredményeinek megvitatása.....	89
6.2. Az EPS vizsgálatok eredményeinek megvitatása	93
7. KÖVETKEZTETÉSEK	97
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	98
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	100
10. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	128
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	130

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK	131
MELLÉKLETEK.....	135

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

MACC – Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection – Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény, Magyarország NCBI

18S rRNS – eukarióták riboszómális RNS kis alegysége

bEPS – kötött extracelluláris poliszacharid

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool – on-line szekvenciakereső alkalmazás

CCALA – Culture Collection of Autotrophic Organisms – Autotróf Szervezetek Gyűjteménye, Csehország

CCAP – Culture Collection of Algae and Protozoa – Alga és Protozoa Gyűjtemény, Egyesült Királyság

DNS – dezoxi-ribonukleinsav

EPS – extracelluláris poliszacharid

IPPAS – Culture Collection of Microalgae IPPAS – IPPAS Mikroalga Gyűjtemény, Oroszország

MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis – szekvenciaelemző program

MUSCLE – MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation – szekvenciaösszehasonlító program

OTU – Operational Taxonomic Unit - működési taxonómiai egység

PCR – Polymerase Chain Reaction – polimeráz lánreakció

RAxML – Randomized Axelerated Maximum Likelihood – filogenetikai elemzést végző program

RNS – ribonukleinsav

sEPS – oldott extracelluláris poliszacharid

TIM2 + G + I model – Transition model – evolúció elemzésére használt model

Zehnder-8 – Zehnder-8 tápoldat (Kotai 1972)

KIVONAT

A Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény (MACC) korábban alaktani szempontból *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlamydomonadaceae) nemzetségbe sorolt törzseinek taxonómiai újraértékelése molekuláris adatok felhasználásával, és egyes *Chlamydomonas* törzsek extracelluláris poliszacharid (EPS) termelésének jellemzése.

A *Chlamydomonas* az egyik legnagyobb zöldalga nemzetség több mint 800 leírt fajjal. Törzsgyűjteményekben megközelítőleg 400 törzs áll rendelkezésre, alkalmazható kutatási célokra. A *Chlamydomonas* nemzetség – és azon belül is a *C. reinhardtii* – sokoldalú gyakorlati jelentőségére utal, hogy modellszervezetként olyan tudományterületeken alkalmazzák, mint a fotoszintézis kutatás, az örökléstan, az UV-rezisztencia kérdései, a hidrogén-, biogáz- és biodízel-termelés lehetőségei, a hormonkutatás, a mezőgazdaság és a gyógyszerkutatás. A *Chlamydomonas* taxonokat hagyományosan életciklusuk vegetatív szakaszában, alaktani jellemzőik szerint osztályozzák. Az egysejtű szervezeteket magába foglaló nemzetség alapvető jellemzője a két egyenlő hosszúságú ostor és a sejt térfogatának mintegy felét kitevő kloroplasztisz, amely egy vagy több pirenoidot tartalmaz.

Az 1990-es évek óta, a molekuláris markerek filogenetikai elemzésben való alkalmazása bebizonyította, hogy a taxonómiai meghatározáshoz az alaktani megközelítés nem elegendő a legtöbb zöldalga, így a *Chlamydomonas* nemzetség esetében sem. Napjainkra kiderült, hogy a nemzetség polifiletikus, ezért alapos felülvizsgálatra van szükség, amelyre a legújabb irányvonal, a polifázikus megközelítés kínál lehetőséget. Ez különböző eljárásokat egyesít magában, nevezetesen alaktani, citológiai, ultrastrukturális és molekuláris biológiai

vizsgálatokat. A hagyományos taxonómiát alkalmazó morfológusok több mint 800 *Chlamydomonas* fajt jegyeznek, de a polifázikus megközelítés alkalmazásával ez a szám minden bizonnyal a töredékére, 100–150 taxonra fog csökkenni.

A 18S rRNS gén kiválasztott génszakaszának felhasználásával rendszertani vizsgálatokat végeztem 70 MACC (Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény) törzsön, amelyeket korábban alaktanilag az egysejtű ostoros *Chlamydomonas* nemzetséghez tartozónak azonosítottak. A vizsgálataim fő célja az MACC *Chlamydomonas* törzsek taxonómiai besorolásának korszerűsítése volt. Megállapítottam, hogy az alaktani alapon történt rendszertani besorolás a törzsek többségénél nem elegendő. Az azonosítást megnehezítette, hogy időközben a zöldalgák taxonómiai osztályozása folyamatosan változott. A molekuláris módszerek alkalmazásával kilenc, filogenetikailag eltérő taxon csoportot azonosítottam. A molekuláris adatokból kiderült, hogy a 70 törzs közül 22 *Chlamydomonas*, 9 a *Scenedesmus* nemzetség tagja, 8 *Chlorosarcinopsis*, 8 *Lobochlamys*, 6 *Chlorella*, 5 *Chlorococcum*, 3 *Deasonia*, 2 *Heterochlamydomonas*, 1-1 *Chloromonas*, *Nautococcus* és *Tetraspora*, míg 4 törzs besorolása továbbra is megoldatlan. A kládokat a kiválasztott 18S rRNS-t kódoló génszakaszok hasonlóságának vizsgálatával és az úgynevezett p-distance módszer alkalmazásával határoztam meg. Vizsgálataim rávilágítottak arra, hogy a törzsgyűjtemények izolátumainak taxonómiai azonosítása alaktani módszerekkel nem lehetséges, sőt a jelenlegi “állapotfelmérés” mellett szükséges az algarendszertani változások folyamatos nyomonkövetése is.

Vizsgálataim másik célja egyes *Chlamydomonas* törzsek, a mezőgazdaság számára értékes extracelluláris poliszacharid (EPS)

termelésének megismerése volt. A *Chlamydomonas* (Ehrenberg 1833) nemzetség egyes fajai bizonyos körülmények között képesek nagy molekulatömegű extracelluláris poliszacharidok (EPS) kiválasztására. Az MACC (*Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény*) törzseinek EPS termeléséről eddig nem álltak rendelkezésre eredmények. Vizsgálataimhoz az MACC 20 *Chlamydomonas* törzsét választottam ki, amelyekből a kivont EPS mintát fenol-kénsavas módszer segítségével tanulmányoztam. Hét törzs esetében több mint 1 g L^{-1} oldható EPS-t mértem, három törzs tenyészetében pedig az oldható EPS mennyisége meghaladta a 2 g L^{-1} -t. A legtöbb EPS-t az MACC 398 törzs termelte (2763 mg L^{-1}) a 30 napos inkubálás során.

Ezen kívül, összefüggést találtam a taxonómiai újraértékelés és az EPS eredmények között. A magas EPS termelés az Oogamochlamydia filogenetikai csoportra volt jellemző, míg a vizsgált 20 törzs esetében megállapítható, hogy kilenc a Reinhardtinia filogenetikai csoport tagja volt, tehát leginkább erre a csoportra volt jellemző az EPS termelés. Az adatokból szintén kiolvasható, hogy az új, filogenetikai alapú besorolás értelmében két törzs, az MACC-825 (*Scenedesmus sp.*) és az MACC-771 (*Chlorella sp.*) nem tartozik egyik *Chlamydomonas*-hoz hasonló filogenetikai csoportot tartalmazó rendbe sem.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy az MACC *Chlamydomonas* törzsei között vannak értékes EPS-termelők, amelyek például talajkondicionáló készítmények alapanyagai lehetnek.

ABSTRACT

Taxonomic re-evaluation of previously identified *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlamydomonadaceae) strains from the Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection (MACC) using molecular data, and characterization of extracellular polysaccharide (EPS) production in some *Chlamydomonas* strains.

Chlamydomonas is one of the biggest green algal genera with more than 800 described species. Approximately 400 strains are available in collections and applicable for research purposes. Referring to the versatility of genus *Chlamydomonas* – and in particular *C. reinhardtii* –, it is applied on scientific fields such as genetics, photosynthesis research, UV resistance issues, possibilities of hydrogen, biogas and biodiesel production, hormone research, agriculture and medicine. The green alga genus *Chlamydomonas* is traditionally classified according to morphological characteristics in the vegetative stage of the life cycle. Essential features of the genus are the two anterior flagella of equal length and the single chloroplast containing one or more pyrenoids.

Since the 1990s, the use of molecular markers for phylogenetic analysis demonstrated that the morphological approach is appropriate neither for most green algae, nor for the genus *Chlamydomonas*. Most green alga genera are polyphyletic, so their status and species number require further revision. The latest trend is the polyphasic approach that combines different methods like morphology, cytology, ultrastructural and molecular biological studies. Morphologists on the side of traditional taxonomy register more than 800 *Chlamydomonas* species, however this amount will likely decrease to 100–150 *Chlamydomonas* species by using a polyphasic approach.

Systematic studies on 70 MACC (*The Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection*, Hungary) isolates previously morphologically identified as '*Chlamydomonas*', a unicellular flagellate, were carried out based on the selected gene section of the 18S rRNA gene. The main purpose of my study was to update the taxonomic classification of MACC *Chlamydomonas* strains. I found that the taxonomic classification on morphological basis is not enough for the most strains. This was also borne out by the fact that the taxonomic classification of green algae has constantly changed in the meantime. Nine clusters of phylogenetically different taxa were identified. Molecular data revealed that 22 of the 70 strains are *Chlamydomonas*, 9 are members of the genus *Scenedesmus*, 8 are *Chlorosarcinopsis*, 8 are *Lobochlamys*, 6 are *Chlorella*, 5 are *Chlorococcum*, 3 are *Deasonia*, 2 are *Heterochlamydomonas*, and there is a *Chloromonas*, *Nautococcus* and *Tetraspora*, while 4 strains remain unresolved. Clades were established by similarity and p-distances of the selected gene section of the 18S rRNA gene. My studies have shown that the taxonomic identification of strain isolates is not possible with morphological methods, and in addition to the current 'review', it is also necessary to continuously monitor the algae taxonomic changes.

The other aim of my research was to find some valuable extracellular polysaccharide (EPS) producing *Chlamydomonas* strains for agriculture. Some species of the genus *Chlamydomonas* (Ehrenberg 1833) can secrete EPS under specific conditions. Up to now, no results were available for EPS production of MACC (Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection) strains. In this study, twenty *Chlamydomonas* strains were analyzed using the Phenol-Sulfuric Acid method. Seven strains produced more than 1g L⁻¹ whereas three strains more than 2g L⁻¹ soluble EPS

(sEPS). Strain MACC-398 was the highest sEPS producer (2763 mg L⁻¹) during the 30-day incubation period.

In addition, I found correlation between taxonomic re-evaluation and EPS results. High EPS production was characteristic of the Oogamochlamydia phylogenetic group, while in case of the 20 examined strains, nine were found to be members of the Reinhardtia phylogenetic group. Therefore, EPS production was most characteristic of this group. The data also show that, under the new phylogenetic-based classification, two strains, MACC-825 (*Scenedesmus sp.*) and MACC-771 (*Chlorella sp.*), do not belong to any orders containing a phylogenetic group similar to *Chlamydomonas*.

This study highlighted promising strains for application in soil conditioning. Based on the results, it can be concluded that there are valuable EPS producers among the MACC *Chlamydomonas* strains. These may be, for example, raw materials for soil conditioning products.

1. BEVEZETÉS

Tanulmányom a korábban *Chlamydomonas*-ként azonosított 70 MACC törzs rendszertani kapcsolataira összpontosított. Az MACC gyűjtemény *Chlamydomonas* törzseiből nem áll rendelkezésre molekuláris filogenetikai adat, ezért szekvenáltam a 18S rRNS génjüket kódoló DNS bizonyos szakaszát, hogy meghatározzam a filogenetikai helyüket és hozzárendeljem azokat a Nakada és mtsai. (2008b) által meghatározott alcsoportokhoz. A kutatás célja, hogy megfelelő alapot biztosítson a jövőbeni rendszertani és biodiverzitással kapcsolatos illetve alga-biotechnológiai kutatásokhoz.

Az utóbbi évek mezőgazdaságának kiemelkedően fontos technológiai eleme a szükséges mennyiségű és minőségű természetes anyagok, tápanyagok, talajjavítók, lombtrágyák és különböző növénykondicionáló anyagok visszajuttatása a talajba, illetve a növény-talajrendszerbe. A világon mindenütt, egyre több algakészítmény kerül kereskedelmi forgalomba, számos hasznos tulajdonságuk és kedvező hatásuk miatt. A növénytermesztésben leggyakrabban biotrágyaként, talajkondicionálóként (extracelluláris poliszacharidok - EPS) és növekedésszabályozó anyagként használnak algákat, de az utóbbi időben megnövekedett az érdeklődés növényvédő hatásuk iránt is.

A mosonmagyaróvári alगतörzsek hormontermelését már közel két évtizede vizsgálják a Növénybiológiai Intézetben. Biotesztekkel és analitikai módszerekkel mára nyilvánvalóvá vált, hogy a cianobaktériumok, a mikroalgák és a makroszkopikus tengeri algák egyaránt termelnek növényi hormonokat, amelyek miatt különleges növénykezelésekre alkalmasak. Hatással vannak egyebek között a

transzspiráció csökkentésére, ugyanakkor fokozzák a terméskötődést és növelik a levelek klorofill-tartalmát, a termés fehérjetartalmát, valamint a gyökér- és hajtásfejlődést.

2. CÉLKITŰZÉS

Választott feladatomban, hogy a Mosonmagyaróvári algagyűjtemény *Chlamydomonas* zöldalga törzseit molekuláris szinten és alaktanilag jellemezzem, majd a kapott eredmények alapján elvégezzem a törzsek elkülönítését. Ez egyben azt is jelenti, hogy az MACC *Chlamydomonas* törzseire alkalmazva meghonosítsak modern, DNS alapú markerezési eljárásokat és kimutassam EPS tartalmukat.

Laboratóriumi vizsgálataimhoz 70 db *Chlamydomonas* törzset választottam ki. A művelet alapvetően a 18S rRNS (riboszómális RNS) gén egy bizonyos szakaszának szekvencia meghatározására épült (Novis és mtsai. 2009, Wu és mtsai. 2001).

Kutatásaim során két fő célkitűzés vezérelt:

- A Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény (MACC) *Chlamydomonas* törzseit pontosan azonosításam és átsoroljam. Ezáltal bemutathatóvá válik az MACC *Chlamydomonas* törzsek jelen pozíciója a zöldalga filogenetikai fa egy szakaszán.
- Az extracelluláris poliszacharidok kivonása és jellemzése a kiválasztott törzsekből. Ez alapot teremthet későbbi talajkondicionálásra irányuló kísérleteknek.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A zöldalgák az eukarióta fotoautotróf élőlények nagy és sokszínű csoportját alkotják, kezdve az egysejtűektől a többsejtű formákig (Bellinger és Sigeo 2010). Zöldalgákat a világon mindenütt találhatunk beleértve olyan élőhelyeket is, mint az északi-sarki és a déli-sarki régiók, az óceánok és az édesvízi tavak, az örök jég és hó felszíne, valamint a különféle talajok a mérsékelt nedves területektől egészen a száraz területekig (Pröschold és Leliaert 2007). A zöldalgák olyan életközösségekben is megtalálhatóak; mint a zuzmók, az egysejtűek és likacsoshéjúak, vagy parazitákként a forró égvői növényeken. Egyes becslések szerint legalább 600 nemzetségük és 10 000 fajuk létezik (Norton és mtsai. 1996).

Alapvető ökológiai szerepük a napenergia kémiai energiává való átalakítása. Számos tulajdonságuk van, mely a víz-, talaj- és növényrendszereket befolyásolja és lehetővé teszi gyakorlati felhasználásukat. Olyan extracelluláris poliszacharidok (EPS), mint például alginátok, agarok, karragének, fukodiánok termelése révén, az élelmiszer- és gyógyszeriparban, de más iparágakban is elterjedt a használatuk (Misurcova és mtsai. 2012). Analitikai mérések eredményei alapján, napjainkra nyilvánvalóvá vált, hogy a zöldalgák növényi hormonokat is termelnek (PGR: Plant Growth Regulator, Ördög és mtsai. 1996, 2006), amelyek biológiai hatásuk miatt speciális növénykezelésekre használhatók. Alkalmassak a transzspiráció csökkentésére, fokozzák a terméskötődést, növelik a levelek klorofill tartalmát, a termés fehérjetartalmát, valamint serkentik a gyökér- és hajtásfejlődést (Stirk és

mtsai. 2013a, 2013b). A hormontermelő algák szuszpenziójával kezelt növényeknél javul a termés minősége, nő a termés hozama (Tóth és mtsai. 2011), sőt növényvédelmi problémákat orvosolhatunk vele (Németh és mtsai. 2006, Ördög és mtsai. 2006, Grierson 2013). Jäger és mtsai. (2010) kukorica (*Zea mays* L.) biotesztekkel igazolta a mikroalgák citokinin- és auxinszerű hatását. Stirk és mtsai. (2013a) endogén auxinok és citokininek mennyiségét határozták meg 24 axénikus mikroalga törzsből.

Ezen kívül olyan tudományterületeken alkalmazzák még a *Chlamydomonas* zöldalgákat, mint az UV-rezisztencia kérdései, a biogáz- és biodízel-termelés lehetőségei, a hormonkutatás, a mezőgazdaság és a gyógyszerkutatás. A *Chlamydomonas reinhardtii*-t nagymértékben tanulmányozzák a géntechnológia területén, a rekombináns fehérje-termeltetés révén, enzimek és védőoltások előállítására a biotechnológiai szektorban (Scaife és mtsai. 2015). Mivel a *Chlamydomonas* egy alapvető biológiai eszköz, a fajok megfelelő elnevezése és leírása szükséges.

Az algák osztályozása jelenleg is átdolgozás alatt áll, a molekuláris adatok bővülése miatt. Pröschold és Leliaert (2007) a polifázikus megközelítés alkalmazását javasolja az alga rendszertan átdolgozásánál. Ezen módszer magába foglalja a molekuláris információ, az alaktan, az elektronmikroszkópia, az életciklus elemzések és az ökológiai vizsgálatok kombinálását. Ami a volvokális taxonokat illeti, a *Chlamydomonas* (Pröschold és mtsai. 2001), a *Chlorogonium* (Nakada és mtsai. 2008b) és a *Microglena* (Demchenko és mtsai. 2012, Watanabe és Lewis 2017) esetében, a 18S rRNS szekvencia illesztés estén széles körben alkalmaztak polifázikus megközelítést

3.1. A *Chlamydomonas* nemzetség helye az algák rendszerében

A Chlorophyta divízió legnagyobb csoportja a *Chlorophyceae* osztály, amely körülbelül 350 nemzetséget, köztük a *Chlamydomonas* nemzetséget, és mintegy 2500 fajt foglal magába. (Nakada és mtsai. 2008a, 2008b; Nakada és Tomita 2011, 2016). A *Chlamydomonas* nemzetséget (görögül: *chlamys* vagyis köpeny, palást, illetve *monas*, ami magányosat jelent) Ehrenberg nevezte el (Ehrenberg 1833, 1838), amely valószínűleg egyezik az 1786-ban leírt ostoros *Monas*-szal (Ettl 1976).

A *Chlamydomonas* nemzetség a *Chlamydomonadaceae* családba tartozik (Umen és mtsai. 2011). A nemzetség több mint 800 fajt foglal magában, de mára felismerték, hogy polifiletikus (jellemvonásaik hasonlóak, azok több őstre vezethetők vissza, a hasonló tulajdonságok egymástól teljesen függetlenül jöttek létre a párhuzamos evolúció során), így a nemzetség alapos felülvizsgálatára van szükség (Stern és mtsai. 2009). A nemzetség jellegzetes és legjobban tanulmányozott képviselőjének, a *C. reinhardtii*-nak a rendszertani helye Frey (2015) szerint a következő:

Birodalom: Eukaryota

Ország: Viridiplantae

Törzs: Chlorophyta

Osztály: Chlorophyceae

Rend: Chlamydomonadales

Család: Chlamydomonadaceae

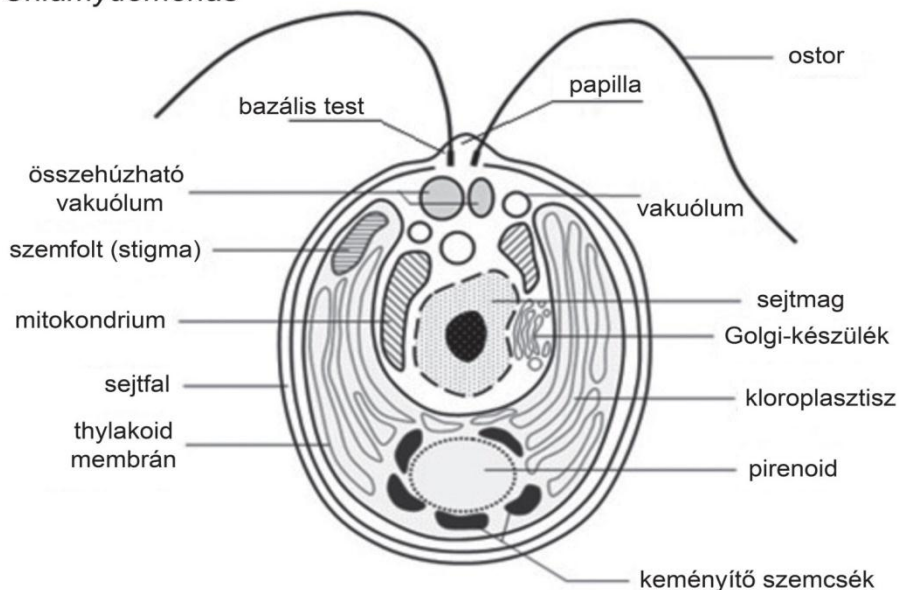
Nemzetség: *Chlamydomonas*

3.2. A *Chlamydomonas* nemzetség jellemzése

A *Chlamydomonas* taxonok rendszertani besorolására irányuló kezdeti próbálkozások a sejtek színét és fénymikroszkópos alakját vették alapul. Bár ezek továbbra is fontos jellemzők, más szempontok, mint például a fénygyűjtő pigmentek típusai, sejtfal alkotóelemek és a raktározó anyagok kémiai jellege jobb támpontot adhatnak a vizsgált törzs azonosításához (Richmond 2008).

Dill 1895-ben 15 *Chlamydomonas* fajt tartott számon. A lista 1927-re 146 fajra gyarapodott, amelyekre Közép-Európában bukkantak. Pascher (1927a) fajleírásait a szintest alakjára és számára, illetve a pirenoidok elhelyezkedésére alapozta. Gerloff (1940) további fajokat határozott meg, ezzel az ismert *Chlamydomonas* taxonok száma 321-re emelkedett. Ettl átfogó tanulmánya a „Die Gattung *Chlamydomonas*” (Ettl 1976) már 459 *Chlamydomonas* fajról tesz említést, miközben a *Chloromonas* alnemzetséget külön nemzetséggé nyilvánította. A fennmaradó fajokat 9 csoportba sorolta, amelyeket az alnemzetség helyett Hauptgruppen („főcsoportok”) elnevezéssel illetett, de ez utóbbi elnevezés nem kapott hivatalos taxonómiai rangot (Pröschold és Silva 2007). Pröschold és mtsai. (2018) bonyolult összehasonlító vizsgálatok után kiderítették, hogy a jelenlegi álláspont szerint 3 faj, nevezetesen a *C. incerta*, *C. reinhardtii* és *C. schloesseri* tekinthető a nemzetség tagjának.

A *Chlamydomonas* nemzetség tagjai egysejtű szervezetek két egyenlő hosszúságú elülső ostorral (flagellum), a papilla (kúp alakú nyúlvány) hiányozhat. Fontos határozójegy még a csésze alakú szintest, amely egy vagy több pirenoidot tartalmaz (1. Ábra, 1. Táblázat).

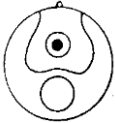


Chlamydomonas




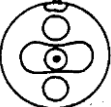


1. Ábra A *Chlamydomonas* alaktana (Dent és mtsai. 2001)

A sejtek többnyire 5–10 μm átmérőjűek és körte vagy tojásdad alakúak. A plazmamembránt körülvevő sejtfal glikoprotein rétegekből áll (Stern és mtsai. 2009). Az ostorok és a bazális testek szerkezete és működése homológ az állati sejtek csillószőreivel és bazális testeivel, így a *Chlamydomonas* nemzetség kiváló modellként szolgál e sejtiszervek tanulmányozására (Pedersen és Rosenbaum 2008). A sejtmag a bazális testek alatt helyezkedik el, míg a sejtek dorzális részét egy nagy, csésze alakú kloroplasztisz alkotja, amely a teljes térfogatnak több mint a felét teszi ki. Az ostorok a sejt méretével megegyező hosszúságúak, vagy annál hosszabbak, ritkán rövidebbek, csúcsi helyzetűek. A szemfolt általában középen vagy elől helyezkedik el (Ács és Kiss 2004). A palmelloid állapot kedvezőtlen körülmények között alakul ki, a *Chlamydomonas* taxonok elvesztik ostoraikat, és egy zselés anyaggal veszik magukat körül. Ezt

követően többszörös osztódással zselés telepet képeznek. A kedvező körülmények beálltával a palmelloid állapotban lévő sejtek visszanyerik jellegzetes mozgó alakjukat (Sharma 1986). A *Chlamydomonas* nemzetég fajainak meghatározása nehézkes, így annak megkönnyítésére mesterséges csoportokat hoztak létre (Felföldy 1985, 1. Táblázat):

1. Táblázat A *Chlamydomonas* csoportok vázlatos képe a szintestük (kloroplasztiszuk) alakját és pirenoidjaik elhelyezkedését bemutatva (Felföldy 1985).

A csoport neve	Vázlatos képe	Kloroplasztiszuk, pirenoidjaik jellemzői
Euchlamydomonas		Csésze alakú szintest, amelyet barázdák, lyukak és bevágások módosíthatnak. Egyetlen alapállású pirenoid. A sejtmag a sejt elülső részében, a szintest üregében található.
Chlamydeila		Csésze alakú szintest, amelyet barázdák, lyukak és bevágások módosíthatnak. Egyetlen oldalt állású pirenoid. A sejtmag a szintest üregében van, a pirenoid előtt vagy mögötte.
Bicocca		Csésze alakú szintestben két egymással szemben álló pirenoid van, amelyek vagy szabályosan az egyenlítő mellett vagy szabálytalanul, egyik följebb, a másik lejjebb helyezkedik el.

Chlorogoniella		A szintest féloldalas, falmenti köpeny vagy vályú alakú, különféle öblösödésekkel, bevágásokkal változatos. Egyetlen, oldalt álló pireloid, a sejtmag is eléggé laterális.
Pseudagloe		A szintest csésze vagy cső alakú, az egyetlen pireloid a sejt közepén lévő szintest hídban van, a szintest hosszmetzete ezért H-alakú. A sejtmag a pireloid előtti üregben található.
Agloe		A szintest csésze vagy cső alakú, a sejt közepén lévő szintest hídba van ágyazva az egyetlen pireloid. A szintest hosszmetzete ezért H-alakú. A sejtmag a pireloid mögötti üregben található.
Amphichloris		A csésze vagy cső alakú szintestben két híd alakult ki, egyik a közepén lévő sejtmag előtt, egy pedig mögötte. Mindkét hídban egy-egy pireloid fekszik a függőleges tengely mentén.
Pleiochloris		A szintest alapformájában csésze alakú (néha módosul), gyakran csíkos, foltos átlyuggatott vagy különálló darabokra szabdalt. Mindig több, néha sok szabálytalanul elhelyezkedő pireloid van benne.
Sphaerella		Hó, jég és gleccser felületén élő, havasi fajok, amelyekben a szintest szerkezete nehezen ismerhető fel

A *Chlamydomonas* nemzetségen belül sok fajt írtak le, de közülük jónéhány valószínűleg nem *Chlamydomonas* (Vuuren és mtsai. 2006). A nemzetség fajait nehéz azonosítani (Harris 1989). A *Carteria* nemzetség hasonlít a *Chlamydomonas*-hoz, de négy ostorral rendelkezik. A *Dunaliella* szintén hasonlít a *Chlamydomonas*-hoz, de sejtfa nem erős szerkezetű, és általában a sós tavak rózsaszínes vagy vöröses elszíneződését okozza (Brook és Johnson 2002).

3.3. A *Chlamydomonas* taxonok filogenetikai kutatására használt gének

Genetikai markernek (mark = megjelöl) tekintünk általában minden olyan tulajdonságot, amely felhasználható egy fajra, populációra, illetve egyedre jellemző DNS-bázissorrend (szekvencia) azonosítására. Ez a tulajdonság lehet alaktani bélyeg, köztes anyagcseretermék vagy közvetlenül a DNS bizonyos szakasza. Ez utóbbi az úgynevezett molekuláris marker (Hajósné 1999). A molekuláris markerek alkalmazását a *Chlamydomonas* nemzetség taxonómiájába az 1990-es években vezették be (Lewis és McCourt 2004).

A 18S rRNS alapú molekuláris módszereket évtizedek óta használják zöldalgák taxonómiai jellemzésekhez (Chenuil 2006, Meyer és mtsai. 2010). A 18S rDNS gént általánosan konzervatív génnek tartják, amely a legtöbb esetben alkalmas a közeli rokon taxonok elkülönítésére (Vaulot és mtsai. 2008, Somogyi 2010). Ráadásul, ez a gén elméletileg nincs kitéve laterális géntranszfernek, amely félrevezető következtetéseket eredményezhetne (Vaulot és mtsai. 2008, Somogyi 2010). A 18S rRNS gén (Němcová és mtsai. 2011, Barsanti és mtsai. 2013) a preferált filogenetikai marker továbbá a *Volvocales* rend vizsgálatára,

ugyanis ebből a génből több száz szekvenciát helyeztek olyan nyilvános adatbázisokba, mint például a GenBank (Nakada és mtsai. 2008b).

Pröschold és mtsai. (2001) e gén segítségével különített el négy ágat (*Hafniomonas*, *Spermatozopsis*, *Dunaliella* és *Polytomella*), amelyek azt megelőzően a *Dunaliellaceae* osztályban (Ettl 1983) szerepeltek. A 18S rRNS variábilis régiókkal is rendelkezik, így ezt a markert alacsonyabb taxonómiai szinten is alkalmazhatjuk, beleértve a mikroevolúciós vizsgálatokat is (Gerloff-Elias és mtsai. 2005, Skaloud 2008). Nakada és mtsai. (2008b) 18S rRNS génszekvenciákon alapuló átfogó molekuláris elemzéseket hajtott végre a *Volvocales* renden, beleértve a *Chlamydomonas* fajokat is. Emellett a PhyloCode-ot (Nemzetközi Filogenetikai Nomenklátúra Kódex, Cantino és de Queiroz, 2010) alkalmazta, hogy részletesen meghatározzon kládokat.

