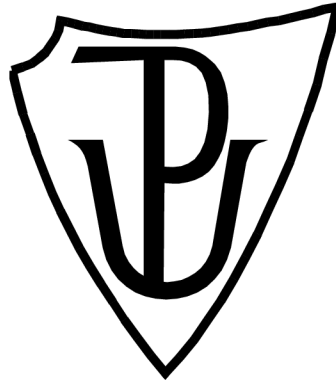


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie a životního prostředí



Taxonómia a diverzita kozmopolitnej sinice *Microcoleus*

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Bc. Viktória Dodoková

Študijný odbor: Hydrobiológia

Forma štúdia: Prezenčná

Vedúci práce: **doc. Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.**

Rok: 2023

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

Čestne prehlasujem, že svoju diplomovú prácu som vypracovala samostatne s odbornou pomocou doc. Mgr. Petra Dvořáka, Ph.D. a za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

POĎAKOVANIE

Veľmi pekne by som sa chcela poďakovať vedúcemu práce doc. Mgr. Petrovi Dvořákovi, Ph.D. za ochotu a cenné rady, ktoré mi boli poskytnuté pri spracovaní diplomovej práce. V druhom rade Katedře botaniky Univerzity Palackého v Olomouci za možnosť využívania algologického laboratória. Zároveň patrí moje poďakovanie rodine, kamarátom a všetkým zainteresovaným za trpezlivosť a morálnu podporu.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora: Bc. Viktória Dodoková

Názov práce: Taxonómia a diverzita kozmopolitnej sinice *Microcoleus*

Typ práce: Diplomová práca

Pracovisko: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci

Vedúci práce: doc. Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2023

Abstrakt: Sinice predstavujú veľkú skupinu prokaryotických organizmov, ktoré sú schopné produkovať kyslík prostredníctvom fotosyntézy. Vyskytujú sa v sladkovodnom i morskom prostredí, pôde, skalách ale často prežívajú aj v extrémnych podmienkach, ako sú púšte či polárne oblasti. Taxonómia siníc je tradične založená na morfológii, avšak s príchodom genetických informácií sa považuje za neplatnú. Morfológická variabilita je v porovnaní s genetickou omnoho menšia. Sinica *Microcoleus* je kozmopolitne rozšíreným druhom a vyskytuje sa predovšetkým v pôde. Taxonómia siníc je komplikovaná a stále málo preskúmaná. Cieľom diplomovej práce je priniesť nové poznatky v taxonómii sinice rodu *Microcoleus*. Vo výskumnej časti bolo použitých 35 kmeňov, ktoré boli podrobené morfologickej a fylogenetickej analýze. Vo fylogenetickej analýze bola použitá sekvencia génu 16S rRNA. Na základe genetickej analýzy bolo definovaných 8 skupín, ktoré boli priradené k 5 už existujúcim druhom rodu *Microcoleus*.

Kľúčové slová: *Microcoleus*, sinice, taxonómia, fylogenéza, morfológia

Počet strán: 48

Počet príloh: 2

Jazyk: Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Bc. Viktória Dodoková
Title:	Taxonomy and diversity of the cosmopolitan cyanobacterium <i>Microcoleus</i>
Type of thesis:	Diploma thesis
Department:	Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor:	doc. Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.
The year of presentation:	2023

Abstract: Cyanobacteria are a large group of prokaryotic organisms that are able to produce oxygen through photosynthesis. They occur in freshwater and marine environments, soil, rocks, but often survive in extreme conditions, such as deserts or polar areas. The taxonomy of cyanobacteria has traditionally been based on morphology, but with the new genetic information it is considered invalid. Morphological variability is much smaller compared to genetic variability. The cyanobacterium *Microcoleus* is a cosmopolitan species and occurs primarily in soil. The taxonomy of cyanobacteria is complicated and still poorly understood. The aim of the thesis is to bring new knowledge in the taxonomy of the cyanobacteria genus *Microcoleus*. In the research part, 35 strains were used, which were subjected to morphological and phylogenetic analysis. In the phylogenetic analysis was used the 16S rRNA gene sequence. On the basis of genetic analysis, 8 groups were defined, which were assigned to 5 already existing species of the genus *Microcoleus*.

Keywords: *Microcoleus*, cyanobacteria, taxonomy, morphology, phylogeny

Number of pages:	48
Number of appendices:	2
Language:	Slovak

Obsah

1 Úvod	8
2 Ciele práce	10
3 Taxonómia	11
3.1 Morfológická evolúcia v taxonómii siníc.....	12
3.2 Polyfázický prístup	13
3.3 Súčasné problémy taxonómie	13
3.4 Súčasná definícia druhu	14
4 <i>Microcoleus</i> sp.	16
4.1 Taxonomická história rodu <i>Microcoleus</i>	16
4.2 Taxonomické zaradenie rodu <i>Microcoleus</i>	18
4.4 Ekológia rodu <i>Microcoleus</i>	18
5 Pôdne sinice	20
6 Toxíny	21
7 Materiál a metodika	24
7.1 Materiál a lokalita	24
6.2 Kultivácia vzoriek	26
6.3 Morfológická časť	26
6.4 Genetická časť	26
6.5 Fylogenetická časť	27
8 Výsledky	28
8.1 Fylogenetický strom.....	28
8.2 Morfológické hodnotenie	29
8.2.1 Skupina A.....	29
8.2.2 Skupina B	31
8.2.3 Skupina C	32

8.2.4 Skupina D.....	33
8.2.5 Skupina E.....	33
8.2.6 Skupina F.....	34
8.2.7 Skupina G.....	34
8.2.8 Skupina H.....	34
10 Záver.....	41
11 Zdroje.....	42
11 Prílohy.....	48
11.1 Zoznam použitých obrázkov:	48
11.2 Zoznam použitých tabuliek:	48

1 Úvod

Sinice (cyanobaktérie) sa na Zemi vyskytujú už 3,5 miliardy rokov. Počas svojej dlhej evolučnej histórie nielenže zmenili zloženie zemskej atmosféry, ale taktiež umožnili vývoj aeróbného života a poskytli materiálový základ pre chloroplasty zelených rastlín (Zhang, 2014). Ekologické stanovište siníc má široké rozmedzie, vyskytujú sa v sladkovodnom i morskom prostredí, pôde, skalách či kôre. Sú schopné produkovať rôzne bioaktívne zlúčeniny (intracelulárne aj extracelulárne), a teda prežiť v extrémnych enviromentálnych podmienkach (Thummajitsakul et al., 2012). V mikrobiálnom prostredí zohrávajú dôležitú úlohu primárnych producentov (Waterbury et al., 1979; Chisholm et al., 1988). Kyslík, ktorý produkujú ako výsledok fotosyntézy má významnú rolu v globálnom biochemickom cykle dusíka, síry a uhlíka. Sinice tak majú značný vplyv na mikrobiálne spoločenstvá a prebiehajúce biogeochemické cykly (Blank, 2004).

Klasifikácia siníc prešla v posledných rokoch rozsiahlou reštrukturalizáciou a revíziou, ktoré súvisia s príchodom fylogenetických analýz, založených na údajoch o molekulárnej sekvencii. Taxonomická klasifikácia predstavuje primárnu metódu používanú na hodnotenie diverzity všetkých biologických skupín organizmov (Komárek et al., 2014). Taxonómia siníc čelí obdobiu rýchlych zmien vďaka jednoduchému sekvenovaniu génu 16S rRNA a zavedeným pracovným postupom na popis nových taxónov (Strunecký et al., 2013).

Druhy, ktoré sú v súčasnosti klasifikované v rámci rodu *Microcoleus* spadajú do dvoch odlišných kladov vo fylogenéze 16S rRNA, pričom jeden obsahuje taxóny v rámci *Oscillatoriaceae* a druhý obsahuje taxóny v rámci *Phormidiaceae* (Siegesmund et al., 2008). *Microcoleus vaginatus*, ktorý je zároveň typovým druhom rodu je výrazne rozšírený (Boyer et al., 2002). Spočiatku *Microcoleus vaginatus* vykazoval špecifickú ekológiu iba v rámci pôdneho spoločenstva. Neskôr však bola ekológia rozšírená o extrémne stanovištia v podobe horúcich a studených púští, kde zohráva dôležitú úlohu pri biogeochemickom cykle a stabilizácii piesčitej pôdy svojimi polysacharidmi. V súčasnej dobe sa považuje za kozmopolitný druh, ktorý sa vyskytuje predovšetkým v bentických a subaerofytických lokalitách (Stanojković et al., 2022).

Bentické druhy z rodu *Microcoleus* sú výrazne rozšírené a tvoria rozsiahle porasty v sladkovodných ekosystémoch, ktoré niekedy vykazujú toxicitu v dôsledku produkcie silných neurotoxínov (anatoxínov) (Tee et al., 2021). *Microcoleus* produkuje celý rad

cyanotoxínov, pričom najčastejšie sa uvádzajú neurotoxicke anatoxíny (anatoxín-a, dihydro-anatoxín-a, homoanatoxín-a, a dihydro-homoanatoxín-a) (Wood et al., 2018).

2 Ciele práce

Hlavným cieľom diplomovej práce je taxonomická revízia a vytvorenie taxonomického kľúča rodu *Microcoleus*. S tým súvisí aj prinesenie nových poznatkov v taxonómii rodu *Microcoleus*. Čiastkovým cieľom je porovnanie morfolologickej a molekulárnej evolúcie. V súčasnej dobe sú kryptická diverzita a kryptické druhy veľkým problémom taxonómie. Pomocou svetelnej mikroskopie bude skúmaná morfológická variabilita 35 kmeňov a následne bude genetická časť sledovaná použitím sekvencie génu 16S rRNA a ITS (interný transkribovaný spacer).

3 Taxonómia

Klasifikácia cyanobaktérií (siníc) prešla v posledných rokoch rozsiahlou reštrukturalizáciou a revíziou, ktoré súvisia s príchodom fylogenetických analýz, založených na údajoch o molekulárnej sekvencii (Komárek et al., 2014). Taxonómia cyanobaktérií bola tradične založená na cytomorfológických a ekologických markeroch, podobne ako u iných skupín najjednoduchších fototrófnych jednobunkových rias či eukaryotických organizmov, ako sú fytoflageláty či kokálne riasy. Sinice boli pôvodne nazývané ako „modrozelené riasy“ z hľadiska ich morfológickej podobnosti s jednoduchými riasami a na základe ich ekologickej rozmanitosti (Komárek, 2019).

Taxonomická klasifikácia predstavuje primárnu metódu používanú na hodnotenie diverzity všetkých biologických skupín organizmov (Komárek et al., 2014). Za vznikom taxonómie stojí Carl Linné, ktorý v 50. rokoch 18. storočia zaviedol binominálnu nomenklatúru, čo znamená, že každý organizmus je označený dvojslovným názvom, a to pomocou druhového a rodového mena (Linné, 1753). Spoločne s vytvorením vedeckého systému sa kritéria klasifikácie v priebehu rokov neustále menili. Taxonómia bola transformovaná zo systému, ktorý jednoducho umiestnil morfológicky podobné taxóny do hierarchického systému klasifikácie, ktorá ideálne odráža evolučné vzťahy a vytvára sieť hypotéz o evolučnej histórii (Komárek et al., 2014).

Spočiatku sa sinice klasifikovali len na základe ich morfológických vlastností. Medzi hlavné morfológické znaky sa zaraďujú veľkosť buniek, ich tvar a usporiadanie (vláknité, koloniálne či jednobunkové), spôsob bunkového delenia, prítomnosť alebo absencia fixácie dusíka či prítomnosť špecializovaných buniek, ako sú heterocyty, akinéty a aerotopy (Rippka et al., 1979; Castenholz & Waterbury, 1989). Postupom času sa klasifikačný systém siníc neustále vyvíjal. Dôležitým medzníkom vo vývoji bol príchod elektrónovej mikroskopie, molekulárnych a genetických metód, na základe čoho sa taxonómia rozdelila do troch základných smerov. Prvá skupina výskumníkov sa prostredníctvom zmenšenia počtu taxónov snažila systém zjednodušiť (Drouet, 1968), druhá skupina v snahe dosiahnuť monofýliu rozdeľovala jednotlivé taxóny (Johansen & Casamatta, 2005) a tretia skupina preferovala opatrnejšiu cestu a získavanie ďalších molekulárnych dát (Hoffman, 2005; Komárek et al., 2014).

Druhový koncept predstavuje súbor kritérií, ktoré slúžia pre teoretické definovanie druhu. Tento koncept, platný pre eukaryotické organizmy však nie je platný pre

organizmy prokaryotické, a to najmä z dôvodu asexuálneho množenia a vytvárania obrovských populácií. Druhový koncept sa odlišuje od definície druhu, ktorá sa využíva predovšetkým na praktickú identifikáciu. Rozlišujú sa druhy, ktoré sú definované pomocou genetických dát (genospieces) alebo pomocou morfológických dát (morfospieces) (Dvořák et al., 2015).

Taxonómia siníc čelí obdobiu rýchlych zmien vďaka jednoduchému sekvenovaniu génu 16S rRNA a zavedeným pracovným postupom na popis nových taxónov (Strunecký et al., 2013). Fylogénéza génu 16S rRNA a genetické vzdialenosti sa považujú za štandard pre vymedzenie jednotlivých druhov (Osorio–Santos et al., 2014; Komárek, 2010; Stackebrandt, 2006).

Polyfázický prístup sa používa väčšinou v kombinácii s monofyletickým konceptom druhu (Johansen & Casamatta, 2005), pričom v súčasnosti je stále častejšie založený na fylogénéze 16S rRNA ako na fylogénéze celého genómu. To sa pravdepodobne čoskoro zmení so zvyšujúcou sa dostupnosťou sekvenovania celého genómu. Sekvenovanie celého genómu a fylogenomická analýza poskytujú kľúčové informácie o evolučnej histórii a vzťahoch organizmov, avšak význam dobre zostavenej morfológickej charakterizácie by sa nemal podceňovať (Dvořák et al., 2023). Sekvenovanie celého genómu sa postupne stáva novým štandardom v popise druhov siníc (Jahodářová et al., 2022; Skoupý et al., 2022; Brown et al., 2021), ktorý poskytuje omnoho podrobnejší popis genetickej vzdialenosti.

