

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie



EKOLOGIE A TAXONOMIE PERIFYTICKÝCH SINIC

Bakalářská práce

Eva Jahodářová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Doc. Petr Hašler, Ph.D.

Olomouc 2012

Konzultant: Mgr. Petr Dvořák

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, s pomocí vedoucího práce Doc. Petra Hašlera Ph.D. a konzultanta Mgr. Petra Dvořáka, použila jsem jen uvedené bibliografické a elektronické zdroje.

V Olomouci dne 25. 7. 2012

.....

PODĚKOVÁNÍ

Velmi děkuji panu Doc. Petru Hašlerovi, Ph.D. za umožnění práce na tomto zajímavém tématu, a také za jeho cenné rady při zpracování bakalářské práce. Dále bych velice ráda poděkovala svému konzultantovi panu Mgr. Petru Dvořákovi, za jeho vstřícný přístup, ochotu a obětavost. V neposlední řadě nesmím opomenout poděkovat své rodině, která mi vytvořila skvělé zázemí.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Eva Jahodářová

Název práce: Ekologie a taxonomie periferytických sinic

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra botaniky

Vedoucí práce: Doc. Petr Hašler Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petr Dvořák

Rok obhajoby: 2012

ABSTRAKT

Sinice jsou mikroskopické prokaryontní organismy s kosmopolitním rozšířením. Jsou nedílnou součástí epipelonu stojatých vod a studiem epipelonu se také tato bakalářská práce zabývá. Vzorky epipelonu byly odebrány v roce 2011 v měsíci srpnu, říjnu a listopadu ve třech lokalitách CHKO Poodří a v lokalitě Heřmanický rybník. K hodnocení získaných vzorků byly použity metody morfologické i molekulární. Vzorky byly determinovány na základě morfologických vlastností dle dostupné literatury, následně kultivovány v tekutém médiu na Petriho miskách. Byla provedena izolace unialgalních kultur. Mezi vyizolovanými druhy byla přítomna např. *Pseudanabaena galeata* nebo *Phormidium animale*. Následně bylo přistoupeno k molekulárním analýzám, konkrétně izolace DNA a PCR amplifikace 16S rRNA. U jednoho vzorku muselo být provedeno klonování, dále následovalo komerční sekvenování. K rekonstrukci fylogenetického stromu byla použita částečná sekvence 16S rRNA kódující gen pro malou podjednotku ribozomu. Na základě morfologických znaků byla prokázána příbuznost vyizolovaného *Phormidium* cf. *animale* E1 a *Phormidium* cf. *animale* E2 s již popsáním druhem *Phormidium animale*. Byla zjištěna určitá genetická vzdálenost těchto dvou studovaných kmenů od dříve studovaného *Phormidium animale* z jiné lokality. Rovněž byli studováni členové skupiny *Pseudanabaenaceae*. Morfologickou studií byly zjištěny dva morfotypy druhu *Pseudanabaena* cf. *galeata*. Analýza 16S rRNA odhalila tři různé genotypy. Jak u *Phormidium*, tak u *Pseudanabaena* se může jednat o nové nebo kryptické druhy, avšak k potvrzení této domněnky musí být vyizolovány další kmeny a použity citlivější molekulární markery.

Klíčová slova: epipelon, sinice, morfologie, taxonomie, fylogenetika, 16S rRNA.

Počet stran: 80

Počet příloh: 17

Jazyk: Čeština

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

First name and surname of the author: Eva Jahodářová

Name of the thesis: Ecology and taxonomy of periphytic cyanobacteria

Type of thesis: bachelor

Workplace: Botany department

Thesis supervisor: Doc. Petr Hašler Ph.D.

Consultant: Mgr. Petr Dvořák

Year of defence: 2012

ABSTRACT

Cyanobacteria are microscopic prokaryotic organisms with a cosmopolitan distribution. They are an integral part of epipelton of the stagnant water and the study of epipelton is the subject of this thesis. Samples of epipelton were collected in 2011 during the months of August, October and November at three locations in CHKO Poodří and in the area of the Heřmanický pond. Morphological and molecular methods were used for the evaluation of the obtained samples. Samples were determined on the basis of morphological characteristics according to available literature, and subsequently cultured in a liquid medium in Petri dishes. Unialgal cultures were isolated. Among the isolated species was present, for example, the *Pseudanabaena galeata* or *Phormidium animale*. The samples were then subjected to molecular analyses, particularly DNA isolation and PCR amplification of 16S rRNA. One sample had to be cloned, further followed by commercial sequencing. For the reconstruction of the phylogenetic tree, a partial sequence of the 16S rRNA gene (for a small subunit of the ribosome) was used. On the basis of morphological similarity, relationship of the isolated *Phormidium* cf. *animale* E1 and *Phormidium* cf. *animale* E2 was demonstrated with the already described species *Phormidium animale*. A certain genetic distance was determined of these two strains from the previously studied *Phormidia animale* from another location. Members of the group *Pseudanabaenaceae* were also studied. Morphological studies have identified two morphotypes of type *Pseudanabaena* cf. *galeata*. Analysis of 16S rRNA revealed three different genotypes. As with *Phormidium* then also with *Pseudanabaena*, there may be new or cryptic species. However confirm this assumption, additional strains must be isolated and more sensitive molecular markers must be utilized.

Keywords: Epipelon, cyanobacteria, morphology, taxonomy, phylogenetics, 16S rRNA

Number of pages: 80

Number of appendices: 17

Language: Czech

OBSAH

ÚVOD	11
1. Obecná charakteristika sinic	11
1.1. Specializované struktury a buňky	11
1.2. Typy stélek	12
1.3. Rozmnožování	13
1.4. Ekologie sinic	13
1.5. Využití	14
2. Charakteristika životního prostředí stojatých vod	15
2.1. Stojaté vody	15
2.1.2. Rozdělení základních bentických habitatů stojatých vod	15
2.1.1.1. Pelagiál	15
2.1.1.2. Bentál	15
3. Charakteristika života ve stojatých vodách	16
3.1. Dělení perifytonu	16
3.1.1. Epipelon	17
3.1.1.1. Sezónní sukcese epipelonu ve sladkovodních nádržích	18
4. Taxonomie	19
4.1. Morfologické přístupy hodnocení taxonomie sinic	20
4.1.1. Kokální druhy	21
4.1.2. Vlákňité druhy	21
4.2. Molekulární přístupy využívané v taxonomii sinic	22
4.2.1. Gen 16S rRNA	22
4.2.2. ITS region (Internal Transcribed Spacer)	23
5. Charakteristika a ekologie perifytických rodů sinic	24
MATERIÁLY A METODY	30
1. Chráněná krajinná oblast Poodří	30
1.1. Mezinárodní význam	30
1.2. Charakteristika území	30
1.3. Geologie a geomorfologie	30
1.4. Pedologie	30

1.5. Fauna a flora	31
1.6. Klimatologie	31
1.7. Hydrologie	31
1.8. Rybník Kotvice	32
1.9. Horní rybník	32
1.10. Křivý rybník	32
2. Evropsky významná lokalita Heřmanický rybník	33
2.1. Mezinárodní význam	33
2.2. Charakteristika území	33
2.3. Geologie a geomorfologie	33
2.4. Pedologie	33
2.5. Fauna a flóra	34
2.6. Klimatologie	34
2.7. Hydrologie	34
2.8. Heřmanický rybník (Heřmanický stav)	35
3. Sběr materiálu	35
4. Mikroskopování a determinace	36
5. Kultivace	36
6. Izolace vybraných kmenů	37
7. Izolace DNA	38
8. DNA amplifikace	38
9. Klonování DNA	40
10. Purifikace PCR produktu	41
11. Fylogenetická analýza	42
CÍLE PRÁCE	42
VÝSLEDKY	43
1. Základní fyzikálně-chemické parametry	43
1.1. Povrchová teplota vody	43
1.2. Hodnoty pH vody	43
1.3. Konduktivita	43
1.4. Salinita (TDS- Total Dissolved Solids)	43
2. Floristický průzkum lokalit v CHKO Poodří a Heřmanickém rybníku	44
2.1. Výskyt druhů v lokalitě Křivý rybník	44
2.2. Výskyt druhů v lokalitě rybníku Kotvice	45

2.3. Výskyt druhů v lokalitě Horní rybník	47
2.4. Výskyt druhů v lokalitě rybníku Heřmanice	49
3. Morfologie studovaných kmenů	50
4. Fylogenetická analýza na základě genu 16S rRNA	53
DISKUZE	55
1. Podmínky prostředí	55
2. Morfologická variabilita	55
3. Studie struktury 16S rRNA	57
ZÁVĚR	58
POUŽITÁ LITERATURA	59
SEZNAM PŘÍLOH	70

ÚVOD

1. Obecná charakteristika sinic

Sinice, odborně Cyanobacteria, Cyanoprokaryota, Cyanophyceae nebo Cyanophyta, jsou fotosyntetické mikroskopické jednobuněčné, koloniální nebo vláknité gramnegativní bakterie (BELLINGER & SIGEE 2010; KALINA & VÁŇA 2005). Postrádají struktury které se běžně vyskytují u eukaryot, např. jádro, Golgiho aparát, endoplasmatické retikulum, mitochondrie, plastidy, vakuoly ohraničené tonoplastem. Thylakoidy sinic (KALINA & VÁŇA 2005) mají schopnost syntetizovat chlorofyl a, vyskytuje se u nich také chlorofyl b (HINDÁK 2008) a chlorofyl d, který je z velké části zastoupen např. u sinice rodu *Acaryochloris marina* (AKIYAMA et al. 2001). V membráně thylakoidů se nachází α i β karoten a xantofyly např. myxoxanthofyl, zeaxanthin nebo echinenon. Na povrchu thylakoidů jsou fykobilizómy, ty syntetizují barviva fykobiliny. C- fykocyanin a allofykocyanin zapříčiňují modré a c- fykoerythryn červené zbarvení buněk. Zmíněná barviva umožňují průběh fotosyntézy i při velmi malé intenzitě osvětlení. Zásobní látkou buněk je polysacharid sinicový škrob, cyanofycinová zrnka jsou zásobárnou dusíkatých látek, polyfosfátové granule obsahují fosforečnany. Ty se do granul ukládají v době, kdy je jich ve vnějším prostředí dostatek a naopak se uvolňují z granulí při jejich nedostatku (HINDÁK 2008; STARMACH 1966; KALINA & VÁŇA 2005).

1. 1. Specializované struktury a buňky

U sinic nalezneme určité struktury, které jsou charakteristické pouze pro tuto taxonomickou skupinu.

AEROTOPY - Jde o soubor plynových měchýřků, které se sdružují do podoby aerotopů. Jsou válcovitého tvaru se zašpičatělými konci. Stěna těchto struktur je složená především z glykoproteinů, je poměrně pevná a propustná pro všechny plynné látky. Aerotopy odlehčují sinice ve vodním sloupci (HINDÁK 2008; KALINA & VÁŇA 2005; KALINA 1998, 1994). Nápadné aerotopy vytváří rod *Microcystis*, *Planktothrix*.

AKINETY (ARTROSPORY) - Vznikly z jedné nebo splynutím více vegetativních buněk, slouží k přežití za nepříznivých podmínek vnějšího prostředí. Od vegetativních buněk se akinety liší zejména velikostí a tlustší buněčnou stěnou, cytoplazma akinet

obsahuje více granulí. Mají velkou zásobu živin (HINDÁK 2008; BRAYNER et al. 2009; KALINA 1998, 1994). Akinety tvoří např. rody *Anabaena*, *Nostoc*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*.

HETEROCYTY (HETEROCYSTY) - Jsou tlustostěnné buňky, které vznikají z buněk vegetativních. Na povrchu heterocyty je slizový obal, obsah vnitřku buňky je průhledný. Pomocí nitrogenázy se v nich fixuje vzdušný dusík, z něj pak vzniká amoniak. Fixovaný dusík se uvnitř buněk skladuje ve formě cyanophycinu, později je transportován přes zátky do sousedních buněk jako glutamin. Podobný proces fixace dusíku je znám u některých bakterií, u těch však probíhá za anaerobních podmínek. Víme, že v heterocytech se nachází fotosystém I, proto zde nevzniká kyslík. Zřejmě se heterocyty objevily u sinic již v prekambriu před 2×10^9 lety (HINDÁK 2008; BRAYNER et al. 2009; KALINA 1998, 1994). Heterocyty nalezneme např. u rodu *Nostoc*, *Anabaena*, *Gloeotrichia*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*.

1. 2. Typy stélek

Sinice zahrnují různé typy stélek. Kokální sinice se vyskytují samostatně nebo se sdružují do kolonií. Tyto kolonie mohou být pravidelné např. *Merosmopedia* nebo nepravidelné např. *Aphanocapsa*. Buňky jsou především uniformní. U všech jednoduchých sinic byla prokázána tendence k polaritě buněk. Polarizované buňky jsou odvozeny z nepolarizovaných typů, proto by měly být evolučně pokročilejší. Tendence vytvářet polarizované buňky, uspořádání buněk do pseudovláken nebo polarizovaných kolonií je zřejmě vyjádření evolučního trendu (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1998; WHITTON & POTTS 2002).

Vláknité sinice mohou tvořit stélky nevětvené, které tvoří např. *Oscillatoria* nebo stélky větvené např. *Plectonema*, *Schizothrix*. U vláknitých sinic se vyskytují dva typy větvení: pravé větvení např. u *Stigonemy* a nepravé větvení, se kterým se můžeme setkat např. u *Tolypothrix*. Za pravé větvení je považováno dělení jedné buňky v rámci jednoho vlákna, poté vznikají dvě nebo více buněk dceřiných. Falešná větvení se vyznačují bočním prodloužením daného vlákna, bez jakéhokoli buněčného dělení (BELLINGER & SIGEE 2010; WHITTON & POTTS 2002; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005). Kolonie mohou narůstat do takových velikostí, že jsou viditelné i pouhým okem.

Velká většina sinic produkuje slizovou pochvu, která obaluje buď celou kolonii nebo samostatné buňky. Slizová pochva může být vrstevnatá a nápadně zbarvená karotenoidy scytoniminy (KALINA & VÁŇA 2005). V kulturách, kde jsou sinice vystaveny stresovým podmínkám, se slizová pochva může vytvořit i u druhů, které ji za běžných podmínek nevytvářejí (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1998).

1. 3. Rozmnožování

Cyanobacterie se rozmnožují pouze asexuálně, a to dělením buněk. Rozmnožují se buď prostým dělením, kdy plazmatická membrána spolu s buněčnou stěnou začíná růst do středu buňky a vytváří příčnou přehrádku, ta rozděluje protoplast na dvě poloviny, následně se buňka rozdělí. Nejprve vrůstá do nitra buňky plazmatická membrána, poté buněčná stěna a její další vrstvy (KALINA & VÁŇA 2005). Asymetrické binární dělení, vyskytující se např. u *Synechococcus nidulans*, je pouze pozměněné prosté dělení. Další způsob rozmnožování je pomocí exocytů. Jedná se o asymetrické binární dělení přisedlých buněk, kdy se apikální část oddělí od zbytku buňky např. u *Chamaesiphon polonicus*. Nanocyty nebo baeocyty lze charakterizovat postupným nebo současným rychlým dělením mateřské buňky na menší dceřiné buňky, např. u *Stanieria sphaerica*. Rozmnožování vláknitých sinic může probíhat stejným způsobem jako u sinic kokálních. Rozmnožovací funkci může zastat také samostatné vlákno, po rozpadu vlákna vznikají rozmnožovací útvary tzv. hormogonia (HINDÁK 2008), jde o krátké filamenty, které se skládají z nediferencovaných buněk (BRAYNER et al. 2009). Mohou být někdy pohyblivé a obsahovat aerotopy. Akinety a zřídka heterocyty jsou jedním ze způsobů rozmnožování (HINDÁK 2008, KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1998, 2005).

1. 4. Ekologie sinic

Geologové i biochemici se shodují v tom, že sinice mají velice dlouhou evoluční historii. Ne však všichni jsou názoru, že se prokaryotní organismy rozšířily více jak před $3,5 \times 10^9$ milióny let. Vyskytují se téměř ve všech biotopech na Zemi. Od vody sladké přes vodu slanou a brakickou, v půdě, na zdech, v nárostech, uvnitř stromatolitů (STAL 2002), v mechu, v podzemních pramenech (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1998). Díky jejich jednoduché buněčné stavbě osídlují stanoviště s velmi nehostinnými podmínkami, od termálních pramenů až po zcela vysušené biotopy (BELLINGER & SIGGE 2010; KALINA & VÁŇA 2005; KOMÁREK 2006). Velká většina z nich může

tolerovat široké rozpětí životních podmínek, ale jsou mezi nimi i zástupci se silnou ekologickou preferencí (BELLINGER & SIGEE 2010). Sinice jsou častými symbionty rostlin, suchozemských a vodních hub a prvoků (ADAMS & DUGGAN 2008, ADAMS et al. 2006).

Planktonní druhy bývají často toxické. Sinice nejsou škodlivé pouze pro savce (ROBINSON et al. 2002), ale také pro další organismy. Toxiny lidem způsobují akutní nebo chronické zdravotní problémy. Ptákům, rybám a dalším zvířatům smrtelné otravy (LYSÁKOVÁ, KITNER & POULÍČKOVÁ 2007). Laboratorní výzkum přinesl nové poznatky týkající se zooplanktonu. Některé kmeny sinic brání příjmu potravy a tím zvyšují úmrtnost zooplanktonu. Určité druhy organismů se na toxicitu adaptovaly (DEMOTT et al. 1991). Toxiny produkované sinicemi mají určitý specifický účinek. Podle toho je řadíme do různých kategorií. Neurotoxiny jsou produkovány např. *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*. Hepatotoxiny jsou produkovány sinicemi např. *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria agardhii*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena laxa*, *Aphanizomenon ovalisporum*. Cytotoxiny produkují rody jako je např. *Scytonema pseudohofmanni*, *Oscillatoria acutissima*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis wesenbergii*, *Tolypothrix bissoidea* (ROBINSON et al. 2002).

1. 5. Využití

Sinice se využívají zejména v biotechnologiích. Mají vysoký obsah proteinů, jsou využívány v dietologii jako potravní doplněk. Pro tyto účely se pěstuje *Spirulina*, která obsahuje karoten a vitamíny. Avšak takové využití sinic má i své negativní stránky. Například nukleové kyseliny, zastoupeny u sinic ve velkém množství, jsou v konečné fázi přeměněny na kyselinu močovou, ta se ukládá v kloubech a způsobuje onemocnění dnou. V některých lécích byly zjištěny patogenní mikroorganismy. U teplokrevných obratlovců byla objevena nespecifická imunitní odpověď. Sinice obsahují fykobiliproteiny, jedná se o modrý fykocyanin. Fykocyanin se používá v lékařství při sledování metabolických procesů a také jako netoxické barvivo (KALINA & VÁŇA 2005). Jejich využití je možné v rámci biomonitoringu. Druhové složení jednotlivých lokalit je do jisté míry odlišné (LYSÁKOVÁ, KITNER & POULÍČKOVÁ 2007). Sinice by mohly poskytovat informace o erozi sedimentů (BELLINGER & SIGEE 2010). Využívají se i jejich symbiotické vztahy s dalšími organismy. Například *Anabaena* symbiotizuje s kapradinkou *Azolla*, kapradinka díky

sinici může vázat vzdušný dusík. Tento vztah se využívá v zemědělství k pěstování rýže (VAISHAMPAYAN ET AL. 2001).