A 18S rRNS a legtöbb esetben alkalmas a nemzetségek szintjétől, az akár osztályok, törzsek taxonómiai szintjéig terjedő összehasonlításra, gyakran túl kevés variációt mutat a nemzetség alatti, illetve fajhatárok környékén található variációk vizsgálatához. Ilyen esetekben variábilisabb genomszakaszok használata válik szükségessé (Ács és Kiss 2004). A 18S rRNS génen kívül néhány plasztid gén (pl. *PsaB*, *rbcL*), valamint a kombinált 18S és 28S rRNS gének számos klamidomonális vonalat emeltek ki (Matsuzaki és mtsai. 2010, Buchheim 2013, Lemieux és mtsai. 2015). A genetikai eredmények megerősítéséhez Pröschold és mtsai. (2018) a sporangium falában található autolizin enzimet (angolul: vegetative lytic enzymes - VLE) használták a kísérleteikhez, mivel ez az enzim jó biokémiai marker a *Chlamydomonas* fajok osztályozásához.

Az algológiai vizsgálatokhoz felhasznált jellegzetes genetikai markerek még például a nukleáris riboszomális operon (SSU, 5.8S és

LSU, beleértve az ITS1 és ITS2 régiókat), az aktin gén, több kloroplasztisz gén (rbcL, atpB) és a mitokondriális gének (pl.: coxI) (Necas és mtsai. 1986). A kis és nagy alegység riboszómális RNS (SSU és LSU rDNS) génjeit szintén gyakran használták az evolúciós elágazások (ún. divergenciák) vizsgálata során, amelyek segítségével a főbb algákat osztályokba sorolták. Az SSU rDNS azonban viszonylag variábilis régiókat is tartalmaz, így ezt a markert alacsony taxonómiai szinten is alkalmazhatjuk, ideértve a mikroevolúciós vizsgálatokat is (Skaloud 2008).

A kis alegység riboszómális DNS-ének (SSU rDNS) filogenetikai elemzése például alátámasztotta az ultrastrukturális adatokon alapuló eredeti feltételezést, amely szerint két fő leszármazási vonal van a zöld növények között (Friedl 1997). Ez azt jelenti, hogy körülbelül 700 millió évvel ezelőtt a ma élő összes zöld növény közös őse két fő csoportban fejlődött tovább: az egyik a *Chlorophyta* törzs (idetartoznak a *Chlamydomonas* fajok is) a másik pedig a *Streptophyta* törzs (ide pedig egyebek mellett a szárazföldi növények tartoznak). Mindkét csoport egymástól elkülöníthető számos alaktani, élettani és molekuláris jellemző alapján (Becker 2013).

A *C. reinhardtii* genomszekvenciáit 2007-ben közzétették (Merchant és mtsai. 2007), amely még több ismeretet nyújtott az ostoros zöldalgák rendszerével kapcsolatban. A *Chlamydomonas* nemzetségen elvégzendő örökléstani kutatások a közeljövőben is az érdeklődés középpontjában lesznek, mivel betekintést nyújtanak az egysejtű eukarióták rendkívül összetett fejlődésébe (Prochnik és mtsai. 2010, Yumoto és mtsai. 2013).

3.4. *Chlamydomonas*-hoz hasonló nemzetségek, filogenetikai csoportok morfológiai jellemzői

A planktonikus kokkoid zöldalgák kulcscsoportjainak összefüggései megtalálhatók a *Chlorophyceae* és a *Trebouxiophyceae* rendek filogenetikai fáin (Nakada és Tomita 2016, Possmayer és mtsai. 2016, Watanabe és Lewis 2017). A törzsfák azt mutatják, hogy egyes algák alakana és filogenetikai elhelyezkedésük nincs szoros kapcsolatban. Az alakana és a filogenetikai pozicionálás közötti különbség gyakran akadályozza a fajleírást. Így az a feltételezés, hogy a hasonló alakana szoros filogenetikai viszonyhoz vezet, gyakran félrevezető és pontatlan (Bock és mtsai. 2011, Lahr és mtsai. 2014).

A molekuláris biológusok jelenleg is vizsgálják a nyilvános törzsgyűjtemények tartalmát, ám ezek a gyűjtemények nem képviselik a taxonok óriási sokféleségét a taxonómiában, és a törzsgyűjteményekben sok taxon megnevezése kétséges. Számos algát nehéz fenntartani törzstenyészetekben és így nem állnak rendelkezésre molekuláris elemzésre (Day és mtsai. 2004, Hegewald 1989, Krienitz és Bock 2012).

Az MACC törzsek haladó szintű jellemzésére vonatkozó jövőbeni célok közé tartozik a fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatok és ultrastrukturális elemzések. Watanabe és Lewis (2017) azt mutatta meg, hogy bizonyos ultrastrukturális tulajdonságok alkalmazhatók a monofiletikus leszármazási vonalak diagnosztizálására és azt is, hogy a vizsgált tulajdonságok informatívak különböző filogenetikai mélységekben, a nemzetségektől a filogenetikai csoportokig. A taxonómiában használt alakana jellegzetességek gyakran ellentmondanak a specifikus leszármazási vonalakkal, vagy nem olyan diagnosztikai

jellegűek, mint amilyenek eredetileg voltak. Erre a legjobb példa, hogy az MACC törzsek többsége a 90-es évek vége óta volt törzstenyészetként fenntartva, ami valószínűleg kihatott az alaktanukra és bizonyos, az azonosításuk szempontjából fontos jellemvonással már nem rendelkeznek (pl.: ostorképzés).

A *Chlamydomonas* sejtek morfológiája nagyon változatos, azonban voltak olyan más nemzetséghez kapcsolódó tényezők is, amelyek gondokat okoztak az MACC zöld alga törzsek filogenetikai elemzésében (2. Táblázat):

A *Chlorococcum* mozgékony, méretükben változatos ellipszoid és a gömb alakú sejtjei egy vagy több pirenoiddal rendelkeznek. A sejt fal sima. A mozgásra képes sejtalak két azonos ostorral rendelkezik és egy időre ellipszoid marad, miután a mozgásképessége megszűnik. Ezeket a sejteket *Chlamydomonas*-típusú sejtekként is ismerik, mert annyira hasonlítanak a *Chlamydomonas*-hoz.

Ami a *Chloromonas* nemzetséget illeti, egysejtű, gömb, tojás, henger vagy orsó alakú sejtek előfordulhatnak. Egyes fajok sejtjei aszimmetrikusak. Két azonos hosszúságú, elülső flagellája van, nem rendelkezik pirenoidokkal, de minden más alaktani szempontból a *Chlamydomonas*-ra hasonlít (Ettl 1976, 1983; Pröschold és mtsai. 2001, McNeil és mtsai. 2012, Nakada és mtsai. 2016), amely az azonosítást megnehezíti.

Watanabe 1983 ultrastrukturális vizsgálata megállapította, hogy a talajlakó *Chlorosarcinopsis* nemzetség összes vizsgált fájában a zoospórák ostor felépítése lényegében azonos a *Chlamydomonas*-szal (Melkonian 1982, 1984). A sejtsomagok gyakran szögletes vagy gömb

alakúak. Az egymáshoz lapuló sejtek sejtfaa vékony, bennük egy pirenoid van.

A *Deasonia* egysejtű cönocita (soksejtmagvú), alakja a tojásdadtól a gömb alakúig változik, a pirenoid a kloroplasztisz közepén helyezkedik el. Ez a nemzetség *Chlamydomonas*-típusú zoospórákkal is rendelkezik és ritkán feljegyzett nemzetség (Deason 1959, 1960, 1971), amely megnehezíti az azonosítását.

A *Heterochlamydomonas* és a *Chlamydomonas* ellipszoid alakú lekerekített vagy tompa hátsó sarokkal bíró sejtjei között az a fő különbség, hogy az előbbi két, elülső elhelyezkedésű, egyenlőtlen hosszúságú ostorral bír (Cox 1969, Langford és Cox 1971).

Ami a *Chlamydomonas-Lobochlamys* különbségeket illeti, a *Lobochlamys* izogám törzsekből áll, tehát szaporodáskor azonos sejt méretű ivarsejtek (gaméták) találkoznak egymással. A sejtek oválisak, elülső végük kissé hegyes, papillával, vékony nyálkahártya veszi körül. A flagella (ostorok) azonos hosszúságú vagy kissé rövidebb, mint a sejt hossz (Pröschold és mtsai. 2001).

A *Nautococcus* olyan tojásdad vagy gömb alakú sejtekből áll, amelyeknek a keskeny végében egy, a lebegést elősegítő sisak van. A sejtben számos, szabad keményítő szemcse található illetve egy pirenoid. Ezek a jellemzők szintén hasonlítanak egyes *Chlamydomonas* fajokhoz és a zoospórái is, amelyek kétostorosak (9-12 μm hosszúak) (Pentecost 1984).



A *Scenedesmus* rendszerint 2, 4, illetve 8 sejtet tartalmaz egy-három sorban vagy váltakozó sorrendben elrendeződve, bár az egysejtes alakok is gyakoriak. A sejtek oválisak a végükön kúposak, és nem minden esetben végződnek tüskékben. Általában egy pirenoiddal bírnak, ami








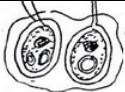
megnehezíti a *Chlamydomonas*-tól való megkülönböztetését (Trainor és Roskosky 1967, Hegewald 1978, Hegewald és Hanagata 2000, Wehr és mtsai. 2015).

A *Tetraspora* sejtek vízi kolóniát alkotnak, homogén, léggömb alakú nyálkahártyában periferián kettes vagy négyes csoportba rendeződve, 6-12 μm átmérőjűek, gömbölyűek/oválisak és egy pár elülső álostorral (pseudoflagellummal) rendelkeznek. A pirenoid bazális, feltűnő keményítőhüvellyel rendelkezik, és a szemfoltja hiányzik (Tsarenko 2011). A szemfolt hiánya segíthet megkülönböztetni a *Chlamydomonas*-tól.

A *Chlorella* egy egysejtű, mozgásra nem képes zöld alga, melynek gömb, ellipszoid vagy lapított sejtjei 1-6 μm átmérőjűek. A pirenoid nehezen észrevehető vagy hiányzik (Shihira és Krauss 1965, Krienitz és Bock 2012).

2. Táblázat A *Chlamydomonas* nemzetséghez hasonló filogenetikai csoportok megjelenési formái, illetve kloroplasztiszuk diakritikus jellemzői (Ettl 1983).

Filogenetikai csoport neve	Rajz a sejtekről	A kloroplasztiszuk diakritikus jellemzői
<i>Chlorella</i>		Csésze- vagy tányér-szerű kloroplasztisz
<i>Chlorococcum</i>		Perifériás nyílású vagy anélküli parietális (falmenti) kloroplasztisz.

<i>Chloromonas</i>		A kloroplasztisz a csésze és a lemezes alak között változhat. A kloroplasztisz gyakran lebenyes vagy lyukacsos.
<i>Chlorosarcinopsis</i>		Kissé megvastagodott, fali kloroplasztisz, amely tálszerű.
<i>Deasonia</i>		Sejtfali elhelyezkedésű, többé-kevésbé nyitott, csésze alakú kloroplasztisszal. Ez a fiatal sejteknél periférikus, a felnőtt sejteknél pedig központi elhelyezkedésű.
<i>Heterochlamydomonas</i>		Ellipszoid alakú sejt, lekerekített vagy tompa hátsó sarokkal. Két elülső, egyenlőtlen hosszúságú flagella.
<i>Lobochlamys</i>		Bemetszésekkel tarkított kloroplasztisz.
<i>Nautococcus</i>		Kloroplasztisza homályos, tengelyirányú.
<i>Scenedesmus</i>		Sejtfali elhelyezkedésű kloroplasztisz.
<i>Tetraspora</i>		Egyetlen csésze alakú fali kloroplasztisz.

3.5. Kihívások a *Chlamydomonas* taxonok rendszerezésében

Általánosságban elmondható, hogy a 18S rRNS szekvenálás megkérdőjelezte a *Chlamydomonas* nemzetség alaktani alapú besorolását. Ugyanakkor számos, korábban létrehozott leszármazási vonal határainak felülvizsgálatát is előmozdította (McCourt 1995). Tehát, míg az egyetlen génen alapuló összehasonlító tanulmányok elfogadhatók, azok csak részben valósították meg a legfontosabb zöldalgák közötti leszármazási kapcsolatok megismerését (Kirk 2005). Ezért a közeljövőben olyan vizsgálatokat kell elvégezni, amelyek több fajtól származó több gén, molekuláris marker bevonásával készülnek, így megbízható filogenetikai eredményt kapunk (Leliaert és mtsai. 2012).

A nemzetségbe tartozó több száz faj mind egysejtű és két egyenlő hosszúságú ostorral rendelkezik (Harris 2009). Sajnálatos módon ezek a jellemzők megtalálhatók sok más taxonban is (Pröschold és mtsai. 2001). A közelmúltban az rDNS szekvencia analízist használták, hogy egyértelmű monofiletikus taxonokat határozzanak meg a *Chlamydomonas* nemzetségen belül. A vizsgálat 132 fajt foglalt magában a *Chlorophyceae* osztályból, és két új nemzetség (*Oogamochlamys* és *Lobochlamys*) elkülönítését eredményezte (Pröschold és mtsai. 2001).

Fajmeghatározáshoz, a taxonok azonosításához napjainkban a polifázikus (multidiszciplináris) megközelítést említik arany középútként, mivel az alaktani sajátosságok, szekvencia-, illetve ökológiai adatok mellett élettani jellemvonásokat is kombinál (Skaloud 2008). Másik fontos kérdés a vizsgált minták baktériummentessége és homogenitása, ugyanis a DNS-kivonás, majd a sikeres szekvencia elemzés csak axénikus tenyészetek

esetében lehetséges (Patricio 2013). Az agarlemezes szélesztés célja olyan törzskultúra készítése, melynek eredményeként az inkubálást követően elkülönült telepeket is kapunk. Az ilyen telepek vélhetően egy algasejtből létrejött klóntenyészetek, így azokon már eredményesen elvégezhető a molekuláris biológiai vizsgálatok (Black 2008).

3.6. A polifázikus megközelítés

Egy nemzetség vagy faj taxonómiai felülvizsgálatának legfontosabb feladata, hogy figyelembe vegye az alaktani változatosságot eltérő laboratóriumi és környezeti feltételek mellett. Éppen ezért javasolt a polifázikus megközelítés használata, amelynek része a fenotípusos sokféleség és a különböző életszakaszok vizsgálata eltérő laboratóriumi feltételek mellett, továbbá a biokémiai és fiziológiai megközelítések, a filogenetikai koncepciók és a fajkoncepciók összehasonlítása, illetve a multi-gén megközelítés.

A polifázikus megközelítés használata választ adhat a taxonómiai kérdésekre, legalábbis nemzetség és faji szinten. Természetesen nem minden koncepció és módszer megfelelő taxonómiai vizsgálatokra az összes zöldalga esetében (Matsuo és mtsai. 2005). A polifázikus megközelítés képes fajokat és nemzetségeket megkülönböztetni és meghatározni. Ez egyrészt az eddig leírt fajok számának csökkenéséhez vezet, másrészt több, morfológiailag azonosnak tűnő biológiai faj megkülönböztetéséhez járul hozzá. Például a polifázikus megközelítés használatával a korábban meghatározott megközelítőleg 800 *Chlamydomonas* faj száma körülbelül 100–150-re csökkenthető (Pröschold és Leliaert 2007).

Fawley és mtsai. (2004) rámutattak azonban arra, hogy a zöld mikroalgák biológiai sokfélesége jóval nagyobb a vártnál. Munkájukban 273, különböző helyszínről (Észak-Dakota és Minnesota, USA) izolált törzs közül 93 különböző törzset azonosítottak 18S rRNS szekvenciájuk alapján, négy egyelőre nem volt meghatározható. Ezért ezeknek az izolált törzseknek a rendszertani besorolása szükséges a polifázikus megközelítés alkalmazásával. A korábban besorolt élőlényeket szintén (ahogyan és amikor az szükséges) az említett módszerrel újra lehet osztályozni annak érdekében, hogy ismeretet szerezzünk azok aktuális pozíciójáról a mikrobiális világban. Így a jelenlegi technikák lehetővé teszik, hogy a mikrobiológusok megfejtsek a mikrobák között fennálló természetes filogenetikai kapcsolatokat (Prakash és mtsai. 2007).

3.7. A *Chlamydomonas* nemzetség algáinak biotechnológiai kutatása

3.7.1.Élettani kutatások *Chlamydomonas* fajokkal

A *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (1988) laboratóriumi kutatásokhoz széles körben használt zöldalga. A hajtásos növényekkel összehasonlítva jelentős előnye, hogy egysejtű, haploid és szervesetlen sókból álló tápközegben is szaporodik, továbbá alternatív szénforrásként acetátot felhasználva, sötétben is képes szaporodni (Funes és mtsai. 2007). Mint modellszervezetet, intenzíven használták és használják a fotoszintézis, a légzés, a nitrogén anyagcsere és a csillómozgás tanulmányozására. Rövid életciklusa lehetővé teszi, hogy a genom szintű elemzések hatékony eszköze legyen. Az elmúlt 25 évben jelentősen megnövekedett a genomikai kutatások száma az algák esetében is. Ennek

kiemelkedő példája a *Chlamydomonas* genom projekt, ami a *C. reinhardtii* molekuláris feltérképezéséből, teljes génállományának megismeréséből állt (Pröschold és Leliaert 2007).

A *C. reinhardtii* a növényi és állati sejtekben lejátszódó folyamatok vizsgálatához egyaránt modellként szolgál. Kiválóan alkalmas az alga növekedés, a fotoszintetikus pigmentek és klorofill-fluoreszcencia változásainak, valamint az oxidatív stressz hatások tanulmányozására. A *C. reinhardtii*-t a lipidanyagcsere kutatás területén is modellként tartják számon (Fan és mtsai. 2011). A zsírsav-bioszintézis az algasejt kloroplasztiszában és az endoplazmatikus retikulumban (ER) megy végbe, épp úgy, mint a hajtásos növényeknél (Zhang és mtsai. 2011). Bertalan és mtsai. (2007) úrkutatási kísérletekben a *C. reinhardtii* II. fotokémiai rendszerének stressztűrését vizsgálta. León és Galván (1997) kimutatták, hogy a *C. reinhardtii* magas sókoncentrációjú környezetben (200 mM NaCl) glicerint termel, ami ozmósziszabályozó másodlagos anyagcseretermék.

Remias (2010) vizsgálatai a hó vagy jég felszínén is tömegesen elszaporodni képes és vörös elszíneződést okozó *C. nivalis* (Wille 1903) pigmentösszetételére és fotoszintézisére irányultak megnövekedett UV-sugárzás mellett. Említésre méltó a „zöld hó” jelenség is, amelyet a sarkköri *C. ballenyana* (Kol 1968) és a Yellowstone Nemzeti Parkból izolált *C. yellowstonensis* (Kol 1941) idéz elő. Ez utóbbi előfordul a Kaukázusban is, ahol fagypony alatt tenyészik és mozogni is képes (Kol és Flint 1968). Dolhi és mtsai. (2013) szerint a sarkköri *C. raudensis* (Ettl 1976) jó modell a hidegben, szélsőséges körülmények között végbemenő fotoszintézis megértéséhez. A *C. altera* (Skuja 1943) szintén kriotoleráns (fagytűrő) faj (Harris 2009).

A környezet savasodása miatt olyan fajok kerültek előtérbe, mint a *C. acidophila* (Negoro 1944) vagy a *C. sphagnophila* (Pascher 1930). Ezek az algák képesek belső pH-szintjüket közel semleges szinten tartani, míg a közeg pH-ja, amelyben növekednek, 1,7 és 2,5 között változik (Visviki és Palladino 2001). Visviki és Santikul (2000) a *C. applanata* (Pringsheim 1930) fajt vizsgálták, amely 3,4 és 8,0 pH-érték között képes elviselni környezete kémhatásának változását, növekedési optimuma pedig 7,4-es pH értéknél van.

Említést érdemelnek a halotoleráns (sótűrő) fajok is, mint például a *C. reginae* (Ettl és Green 1973), a *C. pulsatilla* (Wollenweber 1926), a *C. angulosa* (Dill 1985) vagy a *C. provasolii* (Lee 1979). Ezeknek a fajoknak a génexpresszióját úgy vizsgálták, hogy közben ozmotikus és metabolikus stressznek vetették alá őket (Takeda és mtsai. 2003, Tamoi és mtsai. 2005, Tanaka és mtsai. 2004). A *C. reinhardtii* tenyészetekre „fehérjebioreaktor”-ként is tekinthetünk, ugyanis az általuk termelt rekombináns fehérjék gyógyászati célokat szolgálhatnak (Manuel és mtsai. 2007).

3.7.2. A biodízel-, a biogáz- és a hidrogéntermelés lehetőségei

Ma már széles körben ismert az a tény, hogy algákból bioüzemanyagot lehet előállítani (Dubini 2011). A heterotróf módon, sötétben is szaporodó *Chlamydomonas* kultúrák költséghatékony, nagy léptékű alternatív termesztési módszert jelenthetnek, mert egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítják a szerves szénvegyületeket. Ezzel a termesztési eljárással kiküszöbölhetők a leggyakoribb, fotoautotróf

rendszerekben előforduló akadályok, de nagyobb sejtsűrűség és termelékenység is jellemzi (Rodolfi és mtsai. 2009).

Az algákból előállított biomassa három fontos összetevőt tartalmaz: szénhidrátokat, fehérjéket és lipideket/természetes olajokat. Ez utóbbi miatt kerültek a zöldalgák a bioüzemanyagtermelés látókörébe (Chisti 2007). Gyorsan szaporodnak, általában 24 óránként megduplázzák tömegüket, de egyes képviselőik akár 3,5 óránként is osztódhatnak (Spolaore és mtsai. 2006). A mikroalgákból származó nyereséges biodízeltermeléshez ismernünk kell a lipidbioszintézis folyamatát. Emiatt kezdték vizsgálni a *C. reinhardtii* lipidanyagcseréjét (Cagnon és mtsai. 2013).

A mikroalga biomasszával való biogáztermelésre vonatkozóan kevés kísérleti adat van, pedig története több mint 50 évre nyúlik vissza, amikor *Scenedesmus* sp. és *Chlorella* sp. zöldalgák keverékét használták anaerob fermentorok táplálására (Golueke és mtsi. 1956, Wirth 2014). A legjobb biogázhozamot a *C. reinhardtii* szubsztrátként való felhasználásakor sikerült elérni (Mussgnug és mtsai. 2010). Megfigyelték, hogy a biogázhozam összefüggésben van az alga sejtfalának vastagságával, valamint a szubsztrát minőségével. Az alga biomassa szárítása 20%-kal csökkentette a gázhozamot.

A *Chlamydomonas* törzsek képesek hidrogén termelésére. Számos kutató dolgozott a fotobiológiai hidrogénprodukción tanulmányozásán (Melis és mtsai. 2000, Ghirardi és mtsai. 2005), a végbemenő folyamatok és enzimek jellemzésén (Greenbaum 1982, Ghirardi és mtsai. 2009). Laboratóriumban, tartós fotobiológiai hidrogéntermelést csak a fotoszintetikus O₂-termelés folyamatos gátlásával sikerült elérni, például

a kén megvonásával. Ez a módszer lehetővé tette a folyamatos hidrogéntermelést négy napon keresztül (Greenbaum 1988).

A *Chlamydomonas* törzsek hidrogéntermelésre sötét fermentáción keresztül is képesek (Gfeller és Gibbs 1984). Anaerob erjedéses körülmények között a piruvát oxidációja a piruvát-ferredoxin-oxidoreduktázokkal (PFR) történik. Ez CO₂-ot, acetyl-CoA-t és redukált ferredoxint (FDX) eredményez, ami elektront szállít a hidrogenáz enzimnek, hogy hidrogént termeljen (Ghirardi és mtsai. 2009). Lakatos és mtsai. (2014, 2017) számos vizsgálatot végeztek alga-baktérium társulásokon. A *Chlamydomonas* sp. MACC-549 esetében 1.2 mL L⁻¹ hidrogén hozamot mértek 24 óra alatt. Az eredmények rámutattak arra, hogy az algák hidrogéntermelésének legfontosabb tényezője az oxigénhiányos környezet, és a hatékony bakteriális légzés elengedhetetlen az alga Fe-hidrogenáz enzimjének aktiválásához.

3.7.3. A mezőgazdasági alkalmazás lehetőségei

A víz mellett a talaj a legfontosabb élőhely az algák, így a *Chlamydomonas* taxonok számára is (Zenova és mtsai. 1995). Mezőgazdasági területeken azért fontosak, mert potenciális nitrogén- és szénforrásként szolgálnak más élőlényeknek. A talaj termőképessége általában javul a talajalgák által termelt szerves anyagoktól. A hajtásos növények számára növekedést elősegítő anyagokat választanak ki, például hormonokat, vitaminokat, aminosavakat és szerves savakat. Jelenlétük stabilizálja a talaj felszínét, és ebből adódóan csökkentik az eróziót (Evans és Johansen 1999, Hu és mtsai. 2004). Néhány talajalga által előállított poliszacharid növeli a talaj aggregációját és vízmegtartó képességét.

A *Chlamydomonas*-ok mezőgazdasági alkalmazása a talajkondicionálás és a növényi biostimuláns hatás lehet. Az EPS a talajkondicionálásra, a minden algában előforduló növényi hormonok miatt pedig a biostimuláns hatás kifejtésére alkalmasak.

A *Chlamydomonas* zöldalga ostorai segítségével vizes közegben úszó, a talajban pedig kúszó mozgásra képes. Amikor ostorai szilárd közeggel érintkeznek (például talajszemcsével), az ostorvégekkel odatapad (Bloodgood 1990). Az Egyesült Államokban sikerrel alkalmaztak zselés állagú anyagot kibocsátó zöldalgákat (*Chlamydomonas*, *Asterococcus*) mezőgazdasági talajok szerkezetjavítására (Metting és Rayburn 1983, Barclay és Lewin 1985, Metting 1987). A felszíni talajréteg poliszacharid tartalma jelentősen nőtt, és bár szabadföldi körülmények között az algaszaporodás csak megfelelő vízellátottság mellett tartható fenn, a zselés állagú anyagot kibocsátó zöldalgák és cianobaktériumok talajkondicionálóként történő felhasználása ígéretesnek bizonyult (Metting 1988, Zimmerman 1992, Falchini és mtsai. 1996). Az évenkénti talajoltás a *C. mexicana* (Lewin 1957) zöldalgával enyhén növelte a talajok szénhidrát tartalmát az USA-ban (Metting és Rayburn 1983). Visviki és Palladino (2001) a *C. acidophila* fajon végzett szaporodási és sejttani vizsgálatokat savas körülmények között, ugyanis pH 2,0 körül is szaporodik, így elképzelhető savas talajokon történő alkalmazása.

A *Chlamydomonas* sejtek által termelt extracelluláris polimerek szerepe egyfelől a sejtek a talaj legfelsőbb rétegeibe történő kötődésének elősegítése, ahol fotoszintézis útján tovább szaporodhatnak, másfelől, hogy ellenálljanak a kiszáradásnak, amivel szemben a kocsonyaburok nélküli sejtek védtelenek (Barclay és Lewin 1985). Emellett ez az anyag

elősegíti az aggregátum képződést és fontos lehet szilárd és folyékony fázisokkal alkotott ionos kölcsönhatásokban (Martin 1971). Metting és Rayburn (1983) gyakorlati bizonyítékot szolgáltatottak a mikroalgák talajkondicionálóként történő felhasználására. Metting (1986) szintén terepen elemezte a *C. sajabo* (Lewin 1984) populációdinamikáját és annak hatását a talaj aggregátum stabilizálására. Kroen (1984) pedig a *C. mexicana* növekedését és poliszacharid termelését tanulmányozta termőföldön.

3.8. Extracelluláris poliszacharidok (EPS) és meghatározásuk

Az "EPS" kifejezést Sutherland 1972-ben használta először a nagy molekulású, baktériumok által termelt szénhidrát-polimerek (Costerton és mtsai. 1999) leírására. Az EPS termelése vagy a biofilm kialakulása elősegíti a baktériumok és algák túlélését szélsőséges hőmérséklet, sótartalom és bizonyos tápanyagok hiánya mellett (Poli és mtsai. 2010). Az EPS számos funkciót lát el és sok olyan különböző biológiai folyamatban vesz részt, mint amilyen például a szerves anyagok szállítása és átalakítása, az oldott fémek komplexálása és az elemek biogeokémiai cirkuláltatása. Ezenkívül az EPS fontos szénforrás a tápláléklánc különböző szereplői számára, mivel szerves szénben gazdag. Attól függően, hogy a sejt az EPS-t a külvilágba bocsájtja, vagy a sejtfalához kötve tartja, megkülönböztethetünk oldható (sEPS – az angol „soluble” szóból) és kötött frakciót (bEPS – az angol „bound” szóból).

A vízoldható EPS szerepet játszik a flokkulációban és az EPS természetéből adódóan szabályozza a pelyhek kialakulásának sebességét.

Például a szulfátok dezoxi-cukrok jelenlétében pelyheket hozhatnak létre (Zhou és mtsai. 1998, Delattre és mtsai. 2016). A hasznos tulajdonságai magukban foglalják a stabilizáló, szuszpendáló, vastagító, pelyhesítő, kapszulázó, emulgeáló és vízmegtartó képességet. Az ilyen tulajdonságoknak köszönhetően a poliszacharidok széles körű alkalmazási lehetőséggel rendelkeznek a textiliparban, a gyógyszeriparban, a kozmetikai iparban és a sörfőzésben (Raza és mtsai. 2012).

Szintén bőséges forrásai a szerkezetileg és beltartalmilag változatos biopolimereknek, amelyek egyedülálló bioaktivitással rendelkeznek különleges, nagy értékű alkalmazásokhoz, különösképpen vírusellenes és tumorellenes szerként, antioxidánsként, antikoagulánsként illetve gyulladásgátlóként. Kiváló reológiai tulajdonságai miatt a mikroalga eredetű EPS különösen hasznos a gépiparban (pl. biolubrikáns és turbulencia-csökkentő csövekben) és az élelmiszeriparban (pl. sűrítő- és tartósítószer, Xiao és Zheng 2016).