3.1 Morfológická evolúcia v taxonómii siníc

Sinice sú tradične klasifikované na základe spomínaných morfológických znakov, avšak výskumy preukázali množstvo kryptickej diverzity doloženej molekulárnymi analýzami, najmä sekvencia génu 16S rRNA. Prieskum zriedkavo vzorkovaných biotopov ako je tropické prostredie, aerofytické biotopy či pôdne kôry odhalili novú diverzitu taxónov (Dvořák et al., 2017).

Taxonómia siníc je veľmi komplikovaná a stále málo preskúmaná (Dvořák et al., 2015). Sinice vykazujú pomerne vysoký stupeň morfológických znakov v porovnaní s inými prokaryotickými organizmami. Častokrát dochádza ku vzniku neprirodzených zmien morfológických znakov, a to najmä príčinou nepresnej analýzy jednotlivých kmeňov alebo v dôsledku toho, že sú kmene uložené v zbierkach po veľmi dlhú dobu (Dvořák et al., 2017). Ďalším problémom je rozsiahla diverzita siníc. Vysoká

prispôsobivosť zapríčiňuje neustály vývoj nových morfortypov a ekotypov. Novo vzniknuté morfortypy a ekotypy sú však nemenné iba do doby, pokiaľ dôjde v okolitom prostredí k zmenám podmienok (Komárek et al., 2006).

3.2 Polyfázický prístup

Najprogresívnejší systém využíva polyfázický prístup, ktorý zahŕňa kombináciu morfológických, ekologických a molekulárnych znakov. Fenetický druhový koncept, ktorý sa spolieha výhradne na morfológickú podobnosť neberie do úvahy genomickú diverzitu, ktorá je omnoho väčšia (Johansen & Casamatta, 2005).

Zavedenie a kombinácia moderných molekulárnych, cytomorfológických a ekologických metód v taxonómii cyanobaktérií je nevyhnutná, a mala by byť akceptovaná ako jediná metóda na vypracovanie ich systematiky. Kombinácia rôznych metód by mala byť založená na molekulárnom sekvenovaní, ako základnom prístupe, ku ktorému je potrebné pridať ďalšie kritériá (morfológické, ekologické) pokiaľ sú dostupné a sú v populáciách siníc odlišné a rozpoznateľné. Aplikácia tohto polyfázického a teda kombinovaného prístupu je považovaná za unikátny, moderný, jednoznačný a plne akceptovaný metodický postup, ktorý však zatiaľ nie je bežne používaný a ani možný pre všetky známe populácie siníc (Komárek, 2016).

S využívaním polyfázického prístupu by sa v budúcnosti mohli priniesť pozitívne výsledky, a teda lepšie objasnenie diverzity a evolúcie siníc (Komárek, 2018). Hlavnou príčinou vzniknutých nejasností sú predovšetkým odlišné výsledky jednotlivých štúdií, v dôsledku čoho vedci nedošli k spoločnej ceste pri aplikovaní nomenklatúrnych kódov a druhových konceptov (Komárek, 2016).

3.3 Súčasné problémy taxonómie

Aplikácia moderných ekologických, ultraštruktúrálnych a molekulárnych metód podporovaná kultiváciou početných morfortypov siníc podstatne zmenila poznatky o týchto organizmoch (Komárek, 2006).

Druh je tradične považovaný za základnú taxonomickú kategóriu pre všetky organizmy, avšak z hľadiska moderných klasifikačných kritérií je pre sinice problematický. Prostredníctvom druhového poznania možno získať predstavu o variabilite a diverzite v rámci jedného rodu (Komárek, 2003). Najväčší problém taxonómie v súčasnej dobe predstavujú polyfyletické skupiny a kryptické druhy.

Spomínané skupiny vznikajú na základe omnoho väčšej rozmanitosti genetických ako fenotypových znakov. Možno predpokladať, že v každom rode sú prítomné kryptické druhy (Dvořák et al., 2015).

Prostredníctvom analýzy získaných molekulárnych dát sa u niektorých týchto morfológicky odlišných druhov zistilo, že sú si veľmi podobné a preto je potrebné nájsť jednotlivé genetické rozdiely (Komárek et al., 2014).

3.4 Súčasná definícia druhu

Druh predstavuje základnú taxonomickú jednotku všetkých živých organizmov. Pomocou druhového poznania možno získať predstavu o diverzite a variabilite v rámci jedného rodu (Komárek et al., 2003). Prokaryotické organizmy sú z hľadiska druhového vymedzenia komplikované. Bakteriálne druhy nemajú sexuálne rozmnožovanie, a z tohto dôvodu nespĺňajú požiadavky klasického konceptu druhov, ktorý sa používa pre eukaryotické organizmy. Na základe existencie koherentných evolučných línií, ktoré vznikajú v dôsledku rekombinácie a horizontálneho prenosu génov možno podobný koncept aplikovať u siníc (Dvořák et al., 2015).

Bolo navrhnutých niekoľko druhových konceptov, avšak vedci sa nedokázali zhodnúť na jednom univerzálnom koncepte, ktorý by bol aplikovateľný na sinice (Johansen & Casamatta, 2005). Johansen a Casamatta (2005) vo svojej práci zhrnuli jednotlivé druhové koncepty, pričom vzhľadom na moderné poňatie systematiky zhodnotili jej vhodnosť. V súčasnej dobe sa pôvodne používané fenetické prístupy, ktorých rozhodujúci faktormi sú morfológické a ekologické dáta považujú za chybné (Dvořák et al., 2015; Johansen & Casamatta, 2005).

Vznik jednotlivých druhov cyanobaktérií (špeciácia) je riadený mutáciou, selekciou, tokom génov a v neposlednom rade geografickou a ekologickou izoláciou. Populačná genomika sa používa na vyjadrenie variácií genómu v rámci jednej alebo viacerých populácií. V užšom slova zmysle sa populačná genomika zameriava na základné faktory genetickej diverzity medzi jednotlivcami populácie, a sleduje príspevok takejto variability v procese špeciácie (Dvořák et al., 2023).

Fylogenetické koncepty považujú druhy za nezávislé línie s vlastnou evolučnou históriou (Johansen & Casamatta, 2005). Koncept apomorfných druhov, ktorý sa tiež označuje ako monofyletický, bol odvodený z fylogenetického konceptu. Druhy sú

vymedzené ako najmenšie monofyletické skupiny, ktoré sú definované jedinečnými apomorfiami. Monofyletický koncept možno aplikovať na nepohlavne sa rozmnožujúce organizmy a zdá sa byť pre sinice najpriateľnejší. V rámci tohto konceptu však nemožno určiť, ktoré znaky sú odvodenejšie a preto je jeho použitie ťažšie (Dvořák et al., 2015; Johansen & Casamatta, 2005).

4 *Microcoleus* sp.

Rod *Microcoleus* Desmazières ex Gomont patrí do radu *Oscillatoriales*. Rad *Oscillatoriales* typicky zahŕňa vláknité sinice s komplikovanejšou morfológiou. Na základe moderných kritérií je rod *Microcoleus* klasifikovaný v rámci čeľade *Microcoleaceae*, jednej z najväčších čeľadí tohto radu (Komárek et al., 2014). *Microcoleus vaginatus*, ktorý je zároveň typovým druhom rodu, je výrazne rozšírený. Tento druh sa vo významnom počte vyskytuje predovšetkým v pôdnych krustách. Typickým znakom sú vysoko pohyblivé zužujúce sa trichómy, cylindrické bunky a prítomnosť kalyptry. Dominantnou charakteristikou je tiež výskyt niekoľkých trichómov v spoločnej pošve, kultúry však tento znak veľakrát postrádajú (Boyer et al., 2002).

4.1 Taxonomická história rodu *Microcoleus*

Rod *Microcoleus* prvýkrát klasifikoval a popísal Desmazières v roku 1823, pričom ako typový druh bol pôvodne určený *Microcoleus terrestris*. Klasifikáciu a popis v roku 1892 upravil Gomont a následne na jeho schému naviazali aj ostatní. Rok 1962 sa považuje za významný medzník z hľadiska radikálnych zmien v systéme, ktoré previedol Drouet. Drouetova domnienka o existencii obmedzeného počtu genotypov, ktoré vytvára v závislosti na rôznych ekologických podmienkach širokej morfolologickej variácie, viedla k významnému zníženiu celkového počtu druhov siníc z 1300 na 64. Mnohé druhy, ktoré boli pôvodne popísané Gomontom v rámci niekoľko rodov patriacich do čeľade *Oscillatoriales*, definoval Drouet ako prirodzene sa vyskytujúce variácie jediného druhu a to *Microcoleus vaginatus* (Drouet, 1962).

Napriek rozsiahlej rozmanitosti baktérií a ich významu pre základné fungovanie suchozemských ekosystémov, ich distribučné vzorce stále nie sú úplne známe. Na vyplnenie medzery a ďalšie pochopenie biogeografických vzorcov baktérií došlo ku skúmaniu fylogeografickej štruktúry a základných faktorov diverzifikácie medzi populáciami sinice *Microcoleus* spp. Fylogenetická história bola rekonštruovaná pomocou génov 16S rRNA a 16S–23S interný transkribovaný spacer (ITS) z 495 *Microcoleus* spp. izolátu. Na vyhodnotenie boli uskutočnené fylogenetické signálne testy s cieľom posúdiť vplyv klimatických preferencií na diverzifikáciu izolátov *Microcoleus* spp. Distribúcia a fylogenetická diverzifikácia *Microcoleus* je poháňaná izoláciou podľa

vzdialenosti a prostredia, čo vedie k najmenej 13 rozdielnym líniam, ktoré by mohli predstavovať nové druhy siníc (Stanojković et al., 2022).

V dvoch samostatných štúdiách výskumníci určili, že kmene *Microcoleus* spadajú najmenej do dvoch kladov na základe analýz sekvencie génu 16S rRNA. Boyer a kolektív (2002) priradili jeden klad k *M. vaginatus* a ďalší klad k *M. steenstrupii* Boye–Petersen. Tieto dva klady boli ľahko rozlíšiteľné vo svetelnom mikroskope na základe niekoľkých znakov, a to predovšetkým type bunkového delenia, relatívnej dĺžky bunky, pohyblivosti či prítomnosti alebo neprítomnosti kalyptry. Na základe tejto štúdie bolo zrejmé, že *M. vaginatus* patril do *Oscillatoriaceae*, zatiaľ čo *M. steenstrupii* a *M. chthonoplastes* patrili do *Phormidiaceae*. Pomocou týchto skutočností odporučili revíziu rodu *Microcoleus* podľa molekulárnej a morfolologickej analýzy viacerých taxónov v rámci týchto kladov (Siegesmund et al., 2008).

Hlavné diakritické znaky definujúce *Microcoleus* súvisia najmä s cytomorfológiou trichómov. Medzi tieto znaky patria zúžené konce trichómov, kalyptra, bunky kratšie ako širšie viac–menej izodiametrické a v neposlednom rade fakultatívna prítomnosť pošvy. Prítomnosť viacerých trichómov v spoločnej pošve je často vyskytujúca sa, avšak nie u všetkých druhov. S využitím morfologických a molekulárnych metód revidoval Strunecký a kolektív (2013) *Microcoleus vaginatus* a *Phormidium autumnale*. Hlavným výsledkom výskumu je prevedenie *Phormidia autumnale* do *Microcoleus sensu stricto*. (Strunecký et al., 2013).

Typovým druhom pre *Microcoleus* je *M. vaginatus* a tento taxón sa zaraďuje do *Oscillatoriaceae*. V dôsledku toho musia byť jednotlivé taxóny oddelené do samostatných rodov, a preto bol navrhnutý nový rod *Coleofasciculus*, ktorý obsahuje súčasné morské taxóny patriace do rodu *Microcoleus*. Typový druh *Coleofasciculus* je dobre preštudovaný a rozšírený druh, označovaný ako *Microcoleus chthonoplastes*. Typickým znakom *Coleofasciculus* je výskyt niekoľkých trichómov v jednej nelamelárnej pošve. Trichómy sa zvyčajne na konci nezužujú, sú zaoblené a nemajú kalyptru. Litorál brakických či morských vôd predstavuje typické ekologické stanovište pre *Coleofasciculus* (Siegesmund et al., 2008).

Celkovo je popísaných 30 druhov, no iba 7 z nich vykazuje priamu príbuznosť k *Microcoleus vaginatus*. Do tejto skupiny môžeme zaradiť *M. amplus*, *M. baicalensis*, *M. acremannii*, *M. rushforthii*, *M. subandinus*, *M. terrestris* a *M. antarcticus*. Ostatné

druhy nemajú prítomnú kalyptru, ich koncové bunky sú dlhšie ako širšie a majú zúžené križové steny. Je známych aj niekoľko odlišných druhov od oboch morfológických typov. Z hľadiska ustanovenia *Microcoleus vaginatus* za typový druh, zvyšné nepríbuzné druhy musia byť premiestnené do už popísaných alebo iných rodov (Strunecký et al., 2013).

4.2 Taxonomické zaradenie rodu *Microcoleus*

Niektorí výskumníci zastávajú konzervatívny prístup a odporúčajú, aby bolo uznaných niekoľko druhov, zatiaľ čo iní sa podieľajú na aktívnom opise nových taxónov najmä na základe malých rozdielov v morfológii a ekofyziológii (Boyer et al., 2002). Druhy, ktoré sú v súčasnosti klasifikované v rámci rodu *Microcoleus* spadajú do dvoch odlišných kladov vo fylogénéze 16S rRNA, pričom jeden obsahuje taxóny v rámci *Oscillatoriaceae* a druhý obsahuje taxóny v rámci *Phormidiaceae* (Siegesmund et al., 2008). Rod *Microcoleus* patrí do polyfyletického radu *Oscillatoriales*.

Medzi základné charakteristiky rodu *Microcoleus* možno zaradiť vláknité taxóny s úzkymi trichómami, parietálnymi alebo nepravidelne usporiadanými thylakoidmi. Najdôležitejším znakom sú vlákna, ktoré sú usporiadané do zväzkov. Do tohto radu aktuálne patrí aj jeden kokoidný rod *Cyanothece*, ktorý predstavuje určitý medzistupeň od *Chroococcales* (Komárek et al., 2014).