2. Charakteristika životního prostředí stojatých vod

2. 1. Stojaté vody

Mezi stojaté vody řadíme rybníky, přehrady, jezera. V České republice jsou nejvíce zastoupeny rybníky. Chovné rybníky vykazují, ve většině případů, vysoký stupeň trofie (jsou eutrofní až hypertrofní), proto zde můžeme nalézt velké zastoupení sinic a krásnooček (HAŠLER et al. 2008).

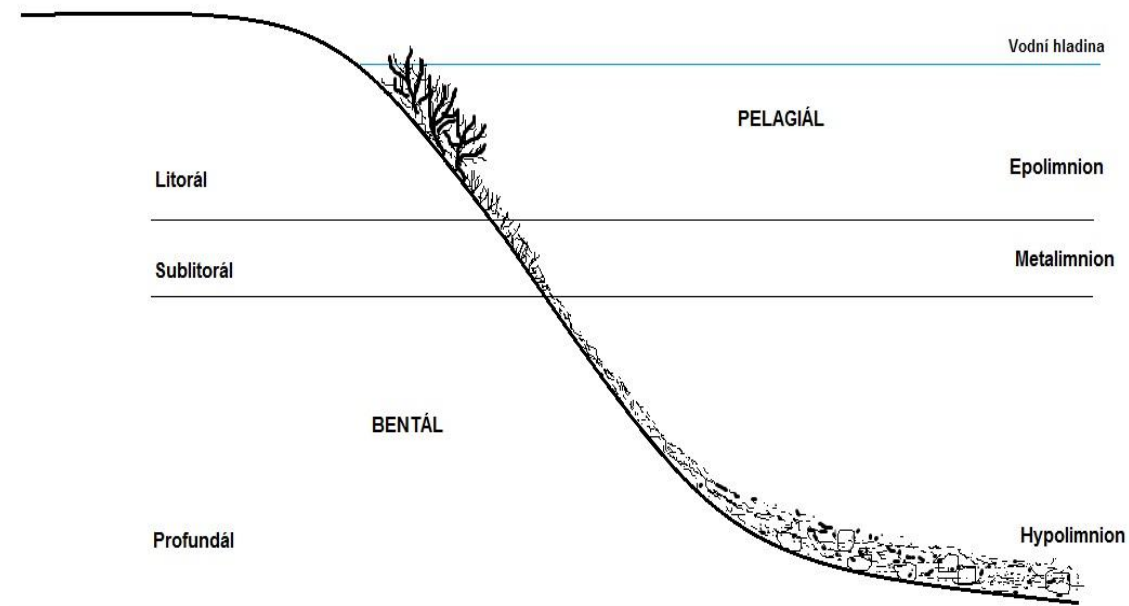
2. 1. 2. Rozdělení základních bentických habitatů stojatých vod

2. 1. 1. 1. Pelagiál

Jedná se o oblast volné vody. Je obýván planktonem a nektonem. Mezi plankton řadíme primární hydrobionty (bakterie, jednobuněčné a mnohobuněčné řasy, prvoky atd.). Do společenstva nektonu jsou zahrnuty zejména ryby (HARTMAN, PŘIKRYL & ŠTĚDROVSKÝ 2005; LELLÁK & KUBÍČEK 1991). Je členěn na epilimnion, metalimnion a hypolimnion.

2. 1. 1. 2. Bentál

Zahrnuje biotop vodního dna ekosystému. Je členěn podle světelného režimu. Člení se na litorál, sublitorál, profundál a abysál (HARTMAN, PŘIKRYL & ŠTĚDROVSKÝ 2005; LELLÁK & KUBÍČEK 1991).



Obrázek 2.1. Schematické znázornění hlavních habitatů v nádrži (data převzata z HARTMAN, PŘIKRYL & ŠTĚDROVSKÝ 2005; POULÍČKOVÁ et al. 2008a)

3. Charakteristika života ve stojatých vodách

Organismy stojatých vod členíme většinou podle způsobu života. Nekton, větší a samostatně plovoucí organismy. Bentos, který je pasivně unášen vodními masami. Bentos dále členíme na fyto-bentos (rostlinná složka) a zoobentos (živočichové) (HARTMAN, PŘIKRYL A ŠTĚDROVSKÝ 2005).

Fyto-bentos dále členíme na rhizo-bentos, což jsou organismy přichyceny rhyzoidy ve dně. Do této kategorie spadají organismy, přichycené k pevnému substrátu tedy fyto-bentos. Ten lze členit na organismy na kamenech - epilíton a na organismy vyskytující se na vyšších cévnatých rostlinách - epifyton. Epipelon - vyskytující se na sedimentech dna, epipsamon - společenstva na písku. Epizoon - fyto-bentos rostoucí na zvířatech (POULÍČKOVÁ 2011).

3. 1. Dělení perifytonu

Množství mixotrofních a autotrofních řas, které jsou složkou perifytonu, lze rozdělit podle preference určitého substrátu (POULÍČKOVÁ et al. 2008a). Herpobentos, organismy na sedimentech nebo přímo v sedimentech. Mezi herpobentos patří epipelon, endopelon, endopsamon, metafyton a částečně meroplankton

a tychoplankton. Epipelon, jedná se zejména o organismy, které žijí na svrchní straně jemných organických (bahnitých) substrátů. Typické druhy jsou např. *Komvophoron*, *Pseudanabaena*, *Euglena*, *Clostridium*, *Amphora*, *Sellaphora*, *Neidium* (POULÍČKOVÁ 2011; POULÍČKOVÁ et al. 2008a).

Za heptobentos považujeme organismy, které se vyskytují na povrchu nebo uvnitř pevného podkladu. Řadíme zde epipelon, epoliton, epifyton, epixylon, endoliton, endopsamon, epizoon a endofyton (POULÍČKOVÁ 2011; POULÍČKOVÁ et al. 2008a).

3. 1. 1. Epipelon

Patří zde organismy, které žijí na svrchní straně jemných organických (bahnitých) substrátů. Epipelon má řadu významných ekologických rolí. Jedná se o biostabilizaci sedimentu regulující benticko-pelagický nutriční systém (DODDS 2003) a primární produkci (HAŠLER et al. 2008; VELASCO et al. 2003) a tudíž vytváří energetické zdroje pro bezobratlé (STEVENSON 1996). I když má epipelon významnou funkci, byla jeho studiu věnována malá pozornost (ŠPAČKOVÁ et al. 2009). Průkopníkem ve studiu ekologie epipelonu ve sladkovodních habitatech byl ROUND (1953, 1972; HAŠLER et al. 2008; HAŠLER & POULÍČKOVÁ 2010; ŠPAČKOVÁ et al. 2009). Mnohem větší zájem byl projeven o studie, které se týkají eutrofizace a fytoplanktonu (HAŠLER et al. 2008).

Charakteristickými autochtonními zástupci epipelonu jsou některé druhy sinic (*Cyanobacteria*), zelené řasy (*Chlorophyta*), skrytěnky (*Cryptophyta*), krásnoočka (*Euglenophyta*), obrněnky (*Dinophyta*) a rozsivky (*Bacillariophyceae*) (LYSÁKOVÁ, KITNER & POULÍČKOVÁ 2007; POULÍČKOVÁ et al. 2008a). Většinu těchto specifických zástupců epipelonu můžeme najít v jezeře bez ohledu na stupeň eutrofizace, některé druhy jsou však vázány na specifické podmínky prostředí (POULÍČKOVÁ et al. 2008a). V jemných sedimentech epipelonu lze nalézt klidová a přisedlá stádia allochtonních planktonních řas (BELMONTE et al. 1997).

Většina sladkovodních epipelických druhů byla pozorována napříč velkým geografickým územím. Toto poukazuje buď na nedostatečné oddělení hranic druhů, nebo na velice dobré dispersní mechanismy, které zatím nebyly dostatečně prozkoumány. (POULÍČKOVÁ et al. 2008a).

HAŠLER et al. (2008) rozděluje epipelon, především sinice a rozsivky, podle jejich požadavků na kvalitu sedimentů na 4 skupiny. První skupina zahrnovala druhy,

kteře preferovaly bahňito-písčítý podklad a nízkou konduktivitu vody. Druhá skupina obsahovala druhy s preferencí vysokého obsahu rozložených organických látek a vysokou konduktivitu. Třetí skupina preferovala oligo/distrofní habitaty s písčítým dnem. Čtvrtá skupina preferovala bahňité sedimenty s eutrofním znečištěním vody. ROUND (1953) rozděluje sediment na čtyři základní typy. Tyto typy byly popsány podle lokality Malhalm Tarm ve Velké Británii. První typ jsou černé vločkovité přirozené rašelinné sedimenty. Druhý typ jsou sedimenty obsahující částečně rozložené vláknité zbytky mechů a krytosemenných rostlin. Třetí typ jsou našedlé vápenité usazeniny s obsahem zrněk písku. Čtvrtý typ zahrnuje sedimenty, které jsou pokryty fragmenty parožňatek (*Chara*), nejedná se o rašelinné sedimenty s obsahem uhličitanu vápenatého a s částmi vyšších rostlin. Členění podle ROUND (1953) se neshoduje s typy sedimentů podle HAŠLER et al. 2008, protože lokalita Malhalm Tarn je geologicky unikátní (HAŠLER et al. 2008).

ROUND (1957) rozděľil jezera v English Lake District na dvě základní skupiny podle obsahu organických látek. Řadíme zde více produktivní jezera s velkým podílem sinic, s organickým sedimentem dna a s vyšším podílem organické hmoty v sedimentu, vyšším než 26 %. Jezera se skalnatým podloží (dnem) s velmi nízkou produkcí sinic a s množstvím organických látek, nižším než 22 %. Toto členění lze najít i v České republice, avšak produktivita jezer je uměle ovlivňována lidmi (POULÍČKOVÁ et al. 2008b).

3. 1. 1. 1. Sezónní sukcese epipelonu ve sladkovodních nádržích

Změny životních podmínek během roku ovlivňují druhovou diverzitu a početnost organismů ve sladkovodních nádržích. Mezi důležité faktory patří obsah živin, kvalita sedimentů, světlo, pohyb vodní masy, predační tlak a růstová rychlost řas (POULÍČKOVÁ 2011), chemický gradient (HAŠLER et al. 2008) a teplota vody.

V podmínkách mírného pásu lze tedy očekávat sezónní dynamiku epipelonu (POULÍČKOVÁ 2011). Na podzim vytvářejí sinice i ostatní řasy klidová stádia. Ty klesají na dno a setrvávají v tomto stavu tak dlouho, nejčastěji do jara nebo do brzkého léta (BELLINGER & SIGEE, 2010), dokud se nezlepší vnější podmínky (HARISTON et al. 1995; BELMONTE et al. 1997). V této formě představují tzv. „seed bank,“ která slouží k opětovnému obnovení populace druhu (HAŠLER, POULÍČKOVÁ & LYSÁKOVÁ 2004). Na jaře, kdy se začíná promíchávat voda ve vodním sloupci, mísí

se sediment, fytoplankton se probouzí opět k životu a migruje zpět do vodního sloupce, kde roste a slouží jako potrava pro zooplankton (HANSSON 1996).

ŠPAČKOVÁ et al. (2009) uvádí, že během jara a podzimu dominovaly z 60 % v nádrži rozsivky (*Bacillariophyceae*). Sinice (*Cyanophyta*) byly nejpočetnější během léta, ve vzorku byly zastoupeny z 80 %. Sezónní maximum krásnooček (*Euglenophyta*) nastalo v červnu. Ve vzorku dominovaly ze 40 %. Jednotlivé druhy sinic můžeme nalézt v průběhu celého roku, ale některé se vyskytují pouze v určitých měsících. *Geitlerinema amphibium* se vyskytovala od března do srpna. *Komvophoron constrictum* od března do listopadu, stejně tak *Pseudanabaena catenata* a *Sporulina major*. *Phormidium tergestinum* se vyskytovalo ve všech uvedených měsících kromě září. *Oscillatoria limosa* byla přítomna od června do listopadu. *Komvophoron groenlandicum* se vyskytoval pouze v říjnu a listopadu, *Komvophoron hindakii* pouze v listopadu a *Phormidium chalybeum* v září.

V eutrofních nádržích, v polovině nebo koncem léta, dochází často k nadměrnému rozvoji kokálních sinic. Ty se označuje jako vodní květ. Velké masy sinic vystoupají na povrch jezera a vytvoří silnou vrstvu biomasy. Nakonec dojde k vyčerpání velkého množství živin obsažených ve vodě a také kyslíku. Biomasa zachytí většinu slunečního záření. Mnoho druhů sinic produkuje toxiny. Všechny tyto aspekty neblaze ovlivňují rozvoj dalších vodních organismů (KALINA & VÁŇA 2005).

4. Taxonomie

Taxonomická klasifikace je metoda která umožňuje rozpoznání a registraci diversity jednotlivých organismů, v kontextu s kontinuálně se měnícími znalostmi o evolučních a ekologických vztazích a fenotypové variabilitě (KOMÁREK 2010). Taxonomie sinic byla podstatně změněna během 20. století (KOMÁREK 2005). S novými přístupy ke klasifikaci jsou stávající vztahy mezi sinicemi neustále měněny. Bylo popsáno 150 rodů a více než 1000 druhů sinic (RIPPKA et al. 1979).

Dnes se v klasifikaci sinic používá takzvaný polyfázický přístup, který kombinuje tradiční metody klasifikace s molekulárními. V tomto přístupu se využívá všech známých dat z molekulární analýzy, cytomorfologie, ekologie a ekofyziologie. Fylogenetickým (molekulárním) datům by měla být přiřazena největší váha s ohledem na informace z ostatních zdrojů. Nesmíme však opomenout použití nomenklatorických pravidel při stanovení jmen taxonů (KOMÁREK 2005). Nastává problém jak vyřešit

nomenklaturu s ohledem na moderní klasifikaci. Používá se nomenklatura botanická (ICBN) i bakteriologická (ICNP) (KOMÁREK 2005; SUDA et al. 2002; OREN 2011; PALINSKA et al. 2006). Tyto kódy dohromady nesplňují požadované podmínky klasifikace, díky tomu se systém stává nejasný (PALINSKA et al. 2006). Podle ICNP je nomenklatorický typový druh životaschopný kmen zachovaný v čisté kultuře. Zatímco podle ICBN se jedná o neživý exemplář, který musí být zachován. Konzervované metabolicky neaktivní řasové kultury jsou považovány jako typy (OREN 2011).

KOMÁREK (2005) ve své práci uvádí, že by bylo zřejmě nejvhodnější vypracovat speciální kód pro bakteriální mikroorganismy, což zahrnuje i sinice. I přes tyto neshody, bylo vypracováno moderní cyanobakteriologické review, které je založeno na moderní podstatě taxonomie a mělo by sloužit jako základ pro budoucí studie biodiverzity sinic.

Jedním z problémů je nesprávné taxonomické určení a zařazení daných druhů. K identifikaci druhů je zapotřebí značná odborná znalost (VALÉRIO et al. 2009). KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989) uvedli, že více než 50 % druhů ve sbírkách neodpovídá popisům taxonů, do kterých jsou zařazeny. Dalším problémem jsou časté změny jmen taxonů. Například „*Anabaena*“ sp. kmen PCC 7120 (RIPPKA et al. 1979) byla přejmenována na *Nostoc* sp. kmen PCC 7120 na základě DNA-DNA hybridizace (LACHANCE 1981) s vysoce repetitivní DNA sekvencí (STPP; MAZEL et al. 1990). Avšak název není dodnes ustanoven.

4. 1. Morfologické přístupy hodnocení taxonomie sinic

Morfologické znaky byly jedním z hlavních zdrojů informací před nástupem molekulárních metod, které se začaly využívat ke konci 20. století. I když dnes molekulární metody udávají hlavní trend v systematické biologii, nesmíme opomenout váhu morfologických znaků. Za morfologické znaky považujeme ty, které jdou běžným okem hodnotit ve světelném mikroskopu. Jedná se o šířku buněk, jejich délku, pochvu a druh dělení. Všechny tyto znaky, na kterých stojí morfologické klíče, se mohou díky měnícím se vnějším podmínkám, velice lehce změnit (PALINSKA et al. 2006; KOMÁREK 2006; NEILAN 2002). Tento fakt byl poprvé rozpoznán v polovině 20. století (KOMÁREK 2006). Některé fenotypové znaky se zřejmě v prostředí kultur ani neprojeví (OTSUKA et al. 2001). Zde nastává problém se správným určením druhů či dokonce rodů (PALINSKA et al. 2006).

4. 1. 1. Kokální druhy

Jeden z nejdůležitějších morfologických znaků je morfologie buňky, zejména její tvar a polarita. Pokud se jedná o kolonii, hodnotí se tvar kolonie, postavení jednotlivých buněk a přítomnost pochvy, zda obaluje celou buňku či kolonii nebo zda je přítomna u každé buňky kolonie. Tento identifikační aspekt může být do jisté míry mylný. Pochva se může tvořit za stresových podmínek u druhů, které ji běžně nevytváří, typickým příkladem jsou podmínky v kulturách. Pozoruje se šířka pochvy, zda je viditelné laminování a zbarvení. Sleduje se polarita buněk i celých kolonií. Přítomnost nebo absence plyných váčků a aerotopů. Dalším znakem je typ buněčného dělení. Může jít o jednoduché buněčné dělení, nepravidelné dělení, rozmnožování pomocí exocytů, nanocytů, baeocytů nebo pomocí samostatných reprodukčních buněk. V mezidodových vztazích je důležitou charakteristikou pohyb rozmnožovacích útvarů. Pokud jsou útvary pohyblivé, nazývají se planocyty. Důležité jsou rozměry buněk a jejich zbarvení. Mnohé značí i ekologie, zda se jedná o vodní prostředí nebo souš, vodu slanou či sladkou, roční období, zeměpisný pás, pH atd. (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1998).

4. 1. 2. Vlákňité druhy

Morfologické znaky vláknitých sinic jsou obdobné jako u sinic kokálních. Důležitým znakem je tvar buněk, jejich velikost a barva. Morfologicky je významný vzhled terminální buňky. Zda se jednotlivé buňky ke konci zužují postupně nebo náhle. Jestli jsou vlákna obalena slizovou pochvou, zda pochva obaluje jen jedno vlákno nebo celou kolonii, významná je její barva. Určuje se, zda má koncová buňka kalyptru. O mnohém vypovídají slizové můstky mezi buňkami. Pozorují se cyanophycinová granula, polyfosfátová, karotenová zrna a jejich umístění, plynové váčky, aerotopy, heterocyty, akinety nebo přítomnost typických vakuol obalených membránou. Zda se vlákno větví či ne. Rozlišuje se větvení vlákna na pravé a nepravé. Sleduje se dělení buněk a rozmnožování. Pozoruje se postup, podle kterého dochází k rozpadu vláken. Sleduje se pohyblivost vláken a rozmnožovacích útvarů. Sinice určujeme pomocí makroskopického a mikroskopického vzhledu kolonií a jejich uspořádání nebo podle toho, zda se vlákna vyskytují samostatně. Významným parametrem jsou ekologické podmínky (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005).

4. 2. Molekulární přístupy využívané v taxonomii sinic

Studium molekulární ekologie používá molekulárně-genetické markery, ty pomohou zodpovědět otázky ohledně ekologie a evoluce jedinců, skupin a celých komunit (CARVALHO 1998). Fenotypové vyjádření genotypu, na kterém stojí veškeré určovací klíče, se může snadno změnit. Díky tomu je molekulárním znakům dávána větší váha (LU et al. 1997). Při studiu sinic se v molekulárních analýzách používá z velké části analýza ribozomové rDNA. Molekulární metody často odhalí daleko vyšší diverzitu, než byla zjištěna pomocí fenotypových znaků (KOMÁREK 2005).