Az olyan mikroalga eredetű poliszacharidok, mint például az agar, az alginátok és a karragének az algák gazdasági szempontból legfontosabb termékei (Pulz és Gross 2004). A mikrobiális exopoliszacharidok (EPS) szintén fokozott figyelmet kapnak, mert biológiai úton lebomlanak, általában nem mérgezők és nem okoznak másodlagos szennyezést. Ezért nagy érdeklődés mutatkozik az algatörzsek kutatása iránt az értékes vegyületek felfedezése miatt. Ilyenek lehetnek az új poliszacharidok, amelyek versenyezhetnek a hagyományos poliszacharidokkal.

Ami a kötött, bEPS-t illeti legfőbb képviselője a cellulóz, amelyet a papírgyártásban, rostanyag-gyártásban (pl. viszkóz, acetát, triacetát), robbanóanyagok (lőgyapot), és celofán gyártására használnak. Ezen kívül

az élelmiszeriparban emulgeálószerként, térfogatnövelőként és diétás rostanyagként terjedt el (Crawford 1981).

Delattre és mtsai. (2016) négy kategóriát különböztet meg a mikroalgákból származó EPS mennyiségi elemzéséhez.

Az első csoport összefoglalja a teljes összetételt és olyan módszereket foglal magában, mint a teljes cukor (fenol-kénsav módszer), a semleges cukor, az uronsav, a polifenol és a fehérje mérése. Ezek a módszerek költséghatékonyak és megbízhatóak, de figyelmet kell fordítani más vegyületekre, például lipidekre, fehérjékre és pigmentekre, amelyek befolyásolhatják az elemzést (DuBois és mtsai. 1956). Ma a fenol-kénsav módszer (DuBois és mtsai. 1956) továbbra is a legmegbízhatóbb és széles körben alkalmazott módszer, amely segítségével a minta minden egyes monoszacharidját pontosan meg lehet becsülni (Albalasmeh és mtsai. 2013). Ez a módszer közelít egy olyan "univerzális eljáráshoz", amellyel a cukrok minden típusa meghatározható, beleértve a nukleinsavakat és egyéb cukorszarmazékok szénhidrátmaradványait is (Herbert és mtsai. 1971). Emellett a teljes szénhidrát elemzésre alkalmasnak találták, mivel a moláris elnyelési értékei a legtöbb cukor esetében egy rövid hatótávolságon belülre esnek (Gerchakov és Hatcher 1972). Bár a módszer szinte minden szénhidrátot észlel, a különböző szénhidrátok elnyelése változó. Tehát, ha csak nem ismeretes, hogy a minta egy szénhidrátot tartalmaz, az eredményeket önkényesen egy szénhidrát esetében kell kifejezni. Ezt a módszert azért választottam a jelen tanulmányra, mert költséghatékony.

A második csoport a kromatográfiai módszerek. Ilyen például a moláris összetétel becsléséhez használt HPLC (nagyhatékonyságú (nagynyomású) folyadékkromatográfia) és a GC (gázkromatográfia).

Gyors, automatizált és rendkívül pontos módszereket nyújtanak egyes minták kémiai összetevőinek azonosítására, de költségesek, bonyolultak és nem minden minta esetében működnek.

A harmadik csoport erős kémiai módosításokon alapszik. Ilyen például az NMR (mágneses magrezonancia spektroszkópia), amely a kötések vizsgálatához szükséges. A legfontosabb előnye, hogy nem-destruktív jellegű, gyors és megkönnyíti a minta előkészítését. Azonban van néhány hátránya, mint például, hogy drága és csak korlátozott hullámhossz-tartományon használható.

Az utolsó csoport teljes szerkezeti elemzést tesz lehetővé, amelyet modifikációkkal / degradációs eljárásokkal és homo- és heteronukleáris 2D NMR-rel (kétdimenziós magmágneses magrezonancia spektroszkópia) lehet kivitelezni. A részletes molekuláris szerkezet meghatározása drága és időigényes, de rendkívül hatékony.

A rendelkezésre álló szakirodalom szerint a *Chlamydomonas* fajok ígéretes alanyai az EPS-hez kapcsolódó vizsgálatoknak. Allard és Tazi (1993) két *Chlamydomonas* fajt vizsgáltak gázkromatográfiával és közleményük szerint a *C. augustae* (Skuja 1943) által kibocsátott EPS főleg arabinózt, glükózt, galaktózt tartalmazott a növekedési fázis kezdetekor, valamint glükózt és glükuronsavat a stacioner fázisban. Éles ellentétben vele, a *C. corrosa* Pascher és Jahoda (1928) EPS szintje független volt a növekedési állapottól és fő cukorként arabinózt és galaktózt tartalmazott. Lewin (1956) tizennyolc egysejtű vagy koloniális zöld algát, főként *Chlamydomonas* fajokat vizsgált papírkromatográfiás módszerrel. Egy kivételével minden fajban a galaktóz és az arabinóz voltak a poliszacharidok fő alkotórészei. A *C. ulvaensis* Lewin (1957) fajban a glükóz és a xilóz dominált. A hozzájuk kapcsolódó

cukorcsoportok között volt a fruktóz, ramnóz, mannóz, uronsav és számos azonosítatlan összetevő. Jiang és Barber (1975) molekuláris szita kromatográfiával meghatározta a *C. reinhardtii* sejtfa poliszacharid tartalmát és a mintában arabinózt, mannózt, galaktózt illetve glükózt azonosítottak. Bafana (2013) elemezte a *C. reinhardtii* fajból származó EPS antioxidáns jelenlétét GC-MS (gázkromatográfia-tömegspektrometria) által. A kémiai elemzés galakturonsav, ribóz, arabinóz, xilóz, glükóz, galaktóz és ramnóz jelenlétét mutatta ki. Az MACC törzsekről eddig nem készült ilyen jellegű tanulmány, így munkám egyik célja a kiválasztott MACC *Chlamydomonas* törzsek EPS tartalmának vizsgálata volt.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Taxonómiai újraértékelés molekuláris adatok felhasználásával

4.1.1. Laboratóriumi algatenyésztés

Hetven, korábban morfológiai szempontból *Chlamydomonas*-ként azonosított (4. Táblázat) törzset választottam ki a Széchenyi István Egyetem Mosonmagyaróvári Algagyűjteményéből (MACC). A törzsek közül 46 Brazíliából, 11 Magyarországról, 9 Csehországból, 2 Ukrajnából, egy Szlovéniából és egy Oroszországból származott. A *Chlamydomonas* törzsek tenyészeit Ördög (1982) korábban leírt tenyésztő berendezésében szaporítottam a következők szerint: A törzstenyészetekből 500 mL-es Erlenmeyer-lombikokban lévő 250 ml módosított Zehnder-8 tápközegbe oltottam (Kotai 1972), amelyet a következő összetevők alkottak:

Zehnder Z 8 tápoldat 1 L oldathoz

1. Törzsoldat (300 mL desztillált vízben feloldva): 3 mL

NaNO ₃	46,7 g
Ca(NO ₃) ₂	5,9 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2,5 g

2. Törzsoldat (300 mL desztillált vízben feloldva): 1 mLK₂HPO₄ 9,3 gNa₂CO₃ 6,3 g**3. Törzsoldat (500 mL desztillált vízben feloldva): 10 mL**FeCl₃ * 6H₂O + HCl (150 mL desztillált vízben feloldva) 5 mL 1,3515 g és 1,5 mLNa₂-EDTA (150 mL desztillált vízben feloldva) 5 mL 2,1915 g**4. Törzsoldat (500 mL desztillált vízben feloldva): 0,08 mL**Na₂SiO₃ * 9H₂O 25,0 mgH₃BO₃ 1550,0 mgMnCl₂ * 4H₂O 1115,0 mg(NH₄)₆Mo₇O₂₄ * 4H₂O 44,0 mg

KBr 59,5 mg

KI 41,5 mg

ZnSO₄ * 7H₂O 143,5 mgCo(NO₃)₂ * 6H₂O 73,0 mgCuSO₄ * 5 H₂O 62,5 mgAl₂(SO₄)₃ * 18H₂O 237,0 mgLiCl * H₂O 25,0 mg

A tenyészeteket 24-26 °C-os tenyésztő szobában szaporítottam és 130 μmol foton m⁻² s⁻¹ fényintenzitást biztosító Lumoflor és fehér fényű fénycsövekkel világítottam meg (14 h/10 h fény/sötét ciklus). A

tenyészeteket 20 L h^{-1} (= $1,33 \text{ L levegő L}^{-1}$ tápközeg percenként) steril, párásított levegővel buborékoltattam át, amit a fényszakaszban $1,5\%$ széndioxiddal dúsítottam.

4.1.2. Alaktani vizsgálatok

A törzsek tenyészeiben a sejteket és azok alaktani jellemzőit Olympus BX60 mikroszkóppal és a hozzá kapcsolt digitális fényképezőgéppel (Olympus DP 70, 400x) vizsgáltam. A sejtek méretét képelemző szoftverrel (Olympus DP Soft 3.2) határoztam meg. A fotók kontrasztját az Adobe Lightroom szoftverrel fokoztam, míg a képösszeállításokat a Fotor 2.0.3 programmal készítettem. A törzsek alaktani vizsgálata Ettl (1983) munkája nyomán készült. Mivel a legtöbb törzs fénymikroszkópos vizsgálatokon alapuló alaktanát (LM) már korábban leírták, csak azokat a képeket mutattam be, amelyek az Eredmények részben is kiemelt, fontos jellemvonásokkal bírnak (13. Ábra). Az összes vizsgált törzs fénymikroszkópos képe a Mellékletek fejezetben a 17. Ábra, 18. Ábra, 19. Ábra, 20. Ábra, 21. Ábra és 22. Ábra részeként került bemutatásra.

4.1.3. A genomi DNS extrakciója és a PCR módszer, szekvenálás

1 mL algaszuszpenziót 14000 g-n centrifugáltam 2 percig. A centrifugálás után a felülúszót pipettával eltávolítottam, majd egy körülbelül $10\text{-}20 \text{ mg-os}$ pelletet szuszpendáltam $500 \mu\text{L}$ ddH₂O-ban hígított 10-os Chelex-100-ban. A szuszpenziót 30 másodpercig

vortexeltem és 95 °C-on (Eppendorf ThermoMixer) 10 percig inkubáltam. A mintát 20 °C-ra hűtöttem le (Eppendorf ThermoMixer) és ismételen 10 másodpercig vortexeltem majd ezt követően 2 percig centrifugáltam 14000 g-n. A felülúszóból 1 µL-t adtam hozzá minden egyes 19 µL PCR mixhez. A 18S rRNS gén egy szakaszát az EUK528F (5-'CCGCGGTAATTCCAGCTC-3 ') (Elwood és mtsai. 1985, Keresztes és mtsai. 2012) és Chlo02R (5'-CTTCGAGCCCCCAACTTTC-3'), rövid, egyszálú DNS-szakaszokkal, primerekkel (Zhu és mtsai. 2005) amplifikáltam (Bio Basic Canada Inc.) A PCR mix 10 µL Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix-et, 7 µL ddH₂O-ot, 1-1 µL primert (0.5 µM végső koncentráció primerenként) és 1 µL tisztított DNS-t (50-100 ng) tartalmazott. Az Euk528f forward primer kapcsolódási pozíciója 573-590, míg a Chlo02R reverse primer kapcsolódási pozíciója 996-979. A primerek kapcsolódási pozíciójának megállapítása a *Chlorella vulgaris* SAG 211-11b törzs 18S rRNS szekvenciája alapján (X13688; Huss és Sogin, 1989) történt.

A PCR-programban az első ciklus előtti ún. elődenaturálás 98 °C-on 30 másodpercig tartott, ezt követte a denaturálás 98 °C-on 10 másodpercig, majd a hibridizációs lépés 58 °C-on 20 másodpercig tartott ezután 72 °C-on 30 másodpercig történt a hosszabbítás. Ez a 3 lépés 40 cikluson keresztül ismétlődött. Ezt követte a végső hosszabbítás (72 °C-on 1 perc). A DNS amplifikáció után a termékeket 45 percig 120 V-on 0,5%-os TBE pufferben, 0,1 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó 1,5%-os agaróz gélen futtattam és a DNS-t 254 nm-es UV-fénnyel megvilágítva tettem láthatóvá. A PCR termékek hossza 380 és 400 bázispár között változott. A PCR termékeket GeneJET gél extrakciós készlet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) alkalmazásával tisztítottam. A PCR

termékek LifeTech 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kapilláris szekvenálása a Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Kutató Központjában történt (Szeged, Magyarország) Dr. Maróti Gergely és munkatársai segítségével. A szekvenálás egy irányból, a forward primerrel történt. A szekvenciáknak csak minimális, néhány bázispáros, minőségileg nem megfelelő eleje került törlésre. Mivel méretükből adódóan az MACC szekvenciák nem nyúltak túl a hosszabb referencia szekvenciákon, így ilyen okból nem kellett vágni belőlük.

4.1.4. A szekvencia igazítás és a filogenetikai elemzés

A *Chlamydomonadaceae* törzsek (Lemieux és mtsai. 2015, Nakada és Tomita 2016, Possmayer és mtsai. 2016, Watanabe és Lewis 2017) referencia szekvenciáit a GenBank-ból (NCBI) (Altschul és mtsai. 1997) nyertem ki. A szekvenciákat a MUSCLE módszer (Edgar 2004) alapján a MEGA 7 szoftverrel (Kumar és mtsai. 2015) elemeztem. A jModelTest 2 teszt megerősítéséhez a TIM2 + G + I szubsztitúciós modellt (Darriba és mtsai. 2012) használtam. A maximum likelihood (ML) elemzést egy 265 szekvenciából álló adathalmazon futtattam a RAxML program (Stamatakis 2014) használatával 1000 bootstraps-en. Az *Ulothrix zonata* UTEX 745-t használtam a fa gyökerének alapjául (Lee és Hur 2012). A végső filogenetikai fát az Adobe Illustrator CC 2014.01 verziójával szerkesztettem. Az MACC törzsek hasonlósági mátrixát (a 18S rRNS részszekvenciák közötti százalékos hasonlóságokat) Geneious 10.2.3 szoftverrel számítottam ki.

4.2. Az EPS vizsgálata

4.2.1. Az algatörzsek szaporítása

Hús zöldalga törzset választottam ki a Mosonmagyaróvári Algagyűjteményből (MACC), amelyek a Petri-csészés szaporítás során Z8 táptalajon zselészerű anyagot állítottak elő (3. Táblázat). A törzseket Ördög (1982) korábban leírt tenyésztő berendezésében szaporítottam (lásd 4.1.1. fejezet). A tenyészetekből 30 napon át minden ötödik napon 20 mL mintát gyűjtöttem, 10 mL-t a szárazanyag, 10 mL-t pedig EPS meghatározásra. Az algatörzsek növekedését a szárazanyag (SZA) tartalom meghatározásával jellemeztem. A fenti kísérletet minden törzssel háromszor megismételtem.

3. Táblázat Az EPS vizsgálatokba bevont MACC törzsek, taxonómiai megnevezésük, eredetük és növekedési jellemzőik laboratóriumi körülmények között.

MACC-kód	Törzsek taxonómiai megnevezése	Származási hely	Növekedési jellemzők laboratóriumi körülmények között
75	<i>Chlamydomonas subtilis</i> (Pringsheim 1930)	CCAO 249 (Trebon)	Tapad a lombik aljához és alga lemezek úsznak a tápoldatban.
194	<i>Chlamydomonas gloeogama</i> (Korshikov in Pascher 1927b)	Napraforgó ültetvény, Magyarország	Nem tapad a lombikhoz, de enyhén habzik. Homogén és nagyon nehéz szűrni.
327	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Brazília	Nem tapad a lombikhoz. Sötétzöld és nehéz szűrni.
382	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Brazília	Sötétzöld. Nem tapad a lombik falához. Kissé habzik. Könnyű szűrni.
398	<i>Chlamydomonas sp.</i>	AL/G-23, Csehország	Kicsit habzik. Homogén, nem tapad a lombikhoz. Nagyon nehéz szűrni, teljesen zselés állagú.
402	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Napraforgó ültetvény, Magyarország	Nem tapad a lombikhoz. Sötétzöld és könnyű szűrni.
460	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Pocsolya, Brazília	Enyhén habzik. Enyhén tapad a lombikhoz. Nehéz szűrni. Sűrű, szirupszerű fázis.
526	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Brazília	A lombik aljához és falához is egyformán tapad. Lemezek úsznak a tápoldatban. Sárgászöld színe van.
530	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Brazília	Világoszöld, enyhén tapad a lombik falához és nehéz szűrni.
531	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Brazília	Világoszöld. Nem tapad a lombikhoz. Nehéz szűrni.
544	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Brazília	Világoszöld, nagyon nehéz szűrni.

3. Táblázat folytatása Az EPS vizsgálatokba bevont MACC törzsek, taxonómiai megnevezésük, eredetük és növekedési jellemzőik laboratóriumi körülmények között.

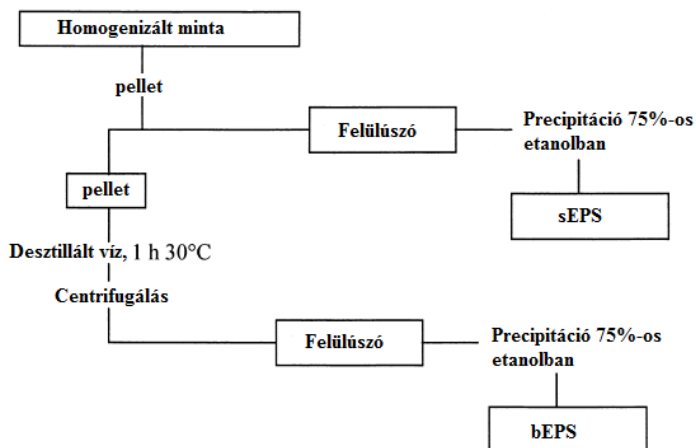
549	<i>Chlamydomonas intermedia</i> (Chodat 1894)	Talaj, Magyarország	Sötétzöld. Nem habzik. Tapad a lombikhoz és sok összetapadt algalemezt tartalmaz. Nehéz szűrni.
579	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Magyarország	Világoszöld, nem habzik és tapad. Könnyű szűrni.
674	<i>Chlamydomonas callunae</i> (Ettl 1976)	Kijev, Ukrajna	Világoszöld, nehéz szűrni.
771	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Brazília	Homogén, sötétzöld. Nem tapad a lombikhoz és nem habzik. Közepes a szűrhetősége.
784	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Dangeard 1988)	Talaj, Brazília	Homogén, világoszöld. Enyhén tapad a lombik falához. Kissé habzik. Könnyű szűrni.
788	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Dangeard 1988)	Talaj, Brazília	Erősen tapad a lombikhoz. Nehéz szűrni. Világoszöld.
806	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Brazília	Kissé tapad a lombikhoz. Homogén, zöld, erősen habzik és nehéz szűrni.
825	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Brazília	Kissé tapad a lombikhoz. Homogén, sötétzöld, erősen habzik és nehéz szűrni.
835	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Talaj, Brazília	Sötétzöld, nagyon nehéz szűrni.

4.2.2. Szárazanyag tartalom meghatározása

Whatman GF/C üvegszálás szűrőket (5 cm átmérőjű) szárítottam 2 órán át 105°C-on, majd exsikkátorban lehűtöttem és megmértem a tömegüket. A tenyészetekből leszűrtem 10 mL algamintát. Mindegyik szűrőt ismét 2 órán át 105 ° C-on szárítottam, majd exsikkátorban lehűtöttem és lemértem. A szuszpenzió sűrűségét g L⁻¹ SZA-ban számítottam ki. A három ismétlésben végzett mérések eredményeiből készítettem a szaporodásgörbéket.

4.2.3. Az EPS kivonása

A szénhidrátokat a 2. Ábra szerint két különböző frakcióban fenolkénsavas módszerrel mértem (DuBois és mtsai. 1956). Az oldható és kötött EPS elkülönítését *DeBrouwer és Stal* módszere (2002) alapján végeztem. Az oldható EPS-t úgy nyertem ki, hogy 10 mL algaszuszpenziót 15 percig szobahőmérsékleten centrifugáltam 3500 g-n. A sejtmentes felülúszót 30 mL hideg etanolt (75%) tartalmazó centrifugacsőbe vittem át és az oldható EPS-t hagytam egy éjszakán át kicsapódni -20 °C-on. Centrifugálás után (15 perc 3500 g) az EPS-üledéket folyékony nitrogénnel szárítottam, majd 300 µL desztillált vízben szuszpendáltam (2. Ábra). A szénhidrát meghatározásához 200 µL-t használtam fel. A kötött EPS-t úgy extraháltam, hogy az előző folyamatból visszamaradt 100 µL pelletet 2 mL desztillált vízben szuszpendáltam. A szuszpenziót alaposan összekevertem és 1 órán át 30 °C-on inkubáltam. A 3500 g-n 15 percig végzett centrifugálás után a kötött EPS-t a felülúszóból az oldott EPS-hez hasonló módon meghatároztam (2. Ábra).



2. Ábra Az extracelluláris szénhidrát frakcionálása *DeBrouwer és Stal* (2002) módszere alapján.

4.2.4. Szénhidrát mérés fenol-kénsavas módszerrel

A módszer lényege, hogy a tömény kénsav minden poliszacharidot, oligoszacharidot és diszacharidot monoszacharidokra bont le. A pentózok (5 szénatomos vegyületek) ezután furfurollá dehidratálódnak, a hexózok (6-szénatomos vegyületek) pedig hidroximetil-furfurollá. Ezek a vegyületek ezután a fenollal visszahatva aransárgává válnak. Az elegy elnyelését 485 nm-en mérik, a szénhidrát mennyiségének meghatározása, glükóz hígítási sorból készített kalibrációs egyenes segítségével állapítható meg (DuBois és mtsai. 1956). Ennek a reakciónak a színe több órán át változatlan marad, ezért a módszer pontossága optimális körülmények között $\pm 2\%$ -on belül van (Nielsen 2010).

Készítettem egy 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentrációjú glükóz-törzsoldatot, ebből pedig hígítással további 5 koncentrációt 0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tartományban

(Moheimani és mtsai. 2013). Ezután 400 μL glükóz oldatot kevertem össze 400 μL 5%-os fenollal és 2 mL koncentrált kénsavval. Ezeket az oldatokat 15-20 percig szobahőmérsékleten tároltam. A fényelnyelést 485 nm-en (Varian CARY 50 spektrofotométer) mértem. A glükóz standard görbét három ismétlés felhasználásával állítottam elő. A különböző frakcionált EPS-kivonatokat 1 mL autoklávozott desztillált vízben feloldottam. Minden egyes mintához új, steril kémcsövet használtam. Az oldatból 400 μL -t elegyítettem 400 μL 5%-os fenollal és 2 mL koncentrált kénsavval. A keverékeket szobahőmérsékleten tároltam, végül a fényelnyelést 485 nm-en mértem. A szénhidrátot glükóz ekvivalens formájában adtam meg a glükóz standard görbe felhasználásával. A méréseket mintánként három ismétléssel végeztem.

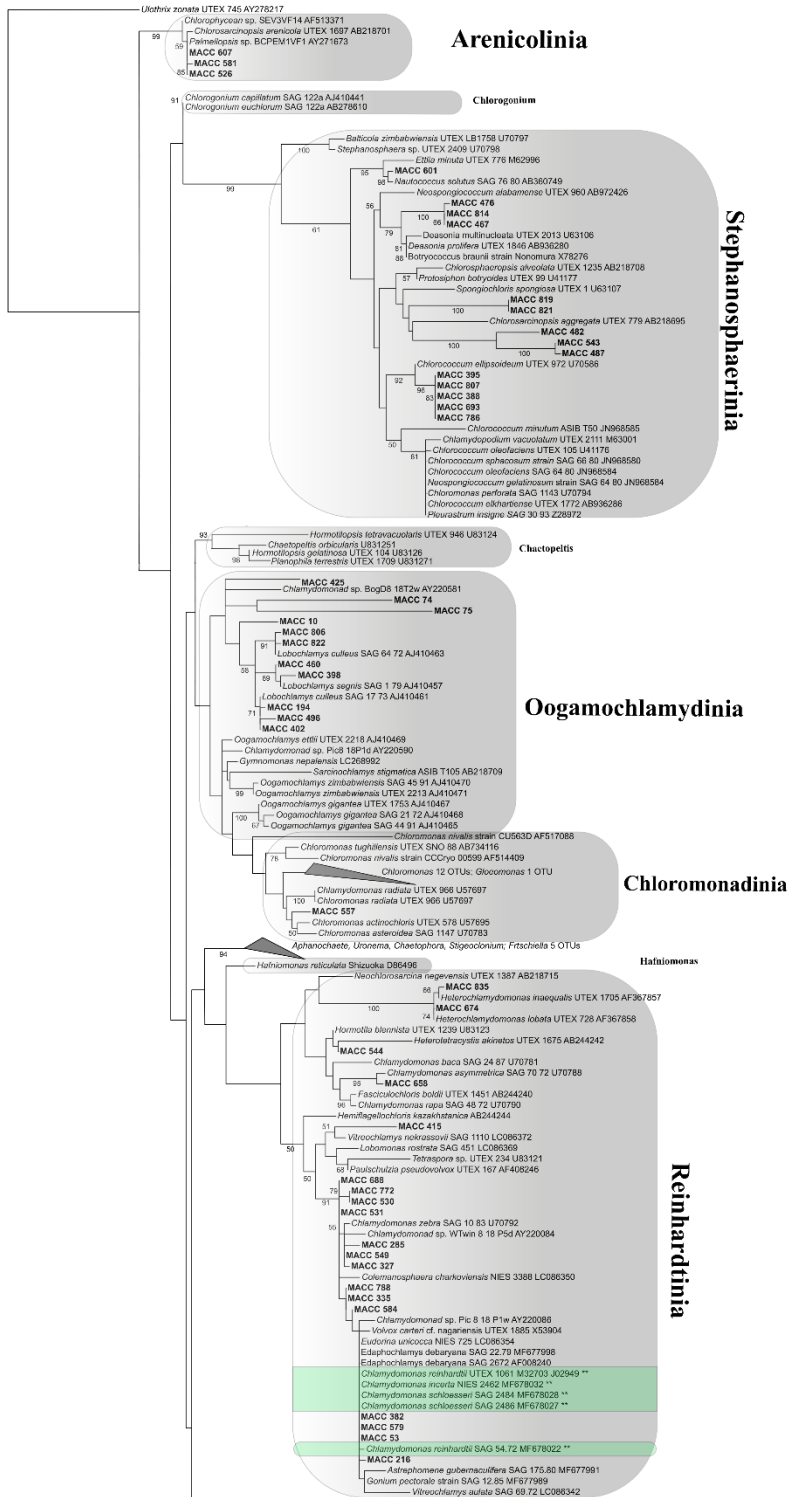
5. EREDMÉNYEK

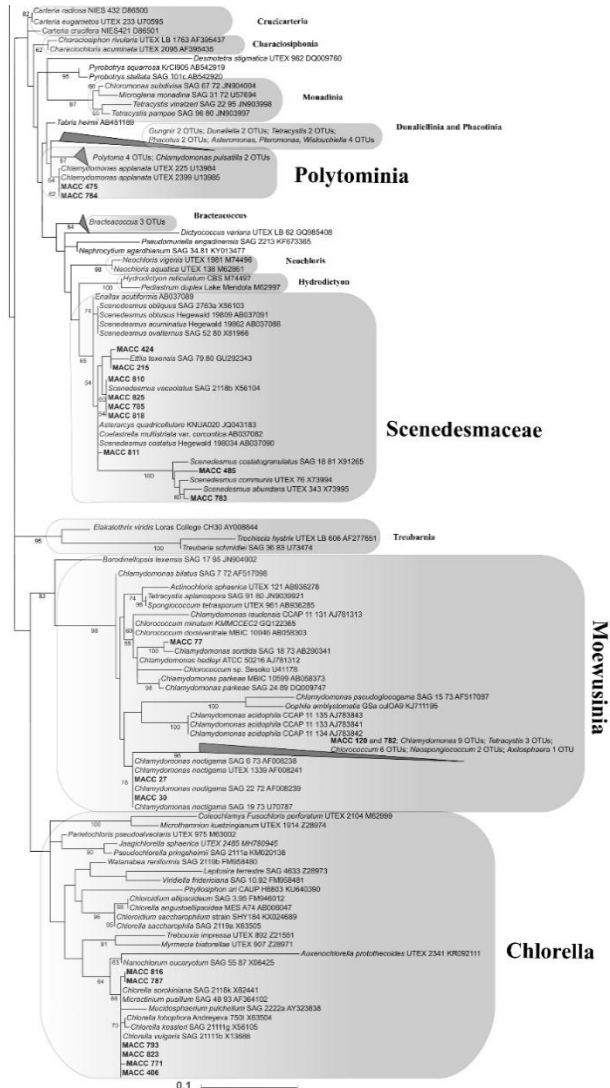
5.1. A filogenetikai és morfológiai elemzés

A végső szekvencia-illesztés, beleértve a törzseket is, 279 OTU-ból (operational taxonomical unit - operatív taxonómiai egység) állt. Kilenc különböző filogenetikai csoportot sikerült elkülöníteni, amelyeket három különböző rendbe soroltam (Nakada 2008b nyomán) (3. Ábra). A vizsgált törzsek az egész fán megtalálhatóak, különböző filogenetikai csoportokat alkotva (3. Ábra). *Chlorellales* rendhez egy filogenetikai csoport tartozott (*Chlorella* filogenetikai csoport 6 MACC törzssel), egy másik filogenetikai csoport a *Sphaeropleales* rend részét képezte (*Scenedesmaceae* filogenetikai csoport 9 MACC törzssel). Hét filogenetikai csoport pedig a *Chlamydomonadales* rendhez sorolódott az elemzés során (Moewusinia 5, Reinhardtinia 19, Arenicolinia 3, Stephanosphaerinia 14, Chloromonadinia 1, Oogamochlamydia 11 és a Polytominia filogenetikai csoport 2 MACC törzssel). A molekuláris adatokból kiderült, hogy a 70 törzs közül 22 *Chlamydomonas*, 9 a *Scenedesmus* nemzetség tagja, 8 *Chlorosarcinopsis*, 8 *Lobochlamys*, 6 *Chlorella*, 5 *Chlorococcum*, 3 *Deasonia*, 2 *Heterochlamydomonas*, 1-1 *Chloromonas*, *Nautococcus* és *Tetraspora*, míg 4 törzs besorolása továbbra is megoldatlan.