Čeľaď *Microcoleaceae* predstavuje najväčšiu podskupinu radu *Oscillatoriales*. Podľa moderných kritérií je mnoho obsiahnutých rodov definovaných ako monofyletické skupiny. Niektoré skupiny túto charakteristiku postrádajú a na základe dostupných dát boli definované ako polyfyletické skupiny. Do tejto kategórie patrí napríklad rod *Geitlerinema* (Strunecký et al., 2023) a tradičný rod *Phormidium* (Komárek & Anagnostidis, 2005). Do čeľade *Microcoleaceae* patrí veľký počet sladkovodných, morských, bentických, pelagických, perifytických aj pôdnych siníc (Strunecký et al., 2013; Komárek et al., 2014).

4.4 Ekológia rodu *Microcoleus*

Sinice sú mimoriadne ekologicky úspešné organizmy. Počas dlhého obdobia svojho vývoja si vyvinuli schopnosť prežiť v niektorých z najextrémnejších biotopov (Dvořák et al., 2017). Zhluky autotrófnych mikroorganizmov (riasy, sinice) na dne sedimentu stojatých a tečúcich vôd sa označujú ako epipelon. Tieto mikroorganizmy vykonávajú celú radu funkcií v ekosystéme, vrátane biostabilizácie sedimentu, regulácie bento–

pelagického kolobehu živín a primárnej produkcie (Pouličková et al., 2008a). Distribúcia jednotlivých druhov je pravdepodobne ovplyvnená mnohými enviromentálnymi faktormi, ako je teplota, koncentrácia kyslíka, štruktúra sedimentu či chemické zloženie (Hašler et al., 2008).

Spočiatku *Microcoleus vaginatus* vykazoval špecifickú ekológiu iba v rámci pôdneho spoločenstva. Neskôr však bola ekológia rozšírená o extrémne stanovištia v podobe horúcich a studených púští, kde zohráva dôležitú úlohu pri biogeochemickom cykle a stabilizácii piesčitej pôdy svojimi polysacharidmi. V súčasnej dobe sa považuje za kozmopolitný druh, ktorý sa vyskytuje predovšetkým v bentických a subaerofytických lokalitách (Stanojković et al., 2022).

Microcoleus vaginatus predstavuje nedávno vyvinutý druh, ktorý prešiel podstatnými evolučnými zmenami. Biogeografia, ktorá bola počas posledných dvoch desaťročí intenzívne študovaná, je jedným z rozhodujúcich faktorov potrebných pre pochopenie ekologických, evolučných a diverzných vzorcov prokaryot. *Microcoleus vaginatus* sa javí ako vhodný modelový organizmus pre hodnotenie biogeografie, a to vďaka celosvetovému rozšíreniu, ako aj relatívne ľahkej identifikácii, izolácii a kultivácii. *M. vaginatus* je dôležitým primárnym producentom v pôdnych krustách a iných subaerofytických prostrediach po celom svete (Dvořák et al., 2012).

Dvořák et al. (2012) sa venovali štúdiu globálneho rozšírenia druhu *Microcoleus vaginatus* v zmysle priestorovej a časovej charakterizácie. Tento výskum slúžil na overenie a nájdenie priestorovej a evolučnej bariéry v kontinentálnej mierke medzi Európou, Severnou Amerikou a Áziou. Molekulárne výsledky viditeľne rozlíšili kmene pochádzajúce z Európy od kmeňov, ktoré sa vyskytujú v Amerike a v Ázii. Geografická izolácia (alopatia) sa považuje za veľmi dôležitý faktor, avšak nie za rozhodujúci (Dvořák et al., 2012).

5 Pôdne sinice

Druhová bohatosť je v pôde výrazne nižšia ako vo vode (Round, 1981), no aj cez to Ettl & Gärtner (1995) uvádzajú z pôdy okolo 1000 druhov eukaryotických rias.

Sinice sa vyznačujú schopnosťou prežívať na pokraji vyhynutia či prežitia. Na základe svojich vyvinutých stratégií sú schopné kolonizovať nehostinné stanovištia. Sinice dokážu prostredníctvom stratégií splynúť s prostredím, využívať ho vo svoj prospech či dokonca zmeniť jeho vlastnosti. Pomocou slizovej pošvy sa vedľa ľahko prichytiť k povrchu hornín a taktiež vedľa ovplyvniť pórovitosť pôdy pre lepšie hospodárenie s vodou (Wynn–Williams, 2000).

Úspešná inokulačná procedúra využívajúca cyanobaktérie môže viesť k rozvoju biologických pôdných kôr alebo „biokrust“, čo predstavuje zoskupenie pôdných častíc s baktériami, mikroriasami, mikrohubami, lišajníkmi či machorastami v rôznych pomeroch. Biokrusty sú rozšírené zložky v suchých oblastiach, ktoré pokrývajú 40 až 100% priestorov a poskytujú kľúčové ekosystémové služby v týchto prostrediach (Maestre et al., 2011) a to najmä tým, že ovplyvňujú hydrologické procesy a dostupnosť pôdnej vody (Colica et al., 2014; Chamizo et al., 2016), stabilitu pôdy (Rodríguez–Caballero et al., 2012) a kolobeh živín (Delgado–Baquerizo et al., 2013). Vlákna siníc a ich extracelulárne sekrety, ktoré sú väčšinou zložené z exopolysacharidov (EPS) pôsobia ako lepiace činidlá, viažu pôdne častice a podporujú tvorbu pôdných agregátov, čím zvyšujú stabilitu pôdy (Mazor et al., 1996).

Sinice fixujú CO₂ a niektoré druhy sú tiež schopné fixovať N₂ a zároveň uvoľňujú do pôdy širokú škálu látok, vrátane fytohormónov, vitamínov a fosforu (Priya et al., 2015). Zvyšujú úrodnosť pôdy v suchých oblastiach (Zhao et al., 2010), kde je dusík spoločne s vodou hlavným limitujúcim faktorom pre fungovanie ekosystému (Noy–Meir, 1973). Sinice poskytujú priaznivé mikrobiotopy pre pôdnu biotu (Liu et al., 2011). Vďaka svojim vlastnostiam a vysokej rozšírenosti v každom prostredí na Zemi môžu byť právom označované za potenciálne nástroje pre obnovu pôdy v suchých oblastiach (Rossi et al., 2017).

6 Toxíny

Mnohé sinice majú potenciál produkovať rôzne sekundárne metabolity s toxigénnou aktivitou (cyanotoxíny), ktoré spôsobujú veľké ekologické a zdravotné problémy na celom svete (Bláha et al., 2009).

Cyanotoxíny zahŕňajú veľmi silné toxíny, ktoré pri podaní akútnej dávky spôsobujú smrť do niekoľkých minút (neurotoxíny) alebo do niekoľkých hodín (hepatotoxíny). Väčšina cyanotoxínov pochádza z planktónnych cyanobaktérií, ktoré sa vyskytujú v sladkej a brakickej vode. Toxické kmene cyanobaktérií však boli izolované aj z bentických či riečnych prostredí a zriedkavo i zo suchozemských biotopov (Sivonen & Jones, 1999). Medzi cyanotoxíny patria cyklické peptidy a alkaloidy. Medzi cyklické peptidy sa zaraďujú mikrocystíny a nodularíny, zatiaľ čo medzi alkaloidy patria anatoxín-a, cylindrospermopsín či saxitocín. Na determináciu cyanotoxínov sa využívajú biologické a chemické metódy (Apeldoorn et al., 2007).

Nadmerné premnoženie cyanobaktérií sa celosvetovo zvýšilo najmä v dôsledku klimatických zmien a eutrofizácie, čo spôsobuje rôzne nepríjemnosti až úhyny živočíchov. Škodlivé rozširovanie siníc a rias má potenciálne dôležité ekonomické a ekologické dôsledky, a ich výskyt je čoraz viac dokumentovaný na celosvetovej úrovni. Eutrofizácia pobrežných vôd, ku ktorej dochádza na celom svete sa považuje za príčinný prvok zvyšujúceho sa výskytu škodlivých rias a siníc. Zvýšené hladiny živín sú spôsobené rôznymi antropogénnymi príčinami, vrátane odpadových vôd, poľnohospodárskych odpadov či vypúšťania priemyselných odpadov. So zvýšenou hladinou živín je často spojený zvýšený rast rias, vrátane cyanobaktérií (Stielow, 2003).

Jav eutrofizácie sa zvyčajne vyskytuje v biotopoch so zvýšeným obsahom živín, predovšetkým dusíka a fosforu. Vodné kvety vytvorené sinicami silne ovplyvňujú vodné prostredie, čo vedie k anoxii, produkcii toxínov či zmene pH (Oliver & George, 2000). Ovplyvňujú produkciu pitnej vody, rekreačné využívanie vodných nádrží a v neposlednom rade majú negatívny vplyv na zdravie ľudí a zvierat (Rastogi et al., 2015; Dodds et al., 2008).

Bentické druhy z rodu *Microcoleus* sú výrazne rozšírené a tvoria rozsiahle porasty v sladkovodných ekosystémoch, ktoré niekedy vykazujú toxicitu v dôsledku produkcie silných neurotoxínov (anatoxínov) (Tee et al., 2021). Proliferácia potenciálne toxických druhov *Microcoleus*, ktoré vytvárajú nárasty sa zvyšuje v prúdiacich tokoch po celom

svete. *Microcoleus* produkuje celý rad cyanotoxínov, pričom najčastejšie sa uvádzajú neurotoxické anatoxíny (anatoxín-a, dihydro-anatoxín-a, homoanatoxín-a, a dihydro-homoanatoxín-a). Predpokladá sa, že anatoxíny sú z veľkej časti obsiahnuté v bunkách. Na lepšie posúdenie zdravotných rizík pre ľudí, zvieratá a vodné organizmy sú potrebné ďalšie poznatky (Wood et al., 2018).

U mnohých z nárastov bola zaznamenaná produkcia silných neurotoxických anatoxínov, ktoré spôsobujú smrť zvierat príčinou udusenía (Puddick et al., 2021; Tee et al., 2021). Toxické kmene boli určené ako *Phormidium autumnale*, ktorý sa považuje za synonymum *Microcolea* (Heath et al., 2010; Wood et al., 2010, 2018; Puddick et al., 2021). V morskom prostredí sa zistilo, že *Phormidium corallytum* spôsobuje ochorenie čiernych pruhov Antlantických útesových korálov (Mitsui et al., 1987). Uvádza sa, že *Phormidium persicinum* produkuje neidentifikované zlúčeniny toxické pre žiabronôžky (Lincoln et al., 1991). Relatívne vysoké koncentrácie anatoxínov v bentických nárastoch s dominanciou *Microcoleus* korelovali najmä s množstvom genotypov produkujúcich toxíny (Wood & Puddick, 2017), ktoré sa môžu vyskytovať spoločne s netoxickými „kmeňmi“ rovnakého rodu (Wood et al., 2012).

Tee et al. (2021) objavili výrazné metabolické a genomické rozdiely medzi toxickými a netoxickými kmeňmi *Microcoleus*. Hlavný rozdiel medzi týmito kmeňmi je najmä v schopnosti prijímania a ukladania dusíka. Toxické kmene sú lepšie prispôsobené na zisk dusíka a sú schopné proliferovať v prostredí, kde sa vyskytujú jeho väčšie koncentrácie. Netoxické kmene jednoduchšie odolávajú kolísajúcim koncentráciám dusíka v prostredí, pretože obsahujú dodatočný génový uhlík. Zbytkový uhlík sa podieľa na metabolizme cyanoficynu, ktorý má úlohu dočasného úložiska uhlíka a dusíka (Tee et al., 2021; Valadez-Cano et al., 2023).

Netoxické kmene sú lepšie prispôsobené na podmienky prostredia, ktoré sa neustále menia. Táto prispôsobivosť je daná prostredníctvom znásobeného počtu transpozómov, a vďaka nej majú výraznejšie konkurenčné výhody, založené na dostupnosti živín. Netoxické kmene sú zdrojom thiamínov a sacharózy, na ktorých sú toxické kmene závislé. Toxické kmene poskytujú netoxickým kmeňom ochranu, najmä vďaka svojim toxínom a chránia ich predovšetkým pred oxidačným stresom, predáciou či nedostatkom živín (Tee et al., 2021).

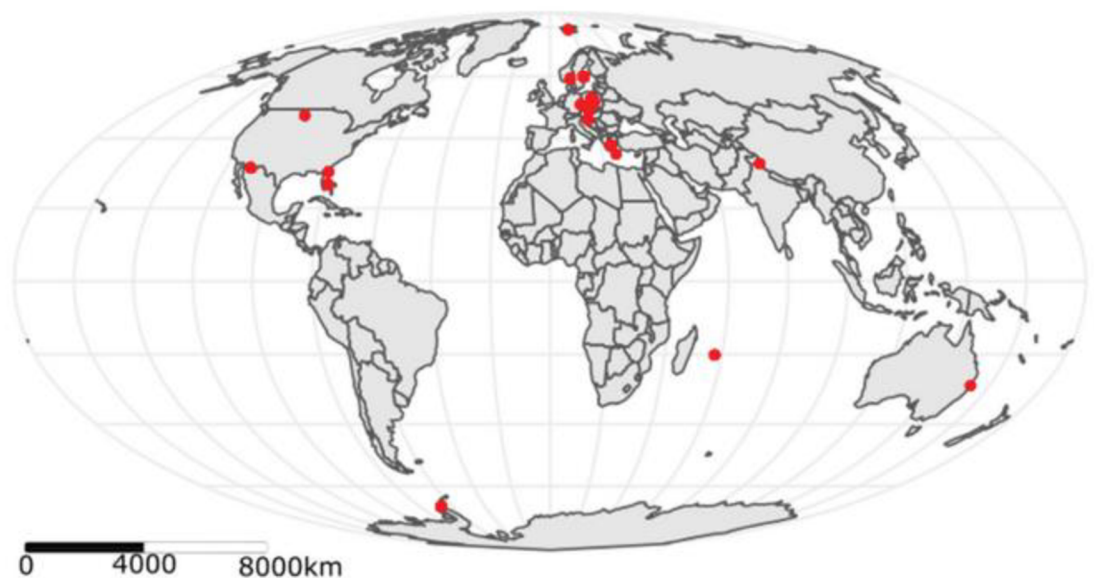
Významným faktorom, ktorý bráni pokroku v poznatkoch o ekologickej funkcii anatoxínov a schopnosti predpovedať ich množstvo vo vzorkách s dominanciou *Microcolea*, je koexistencia viacerých kmeňov s rôznou kvótou anatoxínov (koncentrácia anatoxínu na bunku) (Heath et al., 2010; Wood et al., 2012). Koexistencia toxických a netoxických kmeňov naznačuje, že výhody produkcie anatoxínov nie vždy prevažujú nad nákladmi, spojenými s produkciou anatoxínov. Zlepšenie vedomostí o podmienkach, ktoré uprednostňujú toxické kmene *Microcoleus* má potenciál predpovede, kedy je väčšia pravdepodobnosť, že proliferácie budú toxické. Výskum v tejto oblasti bol obmedzený nedostatkom nástrojov na kvantifikáciu toxických a netoxických genotypov *Microcolea* vo vzorkách životného prostredia (Rantala–Ylinen et al., 2011).