V molekulární systematice se používají různé metody studie DNA, mezi ně řadíme studium základního složení DNA, hybridizaci DNA (KONDO et al. 2000), sekvenování genu (NÜBEL et al. 1997) a PCR fingerprinting (RASMUSSEN & SVANNING 1998; VERSALOVIC et al. 1991).

Tři bakteriální rRNA geny jsou uspořádány do genových klastrů, ty jsou exprimovány jako jednotlivé operony (PEI et al. 2010), operony jsou uspořádány v následujícím pořadí 16S rRNA - 23S rRNA - 5S rRNA. Každý z genů je od dalšího oddělen pomocí ITS regionu (internal transcribed spacer region) (ITEMAN et al. 2000; BOYER, FLECHTNER & JOHNSEN 2001). Operon může být přítomen v bakteriálním genomu v několika kopiích, např. 7 kopií nalezneme u *Escherichie coli* a *Salmonelly*, 10 kopií u *Bacillus subtilis*. Nejčastěji se k analýze používá gen16S, kóduje malou podjednotku ribozomu a nedávno se začal používat ITS region mezi 16S rRNA a 23S rRNA (BOYER, FLECHTNER & JOHANSEN 2001). Výběr genů byl zvolen na základě ribozomální konzervace (CLAYTON et al. 1995).

4. 2. 1. Gen 16S rRNA

Geny 16S rRNA, 23S rRNA a 5S rRNA operonu jsou velice konzervativní struktury, proto je lze používat pro potvrzení nebo vyvrácení evolučních hypotéz (ERNST et al. 2003). Počet kopií tohoto operonu bývá různý. Gen 16S rRNA obsahuje pět konzervativních struktur D1-D5 a tři variabilní struktury (stems) V1-V3 (ITEMANN et al. 2000). 16S rRNA se využívá z toho důvodu, že je obsažen ve všech bakteriích, jedná se o konzervativní strukturu, je také poměrně dosti dlouhá (1500 nukleotidů) proto je schopna poskytnout dostatečné množství informací (WILMOTTE 1994).

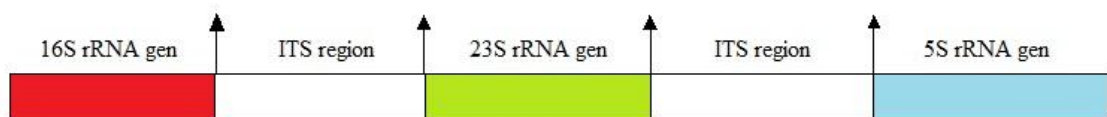
Nejprve se k fylogenetické analýze druhů sinic podle KOMÁRKA & ANAGNOSTIDISE (1989) používal 16S rRNA gen. Použití této molekuly na stanovení

fylogenetických vztahů na úrovni druhů a kmenů je dosti problematické, jelikož tento gen obsahuje velice konzervativní sekvence (FOX, WISOTZEY & JURTSUK 1992). FOX, WISOTZEY & JURTSUK (1992) proto ustanovili, že gen 16S rRNA není vhodný pro stanovení mezidruhových vztahů (BOYER, FLECHTNER & JOHANSEN 2001).

4. 2. 2. ITS region (Internal Transcribed Spacer)

ITS region je možno použít pro stanovení nižších taxonomických vztahů např. mezidruhových (LU et al. 1997). ITS region je velice variabilní, co se týká délky i sekvencí (ACINAS et al. 2009)

ITS region obsahuje antiterminální box A, který umožňuje předčasné zastavení transkripce. Box A může být prezentován jako spárované sekvence uvnitř obou dvouvláknových processing stems, také může mít podobu nepárových regionů, které přiléhají na processing stems. Sekvence boxu A jsou u bakterií velice konzervativní, box A těsně přiléhá na stonkovitou strukturu boxu B, její sekvence jsou naopak velmi variabilní. ITS region často obsahuje jeden nebo dva geny, nejčastěji se jedná buď o tRNA^{Glu} nebo tRNA^{Ala}, nebo se zde vyskytuje tRNA^{Ala} společně s tRNA^{Ile} (ITEMAN et al. 2000), někdy může sekvence tRNA chybět. U sinic nejčastěji chybí kombinace tRNA^{Ile} a tRNA^{Ala}. Sinice často postrádají sekvence pro rRNA ITS regionu nebo je přítomna pouze tRNA^{Ile} (BOYER, FLECHTNER & JOHANSEN 2001). Velikost ITS regionu se pohybuje v délce od 354 do 545 nukleotidů (ITEMAN et al. 2000).



Obrázek 4.1. Schematické znázornění rRNA operonu, který obsahuje ITS regiony a geny 16S rRNA, 23S rRNA a 5S rRNA (data převzata z ITEMAN et al. 2000).

5. Charakteristika a ekologie perifytických rodů sinic

Všechny následující informace byly použity ze *sensu* KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1998, KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005, mimo citovaných.

Aphanothece spp. Nägeli 1849 nom.cons.

Poprvé byla tato kokální sinice popsána NÄGELIM v roce 1849. Náleží do čeledi *Merismopediaceae*. Kolonie jsou mikro i makroskopické, obsahují více nazelenalých nebo nahnědlých buněk. Na povrchu kolonie se vyskytuje amorfni slizová pochva, která může být nažloutlá až načervenalá. Také samotné buňky kolonie mohou mít slizovou pochvu. Buňky jsou široce oválné nebo cylindrické se zaoblenými konci. U některých druhů zřetelné aerotopy. Rozmnožují se prostým dělením buněk. Dělení probíhá v jedné rovině kolmo na podélnou osu buňky. Fakultativně je zaznamenána tvorba nanocytů. Rozmnožují se rozpadem kolonie nebo samostatnou buňkou. Většina druhů je epipelických nebo půdních. Některé druhy sekundárně planktonní. Preferují sladkovodní biotopy, někdy se vyskytují v mírně halinní vodě nebo ve vodě mořské. Nalezeny v severských oblastech, tropech a v termálních pramenech (49,5 °C). Např. druh *Aphanothece endophytica* žije endogleicky ve slizu planktonních sinic. Epizoický způsob života zaznamenán u *Aphanothece protohydrae*.

Gloeothece spp. Nägeli 1849

Druh *Gloeothece* byl popsán švýcarským botanikem KARLEM WILHELMEM VON NÄGELIM v roce 1849. Řadí se do čeledi *Microcystaceae*. Buňky většinou malé, v koloniích nebo samostatně. Kolonie i jednotlivé buňky jsou uzavřeny v hyalinní pochvě nebo jsou koncentricky lamelovité. Pochva může být namodralá, fialová nebo nažloutlá. Buňky světle modrozelené, zelenomodré, olivovězelené nebo fialové, tvaru oválného nebo tyčinkovitého se zaoblenými konci. Dělení probíhá od příčné k podélné ose. Buňky dorostou do své původní velikosti a tvaru až před dalším dělením. Obal je vytvořen až po dělení. Reprodukce probíhá rozpadem kolonie, osvobozením buňky z gelového obalu. Také je přítomna tvorba nanocytů. Velká část druhů obývá aerofytické a atmofytické prostředí. Lze je nalézt i v epipelonu nebo bentosu sladkých vod, v litorálu vod mořských. Některé druhy žijí metafyticky v bažinách. Vyskytují se od horských nížin až po samotné horské vrcholky. Rozšířeny jsou po celém světě. Sekundárně přešly k planktonnímu způsobu života.

***Aphanocapsa* spp.** Nägeli 1849

Aphanocapsa byla také popsána Švýcarem KARLEM WILHELMEM VON NÄGELIM roku 1849. Řadíme ji do čeledi *Merismopediaceae*. Mikroskopické kolonie mohou být různých tvarů. Sliz, jenž obaluje kolonii, je často bezbarvý. Buňky bez vlastní gelové pochvy, sférické, po rozdělení hemisférické, bez aerotopů. Buňky se dělí ve dvou kolmých rovinách v po sobě jdoucích generacích. Další možnost rozmnožení je rozpadem kolonie. U některých také rozmnožení nanocyty. Velká většina druhů žije ve sladké vodě. Jsou součástí epipelonu a epifytonu. Aerofytické druhy se vyskytují na mokřích kamenech, zdech, skalách atd. Obývají tropy i severské oblasti, některé i termální prameny. Žijí endoliticky a epizoicky.

***Merismopedia* spp.** Meyen 1839

Jako první tuto kokální sinici popsal německý botanik FRANZ JULIUS FERDINAND MEYEN roku 1840. Patří do čeledi *Merismopediaceae*. Koloniální i volně žijící sinice. Kolonie deskovité a ploché. Sliz na povrchu kolonie je bezbarvý. Buňky oválné, široce eliptické, barvy jasně modrozelené nebo načervenalé. Někdy viditelné aerotopy. Z jedné mateřské buňky vznikají dvě buňky dceřiné. Dělení probíhá ve dvou rovinách kolmých na sebe. Buňky jsou uspořádány do řad, tuto pozici po dělení nezmění. Do finální velikosti dorostou těsně před dalším dělením. *Merismopedia* se rozmnožuje rozpadem kolonie na jednotlivé subkolonie. Planktonní druhy, epipelické, subaerofytické. Obývají vody slané i sladké, vody bažinné, termální i zcela chladné (severské oblasti např. v Kanadě).

***Gloeocapsa* spp.** Kützing 1843

Gloeocapsa byla popsána v roce 1843 německým botanikem FRIEDRICHEM TRAUGOTTEM KÜTZINGEM. Náleží do čeledi *Microcystaceae*. *Gloeocapsa* tvoří kolonie obalené slizem. Samotné buňky jsou sférické, zřídka protáhlého tvaru, obaleny širokou koncentricky lamelovitou gelovou pochvou, ta může být zbarvena do žluta, červena, modra nebo fialova. Někdy přítomny u planktonních druhů plynné váčky. Dělení probíhá ve třech na sebe kolmých rovinách binárním způsobem, uvnitř gelového obalu. Pokud dojde k osvobození skupiny buněk nebo pouze samostatné buňky od velké kolonie, může vzniknout nová kolonie. Mohou se také rozmnožovat rozpadem kolonie na menší subkolonie nebo pomocí nanocytů. Do tohoto rodu spadají druhy sladkovodní

i halinní, druhy planktonní i bentické, subaerofytické, aerofytické. Některé druhy obývají močály nebo minerální a termální parameny.

***Chroococcus* spp.** Nägeli 1849

Chroococcus byl popsán botanikem NÄGELIM v roce 1849. Patří do čeledi *Chroococcaceae*. Buňky sdruženy do neuspořádaných kolonií. Buňky i kolonie jsou obaleny slizovou pochvou, která je bezbarvá nebo nažloutlá a obvykle koncentricky lamelovitá. Tvar buněk je nejprve subsférický, široce oválný nebo sférický, později hemisférický. Buněčný obsah je šedý, modrozelený, nažloutlý, načervenalý nebo fialový. Plynné váčky se vyskytují pouze u některých planktonních druhů. Dělení buněk probíhá ve třech rovinách v po sobě jdoucích generacích, nejčastěji kolmo na sebe. Rozmnožují se také odloučením buňky nebo i skupiny buněk od kolonie, zřídka nanocyty. Druhy rodu *Chroococcus* jsou planktonní, epifytické nebo perifytické. Obývají sladkou vodu i vodu slanou. Zřídka je nalezneme ve vodách termálních, aerofyticky nebo subaerofyticky. Mnoho druhů osídlilo i velice extrémní podmínky (KOMÁREK & HAUER 2012).

***Oscillatoria* spp.** Vaucher ex Gomont 1892

Tato sinice je řazena do čeledi *Oscillatoriaceae*. Vytváří okem viditelné hladké povlaky nebo vytváří samostatné trichomy. Trichomy jsou cylindrického vzhledu, pohyblivé, široké více než 6,8 μm , boční stěny se zaškrčením nebo i bez, často bez pochvy. Buňky krátké, většinou 2x kratší než širší, neobsahují aerotopy. Buněčné dělení probíhá příčně k ose trichomu. Rozmnožují se rozpadem vláken na pohyblivá hormogonia. Vyskytují se ve vodě sladké i slané, v půdě. Především obývají mělké vodní biotopy. Žijí benticky, pak vyplavou na hladinu kusy biomasy. Rozšířeny po celém světě (KOMÁREK & HAUER 2012).

***Leptolyngbya* spp.** Anagnostidis et Komárek 1988

Leptolyngbya je řazena do čeledi *Pseudanabaenaceae*. Vytváří dlouhá vlákna, která jsou buď samostatně nebo vytváří husté povlaky. Vlákna široká 0,5 až 3,5 μm , pohyblivá i nepohyblivá, někdy je přítomna tenká hyalinní pochva. Buňky cylindrické, izodiametrické, delší než širší bez plynných váčků. Rozmnožují se díky fragmentaci trichomů, hormogonia se mohou pohybovat. *Leptolyngbya* jsou běžně přítomna v půdě a v prerifytonu a metafytonu sladkovodních a mořských biotopů. Vyskytují se

v termálních a minerálních pramenech, aerofyticky, endogleicky. Velice dobře rostou v podmínkách kultur (KOMÁREK & HAUER 2012).

***Geitlerinema* spp.** (Anagnostidis et Komárek) Anagnostidis 1989

Tato sinice náleží do čeledi *Pseudanabaenaceae*. Vytváří nárosty, jen zřídka samostatné trichomy. Trichomy (0,6) 1-4 (6,5) μm , cylindrické, většinou rovné a bez zaškrčení bočních stěn, nemají pochvu. Výrazně pohyblivé. Buňky cylindrické, protáhlé, bez aerotopů, někdy s granulemi (obsahující karotenoidy). Koncové buňky zaoblené, častěji špičaté nebo zužené, někdy zakončeny kalyptrou. Rozmnožují se rozpadem trichomů na pohyblivá hormogonia. Vyskytují se v půdě a v neznečištěných vodních biotopech, porůstají různé substráty, např. kameny, listy, dřevo atd. Některé druhy byly objeveny také v mořských biotopech nebo v termálních pramenech.

***Pseudanabaena* spp.** Lauterborn 1915

Sinice byla poprvé popsána LAUTERBORNEM roku 1915. Spadá do čeledi *Pseudanabaenaceae*. Buňky jsou cylindrické, většinou výrazně zaškrčené, obsahují nástěnné tylakoidy a některé druhy polárně umístěné plynné váčky. Šířka vlákna je menší než 4 μm (ACINAS et al. 2009). U *Pseudanabaeny* se nevyskytuje pochva, mají většinou široký, hladký a rozteklý slizový obal. Vlákna se pohybují jen zřídka nebo se nepohybují vůbec. Buňky se dělí binárním dělením podle jednoho plánu kolmo na dlouhou osu, někdy se dělí asymetricky. Reprodukce probíhá pomocí hormogonií, které obsahují jednu až více buněk. Může docházet i k rozpadu vláken. *Pseudanabaena* je celosvětově rozšířená. Nalezneme ji ve vodách sladkých, slaných i brakických. Vlákna nalezneme v planktonu, metafytycky nebo vytvářejí jemné nárosty. Žijí epizoicky a epipelicky. Obývají subtropy, tropy i severské oblasti. Byly nalezeny i v extrémních podmínkách např. v termálních pramenech.

O této vláknité sinici existuje málo genotypických i genetických informací. Její vlákna jsou velice drobná a vědci jí proto opomíjeli. LAUTERBORN popsal roku 1915 dva nové druhy- *Pseudanabaena constricta* a *Pseudanabaena catenata*, ale jejich potvrzení je otázkou diskuze (CHANG et al. 1985). Morfologicky je *Pseudanabaena* podobná *Limnothrix*. *Limnothrix* se liší širšími vlákny, 1-6 μm , méně výrazným zaškrčením buněk a také z hlediska životních podmínek (CASTENHOLZ et al. 2001). *Pseudanabaena* spolu s *Limnothrix* tvoří monofyletickou skupinu (ZWART et al. 2005). Dřívější studie na základě analýzy genu 16S rRNA ukázaly, že *Pseudanabaena* a

některé kmeny ze *Limnothrix* klastru spolu s *Pseudanabaena* spp., zahrnují jeden vzorek patřící do *Limnothrix redekei*. Tento klastr je obvykle nazýván skupina *Pseudanabaena/Limnothrix* (GKELIS et al. 2005), avšak fylogenetické vztahy této skupiny nejsou zcela vyřešeny (ACINAS et al. 2009).

Do rodu *Pseudanabaena* řadíme např. druhy: *P. limnetica* (Lemmermann) Komárek 1974, *P. catenata* Lauterborn 1915, *P. galeata* Bücher 1949, *P. minima* (G. S. An) Anagnostidis 2001, *P. frigida* (Frisch) Anagnostidis 2001, *P. tennis* Koppe 1924.

***Phormidium* spp.** Kützing ex Gomont 1892

Phormidium vytváří volně plovoucí masy nebo samostatná vlákna. Na povrchu vláken se někdy vytváří pochva, většinou bezbarvá. Samotné trichomy cylindrické, široké od (1,8)2,5-11(15) μm , konce buněk nezaškrčené nebo jen velice jemně zaškrčené. Vlákna jsou pohyblivá. Buňky isodiametrické nebo většinou širší než delší, bez aerotopů. Apikální buňky jsou velice taxonomicky významným znakem, také přítomnost či nepřítomnost kalyptry. Rozmnožování probíhá pomocí transverzálního buněčného dělení, také pomocí hormogonií a rozpadu vláken. Druhy *Phormidia* byly nalezeny ve sladké i slané vodě. Vytváří nárosty na vodních substrátech (půda, vlhké skály, bahno, vodní rostliny, kameny, dřevo) ve stojaté i proudící vodě. Některé druhy byly nalezeny na místech s extrémními podmínkami, jako jsou termální prameny, pouště atd. Účastní se i biolitogéních procesů a tvorby travertinu (KOMÁREK & HAUER 2012).

Molekulární analýza tradičního rodu *Phormidium* ukázala, že se jedná o polyfyletickou skupinu (PALINSKA & MARQUARDT 2008). Tradiční rodový komplex *Oscillatoria/Phormidium/Plectonema a Leptolyngbya* byl začleněn RIPPKA et al. (1979) do takzvaného „LPP-group“, do kterého se začleňují kmeny s tenkými trichomy a nejasnou taxonomickou pozicí (PALINSKA et al. 2011). *Phormidium* a také *Microcoleus* náleží do čeledi *Phormidiaceae*. Některé jejich druhy jsou si navzájem velice podobné. DROUET (1962) tvrdil, že některé druhy *Phormidia* jsou ekotypy rodu *Microcoleus*. Jeho myšlenka však byla později zpochybněna (HAŠLER et al. 2012), např. při studiu *Phormidium autumnale* a *Microcoleus vaginatus* (SIEGISMUND et al. 2008). Velká většina autorů považuje komplex *Microcoleus vaginatus-Phormidium autumnale* za polyfyletický, i když je zde vysoké procento shody v molekulárních i morfologických znacích (HAŠLER et al. 2012). Analýza genu 16S rRNA polyfyletičnost tohoto komplexu potvrdila. Revize této skupiny je

nevyhnutelná (SIEGESMUND et al. 2008). Z tohoto rodu byl vyčleněn rod *Phormidesmis*. Zdá se, že se na základě molekulárních dat a na základě ultrastruktur více podobá skupině zahrnující *Pseudanabaenu* než rodu *Phormidium* (KOMÁREK et al. 2009).