Végeredményben az MACC 27, 30, 53, 77, 120, 216, 285, 327, 335, 382, 475, 530, 531, 549, 579, 584, 658, 688, 772, 782, 784, 788 törzsek maradtak a *Chlamydomonas* nemzetségben, melyekből 15 a Reinhardtinia, 5 a Moewusinia és 2 a Polytominia kládba tartozik. A

korábbi alaktani és a jelenlegi filogenetikai elemzés eredményeit a 4. Táblázatban mutattam be, míg a Mellékletekben a fénymikroszkópos képeket taglaltam (17-22 Ábrák).

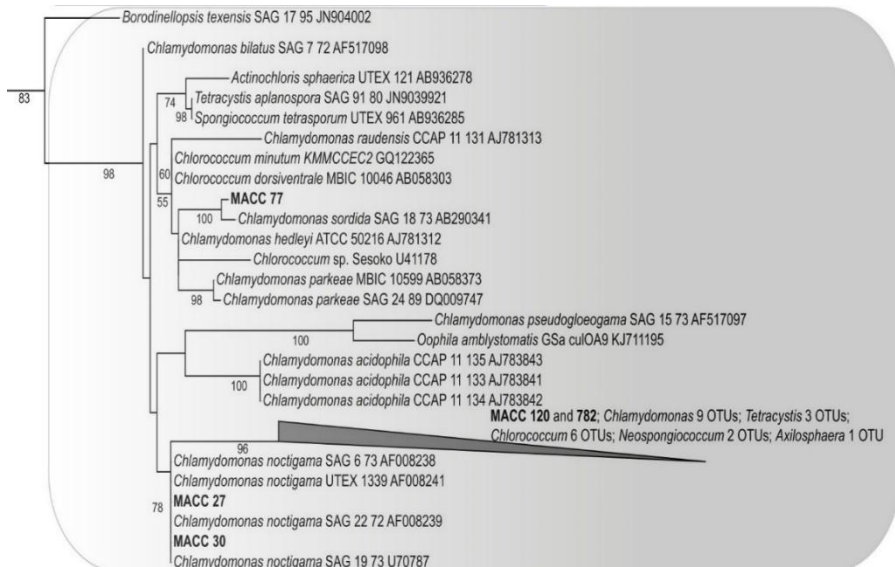




3. Ábra A részleges 18S rRNS gén filogenetikai elemzése. A 70 vizsgált törzset 279, a szakirodalomban már korábban vizsgált törzs segítségével helyeztem el a zöldalgák fáján. Az MACC törzsek kódjait félkövérrel emeltem ki. A szekvenált szakasz hossza 380 és 400 bázispár között változott. A maximum likelihood (ML) módszer segítségével meghatározott bootstrap értéket ($\geq 50\%$) a csomópontok mellett tüntettem fel. Skála = 0,1 szubsztitúció/nukleotid pozíció.

5.1.1. A *Chlamydomonadales* rend

5.1.1.1. A *Moewusinia* filogenetikai csoport



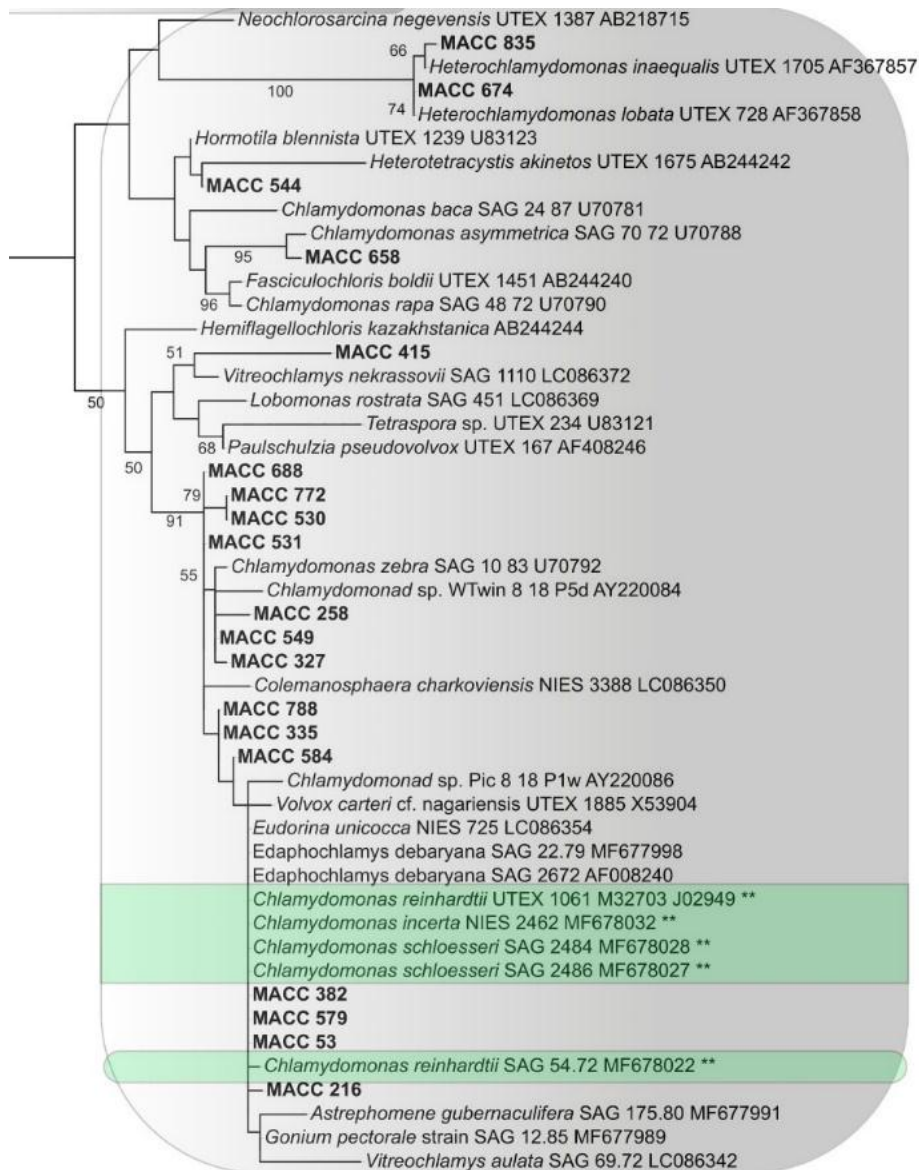
4. Ábra A *Moewusinia* filogenetikai csoport

A *Moewusinia* filogenetikai csoport (4. Ábra) a filogenetikai elemzéssel jól alátámasztott csoport [Bootstrap 99%], mely öt MACC törzset (MACC 27, 30, 77, 120, 782) tartalmazott. A törzseket két alcsoportra osztottam fel. Az első alcsoport tartalmazta az MACC 120 és a 782 törzseket. Az MACC 120 a *Chlamydomonas moewusii* CCAP 11 / 16F referencia törzsszel alkotott csoportot és részleges 18S rRNS hasonlóságuk 98,2% volt. Az MACC 782 csak 94,9%-ban volt hasonló a *C. raudensis* SAG 49.72 referencia törzshöz.

A második alcsoport az MACC 27-et, 30-at és 77-et tartalmazta. Mind az MACC 27, mind pedig a 30 közel volt a *Chlamydomonas noctigama* (más néven *C. pinicola*) UTEX 1339 (Kawasaki és Nakada

2015, Watanabe és Lewis 2017) referencia törzshöz és az előbbi 97,5% az utóbbi pedig 99,1%-ban hasonlított arra. Az MACC 77 a *C. sordida* SAG 18.73 törzshöz kapcsolódott és a részleges 18S rRNS gén hasonlóságuk 97% volt. A második alcsoport tagjai a CCALA-ból (Culture Collection of Autotrophic Organisms – Autotróf Szervezetek Törzsgyűjteménye) származtak (Trebon, Cseh Köztársaság) (4. Táblázat). A sejteknek csésze alakú kloroplasztisza és apikális összehúzódó vakuóluma volt. A pontszerű szemfolt oldalirányban helyezkedett el. A sejteknek két, a sejttel azonos hosszúságú ostora volt. A sejtmag központi elhelyezkedésű volt és a sejtek egy oldalsó pirenoiddal rendelkeztek. Az első alcsoport sejteinek alakta más volt, mint a második alcsoporté, valószínűleg a különböző származási helyek miatt. Az MACC 120-at egy gleccsertóból (Szlovénia) izolálták, míg az MACC 782 talajmintából származott (Brazília). A plasztiszok alakja és az összehúzódó vakuólum hasonló volt, de a szemfolt, az ostorok hossza, a sejtmag helye és a pirenoidok különböztek.

5.1.1.2. A Reinhardtinia filogenetikai csoport



5. Ábra A Reinhardtinia filogenetikai csoport

A Reinhardtinia filogenetikai csoport (5. Ábra) 19 MACC törzset (MACC 53, 216, 285, 327, 335, 382, 415, 530, 531, 544, 549, 579, 584,

658, 674, 688, 772, 788, 835) és három szubkládot foglalt magába (4. Táblázat).

Az első szubklád (100%-os bootstrap támogatottsággal) két törzset tartalmazott, MACC 674 és 835, valamint *Heterochlamydomonas* referenciaszekvenciákat. Az MACC 674 99%-ban hasonlított a *H. lobata* UTEX 728 törzshöz, míg az MACC 835 98,5%-ban volt azonos a *H. inaequalis* UTEX 1705-tel. A fő különbség a *Heterochlamydomonas* és a *Chlamydomonas* nemzetség között az, hogy az előbbinek két egyenlőtlen hosszúságú ostora van. Az alaktanuk tekintetében, mind az MACC 674, mind pedig az MACC 835 is tartalmaz csésze alakú kloroplasztiszt, apikális elhelyezkedésű összehúzódó vakuólumokat, központi elhelyezkedésű sejtmagot és egy elülső pirenoidot. Az MACC 674 Kijevből, az MACC 835 brazil talajmintából származik.

A második szubklád két MACC törzset, az MACC 544-et és az MACC 658-at tartalmazta. Az MACC 658 Trebonból (*Chlamydomonas peterfii* CCALA 247) származott és a *C. asymmetrica* SAG 70 72 referenciatörzsszel került egy csoportba (97,3% szekvencia hasonlóság). A *C. asymmetrica* SAG 70 72 korábban *C. peterfii*-ként osztályozták (Buchheim és mtsai. 1990, 1997, 2001, 2002, Pröschold és mtsai. 2005, Lemieux és mtsai. 2015). Az MACC 544 talajból (Brazília) származott és a *Heterotetracystis akinetes* UTEX 1675 illetve a *Neochlorosarcina negevensis* UTEX 1387 között helyezkedett el. Ennek ellenére az MACC 544 a legnagyobb szekvencia hasonlóságot (98,3%) a *Hormotila blennista* UTEX 1239-cel mutatott, ezért további elemzésre van szükség, hogy pontosabban megismerhessük ezt a törzset. Mind az MACC 544, mind az MACC 658 rendelkezett csésze alakú kloroplasztiszokkal, apikális

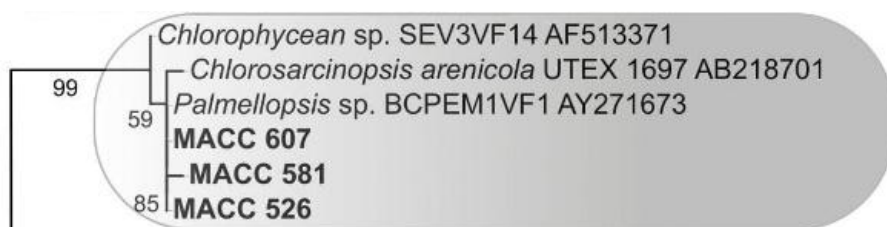
összehúzódo vakuólumokkal, oldalsó elhelyezkedésű és pontszerű szemfoltokkal, központi sejtmaggal és egy elülső pirenoiddal.

A harmadik szubklád 15 MACC törzset (MACC 53, 216, 285, 327, 335, 382, 415, 530, 531, 549, 579, 584, 688, 772, 788) tartalmazott, amelyből az MACC 415 *Tetraspora sp.* UTEX 234 (92,1% szekvencia hasonlóság) és *Paulschulzia pseudovolvox* UTEX 167 (93,9% szekvencia hasonlóság) referenciatörzsekkel alkotott egy csoportot. A *Paulschulzia pseudovolvox*-ot később a *Tetraspora* rokon törzseként kezelték (Tsarenko 2011, Guiry és Guiry 2018). Az MACC 415 volt az egyetlen törzs a Reinhardtinia filogenetikai csoportban, amely pocsoljából (Brazília) származott, míg a többi törzset talajból izolálták (Brazília és Magyarország). A kloroplasztisz alakja parietális, az összehúzódo vakuólumok apikálisak voltak, a sejtmag helye pedig centrális volt. A sejtnak volt egy pirenoidja, de hiányzott a szemfolt, ami összhangban van a *Tetraspora* leírásával.

A fennmaradó 14 MACC törzs (MACC 53, 216, 285, 327, 335, 382, 530, 531, 549, 579, 584, 688, 772, 788) a *Chlamydomonas debaryana* SAG 26.72, a *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 1061, a *Chlamydomonas zebra* SAG 10.83 és két másik törzssel (*Chlamydomonas sp.* WTwin 8 18 PSd és *Volvox carteri f. Nagariensis* UTEX 1885) került egy csoportba. Az MACC 285, 327 és 549 leginkább a *Chlamydomonas zebra* SAG 10.83-hoz hasonlítanak (97-97,5%), míg az MACC 53, 216, 335, 382, 530, 531, 579, 584, 688, 772 és 788 leginkább a *C. reinhardtii* UTEX 1061-hez volt hasonló és a hasonlóságuk 96,7% és 98,2% között alakult. Ezen a csoporton belül a sejtek jellemzői is hasonlóak voltak, mivel a kloroplasztisz csésze alakú volt, az összehúzódo vakuólumok apikálisak voltak illetve egy centrális sejtmaggal, egy elülső pirenoiddal

és két, a sejttel megegyező hosszúságú ostorral rendelkeztek. A törzsek között megfigyelt egyetlen különbség az MACC 327, 530 és 772 szemfoltja volt. Szemfoltjaik hosszúkásak voltak, míg az MACC 53, 216, 285, 335, 382, 531, 549, 579, 584 és 788-as törzseknek pontszerű, oldalirányú szemfoltjaik voltak. Filogenetikai értelemben, e csoport tagjai közül kerültek ki az 'igazi' *Chlamydomonas* törzsek, ugyanis ebbe az alsocsoportba sorolódott a jelenleg elfogadott három *Chlamydomonas*: *C. incerta*, *C. reinhardtii* és *C. schloesseri* (5. Ábra, zöld színnel jelölt törzsek).

5.1.1.3. Az Arenicolinia filogenetikai csoport

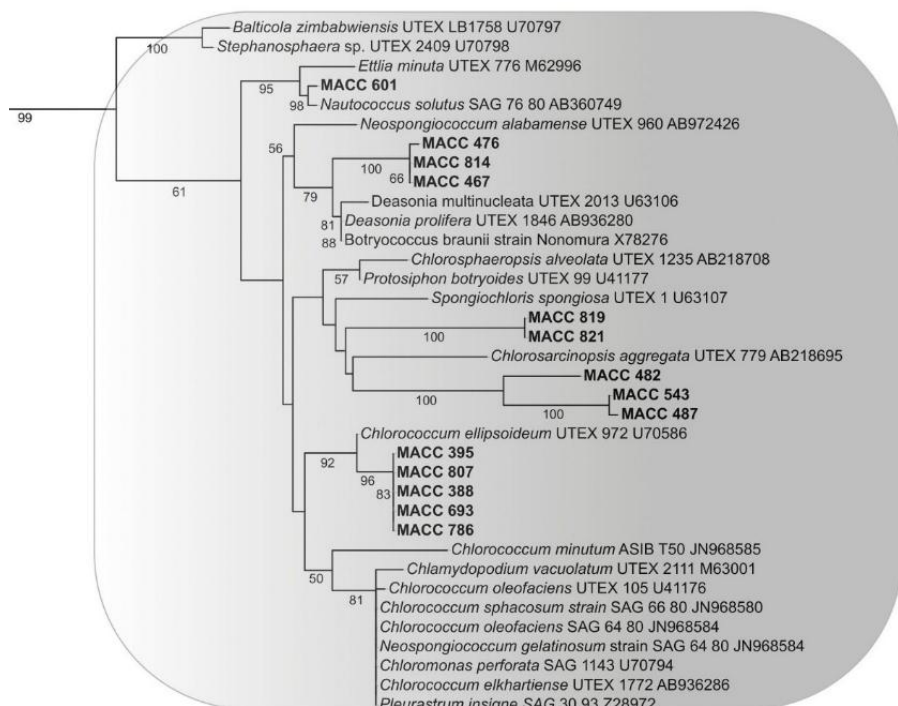


6. Ábra Az Arenicolinia filogenetikai csoport

Az Arenicolinia filogenetikai csoport (6. Ábra) egy jól alátámasztott klasztert (BS 99%) alkotott két referencia szekvenciával (*Chlorophycean* sp. SEV3VF14 és *Chlorosarcinopsis arenicola* UTEX 1697) és három MACC törzssel (MACC 526, 581, 607). A *Chlorosarcinopsis arenicola* UTEX 1697 és az MACC 607 közötti szekvencia hasonlóság 97,5% volt. A csoport tagjainak sejtméretei 3,1-8,5 µm hosszúságúak és 3,5-8,9 µm szélesek voltak (4. Táblázat). A sejtekben nem figyeltem meg sem ostorokat sem szemfoltot, de pirenoidokat

észleltünk. Ezek az alaktani jellegzetességek arra utalnak, hogy ezek a törzsek nem *Chlamydomonas*-ok.

5.1.1.4. A Stephanosphaerinia filogenetikai csoport



7. Ábra A Stephanosphaerinia filogenetikai csoport

A Stephanosphaerinia filogenetikai csoport (7. Ábra) 14 MACC törzset (MACC 395, 388, 467, 476, 482, 487, 543, 601, 693, 786, 807, 814, 819, 821) foglalt magában és jól alátámasztottnak minősült (BS 99%).

Az első alcsoport öt törzse (MACC 482, 487, 543, 819, 821) 100% bootstrap támogatottságot mutatott a *Chlorosarcinopsis aggregata* UTEX 779-cel, de a szekvenciák hasonlósága csak 90,4 és 93,7% közötti volt. Az alcsoport tagjainak nem volt összehúzódó vakuóluma, szemfoltja, ostorai

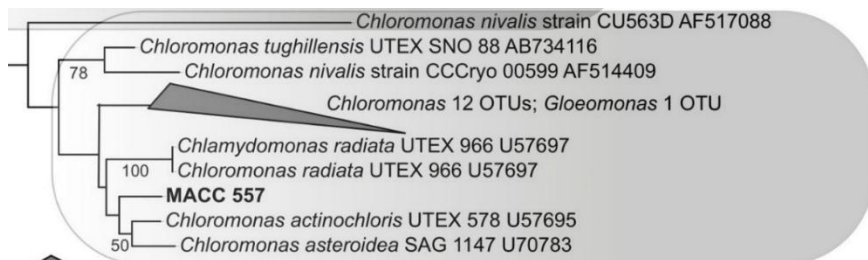
és rendelkeztek centrális sejtmaggal illetve egy pirenoiddal. Az egyetlen észlelhető különbség a törzsek között a kloroplasztisz alakja volt: az MACC 819 és 821 törzseknek szivacsos típusú kloroplasztisza volt, míg az MACC 482, 487 és 543 törzseknek parietális kloroplasztiszuk volt. A legkisebb sejtméret az MACC 543-hoz (3-5 μm) tartozott. Az MACC 543 szennyvízből (Brazília), míg a fennmaradó négy törzs talajmintákból származott (Brazília). Az MACC 819 és 821 valószínűleg ugyanazon *Chlorosarcinopsis* taxonhoz tartoznak, mivel részleges 18S rRNS szekvenciáik 100% -ban hasonló. Mivel e két törzset Brazíliában izolálták ugyanazon a területen, így egyazon fajról beszélhetünk és valószínűleg ugyanabba a *Chlorococcum* taxonba tartoznak.

A második alcsoport tagjainak szekvencia hasonlósága 97,2-98,2% között alakult és az MACC 388, 395, 693, 786, 807 illetve a *Chlorococcum ellipsoideum* UTEX 972 alkotott egy csoportot. A *Chlorococcum* nemzetség tagjai üreges, parietális kromatofórokkal rendelkeznek, felületi nyílással vagy anélkül, egy vagy több pirenoiddal és kétstoros zoospórákkal, amelyek nem válnak gömbölyűvé a mozgási képességük elvesztése után, de néhány napig oválisak maradnak (McGuire 1969). Így e nemzetség tagjai, ha csak néhány napig is, de hasonlítanak a *Chlamydomonas* taxonokhoz, és jelzik, hogy a morfológiai alapú besorolás mennyire nehéz. Ennek az öt törzsnek parietális kloroplasztiszai voltak és egy kissé oldalsó elhelyezkedésű pirenoidot tartalmaztak. Az MACC 388, 395, 693, 786 és 807 (4. Táblázat) 96%-os bootstrap támogatottságú törzsek. Ezen törzsek szekvencia homológiája 98,3% a részleges 18S rRNS gén szekvencia eredményei alapján. A földrajzi adatokat tekintetében az öt törzs három különböző brazil államból származik.

Az MACC 601 97,7%-ban volt hasonló (4. Táblázat) a *Nautococcus solutes* SAG 76 80-hoz. Ez az egyetlen magyar törzs, amely ebben a filogenetikai csoportban sárból, míg a másik 13 törzs Brazíliából származott (11 talajból, az MACC 395 egy tócsából és az MACC 543 szennyvízből). Az MACC 601-nek nem volt összehúzódó vakuóluma, szemfoltja vagy ostorai, de volt egy pirenoidja. A kloroplasztisz alakja parietális és a sejtmag helye központi volt.

Az MACC 467, 476 és 814 a *Deasonia multinucleata* UTEX 2013-hoz került közel. A részleges 18S rRNS hasonlóságuk 95,3% és 95,7% között volt. Mindegyiket talajból (Brazília) izolálták és az MACC 601-től csak két jellemvonásban különböztek: a szivacszerű kloroplasztisz alak és a több mint két pirenoid. A többi tulajdonság ugyanaz volt. Nem voltak összehúzódó vakuólumaik, szemfoltjuk vagy ostorai.

5.1.1.5. A Chloromonadinia filogenetikai csoport

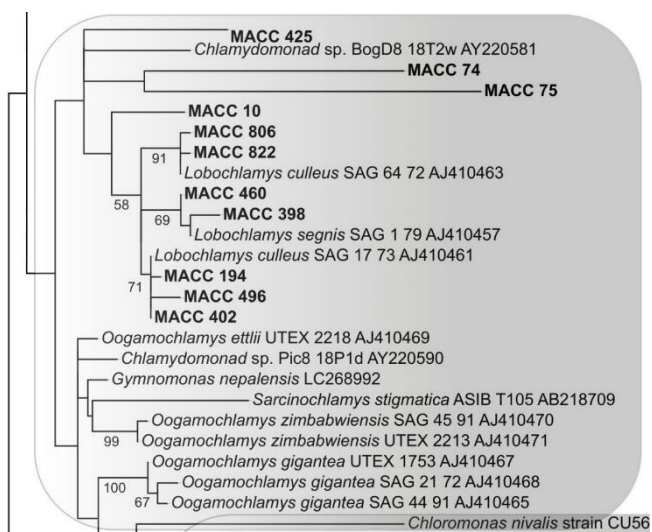


8. Ábra A Chloromonadinia filogenetikai csoport

A Chloromonadinia filogenetikai csoport (8. Ábra) főként *Chloromonas* szekvenciákat tartalmaz és az egyedüli MACC tagja ennek a csoportnak az MACC 557, amely egy fenyőerdőből származik (Magyarország) (4. Táblázat). A filogenetikai elemzés szerint a legközelebbi szomszédja a *Chloromonas actinochloris* UTEX 578, de

magasabb szekvencia hasonlóságot mutatott a *C. asteroidea* SAG 11-47-es referenciatörzzsel. Annak ellenére, hogy az MACC 557-et *Chloromonas* referenciaszekvenciákkal alkotott egy csoportot, további molekuláris elemzést javasolunk, mivel a fénymikroszkópos vizsgálatok alapján pirenoidokkal rendelkeznek. Viszont a *Chloromonas*-t, mint pirenoidokat nem tartalmazó nemzetséget tartják számon.

5.1.1.6. Az Oogamochlamydia filogenetikai csoport



9. Ábra Az Oogamochlamydia filogenetikai csoport

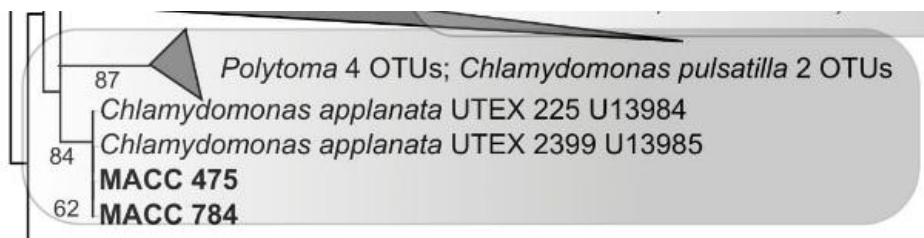
Az Oogamochlamydia filogenetikai csoport (9. Ábra) *Asterococcus*, *Chlamydomonas*, *Lobo-chlamys*, *Oogamochlamys*, *Sarcinochlamys* nemzetségek és 11 MACC taxon (MACC 10, 74, 75, 194, 398, 402, 425, 460, 496, 806, 822) keveréke (4. Táblázat). Az Oogamochlamydia csoport két alcsoportból állt: az első alcsoport tartalmazta az MACC 74-et, 75-öt és 425-öt. Az MACC 74 és az MACC 75 a CCALA-ból származik és a sejtek jellemzői (csésze alakú kloroplasztisz, apikális összehúzódó vakuólumok, pontszerű szemfoltok,

centrális sejtmag és egy oldalsó pirenoid) szintén hasonlóak voltak. Az egyetlen különbség a törzsek között az ostorok hossza volt. Ami a részleges 18S rRNS hasonlóságát illeti, mindkettő alacsony értékeket mutatott (89%) az *Oogamochlamys etlii* UTEX 2218-cal. Az MACC 74 és 75 nem alkotott csoportot a referenciaszekvenciákkal, ezért további elemzésre van szükség ezeknek a törzseknek a besorolásához. Az MACC 425 alaktanilag hasonlított az MACC 74 és 75-höz (csésze alakú kloroplasztiszt, apikális összehúzódó vakuólumok, pontszerű szemfolt, centrális sejtmag és egy oldalsó pirenoid), de talajból származott (Brazília) és a *Chlamydomonas* sp. BogD8 18T2w referenciaszekvenciával mutatott 91,6%-os hasonlóságot.

Az Oogamochlamydia filogenetikai csoport második szubklasztere az MACC 10, 194, 398, 402, 460, 496, 806, 822 és *Lobochlamys* törzseket foglalta magába. Szekvencia-hasonlóságuk 96% - 98,7% között alakult. Az MACC 398 és 460 a *Lobochlamys segnis* SAG 1.79-cel, az MACC 822 és 806 a *L. culleus* SAG 64.72-vel, míg az MACC 194, 402 és 496 a *L. culleus* SAG 17.73 törzsszel került egy csoportba. Az MACC 10 szintén része volt ennek a szubklaszternek, de távol volt a többi törzstől. Érdekes módon az MACC 10-et *Chlamydomonas segnis*-ként határozták meg korábban és a CCALA-ból származott. Az MACC 10 a *Lobochlamys segnis*-nek lett a szomszédja, amelyet korábban *Chlamydomonas segnis*-nek (Pröschold és mtsai. 2001) neveztek. Ennek a szubklaszternek a törzsei különböző eredetű helyekről származtak és jelentős különbségeket csak a szemfoltok (pontszerű vs. elnyúló) alakjai között figyeltek meg. A sejtek csésze alakú kloroplasztiszokkal, apikális összehúzódó vakuólumokat, centrális sejtmagot, egy pirenoidot

tartalmaztak és két, a sejt hosszával azonos hosszúságú ostorral rendelkeztek.

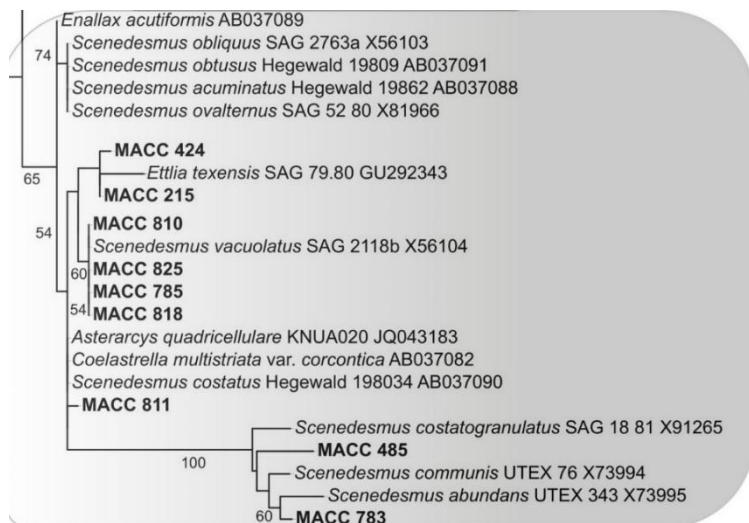
5.1.1.7. A *Polytominia* filogenetikai csoport



10. Ábra A *Polytominia* filogenetikai csoport

A *Polytominia* filogenetikai csoport (10. Ábra) két *Chlamydomonas applanata*, két *Chlamydomonas pulsatilla* és három *Polytoma* OTU-t tartalmazott referenciaszekvenciaként. Az MACC 475 és 784 (4. Táblázat) 98,5%-ban (3. Ábra) hasonló a *Chlamydomonas applanata* UTEX 225 és a *C. applanata* UTEX 2399 törzsekhez, bár az al csoportjuk filogenetikai szempontból nem kellően alátámasztott (Bootstrap 80%). Mind az MACC 475-öt, mind pedig a 784-et brazil talajmintákból izolálták. A sejt méretek szinte azonosak (MACC 475: 4,6-7,7 x 3,1-6 μm és MACC 784: 5,8-7,5 x 2,4-3,4 μm) és hasonlítottak a *Chlamydomonas applanata*-hoz, bár a pirenoidok elhelyezkedése más volt. Az MACC 475-nek egy középső, míg az MACC 784-nek egy oldalsó pirenoidja volt.