7 Materiál a metodika

7.1 Materiál a lokalita

Diplomová práca pozostávala z výskumu jednotlivých kmeňov *Microcoleus spp.* Sinica rodu *Microcoleus spp.* je kozmopolitne rozšírená, pričom jednotlivé populácie sú ovplyvnené priamo prostredím, v ktorom sa nachádzajú (Stanojković et al., 2022). Vzorky použité pre výskumnú časť sú súčasťou zbierky klonálnych kultúr. Zbierka započala v roku 2019 a nachádza sa na Katedre botaniky Univerzity Palackého v Olomouci (Stanojković et al., 2022). Obsahuje dokopy 495 kmeňov *Microcoleus spp.* (Stanojković et al., 2022), na ďalší výskum a taxonomickú revíziu bolo vybratých 200 z nich, pričom v diplomovej práci sa skúmalo 35 kmeňov. Najpravdepodobnejšie pochádza *Microcoleus spp.* (Stanojković et al., 2022) z pôd Európy, avšak neskôr sa rozšíril na všetky kontinenty a rôzne typy stanovišť.

Rozšírenie a lokality jednotlivých vzoriek zobrazuje mapa na priloženom obrázku:



Obrázok 1 Mapa znázorňujúca odberové miesta pre *Microcoleus spp.* (Mollweideova projekcia)

zdroj: Stanojković et al., 2022

V nasledujúcej tabuľke sa nachádza súhrn jednotlivých použitých kmeňov a ich charakteristiky (zemepisná dĺžka, zemepisná šírka, pôvod Zeme a lokalita).

Tabuľka 1 Súhrn použitých kmeňov, geografické údaje a lokalita

Kmeň	Zemepisná dĺžka	Zemepisná šírka	Zem	Lokalita
3-18a C4	17,281988	49,57459	Česká republika	kaluž
A2 C2	-67,13342	-67,49444	Antarktída	machová vegetácia
A2 C3	-67,13342	-67,49444	Antarktída	machová vegetácia
A2 D2	-67,13342	-67,49444	Antarktída	machová vegetácia
AT3 A2	23,747791	37,93935	Grécko	pôda
AT3 D2	23,747791	37,93935	Grécko	pôda
AT9 A2	23,72647	37,93584	Grécko	pôda
AT9b C5	23,72647	37,93584	Grécko	pôda
B3 C5	16,88512	48,67499	Rakúsko	kaluž
F6 C1	-81,506194	30,26645	USA	pôda
F8 C4	-80,06007	26,69013	USA	pôda
F8 C5	-80,06007	26,69013	USA	pôda
LAD1 D1	78,26165	32,59576	India	pôda
M2 A5	57,507761	-2015665	Maurícius	kaluž
M2 B5	57,507761	-2015665	Maurícius	kaluž
M2 C2	57,507761	-2015665	Maurícius	kaluž
MON2 D5	-104,6913	47,07719	USA	pôda
N9 B2	10,401542	59,26936	Nórsko	kaluž
N9 B4	10,401542	59,26936	Nórsko	kaluž
POL1 C1	18,637382	52,5057	Poľsko	pôda
POL7 B2	19,544062	52,421664	Poľsko	pôda
POL8 C2	19,622162	52,45965	Poľsko	pôda
POL8 C6	19,622162	52,45965	Poľsko	pôda
POL8 D1	19,622162	52,45965	Poľsko	pôda
POL8 D6	19,622162	52,45965	Poľsko	pôda
POL 10 D4	19,672946	52,55013	Poľsko	pôda
POL11 C2	19,707491	51,35447	Poľsko	pôda
POL12 A4	19,707491	51,35447	Poľsko	pôda
POL12 A5	19,707491	51,35447	Poľsko	pôda
POL14 C2	19,714972	51,30731	Poľsko	pôda
POL14 C6	19,714972	51,30731	Poľsko	pôda
POL17 C1	19,105952	50,81183	Poľsko	pôda
S13 B4	17,044925	59,893	Švédsko	pôda
S13 C4	17,044925	59,893	Švédsko	pôda
S13 C5	17,044925	59,893	Švédsko	pôda

Vzorky pre diplomovú prácu pochádzajú prevažne zo štátov Európy. Najväčšia časť je zastúpená najmä z Poľska (13 kmeňov), hneď po ňom nasleduje Grécko (4 kmene), Švédsko (3 kmene) a Nórsko (2 kmene). Česká republika a Rakúsko sú zastúpené jedným kmeňom. Vzorky tiež pochádzajú ako z chladnejších častí sveta, konkrétne z Antarktídy (3 kmene), tak z teplejších častí, kde je zastúpený najmä Maurícius (3 kmene). Ďalšie

kmene pochádzajú z USA (4 kmene) a India je zastúpená jedným kmeňom. Väčšina vzoriek bola odobratá najmä z pôdy, kaluže či machovej vegetácie. *Microcoleus spp.* je kozmopolitne rozšíreným druhom nie len v rámci zemepisnej šírky a dĺžky, ale taktiež nadmorskej výšky. Jednotlivé kmene sa vyskytujú v nížinných, horských ale aj prímorských oblastiach.

6.2 Kultivácia vzoriek

Kultivácia vzoriek prebieha v štandardných laboratórnych podmienkach, sú uschované v tekutom Z-médiu pri teplote 22 ± 1 °C, osvetlení $20 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ a pri perióde svetelného režimu 12h svetlo/12h tma.

6.3 Morfológická časť

V morfológickej časti boli jednotlivé vzorky skúmané pomocou svetelného mikroskopu Zeiss Primo Star a v rámci neho bola využitá kamera AxioCamERc6s. V laminárnom boxe (flow-box) bola časť kultivovanej vzorky spoločne so Z-médiom nanosená na podložné sklíčko a prikrytá krycím sklíčkom. Takto pripravený preparát sa po nanosení malej vrstvy imerzného oleja na krycie sklíčko sledoval pri tisícnásobnom zväčšení (1000x).

Z každého sledovaného kmeňa boli pomocou programu AxioVision Rel 4.8. vyhotovené mikrofotografie. V rámci každého preparátu sa vyfotilo 30 mikrofotografií, na ktorých sa zmerala šírka a dĺžka ľubovoľnej bunky vlákna. Medzi základné sledované morfológické znaky môžeme zaradiť farbu vlákna, prítomnosť slizovej pošvy, výskyt kalyptry a tvary terminálnych buniek.

6.4 Genetická časť

Jednotlivé kmene, ktoré boli použité pre výskum v diplomovej práci sú súčasťou veľkej kolektívnej zbierky, uloženej na Katedře botaniky Univerzity Palackého v Olomouci. Genómy týchto kmeňov sú voľne dostupné v GenBank. Popis zberu, kultivácia, extrakcia DNA, PCR amplifikácia génu 16S rRNA a jeho sekvenovanie je popísané v článku Stanojković et al., 2022. Sekvencie boli získané prostredníctvom skráteného postupu metód. PCR amplifikácia génu bola prevedená pomocou kombinácie primerov P1 (5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3') a P2 (5'-GGGAATTTTCCGCAATGGG-3') (Boyer et al., 2002). Objem PCR reakcie bol 20 μl ,

pričom obsahovala 8,5 μl sterilnej vody, 0,5 μl každého primeru (koncentrácia 0,01 mM), 10 μl FastStart PCR master a 0,5 μl templátovej DNA (50 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$).

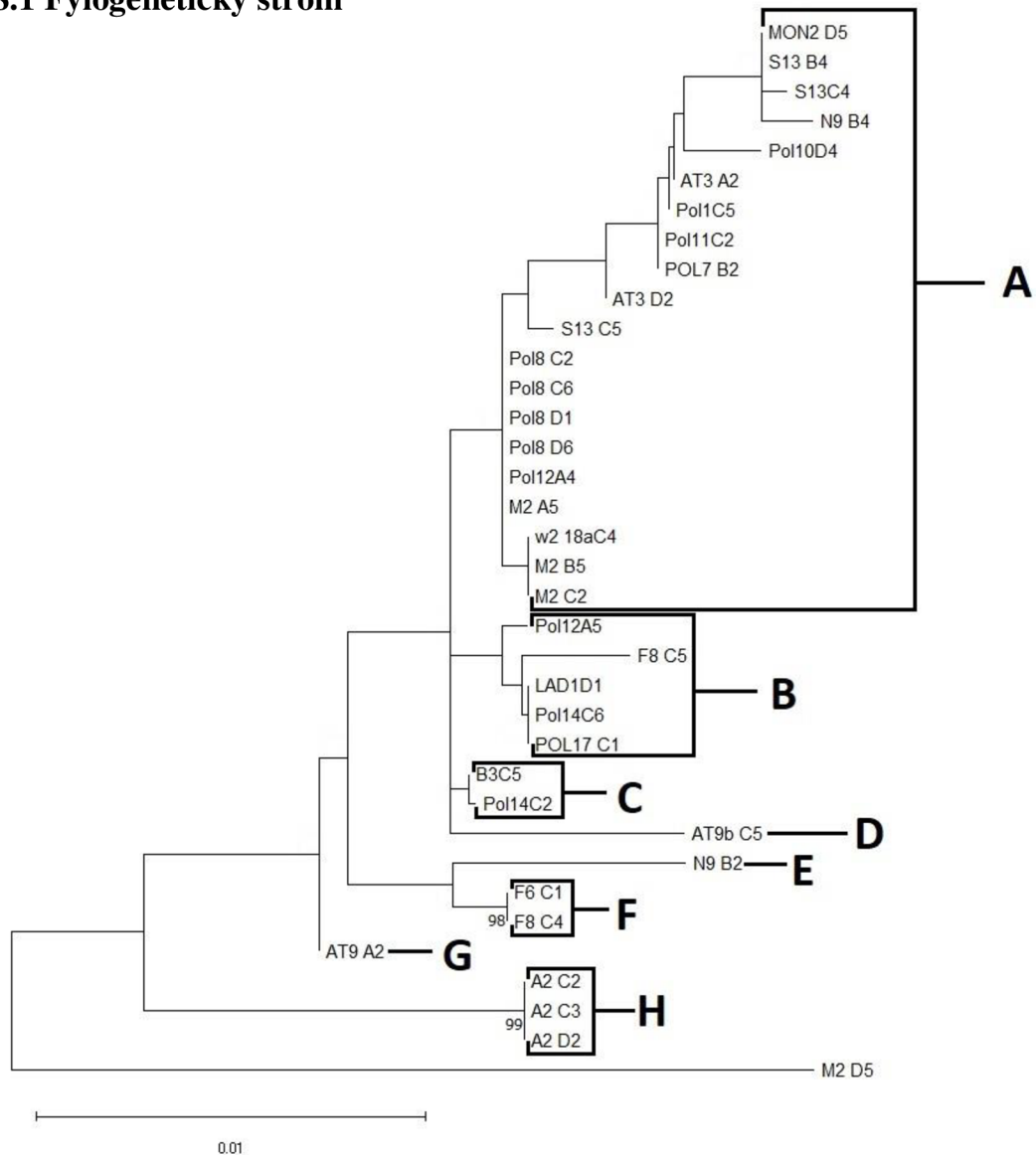
6.5 Fylogenetická časť

Na fylogenetické hodnotenie bol využitý program Mega X (Kumar et al., 2018). Pri hodnotení bolo využitých 35 sekvencií 16S rRNA, vrátane outgrupu, ktorý predstavoval kmeň M2 D5. Pomocou algoritmu Muscle (Edgar, 2004) bol vytvorený multiple sequence alignment a následne bol fylogenetický strom skonštruovaný metódou Maximum likelihood v základnom nastavení s modelom HKY+G+I. Topológia fylogenetického stromu bola testovaná pomocou metódy bootstrap analýzy s počtom 200 replikácií.

Na základe vytvoreného fylogenetického stromu boli zostavené obrazové tabule jednotlivých kmeňov.

8 Výsledky

8.1 Fylogenetický strom



Obrázok 2 Fylogenetický strom získaný pomocou programu MEGA X prostredníctvom metódy Maximum likelihood. Analýza je založená na sekvencii génu 16S rRNA a výsledky sú na základe metódy bootstrapov s počtom 200 replikácií.