Do rodu *Phormidium* řadíme např. druhy: *Ph. animale* (Agardh ex Gomnt) Anagnostidis et Komárek 1988, *Ph. breve* (Kützing ex Gomnt) Anagnostidis et Komárek 1988, *Ph. formosum* (Bory ex Gomont) Anagnostidis et Komárek 1988, *Ph. interruptum* Kützing ex Gomont 1892, *Ph. lividum* Nägeli in Kützing 1849 ex Gomont 1892, *Ph. autumnale* (Agardh) Trevisan ex Gomont 1892.

***Komvophoron* spp.** Anagnostidis et Komárek 1988

Rod *Komvophoron* řadíme do čeledi *Borziaceae*. Sinice většinou vytváří samostatné trichomy, jsou pohyblivé i nepohyblivé, bez pevné pochvy. Buňky jsou sférické nebo soudečkovité, široké do 10 µm. Nevytváří aerotopy, akinety ani heterocysty. Rozmnožují se rozpadem vlákna nebo hormogoniemi. Vyskytují se ve sladkých, slaných i brakických vodách. Často benticky, často na bahnitých a písčitých substrátech (KOMÁREK & HAUER 2012) zřídka jako součást tychopnaktonu, některé rody žijí epifyticky. *Komvophoron* byl nalezen také v termálních a minerálních pramenech. O tomto rodě existuje jen omezené množství informací, zejména pro jeho obtížnou kultivaci (HAŠLER & POULÍČKOVÁ 2010).

KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1988) k rodu *Komvophoron* přiřadili podobné vláknité rody sinic, jako je *Pseudanabaena schmidlei* nebo *Pseudanabaena minuta*. Tak byly významné rody *Komvophoron* přiřazeny k rodu *Pseudanabaena*. Následně navrhli, aby byl rod *Komvophoron* rozdělen na podrod *Alyssophoron* a *Komvophoron*. *Alyssophoron* zahrnuje taxony s krátkými a tenkými trichomy (do délky 300 µm, do šířky 3,25 µm). Do podrodu *Komvophoron* spadají taxony s tlustšími trichomy (do délky 650 µm, do šířky 10 µm). Prvotní molekulární studie ukázaly, že rod *Komvophoron* je jasně oddělen od rodu *Pseudanabaena* (HAŠLER & POULÍČKOVÁ 2010).

Do rodu *Komvophoron* řadíme např. druhy: *K. hindakii* Hašler a Pouličková 2010, *K. schmidlei* (Jaag) Anagnostidis et Komárek 1988, *K. constrictum* (Szafer) Anagnostidis et Komárek 1988, *K. minutum* (Skuja) Anagnostidis et Komárek 1988, *K. groenlandicum* Anagnostidis et Komárek 1988.

MATERIÁLY A METODY

1. Chráněná krajinná oblast Poodří

1. 1. Mezinárodní význam

Zákonem č. 155/ 1991 Sb., zřídilo dne 27. 3. 1991 Ministerstvo životního prostředí České republiky, pro svou zachovalost údolní nivy Odry, Chráněnou krajinnou oblast Poodří. V roce 1993 byla chráněná krajinná oblast vymezena v rámci Ramsarské konvence, jako mimořádně hodnotný mokřad s mezinárodním významem. Ptačí oblast Poodří, zřízena v rámci Natura 2000, je na seznamu evropsky významných ptačích území IBA (Important Bird Area). Chráněná krajinná oblast Poodří, pro svoji celoevropskou hodnotu, byla v roce 2005 zařazena do seznamu IPA (Important Plant Area). Od roku 2006 je na seznamu Evropsky významných lokalit (AGENTURA OCHRANY PŘÍRODY A KRAJINY ČR & SPRÁVA CHRÁNĚNÉ KRAJINNÉ OBLASTI POODŘÍ 2009a).

1. 2. Charakteristika území

Chráněná krajinná oblast Poodří o rozloze 81,5 km² leží v zachovalé údolní nivě řeky Odry, která je svým přirozeným meandrujícím tokem v délce 57,5 km páteří celé chráněné krajinné oblasti. Území chráněné krajinné oblasti bylo vymezeno na severovýchodě Moravskoslezského kraje mezi obcemi Mankovice, Vražné a jižním okrajem města Ostravy (NEUSCHLOVÁ 1999).

1. 3. Geologie a geomorfologie

Poodří se člení podle geologických jednotek na dvě části, Český masív a Západní Karpaty a z geomorfologického hlediska spadá do provincie Západní Karpaty a subprovincie Vněkarpatské sníženiny, celku Moravská brána, podcelku Oderská brána. Nadmořská výška se pohybuje mezi 212-298 m n. m. (NEUSCHLOVÁ 1999; JAROŠEK 1999).

1. 4. Pedologie

Oblast chráněné krajinné oblasti tvoří převážně fluvizemě, nivní těžké a středně těžké půdy glejové, hnědozemě a půda, která je splachovaná ze zemědělsky

jevem. Oblast Poodří je protkána vodními náhony, rybníky, starými říčními rameny a trvalými i pravidelně vysychajícími tůněmi (NEUSCHLOVÁ 1999).

Rozloha 58 rybníků soustředěných do sedmi rybníčních soustav spojovaných náhony, zaujímá v chráněné krajinné oblasti 688 ha. Rybníky jsou využívány především pro chov kaprů a jsou také významnými ornitologickými lokalitami (AGENTURA OCHRANY PŘÍRODY A KRAJINY ČR & SPRÁVA CHRÁNĚNÉ KRAJINNÉ OBLASTI POODŘÍ 2009b).

„Podloží rybníků z geologického hlediska je tvořeno povodňovými hlínami, zvodněnými fluvialními (říčními) štěrky, štěrkopísky, jíly a hlínou splachovanou z navezených hrází“ (ING. RADIM JAROŠEK, KRAJINÁŘ A VEDOUCÍ ODDĚLENÍ PÉČE O PŘÍRODU A KRAJINU SPRÁVY CHRÁNĚNÉ KRAJINNÉ OBLASTI POODŘÍ A KRAJSKÉHO STŘEDISKA V OSTRAVĚ, OSOBNÍ KOMUNIKACE).

1. 8. Rybník Kotvice

Rybník Kotvice byl vyhláškou Ministerstva kultury ze dne 10. 3. 1970 č.j. 3.025/70 – II/2 vyhlášen přírodní rezervací (AGENTURA OCHRANY PŘÍRODY A KRAJINY ČR & SPRÁVA CHRÁNĚNÉ KRAJINNÉ OBLASTI POODŘÍ 2009a). Rybník o rozloze 105,48 ha, parcelní číslo 838, náleží do k.ú. Nová Horka, majitelem je Česká republika. Příslušnost hospodařit s majetkem státu má Agentura ochrany přírody a krajiny ČR (ČESKÝ ÚŘAD ZEMĚMĚŘICKÝ A KATASTRÁLNÍ 2012). Rybník je napájen strouhou Sedlničkou. Hospodaření je s ohledem na ochranu vzácných rostlin a živočichů omezeno. Tato lokalita je významná pro svoji vodní květenu, je hnízdištěm a tahovou zastávkou ptáků (Mapa příloha 2, fotografie příloha 6).

1. 9. Horní rybník

Rybník o rozloze 19,24 ha, parcelní číslo 2292, náleží do k.ú. Studénka nad Odrou, majitelem je společnost DENAS, spol. s r. o. (ČESKÝ ÚŘAD ZEMĚMĚŘICKÝ A KATASTRÁLNÍ 2012). Využívá se k chovu ryb. Lokalita je významná především z ornitologického hlediska. Rybník je zásoben vodním náhonem Mlýnka (Mapa příloha 3, fotografie příloha 8).

1. 10. Křivý rybník

Rybník o rozloze 34,26 ha, parcelní číslo 838, náleží do k.ú. Jistebník, majitelem je společnost CHOV RYB JISTEBNÍK, s. r. o. (ČESKÝ ÚŘAD ZEMĚMĚŘICKÝ

A KATASTRÁLNÍ 2012). Využívá se k chovu ryb. Rybník je významný z ornitologického hlediska. Lokalita je zásobována vodním náhonem Mlýnka (Mapa příloha 1, fotografie příloha 6).

2. Evropsky významná lokalita Heřmanický rybník

2.1. Mezinárodní význam

Rybniční soustava tvořící lokalitu Heřmanický rybník je zahrnuta do Významného ptačího území Heřmanický stav – Odra – Poolší. V roce 2004 byl Heřmanický rybník zařazen nařízením vlády č. 132/2005 Sb., kterým se vymezuje národní seznam evropsky významných lokalit, do národního seznamu evropsky významných lokalit Natura 2000 jako přírodní památka a v roce 2007 do seznamu Evropsky významných lokalit (MANDÁK & ŠUHAI 2010a).

2.2. Charakteristika území

Evropsky významná lokalita Heřmanický rybník o rozloze 478,96 ha leží v Moravskoslezském kraji v severovýchodní části Slezska, na hranici okresu Ostrava město a Karviná. Lokalitu tvoří soustava pěti rybníků. Páteří oblasti je říčka Stružka. Přítomnost těžkého hutnického průmyslu, hlubinná těžba Dolu Heřmanice (těžba černého uhlí) a nelegální svoz stavební sutě a domovního odpadu značně krajinu devastuje. Lokalita se stala skládkou (MANDÁK & ŠUHAI 2010b).

2.3. Geologie a geomorfologie

Území z geologického hlediska spadá ke karpatské neogénní předhlubni, podle geomorfologického členění je součástí celku Ostravská pánev. Nadmořská výška se pohybuje v rozmezí 200-222 m n. m. (MANDÁK & ŠUHAI 2010b).

2. 4. Pedologie

Navezena odvalová hlušina z důlní činnosti a odpadový materiál ze staveb vytvořil půdní profil území Heřmanického rybníku. V lokalitě převládají fluvizemě, půdy glejové a močálové, na hranici s Polskem hnědozemě. (MANDÁK & ŠUHAI 2010b).

2. 5. Fauna a flóra

Okraje rybníků jsou porostlé rákosinou. Svou rozlohou patří k největší ve Slezsku, je ideálním prostorem pro hnízdění a zimování ptáků. Území je tvořeno mokřadními vlhkými pcháčovými loukami, trvalými i vysychající tůněmi, lesními porosty. Rybníky obývá bukáček malý (*Ixobrychus minutus*), moták pochop (*Circus aeruginosus*), husa velká (*Anser anser*), morčák velký (*Mergus merganser*), racek chechtavý (*Chroicocephalus ridibundus*), čejka chocholátá (*Vanellus vanellus*), vodouš rudonohý (*Tringa totanus*), z obojživelníků skokan ostronosý (*Rana arvalis*), čolek velký (*Triturus cristatus*), čolek obecný (*Lissotriton vulgaris*), kuňka obecná (*Bombina bombina*). Zástupci savců: zajíc polní (*Lepus europaeus*), bobr evropský (*Castor fiber*), ježek východní (*Erinaceus roumanicus*), netopýr rezavý (*Nyctalus notula*) (MANDÁK & ŠUHAI 2010c).

2. 6. Klimatologie

Území spadá do mírně teplé klimatické oblasti MT10, avšak liší se určitými zvláštnostmi způsobenými vysokou koncentrací průmyslu, hustou zástavbou a specifickými podmínkami Ostravské pánve.

Průměrná roční teplota	8-9 °C
Průměrné roční srážky	700-800 mm

(WITOSZKOVÁ 2009).

2. 7. Hydrologie

Pět rybníků Lesník, Figura, Nový Stav, Záblatský a největší Heřmanický rybník (Heřmanický stav) se nachází v Evropsky významné lokalitě Heřmanický rybník. Územím protéká říčka Stružka, která je pro rybníky zásobníkem vody. Rozloha rybníků je 243,3 ha (MANDÁK & ŠUHAI 2010b).

„Podloží rybníků z geologického hlediska je tvořeno povodňovými hlínami, písčitymi jíly, štěrky a odvalovou hlušinou.“ (ING. RADIM JAROŠEK, KRAJINÁŘ A VEDOUCÍ ODDĚLENÍ PÉČE O PŘÍRODU A KRAJINU SPRÁVY CHRÁNĚNÉ KRAJINNÉ OBLASTI POODŘÍ A KRAJSKÉHO STŘEDISKA V OSTRAVĚ, OSOBNÍ KOMUNIKACE).

2. 8. Heřmanický rybník (Heřmanický stav)

Heřmanický rybník leží v k.ú. Heřmanice, parcelní číslo 465/1. Svoji rozlohou 116,44 ha je největší v Evropsky významné lokalitě Heřmanický rybník (Heřmanický stav). Majitelem je společnost RPG RE Land, s.r.o. Rybník. (ČESKÝ ÚŘAD ZEMĚMĚŘICKÝ A KATASTRÁLNÍ 2012).

V letech 1970 – 1971 byly provedeny stavební úpravy Heřmanického rybníka a od roku 1972 slouží jako dávkovací nádrž slaných důlních vod čerpaných na povrch z ostravsko-karvinských dolů. Voda rybníku je specifická, je zde zvýšena koncentrace některých rozpuštěných minerálních látek – chloridů. Od roku 1973 rybník napájí říčka Stružka (STANĚK & SEDLÁK 1974).

„V období nízkých vodních stavů na řece Odře se slané důlní vody, přiváděné říčkou Stružkou, v Heřmanickém rybníku akumulují. Při zvýšených vodních stavech probíhá řízené vypouštění. Cílem akumulace slaných důlních vod je nepřekročení koncentračních limitů chloridů v tocích Odry a Olše“ (ING. JIŘÍ DVORSKÝ, CSC., GEOLOG, OSOBNÍ KOMUNIKACE).

Rybník se využívá ke sportovnímu rybolovu. Kolem Heřmanického rybníka byly vystaveny rybářské posedy na kůlech s vytvořenými přístupovými cestami přes rákosinu. Ke zpevnění přístupových cest k posedům využívají, někteří nájemníci, stavební suť, hlušinu, PVC a tím značně poškozují krajinu odpadním materiálem (Mapa příloha 5, fotografie příloha 9).

3. Sběr materiálu

Sběr materiálu proběhl podle metody ROUND 1953 následujícím způsobem: vzorky sedimentů dna byly odebrány pomocí plastové tyče (délka 100 cm, vnitřní průměr 1 cm) do plastových nádob označených popisem lokality. Nádoby byly utěsněny parafilmem. Následně se vzorek přemístil do plastové vaničky, kde sedimentoval přibližně 5 h. Po usazení kalu, byla odstraněna přebývající voda membránovou vývěvou N86 (P-LAB a.s., Česká republika). Na povrch usazeného substrátu byla položena bavlněná látka a na ni krycí sklíčka. Nádoba byla přes noc umístěna v kultivačním boxu s nastavením teplotního režimu na 14-16 °C a vnitřním světlem od 7.00 do 19.00 h. Řasy a sinice mají kladnou fototaxi ke světlu, proto vylézají ze sedimentu na povrch a zachycují se na bavlněné látce. Vzorky sedimentu byly odebrány v měsících srpnu, říjnu a listopadu roku 2011.

4. Mikroskopování a determinace

Mikroskopování bylo provedeno světelným mikroskopem firmy Olympus typ CH20, CHX21 (firma Olympus, Japonsko). Určení nalezených rodů a druhů sinic na základě morfologických vlastností proběhlo dle následující literatury: KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1998, KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005. Fotografie byly pořízeny pomocí mikroskopu Primo Star (Carl Zeiss, Německo) a kamery Micrometrics 31 (Micro-Metrics Company, USA).

5. Kultivace

Krycí sklíčka s biomasou byla přenesena do Petriho misek se Zehnder mediem (Staub 1961; složení uvedeno v tabulce 4. 1.), za účelem rozmnožení kmenů sinic. Misky byly umístěny na západním okně při pokojové teplotě. Kultury rostly přibližně jeden měsíc a byly znovu determinovány pomocí literatury KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1998, KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005.

Tabulka 4. 1. Složení Zehnder media: sloučeniny byly doplněny do uvedeného objemu a následně sledně vysterilizovány.

<i>Makroprvky (do 100 ml)</i>	<i>Koncentrace [g.l⁻¹]</i>
NaNO ₃	46,7
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5,9
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5
K ₂ HPO ₄	3,1
Na ₂ CO ₃	2,1
<i>Fe-EDTA (do 500 ml)</i>	
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,138 mg v 5 ml 0,1M HCl
Chelaton III	0,186 mg v 5 ml 0,1 M HCl
<i>Gaffronovy mikroprvky (do 100 ml)</i>	<i>Hmotnost [mg]</i>
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	19,8
V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ .16H ₂ O	3,1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	8,8

ZnSO ₄ .7H ₂ O	28,7
Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	15,4
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ .2H ₂ O	47,4
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	3,3
KBr	11,9
H ₃ BO ₃	31
MnSO ₄ .4H ₂ O	223
Cr (NO ₃) ₃ .7H ₂ O	3,7
Co (NO ₃) ₂ .H ₂ O	14,6
KJ	8,3
CuSO ₄ .5H ₂ O	12,5

6. Izolace vybraných kmenů

Kousky biomasy byly umístěny na agarové plotny (1,5 % agar). Trichomy vláknitých druhů se budou pohybovat od středu plotny k jejímu okraji. Plotny byly umístěny do kultivačního boxu (22 ± 1 °C, záření $20 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, světelný režim: 12 h světlo/12 h tma) na dva dny. Izolace čistých kmenů proběhla standardní technikou popsanou v ANDERSEN 2005. Pomocí lupy PZO MSt 130 (PZO Warszawa, Polsko) a sterilních jehel bylo odebráno jedno vlákno, které bylo přeneseno do sérologické destičky se Z médiem. Druhý způsob je za použití kapiláry a mikroskopu Olympus CH20, CH21 (Olympus, Japonsko). Jedno vlákno nebo buňka byla přenesena do kapičky Z média na podložním sklíčku. Kapilárou se silikonovým pipetovacím balónkem byla sinice nasáta a přemístěna do další kapičky média. Nakonec byla sinice přemístěna do Z média v sérologické destičce. Po rozrostení kmenů v sérologické destičce, byl odebrán kousek biomasy pro kultivaci v Petriho misce se Z médiem. Petriho misky byly opět umístěny do kultivačního boxu s následujícími podmínkami: teplota 22 ± 1 °C, záření $20 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, světelný režim: 12 h světlo/12 h tma.

Po získání dostatečného množství biomasy v Petriho misce, bylo přistoupeno k izolaci DNA.

7. Izolace DNA

Pro izolaci genomické DNA byl použit UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., USA). Izolace DNA byla provedena dle manuálu, přiloženém u zmíněného kitu. DNA byla extrahována z 50 mg biomasy.

Kontrola koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf North America, USA), hodnoty koncentrace znázorňuje následující tabulka 7. 1.

Tabulka 7.1. Hodnoty koncentrace DNA příslušných vzorků

Číslo vzorku	Hodnota koncentrace DNA [ng/μl]
1	71
2	90
3	54
4	49
5	51

8. DNA amplifikace

Část genu 16S rRNA a celý gen ITS region mezi 16S rRNA a 23S rRNA byl amplifikován pomocí primerů: přední P2 (5'- GGGGAATTTTCCGCAATGGG- 3') a zadní P1 (5'- CTCTGTGTGCCTAGGTATCC- 3'). Kombinaci těchto dvou primerů jako první použili BOYER et al. v publikaci z roku 2002.