5.1.2. A *Sphaeropleales* rend és a Scenedesmaceae filogenetikai csoport



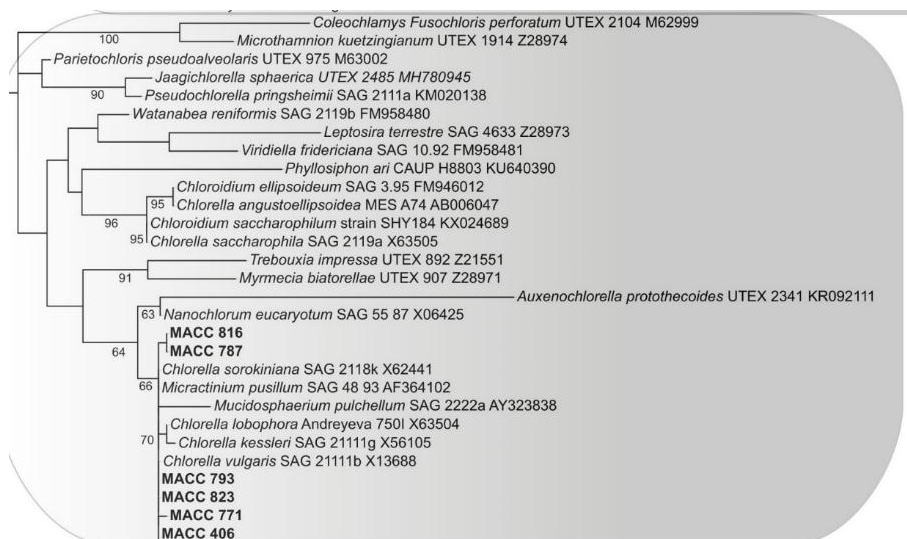
11. Ábra A Scenedesmaceae filogenetikai csoport

A Scenedesmaceae filogenetikai csoport (11. Ábra) kilenc MACC törzset (MACC 215, 424, 485, 783, 785, 810, 811, 818, 825) (4. Táblázat) foglalt magába, amelyek többségét brazil talajokból izoláltak. Kivétel ez alól az MACC 215 és az MACC 485. Az előbbi az IPPAS D-292-ből, Oroszországból, míg az utóbbi egy brazil pocsolyából származott. Az MACC 811 azonos kládba esett, mint a *Scenedesmus costatus* Hegewald mégpedig 98,7%-os szekvencia hasonlósággal. Az MACC 485-nek és az MACC 783-nak volt a legnagyobb bootstrap támogatása ezen a filogenetikai csoporton belül (100%) és a *S. costato-granulatus* SAG 18 81, a *S. communis* UTEX 76 és a *S. abundans* UTEX 343 referenciatörzsekkel alkottak egy csoportot. A két törzs részleges 18S rRNS gén szekvenciaanalízise 97,2% hasonlóságot mutatott.

A filogenetikai csoport tagjai a legmagasabb szekvencia hasonlóságot az *S. communis* UTEX 76-tal mutattak (97,5%). A másik hat MACC törzs (215, 424, 785, 810, 818, 825) ugyanabban a csoportban voltak, mint a *S. vacuolatus* SAG 211-8b és ezek szekvencia hasonlósága 97,2% és 98,5% közötti volt.

Ami az alaktani jellemzőket illeti, a sejtek jellemvonásai azonosak voltak, csak a tóból származó törzs sejtmérete (MACC 485) különbözött a többi nyolc MACC törzstől. Az összehúzódó vakuólumok, a szemfolt és az ostorok hiánya szintén megerősítette azt a tényt, hogy a korábbi jelölésük *Chlamydomonas* nemzetséggént helytelen.

5.1.3. A *Chlorellales* rend és a *Chlorella* filogenetikai csoport



12. Ábra A *Chlorella* filogenetikai csoport

A *Chlorella* filogenetikai csoport (12. Ábra) hat MACC törzset tartalmazott (MACC 406, 771, 787, 793, 816, 823). Ezek az MACC törzsek a *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8k referenciaszekvenciával (Pröschold és mtsai. 2010, Orsini és mtsai. 2014) alkottak egy csoportot. A részleges 18S rRNS gén hasonlóságuk 99% volt a *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8k törzsszel és az alcsoport 91%-os értéket ért el a filogenetikai elemzés során (ML). Ez a filogenetikai csoport tartalmazott más gömb alakú *Chlorella* modellfajokat is, mint például a *C. vulgaris* SAG 211-11b (Pröschold és mtsai. 2010, Steudel és mtsai. 2016) és *C. lobophora* (Krienitz és mtsai. 2004).

A molekuláris elemzés módosította a fent említett hat MACC törzs korábbi alaktanra épülő meghatározását. A fénymikroszkópos képek gömb alakú sejteket mutattak 2-9 μm átmérővel (13. Ábra: 8. *Chlorella*

filogenetikai csoport). A sejtek egyetlen csésze alakú parietális kloroplasztiszt tartalmaztak egy pirenoiddal és nem rendelkeztek összehúzódó vakuóllummal, szemfolttal és ostorokkal. Ami a származási helyet illeti, az MACC 771, 787, 793, 816 számú törzseket talajmintákból (Brazília), míg az MACC 823-at egy pocsolyából (Brazília) izolálták (4. Táblázat). A részleges 18S rRNS gén szekvencia homológiát illetően az MACC 406, 771 és 793 azonos fajnak tűnik.

5.1.4. A négy „megoldatlan” törzs

A négy „megoldatlan” törzs (MACC 74, 75, 425, 544) közül három (MACC 74, 75, 425) az Oogamochlamydia, míg az MACC 544 a Reinhardtinia filogenetikai csoportba sorolódott. Az MACC 425 és 544 brazil talajmintákból származott, míg az MACC 74 és 75 a CCALA nevű törzsgyűjteményből. Mindkét törzs jelenleg is azon a fajnéven szerepel a CCALA törzsgyűjteményben, ahogyan akkor, amikor az MACC-be került. Tehát az MACC 74 CCALA 234 *Chlamydomonas chlorococcoides*, míg az MACC 75 CCALA 249 *Chlamydomonas subtilis* néven van feljegyezve. Ez a tény kritikusan kezelendő, ugyanis a <https://ccala.butbn.cas.cz/en/references> honlap szerint a legfrissebb publikáció, amely magába foglalja a két törzset Katona és mtsai (2019) közleményéhez köthető.

Ugyan Ettl 1983 nyomán az MACC 74 (11 – 14,8 x 5,6 – 9 µm) és az MACC 75 (7,3 – 11,8 x 6,1 – 9 µm) sejt méret értékei összhangban vannak a *Chlamydomonas chlorococcoides* (12 – 18 x 5 – 10 µm) és a *Chlamydomonas subtilis* (7 – 10 x 6 – 10 µm) sejt méret értékeivel (4 Táblázat), csak ezen adatok alapján még nem kérdőjelezhető meg az, hogy

a két törzs *Lobochlamys segnis* (12 – 19 x 5,5 15 μm) vagy *Lobochlamys culleus* (7 – 11 x 3 – 6 μm) lenne. Ez ugyanis az a két faj, amelyek a fent említett Oogamochlamydia filogenetikai csoport legfontosabb referenciái.

4. Táblázat 70 db MACC törzs elemzésének összefoglaló Táblázata NCBI GenBank hozzáférési számmal és sejtméretekkel kiegészítve.

Filogenetikai csoport	Szekvencia hossz (bp)	MACC kód	Származási hely	A korábbi, alaktani besorolás	Az új, filogenetikai alapú besorolás	NCBI hozzáférés	Sejtméret, átmérő (µm)
Chlorella	391	406	Termeszvár, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.	KY864188	7,4 - 9,3 x 5,7 - 7,6
	390	771	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.	KY864216	2,8 - 4,2 x 2,5 - 3,7
	397	787	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.	KY864223	3,8 - 5,2 x 3,3 - 4,9
	394	793	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlorella</i> sp.	KY864225	3,4 - 4,4 x 2,6 - 3,5
	398	816	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.	KY864231	4,2 - 5,5 x 4 - 5
	393	823	Pocsolya, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.	KY864236	4 - 5,3 x 3,9 - 5,2
Moewusinia	399	27	CCALA 238 (Trebón)	<i>Chlamydomonas dorsoventralis</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864170	11,9 - 14,1 x 6 - 8
	396	30	CCALA 239 (Trebón)	<i>Chlamydomonas geitleri</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864171	11,7 - 15,9 x 6,7 - 9
	393	77	CCALA 246 (Trebón)	<i>Chlamydomonas oblonga</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864175	5,5 - 6,9 x 4 - 5,1
	395	120	Hegyi tó, Szlovénia	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864176	7,3 - 14,9 x 6,7 - 8,4
	385	782	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864218	6,2 - 8,1 x 5 - 7,3
Reinhardtinia	391	53	CCALA 236 (Trebón)	<i>Chlamydomonas debaryana</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864172	9,8 - 14,7 x 6,7 - 10,4
	398	216	Szennyvíz, Magyarország	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864179	6,4 - 8,7 x 4,7 - 6,5
	392	285	Kijev, Ukrajna	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864180	12,3 - 15,8 x 8,8 - 11,4
	394	327	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864181	7,2 - 10,2 x 4,7 - 7,6
	391	335	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864182	3,1 - 4,7 x 2,4 - 4
	388	382	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864183	6,4 - 8,6 x 3,7 - 6,5

4. Táblázat folytatása 70 db MACC törzs elemzésének összefoglaló Táblázata NCBI GenBank hozzáférési számmal és sejtméretekkel kiegészítve.

Filogenetikai csoport	Szekvencia hossz (bp)	MACC kód	Származási hely	A korábbi, alaktani besorolás	Az új, filogenetikai alapú besorolás	NCBI hozzáférés	Sejtméret, átmérő (µm)
Reinhardtinia csoport folytatása	389	415	Pocsolya, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Tetraspora</i> sp.	KY864189	8,1 - 10,6 x 4,3 - 7,7
	392	530	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864201	3,7 - 8,5 x 3,3 - 7
	389	531	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864202	6,6 - 9,6 x 4,6 - 6,9
	389	544	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	megoldatlan	KY864204	7,2 - 9,6 x 6,6 - 7,3
	392	549	Talaj, Magyarország	<i>Chlamydomonas intermedia</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864205	9,4 - 11,4 x 6,6 - 10
	394	579	Talaj, Magyarország	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864207	7,4 - 10,7 x 4,1 - 8,4
	392	584	Talaj, Magyarország	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864209	8 - 15,1 x 7,6 - 12
	393	658	CCALA 247 (Trebón)	<i>Chlamydomonas peterfii</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864212	9,4 - 11,3 x 5,8 - 9,5
	393	674	Kijev, Ukrajna	<i>Chlamydomonas callunae</i>	<i>Heterochlamydomonas</i> sp.	KY864213	10 - 11,1 x 7,1 - 8,5
	395	688	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864214	8,9 - 11 x 7,2 - 8,9
	394	772	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864217	10,2 - 11,5 x 8,2 - 9,5
	391	788	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864224	9,9 - 11,4 x 7,1 - 8,9
394	835	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Heterochlamydomonas</i> sp.	KY864238	6,5 - 8,4 x 4 - 4,8	

4. Táblázat folytatása 70 db MACC törzs elemzésének összefoglaló Táblázata NCBI GenBank hozzáférési számmal és sejtméretekkel kiegészítve.

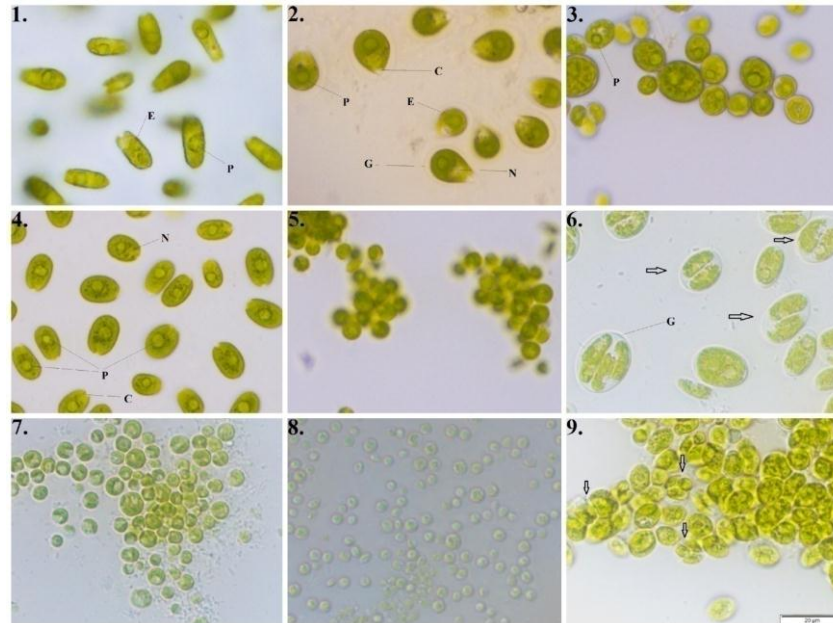
Filogenetikai csoport	Szekvencia hossz (bp)	MACC kód	Származási hely	A korábbi, alaktani besorolás	Az új, filogenetikai alapú besorolás	NCBI hozzáférés	Sejtméret, átmérő (µm)
Arenicolinia	390	526	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	KY864200	3,1 - 5,5 x 3,5 - 5,3
	391	581	Talaj, Magyarország	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	KY864208	4,1 - 5,8 - 3,3 - 4
	395	607	Talaj, Magyarország	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	KY864211	5,9 - 8,5 x 5,8 - 8,9
Stephanosphaerina	392	388	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorococcum</i> sp.	KY864184	6,4 - 8,8 x 3,8 - 8,7
	398	395	Pocsolya, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorococcum</i> sp.	KY864185	7,5 - 11,4 x 4,7 - 9,9
	389	467	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Deasonia</i> sp.	KY864193	9,2 - 13,1 x 6,8 - 12,2
	387	476	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Deasonia</i> sp.	KY864195	10,4 - 16,7 x 8,8 - 13,5
	389	482	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	KY864196	4,9 - 9,2 x 5,3 - 9,3
	393	487	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	KY864198	4,4 - 7,1 x 4 - 6,4
	393	543	Szennyvíz, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	KY864203	3,3 - 5,3 x 3,2 - 5,6
	398	601	Sár, Magyarország	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Nautococcus</i> sp.	KY864210	5,6 - 7,5 x 5,2 - 5,9
	392	693	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorococcum</i> sp.	KY864215	9,1 - 10,3 x 6,7 - 8,7
	392	786	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorococcum</i> sp.	KY864222	7,6 - 11,5 x 5,1 - 9,5
	393	807	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorococcum</i> sp.	KY864227	7,3 - 9,6 x 5,2 - 6,5
	394	814	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Deasonia</i> sp.	KY864230	8,3 - 10,9 x 5,4 - 7,9
	395	819	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	KY864233	9,3 - 10,6 x 7,7 - 9
	393	821	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	KY864234	7,9 - 9 x 4,9 - 7
Chloromonadinia	396	557	Fenyőerdő, Magyarország	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chloromonas</i> sp.	KY864206	15,1 - 19,6 x 8,7 - 13,3

4. Táblázat folytatása 70 db MACC törzs elemzésének összefoglaló Táblázata NCBI GenBank hozzáférési számmal és sejtméretekkel kiegészítve.

Filogenetikai csoport	Szekvencia hossz (bp)	MACC kód	Származási hely	A korábbi, alaktani besorolás	Az új, filogenetikai alapú besorolás	NCBI hozzáférés	Sejtméret, átmérő (µm)
Oogamochlamydia	395	10	CCALA 248 (Trebon)	<i>Chlamydomonas segnis</i>	<i>Lobochlamys</i> sp.	KY806553	8,1 - 12,1 x 5 - 8,2
	392	74	CCALA 234 (Trebon)	<i>Chlamydomonas chlorococcoides</i>	megoldatlan	KY864173	11 - 14,8 x 5,6 - 9
	392	75	CCALA 249 (Trebon)	<i>Chlamydomonas subtilis</i>	megoldatlan	KY864174	7,3 - 11,8 x 6,1 - 9
	394	194	Napraforgó, Magyarország	<i>Chlamydomonas gloeogama</i>	<i>Lobochlamys</i> sp.	KY864177	4,1 - 6,5 x 2,4 - 4,7
	397	398	AL/G-23, Csehország	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Lobochlamys</i> sp.	KY864186	7,9 - 11,6 x 4,1 - 6,8
	393	402	Napraforgó, Magyarország	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Lobochlamys</i> sp.	KY864187	7,6 - 11,1 x 4,6 - 7,7
	392	425	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	megoldatlan	KY864191	6,3 - 8,4 x 5,1 - 7,8
	392	460	Pocsolya, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Lobochlamys</i> sp.	KY864192	11,5 - 14,3 x 6,8 - 10,2
	395	496	Talaj, Magyarország	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Lobochlamys</i> sp.	KY864199	8,8 - 13,9 x 6,9 - 12
	392	806	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Lobochlamys</i> sp.	KY864226	10 - 13,1 x 5,1 - 8,2
	394	822	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Lobochlamys</i> sp.	KY864235	5,7 - 8,4 x 3,8 - 5,5
Polytomia	390	475	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864194	4,6 - 7,7 x 3,1 - 6
	393	784	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas</i> sp.	KY864220	5,8 - 7,5 x 2,4 - 3,4

4. Táblázat folytatása 70 db MACC törzs elemzésének összefoglaló Táblázata NCBI GenBank hozzáférési számmal és sejtméretekkel kiegészítve.

Filogenetikai csoport	Szekvencia hossz (bp)	MACC kód	Származási hely	A korábbi, alaktani besorolás	Az új, filogenetikai alapú besorolás	NCBI hozzáférés	Sejtméret, átmérő (µm)
Scenedesmaceae	390	215	IPPAS D-292, Oroszország	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Scenedesmus</i> sp.	KY864178	9,4 - 12,6 x 6,6 - 10,1
	391	424	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	KY864190	8,8 - 15,6 x 7,7 - 13,7
	393	485	Pocsolya, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	KY864197	2,1 - 3,4 x 1,9 - 3,1
	395	783	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	KY864219	7,7 - 9,5 x 7,4 - 9,2
	389	785	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	KY864221	5,4 - 7 x 4,8 - 6,5
	395	810	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	KY864228	5 - 7,3 x 3,1 - 5,4
	392	811	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	KY864229	5,7 - 7,6 x 3,6 - 5,9
	390	818	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	KY864232	8,9 - 10,7 x 6,6 - 8,9
393	825	Talaj, Brazília	<i>Chlamydomonas</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.	KY864237	8,2 - 10,7 x 4,7 - 6,1	



13. Ábra Az MACC filogenetikai csoportok mikroszkópos képei. A nagyítás 400x-os a méretskála pedig 20 μm . **1.** Moewusinia filogenetikai csoport: MACC 30. **2.** Reinhardtinia filogenetikai csoport: MACC 285. **3.** Scenedesmaceae filogenetikai csoport: MACC 424. **4.** Oogamochlamydia filogenetikai csoport: MACC 460. **5.** Polytominia filogenetikai csoport: MACC 475. **6.** Chloromonadinia filogenetikai csoport: MACC 557: Zoospórák a fiatal anyasejtben (nyíl) és fiatal sejtek, amelyek a zoospórákból képződtek. **7.** Arenicolinia filogenetikai csoport: MACC 607. **8.** Chlorella filogenetikai csoport: MACC 823: Sejtek csésze alakú kloroplasztisszal. **9.** Stephanosphaerina filogenetikai csoport: MACC 693: Sejtek különálló vagy közös zselés anyaggal borítva illetve számos, eltérő nemzedékű autospóra tetrad komplexben csoportosulva (nyíl). Jelmagyarázat: C: összehúzódó vakuólum E: szemfolt G: zselés burok N: sejtmag P: pirenoid.

5.2. Az EPS elemzése

5.2.1. A kiválasztott alga törzsek növekedésének és biomassza hozamának vizsgálata

A törzseket 30 napig inkubáltam. A törzsek lag fázisa jellemzően az 5. napig tartott. Ezután exponenciális növekedés következett, majd a stacioner fázis a 15. és 20. nap között. A pusztulási fázis a 25. napon kezdődött. A legtöbb biomasszát az MACC 460-as törzs (4840 mg L^{-1}), a legkevesebbet pedig az MACC 579-es (576 mg L^{-1}) törzs (5. Táblázat) termelte. Az MACC eukarióta algák többsége 2 és 3 g L^{-1} szárazanyagot tud előállítani az adott kísérleti körülmények között (Ördög 2015). A korábbi kísérletek alapján, a tenyésztési időszak végén 3 g L^{-1} -nél nagyobb koncentrációjú szárazanyagot termelő törzseket rendkívül produktívnak tekintettem.

Ennek megfelelően a vizsgált 20 törzs közül 3 törzs (MACC 402, 771, 530) rendkívül produktív volt és mindhárom talajból izolálták. Ennél is több biomasszát ($> 4 \text{ g L}^{-1}$) szintén 3 törzs (MACC 398, 460, 825) termelt, amelyek közül az egyiket vízből izolálták. Hét törzs bizonyult mérsékelt termelőnek, mivel biomasszájuk mennyisége meghaladta a 2 g L^{-1} -t. Másik 7 törzs biomassza termelése 2 g L^{-1} alatt volt. A 20 törzsből 13 brazil mikroalga volt.

5.2.2. A törzsek sEPS és bEPS termelése

A sEPS termelésük szerint a törzseket 3 csoportra osztottam: magas (A), közepes (B) és alacsony (C) termelők (5. Táblázat). Az egyes csoportokból kiválasztott törzsek megmutatják az alapvető különbségeket

a csoportok, illetve az sEPS és a bEPS mennyisége között, összehasonlítva a termelt biomassza (Mellékletek: 14. Ábra, 15. Ábra, 16. Ábra) mennyiségével. Az **A** csoport törzsei 2000 mg L^{-1} feletti oldható extracelluláris poliszacharidot termeltek. A **B** csoport 7 törzset tartalmazott, amelyekben az sEPS-tartalom 1000 és 2000 mg L^{-1} közötti volt. A fennmaradó 10 törzset a **C** csoportba helyeztem, mert az sEPS tartalmuk 1000 mg L^{-1} alatt volt. A bEPS tartalom összefügg az sEPS termeléssel, de a bEPS mennyisége lényegesen kisebb volt. A kötött EPS kizárólag fényben képződik és a sötétben nagymértékben lebomlik, ami megmagyarázza, hogy a koncentrációja miért kisebb, mint a sEPS-é. A jelen vizsgálatban a bEPS a legmagasabb értékeket ugyanazokon a napokon mutatta, mint az sEPS.

5.2.3. Az EPS termelés és a növekedési jellemzők kapcsolata

A biomassza felhalmozódása általánosságban véve az EPS fokozott termeléséhez vezet (Ni 2013). Az összes vizsgált törzs különböző mennyiségű EPS termelésére volt képes (5. Táblázat), tekintet nélkül a képződött biomassza mennyiségére. Például a gyengébb biomassza termelő törzsek (pl. MACC 531 - 1880 mg L^{-1} biomassza és 1337 mg L^{-1} sEPS) éppúgy el tudták érni a közel 1400 mg L^{-1} sEPS termelési szintet, mint azok a törzsek, amelyek jelentősen több biomasszát termeltek (pl. MACC 402 - 3816 mg L^{-1} biomassza és 1323 mg L^{-1} sEPS).

A tapadás/adhézió (falon történő további növekedés) tekintetében a korábbi vizsgálatok alapján az EPS jelenléte hozzájárul a ragadós jelleg, a sejt aggregációs képesség és az adhézió kialakulásához az Erlenmeyer-

lombik falán. Kilenc törzs mutatta ezeket a jellemvonásokat (MACC 75, 460, 526, 530, 549, 784, 788, 806, 825) (3. Táblázat). A legtöbb ilyen törzs a C csoportban volt, amely alacsonyabb biomassza és EPS termelési képességgel rendelkezett. Magas EPS és biomassza termelő törzsek esetén csak az MACC 460-at jellemezte adhézió. Ezek az adatok megerősítik, hogy az EPS-termelés törzs és törzs között eltér, de a bentikus fajok hidrofób sejtlei nagyobb tapadási szilárdságot mutattak és gyorsabban az üveghez tapadtak, mint a planktonikus törzsek.

5.2.4. Az EPS termelés és a filogenetikai eredmények kapcsolata

Az EPS eredményeket bemutató 5. Táblázatot kiegészítettem filogenetikai csoportokkal és az új, filogenetikai alapú besorolás eredményeivel, hogy további összefüggést találhassak a kétféle vizsgálattal kapott eredmények között.

A magas EPS termeléssel bíró három törzs mind az Oogamochlamydia filogenetikai csoporthoz tartoztak. A közepes EPS termelő hét törzs esetében már nem volt ennyire egységes a kép ugyanis a törzsek többsége a Reinhardtinia filogenetikai csoportból került ki, míg egy-egy esetben Oogamochlamydia és Scenedesmaceae törzsek is megtalálhatók voltak a kategóriában.

A harmadik, tíz alacsony EPS termelő törzset tömörítő kategória fele a Reinhardtinia filogenetikai csoport tagjai közül került ki, de két esetben Oogamochlamydia, egy-egy esetben pedig Arenicolinia, Chlorella és Polytominia filogenetikai csoporttagjaként azonosított törzset is tartalmazott.

Megállapítható, hogy a húsz vizsgált törzs közül kilenc a Reinhardtinia filogenetikai csoport tagja volt, tehát leginkább erre a csoportra volt jellemző az EPS termelés. Az adatokból szintén kiolvasható, hogy az új, filogenetikai alapú besorolás értelmében két törzs, az MACC-825 (*Scenedesmus* sp.) és az MACC-771 (*Chlorella* sp.) nem tartozik egyik *Chlamydomonas*-hoz hasonló filogenetikai csoportot tartalmazó rendbe sem.

5. Táblázat A biomassza termelékenység és az exopoliszacharid tartalom jellemzői (A= magas, B= Közepes, C= alacsony sEPS termelők) a filogenetikai eredményekkel összevetve. A törzseket az sEPS termelésük szerint csökkenő sorrendben soroltam fel.

Kategóriák	Törzsek	Biomassza (mg L ⁻¹ – száraz tömeg)	Tesztelés napja	sEPS (mg L ⁻¹)	sEPS hígítás előtt (µg)	bEPS (mg L ⁻¹)	Filogenetikai csoport	Az új, filogenetikai alapú besorolás
A	MACC-398	4088	25.	2763	138	1296	Oogamochlamydia	<i>Lobochlamys</i> sp.
	MACC-460	4840	15.	2701	135	822	Oogamochlamydia	<i>Lobochlamys</i> sp.
	MACC-194	1452	20.	2304	115	135	Oogamochlamydia	<i>Lobochlamys</i> sp.
B	MACC-674	2197	15.	1458	146	141	Reinhardtina	<i>Heterochlamydomonas</i> sp.
	MACC-835	2079	20.	1395	140	248	Reinhardtina	<i>Heterochlamydomonas</i> sp.
	MACC-382	2103	20.	1355	135	136	Reinhardtina	<i>Chlamydomonas</i> sp.
	MACC-531	1880	15.	1337	134	121	Reinhardtina	<i>Chlamydomonas</i> sp.
	MACC-402	3816	25.	1323	132	556	Oogamochlamydia	<i>Lobochlamys</i> sp.
	MACC-327	2934	20.	1177	118	520	Reinhardtina	<i>Chlamydomonas</i> sp.
	MACC-825	4803	30.	1091	109	121	Scenedesmaceae	<i>Scenedesmus</i> sp.
C	MACC-544	962	20.	731	146	99	Reinhardtina	megoldatlan
	MACC-788	2191	20.	688	138	144	Reinhardtina	<i>Chlamydomonas</i> sp.
	MACC-784	1075	20.	676	135	85	Polytomina	<i>Chlamydomonas</i> sp.
	MACC-549	1553	20.	672	134	76	Reinhardtina	<i>Chlamydomonas</i> sp.
	MACC-806	1186	15.	422	84	96	Oogamochlamydia	<i>Lobochlamys</i> sp.
	MACC-771	3580	30.	371	93	65	Chlorella	<i>Chlorella</i> sp.
	MACC-526	2042	20.	106	106	25	Arenicolina	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.
	MACC-530	3551	20.	94	94	51	Reinhardtina	<i>Chlamydomonas</i> sp.
	MACC-75	2699	20.	42	42	18	Oogamochlamydia	megoldatlan
MACC-579	576	10.	22	22	4	Reinhardtina	<i>Chlamydomonas</i> sp.	

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. A molekuláris vizsgálatok eredményeinek megvitatása

A zöld algák rendbe és osztályba sorolása hagyományosan a morfológiai fajkonceptió szerint történt. Azonban, a hagyományos taxonómiai megközelítések gyakran függenek egyetlen sejtjellemzőtől vagy annak hiányától (Pröschold és Leliaert 2007). Például az egysejtű ostoros *Chloromonas* nemzetséget a zöldszíntestben lévő pirenoidok hiánya választja el a *Chlamydomonas* nemzetségtől. A filogenetikai elemzések kimutatták, hogy egyes *Chloromonas* és *Chlamydomonas* törzsek filogenetikai szempontból ugyanabba a kládba tartozhatnak (Pröschold és mtsai. 2001).

Értekezésem az első olyan tanulmány, amely molekuláris adatokat használ fel az MACC zöldalga törzsek filogenetikai kapcsolatainak meghatározására. A 70 részleges 18S rRNS gén szekvencia elemzéséből származó filogenetikai fa kilenc különböző filogenetikai csoportot tárt fel, ami összhangban van Buchheim és mtsai. 1997, Pröschold és mtsai. 2001, Nakada és mtsai. 2008a, Nakada és Tomita 2011, Watanabe és Lewis 2017 korábbi eredményeivel. A molekuláris adatokkal nem rendelkező törzsgyűjtemények megfelelő azonosítása szükséges a jövőben. A korábbi meghatározások felülvizsgálata hozzájárul a taxonómiai modellek és módszerek finomításához és megfelelő platformot nyújt a jövőbeni munkához.