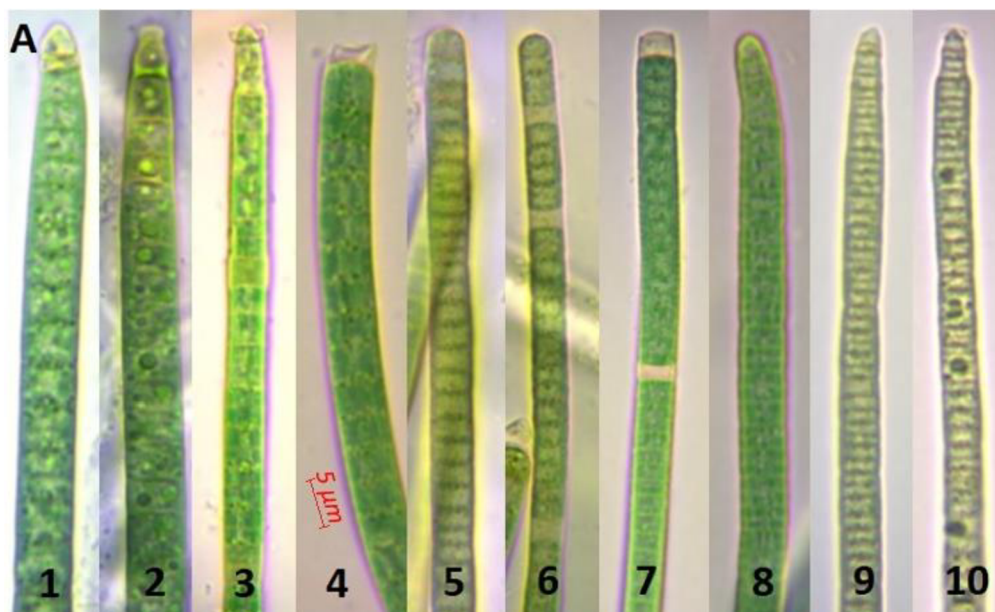
Vo výslednom fylogenetickom strome sa nachádza 35 kmeňov, vrátane outgroupu (kmeň M2 D5 – *Microcoleus vaginatus*), pričom na základe genetickej analýzy génu 16S rRNA sú kmene rozdelené do 8 skupín (označené písmenami A–H). Výsledné skupiny sú definované predovšetkým na základe genetickej podobnosti a taktiež pomocou podobných morfológických znakov. Najpočetnejšia skupina je označená písmenom A a patrí do nej 20 kmeňov. Druhou najväčšou skupinou je skupina B, do ktorej sa zaraďuje 5 kmeňov. Skupina H je zastúpená 3 kmeňmi. Po 2 kmene obsahujú skupiny C

a F. Skupiny, označené písmenami D, E a G sú zastúpené len jedným kmeňom. Takmer všetky skupiny vykazujú nízku bootstrapovú hodnotu, ktorá je menšia ako 70. Len dve skupiny prekračujú túto hodnotu, a to konkrétne skupina F (hodnota 98) a skupina H (hodnota 99).

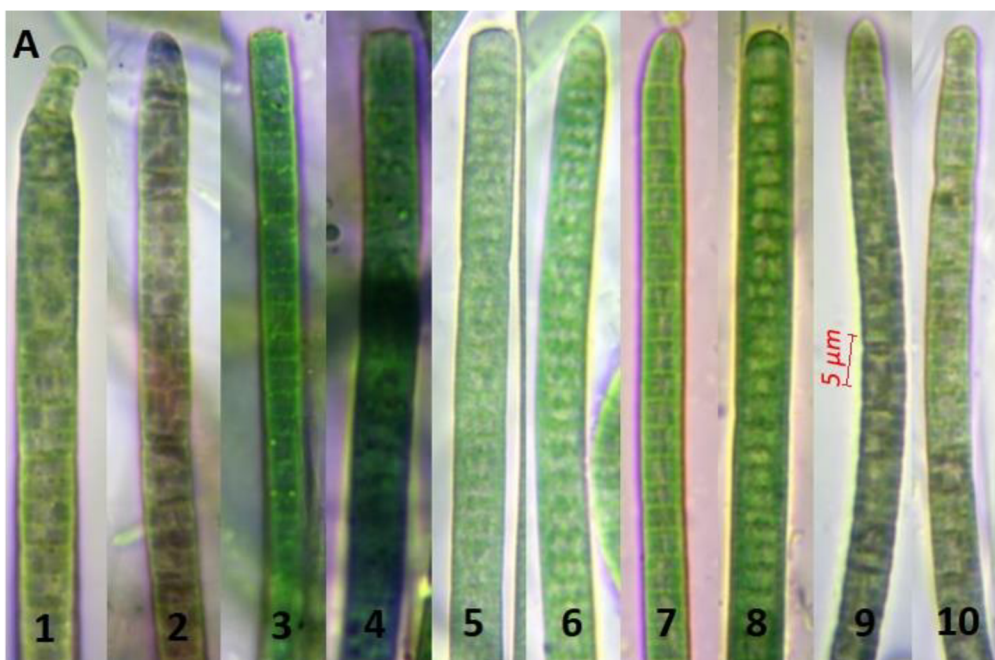
8.2 Morfológické hodnotenie

8.2.1 Skupina A

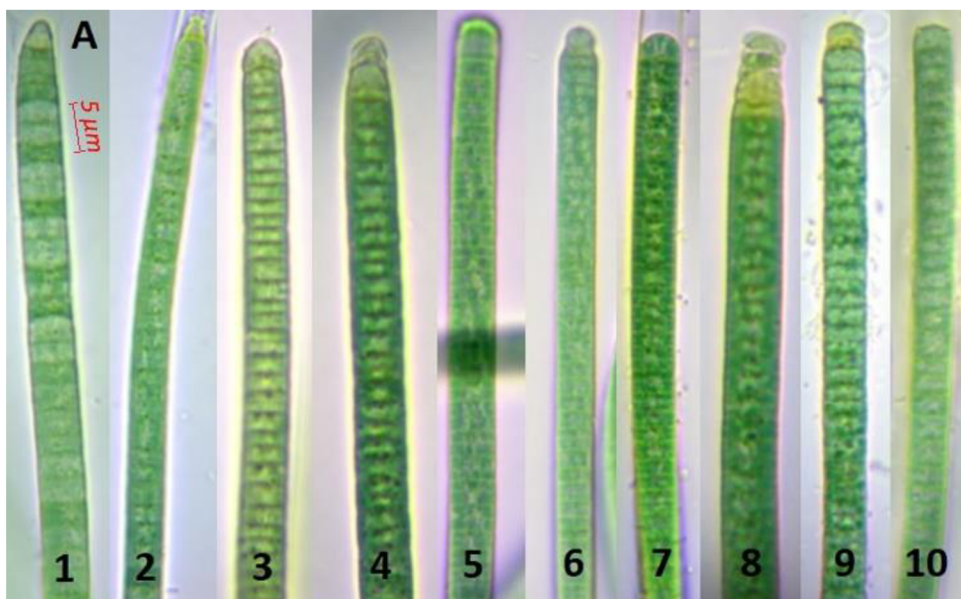
Skupina A (Obrázok 3, 4, 5, 6) je zastúpená najväčším počtom kmeňov. Patrí sem 20 kmeňov: MON 2 D5, S13 B4, S13 C4, N9 B2, Pol10 D4, AT3 A2, Pol1 C5, Pol11 C2, Pol7 B2, AT3 D2, S13 C5, Pol8 C2, Pol8 C6, Pol8 D1, Pol8 D6, Pol12 A4, M2 A5, w2 18aC4, M2 B5, M2 C2. Priemerná šírka bunky u týchto kmeňov sa pohybovala od 5,22 μm do 6,34 μm a priemerná dĺžka bunky od 2,01 μm do 2,91 μm . Žiadny z kmeňov patriacich do skupiny týmto hodnotám výrazne nevybočoval. Najnižšiu priemernú šírku bunky mal kmeň Pol11 C2, naopak najvyššiu mal S13 B4. Najnižšiu priemernú dĺžku bunky vykazoval kmeň Pol8 D6 a najvyššiu Pol8 D1. Ostatné priemerné hodnoty širok a dĺžok sú uvedené v priloženej tabuľke 2 (strana 36). Všetky kmene, patriace do tejto skupiny majú podobné morfológické vlastnosti. Vyznačujú sa tmavším zeleným sfarbením s výnimkou kmeňa Pol10 D4, ktorý je oproti ostatným kmeňom o trochu bledší. Vlákna sú väčšinou rovné, v niektorých prípadoch mierne zahnuté, a na konci sa viditeľne zužujú zvyčajne v rozmedzí 2–4 buniek. U všetkých kmeňov boli prítomné kalyptry, ktoré boli pologuľovité až guľovité. Výskyt kalypťier je počítaný na 50 vlákien, pričom u skupiny A sa ich počet pohyboval v rozmedzí od 10 do 32. Niektoré vlákna sú po stranách mierne zaškrtené, u väčšiny kmeňov boli v bunkách prítomné pozorovateľné graná. U kmeňa S13 C4 a N9 B4 boli vo vlákne vynechané bunky. Slizová pošva a nekrotické bunky boli zaznamenané u všetkých kmeňov.



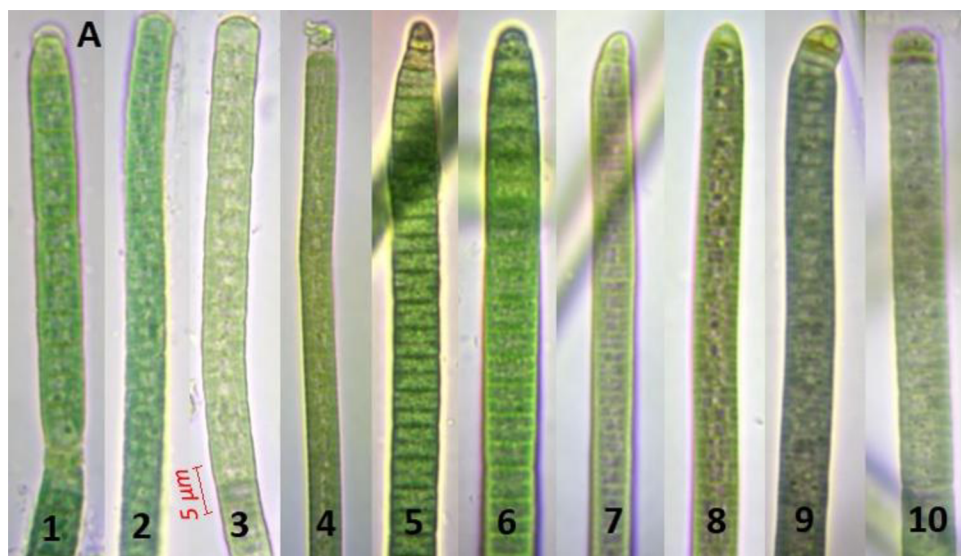
Obrázok 3 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupiny A (prvých 5 kmeňov). Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina A – MON2 D5 (obr. 1,2), S13 B4 (obr. 3,4), S13 C4 (obr. 5,6), N9 B4 (obr. 7,8), Pol10 D4 (obr. 9,10).



Obrázok 4 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupiny A (druhých 5 kmeňov). Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina A – AT3 A2 (obr. 1,2), Pol1 C5 (obr. 3,4), Pol11 C2 (obr. 5,6), Pol7 B2 (obr. 7,8), AT3 D2 (obr. 9,10).



Obrázok 5 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupiny A (tretích 5 kmeňov) Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina A – S13 C5 (obr. 1,2), Pol8 C2 (obr. 3,4), Pol8 C6 (obr. 5,6), Pol8 D1 (obr. 7,8), Pol8 D6 (obr. 9, 10).

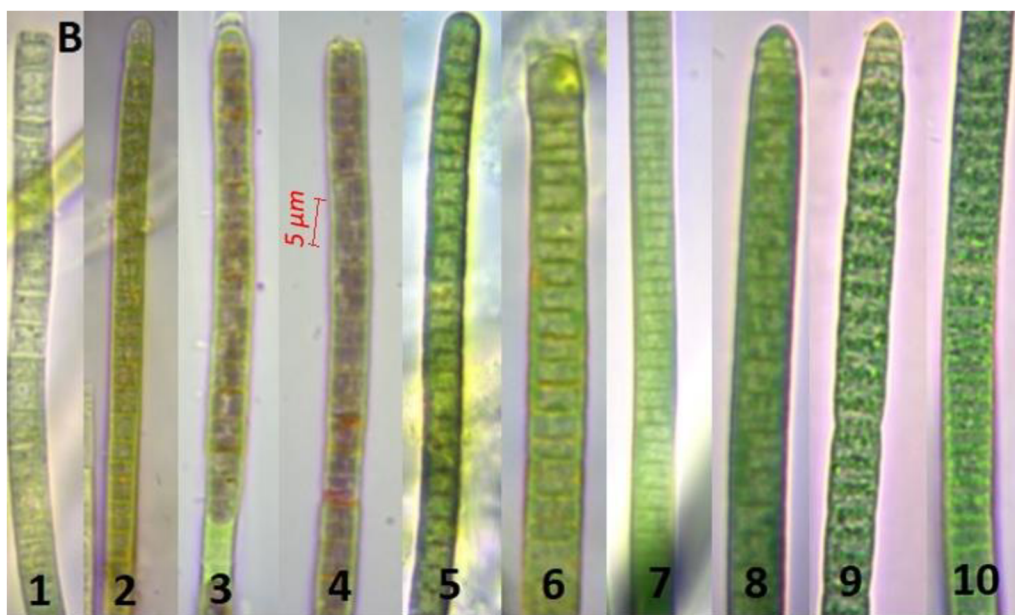


Obrázok 6 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupiny A (posledných 5 kmeňov). Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina A – Pol12 A4 (obr. 1,2), M2 A5 (obr. 3,4), w2 18aC4 (obr. 5,6), M2 B5 (obr. 7,8), M2 C2 (obr. 9,10).

8.2.2 Skupina B

Skupina B (Obrázok 7) je zastúpená 5 kmeňmi: Pol12 A5, F8 C5, LAD1 D1, Pol14 C6, Pol17 C1. Kmene Pol12 A5 a F8 C5 sú mierne sfarbené do červena, ostatné kmene sú výrazne sýtej zelenej farby. U všetkých je prítomná slizová pošva. Kmeň Pol12 A5 mal priemernú šírku bunky 4,92 μm , priemerná dĺžka bunky bola 2,23 μm a rozdiel šírky

a dĺžky sa rovnal 2,69 μm . Boli tu pozorované kalyptry aj nekrotické bunky. U kmeňa F8 C5 bola priemerná šírka bunky 5,11 μm a priemerná dĺžka 2,14 μm . Kalyptry sú väčšinou pologuľovité, vlákna sa na konci postupne zužujú v 1–2 bunkách. Kmeň LAD1 D1 vykazoval priemernú šírku bunky 6,21 μm a priemernú dĺžku 2,11 μm , ich rozdiel predstavoval 4,1 μm . Tento kmeň má zo skupiny výraznejšiu slizovú pošvu a zúženie na konci je nevýrazné alebo veľmi pozvoľné. Kmeň Pol14 C6 mal priemernú šírku bunky 6,31 μm a priemerná dĺžka dosahovala 2,28 μm . Vlákna sú pomerne rovné a v niektorých prípadoch bolo pozorované jemné koncové zahnutie. Apikálne bunky sú zaguľatené. Posledný kmeň Pol17 C1 patriaci do skupiny mal priemernú šírku bunky 6,84 μm a priemernú dĺžku 2,22 μm . Tento kmeň oproti ostatným obsahoval na priečných častiach bunky graná a vlákna boli jemne zaškrtené. Celkové zafarbenie je tmavšej zelenej farby. Kalyptry boli prítomné, rozvoľnené. Zúženie na konci vlákna je nenápadné v rozmedzí 1–2 buniek.