Celkový objem PCR reakce byl 40 μl, do jedné PCR mikrozkušavky jsme napipetovali: 17 μl sterilní neionizované vody, 1 μl každého primeru P1 a P2 (koncentrace 0,01 mM), 20 μl FastStart PCR mastru (Roche Deagnostics GmbH, Německo) a 1 μl templátové DNA.

PCR reakce probíhala v GeneQ™ termálním cycleru (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Čína).

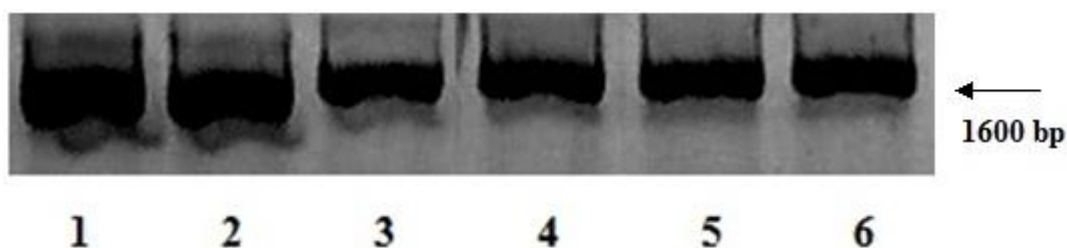
V cycleru byly nastaveny tyto podmínky reakce:

1. Iničiální denaturace trvala 4 min při teplotě 95 °C.
2. 35 cyklů denaturace po dobu 30 s při 95 °C, žihání po dobu 30 s při 57 °C a prodlužování po dobu 1 min 50 s při teplotě 72 °C.
3. Konečné prodlužování po dobu 7 min při 72 °C

Kvalita PCR produktů (asi 1600 bp) byla zkontrolována pomocí elektroforézy na 1,5 % agarovém gelu obarveném ethidium bromidem.

Postup elektroforézy na 1,5 % agarózovém gelu:

1. 1,5 % rozehrátý agar spolu a 0,5x TBE pufr a 2,5 μ l ethidium bromidu byl nalit do ELFO vaničky (AP Česká republika, Česká republika), do gelu byl zanořen hřeben, který byl po ztuhnutí gelu odstraněn. Hřeben vytvořil komůrky pro aplikaci vzorků.
2. Do jamky byla pipetována směs 5 μ l PCR produktu, 2 μ l 6x koncentrované barvičky DNA Loading Dye (Fermentas International Inc., Kanada).
3. Do krajní jamky byl aplikován marker molekulárních hmotností po 100 bp (Norgren, USA)
4. Připojení vaničky ke zdroji stejnosměrného napětí o velikosti 100 V na 20 min.
5. Pořízení záznamu gelu pomocí UV translluminátorem (Herolab, Německo) a programu Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis Systém (EDAS) 290 (Eastman Kodak Company, USA).



Obrázek 8.1. Výsledek elektroforézy na 1,5 % agarózovém gelu, čísla značí jednotlivé vzorky.

Vzorek 1 *Phormidium cf. animale* E1 (Heřmanický rybník)

Vzorek 2 *Phormidium cf. animale* E2 (Heřmanický rybník)

- Vzorek 3 *Pseudanabaena cf. galeata* E3 (Horní rybník)
 Vzorek 4 *Pseudanabaena galeata* E2P (Horní rybník)
 Vzorek 5 *Pseudanabaena cf. galeata* E7 (rybník Kotvice)
 Vzorek 6 *Pseudanabaena cf. galeata* E8 (rybník Kotvice)

U vzorku 4 bylo přistoupeno ke klonování.

9. Klonování DNA

Pro podezření z přítomnosti více shodných operonů bylo přistoupeno u některých kmenů ze vzorku 5 ke klonování DNA.

K transformaci PCR produktů byl využit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, USA).

Pro ligační reakci byly použity následující reagenty o uvedených objemech, ty byly smíchány v 2,5 ml zkumavce a přes noc inkubovány při 4 °C.

2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	2,5 µl
pGEM®-T nebo pGEM®-T Easy Vector (50 ng)	0,5 µl
PCR produkt	1,0 µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss jednotky/µl)	0,5 µl
Deionizovaná voda do konečného objemu	5,0 µl

Transformace JM109 High Efficiency Competent Cells:

1. Nejprve byly připraveny ampicilinové/IPTG/X-Gel 1,5 % agarósové plotny s Luria Bertani (LB) mediem.
 - 15 g agaru bylo přidáno do 1 l LB media a sterilizováno v autoklávu, před přidáním ampicilinu o koncentraci 100 µg/ml se muselo médium nechat zchladnout na 50 °C.
 - Do 85 mm Petriho misky bylo nalito zhruba 30-35 ml média
 - Zatuhnutí agaru
 - Na připravené plotny bylo rozetřeno 100 µl 100 mM IPTG a 20 µl 50 mg/ml X-Gelu, vše bylo ponecháno po dobu 30 min při 37 °C.

2. Lehká centrifugace centrifugou Hettich Mikro 200 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Německo) ligační reakce. 2 µl ligační reakce byly napipetovány do 1,5 ml zkumavky, která byla umístěna na ledu.
3. JM109 High Efficiency Competent Cells přemístěny do nádoby s ledem, dokud nedošlo k rozmrznutí, postupně byly buňky promíchávány.
4. 50 µl buněk opatrně napipetováno do ligační reakce (z 2. kroku). Takto byla zkumavka inkubována při pokojové teplotě 20 min.
5. Buňky prodělaly teplotní šok po dobu 40-45 s ve vodní lázni o teplotě 42 °C. Pak zkumavky s buňkami vráceny do ledové tříště.
6. Do transformované ligační reakce přidáno 550 µl LB media. Zkumavky inkubovány 1,5 h při 37 °C za stálého míchání.
7. 100 µl transformované kultury rozetřeno na ampicilinové plotny.
8. Plotny inkubovány při 37 °C v Biological Termostatu BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika).
9. Byla provedena modrobílá selekce kolonií bakterií, k vyselektování kolonií obsahující plazmid pro další použití
10. Bílá kolonie bakterií, která obsahuje plazmid s vloženou DNA, byla seškrabána pomocí bakteriální kličky a vložena do 5 ml zkumavky s LB médiem, z každé plotny byly odebrány 3 kolonie bakterií.
11. Zkumavky s bakteriemi inkubovány přes noc při teplotě 37 °C v Biological Termostatu BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika).

Izolace plasmidu byla provedena za pomoci High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd., USA), dle přiloženého manuálu.

10. Purifikace PCR produktu

Purifikace byla provedena za použití GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, Co., USA) dle přiloženého manuálu.

Všechny získané plasmidy i purifikované PCR produkty byly poslány na komerční sekvenování. Plasmidy byly sekvenovány za použití primerů M13f a M13r, spolu s vnitřními primery P5 (5'- TGTACACACCGCCCGTC-3') a P8 (5'- AAGGAGGTGATCCAGCCACA-3'), které byly jako první použity BOYER et al. 2001. PCR produkty byly sekvenovány za použití stejných primerů jako při amplifikaci

a s vnitřními primery P5 a P8, které jsou zmíněny výše. Sekvence byly poskládány a analyzovány v Sequencher 4.10 (Gene Codes Corporation, USA).

11. Fylogenetická analýza

Sekvence 16S rRNA genu byly zkontrolovány v softwaru Mallard 1.02 (ASHELFORD et al. 2005). Alignment genu 16S rRNA byl proveden podle algoritmu ClustalW (LARKIN et al. 2007) v programu MEGA 5.05 (TAMURA et al. 2011). Alignment byl znovu ručně překontrolován v softwaru MEGA alignment editor. Dokument byl exportován v různých formátech k budoucímu využití. Sekvence genu 16S rRNA byly využity k sestavení fylogenetického stromu.

Maximum likelihood byla provedena v programu MEGA. Bayesiánské Informační kritérium (SCHWARZ 1978) bylo využito k dosažení nejvhodnějšího substitučního modelu pro maximum likelihood, ten byl určen jako HKY+G. Výsledná rekonstrukce byla statisticky otestována pomocí metody bootstrap (1000 opakování).

CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši týkající se taxonomie a ekologie peryfitických sinic. Zjistit druhové zastoupení v jednotlivých lokalitách v CHKO Poodří a Heřmanickém rybníku. Vybrané druhy dále analyzovat pomocí molekulárních metod.

VÝSLEDKY

1. Základní fyzikálně-chemické parametry

Teplota vody, pH, konduktivita i salinita byla měřena v měsících srpnu, říjnu a listopadu 2011. Všechny uvedené údaje byly změřeny pomocí pH/EC/TDS/°C tester COMBO (HANNA Instruments Czech, Česká republika).

1.1 Povrchová teplota vody

V srpnu 2011 se teplota vody v lokalitách Kotvice, Křivý a Horní rybník pohybovala mezi 22-23 °C, v Heřmanickém rybníku okolo 27 °C. V podzimních měsících se teplota vody značně snížila, v listopadu 2011 byla na hladině již vrstva ledu. V říjnu 2011 se teploty vody v lokalitách pohybovaly okolo 10 °C, v listopadu 2011 mezi 4-5 °C (Tabulka příloha 10).

1.2. Hodnoty pH vody

Ve všech studovaných lokalitách bylo naměřeno středně alkalické pH, což vyhovuje většině druhů sinic, naproti tomu kyselé pH vyhovuje zeleným řasám. Průměrně bylo nejnižší pH zaznamenáno v lokalitě Křivý rybník. Průměrně nejvyšší pH bylo zaznamenáno v lokalitě Heřmanický rybník. Nejnižší pH bylo naměřeno v srpnu 2011 v lokalitě Kotvice 8,48 a nejvyšší hodnota v lokalitě Heřmanický rybník 9,4 (Tabulka příloha 11).

1.3. Konduktivita

Hodnoty konduktivity byly velmi nestabilní. Nejstabilnější hodnoty byly naměřeny v lokalitě Křivý rybník. Nejnižší konduktivita byla naměřena 310 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ v srpnu 2011 v lokalitě Horní rybník. Nejvyšší konduktivita byla naměřena v lokalitě Heřmanický rybník a to ve všech sledovaných měsících. Nejvíce bylo naměřeno 2983 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ v srpnu 2011 (Tabulka příloha 12).

1.4. Salinita (TDS- Total Dissolved Solids)

Nejnižší hodnota TDS byla naměřena v srpnu 2011 v lokalitě Horní rybník 151 ppm. Nejvyšší hodnota byla naměřena v lokalitě Heřmanický rybník v listopadu 2011 a to 1488 ppm. V Heřmanickém rybníku byly naměřeny průměrně nejvyšší hodnoty

TDS. V listopadu 2011 se ve všech lokalitách, kromě lokality Horní rybník, vyskytovala nejvyšší hodnota TDS za měřené období (Tabulka příloha 13).

2. Floristický průzkum lokalit v CHKO Poodří a Heřmanickém rybníku

2. 1. Výskat druhů v lokalitě Křivý rybník

Tabulka 2. 1. 1. Výskyt příslušných druhů v lokalitě Křivý rybník ve studovaných měsících

Druhy	Srpen 2011	Říjen 2011	Listopad 2011
<i>Chroococcales</i>			
<i>Aphanocapsa</i> sp. Nägeli 1849	+	+	-
<i>Merismopedia</i> sp. Meyen 1839	+	+	-
<i>Oscillatoriales</i>			
<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterborn 1915	+	+	+
<i>Pseudanabaena galeata</i> Böcher 1949	-	+	-
<i>Limnothrix</i> sp. Meffert 1988	-	+	-
<i>Geitlerinema amphibium</i> (Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989	+	+	-
<i>Spirulina major</i> Kützing ex Gomont 1892	-	+	-
<i>Spirulina</i> sp. Turpin ex Gomont 1892	-	+	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. Anagnostidis et Komárek 1988	+	+	+
<i>Komvophoron minutum</i> (Skuja) Anagnostidis et Komárek 1988	+	+	-

<i>Phormidium autumnale</i> (Agardh) Trevisan ex Gomont 1892	+	-	-
<i>Phormidium breve</i> (Kützing ex Gomont) Anagnostidis et Komárek 1988	+	-	-
<i>Phormidium lividum</i> Nägeli in Kützing 1849 ex Gomont 1892	-	+	-
<i>Oscillatoria tenuis</i> Agardh ex Gomont 1892	-	+	-

V lokalitě Křivý rybník se vyskytovaly běžné druhy epipelických sinic. Převažovalo zde zastoupení řádu *Oscillatoriales*. Pouze *Pseudanabaena catenata* Lauterborn 1915 se vyskytovala v měsících srpnu, říjnu i listopadu 2011.

2. 2. Výskyt druhů na lokalitě rybníku Kotvice

Tabulka 2. 2. 1. Výskyt příslušných druhů v lokalitě rybník Kotvice ve studovaných měsících

Druhy	Srpen 2011	Říjen 2011	Listopad 2011
<i>Chroococcales</i>			
<i>Cyanobacterium diatomicola</i> (Geitler) Komárek et al. 1999	+	-	-
<i>Synechocystis</i> sp. Sauvageau 1892	+	-	-
<i>Aphanocapsa</i> sp. Nägeli 1849	+	+	+
<i>Merismopedia</i> sp. Meyen 1839	+	+	-
<i>Glaucospira</i> sp. Lagerheim 1892	+	-	-

<i>Chroococcus major</i> Komárek et Komárková-Legnerová 2007	+	-	-
<i>Snowella</i> sp. Elenkin 1938	-	+	+
<i>Oscillatoriales</i>			
<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterborn 1915	+	+	+
<i>Pseudanabaena galeata</i> Böcher 1949	+	+	-
<i>Geitlerinema amphibium</i> Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989	+	+	+
<i>Spirulina tenuior</i> (Lagerheim) Kirchner 1900	+	-	-
<i>Spirulina</i> sp. Turpin ex Gomont 1892	+	-	+
<i>Leptolyngbya</i> sp. Anagnostidis et Komárek 1988	+	-	-
<i>Komvoporon minutum</i> (Skuja) Anagnostidis et Komárek 1988	-	-	+
<i>Komvoporon constrictum</i> (Szafer) Anagnostidis et Komárek 1988	-	-	+
<i>Komvoporon schmidleim</i> (Jaag) Anagnostidis et Komárek 1988	-	+	-
<i>Phormidium autumnale</i> (Agardh) Trevisan ex Gomont 1892	+	-	+

<i>Phormidium lividum</i> Nägeli in Kützing 1849 ex Gomont 1892	-	+	+
<i>Phormidium interruptum</i> Kützing ex Gomont 1892	-	+	+
<i>Oscillatoria limosa</i> Agardh ex Gomont 1892	-	-	+

V lokalitě rybníku Kotvice se vyskytovaly běžné druhy epipelických sinic. Bylo nalezeno více vláknitých druhů než druhů kokálních. Největší diverzita byla zaznamenána u řádu *Oscillatoriales*. Byly zde determinovány také druhy *Komvophoron minutum* (Skuja) Anagnostidis et Komárek 1988 a *Komvophoron constrictum* (Szafer) Anagnostidis et Komárek 1988, tyto dva druhy se podle práce HAŠLER & POULÍČKOVÁ (2010) vyskytují hlavně v létě a na podzim. V rybníku Kotvice byl nalezen *K. minutum* v měsících srpnu a listopadu 2011, *K. constrictum* v měsíci listopadu 2011. *Pseudanabaena catenata* Lauterborn 1915 se vyskytovala ve všech uvedených měsících, stejně jako *Aphanocapsa* sp. Nägeli 1849 a *Geitlerinema amphibium* Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989. V lokalitě rybníku Kotvice byl zaznamenán nejvyšší počet rodů ze všech studovaných lokalit.

2. 3. Výskyt druhů v lokalitě Horní rybník

Tabulka 2. 3. 1. Výskyt příslušných druhů v lokalitě Horní rybník ve studovaných měsících

Druhy	Srpen 2011	Říjen 2011	Listopad 2011
<i>Chroococcales</i>			
<i>Cyanobacterium</i> sp. Rippka et Cohen-Bazire 1983	-	-	+
<i>Aphanocapsa</i> sp. Nägeli 1849	+	-	+
<i>Oscillatoriales</i>			

<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterborn 1915	+	+	+
<i>Pseudanabaena galeata</i> Böcher 1949	+	-	+
<i>Limnothrix</i> sp. Meffert 1988	-	+	-
<i>Geitlerinema amphibium</i> Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989	+	-	-
<i>Spirulina major</i> Kützing ex Gomont 189	-	+	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. Anagnostidis et Komárek 1988	+	-	-
<i>Komvophoron constrictum</i> (Szafer) Anagnostidis et Komárek 1988	+	-	-
<i>Phormidium interruptum</i> Kützing ex Gomont 1892	+	+	-
<i>Phormidium lividum</i> Nägeli in Kützing 1849 ex Gomont 1892	-	+	-
<i>Phormidium</i> sp. Kützing ex Gomont 1892	-	+	-
<i>Nostocales</i>			
<i>Anabaena sphaerica</i> Bornet et Flahault 1888	+	-	-

V lokalitě Horní rybník byly identifikovány běžné druhy epipelonu bahnitého dna nádrže. Diverzitou převládaly vláknité druhy řád *Oscillatoriales*. Byly determinovány zástupci řádu *Nostocales*.

2. 4. Výskyt druhů v rybníku Heřmanice

Tabulka 2. 4. 1. Výskyt příslušných druhů v lokalitě Heřmanický rybník ve studovaných měsících

Druhy	Srpen 2011	Říjen 2011	Listopad 2011
<i>Chroococcales</i>			
<i>Aphanocapsa</i> sp. Nägeli 1849	+	+	+
<i>Merismopedia</i> sp. Meyen 1839	+	+	-
<i>Gloeocapsa compacta</i> Kützing 1845	+	-	-
<i>Chroococcus minimus</i> (Keissler) Lemmermann 1904	+	-	-
<i>Chroococcus limneticus</i> Lemmermann 1898	+	-	-
<i>Snowella</i> sp. Elenkin 1938	-	+	-
<i>Oscillatoriales</i>			
<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterborn 1915	-	+	-
<i>Pseudanabaena galeata</i> Böcher 1949	-	+	-
<i>Geitlerinema amphibium</i> Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989	+	+	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. Anagnostidis et Komárek 1988	+	+	-
<i>Phormidium animale</i> (Agardh ex Gomont) Anagnostidis et Komárek 1988	+	-	-

V rybníku Heřmanice byla zaznamenána nejmenší rodová diverzita epipelických sinic. V měsíci listopadu 2011 se v lokalitě vyskytovali pouze zástupci řádu *Chroococcales* a to *Aphanocapsa* sp. Nägeli 1849.

3. Morfologie studovaných kmenů

Morfologická variabilita vybraných druhů byla studována v kulturách izolovaných kmenů. Všechny uvedené kmeny byly vyizolovány ze vzorků odebraných v srpnu 2011.

***Phormidium animale* CCALA 140**

Šířka buněk 4-5 μm , délka buněk 1-2 μm . Koncové buňky zašpičatělé s jemně zaobleným koncem, bez kalyptry. Zbarvení tmavězelené. Trichomy rovné, bez pochvy, pohyblivé. Kultura *Phormidium animale* CCALA 140 pochází z Botanického ústavu Třeboň, bylo vyizolováno z půdy v Itálii. *Phormidium animale* CCALA 140 bylo použito na morfologické i molekulární porovnání s *Phormidium* cf. *animale* E1 a E2 (Fotografie příloha 13).