A törzsgyűjtemények fenntartóinak egyik nagy szakértelmet igénylő feladata a gyűjtemény mikroalga törzseinek taxonómiai

azonosítása (Ördög 2015). Ma már egyértelmű, hogy a mikroalgák tisztán morfológiai alapon történő azonosítása sok esetben lehetetlen. A mikroalga gyűjtemények fenntartóinak 2008 évi találkozójáról (Oban – UK) készült beszámoló szerint viszont még nagyon kevesen ismerik, és még kevesebben használják a molekuláris biológiai módszerekkel DNS-alapon történő fajmeghatározást (Surek 2008). Utóbbi módszer sem tökéletes az azonosításhoz használt adatbázisokba betáplált olykor téves adat miatt. A hagyományos taxonómia és a DNS-alapú meghatározás együtt adhat megoldást a taxonómusoknak (Ördög 2015). A *Chlamydomonas* nemzetséget illetően a legnagyobb gyűjtemények a CCALA, a CCAP, az IPPAS, a NIES, a SAG és az UTEX (lásd: Rövidítések jegyzéke). A jelen értekezés témájában vizsgált 70 MACC *Chlamydomonas* törzs közül 8 (MACC 10, 27, 30, 53, 74, 75, 77, 658) a CCALA-ból, míg egy (MACC 215) az IPPAS gyűjteményből származott.

Az algáknak máig körülbelül 40,000 fajtát írták le, míg további 200,000 és 10 millió között van azoknak a fajoknak a száma, amelyek felfedezésre várnak. A törzsgyűjteményeknek kulcs szerepe van a következőkben (Nudds és Pettitt 1997):

- Őrzik azokat a példányokat, amelyekhez a tudományos nevek állandóan kapcsolódnak. Ezek a biológiai nomenklátúra pótolhatatlan alapjai, és nélkülözhetetlenek az alkalmazandó nevek meghatározásában.
- Szükségesek az egyes fajokkal kapcsolatos közzétett kutatások ellenőrzéséhez. Az ilyen módon nem igazolható kutatás korlátozott értékű.

- Fontos forrást jelentenek a taxonómiai kutatások számára, és lehetővé teszik a fajok közötti eltérések és hasonlóságok meghatározását.
- Mivel állandóan új módszereket fejlesztenek ki a fajok jellemzésére, a törzsgyűjtemények az egyetlen módszert kínálják az újonnan felfedezett faji jellemzők jelenlétének ellenőrzésére a mintán, amelyen a faj elnevezése alapult.

A fenotípusos plaszticitás és az állandó nomenklaturális frissítések megnehezítik az izolátumok kizárólag alaktanra épülő azonosítását és osztályozását. A molekuláris genotipizálás és az ezt követő filogenetikai vizsgálatok módszerei lehetővé teszik az új izolátumok taxonómiai helyzetének pontosabb meghatározását (Kravtsova és mtsai. 2013). A *Chlamydomonas* fajok korábbi besorolásának helyessége vitatható, mivel sok eredeti leírás a természetes mintákból származó néhány példány fénymikroszkópos vizsgálatán alapult, anélkül, hogy figyelembe vették volna az alaktani jellegzetességek plaszticitását populáción vagy egyedfejlődésen belül (Pröschold és mtsai. 2001). Emellett számos molekuláris filogenetikai elemzés kimutatta, hogy a *Chlamydomonas* nagymértékben polifiletikus (Buchheim és mtsai. 1997, Pröschold és mtsai. 2001, Nakada és mtsai. 2008a, Nakada és Tomita 2011, Watanabe és Lewis 2017). Ami a nemzetséggel kapcsolatos jelenlegi álláspontot illeti, Pröschold és mtsai. (2018) bonyolult összehasonlító vizsgálatok után kiderítették, hogy csak három faj, nevezetesen a *Chlamydomonas incerta*, *Chlamydomonas reinhardtii* és *Chlamydomonas schloesseri* tekinthető a nemzetség tagjának.

Nakada és mtsai. (2008b) alkalmazta először a *Volvocales* renden a PhyloCode (Cantino és de Queiroz 2010) alapú filogenetikai osztályozási rendszert. Használatával felismert 21 "primer kládot", és a filogenetikai elemzés során is azt tapasztaltam, hogy ez a megközelítés a legjobb módja annak, hogy meghatározzam az MACC zöldalga törzsek megfelelő taxonómiai besorolását. A 70 törzset számláló MACC *Chlamydomonas* nemzetség kilenc primer klád között oszlott el. Az elemzésemben mintegy 66 törzset azonosítottam nemzetség szinten (4 törzs helyzete megoldatlan maradt = 70 vizsgált törzs), és valószínűleg maradtak hátra olyan nem vizsgált törzsek, amelyek új leszármazási vonalakat képviselhetnek. A molekuláris elemzés végrehajtása (a részleges 18S rRNS gén szekvencia alapján) lehetővé tette a korábban *Chlamydomonas* nemzetségbe sorolt 70 törzs átsorolását olyan nemzetségekbe, mint a *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chloromonas*, *Chlorosarcinopsis*, *Deasonia*, *Heterochlamydomonas*, *Lobochlamys*, *Nautococcus*, *Scenedesmus* és *Tetraspora*. Ezen kívül, tizenöt törzs, amely eredetileg a *Chlamydomonadales* rendbe tartozott, átkerült a *Chlorellales* (MACC 406, 771, 787, 793, 816, 823) és *Sphaeropleales* (MACC 215, 424, 485, 783, 785, 810, 811, 818, 825) rendbe. Végeredményben az MACC 27, 30, 53, 77, 120, 216, 285, 327, 335, 382, 475, 530, 531, 549, 579, 584, 658, 688, 772, 782, 784, 788 törzsek maradtak a *Chlamydomonas* nemzetségben, melyekből 15 a Reinhardtinia, 5 a Moewusinia és 2 a Polytominia kládba tartozik.

Az eredményeim megmutatták, hogy a korábban *Chlamydomonas* nemzetséghez rendelt törzsek többsége filogenetikai értelemben nem *Chlamydomonas*. Ez alátámasztja a molekuláris eljárások használatának fontosságát a zöldalgák rendszertani feltárása során. A korábbi, morfológiai alapú besorolás eredményeinek elsődleges magyarázata az az,

hogy a *Chlamydomonas* morfológiai jellemzői nagyon változatosak és átfedésben vannak más nemzetségek morfológiai jellemzőivel. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagynunk azt a tényt, hogy minél több markergénjét ismerjük egy adott törzsnek, annál pontosabb lesz a meghatározásuk. Ehhez az is kell, hogy az adott génből kellő mennyiségű szekvenált adat álljon rendelkezésre adatbankokban az összehasonlítások miatt. Az MACC *Chlamydomonas* nemzetség vonatkozásában érdemes lenne még a nukleáris riboszomális operon további régióit (5S rRNS, 5.8S rRNS, 26S rRNS, 28S rRNS), az aktin gént (IDA5, NAP1) több kloroplasztisz gént (atpB, psaB, rbcL) és mitokondriális géneket (coxI, LSU rRNS) is megvizsgálni (Necas és mtsai. 1986, Matsuzaki és mtsai. 2010, Buchheim 2013, Lemieux és mtsai. 2015). Az általam alkalmazott részleges 18S rRNS gén ugyanis a legtöbb esetben alkalmas a nemzetségek szintjétől, az akár osztályok, törzsek taxonómiai szintjéig terjedő összehasonlításra, azonban gyakran túl kevés variációt mutat a nemzetség alatti, illetve fajhatárok környékén található variációk vizsgálatához. Ilyen esetekben a fent említett variábilisabb genomszakaszok használata válik szükségessé (Ács és Kiss 2004).

6.2. Az EPS vizsgálatok eredményeinek megvitatása

Tanulmányomban elsőként vizsgálom az MACC *Chlamydomonas* törzseinek EPS termelését, bár van már más gyűjteményekből közlemény erre a nemzetségre vonatkozóan (Kroen 1984, Bafana 2013). Mind az sEPS, mind a bEPS hasznos melléktermékei a mikroalgáknak. Vizsgálataim során az sEPS-t mindig magasabb koncentrációban detektáltam, mint a bEPS-t. Mindegyik törzs termelt EPS-t különböző

mennyiségben, függetlenül az előállított biomassza mennyiségétől. Az MACC 398 volt a legtermékenyebb sEPS és biomassza termelő az összes vizsgált törzs közül. Kutatásom rávilágított arra, hogy a vizsgált MACC *Chlamydomonas* törzsek negyede EPS termelésre is alkalmas.

Az A csoport törzsei 2000 mg L^{-1} feletti oldható extracelluláris poliszacharidot termeltek. Ez magas érték a szakirodalomban szereplő egyéb tanulmányhoz képest. Allard és Tazi (1993) a *Chlamydomonas augustae* faj esetében 1400 mg L^{-1} , De Angelis (2009) pedig 1000 mg L^{-1} sEPS-t mért *Chlorella vulgaris* (Beyerinck 1890) törzsből. Barclay (1985) a *Chlamydomonas mexicana* és a *C. sajabo* fajokat vizsgálva megállapította, hogy mindkettő kb. 600 mg L^{-1} sEPS előállítására volt képes, Bafana (2013) pedig $632,6 \text{ mg L}^{-1}$ EPS-t határozott meg a *Chlamydomonas reinhardtii* tenyészetéből. Moore és Tischer (1964) *Chlamydomonas* sp.-ben 224 mg L^{-1} sEPS-t és 19 mg L^{-1} bEPS-t mennyiséget határozott meg.

Az egyéb fajokon végzett EPS hozam meghatározására irányuló vizsgálatok eredményei széles skálán mozognak az általam mért értékekhez képest. Díaz Bayona és Garcés (2014) *Botryococcus braunii* fajnál 44 mg L^{-1} , Angelis és mtsai. (2012) *Chlorella vulgaris* esetében 7100 mg L^{-1} , *Arthrospira* (*S. platensis*) esetében pedig 5420 mg L^{-1} , Liu és mtsai. (2015) *Cryptocodinium cohnii* fajnál 1020 mg L^{-1} , Medina-Cabrera és mtsai (2020) *Porphyridium sordidum* fajnál 424 mg L^{-1} míg Li és mtsai. (2020) *Neochloris oleoabundans* faj esetében 1000 mg L^{-1} sEPS-t mért.

A szakirodalom alátámasztja azt a tényt, hogy a bEPS tartalom összefügg az sEPS termeléssel, de a bEPS mennyisége lényegesen kisebb (Moore és Tischer 1964, Yang és mtsai. 2009, Borowitzka 2016). Ez a

kísérleteinkben is kimutatható volt (5. Táblázat). Ezek törzs-specifikus tulajdonságoknak minősülnek, amelyeket tovább kell vizsgálni, mivel jelentős szerepet játszhatnak a törzsek differenciálásában az úgynevezett polifázikus megközelítés részeként.

Az is fontos, hogy az oldható EPS-t a törzsek folyamatosan juttatják bele a táptalajba. Ezzel ellentétben a kötött EPS kizárólag fényben képződik (De Brouwer és Stal 2002) és a sötétben nagymértékben lebomlik, ami megmagyarázza, hogy a koncentrációja miért kisebb, mint a sEPS-é. A jelen vizsgálatban a bEPS a legmagasabb értékeket ugyanazokon a napokon mutatta, mint az sEPS.

A tapadás/adhézió tekintetében a korábbi vizsgálatok alapján (De Philippis és Vincenzini 1998, van Réssel és mtsai. 2000, Pajdak-Stós és mtsai. 2001, Thornton 2002, Mann és Wozniak 2012) az EPS jelenléte hozzájárul a ragadós jelleg, a sejt aggregációs képesség és az adhézió kialakulásához az Erlenmeyer-lombik falán. Kilenc törzs mutatta ezeket a jellemvonásokat (MACC 75, 460, 526, 530, 549, 784, 788, 806, 825) (3. Táblázat). Ezek az adatok megerősítik, hogy az EPS-termelés törzs és törzs között eltér (Streshinskaya és mtsai. 1967, Takeda és Hirokawa 1978), de a bentikus fajok hidrofób sejtjei nagyobb tapadási szilárdságot mutattak és gyorsabban az üveghez tapadtak, mint a planktonikus törzsek. Ezek sejtjei ugyanis hidrofil felülettel rendelkeznek (Ozkan és Berberogul 2013).

Az eredmények alapján javaslom a törzsek potenciális EPS forrásként történő mezőgazdasági (pl.: talajkondicionáló), élelmiszeripari (pl.: állományjavító) felhasználását további hallgatók és nemzetközi partnerek bevonásával laboratóriumi illetve helyszíni kísérleteket során. Az EPS-termelés jelentős szerepet játszhat a törzsek differenciálásában a

polifázikus megközelítés részeként, amely különböző módszerek, például morfológia, citológia illetve ultrastrukturális, biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatok kombinációját tartalmazza.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A tanulmányomban alaktanilag és molekuláris módszerekkel megvizsgáltam és rendszertanilag meghatároztam hetven MACC törzset. A gyűjtemény kihasználatlan potenciállal rendelkezik és az alga sokféleségre vonatkozó adatok tárházaként szolgál, különösen a még nem vizsgált nyilvános algagyűjteményekhez képest. Azáltal, hogy az alga életfára hetven MACC törzset helyeztem el, referenciákat adtam a jövőbeni rendszertani és biológiai sokféleséget célzó kutatásokhoz. E törzsek vizsgálata hozzájárul az *Chlamydomonas* nemzetség átfogóbb megismeréséhez.

A tanulmány szintén első az MACC *Chlamydomonas* törzsek EPS-termelés vizsgálatának tekintetében is. Mind az sEPS, mind pedig a bEPS a mikroalgák hasznos anyagcsereterméke. Kísérleteim során az sEPS-t mindig magasabb koncentrációban volt kimutatható, mint a bEPS-t. Az MACC 398 volt a legtermékenyebb sEPS és biomassza termelő az összes vizsgált törzs között. A kutatásom azt mutatta meg, hogy a vizsgált MACC *Chlamydomonas* törzsek mind EPS termelők voltak, függetlenül az előállított biomassza mennyiségétől az EPS termelés mértékében eltéréseket tapasztaltam. A törzsek lehetséges biopolimer forrásként történő mezőgazdasági, élelmiszeripari és orvostechikai felhasználása további vizsgálatokat és helyszíni kísérletek igényét helyezheti kilátásba. Az EPS-termelés jelentős szerepet játszhat a törzsek differenciálásában az úgynevezett polifázikus megközelítés részeként, amely különböző módszerek, például alaktan, illetve ultrastrukturális, biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatok kombinációját tartalmazza.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Chlamydomonas* az egyik legnagyobb zöldalga nemzetség több mint 800 leírt fajjal. Megközelítőleg 400 törzsük áll rendelkezésre törzsgyűjteményekben és alkalmazható kutatási célokra. A *Chlamydomonas* nemzetség sokoldalú gyakorlati jelentőségére utal, hogy modellszervezetként olyan tudományterületeken alkalmazzák, mint a fotoszintézis-kutatás, a genetika, az UV-rezisztencia kérdései, a biogáz- és biodízel-termelés lehetőségei, a hormonkutatás, a mezőgazdaság és a gyógyszerkutatás. Az egysejtű szervezeteket magába foglaló nemzetség alapvető jellemzője a két egyenlő hosszúságú ostor és a sejt térfogatának mintegy felét kitevő kloroplasztisz, amely egy vagy több pirenoidot tartalmaz. Az 1990-es évek óta, a molekuláris markerek filogenetikai elemzésben való alkalmazása bebizonyította, hogy az alaktani megközelítés nem elegendő a legtöbb zöldalga, így a *Chlamydomonas* nemzetség filogenetikai rendszerezéséhez sem.

Részleges 18S rRNS gén felhasználásával rendszertani vizsgálatokat végeztem 70 MACC (Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény) törzsen, amelyeket korábban alaktanilag az egysejtű ostoros *Chlamydomonas* nemzetséggént azonosítottak. A tanulmány megállapította, hogy a törzsek többségének a korábbi, alaktanon alapuló meghatározása jelentősen módosult a molekuláris biológiai eredmények felhasználása után. Kilenc filogenetikailag és alaktanilag hasonló taxon csoportot azonosítottam. A vizsgálat célja az volt, hogy módosítsuk és frissítsük a törzsek elnevezéseit az MACC gyűjteményben. Ez a tanulmány feltárja annak

szükségességét, hogy felül kell vizsgálni azokat a törzsgyűjteményeket, amelyek izolátumait kizárólag alaktani módszerekkel azonosították.

Az extracelluláris poliszacharidok (EPS) nagy molekula-tömegű szénhidrát-polimerek. Számos mikroorganizmus bocsájt ki extracelluláris polimer anyagokat életeciklusa alatt. A *Chlamydomonas* nemzetség egyes fajai és más zöldalgák bizonyos körülmények között szintén képesek EPS-t kiválasztani. Az MACC (*Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény*) törzseinek EPS termeléséről nem állnak rendelkezésre korábbi eredmények. Vizsgálatainkhoz az MACC 20 *Chlamydomonas* törzsét választottam ki, amelyekből a kivont EPS mintát fenol-kénsavas módszerrel elemeztem (DuBois és mtsai. 1956). Az eredményekkel igazoltam, hogy az MACC *Chlamydomonas* törzsei között vannak értékes EPS-termelők, amelyek például talajkondicionáló készítmények alapanyagai lehetnek.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ács É., Kiss K.T. (szerk.) 2004: Algológiai praktikum. Eötvös Kiadó, Budapest, 361 pp.
2. Albalasmeh A.A., Berhe A.A., Ghezzehei T.A. 2013: A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers* 97, 253-261.
3. Allard B., Tazi A. 1993: Influence of growth status on composition of extracellular polysaccharides from two *Chlamydomonas* species. *Phytochemistry* 32, 41-47.
4. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402.
5. Angelis S., Novak A.C., Sydney E.B., Soccol V.T., Carvalho J.C., Pandey A., Nosedá M.D., Tholozan J.L., Lorquin J., Soccol C.R. 2012: Co-culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: Process preliminary optimization and partial characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 1092–1106.
6. Bafana A. 2013: Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydrate Polymers* 95, 746–752.
7. Barclay W.R., Lewin R.A. 1985: Microalgal polysaccharide production for the conditioning of agricultural soils. *Plant and Soil* 88, 159–169.

8. Barsanti L., Frassanito A.M., Passarelli V., Evangelista V., Etebari M., Paccagnini E. 2013: *Tetraflagellochloris mauritanica* gen. et sp. nov. (Chlorophyceae), a new flagellated alga from the Mauritanian desert: morphology, ultrastructure, and phylogenetic framing. *Journal of Phycology* 49, 178–93.
9. Becker B. 2013: Snow ball earth and the split of Streptophyta and Chlorophyta. *Trends in Plant Science* 18, 180–183.
10. Bellinger E.G., Sigeo D.C. 2010: Freshwater algae, identification and use as bioindicators. John Wiley & Sons, West Sussex, UK.
11. Bertalan I., Esposito D., Torzillo G., Faraloni C., Johanningmeier U., Giardi M.T. 2007: Photosystem II stress tolerance in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* under space conditions. *Microgravity Science and Technology* 19, 122–127.
12. Beyerinck [Beijerinck] M.W. 1890: Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung* 47, 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.
13. Black J.G. 2008: *Microbiology: principles and explorations*. Wiley.
14. Bloodgood R.A. 1990: Gliding motility and flagellar glycoprotein dynamics in *Chlamydomonas*. In: Bloodgood R. A. (ed.) *Ciliary and flagellar membranes*. Plenum Press, New York and London, 91–128.
15. Bock, C., Lothar K., Pröschold T. 2011: Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* 11, 293–312.

16. Borowitzka M.A., Beardall J., Raven J.A. 2016: The Physiology of Microalgae. Series 6. Springer International Publishing Switzerland.
17. Brook A.J., Johnson L.R. 2002: Order Zygnematales. In: John D. M., Whitton B. A., Brook A. J. (eds.) The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press, Cambridge, 479–593.
18. Buchheim M.A., Turmel M., Zimmer, E.A., Chapman R.L. 1990: Phylogeny of *Chlamydomonas* (Chlorophyta) based on cladistic analysis of 18S rRNA sequence data. *Journal of Phycology* 26, 689–699.
19. Buchheim M.A., Sutherland D.M., Buchheim J.A. & Wolf M. 2013: The blood alga: phylogeny of *Haematococcus* (Chlorophyceae) inferred from ribosomal RNA gene sequence data. *European Journal Phycology* 48, 318–29.
20. Buchheim M.A. 2001: Phylogeny of the Chlorophyceae with special reference to the Sphaeropleales: a study of 18S and 26S rDNA data. *Journal of Phycology* 37, 819–835.
21. Buchheim M.A., Buchheim J.A., Chapman R.L. 1997: Phylogeny of *Chloromonas* (Chlorophyceae): a study of 18S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Phycology* 33, 286–293.
22. Buchheim M.A., Buchheim J.A, Carlson T., Kugrens P. 2002: Phylogeny of *Lobocharacium* (Chlorophyceae) and allies: a study of 18S and 26S rDNA data. *Journal of Phycology* 38, 376–383.
23. Cagnon C., Mirabella B., Nguyen H.M., Beyly-Adriano A., Bouvet B., Cuiné S., Beisson F., Peltier G., Li-Beisson Y. 2013:

- Development of a forward genetic screen to isolate oil mutants in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels* 6, 178.
24. Cantino P.D., de Queiroz K. 2010: PhyloCode: International Code of Phylogenetic Nomenclature, Version 4c (online). Website: <http://www.ohio.edu/phylocode/documents.html>.
 25. Cheunil A. 2006: Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica* 127, 101-120.
 26. Chisti Y. 2007: Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294–306.
 27. Chodat, R. 1894: Matériaux pour servir à l'histoire des Protococcoidées. *Bulletin de l'Herbier Boissier* 2, 585-616.
 28. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. 1999: Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
 29. Cox E.R., Deason, T.R. 1969: *Heterochlamydomonas*, a new alga from Tennessee. *Journal of the Tennessee Academy of Science* 44, 105-107.
 30. Crawford R.L. 1981: Lignin biodegradation and transformation. New York: John Wiley and Sons.
 31. Dangeard P.A. 1888: Recherches sur les algues inférieures. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique* 7, 105-175.
 32. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. 2012: jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nature Methods* 9, 772.

33. Day J., Lukavsky G.J., Lorenz M., Friedl T., Elster J., Cambell C.N., Brand J.J. 2004: Pringsheim's living legacy: CAUP, CCALA, CCAP, SAG and UTEX culture collections of algae. *Nova Hedwigia* 79, 27–37.
34. De Angelis S. 2009: Exopolysaccharide production and antioxidant activity by submerged co-culture of macromycetes and microalgae. *Mention Microbiology, Plant Biology and Biotechnologies in the University of Provence, University of the Mediterranean Sea and Federal University of Parana* 1-274
35. De Brouwer J.F.C., Stal L.J. 2002: Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 38, 464-472.
36. De Philippis R., Vincenzini M. 1998: Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 151–175.
37. Deason T.R., Bold H.C. 1960: *Phycological studies. I. Exploratory studies of Texas soil algae.* University of Texas Publication 6022, 1-72.
38. Deason T.R. 1959: Three new Chlorophyceae from Alabama soil. *American Journal of Botany* 46, 572-578.
39. Deason T.R. 1971: The genera *Spongiococcum* and *Neospongiococcum*. I. The genus *Spongiococcum* and the multinucleate species of the genus *Neospongiococcum*. *Phycologia* 10, 17-27.

40. Delattre C., Pierre G., Laroche C., Michaud P. 2016: Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* 34, 1159–1179.
41. Demchenko E., Mikhailyuk T., Coleman A.W., Pröschold T. 2012: Genetic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonasmonadina* group) revised using an integrative approach. *European Journal Phycology* 47, 264–290.
42. Dent R., Han M., Niyogi K.K. 2001: Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends in Plant Science* 6, 364–371.
43. Díaz Bayona K.C., Garcés L.A. 2014: Effect of different media on exopolysaccharide and biomass production by the green microalga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology* 26, 2087–2095.
44. Dill O. 1895: Die Gattung *Chlamydomonas* und ihre nächsten Verwandten. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* 28, 323–358.
45. Dolhi J. M., Maxwell D. P., Morgan-Kiss R. M. 2013: Review: the Antarctic *Chlamydomonas raudensis*: an emerging model for cold adaptation of photosynthesis. *Extremophiles* 17, 711–722.
46. Dubini A. 2011: Green energy: biofuel production from *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Biochemical Society* 33, 20–23.
47. DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350–356.

48. Edgar, RC. 2004: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792-7.
49. Ehrenberg C.G. 1833: Dritter Beitrag zur Erkenntnis großer Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Abh. Königl. Akad. Wiss. Berlin*, 145–336.
50. Ehrenberg C.G. 1838: Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. L. Voss, Leipzig.
51. Elwood H.J., Olsen G.J., Sogin M.L. 1985: The small subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytrichanova* and *Stylonychiapustulata*. *Molecular Biology and Evolution* 2, 399–410.
52. Ettl, H. & Green, J.C. 1973: *Chlamydomonas reginae* sp. nov. (Chlorophyceae), a new marine flagellate with unusual chloroplast differentiation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 53, 1-11.
53. Ettl, H. 1976: Die Gattung *Chlamydomonas* Ehrenberg (Chlamydomonas und die nächstverwandten Gattungen II). *Beihefte zur Nova Hedwigia*. 49, 1–1122.
54. Ettl, H. 1983: Chlorophyta I- Phytomonadina. In Ettl H, Gerloff J, Heynig H, Mollenhauer D (eds) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd. 9. Gustav Fischer, Stuttgart, New York.
55. Evans R.D., Johansen J.R. 1999: Microbiotic crusts and ecosystem processes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18, 183–225.

56. Falchini L., Sparvoli E., Tomaselli L. 1996: Effect of *Nostoc* (Cyanobacteria) inoculation on the structure and stability of clay soils. *Biology and Fertility of Soils* 23, 346–352.
57. Fan J., Andre C., and Xu C. 2011: A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* 585, 1985–1991.
58. Fawley M.W., Fawley K.P., Buchheim M.A. 2004: Molecular diversity among communities of freshwater microchlorophytes. *Microbial Ecology* 48, 489–499.
59. Felföldy L. 1985: A zöldalgák Phytomonadina csoportjának kishatározója. *Vízügyi hidrobiológia*, Budapest.
60. Frey W. (ed.) 2015: Syllabus of Plant Families. A. Engler's Syllabus der Pfl anzenfamilien Part 2/1: Photoautotrophic eukaryotic Algae Glaucocystophyta, Cryptophyta, Dinophyta / Dinzoa, Haptophyta, Heterokontophyta/Ochrophyta, Chlorarachniophyta/ Cercozoa, Euglenophyta/ Euglenozoa, Chlorophyta, Streptophyta p.p. J. Cramer in der Gebr. Borntraeger Verlagsbuch handlung, Stuttgart, Germany, 324.
61. Friedl T. 1997: The evolution of the green algae. *Plant Systematics and Evolution* 11, 87–101.
62. Funes S., Lars-Gunnar F., González-Halphen D. 2007: *Chlamydomonas reinhardtii*: the model of choice to study mitochondria from unicellular photosynthetic organisms. *Methods in Molecular Biology* 372, 137–149.
63. Gerchakov S.M., Hatcher, P.G. 1972: Improved technique for analysis of carbohydrates in sediments. *Limnology and Oceanography* 17, 938-943.

64. Gerloff J. 1940: Beiträge zur Kenntnis der Variabilität und Systematik der Gattung *Chlamydomonas*. Archiv für Protistenkunde 94, 311–502.
65. Gerloff-Elias A., Spijkerman E., Pröschold T. 2005: Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negoro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). Plant, Cell & Environment 28, 1218–29.
66. Gfeller R.P., Gibbs M. 1984: Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology 75, 212–218.
67. Ghirardi M.L., Dubini A., Yu J., Maness P.C. 2009: Photobiological hydrogen-producing systems. Chemical Society Reviews 38, 52–61.
68. Ghirardi M.L., King P.W., Posewitz M.C., Maness P.C., Fedorov A., Kim K., Cohen J., Schulten K., Seibert M. 2005: Approaches to developing biological H₂-photoproducing organisms and processes. Biochemical Society Transactions 33, 70–72.
69. Golueke C.G., Oswald W.J., Gotaas H.B. 1956: Anaerobic digestion of algae. Applied Microbiology 5, 47-55.
70. Greenbaum E. 1982: Photosynthetic hydrogen and oxygen production: kinetic studies. Science 215, 291–293.
71. Greenbaum E. 1988: Energetic efficiency of hydrogen photoevolution by algal water splitting. Biophysical Journal 54, 365–368.
72. Grierson S., Strezov V., Bengtsson J. 2013: Life cycle assessment of a microalgae biomass cultivation, bio-oil extraction and pyrolysis processing regime. Algal Research 2, 299-311.

73. Guiry, M.D. Guiry G.M. 2018: AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
74. Hajósne Dr. Novák M. 1999: Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
75. Harris E.H. 1989: The *Chlamydomonas* sourcebook. Academic Press, San Diego, California.
76. Harris E. H. 2009: The *Chlamydomonas* sourcebook (second edition). Introduction to Chlamydomonas and its laboratory use, vol. 1. Academic Press, San Diego.
77. Hegewald E., Hanagata N. 2000: Phylogenetic Studies on Scenedesmaceae (Chlorophyta). Algological Studies 100, 29-49.
78. Hegewald E. 1978: Eine neue Unterteilung der Gattung Scenedesmus Meyen. Nova Hedwigia 30, 343-376.
79. Hegewald E. 1989: The *Scenedesmus* strains of the culture collection at Austin, Texas (UTEX). Archiv für Hydrobiologie, Supplement 82. Algological Studies 55, 153–189.
80. Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E. 1971: Chemical analysis of microbial cells. Methods in Microbiology 5, 209-344.
81. Hu C.X., Zhang D.L., Liu Y.D. 2004: Research progress on algae of the microbial crusts in arid and semiarid regions. Progress in Natural Science 14, 289–295.
82. Huss V.A.R., Sogin M.L. 1989: Primary structure of the *Chlorella vulgaris* small subunit ribosomal RNA coding region. Nucleic Acids Research 17, 1255.