Obrázok 7 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupiny B. Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina B – Pol12 A5 (obr. 1,2), F8 C5 (obr. 3,4), LAD1 D1 (obr. 5,6), Pol14 C6 (obr. 7,8), Pol17 C1 (obr. 9,10).

8.2.3 Skupina C

Skupina C (Obrázok 8) zahŕňa 2 kmene a to B3 C5 a Pol14 C2. Priemerná šírka bunky u kmeňa B3 C5 sa pohybovala v čísle 8,23 μm a priemerná dĺžka 2,67 μm . Tento kmeň vykazoval sýto zelené sfarbenie a po priečných stranách buniek sa vyskytovali pozorovateľné graná. K zúženiu na konci vlákna dochádzalo okolo 3–4 buniek. Jednotlivé vlákna boli pomerne rovnakého tvaru, avšak v troch prípadoch bolo

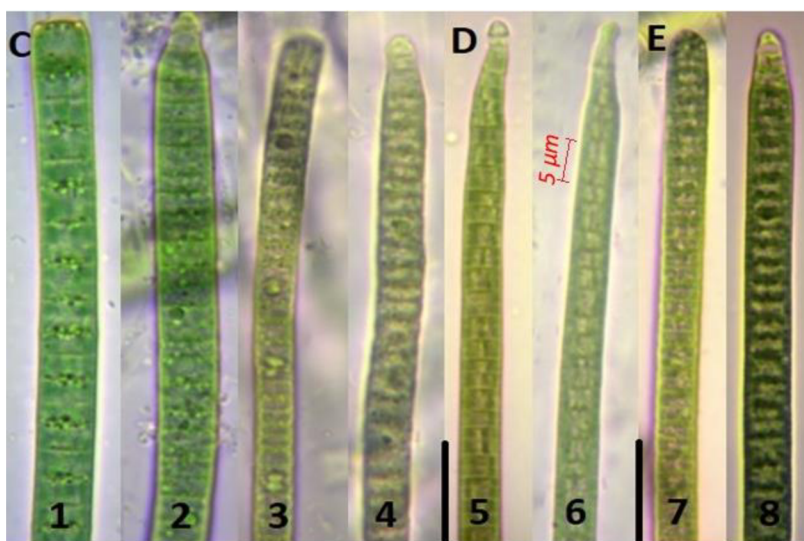
pozorované ich prelomenie. Počet kalyptier sa pohyboval v hornej hranici na 50 vlákien. U tohto kmeňa bola spozorovaná aj prítomnosť dvojitej pošvy (obal v obale). U druhého kmeňa skupiny C bola priemerná šírka bunky 5,61 μm a priemerná dĺžka bunky 2,12 μm . Kmeň Pol14 C2 vykazoval podobné morfológické vlastnosti ako kmeň B3 C5. Nekrotické bunky neboli spozorované.

8.2.4 Skupina D

Do skupiny D (Obrázok 8) je začlenený jeden kmeň AT9b C5. Priemerná šírka bunky je 5,28 μm , priemerná dĺžka bunky je 2,01 μm a ich rozdiel sa rovná 3,27 μm . Počet kalyptier je nadpolovičný, vyskytuje sa aj slizová pošva. Zúženie tohto kmeňa je veľmi výrazné na 4–5 koncových bunkách. Farba je tmavo–zelená až žlto–zelená. Výskyt nekrotických buniek bol pozorovaný minimálne.

8.2.5 Skupina E

Skupina E (Obrázok 8) je taktiež zastúpená len jedným kmeňom a to N9 B2. Vlákna tohto kmeňa sú prevažne rovné a vyznačujú sa olivovo–zeleným sfarbením. Ich šírka bunky je 6,81 μm a dĺžka 2,12 μm , rozdiel medzi šírkou a dĺžkou bunky predstavuje 4,69 μm . Bunky majú granulovitý obsah. Výrazné zúženie na konci vlákna nebolo pozorované, obvykle sa pohybovalo v rozmedzí 2 buniek. Jednotlivé vlákna sú obalené tenkou slizovou pošvou. V niektorých prípadoch chýbala bunka vo vlákne. Kalyptry, ktoré boli pozorované, boli zväčša zaoblené alebo takmer kužeľovité, prítomnosť nekrotických buniek bola taktiež zaznamenaná.



Obrázok 8 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupín C, D a E. Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina C – B3 C5 (obr. 1,2), Pol14 C2 (obr. 3,4); skupina D – AT9b C5 (obr. 5,6); skupina E – N9 B2 (obr. 7,8).

8.2.6 Skupina F

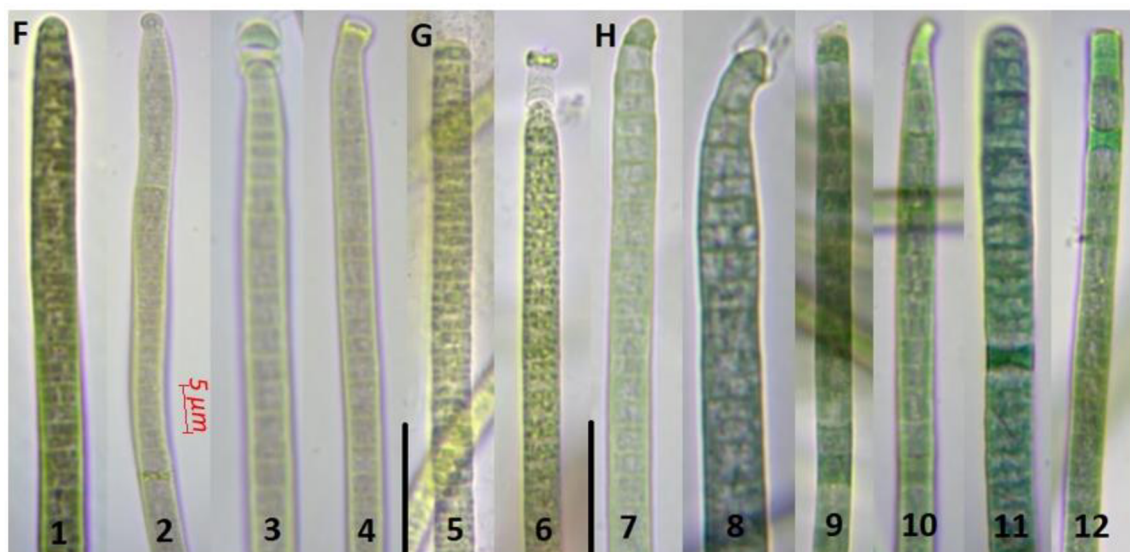
Do skupiny F (Obrázok 9) sa zaraďujú 2 kmene, a to konkrétne F6 C1 a F8 C4. U kmeňa F6 C1 bola nameraná priemerná šírka bunky 5,77 μm a priemerná dĺžka 2,32 μm . U kmeňa F8 C4 bola priemerná šírka bunky 5,33 μm a dĺžka mala hodnotu 2,27 μm . U oboch kmeňov sa vyskytujú kalyptry, pričom ich počet nepresahuje číslo 10. Kmeň F6 C1 sa vyznačuje skôr prítomnosťou pologulovitých kalypťier, zatiaľ čo kmeň F8 C4 má výrazné kalyptry, ktoré sú na prvý pohľad dobre pozorovateľné. Obidva kmene vykazujú jemné sfarbenie do fialova a vyskytujú sa u nich nekrotické bunky. Kmeň F8 C4 sa zároveň vyznačuje prítomnosťou jemnej slizovej pošvy, niektoré vlákna má po stranách výrazne zaškrtené a zúženie na konci vlákna je okolo 4 buniek.

8.2.7 Skupina G

Do skupiny G (obrázok 9) spadá len jeden kmeň a to AT9 A2. U tohto kmeňa bola nameraná priemerná šírka bunky, ktorá činí 6,21 μm a priemerná dĺžka je 3,07 μm . Kalyptra bola vo väčšine prípadov rozvoľnená a jej výskyt bol pomerne častý. Nekrotické bunky u tohto kmeňa neboli spozorované. Vlákna sú prevažne rovné a dominuje u nich tmavozelené sfarbenie. Bunky jednotlivých vlákien sa vyznačujú prítomnosťou grán, ktoré sú veľké a dobre pozorovateľné.

8.2.8 Skupina H

Do skupiny H (obrázok 9) patria 3 kmene, a to A2 C2, A2 C3, A2 D2. Priemerná nameraná šírka bunky u kmeňa A2 C2 bola 5,9 μm a priemerná dĺžka 2,86 μm . V tomto kmeni bolo spozorovaných 8 kalypťier. Nekrotické bunky sa vyskytovali, pričom v niektorých prípadoch boli pomerne výrazné. U kmeňa A2 C3 bola priemerná šírka bunky 5,31 μm a dĺžka bola 2,14 μm . Farba vlákien vykazuje sýto zelenú farbu. Výskyt kalypťier nie je príliš častý, avšak nekrotické bunky dominovali vo viacerých vláknach. Zúženie je výrazné na 2–3 bunkách. Kmeň A2 D2 má priemernú šírku bunky 5,41 μm a priemerná dĺžka predstavuje 2,42 μm . Výskyt nekrotických buniek je častý. Farba kmeňa je výrazne zelená. Počet kalypťier sa pohybuje v spodnej hranici na 50 vlákien.



Obrázok 9 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupín F, G a H. Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina F – F6 C1 (obr. 1,2), F8 C4 (obr. 3,4); skupina G – AT9 A2 (obr. 5,6); skupina H – A2 C2 (obr. 7,8), A2 C3 (obr. 9,10), A2 D2 (obr. 11,12).

Tabuľka 2 Základné morfológické charakteristiky jednotlivých skupín (A – H) a kmeňov do nich patriacich

Skupina	Kmeň	Priemerná šírka bunky (µm)	Priemerná dĺžka bunky (µm)	Priemerný rozdiel šírky a dĺžky bunky (µm)	Počet kalypťier na 50 vlákien	Slizová pošva	Počet zužujúcich sa buniek
A	MON2 D5	6,32	2,59	3,73	12	áno	2
	S13 B4	6,34	2,12	4,22	23	výrazná	2–3
	S13 C4	6,07	2,27	3,80	31	výrazná	3
	N9 B4	5,22	2,75	2,47	19	áno	3–4
	Pol10 D4	5,63	2,23	3,40	10	výrazná	2–5
	AT3 A2	5,82	2,34	3,48	26	áno	3
	Pol1 C5	5,94	2,22	3,72	15	áno	2
	Pol11 C2	5,22	2,78	2,44	30	áno	2–3
	Pol7 B2	5,87	2,13	3,74	11	áno	2
	AT3 D2	5,62	2,56	3,06	14	výrazná	2–3
	S13 C5	5,63	2,41	3,22	25	áno	2
	Pol8 C2	5,87	2,43	3,44	27	výrazná	2–4
	Pol8 C6	6,09	2,48	3,61	15	áno	2–3
	Pol8 D1	6,07	2,91	3,16	20	áno	2
	Pol8 D6	5,43	2,01	3,42	11	áno	2–3
	Pol12 A4	5,77	2,81	2,96	32	áno	3–4
	M2 A5	5,29	2,03	3,26	27	áno	3
	w2 18aC4	5,81	2,38	3,43	14	výrazná	2
M2 B5	5,96	2,31	3,65	17	výrazná	2–3	
M2 C2	5,45	2,71	2,74	24	áno	2–4	
B	Pol12 A5	5,92	2,23	3,69	13	áno	2
	F8 C5	5,11	2,14	2,97	22	áno	1–2
	LAD1 D1	6,21	2,11	4,10	15	výrazná	5–6
	Pol14 C6	6,31	2,28	4,03	12	áno	2–3
	Pol17 C1	6,84	2,22	4,62	23	áno	1–2
C	B3 C5	8,23	2,67	5,56	18	výrazná	3–4
	Pol14 C2	5,61	2,12	3,49	7	áno	2–3
D	At9b C5	5,28	2,01	3,27	28	áno	4–5
E	N9 B2	6,81	2,12	4,69	12	áno	2
F	F6 C1	5,77	2,32	3,45	7	áno	2–3
	F8 C4	5,33	2,27	3,06	4	áno	4
G	AT9 A2	6,21	3,07	3,14	22	áno	1–2
H	A2 C2	5,91	2,86	3,05	8	výrazná	3–6
	A2 C3	5,31	2,14	3,17	7	áno	2–3
	A2 D2	5,41	2,42	2,99	9	áno	2–3

9 Diskusia

Druhová diverzita v rámci rodu *Microcoleus sp.* je iba na základe morfológických a ekologických údajov, ktoré slúžia k identifikácii ťažko rozpoznateľná (Strunecký et al., 2013). Medzi základné morfológické znaky, ktoré sa využívajú na rozpoznávanie sinice *Microcoleus patria* prítomnosť kalyptry, veľkosť buniek, ktoré sú kratšie ako širšie a taktiež výskyt niekoľkých vlákien v jednej spoločnej bezfarebnej pošve. Rod *Microcoleus* má veľmi podobné morfológické znaky s rodom *Phormidium*, a preto častokrát dochádza ku ich zámene. Rod *Phormidium* má však narušenie od *Microcolea* v pošve prítomné iba jedno vlákno (Strunecký et al., 2013; Dvořák et al., 2012; Hašler et al., 2012). Úzka morfológická príbuznosť medzi týmito dvoma rodmi je bližšie popísaná v článkoch Hašler et al. (2012) a Strunecký et al. (2013).