***Phormidium* cf. *animale* E1**

Patří do II. skupiny podle morfologického klíče KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (2005). Šířka buněk byla v průměru 4-5 μm , délka buněk 1-2 μm . Koncové buňky zašpičatělé s jemně zaobleným koncem, bez kalyptry. Zbarvení zelené až tmavězelené. Trichomy rovné, bez pochvy, dosti pohyblivé. *Phormidium* cf. *animale* E1 bylo nalezeno ve vzorku 1 v epipelonu rybníku Heřmanice, typicky se tento druh vyskytuje terestricky ve vlhké půdě (Fotografie příloha 13).

***Phormidium* cf. *animale* E2**

Morfologicky je shodné s *Phormidium* cf. *animale* E1. *Phormidium* cf. *animale* E2 bylo nalezeno ve vzorku 2 v epipelonu rybníku Heřmanice (Fotografie příloha 13).

***Pseudanabaena* cf. *galeata* E7**

Trichomy se vyskytují samostatně, častěji vytváří kolonie. Vlákna bez slizového obalu, buňky navzájem spojeny slizovými můstky. Šířka vlákna 1-2 μm , délka buňky 2-3 μm . Buňky soudečkovité, koncové buňky mají často dva aerotopy. Aerotopy se vyskytují i mezi sousedními buňkami. Trichomy tmavězelené, pohyblivé.

Pseudanabaena cf. galeata byla vyizolována ze vrodu 7 z epipelonu rybníku Kotvice. (Fotografie příloha 14).

***Pseudanabaena cf. galeata* E8**

Morfologickými vlastnostmi se neliší od *Pseudanabaena cf. galeata* E7. Nalezena v epipelonu vzorku 8 v lokalitě Kotvice (Fotografie příloha 14).

***Pseudanabaena cf. galeata* E3**

Trichomy se vyskytovaly samostatně, častěji v hustých koloniích. Trichomy bez slizového obalu, buňky spojeny slizovými můstky. Šířka buněk 2 μm , délka buněk 2-4 μm . Buňky protáhlejší, méně soudečkovité. Koncová buňka obsahovala dva malé nebo jeden velký protop, nelze zatím říci, zda se jedná o významný morfologický znak. Aerotopy se vyskytují i mezi sousedními buňkami. Zbarvení vláken tmavězelené. Trichomy pohyblivé. *Pseudanabaena cf. galeata* E3 nalezena ve vzorku 3 v epipelonu v lokalitě Horní rybník (Fotografie příloha 14)

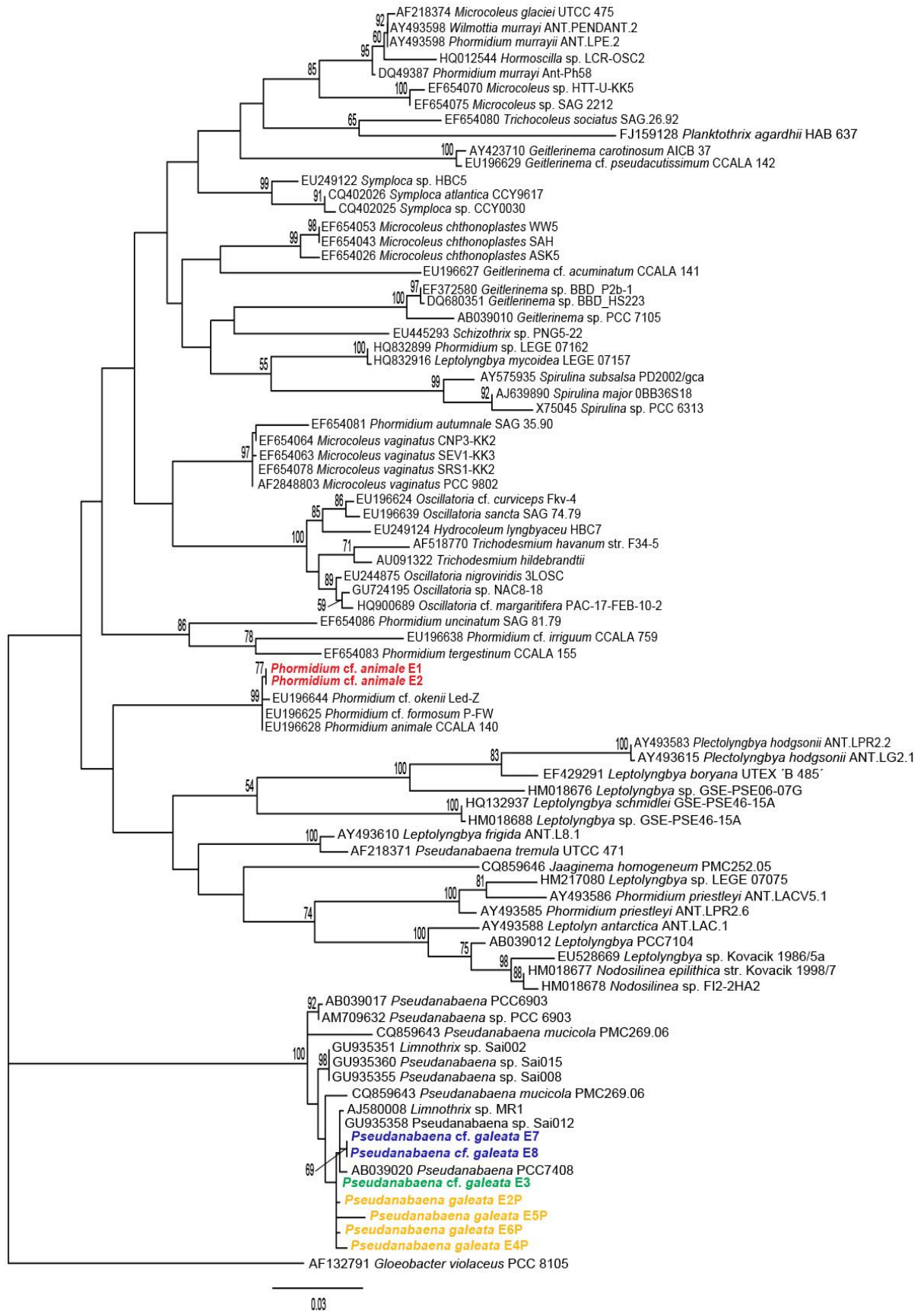
***Pseudanabaena galeata* E2P**

Častěji vytváří kolonie, nalezeny i samostatně se vyskytující vlákna. Trichomy bez slizové pochvy, buňky spojeny slizovými můstky. Šířka buněk 2 μm , délka buněk 3-4(5) μm . Buňky protáhlejší a méně soudečkovité. Koncová buňka obsahovala dva malé aerotopy nebo jeden velký aerotop. Aerotopy nalezeny i mezi sousedními buňkami. Barva vláken tmavězelená. Vlákna pohyblivá. Sinice nalezena v epipelonu vzorku 5 v lokalitě Horní rybník (Fotografie příloha 14).

Tabulka 3. 1. Shrnutí morfologických znaků vybraných kmenů sinic

Druh	Zakončení trichomu	Apikální buňka	Šířka buňky [μm]	Délka buňky [μm]	Kalyptra	Pochva	Aerotopy	Lokalita, ekologie
<i>Ph. cf. animale</i>								
CCALA 140	Buňky se postupně zužují	Zašpičatělé s jemně zaoblenými konci, kónické	4-5	1-2	-	-	-	Itálie, půda
E1	Buňky se postupně zužují	Zašpičatělé s jemně zaoblenými konci, kónické	4-5	1-2	-	-	-	ČR, Heřmanický rybník, epipelon
E2	Buňky se postupně zužují	Zašpičatělé s jemně zaoblenými konci, kónické	4-5	1-2	-	-	-	ČR, Heřmanický rybník, epipelon
<i>P. cf. galeata</i>								
E7	Buňky se postupně nezužují	Buňky zaoblené, soudečkovité,	1-2	2-3	-	-	1	ČR, rybník Kotvice, epipelon
E8	Buňky se postupně nezužují	Buňky zaoblené, soudečkovité	1-2	2-3	-	-	1	ČR, rybník Kotvice, epipelon
E3	Buňky se postupně nezužují	Buňky zaoblené, soudečkovité, protáhlejší	2	2-4	-	-	1-2	ČR, Horní rybník, epipelon
<i>P. galeata</i>								
E2P	Buňky se postupně nezužují	Buňky zaoblené, soudečkovité, protáhlejší	2	3-4(5)	-	-	1-2	ČR, Horní rybník, epipelon

4. Fylogenetická analýza na základě genu 16S rRNA



Obrázek 4. 1. Fylogenetický strom založený na analýze 16S rRNA, rekonstruovaný pomocí analýzy maximum likelihood. Klad zvýrazněný červeně, obsahuje vzorky *Phormidium* cf. *animale* E1, *Phormidium* cf. *animale* E2. Klad zvýrazněný modře zahrnuje jeden genotyp *Pseudanabaena* cf. *galeata* E7, *Pseudanabaena* cf. *galeata* E8. Klad zvýrazněný zeleně znázorňuje druhý genotyp a to *Pseudanabaena* cf. *galeata* E3. Klad zvýrazněný žlutě zaujímá třetí genotyp, zahrnující *Pseudanabaena galeata* E2P, *Pseudanabaena galeata* E4P, *Pseudanabaena galeata* E5P, *Pseudanabaena galeata* E6P.

PCR produkty všech vyizolovaných kmenů obsahovaly částečnou sekvenci genu 16S rRNA. Jejich sekvence byly porovnány se sekvencemi v GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), ty určily, že se jedná o vláknité druhy čeledi *Phormidiaceae* a *Pseudanabaenaceae*. Jako outgroup byl použit *Gloeobacter violaceus* PCC8105. Členové z čeledi *Phormidiaceae* vytvořili zřejmě monofyletický klad, EU196625 *Phormidium* cf. *formosum* P-FW a EU196644 *Phormidium* cf. *okenii* Led-Z byly pravděpodobně špatně determinovány. *Phormidium animale* E1 a *Phormidium animale* E2 jsou shodné na molekulární i morfologické úrovni. Také jsou molekulárně velmi blízké kmenu *Phormidium animale* CCALA 140.

Členové čeledi *Pseudanabaenaceae* vytváří ve fylogramu dva klady, mé vzorky spadají do spodní větve, která je zřejmě monofyletická, protože AJ580008 *Limnothrix* sp. MR1 je pravděpodobně špatně determinována. Morfologicky vytváří *Pseudanabaena*, nalezena ve vzorcích, dva morfotypy. První morfotyp tvoří *Pseudanabaena* cf. *galeata* E3, *Pseudanabaena galeata* E2P, *Pseudanabaena galeata* E4P, *Pseudanabaena galeata* E5P a *Pseudanabaena galeata* E6P, druhý morfotyp *Pseudanabaena* cf. *galeata* E7 a *Pseudanabaena* cf. *galeata* E8. Molekulární studie těchto druhů odhalila tři genotypy. První genotyp vytváří *Pseudanabaena* cf. *galeata* E3, druhý genotyp *Pseudanabaena galeata* E2P, *Pseudanabaena galeata* E4P, *Pseudanabaena galeata* E5P a *Pseudanabaena galeata* E6P a třetí genotyp *Pseudanabaena* cf. *galeata* E7 a *Pseudanabaena* cf. *galeata* E8.

DISKUZE

1. Podmínky prostředí

V této práci byly studovány druhy sinic vyskytující se v epipelonu rybníčních soustav okresu Nový Jičín a okresu Ostrava-město. Byly odebrány tři vzorky v měsících srpnu, říjnu a listopadu 2011. Dna vybraných nádrží byla především bahnitá až šterkovitá. Ve studovaných rybnících bylo naměřeno alkalické pH, což vyhovuje většině druhů sinic (KALINA & VÁŇA 2005). V lokalitě Heřmanický rybník byly zjištěny vysoké hodnoty salinity (až 1488 ppm), které se dají považovat za extrémní podmínky prostředí. To může mít vliv na menší rodové zastoupení v nádrži. V rybnících byly nalezeny běžně se vyskytující druhy vláknitých a kokálních sinic, nejčastěji se jednalo o zástupce čeledi *Pseudanabaenaceae* a *Phormidiaceae*, např. *Pseudanabaena catenata* Lauternborn 1915, *Oscillatoria limosa* Agardh ex Gomont 1892, *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont 1892, *Phormidium interruptum* Kützing ex Gomont 1892, *Phormidium autumnale* (Agardh) Trevisan ex Gomont 1892, *Pseudanabaena galeata* Böcher 1949, *Geitlerinema amphibium* (Agardh ex Gomont) Anagnostidis 1989, *Limnothrix* sp. Meffert 1988, *Spirulina major* Kützing ex Gomont 1892, *Aphanocapsa* sp. Nägeli 1849, *Merismopedia* sp. Mayen 1893 atd. V nádržích byly nalezeny některé druhy rodu *Komvophoron*, např. *Komvophoron minutum* (Skuja) Anagnostidis et Komárek 1988, *Komvophoron constrictum* (Szafer) Anagnostidis et Komárek 1988, *Komvophoron schmidlei* (Jaag) Anagnostidis et Komárek 1988.

2. Morfologická variabilita

Byla studována morfologická variabilita vyizolovaných kmenů sinic. Pro izolaci byly použity kmeny, které přežily stresové podmínky kultivace. V médiu dobře rostou pouze odolné druhy sinic a o těch, které mají specifitější nároky, máme jen omezené množství informací. Jedním vyizolovaným kmenem z čeledi *Phormidiaceae* bylo *Phormidium* cf. *animale* E1 a druhým *Phormidium* cf. *animale* E2, která podle KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (2005) reprezentují III. skupinu rodu *Phormidium*. Taxonomie je především založena na velikosti buněk, tvaru koncových buněk, přítomností pochvy a kalyptry atd. (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005). Tyto dva zmíněné druhy byly morfologicky totožné. Došlo k porovnání s *Phormidium animale* CCALA 140 z Botanického ústavu Třeboň, od něhož se morfologicky nelišily.

Phormidium cf. *animale* E1 a E2 je součástí epipelonu z bahnitého dna rybníku Heřmanice. Běžně se tento druh vyskytuje hlavně v půdě, odkud bylo vyizolováno i *Phormidium animale* CCALA 140. Studie rodu *Phormidium* pouze na základě fenotypických vlastností je velice náročná, tato náročnost je způsobena hlavně vysokým počtem druhů a jejich širokou ekologickou valencí (PALINSKA & MARQUARDT 2008). Z toho důvodu se považuje tato skupina za polyfyletickou. Tradiční řád *Oscillatoriales*, do kterého je řazen i rod *Phormidium*, je pro svou heterogenitu neustále diskutován (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005, RIPPKA et al. 1979). Jedním z hlavních taxonomických znaků je přítomnost nebo absence pochvy (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 2005), nicméně z velké části je tento znak ovlivněn environmentálními podmínkami a podmínkami kultury (PALINSKA et al. 1996). Proto by měla být informace o tvorbě pochvy používána pouze ve vztahu s dalšími vlastnostmi (PALINSKA & MARQUARDT 2008). Využití molekulárních markerů a objasnění příbuzenských vztahů je velice důležité a nevyhnutelné.

Do studie byl zařazen i drobný rod *Pseudanabaena*, jenž byl dlouhou dobu algology přehlížen. Členové tohoto rodu jsou celosvětově rozšířeni (ACINAS et al. 2009) a byli nalezeni v nejrůznějších ekologických podmínkách nevyjímaje sladkovodní habitaty (ZWART et al. 2005). *Pseudanabaena* cf. *galeata* E3, *Pseudanabaena galeata* E2P, *Pseudanabaena galeata* E4P, *Pseudanabaena galeata* E5P a *Pseudanabaena galeata* E6P podle morfologických znaků odpovídají typické *Pseudanabaena galeata* Böcher 1949. Buňky měří na délku 2-4(5) μm a na šířku 2 μm . *Pseudanabaena* cf. *galeata* E7 a *Pseudanabaena* cf. *galeata* E8 se však od typické *Pseudanabaena galeata* Böcher 1949 liší. Jejich buňky jsou kratší (2-3 μm) a jsou více soudečkovité. Zatímco typická *Pseudanabaena galeata* má buňky dlouhé 2-7 μm a více protáhlé. Morfologicky vytváří *Pseudanabaena*, nalezena ve vzorcích, dva morfotypy. První morfotyp tvoří *Pseudanabaena* cf. *galeata* E3, *Pseudanabaena galeata* E2P, *Pseudanabaena galeata* E4P, *Pseudanabaena galeata* E5P a *Pseudanabaena galeata* E6P, druhý morfotyp *Pseudanabaena galeata* E7 a *Pseudanabaena galeata* E8. U druhého zmíněného morfotypu se na koncové buňce vlákna vyskytoval jeden velký aerotop. Na koncových buňkách prvního zmíněného morfotypu se vyskytovaly dva malé aerotopy. Zda je tento znak z morfologického hlediska významný či nikoliv, není zatím jasné.

3. Studie struktury 16S rRNA

Vztahy definované na základě molekulárních a morfologických vztahů se značně liší. Často jsou do stejného klastru řazeny druhy výrazně morfologicky odlišné. V takovém případě je nevyhnutelné detailně analyzovat genom, sledovat ekologické adaptace a také zaznamenat veškerou variabilitu (KOMÁREK 2005).

Až porovnání sekvencí genu 16S rRNA odhalilo genetickou separaci vyskytující se u zástupců čeledi *Pseudanabaenaceae* a *Phormidiaceae*. *Phormidium* cf. *animale* E1 a *Phormidium* cf. *animale* E2 jsou na základě studie tohoto genu geneticky shodné. Genetická odlišnost kmenu *Phormidium* cf. *animale* E1, *Phormidium* cf. *animale* E2 od kmenu *Phormidium animale* CCALA 140 odpovídá jejich rozdílné ekologii a dosti velké geografické vzdálenosti. Jak již bylo zmíněno, *Phormidium animale* CCALA 140 bylo nalezeno v Itálii. Rod *Phormidium* obsahuje jen několik málo morfologicky uznaných genetických klastřů v současné taxonomii. Revize tohoto rodu je zatím v počátcích (KOMÁREK 2010).

U členů rodu *Pseudanabaena* byly odhaleny tři genotypy. První genotyp tvoří *Pseudanabaena* cf. *galeata* E7 a *Pseudanabaena* cf. *galeata* E8. Druhý genotyp je tvořen druhem *Pseudanabaena* cf. *galeata* E3, třetí genotyp vytváří *Pseudanabaena galeata* E2P, *Pseudanabaena galeata* E4P, *Pseudanabaena galeata* E5P, *Pseudanabaena galeata* E6P. Zástupci posledního genotypu se od sebe navzájem mírně geneticky odlišují. ACINAS et al. (2009) studovala rod *Pseudanabaena* na základě multifázického a genetického přístupu. Zmiňuje se o tom, že fylogenetické vztahy na základě 16S rRNA a 23S rRNA jsou konzistentní, ale analýza dalších lokusů vykazovala vysokou míru mikrodiversity.

Jak u zástupců čeledi *Pseudanabaenaceae*, tak u zástupců čeledi *Phormidiaceae* se může jednat o nové nebo kryptické druhy, takto definované druhy jsme schopni odlišit pouze na základě studia DNA (BOYER et al. 2002). Pro odhalení skutečných fylogenetických vztahů musí být použity další citlivější molekulární markery, např. studie ITS segmentu mezi 16S rRNA a 23S rRNA.

ZÁVĚR

Náplní této bakalářské práce byl floristický průzkum vybraných vodních nádrží CHKO Poodří a rybníku Heřmanice, izolace kmenů vybraných rodů sinic a taxonomické posouzení získaných kmenů na základě 16S rRNA genu a osvojení si základních postupů při vzorkování, morfologickém hodnocení, izolaci kmenů, fylogenetické analýze atd.