83. Jäger K., Bartók T., Ördög V., Barnabás B. 2010: Improvement of maize (*Zeamays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. *South African Journal of Botany* 76, 511–516.
84. Jiang K.S., Barber G.A. 1975: Polysaccharide from cell walls of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 14, 2459-2461.
85. Katona S., Horváth N., Berthold D.E., Molnár Z., Bálint P., Ördög V., Pap B., Maróti G., Bánáti F., Szenthe K., Vörös L., Kilgore C., Laughinghouse H.D. 2019: Phylogenetic re-evaluation of previously identified *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlamydomonadaceae) strains from The Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection, Hungary, using molecular data. *South African Journal of Botany*. 125, 16-23.
86. Kawasaki Y., Nakada T., Tomita M. 2015: Taxonomic revision of oil-producing green algae, *Chlorococcum oleofaciens* (Volvocales, Chlorophyceae), and its relatives. *Journal of Phycology* 51, 1000–1016.
87. Keresztes Zs., Felföldi T., Somogyi B., Székely Gy., Dragos N., Márialigeti K., Bartha Cs., Vörös L. 2012: First record of picophytoplankton diversity in Central European hypersaline lakes. *Extremophiles* 16, 759-769.
88. Kirk D.L. 2005: A twelve-step program for evolving multicellularity and a division of labor. *Bioessays* 27, 299–310.
89. Kol, E. 1941: The green snow of Yellowstone National Park. *American Journal of Botany* 28, 185-191.
90. Kol E., Flint E.A. 1968: Algae in green ice from the Balleny Islands, Antarctica. *New Zealand Journal of Botany* 6, 249–261.

91. Kotai J. 1972: Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norwegian Institute for Water Research, Oslo, 11, 5.
92. Kravtsova T.R., Lazebnaya I.V., Lazebny O., Yu E., Volkova E., Fedorenko T.A., Gorelova O.A., Baulina O.I., Lobakova E.S., Vasetenkov A.E., Koksharova O.A. 2013: Molecular phylogeny of a green microalga isolated from White Sea sponge *Halichondria panicea* (Pallas, 1766). Russian journal of plant physiology 60, 536-540.
93. Krienitz L., Bock C. 2012: Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. Hydrobiologia 698, 295-326.
94. Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D., Huss V.A.R., Rohr T., Wolf M. 2004: Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Phycologia 43, 529-542.
95. Kroen W.K. 1984: Growth and polysaccharide production by the green alga *Chlamydomona smexicana* (Chlorophyceae) on soil. Journal of Phycology 20, 616-618.
96. Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2015: MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution.
97. Lahr D.J.G., Laughinghouse IV D.H., Oliverio A.M., Gao F., Katz L.A. 2014: How discordant morphological and molecular evolution among microorganisms can revise our notions of biodiversity on earth. Bioessays 36, 950-959.

98. Lakatos, G., Deák Zs., Vass I., Rétfalvi T., Rozgonyi Sz., Rákhely G., Ördög V., Kondorosi É., Maróti G. 2014: Bacterial symbionts enhance photo-fermentative hydrogen evolution of *Chlamydomonas* algae. *Green Chemistry* 16, 4716-4727.
99. Lakatos G., Balogh D., Farkas A., Ördög V., Nagy P.T., Bíró T., Maróti G. 2017: Factors influencing algal photobiohydrogen production in algal-bacterial co-cultures. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 28, 161-171.
100. Langford M.F., Cox E.R. 1971: Additions to the genus *Heterochlamydomonas* (Chlorophycophyta). *Journal of the Tennessee Academy of Science* 46, 66-71.
101. Lee H.J., Hur S.B. 2012: Comparison between phylogenetic relationships based on 18S rDNA sequences and growth by salinity of *Chlorella*-like species (Chlorophyta). *Fisheries and Aquatic Sciences*. 15, 125-135.
102. Lee J.J., McEnery M.E., Kahn E.G., Schuster F.L. 1979: Symbiosis and the evolution of larger Foraminifera. *Micropaleontology* 25, 118-140.
103. Leliaert F., Smith D.R., Moreau H., Herron M.D., Verbruggen H., Delwiche C.F., De Clerck O. 2012: Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31, 1–46.
104. Lemieux C., Vincent A.T., Labarre A., Otis C., Turmel M. 2015: Chloroplast phylogenomic analysis of chlorophyte green algae identifies a novel lineage sister to the Sphaeropleales (Chlorophyceae). *BMC Evolutionary Biology* 15, 264.

105. León R., Galván F. 1997: Analysis of effective light in different photobioreactors: its influence on growth, photosynthetic activity and glycerol production by the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13, 237–239.
106. Lewin R. A. 1956: Extracellular polysaccharides of green algae. *Canadian Journal of Microbiology* 2, 665-672.
107. Lewin R. A. 1957: Four new species of *Chlamydomonas*. *Canadian Journal of Botany* 35, 321-326.
108. Lewin R. A. 1984: *Chlamydomonas sajao* nov. sp. (Chlorophyta, Volvocales). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 2, 92-96.
109. Lewis A.L., McCourt R. M. 2004: Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany* 91, 1535–1556.
110. Li Y., Wang C., Liu H., Sua J., Lane C.Q., Zhonga M., Hua X. 2020: Production, isolation and bioactive estimation of extracellular polysaccharides of green microalga *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research* 48, 1-11.
111. Liu B., Sun Z., Ma X., Yang B., Jiang Y., Wei D., Chen F. 2015: Mutation breeding of extracellular polysaccharide-producing microalga *Cryptocodinium cohnii* by a novel mutagenesis with atmospheric and room temperature plasma. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 8201–8212.
112. Mann E.E., Wozniak, D.J. 2012: Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 893–916.

113. Manuel A., Beligni M., Elder J., Siefker D., Tran M., Webber A., McDonald T., Mayfield S. 2007: Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnology Journal* 5, 402–412.
114. Martin J.P. 1971: Decomposition and binding action of polysaccharides in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 3, 33-41.
115. Matsuo Y., Imagawa H., Nishizawa M., Shizuri Y. 2005: Isolation of an algal morphogenesis inducer from a marine bacterium. *Science* 307, 1598.
116. Matsuzaki R., Nakada T., Hara Y., Nozaki H. 2010: Light and electron microscopy and molecular phylogenetic analyses of *Chloromonas pseudoplatyrhyncha* (Volvocales, Chlorophyceae). *Phycological Research* 58, 202-9.
117. McCourt R.M. 1995: Green algal phylogeny. *Trends in Ecology and Evolution* 10,159–163.
118. McGuire R.F. 1969: Attributes of Chlorococcum species: A numerical analysis. *Journal of Phycology* 5, 220–223.
119. McNeil J., Barrie F.R., Buck W.R., Demoulin V., Greuter W., Hawksworth D.L., and Herendeen P.S. 2012: International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. *Regnum Vegetabile* 154, 1–208.
120. Medina-Cabrera E.V., Rühmann B., Schmid J., Sieber V. 2020: Characterization and comparison of *Porphyridium sordidum* and *Porphyridium*. *Algal Research* 49, 978-985.

121. purpureum concerning growth characteristics and polysaccharide production
122. Melis A., Zhang L., Forestier M., Hirardi M.L., Seibert M. 2000: Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 122, 127–136.
123. Melkonian, M. 1982: Structural and evolutionary aspects of the flagellar apparatus in green algae and land plants. *Taxon* 31, 255–265.
124. Melkonian, M. 1984: Flagellar apparatus ultrastructure in relation to green algal classification. In Irvine, D. E. G. & D. M. John (eds), *Systematics of the green algae*. The Systematics Association, Special Volumes, No. 27. Academic Press, London, Orlando, 73–120.
125. Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J., Witman G.B. 2007: The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245–250.
126. Metting B. 1987: Dynamics of wet and dry aggregate stability from a three-year microalgal soil conditioning experiment in the field. *Soil Science* 143, 139–143.
127. Metting B. 1988: Micro-algae in agriculture. In: Borowitzka M. A., Borowitzka L. J. (eds.) *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, 288–304.
128. Metting B., Rayburn W.R. 1983: The influence of a microbial conditioner on selected Washington soils: an empirical study. *Soil Science Society of America Journal* 47, 682–685.

129. Metting B. 1986: Population dynamics of *Chlamydomonas sajabo* and its influence on soil aggregate stabilization in the field. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 1161-1164.
130. Meyer A., Todt C., Mikkelsen N.T., Lieb B. 2010: Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evolutionary Biology* 10, 70-82.
131. Misurcova L., Skrovankova S., Samek D., Ambrozova J., Machu L. 2012: Health benefits of algal polysaccharides in human nutrition. *Advances in Food and Nutrition Research* 66, 75–145.
132. Moheimani N.R., Borowitzka M.A., Isdepsky A., Sing S.F. 2013: Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition. In: Borowitzka M., Moheimani N. (eds) *Algae for Biofuels and Energy*. *Developments in Applied Phycology* 5. Springer, Dordrecht.
133. Moore B.G., Tischer R.G. 1964: Extracellular polysaccharides of algae: effects on life-support systems. *Science* 145, 586-7.
134. Mussgnug J. H., Klassen V., Schlüter A., Kruse O. 2010: Microalgae as a substrate for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology* 150, 51–56.
135. Nakada T., Tomita M. 2011: *Chlamydomonas neoplanoconvexa* nom. nov. and its unique phylogenetic position within Volvocales (Chlorophyceae). *Phycological Research* 59, 194-199.
136. Nakada T., Tomita M. 2016: Taxonomic revision of *Chlamydomonas* subg. *ampichloris* (Volvocales,

- Chlorophyceae), with resurrection of the genus Dangeardinia and descriptions of *Ixipapillifera* gen. nov. and *Rhysamphichloris* gen. nov. *Journal of Phycology* 52, 283–304.
137. Nakada T., Nozaki H., Pröschold T. 2008a: Molecular phylogeny, ultrastructure and taxonomic revision of *Chlorogonium* (Chlorophyta): emendation of *Chlorogonium* Ehrenberg and description of *Gungnir* gen. nov. and *Rusalka* gen. nov. *Journal of Phycology* 44, 751–60.
138. Nakada T., Misawa K., Nozaki H. 2008b: Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48, 281–91.
139. Necas J., Tetik K., Sulek J. 1986: Mutation process induced by MNNG in different phases of the cell cycle in *Chlamydomonas geitleri* VI. Dependence of the induction of mutagenesis on the mutagen dose in the course of the cell cycle. *Archiv für Hydrobiologie* 44, 393–404.
140. Negoro, K. 1944: Untersuchungen über die Vegetation der mineralogen azidotrophen Gewässer Japans. *Scientific Reports Tokyo Bunrika Daigaku* 6, 231-374.
141. Němcová Y., Eliáš M., Škaloud P., Hodač L., Neustupa J. 2011: *Jenufa* gen. nov.: A new genus of coccoid green algae (Chlorophyceae, incertae sedis) previously recorded by environmental sequencing. *Journal of Phycology* 47, 928-938.
142. Németh L., Ördög V. 2006: Antifungal and antibacterial activity of extracts from selected microalgae. 3rd Symposium on

- Microalgae and Seaweed Products in Agriculture, Mosonmagyaróvár (Hungary), 21 - 23 June, p:1.
143. Ni B-J. 2013: Formation, characterization and mathematical modeling of the aerobic granular sludge. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
144. Nielsen S.S. 2010: Food Analysis Laboratory Manual. Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. Springer Science 47-52.
145. Norton T.A., Melkonian M., Andersen R.A. 1996: Algal biodiversity. *Phycologia* 35, 308–326.
146. Novis P.M., Halle C., Wilson B., Tremblay L.A. 2009: Identification and characterization of freshwater algae from a pollution gradient using *rbcL* sequencing and toxicity testing. *Arch. Environ. Con. Toxicol.* 57, 504-514.
147. Nudds J.R., Pettitt C.W. 1997: The value and valuation of natural science collections: proceedings of the international conference, Manchester, 1995. London: Geological Society.
148. Orsini M., Cusano R., Costelli C., Malavasi V., Concas A., Angius A., Cao G. 2014: Complete genome sequence of chloroplast DNA (cpDNA) of *Chlorella sorokiniana*. *Mitochondrial DNA* 27, 838-839.
149. Ozkan A., Berberoglu H. 2013: Adhesion of algal cells to surfaces, Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research 29, 469-482.
150. Ördög V., Pocsai K., Gergely I., Bálint P., Németh L., Molnár Z. 2006: Microalgae in plant production and protection. 3rd

- Symposium on Microalgae and Seaweed Products in Agriculture, Mosonmagyaróvár (Hungary), 21 - 23 June, p:1.
151. Ördög V., Pulz O. 1996: Diurnal changes of cytokinin-like activity in a strain of *Arthronema africanum* (Cyanobacteria), determined by bioassay. *Algological Studies* 82, 57-67.
 152. Ördög V. 1982: Apparatus for laboratory algal bioassays. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie* 67, 127-136.
 153. Ördög V. 2015: Disszertáció: Mikroalgák biotechnológiai alkalmazása a növénytermesztésben és növényvédelemben. Magyar Tudományos Akadémia.
 154. Pajdak-Stós A., Fialkowska E., Fyda J. 2001: *Phormidium autumnale* (Cyanobacteria) defense against three ciliate grazer species. *Aquatic Microbial Ecology* 23, 237–244.
 155. Pascher A. 1927a: Volvocales. In Pascher A (ed.) *Süßwasser-Flora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz*, Jena, Verlag von Gustav Fischer Heft 4, 1–506.
 156. Pascher, A. 1927b: Eine Chrysonomade mit gestielten und verweigten Kolonien. *Archiv für Protistenkunde* 57, 319-330.
 157. Pascher A., Jahoda R. 1928: Neue Polyblepharidinen und Chlamydomonadinen aus den Altümpeln um Lunz. *Archiv für Protistenkunde* 61, 239-281.
 158. Pascher, A. 1930: Neue Volvocalen (Polyblepharidinen-Chlamydomonadinen). *Archiv für Protistenkunde* 69, 103-146.
 159. Patricio A. 2013: Isolation, Characterization and Identification of Microalgae from the Red Sea. Thesis. King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal. Kingdom of Saudi Arabia.

160. Pedersen L.B., Rosenbaum J.L. 2008: Chapter two intraflagellar transport (IFT): role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Current Topics in Developmental Biology* 85, 23–61.
161. Pentecost A. 1984: Observations on a bloom of the neuston alga, *Nautococcus pyriformis*, from southern England with an explanation of the floatation mechanism. *British Phycological Journal* 19, 227-232.
162. Poli A., Anzelmo G., Nicolaus B. 2010: Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. *Marine Drugs* 8, 1779–1802.
163. Possmayer M., Gupta R.K., Szyszka-Mroz B., Maxwell D.P., Lachance M.A., Hüner N.P.A., Smith D.R. 2016: Resolving the phylogenetic relationship between *Chlamydomonas* sp. UWO 241 and *Chlamydomonas raudensis* SAG 49.72 (Chlorophyceae) with nuclear and plastid DNA sequences. *Journal of Phycology* 52, 305-310.
164. Prakash O., Verma M., Sharma P., Kumar M., Kumari K., Singh A., Kumari H., Jit S., Gupta S.K., Khanna M., Lal R. 2007: Polyphasic approach of bacterial classification. An overview of recent advances. *Indian J. Microbiol* 47, 98-108.
165. Pringsheim E.G. 1930: Neue Chlamydomonadacee, welche in Reinkulturen gewonnen wurden. *Archiv für Protistenkunde* 69. 95-102.
166. Prochnik S.E., Umen J., Nedelcu A., Hallmann A., Miller S.M., Nishii I., 2010: Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science* 329, 223–226.

167. Pröschold T., Leliaert F. 2007: Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In: Unraveling the algae: the past, present and future of algal systematics (Ed. by J. Brodie & J. Lewis). Taylor and Francis, London, 123–153.
168. Pröschold, T., Marinm B., Schlösserm U.G., Melkonianm M. 2001: Molecular Phylogeny and Taxonomic Revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and Description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. Protist 152, 265–300.
169. Pröschold, T., Bock C., Luo W., Krienitz L. 2010: Polyphyletic distribution of bristle formation in Chlorellaceae: *Micractinium*, *Diacanthos*, *Didymogenes* and *Hegewaldia* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Phycological Research 58, 1-8.
170. Pröschold T., Harris E.H., Coleman A.W. 2005: Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. Genetics 170, 1601-1610.
171. Pröschold T., Silva P.C. 2007: Proposal to change the listed type of *Chlamydomonas* Ehrenb., nom. cons. (Chlorophyta). Taxon (in press).
172. Pröschold T., Darienko T., Krienitz L., Coleman A.W. 2018: *Chlamydomonas schloesseri* sp. nov. (Chlamydomonadales, Chlorophyta) revealed by morphology, autolysin cross experiments, and multiple gene analyses. Phytotaxa 362, 021-038.

173. Pulz O., Gross W. 2004: Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 635-648.
174. Raza W., Yang W., Jun Y., Shakoor F., Huang Q., Shen Q. 2012: Optimization and characterization of a polysaccharide produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 and its antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers* 90, 921–929.
175. Remias D., Lutz U., Lutz C. 2010: Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *Eur. J. Phycol* 40, 259–268.
176. Richmond A. 2008: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Wiley-Blackwell.
177. Rodolfi L., Zittelli C. G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. 2009: Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100-112.
178. Scaife M.A., Nguyen G.T., Rico J., Lambert D., Helliwell K.E., Smith A.G. 2015: Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *Plant Journal* 82, 532–546.
179. Sharma O.P. 1986: Textbook of Algae. Delhi.
180. Shihira I., Krauss R.W. 1965: *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. Maryland: University of Maryland, College Park, 1-97.
181. Skaloud P. 2008: Polyphasic approaches in the taxonomy of green aerophytic algae. Ph.D. thesis. Charles University in Prague.

182. Skuja H. 1943: Ein Fall von fakultativer Symbiose zwischen operculatem Discomycetun einer Chlamydomonade. Archiv für Protistenkunde 96, 365-376.
183. Somogyi B. 2010: Piko-eukarióta algák jelentősége sekély tavakban: téli dominancia és taxonómiai unikalitás. Doktori (PhD) értekezés. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest.
184. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. 2006: Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering 101, 87-96
185. Stamatakis A. 2014: RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30, 1312–1313.
186. Stern D.B., Witman G., Harris E.H. 2009: The *Chlamydomonas* sourcebook (Second Edition). Academic Press. Oxford; Burlington, MA; San Diego, CA.
187. Steudel B., C. Hallmann, Lorenz M., Abrahamczyk S., Prinz K., Herrfurth C., Feussner I., Martini J.W., Kessler M. 2016: Contrasting biodiversity-ecosystem functioning relationships in phylogenetic and functional diversity. New Phytologist 212, 409-420.
188. Stirk W.A., Ördög V., Novák O., Rolcik J., Strnad M., Bálint P., van Staden J. 2013a: Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. Journal of Phycology 49, 459–467.
189. Stirk W.A., Bálint P., Tarkowská D., Novák O., Strnad M., Ördög V., van Staden J. 2013b: Hormone profiles in microalgae: Gibberellins and brassinosteroids. Plant Physiology and Biochemistry 70, 348-353.

190. Streshinskaya G.M., Pakhomova M.V., Kosikov K.V. 1967: Composition of different *Chlorella* strains of green algae. *Prikladnaia Biokhimiiai Mikrobiologiiia* 3, 477–481.
191. Surek B. 2008: Meeting report: algal culture collections, an international meeting at the culture collection of algae and protozoa (CCAP), dunstaffnage marine laboratory, Dunbeg, Oban, United Kingdom, June 8–11. *Protist* 2008, 159: 509–517.
192. Sutherland I.W. 1972: Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology* 8, 143–213.
193. Takeda H., Hirokawa T. 1978: Studies on the cell wall of *Chlorella*. I. Quantitative changes in cell wall polysaccharides during the cell cycle of *Chlorella ellipsoidea*. *Plant and Cell Physiology* 19, 591–598.
194. Takeda T., Miyao K., Tamoi M., Kanaboshi H., Miyasaka H., Shigeoka S. 2003: Molecular characterization of glutathione peroxidase-like protein in halotolerant *Chlamydomonas* sp. W80. *Physiol. Plant.* 117, 467-475.
195. Tamoi M., Nagaoka M., Shigeoka S. 2005: Immunological properties of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from *Chlamydomonas* sp. W80. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 848–851.
196. Tanaka S., Ikeda K., Miyasaka H. 2004: Isolation of a new member of group 3 late embryogenesis abundant protein gene from a halotolerant green alga by a functional expression screening with cyanobacterial cells. *FEMS Microbiol Lett* 236, 41–45.

197. Thornton D.C.O. 2002: Diatom aggregation in the sea: mechanisms and ecological implications. *European Journal of Phycology* 37, 149–161.
198. Tóth J., Ördög V. 2011: Effect of MACC-612 *Nostoc entophyllum* on red pepper. 5th International Symposium on Microalgae and Seaweed Products in Plant/Soil-Systems, Mosonmagyaróvár (Hungary), 23-24 June, p:5-6.
199. Trainor F.R., Roskosky F.G. 1967: Control of unicell formation in a soil *Scenedesmus*. *Canadian Journal of Botany* 45, 1657-1665.
200. Tsarenko P.M. 2011: Tetrasporales. In: *Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography*. Gantner Verlag 3, 225-232.
201. Umen J. G. 2011: Evolution of sex and mating loci: an expanded view from Volvocine algae. *Current Opinion in Microbiology* 14, 634–641.
202. van Rijssel M., Janse I., Noordkamp D.J.B., Gieskes W.W.C. 2000: An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*. *Journal of Sea Research* 43, 297–306.
203. Vaultot D., Eikrem W., Viprey M., Moreau H. 2008: The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3 \mu\text{m}$) in marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 795-820.
204. Visviki I., Palladino J. 2001: Growth and Cytology of *Chlamydomonas acidophila* Under Acidic Stress. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 623–630.

205. Visviki I., Santikul, D. 2000: The pH Tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 38, 147–151.
206. Vuuren S. J., Taylor J., van Ginkel C., Gerber A. 2006: Easy identification of the most common freshwater algae. North-West University. Potchefstroom.
207. Watanabe S., L.A. Lewis 2017: Phylogenetic interpretation of light and electron microscopic features of selected members of the phylogroup Moewusinia (Chlorophyceae), with new generic taxonomy. Phycologia 56, 329–353.
208. Wehr J., Sheath R., Kociolek J.P. 2015: Freshwater Algae of North America 2nd Edition Ecology and Classification. Academic Press.
209. Wille N. 1903: Algologische Notizen IX-XIV. Nytt Magazin for Naturvidenskaberne 41, 89–185.
210. Wirth R. 2014: Biogáz termelő mikroorganizmus közösségek vizsgálata metagenomikai megközelítéssel. Doktori értekezés. SZTE és MTA-SZBK.
211. Wollenweber H.W. 1926: Viervakuolige Chlamydomonaden. Berichte der deutsche botanischen Gesellschaft 44, 52-56.
212. Wu H.L. 2001: Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. Bot. Bull. Acad. Sin. 42, 115–121.
213. Xiao R., Zheng Y. 2016: Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. Biotechnology Advances 34. 1225–1244.
214. Yang Z., Kong F.X., Yang Z., Zhang M., Yu Y., Qian S.Q. 2009: Benefits and costs of the grazer-induced colony formation in

- Microcystis aeruginosa*. *Annales de Limnologie. International Journal of Limnology* 45, 203-208.
215. Yumoto K., Kasai F., Kawachi M. 2013: Taxonomic re-examination of *Chlamydomonas* strains maintained in the NIES-Ccollection. *J. Microbiol. Cult. Collect.* 29, 1–12.
216. Zenova G.M., Shtina E.A., Dedysh S.N., Glagoleva O.B., Likhacheva A.A., Gracheva T.A. 1995: Ecological relations of algae in biocenoses. *Mikrobiologiya* 64, 121–133.
217. Zhang P., Liu S., Cong B., Wu G., Liu C., Lin X., Shen J., Huang X. 2011: A novel omega-3 fatty acid desaturase involved in acclimation processes of polar condition from Antarctic ice algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Mar Biotechnol* 13, 393–401
218. Zhou J., Mopper K., Passow U. 1998: The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnology and Oceanography* 43, 1860–1871.
219. Zhu F., Massana R., Not F., Marie D., Vaulot D. 2005: Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiology Ecology* 52, 79-92.
220. Zimmerman W.J. 1992: Microalgal biotechnology and applications in agriculture. In: *Soil microbial ecology* (Ed: Metting F.B.) Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, 457-479.

10. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A Mosonmagyaróvári Algagyűjtemény (MACC) történetében elsőként, 70, a *Chlamydomonas* nemzetség tagjainak vélt MACC zöldalga törzs genom DNS-ét izoláltam. A 18S rRNS gén egy szakaszát az EUK528F (5-'CCGCGGTAATTCCAGCTC-3 ') és a Chlo02R (5'-CTTCGAGCCCCCAACTTTC-3'), rövid, egyszálú DNS-szakaszokkal, primerekkel a PCR módszerrel sokszorosítottam, ezt követően szekvenáltattam, majd rendszertanilag elemeztem. A PCR termék hossza 380 és 400 bázispár között volt.
2. Ráműtattam arra, hogy a törzsek többsége, a zöldalga taxonómiában az elmúlt években bekövetkezett jelentős változások miatt, új nemzetségekbe sorolandó. Ezen kívül, megállapítottam, hogy a törzsek 9 filogenetikai csoportba sorolhatók a zöld alga filogenetikai fán. Ezek a következők: Arenicolinia, Chlorella, Chloromonadinia, Moewusinia, Oogamochlamydia, Polytominia, Reinhardtinia, Scenedesmaceae, Stephanosphaerina. A molekuláris adatokból kiderült, hogy a 70 törzs közül csak 22 *Chlamydomonas*, a többi törzs közül 9 a *Scenedesmus* nemzetség tagja, 8 *Chlorosarcinopsis*, 8 *Lobochlamys*, 6 *Chlorella*, 5 *Chlorococcum*, 3 *Deasonia*, 2 *Heterochlamydomonas*, 1-1 *Chloromonas*, *Nautococcus* és *Tetraspora*, míg 4 törzs besorolása továbbra is megoldatlan.
3. Hetven törzs mikroszkópi módszerrel történő elemzését is elvégeztem. Rávilágítottam arra, hogy az alaktani meghatározást meg kell erősíteni a molekuláris biológiai eredményekkel, ugyanis

a gyorsan keletkező filogenetikai adatok korában, már a nemzetség szintű azonosítás sem biztosított alaktani szinten.

4. A Mosonmagyaróvári Algagyűjteményben (MACC) elsőként vizsgáltam oldható és kötött extracelluláris poliszacharidok jelenlétét. Hét törzs esetében több mint 1 g L^{-1} oldható EPS-t mértem, három törzs tenyészetében pedig az oldható EPS mennyisége meghaladta a 2 g L^{-1} -t. A legtöbb EPS-t az MACC 398 törzs termelte (2763 mg L^{-1}) a 30 napos inkubálás során. Az eredményekkel igazoltam, hogy az MACC *Chlamydomonas* törzsei között vannak értékes EPS-termelők, amelyek például talajkondicionáló készítmények alapanyagai lehetnek.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Ördög Vince egyetemi tanár úrnak, valamint Dr. Molnár Zoltán docens úrnak a doktori tanulmányaim során nyújtott szakmai segítségükért, tanácsaikért.

Köszönöm Prof. Dr. Vörös Lajos egyetemi tanár úrnak, az MTA Balatoni Limnológiai Kutatóintézet tudományos tanácsadójának a taxonómiai kutatások során nyújtott pótolhatatlan segítségét.

Szeretném megköszönni Dr. Maróti Gergely kutatónak, Dr. Wendy A. Stirk professzor asszonynak valamint Pap Bernadettnek, hogy szakmai észrevételeikkel hozzájárultak tudományos értekezésem jobbá tételéhez. Köszönettel tartozom továbbá a Növénytudományi Tanszék valamennyi dolgozójának, különös tekintettel Bálint Péternek és Lobik Ildikónak, az algaanyaggyűjtésben és az adatrögzítésben nyújtott segítségükért.

Szívből jövő köszönettel tartozom családomnak segítségükért és szeretetükért.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

A közlemények „A Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT)” adatbázisban is megtalálhatók.

Nemzetközi impakt faktoros folyóiratban megjelent publikációk:

1. **S. Katona**, N. Horváth, D.E. Berthold, Z. Molnár, P. Bálint, V. Ördög, B. Pap, G. Maróti, F. Bánáti, K. Szenthe, L. Vörös, C. Kilgore, H.D. Laughinghouse 2019: Phylogenetic re-evaluation of previously identified *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlamydomonadaceae) strains from The Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection, Hungary, using molecular data. South African Journal of Botany. 125, 16-23. Q2, **IF: 1.792**.
2. N. Horváth, **S. Katona**, D.E. Berthold, Z. Molnár, P. Bálint, V. Ördög, B. Pap, G. Maróti, F. Bánáti, K. Szenthe, L. Vörös, C. Kilgore, H.D. Laughinghouse 2019: The reclassification of 37 strains from The Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection, Hungary, which were previously identified as *Anabaena* (Cyanobacteria, Nostocaceae). South African Journal of Botany. 123, 333-340. Q2, **IF: 1.792**.

Hazai tudományos folyóiratban megjelent publikáció:

3. **S. Katona**, N. Horváth, Z. Molnár, V. Ördög 2018: Extracellular polysaccharides in twenty *Chlamydomonas* strains of the

Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection. Acta agronomica Óváriensis. 59, 62-81.

4. **S. Katona**, Z. Molnár, V. Ördög 2016: A *Chlamydomonas* zöldalga nemzetség algáinak szerepe a biotechnológiában és helyük a zöldalgák rendszerében. Botanikai közlemények. 103, 153-171.

Nemzetközi konferencián tartott idegen nyelvű előadások:

5. N. Horváth, **S. Katona**, Z. Molnár, V. Ördög 2019: Extracellular polysaccharides in twenty *Chlamydomonas* strains of the Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection. 9th Symposium on Microalgae and Seaweed Products. Mosonmagyaróvár, 25-26 June, 2019.

