

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

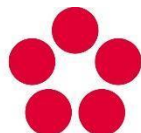
**Proč je *Gloeocapsa* fialová
- identifikace gleocapsinu, UV-protektivního pigmentu sinic**

Bakalářská práce

Anastasiia Shchunina

Školitel: RNDr. Jan Mareš, Ph.D.

České Budějovice 2023



Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Shchunina A., (2023): Proč je *Gloeocapsa* fialová - identifikace gloeocapsinu, UV- protektivního pigmentu sinic. [Why is *Gloeocapsa* purple - identification of gloeocapsin, the UV-protective pigment of cyanobacteria. Bc. Thesis, in Czech.] – 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Gloeocapsin is a pigment with unknown chemical structure that occurs in gelatinous sheaths of some terrestrial cyanobacteria and is characterized by an acid-base color reaction. As part of this bachelor's thesis, colonies of potential producers of the UV-protective pigment gloeocapsin from the genus *Gloeocapsa* were isolated, originating from natural samples of epilithic cyanobacterial growths from PR Opolenec, PR Holubovské hadce and PR Bořinka in the Czech Republic. The taxonomic identity of individual colonies was confirmed by microscopic analysis and sequencing of the 16S rRNA gene. Finally, the whole genome sequences of three selected species (*Gloeocapsa novacekii*, *G. violascea* and *G. atrata*) were obtained using genome amplification by the multiple-displacement amplification method from individual colonies and their sequencing on the Illumina platform. The obtained data will be used in subsequent work to identify genes for the biosynthesis of gloeocapsin.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 13.04.2023.

.....

Anastasiia Shchunina

Poděkování

Chtěla bych poděkovat mému školiteli Janu Marešovi za možnost podílet se na této studii. Velice děkuji za trpělivost a neocenitelné rady při vypracování bakalářské práce. Další poděkování patří ostatním zaměstnancům Hydrobiologického ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích za spolupráci a pohodlnou atmosféru při práci.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Subaerické sinice	1
1.2. Sinice rodu <i>Gloeocapsa</i>	2
1.3. UV protektivní látky sinic	4
1.3.1 Mykosporiny a aminokyseliny podobné mykosporinu (MAA)	5
1.3.2 Scytonemin	6
1.3.3 <i>Gloeocapsin</i>	8
1.4. Cíle práce.....	9
2. Metody.....	9
2.1 Odběry vzorků.....	9
2.1.1 Lokality	10
2.1.1.1 Holubovské hadce	10
2.1.1.2 Opolenec.....	11
2.1.1.3 Bořinka	12
2.2 Mikroskopická analýza.....	12
2.3 Izolace jednotlivých kolonií	13
2.4 MDA amplifikace genomu.....	13
2.5 Amplifikace (PCR) genu pro 16S rRNA.....	14
2.6 Přechištění PCR produktů a jejich sekvenace	15
2.7 Analýza 16S rRNA sekvencí.....	16
2.8 Analýza genomu.....	16
3. Výsledky.....	17
3.1 Terénní odběr vzorků	17
3.2 Mikroskopický rozbor vzorků a izolace potenciálních producentů <i>gloeocapsinu</i>	18
3.2.1 <i>Gloeocapsa alpina</i>	18
3.2.2 <i>Gloeocapsa novacekii</i>	19
3.2.3 <i>Gloeocapsa violascea</i>	20

3.2.4 <i>Gloeocapsa atrata</i>	21
3.3 Amplifikace genomu pomocí MDA a PCR genu pro 16S rRNA	23
3.4 Sekvenace a BLAST analýza genu pro 16S rRNA	27
3.5 Homogenita sekvencí 16S rRNA v rámci vzorku (morfortypu)	28
3.6 Fylogenetická analýza	29
3.7 Sekvenace draftu genomu u vybraných vzorků	31
4. Diskuze	32
5. Závěr	36
6. Literatura	37

1. Úvod

1.1 Subaerické sinice

Sinice patří mezi vývojově nejstarší fotosyntetické organismy. Zájem o tuto skupinu prokaryotních organismů v posledních desetiletích roste, zejména kvůli jejich rychlému šíření a tvorbě vodních květů ve stojatých vodách po celém světě v důsledku eutrofizace (HUISMAN et al., 2018). Různé typy sinic mají různé adaptivní mechanismy, které jsou důvodem jejich úspěchu při kolonizaci mnoha různých prostředí (WHITTON, 2012).

Sinice jsou ekologicky úspěšné nejen ve vodě ale i na souši, kde jsou schopny růst na rozmanitých subaerických stanovištích. Subaeričtí zástupci se vyskytují mj. i v extrémních klimatických podmínkách na substrátech, jako jsou kmeny a listy stromů, betonové zdi, obnažené horniny, povrchy kovových substrátů, a řada dalších exponovaných umělých struktur (PANIKKAR & JACKSON, 2014). Světlo, teplota, déšť a vlhkost vzduchu jsou považovány za nejvýznamnější faktory ovlivňující růst těchto organismů. Subaerická a aerofytická společenstva sinic jsou často vystavena výraznému stresu ve formě periodického nedostatku vody, rychlých změn teploty a nadbytku světla a UV záření. Termín aerické neboli vzdušné (sinice) pochází z práce PETERSEN (1915), který je detailně popsal a definoval jako řasy získávající většinu vody z atmosféry a podléhající častému vysychání během normálního vegetativního stavu. V současné fykologii je pro tyto sinice obvykle používán termín subaerické sinice. V roce 1975 SCHLICHTING (1975) definoval subaerické sinice jako sinice rostoucí na vzduchu, a to obvykle na povrchu určitého pevného substrátu. V práci NOVÁČEK (1934) byly aerické sinice uvedeny jako sinice, jejichž velké části jsou vystaveny vzduchu a pokryty jen kapilární vrstvičkou vody.

Ve skutečnosti jsou subaerická společenstva sinic tvořena zástupci různých ekologických skupin, jako jsou druhy přísně aerické, pro které je charakteristická shoda mezi podmínkami aerického prostředí a jejich optimálními ekologickými nároky; semiterestrické (amfibické) druhy schopné se přizpůsobit různým podmínkám vodního režimu; a akvatické druhy, které se v tomto prostředí vyskytují pasivně ve své dormantní fázi (neboli ve fázi přečkávání nepříznivých podmínek) (NOVÁČEK, 1934).

Subaerická společenstva sinic je možné dále členit podle druhu podkladu na kterém rostou (NOVÁČEK, 1934; HAUER et al., 2015) na společenstva epilitická, organofytická, které rostou na organických podkladech (např. epifyti) a společenstva geofytická (na povrchu půdy).

1.2. Sinice rodu *Gloeocapsa*

Sinice rodu *Gloeocapsa* můžeme nalézt po celém světě. Vyskytují se jak v suchých tak i vlhkých prostředích, nejčastěji je však najdeme na kamenných površích vystavených vzduchu (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998). Existují i popsané druhy z vodního prostředí, například v termálních pramenech, ale jejich příslušnost do rodu *Gloeocapsa* musí být ještě ověřena, a proto se jimi v této práci dále nebudeme zabývat.

Donedávna se rod *Gloeocapsa* řadil do čeledi Microcystaceae (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998), případně Chroococcaceae (KOMÁREK et al., 2014) v řádu Chroococcales, aktuálně navržené zařazení v systému je do čeledi Chroococciopsidaceae ve fylogeneticky vymezeném řádu kokálních sinic - Chroococciopsidales (STRUNECKÝ et al., 2023). Typovým druhem tohoto rodu je *Gloeocapsa atrata* KÜTZING 1843, druh původně nalezený pod mechy na pěnovcových skalách nedaleko Bernu v roce 1835 a následně popsáný Friedrichem Traugottem Kützingem v roce 1843 v díle *Phycologia generalis oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange* (KÜTZING, 1843).

Sinice rodu *Gloeocapsa* jsou charakteristické tvorbou mikroskopických až makroskopicky viditelných kolonií, které jsou složeny z náhodně uspořádaných kulovitých buněk s modrozeleným homogenním obsahem. Buňky se dělí stejnoměrně na dvě dceřinné buňky v různých rovinách v po sobě následujících generacích (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998). Jednotlivé buňky, jejich dvojice a celé kolonie jsou vždy obklopeny výraznými slizovými membránami. U většiny druhů jsou ve slizovém obalu přítomna UV-protektivní barviva jako gloeocapsin a scytonemin (NOVÁČEK, 1934).

Aerofytické sinice včetně rodu *Gloeocapsa* jsou často charakterizovány schopností střídání fází životního cyklu v závislosti na střídání podmínek příznivých a nepříznivých k jejich růstu. Na základě práce BRANDA (1900) se ve své studii NOVÁČEK (1934) zabýval životním cyklem a přechodem mezi jednotlivými stádii u druhu *Gloeocapsa sanguinea*. Životní cyklus je zde rozdělen do dvou fází: vegetační, která odpovídá příznivým životním podmínkám při relativním dostatku vlhkosti a světla a latentní (dormantní), ke které dochází v nepříznivých podmínkách např. při vysychání a s nadměrným ozářením. NOVÁČEK (1934) rozdělil tyto dvě fáze na charakteristická stádia podle měnícího se uspořádání slizových obalů:

Fáze vegetační: 1. *status solutus* (*Aphanocapsa* stadium); 2. *status familiaris simplex*; 3. *status familiaris lamellosus*. Fáze latentní: *status perdurans* (arthrospory).

Podle NOVÁČKA (1934) jsou jednotlivé fáze životního cyklu popsány takto:

Status solutus: dochází k úplnému rozpuštění všech diferencovaných obalů. Protoplasty (buňky) jsou uloženy v homogenní rosolovité hmotě. Tento stav slouží k šíření, protože jemný sliz se může snadno zachytit na skalním povrchu. Protoplasty mohou přecházet na arthrospory v případě nástupu nepříznivých podmínek. Můžeme se také setkat s názvem *Aphanocapsa stadium* (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998), protože buňky mají téměř homogenní slizový obal, což morfologicky odpovídá rodu *Aphanocapsa*. Vyskytuje se na dobře osvětlených a vlhkých stanovištích.

Status familiaris simplex: viditelně diferencovaná společná obalová soustava. Po rozdělení mateřské buňky vytváří dceřinné buňky vlastní slizový obal, přičemž původní mateřský obal zůstává zachován. Podobně jako *status solutus* se pravidelně vyskytuje na vlhkých a osvětlených stanovištích.

Status familiaris lamellosus: v tomto stavu se obalová soustava diferencuje tak, že mladší buněčné elementy jsou pod zbytkem většího počtu vrstevnatě uspořádaných vnějších membrán mateřských buněk. Nacházíme je ve vrcholné fázi vegetačního cyklu.

Status perdurans: arthrospory v této latentní fázi slouží k přečkání nepříznivých podmínek a k následnému rozšíření. Jsou to dormantní buňky s pevným a pigmentovaným obalem, které jsou odolné vůči nadměrnému světlu, suchu, vysokým teplotám nebo naopak mrazu.

V slizovém obalu některých druhů rodu *Gloeocapsa* můžeme v různých stádiích životního cyklu pozorovat dvě modifikace rozložení pigmentů (NOVÁČEK, 1934):

Zbarvení distinktní – při kterém je barvivo uloženo do prostorově oddělené pigmentové vrstvy o různé intenzitě. Toto uspořádání lze obvykle pozorovat u arthrospor ve *status perdurans* a případně v pokročilém *status familiaris lamellosus*, tedy spíše v dormantní fázi cyklu. Diferencovaná pigmentová vrstva chrání před působením světla vrstvy, které jsou pod ní uloženy.

Zbarvení difuzní – kdy můžeme pozorovat zbarvení celé masy slizového obalu, přičemž obaly jsou zbarveny téměř nebo zcela rovnoměrně. Toto zbarvení je obvykle charakteristické pro *status familiaris simplex* a *status solutus*, případně také pro *status familiaris lamellosus*, neboli pro vegetační (růstovou) část životního cyklu.

V závislosti na intenzitě světla se může také lišit intenzita zbarvení slizových obalů sinic. Proto kolonie rostoucí na osluněných stanovištích a na povrchu celého nárostu zpravidla mají silně vyvinuta UV-protektivní barviva, zatímco kolonie rostoucí ve stínu nebo pod povrchovou vrstvou nárostu jsou většinou bezbarvé. Ve slizových obalech různých druhů rodu *Gloeocapsa* byly zaznamenány pigmenty různé barvy (různá UV-protektivní barviva) (GOLUBIĆ, 1965). Kolonie mohou získat pod vlivem silného slunečního ozáření žlutohnědé zbarvení odpovídající pravděpodobně přítomnosti scytoneminu (např. *G. biformis* ERCEGOVIĆ 1925), červené zbarvení

různých odstínů (např. *G. novacekii* KOMÁREK ET ANAGNOSTIDIS 1995, *G. ralfsii* (HARVEY) KÜTZING 1846, *G. sanguinea* (AGARDH) KÜTZING 1843), a nebo modré, fialové a černo-fialové zbarvení, kde se předpokládá obsah gloeocapsinu. Ze skupiny druhů obsahujících gloeocapsin byly v České Republice nalezeny tyto taxony: *G. alpina* (NÄGELI) BRAND 1900, *G. atrata* KÜTZING 1845, *G. compacta* KÜTZING 1845, *G. nigrescens* NÄGELI IN RABENHORST 1857 a *G. violascea* (CORDA) RABENHORST 1865 (KAŠTOVSKÝ et al., 2010). Tyto druhy se vyskytují zejména epilitticky na horninách se zásaditou reakcí, jako jsou vápence a hadce (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998; HAUER, 2007). V literatuře je také popsáno, že některé druhy s obsahem gloeocapsinu jsou schopny měnit barvu v závislosti na pH prostředí a koncentraci železa (JAAG, 1945), viz dále v kapitole 1.3.3.

1.3. UV protektivní látky sinic

Bylo prokázáno, že UV záření je škodlivé pro organismy včetně sinic, neboť způsobuje zvýšenou tvorbu volných kyslíkových radikálů a poškození genetické informace (SINGH et al., 2010). V prostředích vystavených přímému slunečnímu záření, jako jsou skalní povrchy a půdy, musí mít sinice účinné mechanismy k omezení nebo potlačení škodlivých účinků silného slunečního záření, včetně těch, které způsobuje zvláště škodlivá oblast UV spektra. Mechanismy, které tvoří ochranu proti poškození způsobenému UV zářením, byly u sinic již dříve popsány - jedná se především o negativní fototaxi a syntézu UV-protektivních látek (GARCIA-PICHEL et al., 1993).

UV-protektivní látky jsou z hlediska hospodaření buňky poměrně neefektivní formou ochrany, protože pro jejich výrobu jsou třeba značné materiální a energetické investice. Aby látka mohla být považována za skutečně UV-protektivní, musí být splněny dvě hlavní podmínky: sloučenina musí absorbovat UV záření s vysokým absorpčním koeficientem a její koncentrace v organismu musí být dostatečná k tomu, aby způsobila podstatnou ochranu proti UV. Existují i další kritéria, která mohou pomoci stanovit ekologickou roli látky; například, že sloučenina by měla být syntetizována speciálně během citlivých fází životního cyklu (například tvorba spor) a/nebo v přímé reakci na expozici UV záření (GAO & GARCIA-PICHEL, 2011).

V ideálním případě tedy přítomnost UV-protektivních látek přináší ochranné účinky před UV zářením, a tím přímo napomáhá ke zvýšení růstu nebo šance na přežití. Naopak, v případě specifické ztráty této látky, například při extrakci nebo cílené mutaci, dochází ke ztrátě pasivní ochrany buněk. Nejvíce se u sinic přiblížil splnění těchto kritérií scytonemin a dále mykosporiny a aminokyseliny podobné mykosporinu (MAA), viz následující kapitoly. Předpokládá se, že vývoj těchto sloučenin hrál důležitou roli ve strategii přežití ranných forem života na Zemi a

dosud je nezbytným předpokladem jejich přežití na exponovaných a extrémních stanovištích (NĚMEČKOVÁ et al., 2021).