Ve všech studovaných lokalitách byly zjištěny druhy, které jsou běžnou součástí epipelonu stojaných vod. Výjimku tvořila *Phormidium cf. animale* E1 a *Phormidium cf. animale* E2, která byla nalezena v epipelonu rybníka Heřmanice. Běžně se tento druh vyskytuje v půdě. Studovaní byli hlavně zástupci čeledi *Phormidiaceae* a *Pseudanabaenaceae*. Molekulární studie kmenu *Phormidium cf. animale* E1 a *Phormidium cf. animale* E2 prokázala souvislost s morfologickými znaky kmenu *Phormidium cf. animale* CCALA 140. Byly odhaleny i jisté genetické odchylky studovaných kmenů, ty jsou nejpravděpodobněji způsobeny odlišnou ekologií a velkou geografickou vzáleností. Čeleď *Pseudanabaenaceae* zahrnovala 4 studované kmeny. Díky morfologickým znakům byly determinovány dva morfotypy druhu *Pseudanabaena cf. galeata*. Tyto dva morfotypy byly odlišeny na základě velikosti a tvaru buněk. Sekvence genu 16S rRNA neprokázala vztah mezi molekulárními a morfologickými znaky. Data poskytnutá tímto genem odhalila tři genotypy. První genotyp, jenž tvoří samostatný klad, zahrnuje kmeny *Pseudanabaena cf. galeata* E7, *Pseudanabaena cf. galeata* E8. Sousední klad s odlišným genotypem tvoří kmen *Pseudanabaena cf. galeata* E3. Z tohoto genotypu se zřejmě doštěpil další klad zahrnující kmeny *Pseudanabaena galeata* E2P, *Pseudanabaena galeata* E4P, *Pseudanabaena galeata* E5P a *Pseudanabaena galeata* E6P. Studie založená na genu 16S rRNA není dostačující na stanovení mezidruhových vztahů. Na základě tohoto genu nejsme schopni říct, zda se jedná o nové nebo kryptické druhy. K přesnější determinaci musí být použity další molekulární markery, nejlépe ITS region mezi 16S rRNA a 23S rRNA. Ten je dosti variabilní co se týká délky i sekvencí a pro stanovení mezidruhových vztahů se pokládá jako kvalitní molekulární marker. Molekulární metody jsou v této oblasti systematické biologie nenahraditelné.

POUŽITÁ LITERATURA

ACINAS, S. G., HAVERKAMP, T. H. A., HUISMAN, J. & STAL, J. (2009): Phenotypic and genetic diversification of *Pseudanabaena* spp. (cyanobacteria). – The ISME Journal 3(1):31-46.

ADAMS, D. A., BERGMAN, B., NIERZWICKI-BAUER, S. A., RAI, A. N. & SCHÜßLER, A. (2006): Cyanobacterial-plant symbioses. – In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K. H. & STACKEBRANDT, E.(eds): The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: symbiotic associations, biotechnology, applied mikrobiology, 3rd edition, 331-361, Springer-Verlag, New York.

ADAMS, D. A., DUGGAN, P. S. (2008): Cyanobacteria-bryophyte symbioses. – Journal of Experimental Botany 59(5): 1047-1058.

AGENTURA OCHRANY PŘÍRODY A KRAJINY ČR & SPRÁVA CHRÁNĚNÉ KRAJINNÉ OBLASTI POODŘÍ (2009a): Rozbory Chráněné krajinné oblasti Poodří k 30.6.2008. – 121 pp., Správa Chráněné krajinné oblasti Poodří, Studénka.

AGENTURA OCHRANY PŘÍRODY A KRAJINY ČR & SPRÁVA CHRÁNĚNÉ KRAJINNÉ OBLASTI POODŘÍ (2009b): Plán péče o Chráněnou krajinnou oblast Poodří na období 2009-2018. – 41 pp., Správa Chráněné krajinné oblasti Poodří, Studénka.

AKIYAMA, M., MIYASHITA, H., KISE, H., WATANABE, T., MIYACHI, S. & KOBAYASHI, M. (2001): Detection of chlorophyll *d*' and pheophytin *a* in a chlorophyll *d*-Dominating oxygenic photosynthetic prokaryote *Acaryochloris marina*. - Analytical Sciences 17(1): 205-208.

ANDERSEN, R. A. (2005): Algal culturing techniques. – 578 pp., Academic Press, London.

ASHELFORD, K. E., CHUZHANOVA, N. A., FRY, J. C., JONES, A. J. & WEIGHTMAN, A. (2005): At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. – Applied and Environmental Microbiology 71(12): 7724-7736.

BELLINGER, E. G. & SIGEE, D.C. (2010): Freshwater algae: identification and use as bioindicators. – 271 pp., Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.

BELMONTE, G., MIGLIETTA, A., RUBINO, F. & BOERO, F. (1997): Morphological convergence of resting stages of planktonic organisms: a review. – *Hydrobiologia* 355(1-3): 159-165.

BOYER, S. L., FLECHTNER, V. R. & JOHANSEN, J. R. (2001): Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. – *Molecular Biology and Evolution* 18(6): 1057-1069.

BOYER, S. L., JOHANSEN, J. R. & HOWERD, G. L. (2002): Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. – *Journal of Phycology* 38(6): 1222-1225.

BRAYNER, R., YÉPRÉMIAN, C., DJEDIAT, C., CORADIN T., HERBST, F., LIVAGE, J., FIÉVET, F. & COUTÉ, A. (2009): Photosynthetic microorganism-mediated synthesis of akaganeite (beta-FeOOH) nanorods. – *Langmuir* 25(17): 10062-10067.

CARVALHO, G. R. (1998): Molecular ecology: origins and approach. – In: CARVALHO, G. R. (eds.): *Advances in molecular ecology*: 1-16, IOS Press, Amsterdam.

CASTENHOLZ, R. W., RIPPKA, R., HARDMAN, M. & WILMOTTE, A. (2001): Form-genus XII. *Pseudanabaena* Lauterborn 1916. – In: BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W. (eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition, 554-557, Springer Verlag, Heidelberg.

CLAYTON, R. A., SUTTON, G., HINKLE, P. S., BULT JR. C. & FIELDS, CH. (1995): Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: Why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. – *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(3): 595-599.

ČESKÝ ÚŘAD ZEMĚMĚŘICKÝ A KATASTRÁLNÍ. Nahlížení do katastru nemovitostí. [online]. © 2004-2012. Praha: [cit. 2012-02-03]. Dostupné z: <http://nahlizeniidokn.cuzk.cz/>

DEMOTT, W. R., ZHANG, Q. X. & CARMICHAEL, W. W. (1991): Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. – *Limnology and Oceanography* 36(7): 1346-1375.

DODDS, W. K. (2003): The role of periphyton in phosphorus retention in shallow freshwater aquatic systems. – *Journal of Phycology* 39(5): 840-849.

DROUET, F. (1962): Gomont's ecophenes of the blue-green alga *Microcoleus vaginatus* (Oscillatoriaceae). - *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 114: 191-205.

ERNST, A., BECKER, S., WOLLENZIEN, U. I. A. & POSTIUS CH. (2003): Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequences analysis. – *Microbiology* 149: 217-228.

FOX, G., WISOTZKEY, J. D. & JURTSCHUK P. JR. (1992): How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. – *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(1): 166-170.

GKELIS, S., RAJANIEMI, P., VARDAKA, E., MOUSTAKA-GOUNI, M., LANARAS, T. & SIVONEN, K. (2005): *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (cyanobacteria) strains from Lake Kastria, Greece from a separate phylogenetic group. – *Microbial Ecology* 49(1): 176-182.

GROMAN, J. (2004): Region Poodří: studie-obnova rybníčních soustav v Regionu Poodří. – 123 pp, Region Poodří, Bartošovice.

KALINA, T. (1994): Systém a vývoj sinic a řas. – 165 pp., Karolinum, Praha.

HANSSON, L. A. (1996): Algal recruitment from lake sediments in relation to grazing, sinking, and dominance patterns in the phytoplankton community. – *Limnology and Oceanography* 41(6): 1312-1323.

HARISTON, N. G., VAN BRUNT, R. A., KEARNS, C. M. & ENGSTROM, D. R. (1995): Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. – *Ecology* 76(6): 1706-1711.

HARTNAM, P., PŘÍKRYL, I. & ŠTĚDROVSKÝ, E. (2005): *Hydrobiologie*. – 359 pp., Informatorium, Praha.

HAŠLER, P., POULÍČKOVÁ, A. & LYSÁKOVÁ, M. (2004): The survival and vitality of cyanobacteria and algae in fishpond bottom sediments. – *Czech Phycology* 4: 133-144.

HAŠLER, P., ŠTĚPÁNKOVÁ, J., ŠPAČKOVÁ, J., NEUSTUPA, J., KITNER, M., HEKERA, P., VESELÁ, J., BURIAN, J. & POULÍČKOVÁ, A. (2008): Epipellic cyanobacteria and algae: a case study from Czech ponds. – *Fottea* 8(2): 133-146.

HAŠLER, P. & POULÍČKOVÁ, A. (2010): Diversity, taxonomy and autecology of autochthonous epipellic cyanobacteria of the genus *Komvophoron* (Borziaceae, Oscillatoriales): a study on populations from the Czech Republic and British Isles. – *Biologia* 65(1):7-16.

HAŠLER, P., DVOŘÁK, P., JOHANSEN, J. R., KITNER, M., ONDŘEJ, V. & POULÍČKOVÁ, A. (2012): Morphological and molecular study of epipellic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/Cyanobacteria). – *Fottea* 12(2): 341-356.

HINDÁK, F. (2008): *Colour atlas of Cynaophytes*. – 256 pp., Veda, Bratislava.

CHANG, T. P., KOEST, H. P. & WANNER, G. (1985): Critical observations on some *Pseudanabaena* species. – *Archiv für Hydrobiologie (Suppl. 71)* 1/2: 149-155.

ITEMAN, I., RIPPKA, R., TANDEAU DE MARSAC, N. & HERDMAN, M. (2000): Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. – *Microbiology* 146(6): 1275-1286.

JAROŠEK, R. (1999): Stručná geologická a geomorfologická charakteristika. – In: NEUSCHLOVÁ, Š. (eds): Poodří:současné výsledky výzkumu Chráněné krajinné oblasti Poodří: 11-13, Společnost přátel Poodří v Ostravě, Ostrava.

KALINA, T. (1994): Systém a vývoj sinic a řas. – 165 pp., Karolinum, Praha.

KALINA, T. (1998): Systém a vývoj sinic a řas. – 166 pp., Karolinum, Praha.

KALINA, T. & VÁŇA, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. – 606 pp., Karolinu, Praha.

KANEKO, T., NAKAMURA, Y., WOLK, C. P., KURITZ, T., SASAMOTO, S., WATANABE, A., IRIGUCHI, A., ISHIKAWA, K., KAWASHIMA, K. & other authors (2001): Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. – DNA Research 8(5): 205-213.

KOMÁREK, J. (2005): The modern classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). – Oceanological and Hydrobiological Studies 34(3): 5-17.

KOMÁREK, J. (2006): Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. - Algae 21(4): 349-375.

KOMÁREK, J. (2010): Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). – Hydrobiologia 639 (1): 245-259.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 - Nostocales. – Archiv für Hydrobiologie 82(3)/Algological Studies 56: 247-345.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1998): Cyano-prokaryota 1. Teil Chroococcales. – In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1: 1–548, Gustav Fischer, Jena – Stuttgart – Lübeck – Ulm.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (2005): Cyano-prokaryota 2. Teil Oscillatoriales. – In: BÜDEL, B., GÄRTNER, G., KRIENITZ, L. & SCHAGERL, M. (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2: 1–759, Elsevier, München.

KOMÁREK, J., KAŠTOVSKÝ, J., VENTURA, S., TURICCHIA, S. & ŠMARDA, J. (2009): The cyanobacterial genus *Phormidesmis*. – *Algological Studies* 129(1): 41-59.

KOMÁREK, J. & HAUER, T. (2012): CyanoDB.cz – On-line database of cyanobacterial genera.[online]. © 2004-2012. Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR: [cit. 2012-05-06]. Dostupné z: <http://www.cyanodb.cz>

KONDO, R., YOSHIDA, T., YUKI, Y. & HIROISHI, S. (2000): DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus, *Microcystis*. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(2): 767-770.

LACHANCE, M. A. (1981): Genetic relatedness of heterocytous cyanobacteria by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid reassociation. – *International Journal of Systematic Bacteriology* 31(2): 139-147.

LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN N. P., DUENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A. & other authors (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. – *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

LELLÁK, J. KUBÍČEK, F. (1991): *Hydrobiologie*. – 256 pp., Univerzita Karlova, Praha.

LU, W., EVANS, E. H., MCCOOL, S. M. & SAUNDERS, V. A. (1997): Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA spacer region. – *Microbiology Letters* 153(1): 141-149.

LYSÁKOVÁ, M., KITNER, M. & POULÍČKOVÁ, A. (2007): The epipellic algae of fishponds of Central and Northern Moravia (The Czech Republic). – *Fottea* 7(1): 69-75.

MANDÁK, M. & ŠUHAJ, J. (2010a): Ochrannářské úsilí o zachování přírodních hodnot EVL Heřmanický rybník. – *Poodří: časopis obyvatel horní Odry* 13(1): 19-22.

MANDÁK, M. & ŠUHAJ, J. (2010b): Evropsky významná lokalita Heřmanický rybník-ornitologický ráj mezi Ostravou, Bohumínem a Rychvaldem. - Poodří: časopis obyvatel horní Odry 13(1): 4-8.

MANDÁK, M. & ŠUHAJ, J. (2010c): Nejpálčivější problémy ochrany přírody v EVL Heřmanický rybník. - Poodří: časopis obyvatel horní Odry 13(1): 22-26.

MAZEL, D., HOUMARD, J., CASTETS, A. M. & TANDEAU DE MARSAC, N. (1990): Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. – Journal of Bacteriology 172(5): 2755-2761.

NEILAN, B. A. (2002): The molecular evolution and DNA profiling of toxic cyanobacteria – Current Issues in Molecular Biology 4:1-11.

NEUHÄUSLOVÁ, Z. (1999): Chráněná krajinná oblast Poodří a její specifičnost z hlediska geobotanického. – In: NEUSCHLOVÁ, Š. (eds): Poodří:současné výsledky výzkumu Chráněné krajinné oblasti Poodří: 36-40, Společnost přátel Poodří v Ostravě, Ostrava.

NEUSCHLOVÁ, Š. (1999): Poodří:současné výsledky výzkumu Chráněné krajinné oblasti Poodří. 115 pp., Společnost přátel Poodří v Ostravě, Ostrava.

NÜBEL, U., GARCIA-PICHEL, F. & MUYZER, G. (1997): PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. – Applied and Environmental Microbiology 63(8): 3327-3332.

OREN, A. (2011): Cyanobacterial systematics and nomenclature as featured in the International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy / International Journal of Systematic Bacteriology / International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology. - International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61(1): 10-15.

OTSUKA, S., SUDA, S., SHIBATA, S., OYAIZU, H., MATSUMOTO, S. & WATANABE, M. M. (2001): A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lammermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. – Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51(3): 873-879.

PALINSKA, K. A., THOMASIUŠ, CH. F., MARQUARDT, J. & GOLUBIC, S. (2006): Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccata. - *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(10): 2253-2263.

PALINSKA, K. A. & MARQUARDT, J. (2008): Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales). – *Archives of Microbiology* 189(4): 325-335.

PALINSKA, K. A., DEVENTER, B., HARIRI, K. & Łotocka, M. (2011): A taxonomic study on *Phormidium*-group (cyanobacteria) based on morphology, pigments, RAPD molecular markers and RFLP analysis of the 16S rRNA gene fragment. - *Fottea* 11(1): 41-55.

PEI, A. Y., OBERDORF, W. E., NOSSA, C. W., AGARWAL, A., CHOKSHI, P., GERZ, E. A., JIN, Z., LEE, P., YANG, L. & other authors (2010): Diversity of 16S rRNA genes with individual prokaryotic genomes. – *Applied and Environmental Microbiology* 76(12): 3886-3897.

POULÍČKOVÁ, A. (2011): *Základy ekologie sinic a řas*. – 91 pp., Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

POULÍČKOVÁ, A., HAŠLER, P., LYSÁKOVÁ, M. & SPEARS, B. (2008a): The ecology of freshwater epipellic algae: an update. – *Phycologia* 47(5): 437-450.

POULÍČKOVÁ, A., LYSÁKOVÁ, M., HAŠLER, P. & LELKOVÁ, E. (2008b): Fishpond sediments – the source of palaeoecological information and algal „seed banks“. – *Nova Hedwigia* 86(1-2): 141-153

RASMUSSEN, U. & SVENNING, M. M. (1998): Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. – *Applied and Environmental Microbiology* 64(1): 265-272.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M. & STANIER, R. Y. (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. – *Journal of General Microbiology* 111(1): 1-61.

ROBINSON, N. J., RUTHERFORD, J. C., POCOCK, R. & CAVET, J. S. (2002): Metal metabolism and toxicity: repetitive DNA. – In: WHITTON, B. A. & POTTS, M. (eds): The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space: 443-463, Kluwer Academic Publishers, Boston.

ROUND, F. E. (1953): An investigation of two benthic algal communities in Malham Tarn. – *Journal of Ecology* 41(1): 174-197.

ROUND, F. E. (1957): Studies on bottom-living algae in some lakes of the English Lake District: part III. The distribution on the sediment of algal groups other than the Bacillariophyceae. – *Journal of Ecology* 45(3): 649-664.

ROUND, F. E. (1972): Patterns of seasonal succession of freshwater epipelagic algae. – *British Phycological Journal* 7(2): 213-220.

SCHWARZ, G. E. (1978): Estimating the dimension of a model. - *The Annals of Statistics* 6(2): 461-464.

SIEGESMUND, M. A., JOHANSEN, J. R., KARSTEN, U. & FRIEDL, T. (2008): *Coleofasticulus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. – *Journal of Phycology* 44(6): 1572-1585.

STAL, L. J. (2002): Cyanobacterial mats and stromatolites. – In: WHITTON, B. A. & POTTS, M. (eds): The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space: 61-120, Kluwer Academic Publishers, Boston.

STANĚK, Z. & SEDLÁK, M. (1974): Radiobiochemický průzkum Heřmanické dávkovací nádrže. – 46pp., Výzkumný ústav vodohospodářský, Brno.

STARMACH, K. (1966): Cyanophyta – Sinice, Glaucophyta – Galukofity. – In: Flora słodkowodna Polski, Tom 2. – 806 pp., Państwowe wydawnictwo naukowe, Warszawa.

STEVENSON, R. J. (1996): An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. – In: R. J., STEVENSON, BOTHWELL, M. L. & LOWE, R. I. (eds.): Algal ecology: freshwater benthic ecosystems: 3-30, Academic Press, San Diego.

SUDA, S., WATANABE, M. M., OTSUKA, S., MAHAKAHANT, A., YONGMANITCHAI, W., NOPARTNARAPORN, N., LIU, Y. D. & DAY, J. G. (2002): Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(5): 1577-1595.

ŠPAČKOVÁ, J., HAŠLER, P., ŠTĚPÁNKOVÁ, J. & POULÍČKOVÁ, A. (2009): Seasonal succession of epipellic algae: a case study on a mesotrophic pond in a temperate climate. – *Fottea* 9(1): 121-133.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. – *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2947-2948.