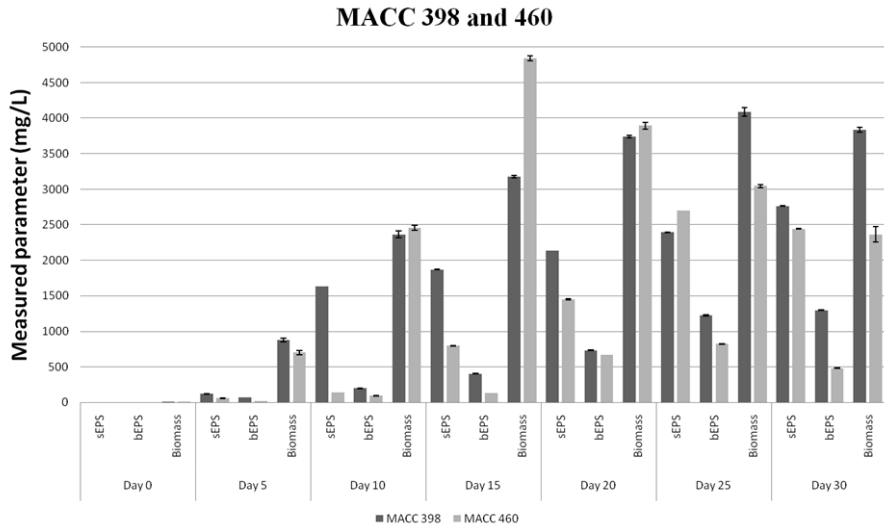
Nemzetközi konferencián bemutatott poszterek:

6. **S. Katona**, N. Horváth, D.E. Berthold, Z. Molnár, P. Bálint, V. Ördög, B. Pap, G. Maróti, F. Bánáti, K. Szenthe, L. Vörös, C. Kilgore, IV H.D. Laughinghouse 2019: The reclassification of 37 strains from The Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection, Hungary, which were previously identified as *Anabaena* (Cyanobacteria, Nostocaceae). 9th Symposium on Microalgae and Seaweed Products. Mosonmagyaróvár, 25-26 June, 2019.
7. **S. Katona**, N. Horváth, Z. Molnár, V. Ördög 2015: Review of the biotechnological research results of the genus *Chlamydomonas*. 7th Symposium on Microalgae and Seaweed Products. Mosonmagyaróvár, 29-30 June, 2015.

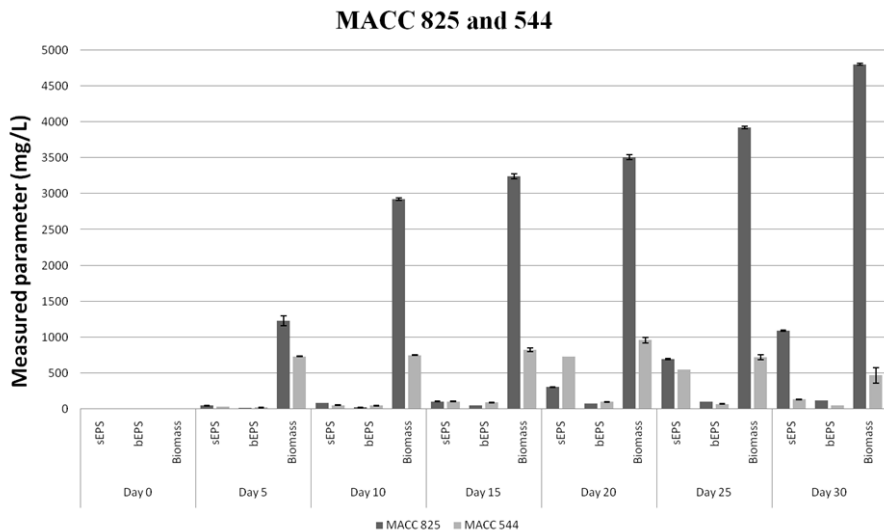
8. N. Horváth, **S. Katona**, Z. Molnár, V. Ördög 2015: Review of the possible ways to enhance the akinete germination of the genus *Anabaena*. 7th Symposium on Microalgae and Seaweed Products. Mosonmagyaróvár, 29-30 June, 2015.
9. **S. Katona**, N. Horváth, Z. Molnár, V. Ördög 2014: Taxonomic and phylogenetic analysis of *Chlamydomonas* green alga strains. XXXV. Óvári Tudományos Nap. Mosonmagyaróvár, 13 November, 2014.
10. N. Horváth, **S. Katona**, Z. Molnár, V. Ördög 2014: Taxonomic and phylogenetic analysis of *Anabaena* cyanobacterium strains. XXXV. Óvári Tudományos Nap. Mosonmagyaróvár, 13 November, 2014.
11. **S. Katona**, N. Horváth, Z. Molnár, V. Ördög 2014: Phylogenetic and taxonomic review of the *Chlamydomonas* (*Volvocales*, Chlorophyta) green algae strains. 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology. Szeged, 27-29 August, 2014.
12. N. Horváth, **S. Katona**, Z. Molnár, V. Ördög 2014: Phylogenetic and taxonomic review of the *Anabaena* (*Nostocales*, Cyanobacteria) cyanobacteria strains. 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology. Szeged, 27-29 August, 2014.
13. N. Horváth, **S. Katona**, N. Makra, Z. Molnár, V. Ördög 2013: Application of PCR methods on the algae strains of Mosonmagyaróvár Algae Culture Collection (MACC). 6th Symposium on “Microalgae and seaweed products in plant/soil-systems”. Mosonmagyaróvár, 24-25 June, 2013.
14. **S. Katona**, N. Horváth, Z. Molnár, V. Ördög 2012: Gibberellinsav és mikroalga kezelés hatása néhány fűszernövény magjának

csírázására. XXXIV. Óvári Tudományos Nap. Mosonmagyaróvár,
2012. október 5.

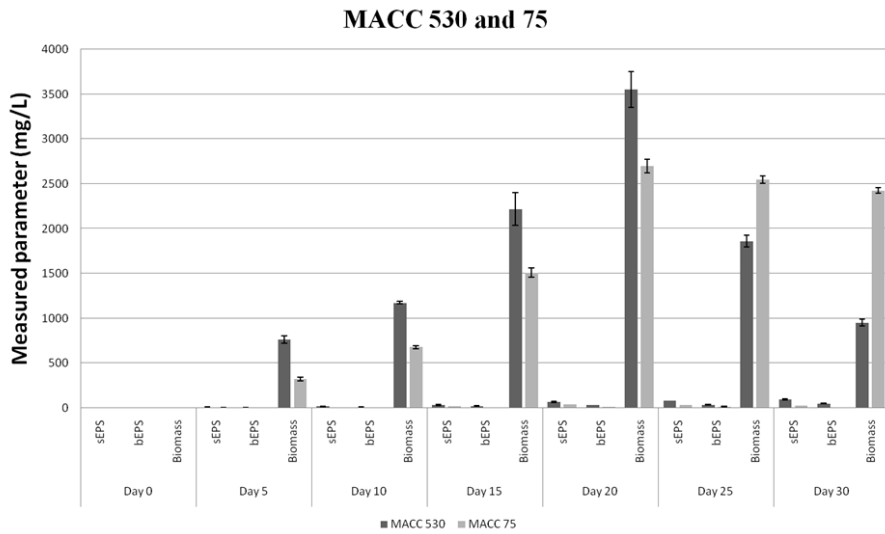
MELLÉKLETEK



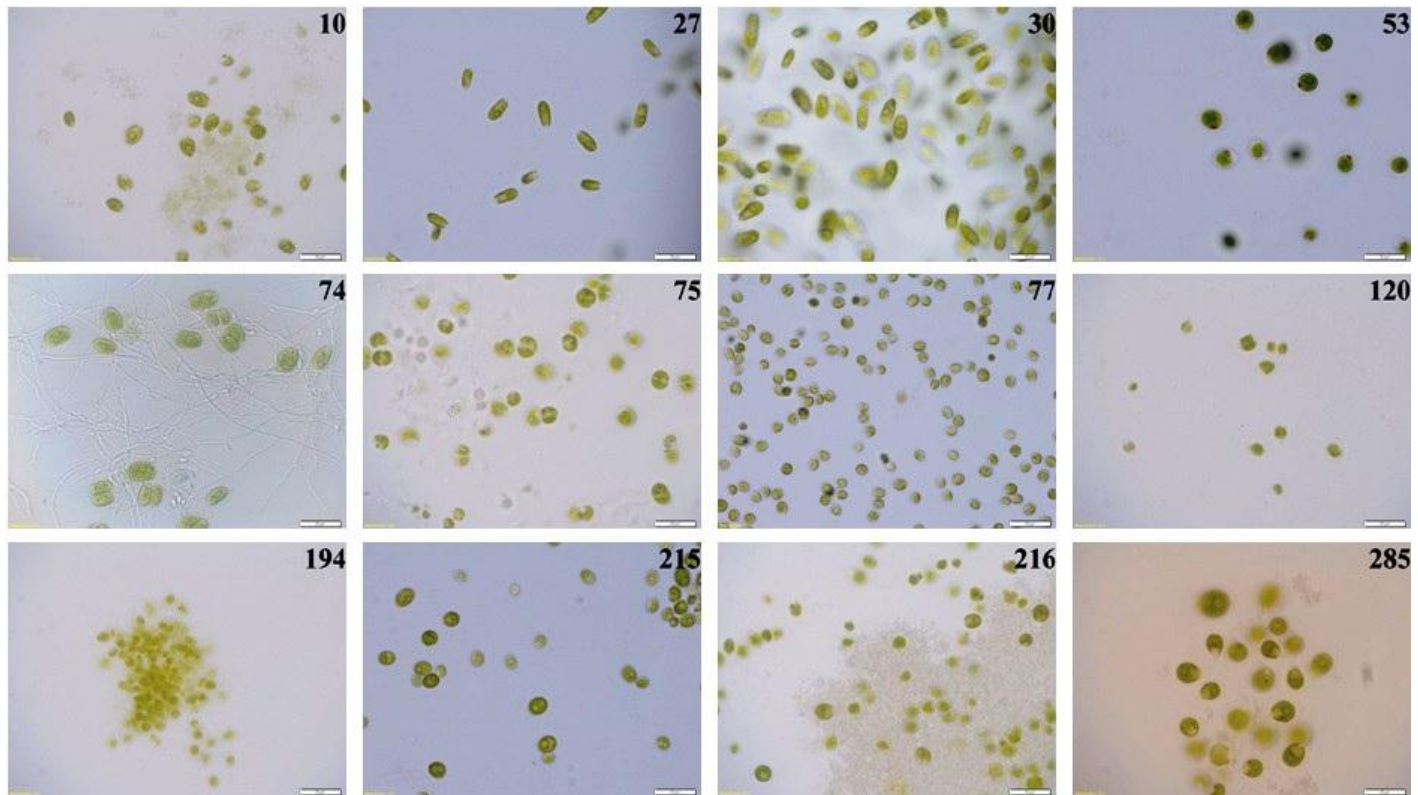
14. Ábra Két magas sEPS termelő *Chlamydomonas* törzs (MACC 398 és 460) biomassza, oldható (sEPS) és kötött (bEPS) termelését ábrázoló oszlopdiagram.



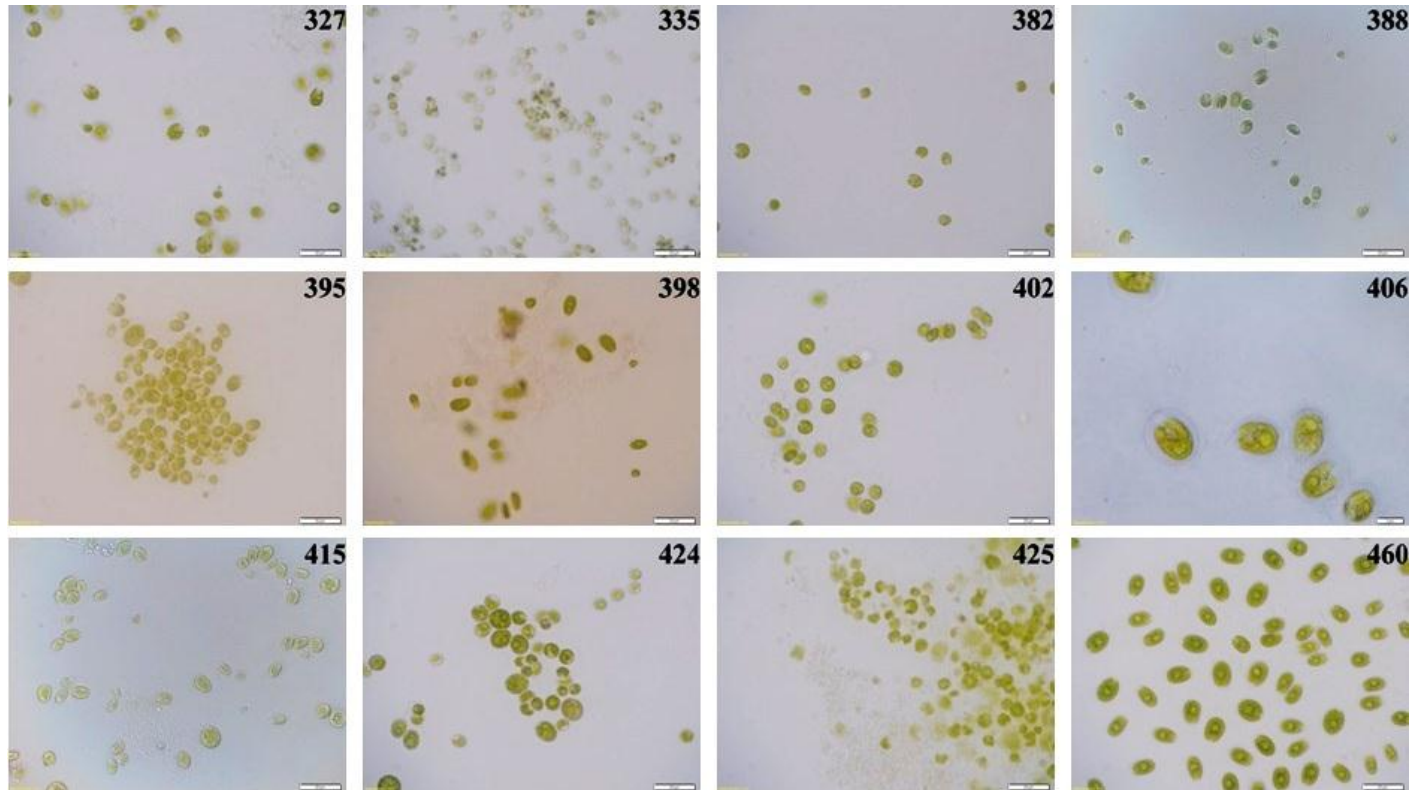
15. Ábra Két közepes sEPS termelő *Chlamydomonas* törzs (MACC 825 és 544) biomassza, oldható (sEPS) és kötött (bEPS) termelését ábrázoló oszlopdiagram.



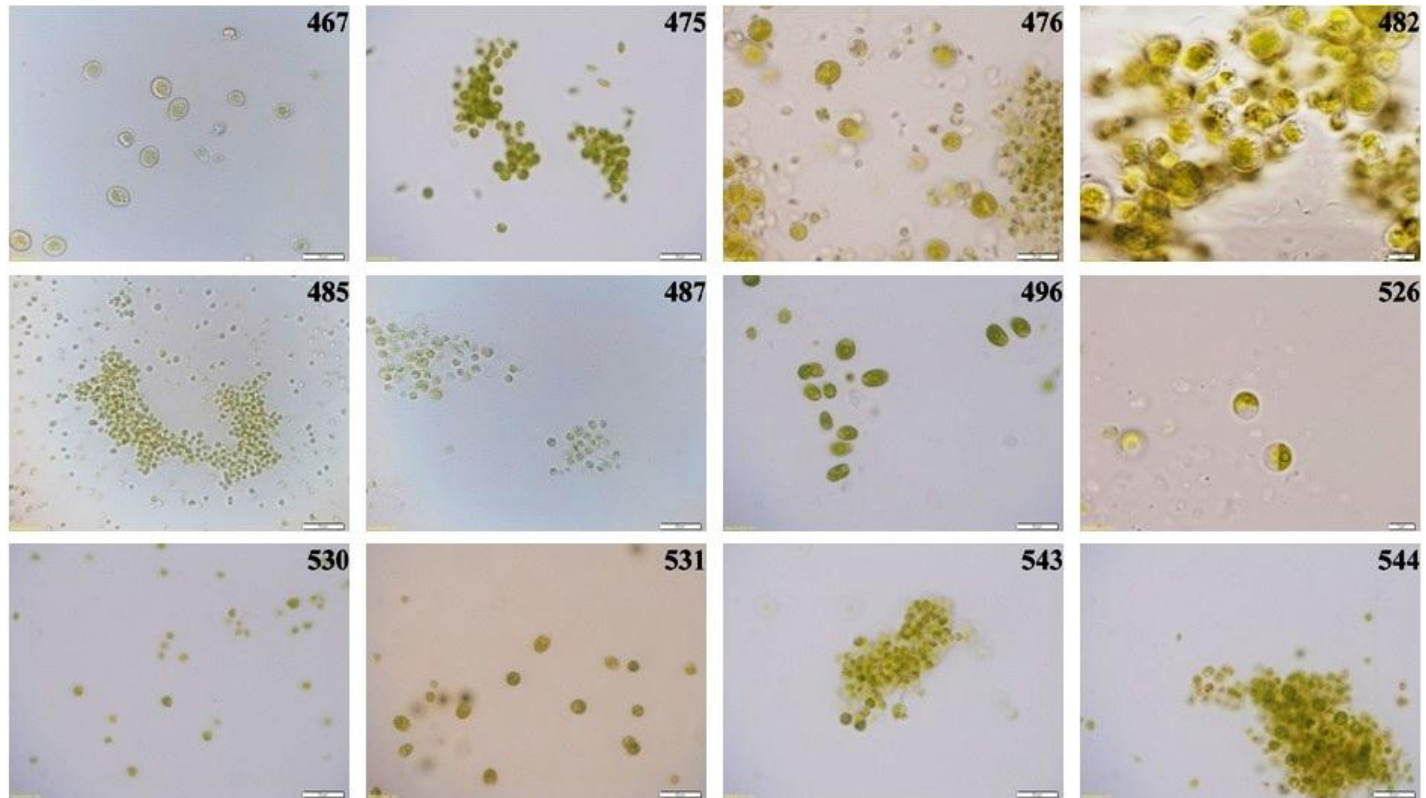
16. Ábra Két gyenge sEPS termelő *Chlamydomonas* törzs (MACC 530 és 75) biomassza, oldható (sEPS) és kötött (bEPS) termelését ábrázoló oszlopdiagram.



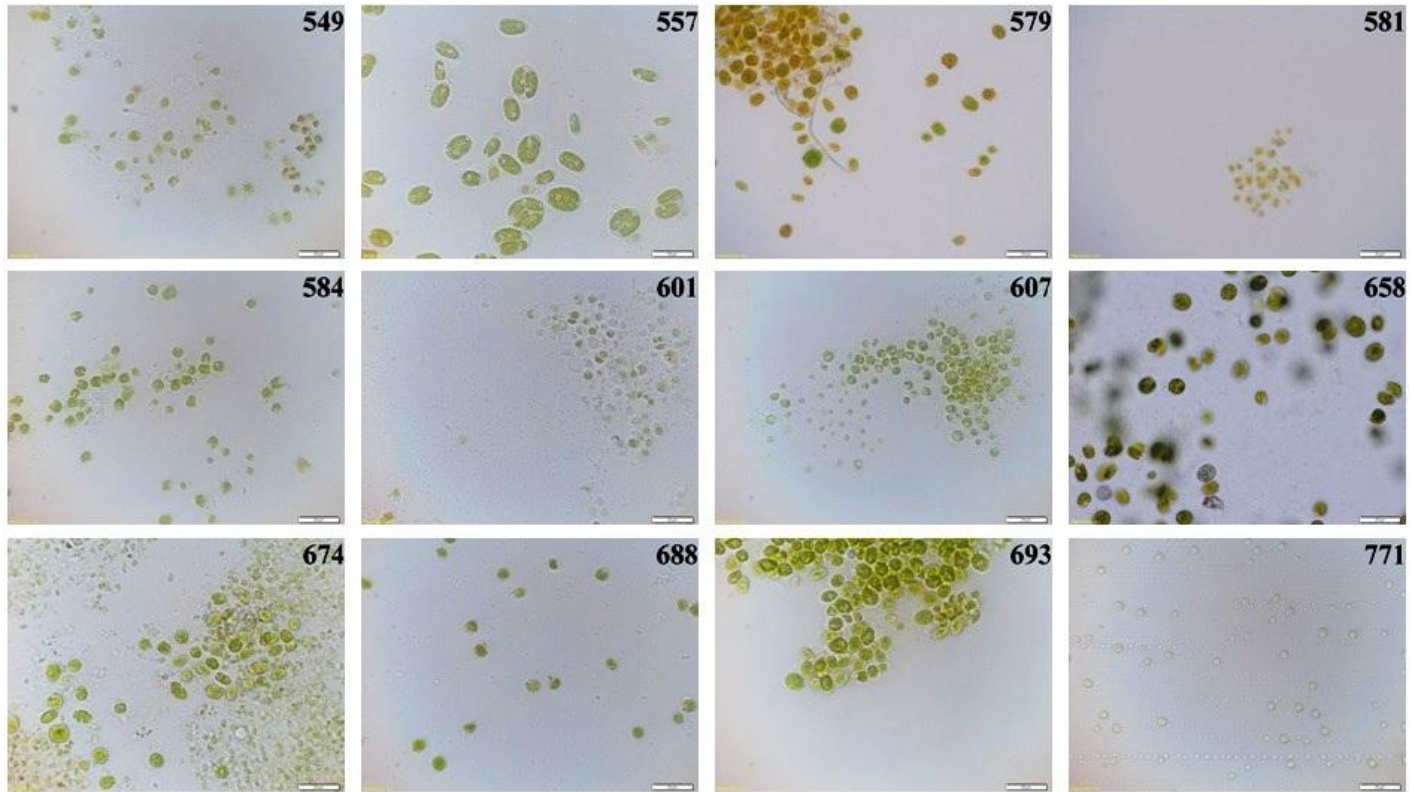
17. Ábra Az MACC10, 27, 30, 53, 74, 75, 77, 120, 194, 215, 216 és 285-ös törzsek fénymikroszkópos képe 400-szoros nagyításban. A méretskála 20 μm .



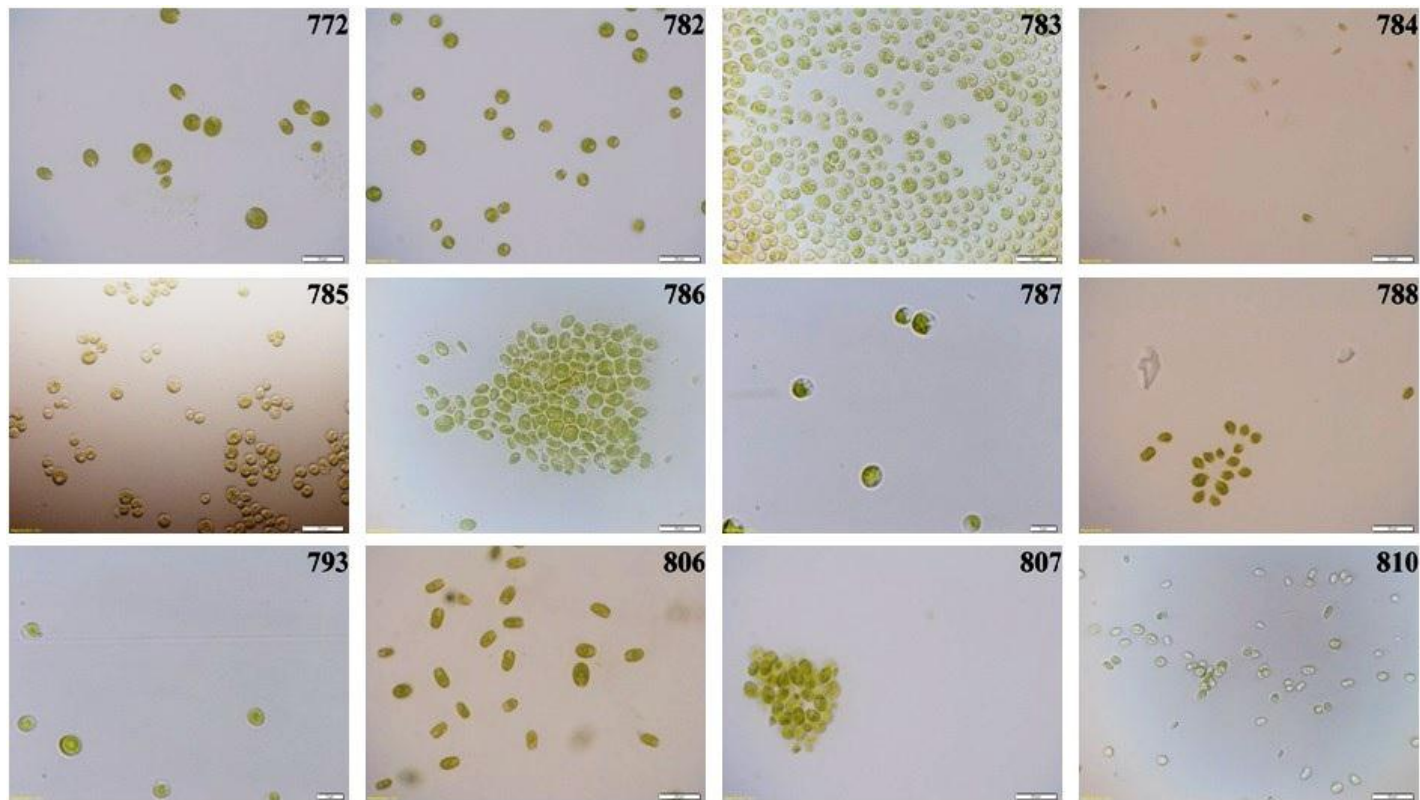
18. Ábra A MACC327, 335, 382, 388, 395, 398, 402, 415, 424, 425 és 460-as törzsek fénymikroszkópos képe 400-szoros nagyításban. A méretskála 20 μm . A 406-os törzs esetében 100-szoros a nagyítás, a méretskála pedig 5 μm .



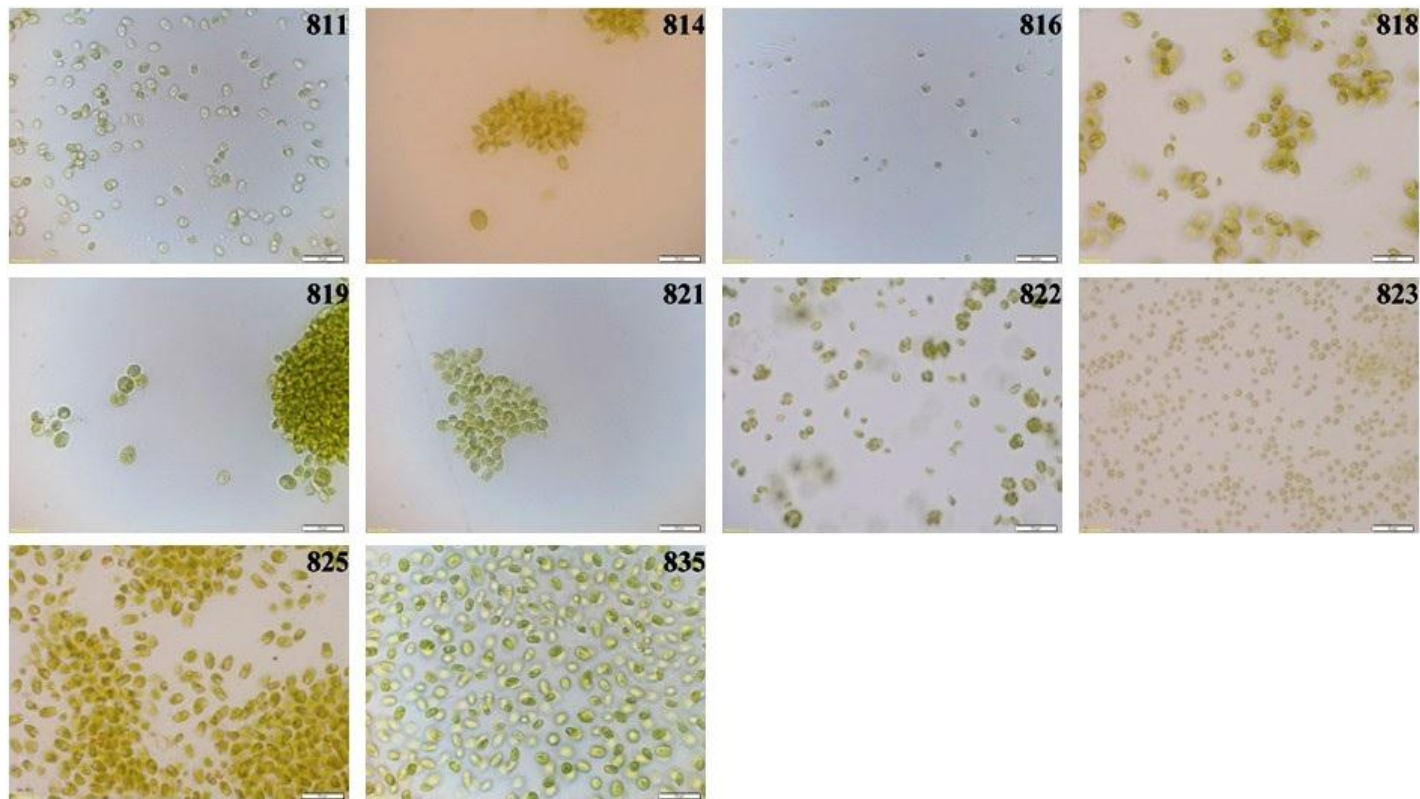
19. Ábra A MACC 467, 475, 476, 485, 487, 496, 530, 531, 543, 544-es törzsek fénymikroszkópos képe 400 szorosnagytásban. A méretskála 20 μm . A 482 és 526 törzsek esetében 100-szoros a nagyítás, a méretskála pedig 5 μm .



20. Ábra Az MACC549, 557, 579, 581, 584, 601, 607, 658, 674, 688, 693, 771-es törzsek fénymikroszkópos képe 400-szoros nagyításban. A méretskála 20 μm .



21. Ábra Az MACC 772, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 793, 806, 807, 810-es törzsek fénymikroszkópos képe 400-szoros nagyításban. A méretskála 20 µm. A 787 és 793 törzsek esetében 100-szoros a nagyítás, a méretskála pedig 5 µm.



22. Ábra Az MACC 811, 814, 816, 818, 819, 821, 822, 823, 825, 835-ös törzsek fénymikroszkópos képe 400-szoros nagyításban. A méretskála 20 μm .