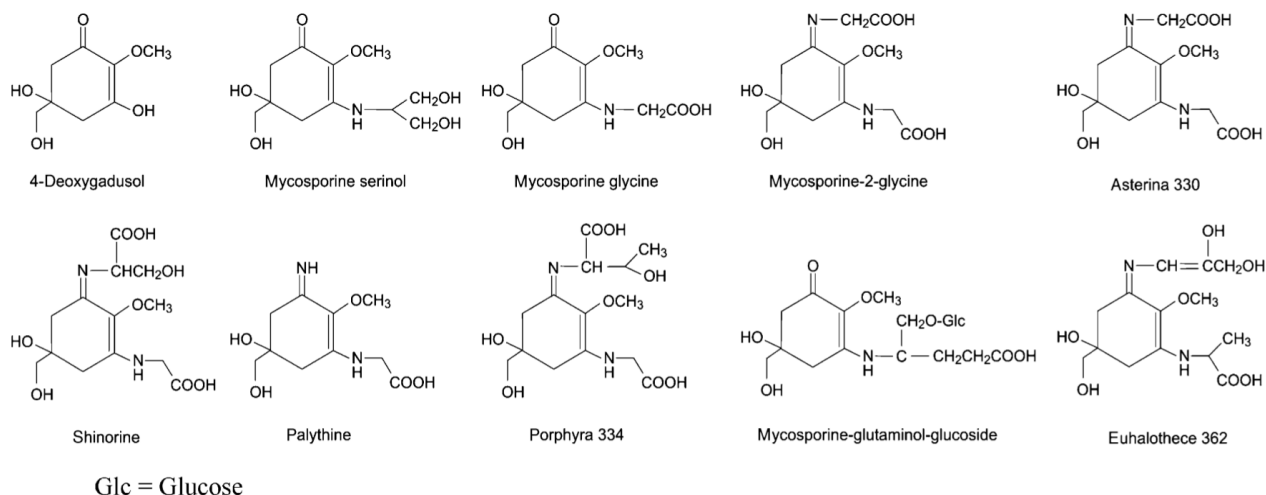
1.3.1 Mykosporiny a aminokyseliny podobné mykosporinu (MAA)

Mykosporiny a aminokyseliny podobné mykosporinu jsou ve vodě rozpustné bezbarvé látky chránící organismy před nadbytečným UV zářením. Absorbují UV-A a UV-B záření a rozptylují jeho energii ve formě tepla. Silnější absorpci v UV oblasti spektra mají mezi 310 a 360 nm (GARCIA-PICHEL & CASTENHOLZ, 1993). Mykosporiny jsou látky, které sdílejí 5-hydroxy-5-hydroxymethyl-cyklohex-1,2-enový kruh a mají methoxy-substituent na C2 (Obrázek 1; OREN, 2007). Na C3 jsou substituovány aminosloučeninou a v C1 buď oxo nebo imino skupinou. Případný rozdíl v absorpci UV spektra je dán změnami na připojené boční skupině a substituenty dusíku. Někdy se termín „mykosporin“ používá pro látky, které mají keton na C1 (také známé jako oxo-mykosporiny nebo monosubstituované mykosporiny). Většina MAA je stabilních, ale některé typy mohou podléhat fotosenzibilizované hydrolýze. MAA se typicky akumulují jako rozpuštěné látky v cytoplazmě, ale deriváty kovalentně vázané na oligosacharidy mohou být vylučovány i do slizového obalu buňky. Obsah mykosporinu často dosahuje několika procent buněčné sušiny produkujícího organismu (GAO & GARCIA-PICHEL, 2011). V jedné z raných studií (SIVALINGAM et al., 1976) bylo navrženo, že MAA mohou zvyšovat účinnost fotosyntézy, což však dosud nebylo potvrzeno. MAA jsou pouze slabě fluorescenční, pokud vůbec mají tuto schopnost, a jsou obecně nejhojnější v prostředí s vysokým ozářením, kde světelná energie není limitujícím faktorem pro fotosyntézu (GAO & GARCIA-PICHEL, 2011).

Mykosporiny byly původně detekovány v myceliu bazidiomycet, u kterého byla vyvolána sporulace expozicí UVB záření. Vyskytují se v široké škále organismů obývajících jak vodní tak i suchozemské prostředí a kromě hub byly zaznamenány například u červených řas, mořských hvězdic, korálů, dinoflagelátů a sinic (SINHA, 2008). Zprávy o přítomnosti MAA v bakteriích jiných než sinice jsou nepodložené a neexistují žádné zprávy o jejich výskytu u archaea. Zvířata nesyntetizují MAA přímo, ale získávají je ze své stravy nebo od symbiotických mikroorganismů (GAO & GARCIA-PICHEL, 2011).

Biosyntéza MAA u sinic probíhá obvykle za pomoci 4 enzymů kódovaných v genovém klastru *mysA-D/E*. První enzym *MysA* cyklizuje seduheptulóza-7-fosfát, který je intermediátem pentózového cyklu. Výsledný intermediát je metylován O-metyltransferázou (*MysB*) a zbývající enzymy (ATP-dependentní ligáza *MysC*, a jeden z dvojice *D-Ala-D-Ala* ligáza *MysD* nebo neribozomální peptidová syntetáza *MysE*) propojuje výsledný produkt s určitými

aminokyselinovými zbytky podle toho, o jaký konkrétní MAA se jedná (BALSKUS & WALSH, 2010).



Obrázek 1. Chemická struktura mykosporinu a aminokyselin podobných mykosporinu (MAA). (OREN, 2007).

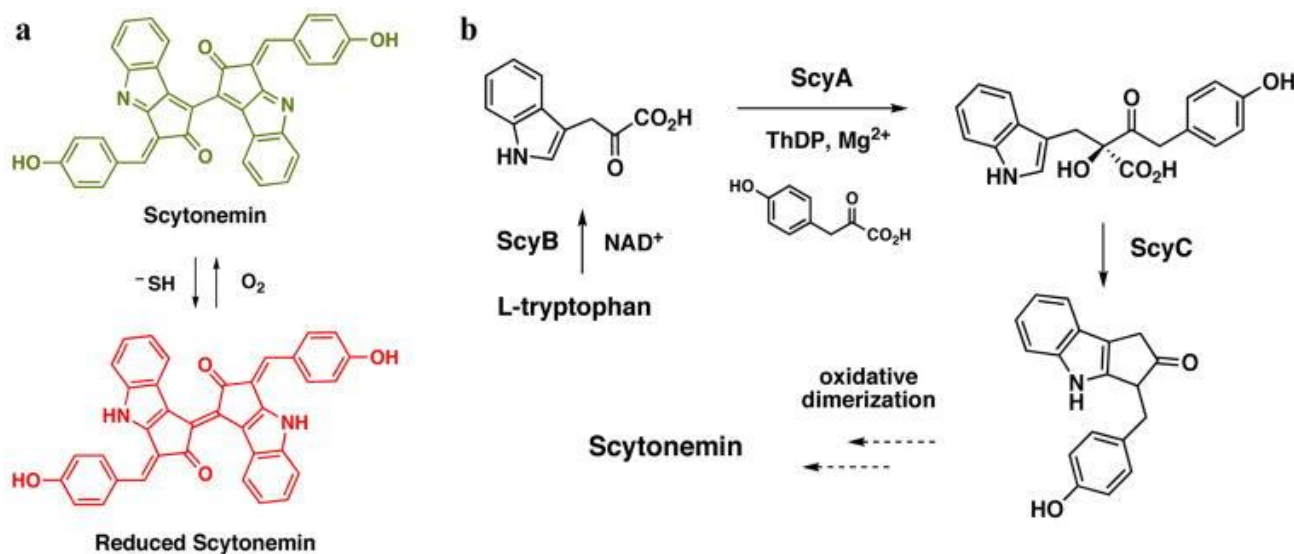
1.3.2 Scytonemin

Scytonemin je žlutý až hnědý, velmi stabilní pigment, který se vylučuje a ukládá v extracelulárních polysacharidových obalech, výhradně u některých sinic (D'AGOSTINO et al., 2019). Tvoří stabilní ochrannou vrstvu, která je účinná při stínění buněk před UV-A a modrým zářením, neabsorbuje však zelené ani červené světlo, které je potřebné pro fotosyntézu. Je sekundárním metabolitem syntetizovaným sinicemi výhradně v reakci na UV-A záření o vlnové délce 315-400 nm, ale je schopen absorbovat také UV-C (max = 250 nm) a UV-B (280-320 nm). Komplexní aromatické struktury s distribucí konjugovaných dvojných vazeb (Obrázek 2a) umožňují silnou absorpci v oblasti UV-A s maximem okolo 370 nm. Bylo také zjištěno, že jeho biosyntézu může pozotivně ovlivnit komplex environmentálních stresových faktorů jako salinita, vysychání, teplota a limitace dusíkem. Samotný stres neindukuje syntézu scytoneminu, ale může zvýšit jeho hladinu dosaženou během indukce UV-A (GAO & GARCIA-PICHEL, 2011).

Chemická struktura scytoneminu byla poprvé popsána v roce 1993 (PROTEAU, 1993). Je to v tučích rozpustný dimer, který je složen z indolových a fenolických podjednotek, o molekulové hmotnosti 544 Da. Dvě podjednotky spojuje olefinický atom uhlíku (SINHA, 2008).

Jeho název podle IUPAC je 3-[(4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)methyl]-1-[2-oxo-3-[(4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)methyl]-4H-cyklopenta[b]indol-1-yl]-4H-cyklopenta[b]indol-2-on, molekulární vzorec $C_{36}H_{20}N_2O_4$ (PATHAK, 2020). Pro scytonemin jsou známy dva

redoxní stavy: běžnější oxidovaná žlutá forma, která byla pojmenována fuscochlorin a červená redukovaná forma - fuscorhodin (Obrázek 2a).



Obrázek 2. a) Struktura redukované a oxidované formy scytoneminu. b) Schéma biosyntézy scytoneminu. Podle BALSUS et al. (2011).

Scytonemin lze snadno detekovat mikroskopickým pozorováním a byl popsán u více než 300 druhů sinic. Je běžný u přírodních populací, které jsou vystaveny vysokému ozáření a často současně extrémním podmínkám prostředí, jako je opakované vysychání nebo nízké teploty a omezení dostupnosti živin (NĚMEČKOVÁ et al., 2021). Scytonemin dosud nebyl nalezen v planktonních populacích, v mořských nebo submerzních sladkovodních populacích. Jeho obsah může u pěstovaných izolátů dosahovat až 5 % sušiny buněk (GAO & GARCIA-PICHEL, 2011).

Scytonemin je rozšířen napříč celou linií sinic, což znamená že tento pigment mohl být produkován již jejich společným předkem (GARCIA-PICHEL & CASTENHOLZ, 1991). Výsledky fylogenetických analýz a molekulárního datování klastřů biosyntetických genů scytoneminu naznačují prekambričský původ tohoto UV-protektivního pigmentu (GARCIA-PICHEL et al., 2019; TAMRE & FOURNIER, 2022). Biosyntéza scytoneminu je kódována genovým klastrem sestávajícím ze tří konzervovaných genů *scyA-C* (BALSUS et al., 2011). Enzym ScyB katalyzuje konverzi L-tryptofanu na 3-indolpyruvát, který je následně kovalentně vázán za pomoci ScyA na *p*-hydroxyfenylpyruvát. Zbývající enzym ScyC katalyzuje cyklizaci výsledného produktu, který je monomerním scytoneminem; k dokončení biosyntézy je nezbytná jeho oxidativní dimerizace (Obrázek 2b).

1.3.3 Gloeocapsin

Dalším sinicovým ochranným pigmentem proti UV záření je gloeocapsin, který se obvykle vyskytuje ve slizových obalech sinic rodu *Gloeocapsa* (JAAG, 1945) ale také byl zřejmě nalezen v rodech *Solentia*, *Hyella* a *Hormathonema* (STORME et al., 2015). NÄGELI a SCHWENDERER (1877) jako první pozorovali a pojmenovali tento pigment podle taxonu *Gloeocapsa*.

Definice gloeocapsinu je založena na jeho schopnosti měnit barvu podle pH prostředí, od modré a fialové v alkalických podmínkách až po červenou v kyselém prostředí (JAAG, 1945). Srovnání reakce tohoto barviva na prostředí bylo podrobně experimentálně zaznamenáno například v diplomové práci DADÁKOVÁ (2017). Autorka ve své studii popsala změnu barevných pigmentů od červené barvy v kyselém prostředí (při pH 4 a pH 5), přes fialovou v cirkumneutrálním prostředí (při pH 6 a pH 7), až po modrou v alkalickém prostředí (při pH 8 a pH 9) u druhů *Gloeocapsa alpina* a *G. atrata*. Experiment byl proveden pomocí inkubace jednotlivých kolonií sinice v pufru o daném pH. Inkubace probíhala 12 až 16 hodin při teplotě 20 °C. Pomocí promývání jednotlivých kolonií v pufrch od pH 9 do pH 4 a poté zpět do pH 9 bylo také potvrzeno, že tato reakce změny barvy pigmentu je vratná.

Pigment gloeocapsin je však jinak velmi málo prozkoumán. První (a dosud jediná) spektroskopická charakterizace gloeocapsinu byla provedena pomocí Ramanovy mikrospektroskopie na koloniích *G. alpina* a *Solentia paulocellulare* (STORME et al., 2015), a později bylo toto měření zopakováno v extraktu ze sinice *Phormidesmis nigrescens* (LARA et al., 2022) a v přírodních vzorcích s vysokým zastoupením rodu *Gloeocapsa* (NĚMEČKOVÁ et al., 2021). Pokus o charakterizaci extraktu *P. nigrescens* pomocí kapalinové chromatografie s propojením na hmotnostní spektrometr (LC-MS) přinesl rozporuplná data a strukturu gloeocapsinu se autorům nepodařilo objasnit (LARA et al., 2022).

Na rozdíl od scytoneminů přesná chemická struktura a biosyntetická dráha gloeocapsinu dosud nebyla charakterizována. Tento nedostatek znalostí je především dán absencí kultivovaných kmenů produkujících gloeocapsin, a tedy nemožností získat dostatečné množství purifikovaného pigmentu (GRANT & LOUDA, 2013). Studium gloeocapsinu je tak omezeno malým množstvím biomasy dostupné v přírodních vzorcích. Diagnóza gloeocapsinu byla dosud založena pouze na výše uvedené schopnosti pigmentované pochvy sinic měnit barvu společně se změnou pH (PENTECOST & WHITTON, 2012). Na základě mapování pigmentovaných slizových obalů oproti cytoplazmě buňek rodu *Gloeocapsa* pomocí rastrovací Ramanovy mikrospektrometrie (STORME et al., 2015) se předpokládá, že gloeocapsin by mohl být derivátem parietinu, neboť s ním sdílí hlavní peaky Ramanovského spektra. Parietin je

sekundární metabolit lišejníků, který je však žlutohnědě zbarven a nevykazuje stejné barevné změny při změně pH jako gloeocapsin (GAUSLAA & USTVEDT, 2003). UV spektrometrická analýza extraktů z r. *Gloeocapsa* také ukázala, že gloeocapsin a parietin sdílejí fotoprotektivní charakteristiky (absorpci UV) (STORME et al., 2015), mohlo by se tedy jednat o derivát parietinu lišící se konformací nebo přítomností některých funkčních skupin. Vzhledem k výše uvedeným faktům je také možné, že za změnou barvy pigmentovaných slizových obalů u rodu *Gloeocapsa* nestojí pouze jediná chemická látka, ale směs pigmentů, jejichž společná reakce na změnu pH se takto manifestuje.

1.4. Cíle práce

Cílem této práce je vlastnoručně odebrat biomasu přírodních vzorků s dominantou sinic rodu *Gloeocapsa* obsahujících gloeocapsin (které mají fialovou až černou barvu), ze kterých budou následně izolovány jednotlivé kolonie. Pro potvrzení taxonomické identity jednotlivých kolonií bude provedena mikroskopická analýza a sekvenace genu pro 16S rRNA. Konečným cílem je získat sekvence celého genomu vybraných taxonů s použitím amplifikace a sekvenace DNA z jednotlivých kolonií. Tato data budou v navazující práci využita k identifikaci genů pro biosyntézu gloeocapsinu.