VAISHAMPAYAN, A., SINHA, R. P., HÄDER, D. P., DEY, T., GUPTA, A. K., BHAN, U. & RAO, A. L. (2001): Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. – *The Botanical Review* 67(4): 453-516.

VELASCO, J., MILLAN, A., VIDAL-ABARCA, M. R., SUAREZ, M. L., GUERRERO, C. & ORTEGA, M. (2003): Macrophytic, epipellic and epilithic primary production in a semiarid Mediterranean stream. – *Freshwater Biology* 48(8): 1408-1420.

VALÉRIO, E., CHAMBEL, L., PAULINO, S., FARIA, N., PEREIRA, P. & TENREIRO, R. (2009): Molecular identification, typing, and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. – *Microbiology* 155(2): 642-656.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. & LUPSKI, J. R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. – *Nucleic Acids Research* 19(24): 6823-6831.

WHITTON, B. A. & POTTS, M. (2002): Introduction to cyanobacteria. – In: WHITTON, B. A. & POTTS, M. (eds): *The ecology of the cyanobacteria: their diversity in time and space*: 1-11, Kluwer Academic Publishers, Boston.

WILMOTTE, A. (1994): Molecular evolution and taxonomy of cyanobacteria. – In: BRYANT, D. (eds): *The molecular biology of cyanobacteria*: 1-25, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

WITOSZKOVÁ, D. (2009). Teplotní inverze v Ostravské pánvi. Brno. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Geografický ústav.

ZWART, G., KAMST-VAN AGTERVELD, M. P., VAN DER WERFF-STAVERMAN, I., HAGEN, F., HOOGVELD, H. L. & GONS, H. J. (2005): Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. – *Environmental Microbiology* 7(3): 365-377.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1. Mapa se zaznačenou lokalitou Křivý rybník

Příloha 2. Mapa se zaznačenou lokalitou Kotvice

Příloha 3. Mapa se zaznačenou lokalitou Horní rybník

Příloha 4: Mapa s vyznačenými lokalitami Křivý rybník, rybník Kotvice a Horní rybník

Příloha 5. Mapa se zaznačenou lokalitou Heřmanický rybník

Příloha 6. Fotografie: Křivý rybník

Příloha 7. Fotografie: Kotvice

Příloha 8. Fotografie: Horní rybník

Příloha 9. Fotografie: Heřmanický rybník

Příloha 10. Tabulka s údaji o povrchové teplotě vody příslušných lokalit

Příloha 11. Tabulka s údaji o pH vody příslušných lokalit

Příloha 12. Tabulka s údaji o konduktivitě vody příslušných lokalit

Příloha 13. Tabulka s údaji o salinitě vody příslušných lokalit

Příloha 14. Obrazová tabule rodu *Phormidium*, fotografie kultur

Příloha 15. Obrazová tabule rodu *Pseudanabaena*, fotografie kultur

Příloha 16. Obrazová tabule rod *Phormidium*, fotografie přírodních vzorků

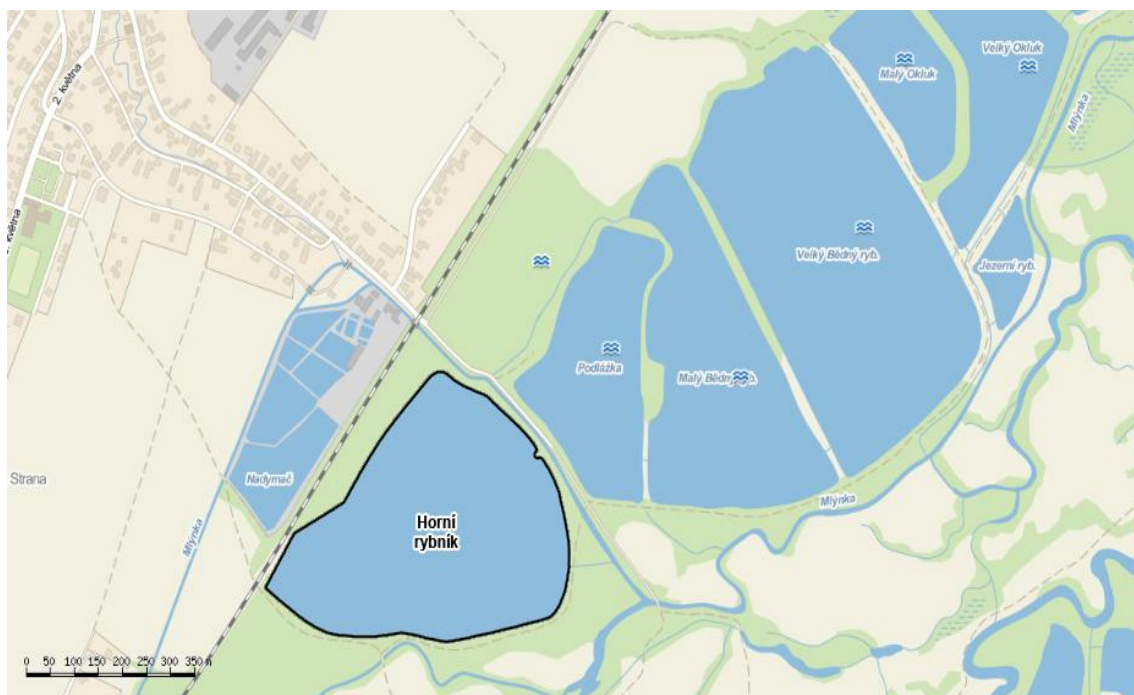
Příloha 17. Obrazová tabule rod *Komvophoron*, fotografie přírodních vzorků



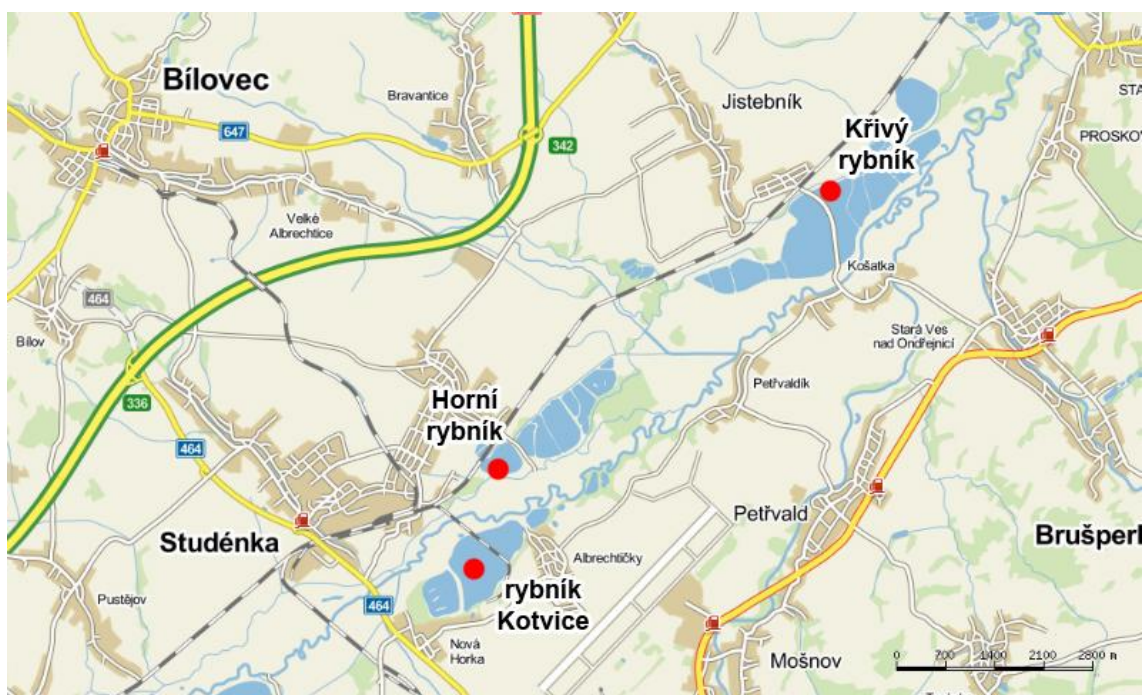
Příloha 1. Mapa se zaznačenou lokalitou Křivý rybník



Příloha 2. Mapa se zaznačenou lokalitou Kotvice



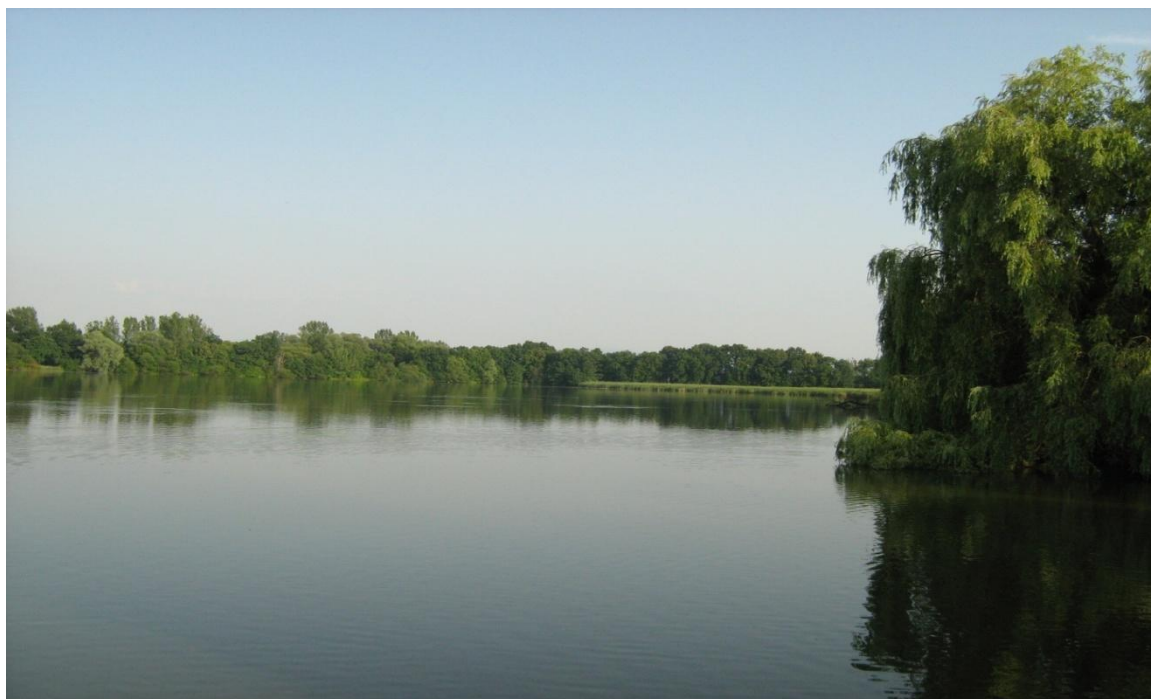
Příloha 3. Mapa se zaznačenou lokalitou Horní rybník



Příloha 4. Mapa s vyznačenými lokalitami Křivý rybník, rybník Kotvice a Horní rybník



Příloha 5. Mapa se zaznačenou lokalitou Heřmanický rybník



Příloha 6. Fotografie: Křivý rybník



Příloha 7. Fotografie: rybník Kotvice



Příloha 8. Fotografie: Horní rybník



Příloha 9. Fotografie: Heřmanický rybník

Příloha 10. Údaje o povrchové teplotě vody v uvedených lokalitách

Teplota za určité měsíce v roce 2011 [°C]

Lokalita	Srpen	Říjen	Listopad
Kotvice	22,7	9,7	4
Horní rybník	23,3	10,7	5
Křivý rybník	22,1	10	5
Heřmanický rybník	26,7	9,6	5,4

Příloha 11. Údaje o pH vody v uvedených lokalitách

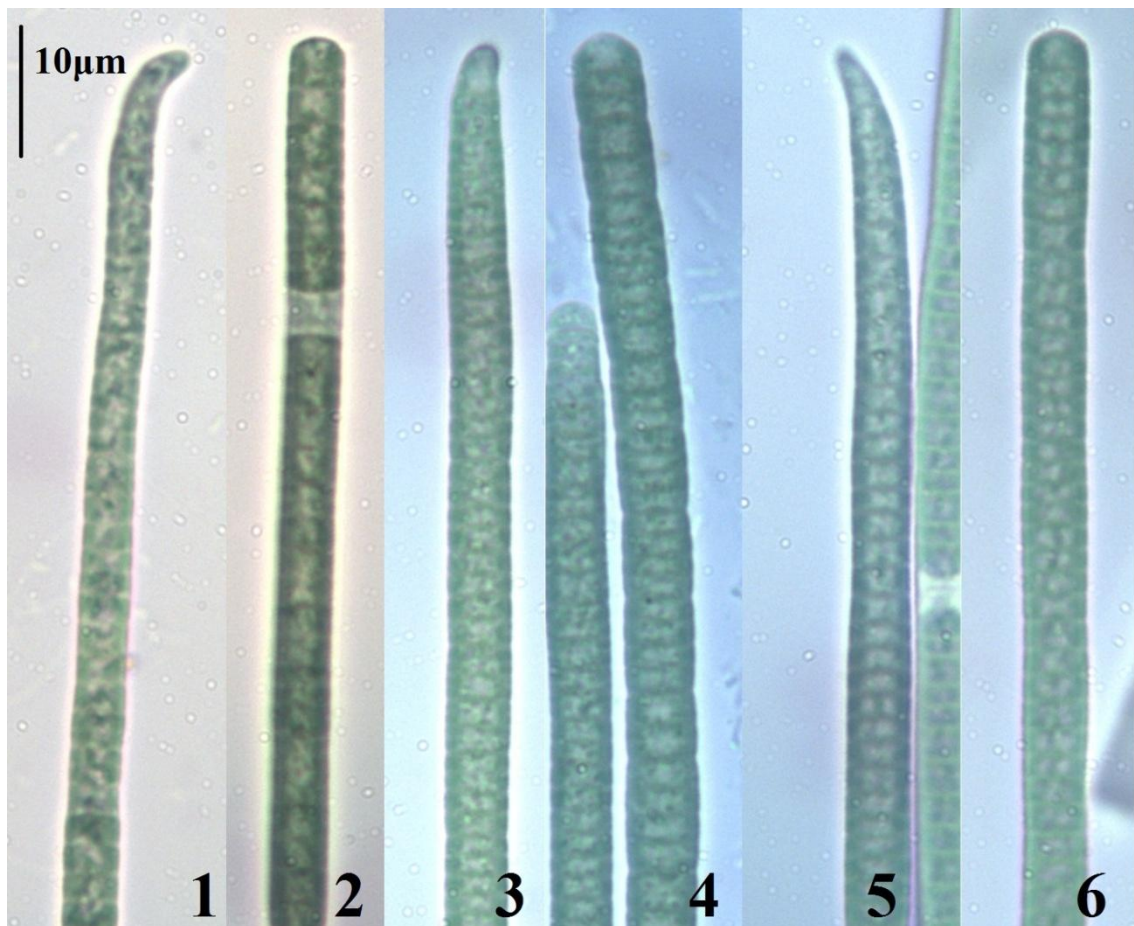
Hodnoty pH za určité měsíce v roce 2011			
Lokalita	Srpen	Říjen	Listopad
Kotvice	8,48	8,89	8,87
Horní rybník	9,24	8,99	8,9
Křivý rybník	8,68	8,75	8,53
Heřmanický rybník	9,39	8,97	9,4

Příloha 12. Údaje o konduktivitě vody v uvedených lokalitách

Konduktivita za určité měsíce v roce 2011 [$\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$]			
Lokalita	Srpen	Říjen	Listopad
Kotvice	404	438	629
Horní rybník	310	555	502
Křivý rybník	370	404	547
Heřmanický rybník	1774	1941	2983

Příloha 13. Údaje o salinitě vody v uvedených lokalitách

Hodnoty TDS za určité měsíce v roce 2011 [ppm]			
Lokalita	Srpen	Říjen	Listopad
Kotvice	202	225	320
Horní rybník	151	279	225
Křivý rybník	185	202	276
Heřmanický rybník	887	971	1488



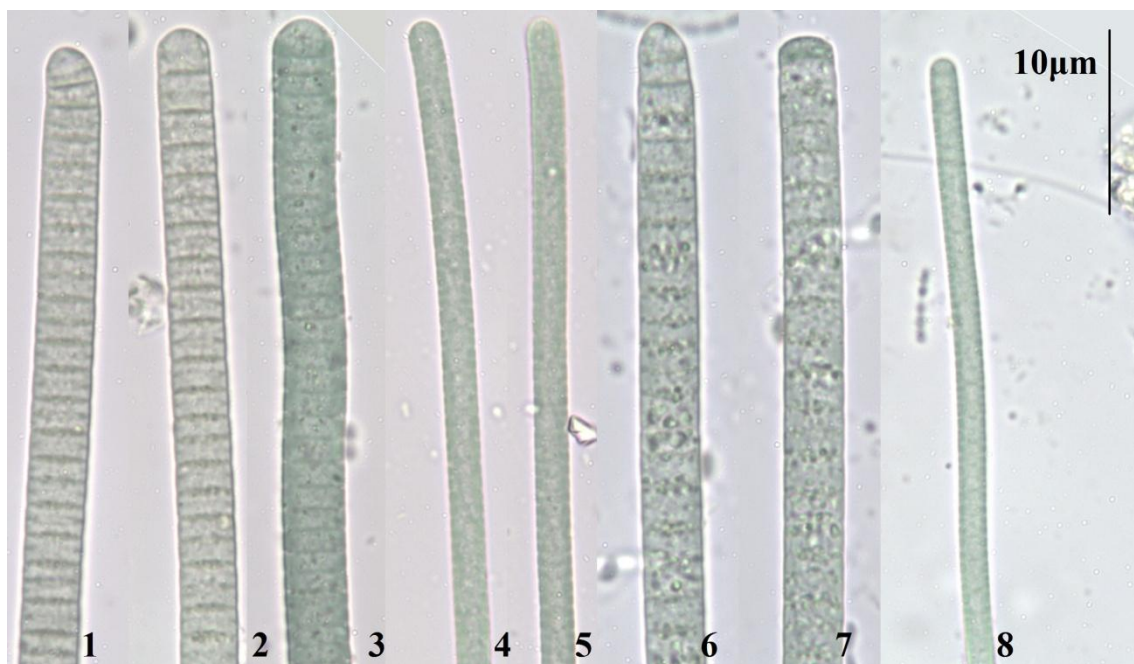
Příloha 14. Obrazová tabule rodu *Phormidium*, fotografie kultur:

Phormidium animale CCALA 140 (1-2), *Phormidium* cf. *animale* E1 (3-4),
Phormidium cf. *animale* E2 (5-6).



Příloha 15. Obrazová tabule rodu *Pseudanabaena*, fotografie kultur:

Pseudanabaena cf. *galeata* E3 (7), *Pseudanabaena galeata* EP2 (8), *Pseudanabaena* cf. *galeata* E7 (9), *Pseudanabaena* cf. *galeata* E8 (10)



Příloha 16. Obrazová tabule rodu *Phormidium*, fotografie přírodních vzorků:

z lokality Křivý rybník (1,2), z lokality Křivý rybník (3), z lokality rybník Kotvice (4,5),
z lokality rybník Kotvice (6,7), z lokality Horní rybník (8)



Příloha 17. Obrazová tabule rodu *Komvophoron*, fotografie přírodních vzorků:

Komvophoron minutum z lokality rybník Kotvice (1), *Komvophoron minutum* z lokality Horní rybník (2), *Komvophoron constrictum* z lokality Horní rybník (3,4)