V diplomovej práci bolo morfológicky a molekulárne hodnotených 35 kmeňov *Microcoleus*. Na základe genetickej analýzy génu 16S rRNA bolo zostavených 8 skupín (A–H). Kmene boli celkovo priradené k 5 už existujúcim druhom rodu *Microcoleus*. V niektorých prípadoch môže dôjsť k narušeniu sledovaných znakov, ako sú farba vlákna, výskyt kalyptrier či nekrotických buniek. Tieto zmeny môžu byť spôsobené buď pri samotnej príprave preparátu, spôsobom a fázou kultivácie či kontamináciou vzorky.

Jednotlivé druhy, ku ktorým boli sledované kmene priradené sú *Microcoleus vaginatus* (skupina A, B, C a G), *Phormidium vulgare* (skupina D), *Phormidium lucidum* (skupina E), *Phormidium uncinatum* (skupina F) a *Phormidium amoenum* (skupina H).

Kmene, ktoré patrili do skupiny A boli určené na základe pozorovaných morfológických znakov ako *Microcoleus vaginatus*. Sledované znaky odpovedali popisu, ktorý uvádzajú Komárek & Anagnostidis (2005). Namerané priemerné šírky buniek, ktoré sa pohybovali v rozpätí 5,22 μm až 6,34 μm odpovedali uvedeným stredným hodnotám. Namerané priemerné dĺžky buniek, ktoré sa pohybovali v rozmedzí 2,01 μm až 2,91 μm taktiež odpovedali uvedeným stredným hodnotám. Bunky sú kratšie ako širšie, zvyčajne 3–7 μm široké a 2–5 μm dlhé. Vlákna uvedeného druhu sú najčastejšie svetlé modro–zelené, olivovo–zelené, špinavo zelené alebo sfarbené do červena. Posledný typ sfarbenia sa u sledovaných kmeňov nepreukázal. Vlákna sa zvyčajne po stranách nezaškrucujú a na priečnych stenách buniek sa vyskytujú viditeľné graná (Komárek & Anagnostidis, 2005). Ďalšími charakteristickými znakmi sú zužujúce sa trichómy a prítomnosť kalyptry. Početné trichómy sa zvyčajne vyskytujú v spoločnej

pošve, kultúry však mnohokrát tento znak postrádajú (Boyer et al., 2002). Kalyptra je pologuľovitá, kužeľovitá alebo tupo kužeľovitá. Bežne sa tento druh vyskytuje v pôde, na kameňoch, vápenatých horninách a v litorále stojatých vôd, avšak môže byť prítomný aj v stojatých a tečúcich vodách. *Microcoleus vaginatus* je celosvetovo kozmopolitne rozšírený v miernych i tropických oblastiach, čo možno potvrdiť, pretože kmene z tejto skupiny pochádzali aj z ostrova Maurícius. Mimo toho, kmene pochádzali najmä z pôd Poľska.

Kmene patriace do skupiny B vykazovali opäť podobné morfológické vlastnosti ako druh *Microcoleus vaginatus*. Namerané priemerné šírky a dĺžky buniek odpovedali uvedeným stredným hodnotám podľa Komárek & Anagnostidis (2005). Kmene boli prevažne výrazne sýtej zelenej farby, avšak objavilo sa aj mierne sfarbenie do červena a to konkrétne u kmeňov Pol12 A5 a F8 C5. Vlákna neboli zaškrtené s výnimkou kmeňa Pol17 C1, u ktorého bolo sledované jemné zaškrtenie, čo Komárek & Anagnostidis (2005) neuvádzajú. Taktiež nebol pozorovaný ani výskyt viacerých vlákien v spoločnej pošve. Kmene opäť pochádzali prevažne z pôd Poľska. Zdá sa, že tento druh je kozmopolitný, ekologicky euryvalentný a vyskytuje sa v aerofytických a sladkovodných biotopoch (Dvořák et al., 2012).

Kmene skupiny C boli na základe morfológických znakov určené ako *Microcoleus vaginatus*. Táto skupina zahŕňala len 2 kmene, ktoré vykazovali podobné charakteristiky. U obidvoch kmeňov sa na priečných stranách buniek vyskytovali pozorovateľné graná a dochádzalo k zužovaniu vlákien, tak ako sa uvádza v Komárek & Anagnostidis (2005). U kmeňa B3 C5 bola prítomná zdvojená pošva.

Skupina D zahŕňa len jeden kmeň, ktorý bol určený ako *Phormidium vulgare*. Podľa Komárek & Anagnostidis (2005) je sfarbenie vlákien tmavo olivovo–zelené či bledé modro–zelené. Vlákna sú rovné, prípadne jemne stočené a niekedy husto zapletené. Bunky sú izodiametrické, výrazne kratšie ako širšie a po priečných stranách obsahujú graná. Apikálne bunky sa zužujú a sú zakončené kalyptrou (Komárek & Anagnostidis, 2005). Namerané hodnoty šírky a dĺžky bunky u tohto kmeňa odpovedali uvedeným stredným hodnotám. Farba vlákien vykazovala tmavo–zelené až žlto–zelené sfarbenie. Vlákna sa výrazne zužovali na 4–5 koncových bunkách. Tento druh sa bežne vyskytuje vo vlhkých pôdach najmä v lokalitách strednej Európy, ale aj v severných oblastiach až

po Arktídu. Sledovaný kmeň pochádzal z pôdy v Grécku, čo by odpovedalo jeho rozšíreniu.

Skupina E zahŕňa opäť len jeden kmeň, ktorý bol určený ako *Phormidium lucidum*. Priemerná šírka a dĺžka buniek odpovedala hodnotám podľa Komárek & Anagnostidis (2005). Na základe popisu Komárek & Anagnostidis (2005) má tento druh rovné vlákna, ktoré sa viac–menej zužujú a sú olivovo–zelenej alebo bledomodro zelenej farby. Graná sa na priečnych stenách buniek buď nevyskytujú alebo sú jemné po oboch stranách. Kalyptra je zaguľatená alebo takmer kužeľovitá a málokedy býva zväčšená. Sledovaný kmeň N9 B2 vykazoval podobné morfológické vlastnosti, avšak bunky obsahovali graná. Komárek & Anagnostidis (2005) primárne uvádzajú ako miesto výskytu termálne pramene, teplé brakické vody, slané vody a teplé plytké príkopy. Kmeň N9 B2 bol odobratý z kaluže nórskeho súostrovia Svalbard.

Skupina F zahŕňa 2 kmene, ktoré boli charakterizované na základe vykazujúcich morfológických znakov ako *Phormidium uncinatum*. Nameraná hodnota šírky bunky, ktorá bola u kmeňa F6 C1 5,77 μm a u kmeňa F8 C4 5,33 μm odpovedala podľa Komárek & Anagnostidis (2005) uvedeným hodnotám. Taktiež nameraná dĺžka bunky, ktorá bola u kmeňa F6 C1 2,32 μm a u kmeňa F8 C4 2,27 μm odpovedala uvedeným hodnotám. Podľa Komárek & Anagnostidis (2005) je farba vlákien modro–zelená alebo špinavo zelená. Sledované kmene F6 C1 a F8 C4 boli mierne sfarbené do fialova, čo mohlo vzniknúť v dôsledku kontaminácie alebo spôsobom a fázou kultivácie. Vlákna nie sú po stranách zaškrtené, zužujú sa a môžu byť zahnuté alebo mierne stočené. Zahnutie na konci vlákien však bolo sledované minimálne. Tento druh sa zvyčajne vyskytuje v sladkých vodách, menej často vo vlhkých pôdach či termálnych prameňoch. Sledované kmene pochádzajú z pôdy v USA, a teda možno potvrdiť výskyt tohto druhu v pôde.

Do skupiny G patrí jeden kmeň AT9 A2, ktorý možno prostredníctvom sledovaných morfológických vlastností priradiť k druhu *Microcoleus vaginatus*. Morfológické znaky odpovedali popisu Komárek & Anagnostidis (2005). Kmeň pochádza z pôd Grécka.

Kmene patriace do skupiny H boli zaradené k druhu *Phormidium amoenum*. Podľa Komárek & Anagnostidis (2005) sú vlákna rovné alebo mierne zakrivené, na koncoch sa postupne zužujú. Priečne steny buniek sú buď granulované alebo graná nie sú prítomné. Apikálne bunky sú dlhšie ako ostatné, zakončené zvyčajne kužeľovitou kalyptrou. Sledované znaky odpovedali uvedeným definíciám. Tento druh sa bežne vyskytuje

v sladkej stojatej vode, neznečistených vodách, bahnitých močiaroch či vlhkých pôdach. Je široko rozšírený v temperátnych a tropických oblastiach, avšak existuje množstvo údajov výskytu v Európe (Česká republika, Francúzsko, Nemecko, Grécko), severnej Amerike (USA – California, Nevada), Afrike či napríklad Indii. Sledované kmene pochádzali z machovej vegetácie Antarktídy. V budúcnosti by bolo dobré tento taxón zrevidovať.

Strunecký et al. (2013) navrhol prevod niektorých druhov rodu *Phormidium* (skupiny VII), pričom sa to týka: *P. amoenum*, *P. autumnale*, *P. favosum*, *P. fonticulum*, *P. setchellanium*, *P. vulgare*, a ďalších, ktoré sú novo označované pod rodovým názvom *Microcoleus*. V diplomovej práci bola potvrdená príbuznosť *Microcolea* s druhmi pôvodne zaradenými v skupine VII *Phormidium* (Komárek & Anagnostidis, 2005), ktorú na základe morfológie a fylogenetickej pozície do rodu *Microcoleus* revidoval Strunecký et al. (2013). Morfológické vlastnosti kmeňov odpovedali niekoľkým kmeňom druhov *P. lucidum*, *P. uncinatum*, ktoré patria do skupiny VIII *Phormidium* (Komárek & Anagnostidis, 2005). Možno predpovedať, že k rodu *Microcoleus* patria nie len všetky druhy skupiny VII, ale taktiež druhy patriace sa do skupiny VIII *Phormidium*. Potvrdila sa platná príbuznosť medzi rodmi *Phormidium* a *Microcoleus*.

10 Záver

Cieľom tejto diplomovej práce bolo rozšíriť poznatky o taxonómii kozmopolitnej sinice rodu *Microcoleus*. V rámci výskumnej časti sa pracovalo s 35 kmeňmi, ktoré boli podrobené ako morfolologickej, tak genetickej analýze. Morfologická analýza bola skúmaná pomocou svetelného mikroskopu a genetická analýza prebehla na základe sekvencie génu 16S rRNA. Pomocou získaných fylogenetických vzťahov boli kmene vo fylogenetickom strome rozdelené do 8 skupín a následne morfologicky porovnané s druhmi v Komárek & Anagnostidis (2005). Skupiny boli priradené k 5 druhom *Microcoleus*. Výsledky výskumu však ukázali, že aj keď sú druhy geneticky príbuzné, môžu sa od seba morfologicky odlišovať.

Diplomová práca priniesla nové poznatky v taxonómii siníc, ktorá je však značne komplikovaná a stále málo preskúmaná. Sledovaná problematika si vyžaduje v budúcnosti ďalší výskum väčšieho počtu kmeňov *Microcoleus*.

11 Zdroje

Zoznam bibliografických odkazov:

Bláha, L., Babica, P., Maršálek, B. (2009): *Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks*. Interdisciplinary Toxicology, 2(2), 36–41. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0006-2>.

Blank, C. E. (2004): *Evolutionary timing of the origins of mesophilic sulphate reduction and oxygenic photosynthesis: a phylogenomic dating approach*. Geobiology, 2(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4677.2004.00020.x>.

Boyer, S. L., Johansen, J. R., Flechtner, V. R. et al. (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, 1222–1235. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01168.x>.

Brown, I., Tringe, S. H., Ivanova, N. et al. (2021): *High-Quality Draft Genome Sequence of the Siderophilic and Thermophilic Leptolyngbyaceae Cyanobacterium JSC – 12*. Microbiology Resource Announcements, 10, 25. <https://doi.org/10.1128/mra.00495-21>.

Casamatta, D. A., Johansen, J. R., Vis, M. L. et al. (2005): *Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria)*. Journal of Phycology, 41, 421–438. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04062.x>.

Castenholz, R. W., Waterbury, J. B. (1989): *Introduction to Cyanobacteria*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 3, 1710–1728. <https://doi.org/10.1007/b92997>.

Colica, G., Li, H., Rossi, F. et al. (2014): *Microbial secreted exopolysaccharides affect the hydrological behavior of induced biological soil crusts in desert sandy soil*. Soil Biology and Biochemistry, 68, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.017>.

Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Gallardo, A. (2013): *Biological soil crusts increase the resistance of soil nitrogen dynamics to changes in temperatures in a semi-arid ecosystem*. Plant and Soil, 366, 35–47. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1404-3>.

Dodds, W. K., Bouska, W. W., Eitzmann, J. L. et al. (2009): *Eutrophication of U.S. Freshwaters: Analysis of Potential Economic Damages*. Environmental Science & Technology, 43(1). <https://doi.org/10.1021/es801217q>.

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.

Drouet, F. (1968): *Revision of the Classification of the Oscillatoriaceae*. Academy of National Sciences, Philadelphia.

Dvořák, P., Casamatta, D., Hašler, P. et al. (2017): *Diversity of the Cyanobacteria*. *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*, 1: 3–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46261-5_1.

Dvořák, P., Hašler, P., Pouličková A. (2012): *Phylogeography of the *Microcoleus vaginatus* (Cyanobacteria) from Three Continents – A Spatial and Temporal Characterization*. *PLoS ONE*, 7(6), e40153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040153>.

Dvořák, P., Jahodářová, E., Stanojković, A. et al. (2023): *Population genomics meets the taxonomy of cyanobacteria*. *Algal Research*, 72, 103128. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103128>.

Dvořák, P., Pouličková, A., Hašler, P. et al. (2015): *Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification*. *Biodiversity and Conservation*, 24: 739–757. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0888-6>.

Edgar, R. C. (2004): *MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with high Accuracy and high Throughput*. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

Ettl, H., Gärtner, G. (1995): *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Gustav Fischer Verlag, 526 s.

Hašler, P., Dvořák, P., Johansen, J. R. et al. (2012): *Morphological and molecular study of epipellic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/Cyanobacteria)*. *Fottea*, 12(2), 341–356. <https://doi.org/10.5507/fot.2012.024>.