2. Metody

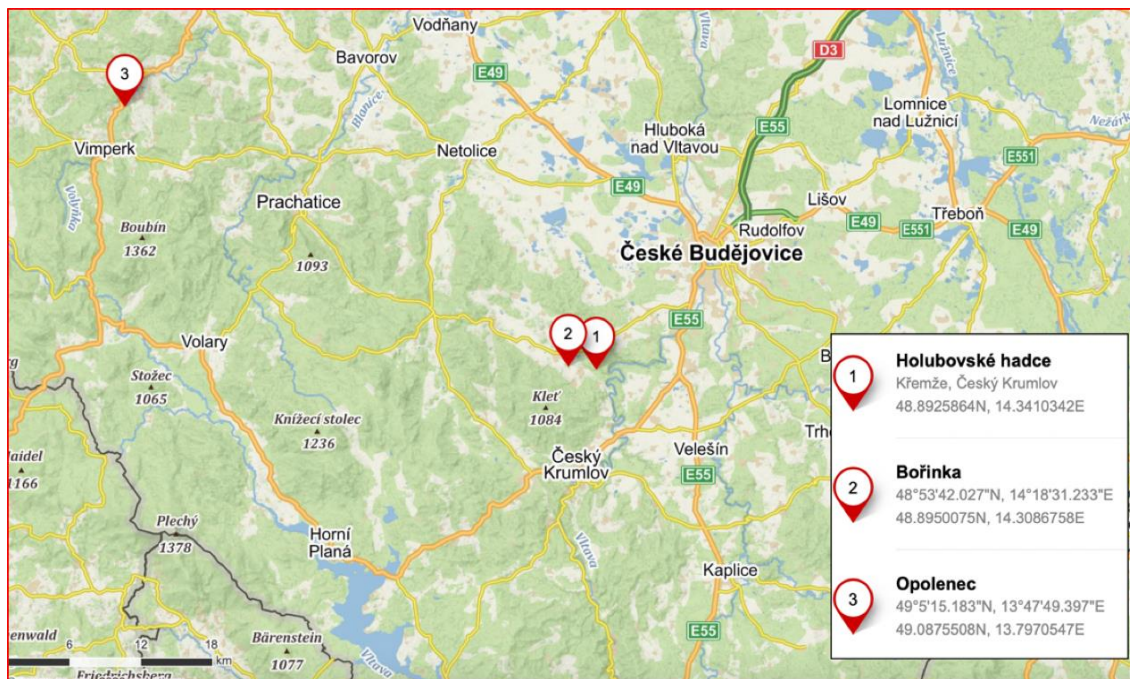
2.1 Odběry vzorků

Odběr epilithických nárostů sinic byl proveden seškrabem pomocí čistého nože ze substrátu (obnažené horniny) do Eppendorf zkumavky o objemu 2 ml, a to celkem na třech různých lokalitách v Jihočeském kraji (kapitola 2.1.1). Celkem bylo odebráno 26 vzorků, ve kterých byla přímo v terénu s použitím přenosného terénního mikroskopu Newton Nm1 (Newton Microscopes Ltd.) zaznamenána přítomnost kolonií rodu *Gloeocapsa* modré až (černo)fialové barvy a pro další analýzu byly uchovány pouze vzorky, kde byly tyto druhy přítomny (Tabulka 1).

Všechny vzorky byly po návratu do laboratoře šetrně usušeny na filtračním papíře a následně skladovány při pokojové teplotě v papírových obálkách v plastové krabičce. Kolonie r. *Gloeocapsa* lze vzhledem k jejich přirozené adaptaci na periodické vysychání snadno skladovat ve vysušeném stavu, aniž by došlo k poškození buněk a při následné práci se vzorky je lze opět rehydratovat přidáním kapky vody nebo pufu.

2.1.1 Lokality

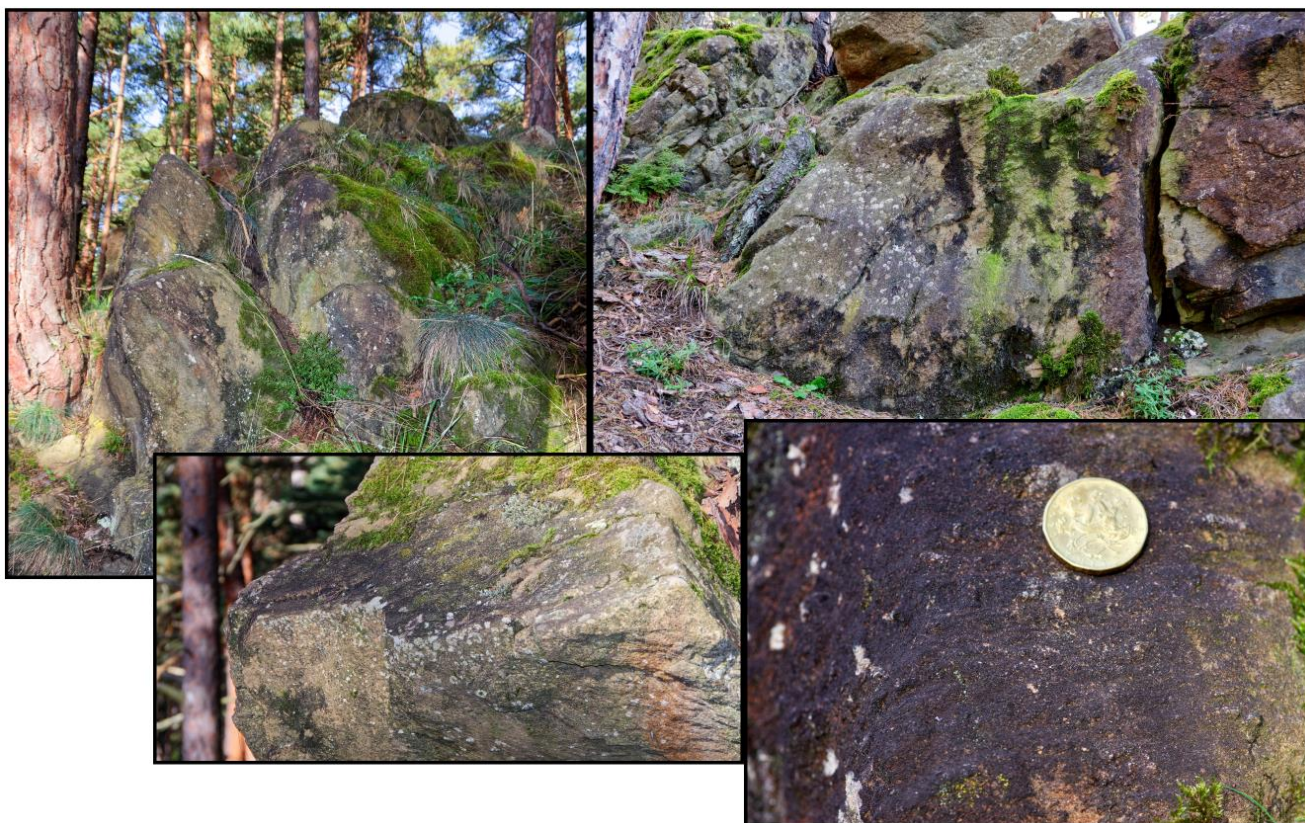
Podle předchozí studie epilitických sinic z jižních Čech (HAUER, 2007) byly vybrány následující tři lokality se skalními výchozy a převahou vápencových a hadcových substrátů, kde autor studie zaznamenal hojný výskyt cílových druhů (Obrázek 3).



Obrázek 3. Umístění lokalit na mapě jižní části České Republiky (zdroj: Mapy.cz).

2.1.1.1 Holubovské hadce

Přírodní rezervace se nachází v Jihočeském kraji, okrese Český Krumlov, mezi obcí Holubov a řekou Vltavou. Geologie jižní a jihovýchodní části, kde byly odebírány vzorky, se skládá z krystalických vápenců a serpentinitu (Obrázek 4; ČESKÁ GEOLOGICKÁ SLUŽBA, 1998). Holubovské hadce mají nadmořskou výšku okolo 470 m.n.m. Podle studie HAUERA (2007) ze sinic v této lokalitě převládají *Aphanothece castagnei*, *Gloeocapsopsis dvorakii* a druh, který nás zajímá - *Gloeocapsa violascea*.



Obrázek 4. Holubovské hadce, epilithické nárosty sinic.

2.1.1.2 Opolenec

Opolenec je přírodní rezervace v okrese Prachatice v jižních Čechách. Nachází se v krajině nižšího Šumavského podhůří, lokalitu tvoří menší lesní komplex a drobné louky a skály na pravé straně údolí Volyňky a má nadmořskou výšku okolo 620 m.n.m. Z geologických materiálů zde převládají krystalické vápence (mramor), které jsou uloženy v kyselých horninách (Obrázek 5) (ČESKÁ GEOLOGICKÁ SLUŽBA, 1998). Podle studie HAUERA (2007) jsou pro tuto lokalitu charakterističtí zástupci sinicové vegetace jako *Leptolyngbya* sp., *Pseudanabaena* cf. *spelaea*, *Chlorogloea microcystoides*, *Chroococcus spelaeus*, *Entophysalis atroviolacea*, *Gloeocapsopsis dvorakii*, *Gloeocapsopsis pleurocapsoides*, *Nostoc* cf. *microscopicum*, *Hassallia byssoidea*, *Tolypothrix elenkinii*, *Scytonema crustaceum* nebo *Stigonema panniforme*. Z taxonů zajímavých pro tuto práci byly na této lokalitě nalezeny druhy: *Gloeocapsa atrata*, *G. nigrescens*, *G. novacekii* a *G. violascea*.



Obrázek 5. Opolenec, epilithické nárosty sinic.

2.1.1.3 Bořinka

Tato lokalita byla vybrána jako doplňková, protože se nachází poblíž Holubovských hadců a školitel předpokládal, že se zde také vyskytují skalní výchozy s nárosty sinic. Přírodní rezervace se nachází poblíž města Křemže, podél jižního břehu Křemžského potoka. PR Bořinka se nachází na hadcovém podkladu a má nadmořskou výšku 486 az 515 m.n.m. a souřadnice 48°53'42.027"N, 14°18'31.233"E. Ze zajímavých druhů pro tento výzkum byl odebrán pouze jeden vzorek s dominantou *Gloeocapsa novacekii* (Tabulka 1) a nebyla zde pořizována fotografická dokumentace.

2.2 Mikroskopická analýza

Mikroskopický rozbor sinic přítomných v odebraných vzorcích (Tabulka 1) byl proveden pomocí mikroskopu Olympus BX51 vybaveného Nomarského DIC při zvětšení 100×–400× a druhy byly dokumentovány digitálním fotoaparátem Olympus DP-72 (Olympus, Tokyo, Japonsko) v programu Olympus cell Sens Standard v. 2.1 a determinovány podle klíče KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1998).

2.3 Izolace jednotlivých kolonií

Izolace byla provedena v místnosti sterilizované přes noc germicidní UV zářivkou a na pracovní ploše otřené ethanolem, s použitím invertovaného mikroskopu Olympus IX71 (Olympus, Tokyo, Japonsko) při zvětšení 200×-400×.

Vysušený materiál sinic byl rozdrcen na sterilním podložním sklíčku v TE pufru (pH 7,2). Vzhledem k velikosti jednotlivých kolonií buněk byla vybrána metoda izolace s použitím tenké mikrokapiláry (MAREŠ et al., 2015). Izolace se provádí tak, že vybranou kolonii separujeme ze vzorku pomocí kapiláry a následně promyjeme v alespoň 3 až 5 kapkách sterilního TE pufru tak, aby v čisté kapce zůstala pouze vybraná kolonie. Izolovaná kolonie byla překryta krycím sklíčkem, zkontrolována její přítomnost a zároveň byla vyfotografována pod mikroskopem digitálním fotoaparátem Olympus DP-72 (Olympus, Tokyo, Japonsko). Poklepáním pinzety na krycí sklíčko v místě, kde se nachází kolonie, byla částečně narušena její stěna, kolonie praskla a jednotlivé buňky tak byly exponovány vůči okolnímu roztoku. Po odstranění krycího sklíčka byla kolonie opět lokalizována pod mikroskopem a pomocí kapiláry společně s co nejmenším objemem pufru přenesena do sterilní PCR zkumavky o objemu 0,2 ml a skladována na ledu během zpracování ostatních kolonií. Po ukončení práce byly vzorky uchovávány v laboratorním mrazáku při teplotě -20°C po dobu několika hodin až dnů před dalším zpracováním.

2.4 MDA amplifikace genomu

MDA neboli “multiple displacement amplification” je metoda, která umožňuje stejnorodou amplifikaci celého genomu izolovaných buněk. Je k ní zapotřebí velmi malého množství startovního materiálu. Práce probíhala v laminárním boxu (Telstar Clean Air) s veškerým náčiním sterilizovaným pomocí germicidní UV zářivky.

Pro amplifikaci byl použit postup dle protokolu přiloženého ke kitu REPLI-g Mini od firmy Qiagen. Nejprve byl připraven zásobní roztok DLB pufru přidáním 500 µl destilované vody k lyofilizovanému DLB pufru. Poté byl připraven pufr D2 smícháním 55 µl připraveného DLB pufru a 5 µl roztoku DTT (dithiothreitol) o koncentraci 1M. Celkový objem takto připraveného pufru o 60 µl vystačí na 15 vzorků. Ve zkumavkách s izolovanými koloniemi sinic bylo smícháno 2,5 µl PBS s přibližně 0,5 µl vzorku a směs krátce stočena ve stolní minicentrifuze. Poté bylo přidáno 3,5 µl pufru D2, tato lyzační směs byla jemně zvortexována a inkubována na ledu po dobu 10 min. Během této doby byl připraven polymerázový mix na ledu smícháním 10 µl destilované vody, 29 µl REPLI-g Mini Reaction Buffer, a 1 µl REPLI-g Mini DNA Polymerase (celkem 40 µL pro každý vzorek). Po 10 minutách je třeba dodat do každé zkumavky 3,5 µl Stop

Solution k ukončení lyze buněk, krátce promíchat s použitím vortexu a zcentrifugovat. Ke každému vzorku lyzovaných buněk s uvolněnou DNA o objemu 10 μ l bylo přidáno 40 μ l polymerázového mixu z předchozího kroku a směs inkubována při 30 °C po dobu 10-16 hodin; amplifikace je následně ukončena denaturačním krokem po dobu 5 min při 65 °C (Tabulka 2).

Tabulka 2. Program do termocykleru pro MDA*.

Cyklus č.	Teplota [°C]	Čas [min]
1	30	960
2	65	5
stop	4	-

*teplota víka termocykleru je nastavena na 70°C.

2.5 Amplifikace (PCR) genu pro 16S rRNA

Pro kontrolu kvality úspěšně amplifikovaných MDA produktů byla provedena amplifikace genu pro 16S rRNA pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR).

Práce probíhala v PCR boxu, který byl předem sterilizován UV zářením. Každá reakce sestávala z celkem 25 μ l směsi, z toho polovinu (12,5 μ l) tvořil komerčně dostupný polymerázový mix (2xPlain PP Master Mix, Top-Bio, s.r.o., Paha). Na přípravu master mixu bylo dále použito poměrně na každý vzorek 0,6 μ l primeru 16S378F a 0,6 μ l primeru 16S1494r podle TATON et al. (2003) o koncentraci 10 pmol/ μ l a 11,3 μ l destilované vody. Do zkumavek nakonec přidáme 1 μ l MDA produktu obsahujícího templátovou DNA a 24 μ l PCR master mixu. Po promíchání směsi byly PCR zkumavky vloženy do termocykleru a byl vybrán následující program (Tabulka 3):

Tabulka 3. Program do termocyklieru pro PCR s primery 16S378F-16S1494r.

cyklus č.	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet opakování
1	94	5	1
2	94	1	38
	54	1	
	72	1,5	
3	72	10	1

2.6 Přečištění PCR produktů a jejich sekvenace

Úspěšně amplifikované vzorky po PCR pro 16S rRNA gen byly přečištěny pomocí metody ExoSAP (WATANABE et al., 2010). Do zkumavky s PCR produktem byla přidána směs exonukleázy I a termosenzitivní alkalické fosfatázy (Thermo Fisher Scientific) v poměru 1:1 (0,4 µl směsi na každých 10 µl vzorku). Výsledná směs byla vložena do termocyklieru a byl spuštěn program ohřevu na 37 °C po dobu 30 min a denaturace při 85 °C po dobu 15 min. Po skončení programu bylo z každého vzorku do dvou zkumavek odpipetováno 7,5 µl. Poté bylo do jedné z nich přidáno 2,5 µl primeru 16S378F a do druhé 2,5 µl primeru 16S1494r o koncentraci 10 pmol/µl. Výsledné vzorky s přečištěnými PCR produkty a primery byly odeslány do společnosti SeqMe (Dobříš, Česká Republika) na sekvenaci templátu Sangerovou metodou z obou stran pomocí výše uvedených forward a reverse primerů.

Hrubá data ze sekvenátoru byla složena pomocí programu Geneious Prime 2022.2.2. (Biomatters Ltd., Auckland, Nový Zéland) funkcí *de novo* assembly a na základě porovnání získaných dat s databází GenBank pomocí Nucleotide BLAST (National Center for Biotechnology Information) bylo zkontrolováno, zda ve vzorcích byly přítomny sinice rodu *Gloeocapsa*.

2.7 Analýza 16S rRNA sekvencí

Jako závěrečná kontrola úspěšnosti amplifikace genomu z kolonií rodu *Gloeocapsa* byla provedena analýza podobnosti získaných sekvencí genu pro 16S rRNA v rámci jednotlivých vzorků a jejich následná základní fylogenetická analýza.

Jako úspěšné byly vyhodnoceny vzorky, u kterých se podařilo získat alespoň 3 nezávislé sekvence 16S rRNA genu stejného druhu (morfortypu) rodu *Gloeocapsa* o vzájemné identitě $\geq 99\%$. Podobnost sekvencí byla vyhodnocena funkcí *Distances* v programu Geneious Prime, která vypočte párovou p-distanci na základě matice alignovaných sekvencí. Sekvence pro tyto účely i pro účely fylogenetické analýzy byly alignovány algoritmem MAFFT verze 7 (KATOH & STANDLEY, 2013) a alignment byl manuálně zkontrolován.

Sekvence genu pro 16S rRNA pro fylogenetickou analýzu byly alignovány společně s nejbližšími sekvencemi z databáze NCBI (na základě BLAST analýzy), všemi sekvencemi dostupných kmenů sinic z řádu Chroococcidiopsidales přítomnými v databázi NCBI a delšími než 1000 bp a dalšími vybranými sekvencemi sinic na základě literatury (STRUNECKÝ et al., 2023; NĚMEČKOVÁ, 2023). Fylogenetická analýza byla provedena z vytvořeného alignmentu metodou Maximum Likelihood pomocí RaxML v. 8 (STAMATAKIS, 2014) v programu Geneious Prime. Při analýze byl aplikován substituční model GTR+I+G a pro stanovení podpory větví bylo provedeno 500 bootstrapových pseudoreplikací.

2.8 Analýza genomu

Byla provedena sekvenace draftu celého genomu u čtyř vybraných vzorků (3.1, 7.8, 8.6 a 20.11) na platformě Illumina HiSeq pomocí metody Paired End o délce čtení 250 bp (1.2 Gbp/vzorek). Paired-end sekvenování umožňuje sekvenovat oba konce fragmentu DNA; v případě, že jsou použity krátké fragmenty, je sekvenován dopředný i zpětný řetězec, což zvyšuje přesnost sekvenování a délku spojitě sekvenovaného úseku. Sekvenaci provedla firma SeqMe, s.r.o. (Dobříš). Výsledná data byla zbavena sekvencí adaptorů pomocí programu BBDUK (BUSHNELL, 2014) a následně složena pomocí SPAdes 3.12 s použitím single cell option (BANKEVICH et al., 2012). Následně byl proveden manuální binning získaných contigů o délce >1000 bp na základě výsledku hromadné analýzy BLASTp všech kódovaných proteinů. Kódované proteiny byly v celém genomu predikovány pomocí programu Prokka v. 1.12 (SEEMANN, 2014) a jejich peptidové sekvence blastovány pomocí nástroje USEARCH v. 11 (EDGAR, 2010). Jako cílové contigy byly ponechány ty, u kterých výsledky analýzy ukázaly taxonomické zařazení nejpodobnějších sekvencí mezi sinice (databáze NCBI RefSeq) a jejich

procentuální zastoupení GC bazí přibližně odpovídalo očekávanému zastoupení v celém genomu. Odhadovaná kompletnost a další parametry výsledných genomů byly získány pomocí programu CheckM v. 1.1.6 (PARKS et al., 2015).

3. Výsledky

3.1 Terénní odběr vzorků

Byl proveden terénní sběr epilitických nárostů sinic na třech lokalitách: PR Opolenec (8. 7. 2021), PR Holubovské hadce a PR Bořinka (9. 7. 2021). V Tabulce 1 jsou zaznamenány lokality, podloží a pozorované druhy. Celkem bylo odebráno 26 přírodních vzorků a k další analýze ponecháno 13 vzorků s dominantou rodu *Gloeocapsa*.

Tabulka 1. Seznam a popis odběrových lokalit.

č. vzorku	lokalita	podloží	nalezené druhy r. <i>Gloeocapsa</i>
3	Opolenec	vápenec	<i>Gloeocapsa novacekii</i> <i>Gloeocapsa alpina</i>
4			<i>Gloeocapsa novacekii</i> <i>Gloeocapsa</i> sp.
5			<i>Gloeocapsa</i> sp.
6			<i>Gloeocapsa novacekii</i>
7			<i>Gloeocapsa novacekii</i> <i>Gloeocapsa</i> cf. <i>compacta</i>
8			<i>Gloeocapsa violascea</i> <i>Gloeocapsa</i> sp.
9			<i>Gloeocapsa</i> spp.
10			<i>Gloeocapsa biformis</i> <i>Gloeocapsa</i> sp.

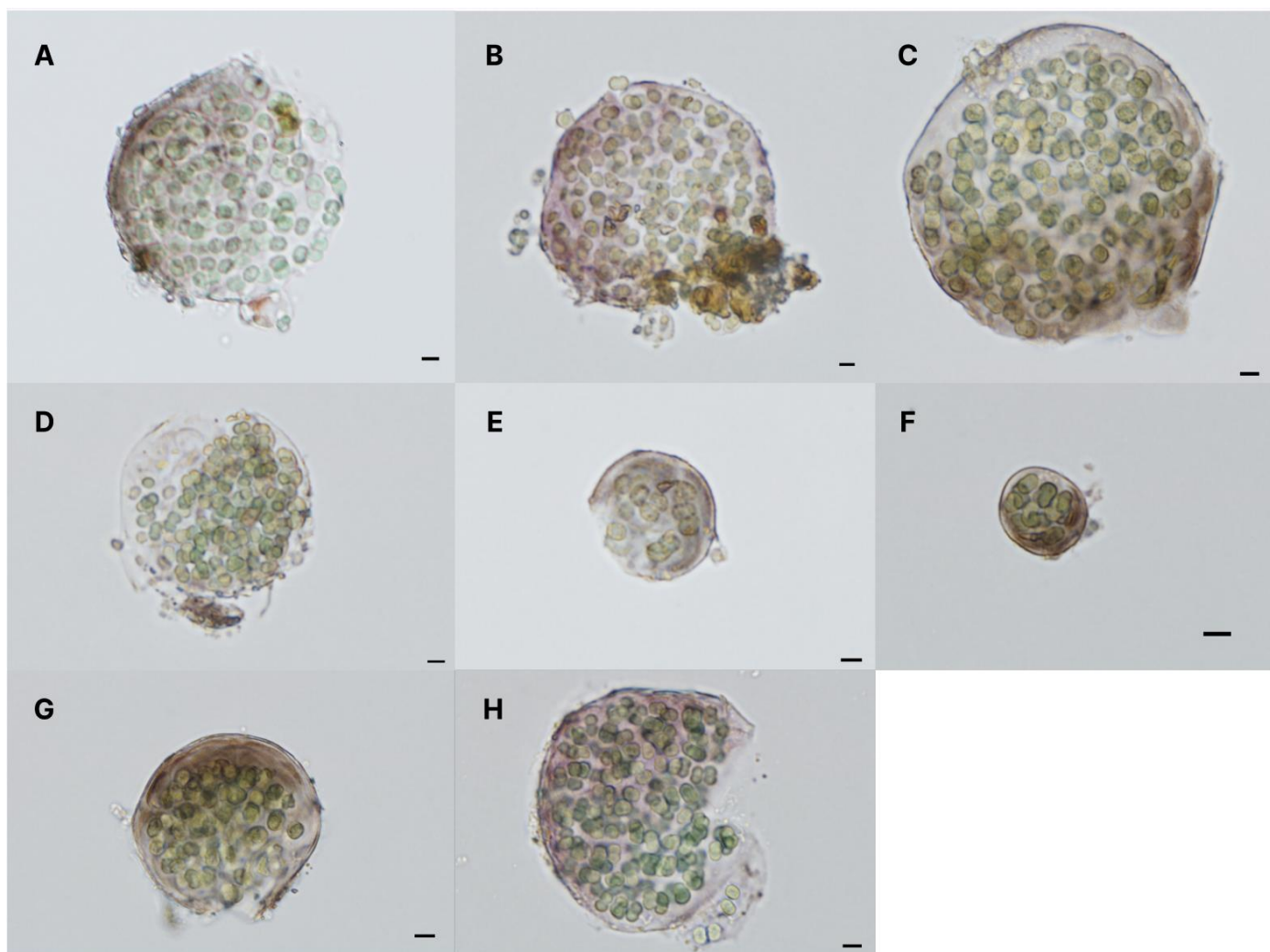
14			<i>Gloeocapsa</i> spp.
15			<i>Gloeocapsa</i> sp.
20	Holubovské hadce	hadec (příměs vápence)	<i>Gloeocapsa novacekii</i> <i>Gloeocapsa atrata</i>
22			<i>Gloeocapsa novacekii</i>
26	Bořinka	hadec	<i>Gloeocapsa</i> sp. <i>Gloeocapsa novacekii</i>

3.2 Mikroskopický rozbor vzorků a izolace potenciálních producentů gloeocapsinu.

Po pozorování všech vzorků pod mikroskopem byly vybrány vzorky s největším počtem kolonií rodu *Gloeocapsa* obsahujících modrý až (šedo)fialový pigment. Z těchto vzorků byly izolovány jednotlivé kolonie a byla provedena jejich fotodokumentace.

3.2.1 *Gloeocapsa alpina*

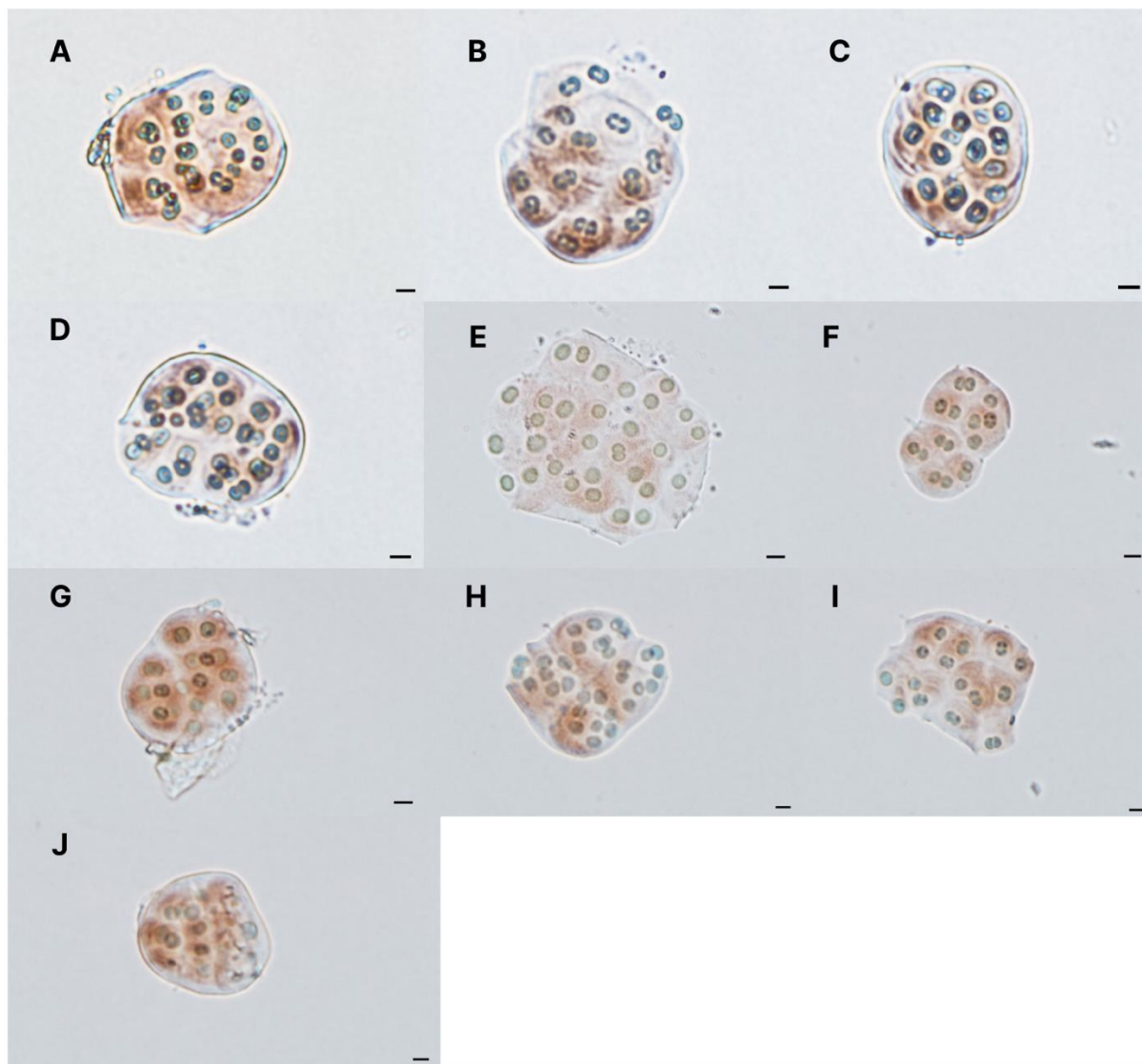
Získané nárosty tvořily mikroskopické kolonie, makroskopicky sdružené do nepravidelné nebo granulované černé masy. Kolonie byly tvořeny z modrozelených buněk o velikosti 4 až 8 μm v průměru, obalených širokým modrým nebo šedomodrým slizovým obalem s lamelami a jemnou granulací. Pro další analýzu byl vybrán vzorek č. 3 (Obrázek 6) z lokality Opolenec, z povrchu obnaženého skalního výchozu poblíž Sudslavické jeskyně.



Obrázek 6. Izolované kolonie *Gloeocapsa alpina* ze vzorku č. 3 (Opolenec). Světle fialová barva odpovídá pH pufru (7,2). **A-** vzorek 3.1; **B-** vzorek 3.2; **C-** vzorek 3.3; **D-** vzorek 3.4; **E-** vzorek 3.5; **F-** vzorek 3.6; **G-** vzorek 3.7; **H-** vzorek 3.8. Měřítko = 10 μm .

3.2.2 *Gloeocapsa novacekii*

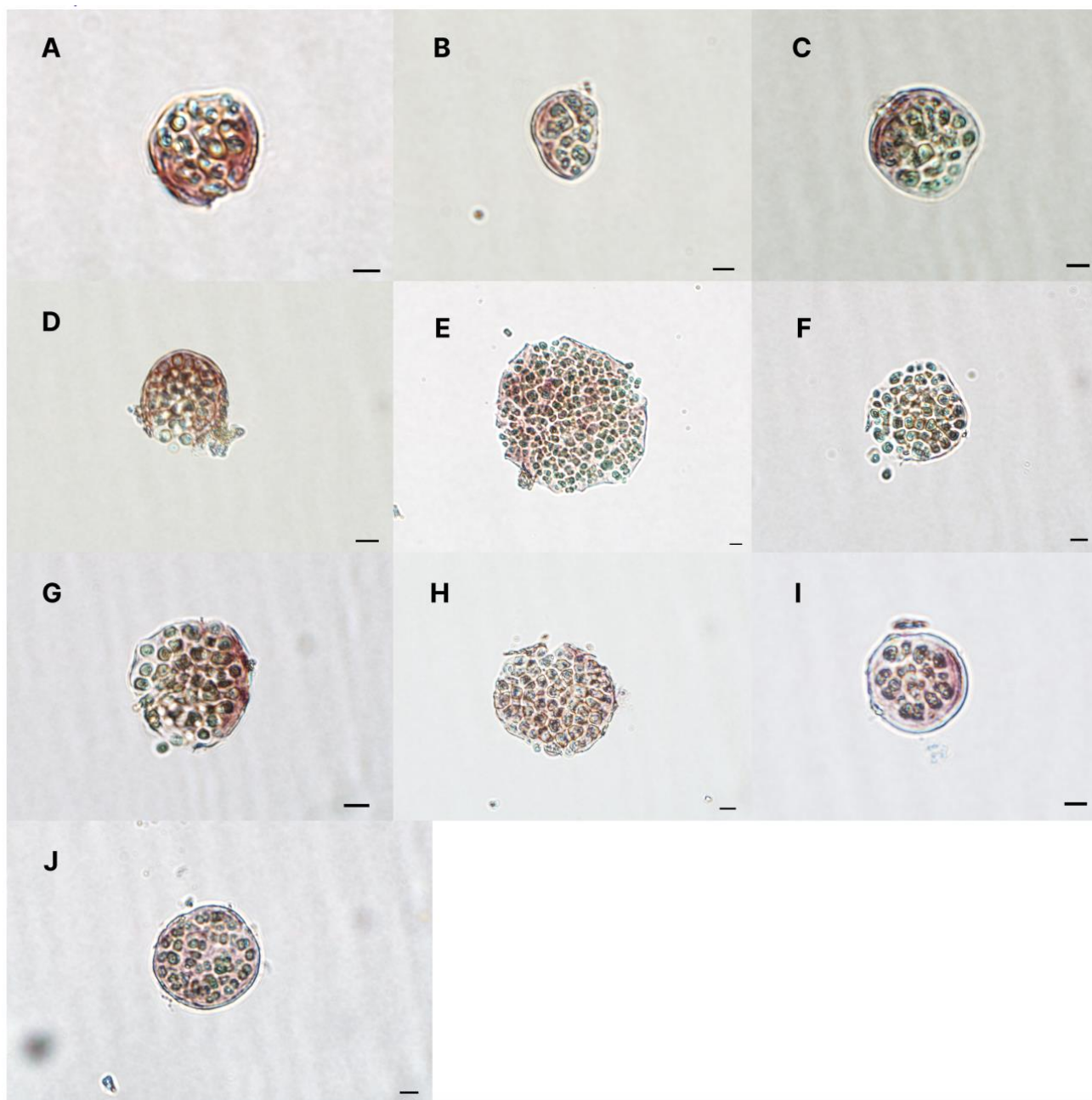
Pozorované nárosty s dominancí tohoto druhu byly obvykle granulární slizovité biofilmy červenofialové až černé barvy na povrchu obnažených skalních výchozů. Kolonie mikro- až makroskopické, rezavě červené, složené ze subkolonií, občas s bezbarvou vrstvou slizu při povrchu kolonie. Buňky kulovité, olivově zelené až modrozelené 4–9 μm v průměru. Druh se vyskytoval hojně na všech navštívených lokalitách a od ostatních druhů se lišil stabilním cihlově červeným zbarvením slizových obalů. Pro další analýzu byl vybrán vzorek č. 7 (Obrázek 9) z lokality Opolenec poblíž Sudslavické jeskyně. Jednalo se o srovnávací materiál blízce příbuzné sinice, která však neprodukuje modrý/fialový pigment reagující barevně na změnu pH.