Hašler, P., Štěpánková, J., Špačková, J. et al. (2008): *Epipellic cyanobacteria and algae: a case study from Czech ponds*. *Fottea*, 8(2), 133–146. <https://doi.org/10.5507/fot.2008.012>.

Heath, M. W., Wood, S. A., Ryan, K. G. (2010): *Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand*. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(1), 95–109. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00867.x>.

Hoffmann, L. (2005): *Nomenclature of Cyanophyta/Cyanobacteria: round table on the unification of the nomenclature under the Botanical and Bacteriological Codes*. *Algological Studies*, 117(1), 13–29. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2005/0117-0013>.

Chamizo, S., Cantón, Y., Rodríguez–Caballero, E. et al. (2016): *Biocrusts positively affect the soil water balance in semiarid ecosystems*. *Ecohydrology*, 9(7), 1208–1221. <https://doi.org/10.1002/eco.1719>.

Chisholm, S. W., Olson, R. J., Zettler, E. R. et al. (1988): *A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone*. *Nature*, 334, 340–343. <https://doi.org/10.1038/334340a0>.

Jahodářová, E., Pouličková, A., Dvořák P. (2022): *The CRISPR/Cas Machinery Evolution and Gen Flow in the Hot Spring Cyanobacterium Thermostichus*. The Diversity and Evolution of Cyanobacteria, 14(7), 502. <https://doi.org/10.3390/d14070502>.

Johansen, J. R., Casamatta, D. A. (2005): *Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm*. Algological Studies, 117(1), 71–93. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2005/0117-0071>.

Komárek, J. (2003): *Problem of the taxonomic category "species" in cyanobacteria*. Algological Studies, 109, 281–297. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2003/0109-0281>.

Komárek, J. (2005): *The modern classification of cyanoprokaryotes (cyanobacteria)*. Oceanological and Hydrobiological Studies, 34, 5–17.

Komárek, J. (2006): *Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches*. ALGAE, 21(4), 349–375. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2006.21.4.349>.

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, 245–259. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-009-0031-3>.

Komárek, J. (2016): *A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications*. European Journal of Phycology, 51(3), 346–353. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1163738>.

Komárek, J. (2018): *Several problems of the polyphasic approach in the modern cyanobacterial system*. Hydrobiologia, 811(1), 7–17. . <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3379-9>.

Komárek, J. (2020): *Quo vadis, taxonomy of cyanobacteria (2019)*. Fottea, 20(1): 104–110. <https://doi.org/10.5507/fot.2019.020>.

Komárek, J., Anagnostidis., K. (2005): *Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales*. In: Büdel, B., Gärdner, G., Krienitz, L. & Schagerl, M. (eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa. Elsevier, Mnichov, 19(2), 759.

Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. et al. (2014): *Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using a Polyphasic Approach*. Preslia 86(4): 295–335.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M. et al. (2018): *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms*. Molecular Biology and Evolution, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

Lincoln, R. A., Strupinski, K., Walker, J. M. (1991): *Studies on a toxin produced by the cyanobacterium Phormidium persicinum*. Biochemical Society Transactions, 19(4), 428S. <https://doi.org/10.1042/bst019428s>.

Linné, C. (1753): *Species Plantarum*.

- Liu, Y., Li, X., Jia, R. et al. (2011): *Effects of biological soil crusts on soil nematode communities following dune stabilization in the Tengger Desert, Northern China*. Applied Soil Ecology, 49, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.06.007>.
- Maestre, F. T., Solé, R., Singh, B. K. (2017): *Microbial biotechnology as a tool to restore degraded drylands*. Microbial biotechnology, 10(5), 1250–1253. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12832>.
- Mazor, G., Kidron, G. J., Vonshak, A. et al. (1996): *The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts*. FEMS Microbiology Ecology, 21(2), 121–130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1996.tb00339.x>.
- Mitsui, A., Rosner, D., Goodman, A. et al. (1989): *Hemolytic toxins in marine cyanobacterium Synechococcus sp.* Proceedings International Red Tide Symposium, 367–370.
- Noy–Meir, I. (1973): *Desert ecosystems: Environment and Producers*. Annual review of ecology and systematics, 4(1), 25–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.04.110173.000325>.
- Oliver, R. L., George, G. G. (2000): *Freshwater blooms*. The Ecology of Cyanobacteria, Their Diversity in Time and Space, Kluwer Academic, Dordrecht, 149–194.
- Osorio–Santos, K., Pietrasiak, N., Bohunická M. et al. (2014): *Seven new species of Oculatella (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification*. European Journal of Phycology, 49(4), 450–470. <https://doi.org/10.1080/09670262.2014.976843>.
- Pouličková, A., Hašler P., Lysáková, M. et al. (2008a): *The ecology of freshwater epipellic algae: an update*. Phycologia, 47(5), 437–450. <https://doi.org/10.2216/07-59.1>.
- Priya, H., Prasanna, R., Ramakrishnan, B. et al. (2015): *Influence of cyanobacterial inoculation of the culturable microbiome and growth of rice*. Microbiological Research, 171, 78–79. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.12.011>.
- Puddick, J., Ginkel, R., Page, C. D. (2021): *Acute toxicity of dihydroanatoxin-a from Microcoleus autumnalis in comparison to anatoxin-a*. Chemosphere, 263. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127937>.
- Rantala–Ylinen, A., Känä, S., Wang, H. et al. (2011): *Anatoxin-a Synthetase Gene Cluster of the Cyanobacterium Anabaena sp. Strain 37 and Molecular Methods To Detect Potential Producers*. Applied and Environmental Microbiology, 77(20), 7271–7278. <https://doi.org/10.1128/AEM.06022-11>.
- Rastogi, R. P., Madamwar, D., Incharoensakdi, A. (2015): *Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies*. Frontiers in Microbiology, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01254>.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B. (1979): *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria*. Journal of General Microbiology, 111(1), 1–61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.

Rodríguez–Caballero, E., Cantón, Y., Chamizo, S. et al. (2012): *Effects of biological soil crusts on surface roughness and implications for runoff and erosion*. Geomorphology, 145–146, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2011.12.042>.

Rossi, F., Li, H., Liu, Y. et al. (2017): *Cyanobacterial inoculation (cyanobacterisation): perspectives for the development of a standardized multifunctional technology for soil fertilization and desertification reveals*. Earth–Science Reviews, 171, 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.05.006>.

Round, F. E. (1981): *The ecology of Algae*. Cambridge University Press, 653 s.

Siegesmund, M. A., Johansen, J. R., Karsten, U. et al. (2008): *Coleofasciculus gen. nov. (Cyanobacteria): Morphological and molecular criteria for revision of the genus Microcoleus gomont (1)*. Journal of Phycology, 44, 1572–1585. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00604.x>.

Sivonen, K., Jones, G. (1999): *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management 1*. Cyanobacterial toxins, 43(112).

Skoupý, S., Stanojković, A., Pavlíková, M. et al. (2022): *New cyanobacterial genus Argonema is hiding in soil crusts around the world*. Scienfitis Reports, 12, 7203. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11288-4>.

Stackebrandt, E. (2006): *Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards*. Microbial Today, 33, 152–156.

Stanojković, A., Skoupý, S., Hašler, P. et al. (2022): *Geography and climate drive the distribution and diversification of the cosmopolitan cyanobacterium Microcoleus (Oscillatoriales, Cyanobacteria)*. European Journal of Phycology, 57(4), 396–405. <https://doi.org/10.1080/09670262.2021.2007420>.

Stanojković, A., Skoupý, S., Škaloud, P. et al. (2022): *High genomic differentiation and limited gene flow indicate recent cryptic speciation within the genus Laspinema (cyanobacteria)*. Frontiers in Microbiology, 13, 977454. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.977454>.

Stielow, S., Ballantine, D. L. (2003): *Benthic cyanobacterial, Microcoleus lyngbyaceus, blooms in shallow, inshore Puerto Rican Seagrass habitats, Caribbean sea*. Harmful Algae, 2, 127–133. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00007-6).

Strunecký, O., Ivanova, A. P., Mareš, J. (2023): *An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis*. Phycological Society of America, 59, 12–51. <https://doi.org/10.1111/jpy.13304>.

Strunecký, O., Komárek, J., Johansen, J. et al. (2013): *Molecular and Morphological Criteria for Revision of the Genus Microcoleus (Oscillatoriales, Cyanobacteria)*. Journal of Phycology, 49, 1167–1180. <https://doi.org/10.1111/jpy.12128>.

- Tee, H. S., Wood, S. A., Bouma–Gregson, K. et al. (2021): *Genome streamlining, plasticity, and metabolic versatility distinguish co–occurring toxic and nontoxic cyanobacterial strains of Microcoleus*. *mBio*, 12:e02235–21. <https://doi.org/10.1128/mBio.02235-21>.
- Thummajitsakul, S., Silprasit, K., Sittipraneed, S. (2012): *Antibacterial activity of crude extracts of cyanobacteria Phormidium and Microcoleus species*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(10), 2574–2579. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.152>.
- Valadez–Cano, C., Reyes–Prieto, A., Beach, D. G. et al. (2023): *Genomic characterization of coexisting anatoxin-producing and non-toxicogenic Microcoleus subspecies in benthic mats from the Wolastoq, New Brunswick, Canada*. *Harmful Algae*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102405>.
- Waterbury, J. B., Watson, S. W., Guillard, R. R. L. et al. (1979): *Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium*. *Nature*, 277, 293–294. <https://doi.org/10.1038/277293a0>.
- Wood, S. A., Biessy, L., Puddick, J. (2018): *Anatoxins are consistently released into the water of streams with Microcoleus autumnalis–dominated (cyanobacteria) proliferations*. *Harmful Algae*, 80, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.10.001>.
- Wood, S. A., Heath, M. W., Kuhajek, J. et al. (2010): *Fine–scale spatial variability in anatoxin–a and homoanatoxin–a concentrations in benthic cyanobacterial mats: implication for monitoring and management*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 2011–2018. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04831.x>.
- Wood, S. A., Puddick, J. (2017): *The Abundance of Toxic Genotypes Is a Key Contributor to Anatoxin Variability in Phormidium–Dominated Benthic Mats*. *Marine Drugs*, 15(10), 307. <https://doi.org/10.3390/md15100307>.
- Wood, S. A., Smith, F. M. J., Heath M. W. et al. (2012): *Within–Mat Variability in Anatoxin–a and Homoanatoxin–a Production among Benthic Phormidium (Cyanobacteria) Strains*. *Toxins*, 4(10), 900–912. <https://doi.org/10.3390/toxins4100900>.
- Wynn – Williams, D. D. (2000): *Cyanobacteria in deserts – life at the limit?* In: Whitton, B. A., Potts, M. (eds.). *The Ecology of Cyanobacteria*. Netherlands, Kluwer, 341–366. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_13.
- Zhang, X. J., Feng, J., Wang, G. H. et al. (2014): *A morphological and phylogenetic study of a filamentous cyanobacterium, Microcoleus vaginatus, associated with the moss Mnium cuspidatum*. *Symbiosis*, 64, 43–51. <https://doi.org/10.1007/s13199-014-0301-3>.
- Zhao, Y., Xu, M., Belnap, J. (2010): *Potential nitrogen fixation activity of different aged biological soil crusts from rehabilitated grasslands of the hilly Loess Plateau, China*. *Journal of Arid Environments*, 74(10), 1186–1191. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2010.04.006>.

11 Prílohy

11.1 Zoznam použitých obrázkov:

- Obrázok 1 Mapa znázorňujúca odberové miesta pre *Microcoleus* spp. (Mollweideova projekcia) (zdroj: Stanojković et al., 2022)24
- Obrázok 2 Fylogenetický strom získaný pomocou programu MEGA X prostredníctvom metódy Maximum likelihood. Analýza je založená na sekvencii génu 16S rRNA a výsledky sú na základe metódy bootstrapov s počtom 200 replikácií.28
- Obrázok 3 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupiny A (prvých 5 kmeňov). Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina A – MON2 D5 (obr. 1,2), S13 B4 (obr. 3,4), S13 C4 (obr. 5,6), N9 B4 (obr. 7,8), Pol10 D4 (obr. 9,10).30
- Obrázok 4 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupiny A (druhých 5 kmeňov). Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina A – AT3 A2 (obr. 1,2), Pol1 C5 (obr. 3,4), Pol11 C2 (obr. 5,6), Pol7 B2 (obr. 7,8), AT3 D2 (obr. 9,10).30
- Obrázok 5 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupiny A (tretích 5 kmeňov) Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina A – S13 C5 (obr. 1,2), Pol8 C2 (obr. 3,4), Pol8 C6 (obr. 5,6), Pol8 D1 (obr. 7,8), Pol8 D6 (obr. 9, 10).31
- Obrázok 6 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupiny A (posledných 5 kmeňov). Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina A – Pol12 A4 (obr. 1,2), M2 A5 (obr. 3,4), w2 18aC4 (obr. 5,6), M2 B5 (obr. 7,8), M2 C2 (obr. 9,10).31
- Obrázok 7 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupiny B. Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina B – Pol12 A5 (obr. 1,2), F8 C5 (obr. 3,4), LAD1 D1 (obr. 5,6), Pol14 C6 (obr. 7,8), Pol17 C1 (obr. 9,10).32
- Obrázok 8 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupín C, D a E. Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina C – B3 C5 (obr. 1,2), Pol14 C2 (obr. 3,4); skupina D – AT9b C5 (obr. 5,6); skupina E – N9 B2 (obr. 7,8).33
- Obrázok 9 Obrazová tabuľa vytvorená zo skupín F, G a H. Z každého kmeňa sú vyobrazené 2 trichómy. Skupina F – F6 C1(obr. 1,2), F8 C4 (obr. 3,4); skupina G – AT9 A2 (obr. 5,6); skupina H – A2 C2 (obr. 7,8), A2 C3 (obr. 9,10), A2 D2 (obr. 11,12).35

11.2 Zoznam použitých tabuliek:

- Tabuľka 1 Súhrn použitých kmeňov, geografické údaje a lokalita25
- Tabuľka 2 Základné morfológické charakteristiky jednotlivých skupín (A – H) a kmeňov do nich patriacich36