Obrázek 9. Izolované kolonie *Gloeocapsa novacekii* ze vzorku č. 7 (Opolenec). **A-** vzorek 7.1; **B-** vzorek 7.2; **C-** vzorek 7.3; **D-** vzorek 7.4; **E-** vzorek 7.5; **F-** vzorek 7.6; **G-** vzorek 7.7; **H-** vzorek 7.8, **I-** vzorek 7.9, **J-** vzorek 7.10. Měřítko = 10 μm .

3.2.3 *Gloeocapsa violascea*

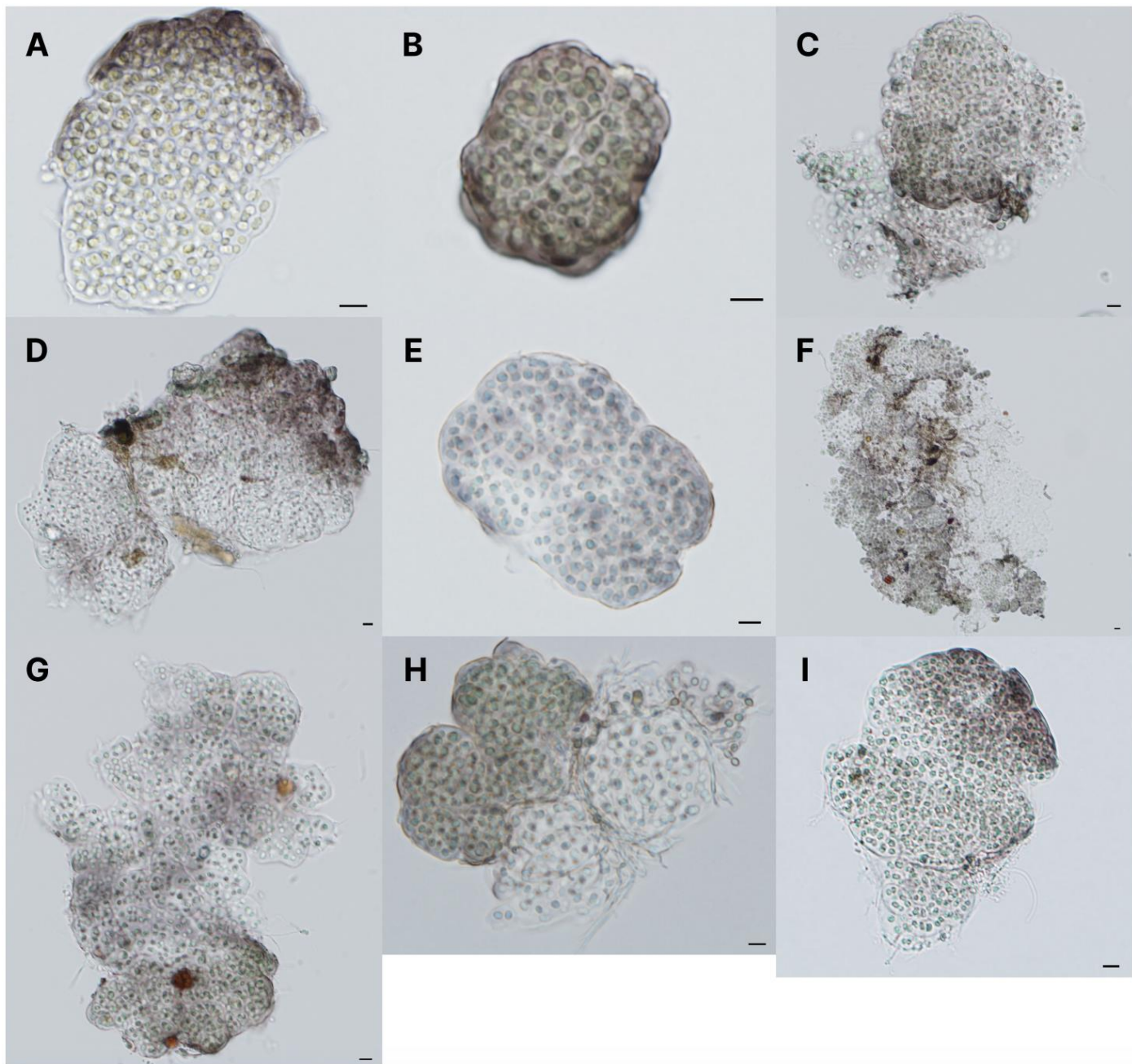
Odebrané nárosty tvořily makroskopický černý granulovaný biofilm na povrchu obnažené vápencové skály (vzorek č. 8, Opolenec, poblíž Sudslavické jeskyně). Kolonie tmavě šedofialové, buňky světle modrozelené, 3–6 μm v průměru. Oproti předchozím druhům byla velikost buněk v průměru o něco nižší, barva slizu nebyla modravá ale spíše černofialová a sliz byl obvykle hustěji vyplněn buňkami (Obrázek 7).



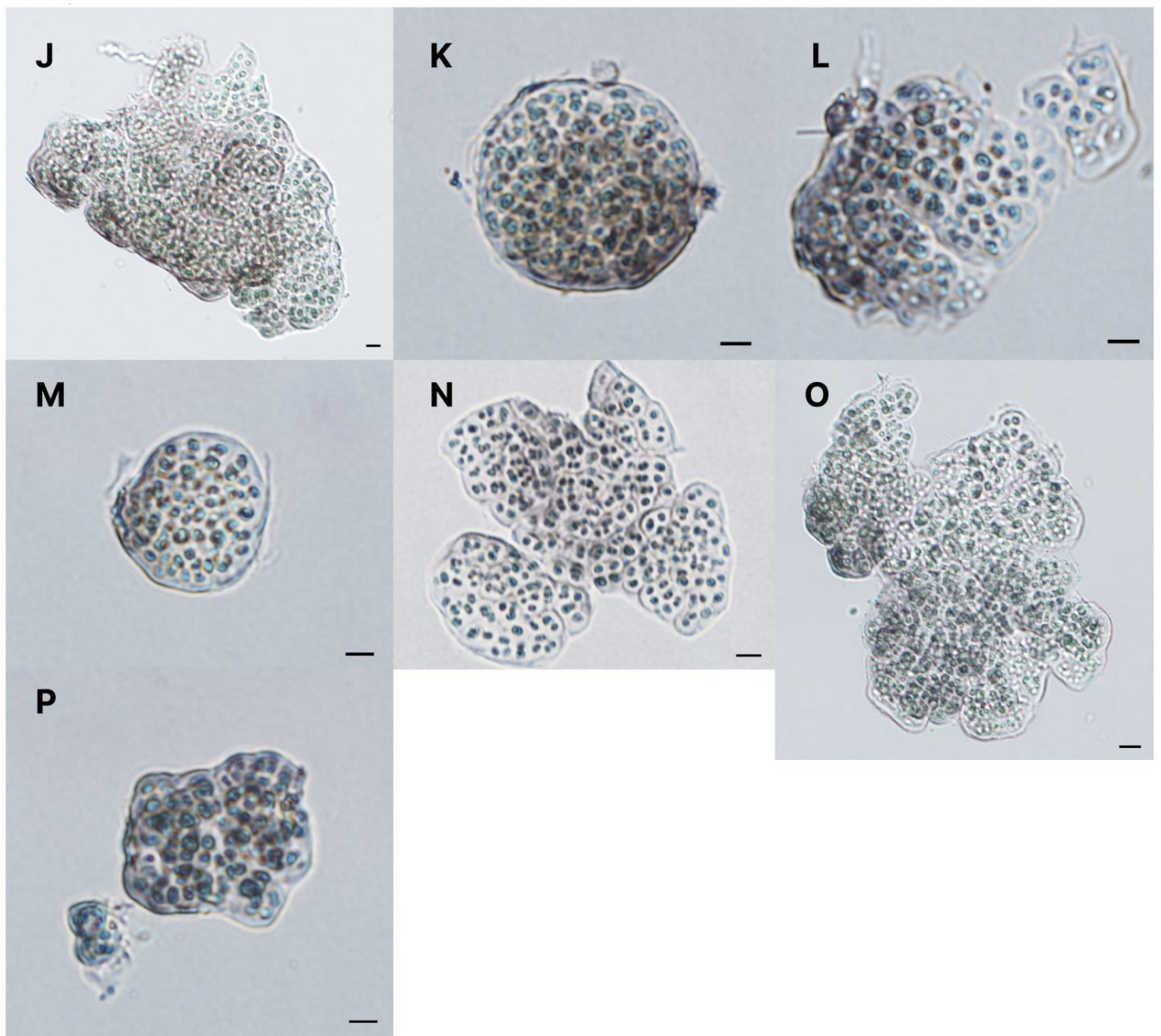
Obrázek 7. Izolované kolonie *Gloeocapsa violascea* ze vzorku č. 8 (Opolenec). Světle fialová barva odpovídá pH puftru (7,2). **A-** vzorek 8.1; **B-** vzorek 8.2; **C-** vzorek 8.3; **D-** vzorek 8.4; **E-** vzorek 8.6; **F-** vzorek 8.7; **G-** vzorek 8.8; **H-** vzorek 8.9, **I-** vzorek 8.10, **J-** vzorek 8.11. Měřítko = 10 μm .

3.2.4 *Gloeocapsa atrata*

Nalezené kolonie byly součástí souvislého vláknitého černého nárostu sinic na povrchu hadcové skály porostlé mechy (vzorek č. 20, Holubovské hadce). Kolonie spíše nepravidelného tvaru, větších rozměrů a černavého zbarvení, zejména při okraji kolonie (Obrázek 8a, 8b). Buňky nepravidelně rozmístěné v celé hmotě kolonie, o průměru 3–6 μm .



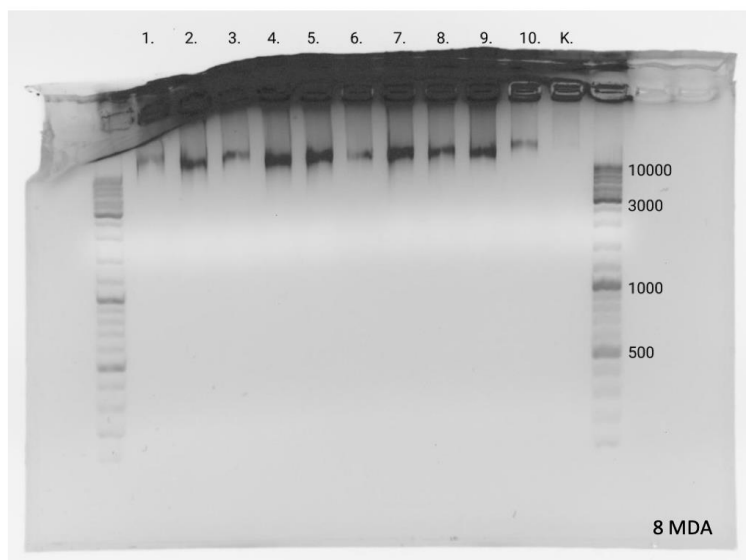
Obrázek 8a. Izolované kolonie *Gloeocapsa atrata* ze vzorku č. 20 (Holubovské hadce). Světle fialový odstín odpovídá pH pufri (7,2). **A-** vzorek 20.1; **B-** vzorek 20.2; **C-** vzorek 20.3; **D-** vzorek 20.4; **E-** vzorek 20.5; **F-** vzorek 20.6; **G-** vzorek 20.7; **H-** vzorek 20.8, **I-** vzorek 20.9. Měřítko = 10 μm .



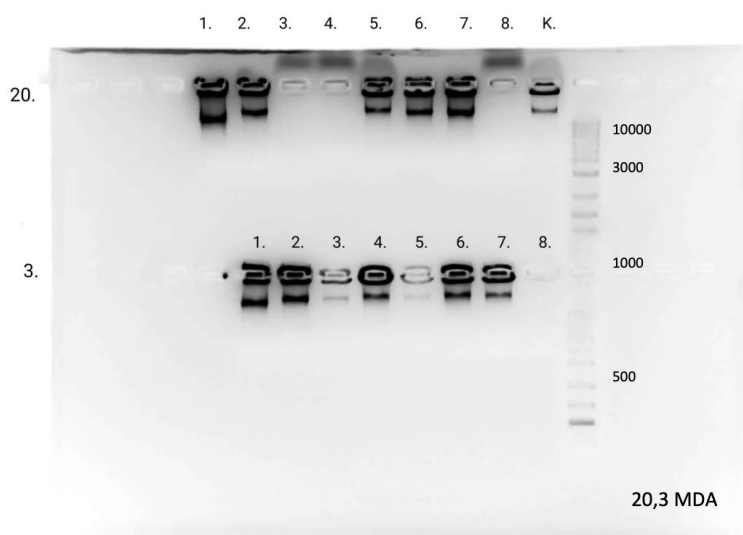
Obrázek 8b. Izolované kolonie *Gloeocapsa atrata* ze vzorku č. 20 (Holubovské hadce). Světle fialový odstín odpovídá pH pufru (7,2). **J-** vzorek 20.10, **K-** vzorek 20.11, **L-** vzorek 20.12, **M-** vzorek 20.13, **N-** vzorek 20.14, **O-** vzorek 20.15, **P-** vzorek 20.16. Měřítko = 10 μm .

3.3 Amplifikace genomu pomocí MDA a PCR genu pro 16S rRNA

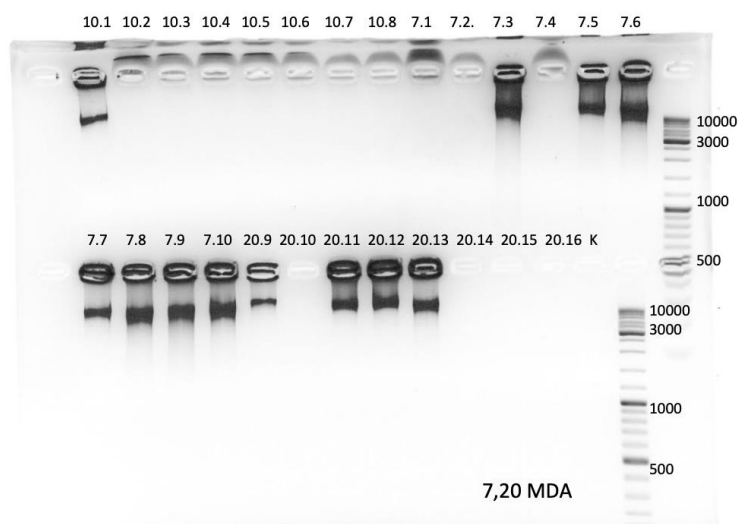
Amplifikace genomu úspěšně zvýšila množství DNA u většiny izolovaných kolonií, což bylo potvrzeno gelovou elektroforézou (přítomnost fragmentů DNA o velikosti > 10 kbp na gelu u jednotlivých vzorků). Z 52 analyzovaných kolonií byl pozitivní výsledek pozorován u 31 kolonií - Obrázky 10, 11 a 12.



Obrázek 10. Výsledky MDA pro vzorek č. 8. (*Gloeocapsa violascea*, Opolenec). K - negativní kontrola. Poslední vzorek - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fisher Scientific).

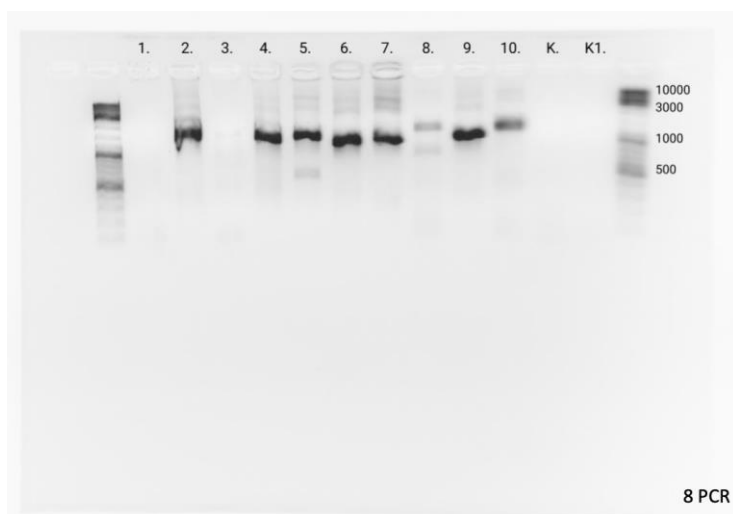


Obrázek 11. Výsledky MDA pro vzorek č. 3 (*Gloeocapsa alpina*, Opolenec) - spodní řada jamek; č. 20 (*Gloeocapsa atrata*, Holubovské hadce) - horní řada jamek. K - negativní kontrola společná pro všechny vzorky. Poslední vzorek v horní řadě - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fisher Scientific).

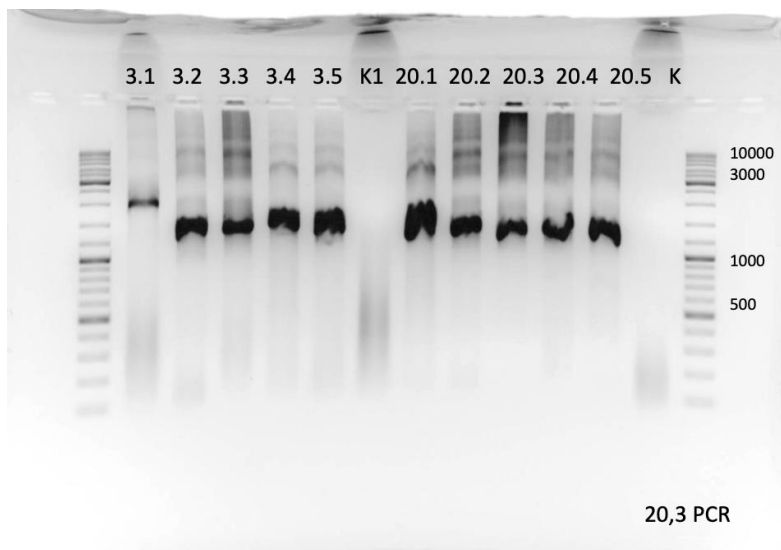


Obrázek 12. Výsledky MDA pro vzorek č. 7 (*Gloeocapsa novacekii*, Opolenec) - jamky 7.1 až 7.10; a vzorek č. 20 (*Gloeocapsa atrata*, Holubovské hadce) - jamky 20.9. až 20.16. K - negativní kontrola společná pro všechny vzorky. Poslední vzorek v každé řadě - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fisher Scientific). Amplifikace vzorku č. 10 se zdařila pouze u jediné kolonie, a proto není v bakalářské práci dále uváděn.

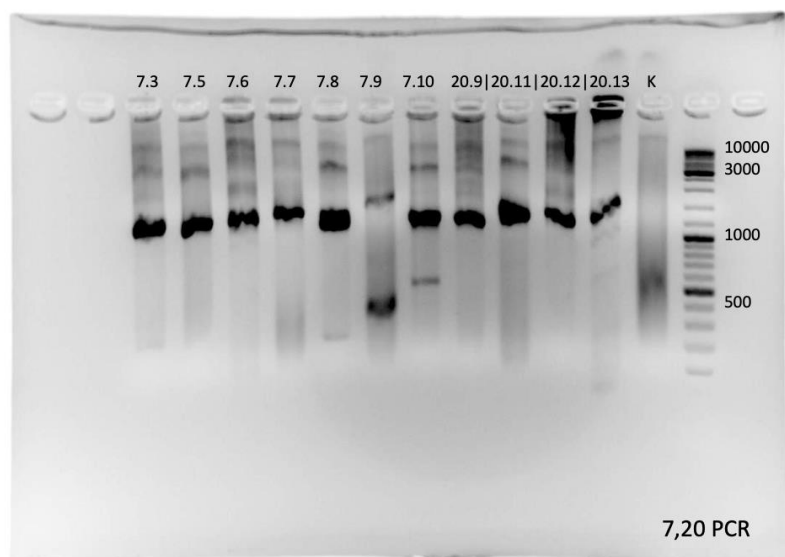
Dále byla s použitím MDA produktu jako templátu u každé ze 31 úspěšných kolonií provedena PCR pro fragment 16S rRNA genu. Důkazem úspěšné amplifikace byl viditelný proužek o délce cca 1100 bp na gelu u 28 kolonií, což potvrdilo přítomnost DNA sinic (Obrázky 13, 14, a 15).



Obrázek 13. Výsledek PCR pro 16S rRNA gen (primery 16S378F-16S1494r), vzorek č. 8. (*Gloeocapsa violascea*, Opolenec). K - PCR produkt z negativní kontroly příslušné MDA, K1 - negativní kontrola PCR. Poslední vzorek - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fisher Scientific).



Obrázek 14. Výsledek PCR pro 16S rRNA gen (primery 16S378F-16S1494r), vzorek č. 3 (*Gloeocapsa alpina*, Opolenec) - jamky 3.1. až 3.5; vzorek č. 20 (*Gloeocapsa atrata*, Holubovské hadce) - jamky 20.1 až 20.5. K - PCR produkt z negativní kontroly příslušné MDA, K1 - negativní kontrola PCR. Poslední vzorek - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fisher Scientific).



Obrázek 15. Výsledek PCR pro 16S rRNA gen (primery 16S378F-16S1494r), vzorek č. 7 (*Gloeocapsa novacekii*, Opolenec) - jamky 7.3 až 7.10; vzorek č. 20 (*Gloeocapsa atrata*, Holubovské hadce) - jamky 20.9. až 20.13. K - negativní kontrola PCR. Poslední vzorek - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fisher Scientific).

3.4 Sekvence a BLAST analýza genu pro 16S rRNA

Výsledná data ze sekvenátoru byla složena z forward a reverse řetězců a byla provedena kontrola správného čtení bází. Zpracované vzorky jsou zaznamenány v Tabulkách 4, 5, 6, a 7. Sekvence získané z těchto vzorků byly podrobeny porovnání s databází NCBI pomocí online aplikace BLASTn se základním nastavením. Za pozitivní byl považován výsledek s nejlepšími hity sekvencí z řádu Chroococciidiopsidales. Z celkových 28 vzorků bylo pro další analýzy vybráno 16 vzorků, u kterých byla získána dostatečně dlouhá a kvalitní sekvence, zároveň odpovídající zařazení do tohoto řádu. Mezi sekvencemi nebyly zaznamenány kontaminace z třídy sinic, pouze občasné kontaminace heterotrofními bakteriemi. Některé vzorky byly vyřazeny z důvodu krátké sekvence nebo sekvence s horší kvalitou čtení.

Tabulka 4. Výsledky sekvenace vzorku č. 3 (*Gloeocapsa alpina*). R - čísla sekvenačních reakcí primerem 16S1494r; C - čísla sekvenačních reakcí primerem 16S378F. Zeleně zvýrazněné vzorky obsahovaly kvalitní čtení sekvence r. *Gloeocapsa* a byly vybrány pro další analýzu.

Č. kolonie	3.1	3.2	3.4	3.6	3.7
R	1	2	3	4	5
C	1	2	3	4	5

Tabulka 5. Výsledky sekvenace vzorku č. 7 (*Gloeocapsa novacekii*). R - čísla sekvenačních reakcí primerem 16S1494r; C - čísla sekvenačních reakcí primerem 16S378F. Zeleně zvýrazněné vzorky obsahovaly kvalitní čtení sekvence r. *Gloeocapsa* a byly vybrány pro další analýzu.

Č. kolonie	7.3	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	7.10
R	1	2	3	4	5	6	7
C	12	13	14	15	16	17	18

Tabulka 6. Výsledky sekvenace vzorku č. 8 (*Gloeocapsa violascea*). R - čísla sekvenačních reakcí primerem 16S1494r; C - čísla sekvenačních reakcí primerem 16S378F. Zeleně zvýrazněné vzorky obsahovaly kvalitní čtení sekvence r. *Gloeocapsa* a byly vybrány pro další analýzu.

Č. kolonie	8.1	8.3	8.4	8.5	8.6	8.8	8.9
R	2A	4A	5A	6A	7A	9A	10A
C	2B	4B	5B	6B	7B	9B	10B

Tabulka 7. Výsledky sekvenace vzorku č. 20 (*Gloeocapsa atrata*). R - čísla sekvenačních reakcí primerem 16S1494r; C - čísla sekvenačních reakcí primerem 16S378F. Zeleně zvýrazněné vzorky obsahovaly kvalitní čtení sekvence r. *Gloeocapsa* a byly vybrány pro další analýzu.

Č. kolonie	20.1	20.2	20.3	20.4	20.5	20.9	20.11	20.12	20.13
R	6	7	8	9	10	8	9	10	11
C	6	7	8	9	10	19	20	21	22

3.5 Homogenita sekvencí 16S rRNA v rámci vzorku (morfortypu)

Ze sekvencí vybraných vzorků byla vytvořena tabulka podobnosti (Tabulka 8), potvrzující homogenitu sekvencí jednotlivých kolonií v rámci daného vzorku a morfortypu (100 minus párová p-distance v alignované sekvenci 16S rRNA genu > 99).

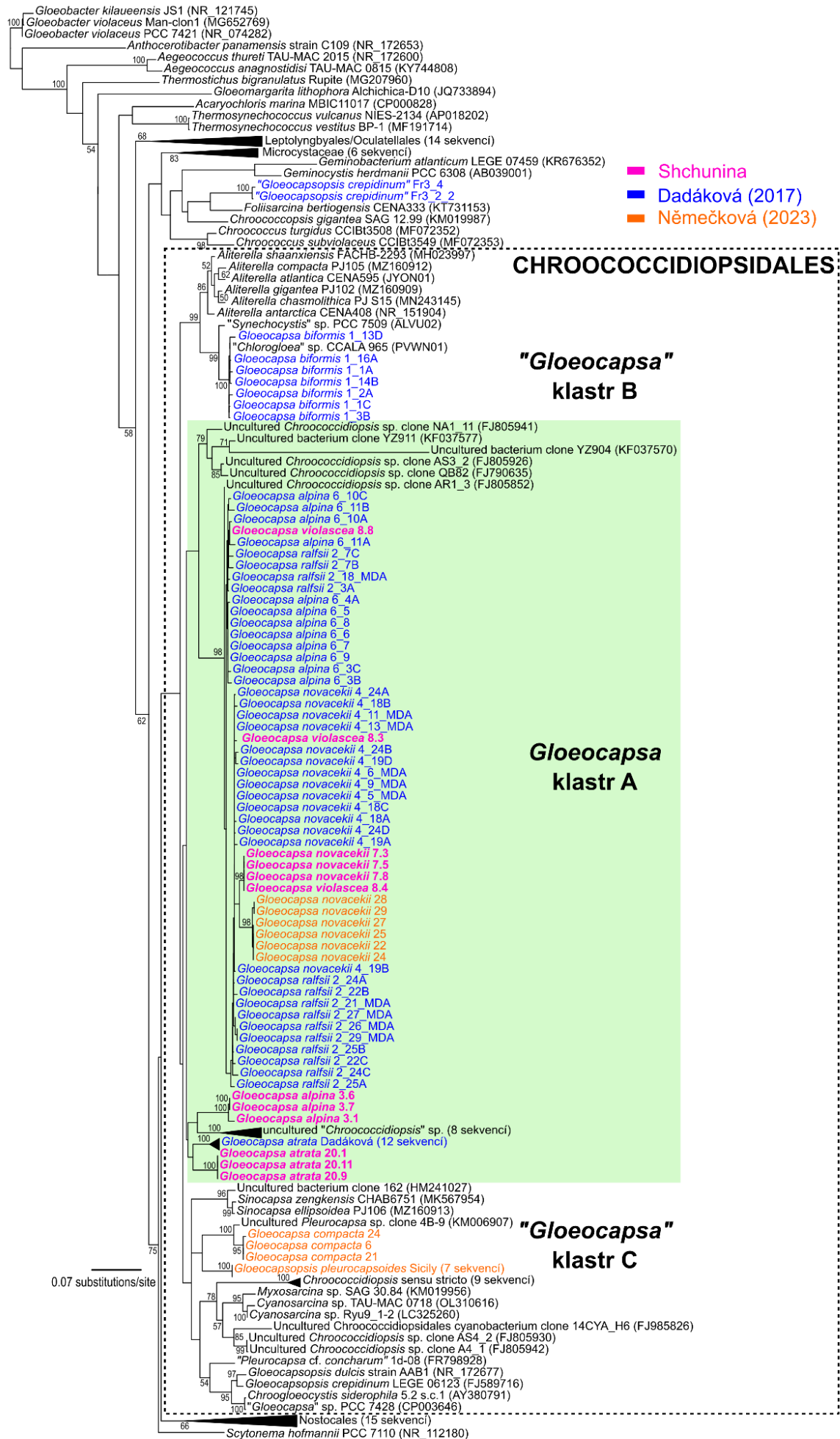
Tabulka 8. Homogenita sekvencí v rámci daného vzorku a morfortypu (je uvedeno v %).

	3.1	3.6	3.7	7.3	7.5	7.8	8.3	8.4	8.8	20.1	20.9	20.11
3.1_ <i>alpina</i>	-	99.3	99.3	92.0	94.5	94.0	94.6	94.8	94.7	94.0	94.9	93.6
3.6_ <i>alpina</i>	99.3	-	100	92.2	94.6	94.2	94.3	95.2	95.1	94.4	94.9	93.9
3.7_ <i>alpina</i>	99.3	100	-	92.2	94.6	94.2	94.4	95.2	95.2	94.4	94.9	93.9
7.3_ <i>novacekii</i>	92.0	92.2	92.2	-	100	100	98.4	100	98.3	92.4	91.4	91.8
7.5_ <i>novacekii</i>	94.5	94.6	94.6	100	-	100	98.9	100	98.9	94.5	94.2	93.8
7.8_ <i>novacekii</i>	94.0	94.2	94.2	100	100	-	98.8	100	98.8	94.0	94.2	93.9
8.3_ <i>violascea</i>	94.6	94.3	94.4	98.4	98.9	98.8	-	99.1	99.7	95.0	94.9	94.5
8.4_ <i>violascea</i>	94.8	95.2	95.2	100	100	100	99.1	-	99.0	94.7	94.2	94.0
8.8_ <i>violascea</i>	94.7	95.1	95.2	98.3	98.9	98.8	99.7	99.0	-	95.0	94.9	94.5
20.1_ <i>atrata</i>	94.0	94.4	94.4	92.4	94.5	94.0	95.0	94.7	95.0	-	100	100
20.9_ <i>atrata</i>	94.9	94.9	94.9	91.4	94.2	94.2	94.9	94.2	94.9	100	-	100
20.11_ <i>atrata</i>	93.6	93.9	93.9	91.8	93.8	93.9	94.5	94.0	94.5	100	100	-

3.6 Fylogenetická analýza

Abych dále potvrdila správnost a reprodukovatelnost proběhlé amplifikace genomu (MDA) a sekvenčních dat z PCR produktů získaných z kolonií r. *Gloeocapsa*, byla nezbytná jejich fylogenetická analýza s použitím alignmentu 16S rRNA genu.

Získané sekvence fragmentu genu pro 16S rRNA bylo na základě fylogenetické analýzy možné zařadit do řádu Chroococciopsidales a do blízké příbuznosti existujících sekvencí rodu *Gloeocapsa* (Obrázek 16). Sekvence typového druhu *G. atrata* ze vzorku č. 20 vytvořily sesterskou linii k existujícím sekvencím *G. atrata*, vzájemná příbuznost těchto dvou subklastrů však nebyla dostatečně silně potvrzena bootstrapovou analýzou (bootstrap <50 %). Sekvence *G. alpina* ze vzorku č. 3 vytvořily skupinu v jedné z blízkých vedlejších linií. Ostatní sekvence, *G. violascea* ze vzorku č. 8 a *G. novacekii* ze vzorku č. 7, se ocitly uvnitř dobře podpořené větve (bootstrap = 96 %) zahrnující řadu předchozích sekvencí druhů *G. novacekii*, *G. alpina* a *G. ralfsii*. Druhy uvnitř tohoto klastru velmi podobných sekvencí však nebyly vzájemně dobře odděleny. Všechny výše uvedené sekvence byly uvnitř statisticky nepodpořené avšak monofyletické linie (*Gloeocapsa* klastr A), kterou pro účely této práce budeme považovat za odpovídající rodu *Gloeocapsa* (Obrázek 16). Další dva druhy, sekvenované v předchozích studiích a tradičně spadající do r. *Gloeocapsa*, se ve vypočteném stromu nacházely mimo tuto linii. Jednalo se zejména o druh *G. biformis*, který vytvořil dobře podpořený klastr (“*Gloeocapsa*” klastr B; bootstrap = 99 %) společně s rodem *Aliterella* a kmenem “*Synechocystis*” sp. PCC 7609. Druh *G. compacta* (“*Gloeocapsa*” klastr C) se ocitl v širší linii společně s dalšími rody jako např. *Sinocapsa*, *Chroogloeocystis* a některé druhy r. *Gloeocapsopsis*, avšak bez statistické podpory.



Obrázek 16. Fylogenetický strom sinic vypočtený na základě alignmentu genu pro 16S rRNA se zaměřením na řád Chroococcidiopsidales. Sekvence získané v této práci (vyznačeny fialově) spadají do řádu Chroococcidiopsidales, do statisticky nepodpořené fylogenetického klastru zahrnujícího typový druh *Gloeocapsa atrata* a dále druhy *G. alpina*, *G. violascea*, *G. novacekii* a *G. ralfsii* (*Gloeocapsa* klastre A). Druhy *G. biformis* (klastre B) a *G. compacta* (klastre C) sekvenované v předchozích studiích (DADÁKOVÁ, 2017; NĚMEČKOVÁ, 2023) podle rekonstrukce spadají do vedlejších linií v rámci Chroococcidiopsidales, oddělená pozice klastre C (*G. compacta*) však nebyla statisticky podpořena. Vypočteno metodou Maximum Likelihood, čísla poblíž uzlů uvádějí hodnotu bootstrapu >50 % (500 pseudoreplikací).

3.7 Sekvence draftu genomu u vybraných vzorků

Byla provedena sekvenace draftu celého genomu na platformě Illumina u čtyř vybraných vzorků zastupujících 4 různé druhy rodu *Gloeocapsa*. Výsledné parametry získaných genomových sekvencí shrnuje Tabulka 9. Ve vzorku číslo 3.1 byla osekvenována jenom malá část genomu, jak ukazuje jeho odhadovaná kompletnost 12,93 %. Možnou příčinou mohla být amplifikace jen části genomu nebo degradace DNA během laboratorního zpracování. Zbylé tři vzorky vykazovaly kompletnost větší než 94,5 % a délka jejich genomu byla v rozmezí 6,7 až 8 Mbp. Procentuální zastoupení GC bazí v genomu bylo v rozmezí 46,1 až 48,4 %. Počet contigů se pohyboval v rozmezí 296 až 433 a délka nejdelšího contigu byla v rozmezí 61 až 427 kpb, což ukazuje na poměrně kvalitně složené genomy.

Tabulka 9. Výsledek sekvenace draftu genomu vybraných vzorků na platformě Illumina.

Č. vzorku	Druh	Délka genomu (bp)	Počet contigů	Nejdelší contig (bp)	GC (%)	Kompletnost (%)
3.1	<i>G. alpina</i>	1 150 008	296	61 147	47,2	12,93
7.8	<i>G. novacekii</i>	7 591 940	433	302 426	48,4	97,67
8.8	<i>G. violascea</i>	7 993 741	342	426 871	47,6	99,56
20.11	<i>G. atrata</i>	6 714 639	438	190 245	46,1	94,55

4. Diskuze

Hlavním cílem této práce bylo získat sekvence celého genomu vybraných taxonů z rodu *Gloeocapsa*. V navazující studii budou tato data využita jednak pro taxonomické účely s využitím moderní fylogenomické analýzy (STRUNECKÝ et al., 2023), především ale při pokusu o identifikaci genů pro biosyntézu hypotetické UV-protektivní látky gloeocapsinu (LARA et al., 2022).

V terénní části práce jsem se odebírala vzorky na třech lokalitách, kde převládají vápencové a hadcové substráty. Dvě lokality (PR Opolenec, PR Holubovské hadce) byly vybrány podle předchozích studií sinicové mikroflóry z jižních Čech (HAUER, 2007), jedna lokalita v blízkosti (PR Bořinka) byla doplněna na základě doporučení školitele. Celkem bylo odebráno 26 vzorků epilitických nárostů, ve kterých byly nalezeny kolonie sinic r. *Gloeocapsa* s červeným až černým zbarvením. Celkově byly nalezeny a dále analyzovány čtyři druhy zajímavé pro tuto práci: *Gloeocapsa alpina*, *G. novacekii*, *G. atrata* a *G. violascea*.

Při porovnání se seznamem nalezených druhů na studovaných lokalitách PR Holubovské hadce a PR Opolenec v práci HAUER (2007) byly nalezeny rozdíly. Na vápencích lokality Opolenec bylo v mojí práci odebráno celkem 10 vzorků s převahou kolonií *Gloeocapsa alpina*, *G. novacekii*, *G. violascea*, *G. cf. compacta* a neurčených bezbarvých kolonií (*Gloeocapsa* sp.). HAUER (2007) na této lokalitě také zaznamenal druhy *G. violascea* a *G. novacekii*, nezaznamenal však druhy *G. alpina*, *G. biformis* a *G. cf. compacta*, ale naopak našel *G. atrata* a *G. nigrescens*, které mnou nalezeny nebyly. Na serpentinitovém substrátu Holubovských hadců mnou byly odebrány vzorky s dominantou *Gloeocapsa atrata* a *G. novacekii*, což se liší od výsledků předchozí práce, kdy na této lokalitě byly pozorovány pouze kolonie *G. violascea* (HAUER, 2007). Zjištěné rozdíly v seznamu nalezených druhů lze přisoudit zejména náhodným faktorům při výběru mikrostanovišť k odběru vzorků. Zastoupení druhů v epilitických nárostech se může velmi lišit i v rámci prostorově blízkých mikrostanovišť (VONDRÁŠKOVÁ et al., 2017) a také v průběhu vegetační sezóny a mezi jednotlivými roky v důsledku opakované sezónní sukcese (ROUSH & GARCIA-PICHEL, 2020). Všechny nalezené druhy r. *Gloeocapsa* jsou podle dostupné literatury na vhodných substrátech široce rozšířeny (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998; HAUER et al., 2015).

Z biotopů s hadcovým podkladem na území České Republiky je nejprozkumanejším Mohelenská hadcová step. Fykologicky výzkum této lokality zahájil Rudolf Dvořák (DVOŘÁK, 1931), poté František Nováček (NOVÁČEK, 1934) a revizi později provedl HAUER (2007). Následně byla v práci HAUER (2008) porovnána data v letech 2004 – 2006 s historickými údaji

zmíněných publikací. Za celou dobu výzkumu Mohelenské hadcové stepi zde bylo pozorováno celkem 10 druhů rodu *Gloeocapsa*.

Amplifikace celého genomu jednotlivých kolonií byla provedena metodou multiple-displacement amplification (MDA). V předchozích studiích, jako například LARA et al. (2013) nebo POKORNÝ et al. (2023), tato metoda prokázala vysokou efektivitu amplifikace z jednotlivých kolonií sinic. MDA metoda byla zvolena, aby bylo možné s minimální chybovostí získat kompletní genomovou DNA pro další práci bez nutnosti kultivace sinic. Obsah a taxonomická identita sinicové DNA ve vzorcích byly potvrzeny amplifikací genu pro 16S rRNA specifickými primery pro sinice (TATON et al., 2003) a jejich následnou fylogenetickou analýzou.

V současné době je taxonomie rodu *Gloeocapsa* založena výhradně na kombinaci hlavních určovacích morfologických znaků (barva a struktura slizových obalů, velikost buněk atd.) a ekologie výskytu (preferovaný substrát, vodní nebo suchozemské prostředí apod.). V mezinárodní vědecké literatuře dosud nebyla publikována práce obsahující molekulární data pro r. *Gloeocapsa*. K porovnání jsou dostupné jsou pouze dvě studie - diplomová práce DADÁKOVÁ (2017) a disertační práce NĚMEČKOVÁ (2023), které používaly stejnou metodiku sekvenace z jednotlivých buněk či kolonií. V databázi NCBI můžeme najít několik sekvencí, které jsou označeny jako *Gloeocapsa* sp. (např. *Gloeocapsa* sp. PCC 73106, *Gloeocapsa* sp. PCC 7428), žádná z nich však nespadá do blízké příbuznosti našich sekvencí typového druhu *G. atrata* (Obrázek 16; DADÁKOVÁ, 2017), a patrně se jedná o chybné taxonomické zařazení.

Srovnáme-li fylogenetickou pozici typového druhu *G. atrata* (který definuje pozici celého rodu) v práci DADÁKOVÁ (2017) a v této bakalářské práci, poněkud se liší. V 16S rRNA stromu v práci DADÁKOVÁ (2017) *G. atrata* vytvořila samostatnou linii, zatímco podle Obrázku 16 je možné, že tvoří monofyletickou linii s většinou ostatních druhů rodu *Gloeocapsa*. Ani jedna z analýz však neposkytla dostatečnou statistickou podporu větví. Fylogenetická analýza provedená pouze na základě genu pro 16S rRNA není často dostatečně informativní a v současné taxonomii sinic se již nedoporučuje (STRUNECKÝ et al., 2023). Pro spolehlivé rozřešení této otázky by bylo vhodné zkonstruovat fylogenetický strom na základě sekvence většího počtu genů, ideálně s použitím genomů pro r. *Gloeocapsa* získaných v této práci a genomů z řádu Chroococcidiopsidales dostupných v databázi NCBI. Tato analýza již nebyla do mé bakalářské práce zařazena, protože mým cílem nebylo podrobné řešení taxonomie rodu *Gloeocapsa*. Předchozí výsledky analýzy na základě tří lokusů, *16S rRNA*, *rpoC1* a *rbcLX*,

naznačují, že by většina rodu *Gloeocapsa* mohla být monofyletická (DADÁKOVÁ, 2017), tak jako v Obrázku 16 (*Gloeocapsa* klast A).

Součástí tohoto klastru jsou dále sekvence morfologicky definovaných druhů *G. alpina*, *G. novacekii*, *G. violascea* a *G. ralfsii*. Rozlišení jednotlivých druhů v klastru *Gloeocapsa* A nebylo na základě fragmentu 16S rRNA genu možné, protože tento gen není na úrovni druhu dostatečně informativní. Pro odlišení příbuzných druhů by bylo třeba použít analýzu úseku rRNA ITS (OSORIO-SANTOS et al., 2014; DVOŘÁK et al., 2015), která nebyla v rámci této práce sekvenována, protože práce nebyla taxonomicky zaměřena. DADÁKOVÁ (2017) ve své diplomové práci konstatovala, že druhy v tomto klastru na základě analýzy rRNA ITS vzájemně odlišit lze. Je však otázkou, jestli je pozice morfologicky definovaných druhů stabilní. Příkladem je odlišná pozice druhu *G. alpina* sekvenovaného z různých lokalit v rámci *Gloeocapsa* klastru A (Obrázek 16).

Dalším druhem, který byl sekvenován v předchozí studii (DADÁKOVÁ, 2017) a tradičně spadá do r. *Gloeocapsa*, je *G. biformis*, který vytvořil vlastní oddělený klast „*Gloeocapsa*“ B v širší fylogenetické linii obsahující rod *Aliterella* a kmen „*Synechocystis*“ sp. PCC 7609. Tento výsledek se shoduje s výsledky DADÁKOVÉ (2017) a podporuje její hypotézu, že se jedná o zástupce jiného rodu sinic.

Při analýze fylogenetického stroměčku (Obrázek 16) je dále vidět, že sekvence „*Gloeocapsa*“ sp. PCC 7428 spadá do další oddělené fylogenetické linie nepřibuzné typovému druhu *G. atrata*. V jeho okolí se také nacházejí sekvence *Gloeocapsa compacta* a *Gloeocapsopsis pleurocapsoides* z epilitických nárostů na Sicílii (NĚMEČKOVÁ, 2023). Ve fylogenetickém stroměčku NĚMEČKOVÉ (2023) však tyto druhy klastrovaly do hlavní linie r. *Gloeocapsa*. Vzhledem k nízké podpoře větví v obou fylogenetických stromech nelze rozhodnout, která hypotéza je správná, a k vyřešení této otázky bude nezbytná multilokusová analýza.

Co se týká morfologicky podobného rodu *Gloeocapsopsis* (KOMÁREK, 1993), dospěla jsem k podobnému výsledku jako DADÁKOVÁ (2017). Podle výsledku fylogenetické analýzy je tento rod zřejmě také polyfyletický (Obrázek 16). Podle současného pojetí (JUNG et al., 2021) se typový druh *Gloeocapsopsis crepidinum* ve stromu nachází v příbuznosti genomu „*Gloeocapsa*“ sp. PCC 7428 (CP003646). *G. pleurocapsoides* se zdá být blízké příbuzné ke *Gloeocapsa compacta* a další sekvence materiálu „*Gloeocapsopsis crepidinum*“ dokonce spadají do čeledi Pleurocapsaceae (Obrázek 16; DADÁKOVÁ, 2017). Tyto otázky musí zodpovědět budoucí studie zaměřená na rod *Gloeocapsopsis*.

V rámci genomů z řádu Chroococciopsidales se procentuální zastoupení GC bazí (GC%) u mých vzorků r. *Gloeocapsa* se rovná 46,1 až 48,4 %, což je o několik procent výše než u

ostatních zástupců z NCBI databáze, kteří byli zahrnuti do fylogenetické analýzy, jako *Aliterella atlantica* CENA595 (42,6 %), *Gloeocapsopsis dulcis* AAB1 (42,4 %), nebo *Gloeocapsopsis crepidinum* LEGE 06123 (41,7 %). Specifická pro rod *Gloeocapsa* je také délka genomu – úspěšné vzorky r. *Gloeocapsa* z této práce mají délku 6,7-7,9 Mbp, u genomů uvedených výše se délka pohybuje kolem 5,2 Mbp: *Aliterella atlantica* CENA595 = 5,012 Mbp, *Gloeocapsopsis dulcis* AAB1 = 5,271 Mbp, *Gloeocapsopsis crepidinum* LEGE 06123 = 5,315 Mbp.

Pro sekvenaci genomu byl kromě druhů s předpokádaným obsahem gloeocapsinu (*G. alpina*, *G. atrata*, *G. violascea*) také vybrán druh *G. novacekii*, který má i při vyšším pH stabilně červené zbarvení slizových obalů (DADÁKOVÁ, 2017) a předpokládáme tak, že neprodukuje gloeocapsin. Jeho zařazení do studie by mohlo v budoucnu výrazně pomoci při hledání biosyntetických genů specifických pro gloeocapsin, protože by v jeho genomu měly tyto geny oproti blízce příbuzným fialovým zástupcům (Obrázek 16; DADÁKOVÁ, 2017; NĚMEČKOVÁ, 2023) chybět. Identita červeného pigmentu *G. novacekii* sice také není známa, ale předpokládáme, že i v případě přítomnosti podobného pigmentu se bude biosyntetická dráha specificky lišit od gloeocapsinu, který barevně reaguje na změnu pH.

Podobný typ barevné změny v závislosti na pH v přírodě vykazují zejména rostlinné pigmenty antokyany (KHOO et al., 2017). Jedná se o flavonoidní látky produkované rostlinami a jejich biosyntéza je odvozená od fenylypropanoidní dráhy specifické pro rostliny (MANNINO et al., 2021; DE VRIES et al., 2021). Současná hypotéza o chemické struktuře gloeocapsinu je založená na měření pomocí Ramanovy spektroskopie a předpokládá, že se jedná o derivát parietinu (STORME et al., 2015; LARA et al., 2022).

Parietin (v literatuře také nazývaný physcion) je derivátem emodinu methylovaného na hydroxylové skupině C3, byl izolován z mnoha suchozemských a mořských zdrojů (QI et al., 2022). Jeho biosyntéza je v současné době předmětem bádání – antrachinonový skelet je v houbách produkován polyketidovými syntetázami (PKS) (YUAN et al., 2023), v závěru biosyntézy dochází k methylaci C-6 hydroxylové skupiny emodinu O-methyltransferázou, což bylo nedávno popsáno u houby *Aspergillus terreus* (YAO et al., 2023). Parietin vykazuje silné bioaktivní vlastnosti jako induktor apoptózy, má antineoplastické, hepatoprotektivní, protizánětlivé, antibakteriální, a antifungální účinky (QI et al., 2022; YAO et al., 2023). Vzhledem k jeho bioaktivitě a možným farmakologickým aplikacím je dobrým příkladem, proč je užitečné studovat UV-protektivní látky nebo barviva přírodního původu, včetně gloeocapsinu (XUN et al., 2019; HONG et al., 2008).

5. Závěr

- Byly odebrány přírodní vzorky s dominantou r. *Gloeocapsa* obsahující gloeocapsin (které mají fialovou až černou barvu).
- Byla provedena mikroskopická analýza a sekvenace genu pro 16S rRNA a potvrzena taxonomická identita jednotlivých kolonií.
- Byly získány sekvence celého genomu tří vybraných taxonů (*Gloeocapsa atrata*, *G. violascea* a *G. novacekii*) s použitím amplifikace a sekvenace DNA z jednotlivých kolonií. Tato data budou v navazující práci využita k identifikaci genů pro biosyntézu gloeocapsinu.

6. Literatura

BALSKUS E.P., WALSH C.T., (2010): The Genetic and Molecular Basis for Sunscreen Biosynthesis in Cyanobacteria. *Science*, 329(5999): 1653–1656.

BALSKUS E.P., CASE R.J., WALSH C.T., (2011): The biosynthesis of cyanobacterial sunscreen scytonemin in intertidal microbial mat communities. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 77(2): 322–332.

BANKEVICH A., NURK S., ANTIPOV D., GUREVICH A.A., DVORKIN M., KULIKOV A.S., LESIN V.M., NIKOLENKO S.I., PHAM S., PRJIBELSKI A.D., PYSHKIN A.V., SIROTKIN A.V., VYAHHI N., TESLER G., ALEKSEYEV M.A., PEVZNER P.A., (2012): SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.*, 19(5): 455–77.

BRAND, F. (1900). Der Formenkreis von *Gloeocapsa alpina*. *Bot. Centralb.*, 15: 152–159.

BUSHNELL B. (2014). BBTools software package. Dostupné z: <https://sourceforge.net/projects/bbmap/>.

ČESKÁ GEOLOGICKÁ SLUŽBA, (1998): Databáze významných geologických lokalit. Praha. Dostupné z: <http://lokality.geology.cz/>.

DADÁKOVÁ I., (2017): Polyphasic study of the cyanobacterial genus *Gloeocapsa* using molecular analysis of single cells. Faculty of Science, Masaryk University Department of Botany and Zoology: 73.

D'AGOSTINO P.M., WOODHOUSE J.N., LIEW H.T., SEHNAL L., PICKFORD R., WONG H.L., BURNS B.P., NEILAN B.A., (2019): Bioinformatic, phylogenetic and chemical analysis of the UV-absorbing compounds scytonemin and mycosporine-like amino acids from the microbial mat communities of Shark Bay, Australia. *Environ. Microbiol.*, 21(2): 702–715.

DE VRIES S., FÜRST-JANSEN J.M.R., IRISARRI I., DHABALIA ASHOK, A., ISCHEBECK T., FEUSSNER K., ABREU I.N., PETERSEN M., FEUSSNER I., DE VRIES J.,

(2021): The evolution of the phenylpropanoid pathway entailed pronounced radiations and divergences of enzyme families. *Plant. J.*, 107: 975–1002.

DVOŘÁK P., POULÍČKOVÁ A., HAŠLER P., BELLI M., CASAMATTA D.A., PAPINI A., (2015): Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. *Biodivers. Conserv.*, 24: 739–757.

DVOŘÁK R., (1931): Vzdušné (aerophytické) řasy oblasti západomoravské [Aerophytic algae of the West Moravia]. *Příroda*, 24: 7.

EDGAR R.C., (2010): Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19): 2460–2461.

GAO Q., GARCIA-PICHEL F., (2011): Microbial ultraviolet sunscreens. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(11): 791–802.

GARCIA-PICHEL F., CASTENHOLZ R.W., (1991): Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheat pigment. *J. Phycol.*, 27: 395–409.

GARCIA-PICHEL F., CASTENHOLZ R.W., (1993): Occurrence of UV-Absorbing, Mycosporine-Like Compounds among Cyanobacterial Isolates and an Estimate of Their Screening Capacity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(1): 163–169.

GARCIA-PICHEL F., WINGARD C.E., CASTENHOLZ R.W., (1993): Evidence Regarding the UV Sunscreen Role of a Mycosporine-Like Compound in the Cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(1): 170–176.

GARCIA-PICHEL F., LOMBARD J., SOULE T., DUNAJ S., WU S.H., WOJCIECHOWSKI M.F., (2019): Timing the evolutionary advent of cyanobacteria and the later great oxidation event using gene phylogenies of a sunscreen. *MBio*, 10: 1–14.

GAUSLAA Y., USTVEDT E.M., (2003): Is parietin a UV-B or a blue-light screening pigment in the lichen *Xanthoria parietina*. *Photochem. Photobiol. Sc.*, 2: 424–432.

GOLUBIĆ S., (1965): Zur Revision der Gattung *Gloeocapsa* Kützing (Cyanophyta). Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie, 27(2): 218–232.

GRANT C.S., LOUDA J.W., (2013): Scytonemin-imine, a mahogany-colored UV/Vis sunscreen of cyanobacteria exposed to intense solar radiation. Organic Geochemistry, 65: 29–36.

HAUER T., (2007): Rock-inhabiting cyanoprokaryota from South Bohemia (Czech Republic). Nova Hedwigia, 85. 379–392.

HAUER T., (2008): Epilithic cyanobacterial flora of Mohelenská hadcová steppe Nature Reserve (western Moravia, Czech Republic) 70 years ago and now. Fottea, 8(2): 129–132.

HAUER T., MÜHLSTEINOVÁ R., BOHUNICKÁ M., KAŠTOVSKÝ J., MAREŠ J., (2015): Diversity of cyanobacteria on rock surfaces. Biodivers. Conserv., 24: 759–779.

HONG Z., MIAO L., ZHI-NIAN L., CHANG-LING L., (2008): Biological activities of emodin methylation derivatives. Agrochemicals, 47 (3).

HUISMAN J., CODD G.A., PAERL H.W., IBELINGS B.W., VERSPAGEN J.M.H., VISSER P.M., (2018): Cyanobacterial blooms. Nat. Rev. Microbiol., 16(8): 471–483.

JAAG O., (1945): Untersuchungen über die Vegetation und Biologie der Algen des nackten Gesteins in den Alpen im Jura und im Schweizerischen Mittelland. Böhler & Co., Bern.: 560.

JUNG P., AZUA-BUSTOS A., GONZALEZ-SILVA C., MIKHAILYUK T., ZEBICKI D., HOLZINGER A., LAKATOS M., BÜDEL B., (2021): Emendation of the Coccoid Cyanobacterial Genus *Gloeocapsopsis* and Description of the New Species *Gloeocapsopsis diffluens* sp. nov. and *Gloeocapsopsis dulcis* sp. nov. Isolated From the Coastal Range of the Atacama Desert (Chile). Front. Microbiol., (12).

KAŠTOVSKÝ J., HAUER T., KOMÁREK J., SKÁCELOVÁ O., (2010). The list of cyanobacterial species of the Czech Republic to the end of 2009. Fottea, 10(2): 245–249.

KAŠTOVSKÝ J., HAUER T., GERIŠ R., CHATTOVÁ B., JURÁŇ J., LEPŠOVÁ-SKÁCELOVÁ O., PITELKOVÁ P., PUSZTAI M., ŠKALOUD P., ŠŤASTNÝ J., ČAPKOVÁ K., BOHUNICKÁ M., MÜHLSTEINOVÁ R., (2018): Atlas sinic a řas ČR 1. powerprint, Praha, 384.

KATOH K., STANDLEY D.M., (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 30(4): 772–780.

KHOO H.E., AZLAN A., TANG S.T., LIM S.M., (2017): Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.*, 61(1).

KOMÁREK J., (1993): Validation of the genera *Gloeocapsopsis* and *Asterocapsa* (Cyanoprokaryota) with regard to species from Japan, Mexico and Himalayas. *Bulletim of the National Science Museum, Ser. B*, 19(1): 19–37.

KOMÁREK J., ANAGNOSTIDIS K., (1998): Cyanoprokaryota 1. Teil Chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm, 19(1): 1–548.

KOMÁREK J., KAŠTOVSKÝ J., MAREŠ J., JOHANSEN J.R., (2014): Taxonomie classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86: 295–335.

KÜTZING F.T., (1843): *Phycologia generalis oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange*. Mit 80 farbig gedruckten Tafeln, gezeichnet und gravirt vom Verfasser. Leipzig: F.A. Brockhaus.

LARA Y., LAMBION A., MENZEL D., CODD G. A., WILMOTTE A., (2013): A cultivation-independent approach for the genetic and cyanotoxin characterization of colonial cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 69(2): 135–143.

LARA Y.J., MCCANN A., MALHERBE C., FRANÇOIS C., DEMOULIN C.F., SFORNA M.C., EPPE G., DE PAUW E., WILMOTTE A., JACQUES P., JAVAUX E.J., (2022): Characterization of the Halochromic Gloeocapsin Pigment, a Cyanobacterial Biosignature for Paleobiology and Astrobiology. *Astrobiology*, 22(6): 735–754.

MANNINO G., GENTILE C., ERTANI A., SERIO G., BERTEA C.M., (2021): Anthocyanins: Biosynthesis, Distribution, Ecological Role, and Use of Biostimulants to Increase Their Content in Plant Foods- A Review. *Agriculture*, 11(3): 212.

MAREŠ J., LARA Y., DADÁKOVÁ I., HAUER T., UHER B., WILMOTTE A., KAŠTOVSKÝ J., (2015): Phylogenetic analysis of cultivation-resistant terrestrial cyanobacteria with massive sheaths (*Stigonema* spp. and *Petalonema alatum*, Nostocales, cyanobacteria) using single-cell and filament sequencing of environmental samples, *J. Phycol.*, 51: 288–297.

NÄGELI C., SCHWENDENER S., (1877): *Das mikroskop: theorie und anwendung desselben*. Leipzig: W. Engelmann.

NĚMEČKOVÁ K., CULKA A., NĚMEC I., EDWARDS H.G.M., MAREŠ J., JEHLIČKA J., (2021): Raman spectroscopic search for scytonemin and gloeocapsin in endolithic colonizations in large gypsum crystals. *Journal of Raman Spectroscopy*, 52(12): 2633–2647.

NĚMEČKOVÁ K., (2023): *Detecting biomarkers of extremophiles in Martian analogues*. PhD Thesis, Charles University in Prague, 72.

NOVÁČEK F., (1934): *Epilitické sinice serpentínů mohelenských. Pars I: Chroococcales*. In PODPĚRA J. (ed.) *Mohelno. Svaz pro ochranu přírody a domoviny v zemi Moravskoslezské*, Brno.

OREN A., GUNDE-CIMERMAN N., (2007): Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites. *FEMS Microbiol. Lett.*, 269(1): 1–10.

OSORIO-SANTOS K., PIETRASIAK N., BOHUNICKÁ M., MISCOE L.H., KOVÁČIK L., MARTIN M.P., JOHANSEN R.J., (2014) Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales,

Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *European Journal of Phycology*, 49(4): 450–470.

PANIKKAR M.V.N., JACKSON A., (2014): Biodiversity of sub-aerial algae. Conference: National Seminar on the Taxonomy and Ecology of Freshwater algae: 16–27.

PARKS DH., IMELFORT M., SKENNERTON CT., HUGENHOLTZ P., TYSON GW., (2015): CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.*, 25(7): 1043–55.

PATHAK J., PANDEY A., MAURYA P.K., et al., (2020): Cyanobacterial Secondary Metabolite Scytonemin: A Potential Photoprotective and Pharmaceutical Compound. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 90: 467–481.

PENTECOST A., WHITTON B.A., (2012): Subaerial cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II*, edited by B.A. Whitton, Springer, Netherlands.: 291–316.

PETERSEN J.B., (1915): Studier over Dánske aérofile alger. *K Dánske Vidensk. Selsk. Ser 7.*, Kopenhagen, 12: 272–379.

POKORNÝ J., ŠTENCLOVÁ L., KAŠTOVSKÝ J., (2023): Unsuspected findings about phylogeny and ultrastructure of the enigmatic cyanobacterium *Microcrocis geminata* resulted in its epitypification and novel placement in Geminocystaceae. *Fottea* 23(1): 110–121.

PROTEAU P.J., GERWICK W.H., GARCIA-PICHEL F., CASTENHOLZ R., (1993): The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia*, 49(9): 825–829.

QI F., ZHANG W., XUE Y., GENG C., JIN Z., LI J., GUO Q., HUANG X., LU X., (2022): Microbial production of the plant-derived fungicide physcion. *Metab. Eng.*, 74: 130–138.

ROUSH D., GARCIA-PICHEL F., (2020): Succession and Colonization Dynamics of Endolithic Phototrophs within Intertidal Carbonates. *Microorganisms*, 8(2): 214.

SCHLICHTING H. E., (1975): Some subaerial algae from Ireland. *Brit. Phycolog. Journal*, 10(3): 257–261.

SEEMANN T., (2014): Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14): 2068–2069.

SINGH S.P., HÄDER D.P., SINHA R.P., (2010): Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing. Res. Rev.*, 9(2): 79–90.

SINHA R.P., HÄDER D.-P., (2008): UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science*, 174(3): 278–289.

SIVALINGAM P.M., IKAWA T., NISIZAWA K., (1976): Physiological roles of a substance 334 in algae. *Bot. Mar.*, 19: 9–21.

STAMATAKIS A., (2014): RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9): 1312–1313.

STORME J-Y., KLEINTEICH J., WILMOTTE A., et al., (2015): Raman characterization of the UV-protective pigment gloeocapsin and its role in the survival of cyanobacteria. *Astrobiology*, 15: 843–857.

STRUNECKÝ O., IVANOVA A.P., MAREŠ J., (2023): An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis. *J. Phycol*, 59: 12–51.

TAMRE E., FOURNIER G.P., (2022): Inferred ancestry of scytonemin biosynthesis proteins in cyanobacteria indicates a response to Paleoproterozoic oxygenation. *Geobiology*, 20: 764–775.

TATON A., GRUBISIC S., BRAMBILLA E., DE WIT R., WILMOTTE A., (2003): Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(9): 5157–5169.

VONDRÁŠKOVÁ A., FIBICH P., LEPŠ J., KAŠTOVSKÝ J., (2017): Determinants of cyanobacterial species composition in the splash zone of two Croatian islands. *Eur. Journal of Phycology*, 52(2): 179–187.

WATANABE K., EMOTO N., SUNOHARA M., KAWAKAMI M., KAGE H., NAGASE T., OHISHI N., TAKAI D., (2010): Treatment of PCR products with exonuclease I and heat-labile alkaline phosphatase improves the visibility of combined bisulfite restriction analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 399(3): 422–424.

WHITTON A.B., (2012): *Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time.*

XUN L., LIU Y., CHU S., YANG S., PENG Y., REN S., WEN B., CHEN N., (2019): Physcion and physcion 8-O- β -glucopyranoside: a review of their pharmacology, toxicities and pharmacokinetics. *Chem. Biol. Interact.*, 310(108722).

YAO Y., YANG E., PAN Y., SHU X., LIU G., (2023): Mining an O-methyltransferase for de novo biosynthesis of physcion in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 107: 1177–1188.

YUAN X., LI Y., LUO T., BI W., YU J., WANG Y., (2023): Genomic Analysis of the *Xanthoria elegans* and Polyketide Synthase Gene Mining Based on the Whole Genome. *Mycobiology*, 51(1): 36–48.